

УДК 577.352

НОРМАЛЬНЫЕ ФЛУКТУАЦИИ ФОРМЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН КАК ФАКТОР СОПРЯЖЕНИЯ УПОРЯДОЧЕННЫХ МОНОСЛОЙНЫХ ДОМЕНОВ

© 2019 г. Т. Р. Галимзянов^{a, b}, М. А. Калущий^{a, b}, О. В. Кондрашов^{a, c}, К. В. Пинигин^{a, c},
Р. Ю. Молотковский^a, П. И. Кузьмин^a, О. В. Батищев^{a, c}, С. А. Акимов^{a, b, *}

^aИнститут физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН,
Россия, 119071, Москва, Ленинский просп., 31, стр. 5

^bНациональный исследовательский технологический университет “МИСиС”,
Россия, 119049, Москва, Ленинский просп., 4

^cМосковский физико-технический институт (государственный университет),
Россия, 141700, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

*e-mail: akimov@isis.ru

Поступила в редакцию 09.02.2019 г.

После доработки 14.02.2019 г.

Принята к публикации 15.02.2019 г.

Считается, что разделение липидного матрикса биологических мембран на упорядоченную и неупорядоченную фазы играет важную роль в латеральном распределении белков и трансмембранной передаче клеточных сигналов. В модельных липидных мембранах с симметричным составом по монослоям такое фазовое разделение всегда приводит к формированию бислойных доменов. Однако липидный состав внешнего и внутреннего монослоев плазматических мембран клеток различен, т.е. эти мембраны асимметричны. Механизм сопряжения монослойных доменов в бислойные структуры в клетках до сих пор остается невыясненным. Упорядоченный липидный домен толще окружающей мембраны, вследствие чего на его границе возникают упругие деформации. Упругая часть граничной энергии оказывается минимальной, когда монослойные домены располагаются один над другим. Тем не менее, этой движущей силы оказывается недостаточно для обеспечения сопряжения доменов: при некоторой доле площади мембраны, занимаемой доменами, упругая энергия может достигать минимума при антисимметричных конфигурациях (упорядоченный домен в верхнем монослое сопрягается с неупорядоченным монослоем окружающей мембраны). В качестве альтернативного фактора сопряжения мы рассмотрели тепловые изгибные флуктуации формы мембраны. Проведенный нами теоретический анализ упругих деформаций в асимметричном по составу монослоев липидном бислое показывает, что более жесткие липидные домены имеют тенденцию распределяться в области с меньшей кривизной монослоя; эти области естественным образом совпадают в противоположных монослоях. Таким образом, сопряжение упорядоченных доменов в разных монослоях обеспечивается их большей изгибной жесткостью по сравнению с окружающей мембраной. Одновременно большая упорядоченность приводит к латеральной конденсации: уменьшению средней площади, приходящейся на липидную молекулу. Различие в площади на молекулу липида в сосуществующих фазах мембраны, напротив, стремится разъединить бислойные домены на их монослойные составляющие части. Для количественной оценки энергии сопряжения упорядоченных доменов необходимо учитывать оба этих эффекта.

Ключевые слова: липидная мембрана, упорядоченный домен, линейное натяжение, тепловые флуктуации, теория упругости

DOI: 10.1134/S0233475519030058

ВВЕДЕНИЕ

Клеточные мембраны крайне латерально неоднородны. Различными методами установлено, что в них существуют липид-белковые домены, или кластеры, состав которых значительно отличается от среднего состава клеточной мембраны. Такие домены, обогащенные сфингомиелином,

иногда называются “рафтами” [1]. По-видимому, они играют существенную роль в передаче клеточных сигналов [2–4], апоптозе [5–7], эндоцитозе [1] и т.д. В настоящее время имеются довольно противоречивые сведения о характерном времени жизни таких доменов, их локализации с различными белками, а также липидном составе [8–12].

Трудность изучения доменов *in vivo* связана с их чрезвычайно малым размером (<200 нм) [9, 11], меньшим дифракционного предела видимого света. Это приводит к тому, что практически все экспериментальные данные о свойствах доменов в клеточных мембранах являются в большей или меньшей степени косвенными. В искусственных мембранах, содержащих основные липидные компоненты внешнего монослоя плазматической мембраны, при понижении температуры могут быть сформированы липидные домены микронных размеров [12–15]. Эти домены используются в качестве модели доменов клеточных мембран. В таких модельных системах было установлено, что липиды в доменах находятся в жидко-упорядоченном (L_o) состоянии, притом, что окружающая мембрана жидко-неупорядоченная (L_d).

В бислойных системах упорядоченные домены в противоположных монослоях практически всегда располагаются один над другим [12–15]. О природе сил, ответственных за сопряжение монослойных доменов в бислойные структуры, имеется несколько гипотез. В работах [16, 17] предполагалось, что сопряжение происходит за счет трансбислойной димеризации холестерина. Однако в более поздних работах показано, что жидко-упорядоченные домены необязательно обогащены холестерином по сравнению с окружающей мембраной [10, 11], и его трансбислойная димеризация не может приводить к сопряжению доменов. Высказывались предположения, что в клеточных мембранах сопряжение доменов может быть связано с наличием трансмембранных белков, но это не объясняет бислойность доменов в модельных мембранах, не содержащих белки. В подавляющем большинстве работ эффективное трансбислойное отталкивание жидко-упорядоченной и жидко-неупорядоченной фаз просто постулируется без указания его физических причин [18, 19].

Недавно нами был предложен возможный механизм сопряжения монослойных доменов, связанный с так называемым гидрофобным несоответствием [20, 21]. Экспериментально показано, что толщина бислоя L_o -фазы на 0.5–2 нм превосходит толщину L_d мембраны [22, 23]. Если бы сосуществующие фазы мембраны оставались плоскими и однородными вплоть до их границы, на границе был бы скачок толщины бислоя амплитудой 0.5–2 нм, обладающий высокой энергией вследствие неизбежного экспонирования гидрофобной части мембраны в воду. Предполагается, что на межфазной границе возникают упругие деформации, направленные на сглаживание такого скачка толщины. Показано, что энергия деформаций минимальна, если домены находятся не точно один над другим, а их границы сдвинуты друг относительно друга на несколько нанометров [20, 21]. Такой равновесный сдвиг границ

трудно наблюдать экспериментально, однако возможность его существования продемонстрирована в ряде работ методами молекулярной динамики [24–26]. При этом удаление границ монослойных доменов на большие расстояния друг от друга энергетически невыгодно. Таким образом, упругие деформации мембраны вблизи границы монослойных доменов могут обеспечивать их сопряжение в бислойную структуру с точностью до небольшого относительного сдвига границ.

В серии работ [18, 19] показано, что за счет сложной пространственной организации фаз L_o и L_d можно добиться того, что на большей части площади мембраны “симметричная” бислойная конфигурация L_o -фазы будет менее энергетически выгодна, чем “антисимметричная” конфигурация, в которой бислой состоит из монослоя L_o -фазы и монослоя L_d -фазы. Согласно нашим оценкам, при физических разумных значениях параметров системы это может происходить в диапазоне площади L_o -фазы от 47 до 53% от общей площади мембраны [27]. В то же время, насколько нам известно, экспериментально наблюдаемые домены L_o -фазы бислойны во всем диапазоне их относительных площадей. Переход в “антисимметричную” конфигурацию связан с масштабными перестройками мембраны и, в принципе, может быть затруднен кинетически. Однако критерий термодинамической стабильности при любой доли площади мембраны, занимаемой L_o -фазой, предполагает наличие альтернативного механизма сопряжения, не связанного с гидрофобным несоответствием монослоев L_o - и L_d -фаз на границе доменов.

В настоящей работе предложен механизм сопряжения монослойных доменов, основанный на различии упругих свойств L_o - и L_d -фаз, а именно, на различии их модулей изгиба. В ряде работ экспериментально установлено, что изгибная жесткость L_o -фазы в 2–5 раз превосходит изгибную жесткость L_d -фазы [28, 29]. Это означает, что изгибные тепловые флуктуации формы мембраны будут подавлены в области L_o -фазы. Стремление системы максимизировать площадь, доступную флуктуациям, должно приводить к совмещению монослойных доменов L_o -фазы, расположенных в разных монослоях, в бислойную структуру. Предлагаемая модель основана на простых физических принципах и не ограничена особенностями структуры границы упорядоченных доменов.

Ранее мы рассмотрели такой механизм сопряжения упорядоченных монослойных доменов в симметричной по липидному составу мембране, в которой физические свойства упорядоченных доменов одинаковы в обоих монослоях [30]. Однако два монослоя биологических мембран, как правило, имеют различный липидный состав [31]. В частности, наружный монослой плазматической

мембраны обогащен сфингомиелином, в нем преобладают фосфолипиды с насыщенными углеводородными цепями. Во внутреннем монослое больше липидов с ненасыщенными углеводородными цепями и отрицательно заряженных липидов [31]. Соответственно, предположение об одинаковости свойств упорядоченных доменов, расположенных в различных монослоях биологических мембран, по-видимому, не выполняется. В настоящей работе мы обобщили разработанную ранее модель на случай асимметричной по липидному составу мембраны.

ПОСТАНОВКА И РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ

Рассмотрим асимметричную по составу мембрану общей площади S_0 , каждый монослой которой содержит N_R доменов приблизительно одинаковой площади s_R каждый, так что при трансбислойном совмещении монослойных доменов в мембране может образоваться всего N_R бислойных доменов. Площадь L_o -фазы в каждом монослое равна $S_{0R} = N_R s_R$; предполагается, что S_{0R} меньше, чем половина общей площади мембраны S_0 , т.е. $S_{0R} < S_0/2$. Это условие важно лишь для простоты математических выкладок, однако расчеты легко обобщаются и на обратный случай. Площадь L_d -фазы в каждом монослое, соответственно, равна $S_{0S} = S_0 - N_R s_R$. Пусть часть монослойных L_o -доменов перекрывается с L_d -фазой в противоположном монослое. Обозначим количество таких перекрытий N_{int} , среднюю площадь каждого перекрытия — s_{int} . Таким образом, общая площадь всех перекрывающихся участков L_o/L_d равна $S_{int} = N_{int} s_{int}$ (рис. 1). Мы будем рассматривать мембрану в приближении Хельфриха [32], согласно которому мембрана считается бесконечно тонкой пленкой, характеризующейся модулем изгиба и не имеющей внутренней структуры. Асимметрия липидного состава мембраны по монослоям моделируется различными упругими характеристиками монослоев: модули изгиба L_o -фазы в верхнем и нижнем монослоях обозначим B_{1R} и B_{2R} соответственно; модули изгиба верхнего и нижнего монослоев L_d -фазы обозначим B_{1S} и B_{2S} . В рамках приближения Хельфриха модуль изгиба бислоя равен сумме модулей изгиба составляющих его монослоев. Таким образом, в рассматриваемой мембране имеются участки со следующими модулями упругости (рис. 1): 1) $2B_R = B_{1R} + B_{2R}$ в области совмещенных монослойных доменов L_o -фазы (площадь такой области $S_R = S_{0R} - S_{int}/2$); 2) $2B_S = B_{1S} + B_{2S}$ в области совмещенных монослоев L_d -фазы (площадь этой области $S_S = S_0 - S_{0R} - S_{int}/2$); 3) $2B_{int} = B_{1R} + B_{2S}$ в области, где бислой состоит из верхнего монослоя L_o -фазы и нижнего монослоя L_d -фазы (площадь

области $S_{int}/2$); 4) $2B_{2int} = B_{2R} + B_{1S}$ в области, где бислой состоит из нижнего монослоя L_o -фазы и верхнего монослоя L_d -фазы (площадь области $S_{int}/2$). Для общности введем также феноменологическое взаимодействие между монослоями L_o - и L_d -фаз, L_o и L_o , L_d и L_d в составе бислоя.

Введем декартову систему координат так, чтобы в основном состоянии мембрана совпадала с плоскостью xy ($z = 0$). Форма возмущенной мембраны описывается функцией $u(x, y)$ — отклонением формы мембраны от основного состояния. В приближении Хельфриха деформации считаются малыми [32], хотя для липидных мембран линейная теория упругости хорошо работает и при больших деформациях [33–38]. Полная энергия системы с точностью до слагаемых второго порядка по деформациям запишется следующим образом:

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

где Δ — оператор Лапласа, W_{int} — эффективная поверхностная плотность энергии взаимодействия монослоев L_o - и L_d -фаз, которая играет роль внешнего “поля”. Отрицательное значение этой плотности энергии означает отталкивание L_o - и L_d -фаз в противоположных монослоях. В первом слагаемом идет интегрирование по области бислойной L_o -фазы; во втором слагаемом — по области бислойной L_d -фазы; в третьем и четвертом слагаемых — по областям перекрытия монослоев L_o - и L_d -фаз. Здесь и далее мы будем рассматривать только макроскопические домены. В этом приближении можно пренебречь вкладами в энергию, возникающими от границ доменов, и вычислить каждый вклад (каждое слагаемое) в плотности энергии (1) в предположении бесконечно большого домена независимо от других вкладов.

Разложим функцию отклонения формы мембраны от плоского состояния $u(\mathbf{r})$ в ряд Фурье по координатам x и y : $u(\mathbf{r}) = \frac{h^2}{\sqrt{S}} \sum (u_{nm}) e^{-i\mathbf{q}_{nm}\mathbf{r}}$, где h — некоторый пространственный масштаб; $\mathbf{q}_{nm}$ — вектор с координатами $\left(\frac{2\pi n}{L_x}, \frac{2\pi m}{L_y}\right)$; L_x, L_y — размер рассматриваемой области мембраны по направлениям x и y соответственно; $S = L_x L_y$ — площадь рассматриваемой области, а сумма берется по всем векторам $\mathbf{q}_{nm}$, таким, что $|\mathbf{q}_{nm}| < q_{UV} = \frac{\pi}{a}$, где a — характерный размер, определяющий ультрафиоле-

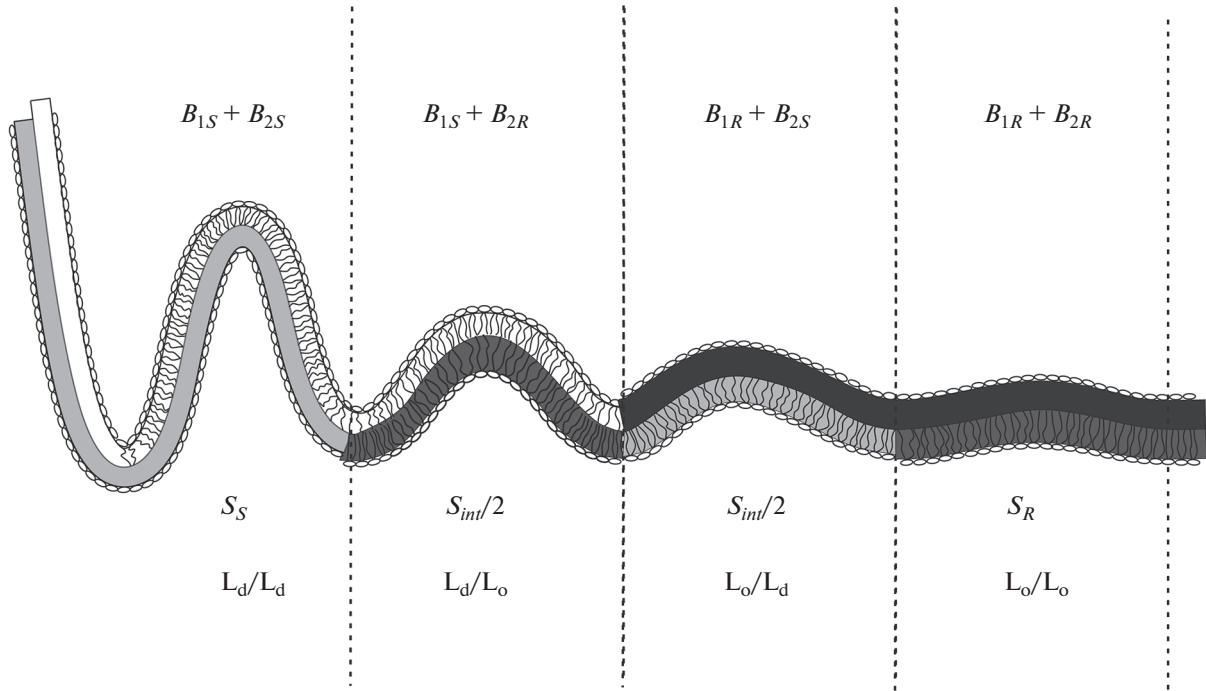


Рис. 1. Возможные комбинации монослоев упорядоченной и неупорядоченной фаз в асимметричной липидной мембране. L_o - и L_d -домены обладают различной изгибной жесткостью в верхнем и нижнем монослоях мембраны. Всего возможны четыре величины эффективного модуля изгиба бислоя; слева направо: (1) $2B_S = B_{1S} + B_{2S}$ в области совмещенных монослоев L_d -фазы (площадь этой области S_S); (2) $2B_{2int} = B_{1S} + B_{2R}$ в области, где бислоем состоит из нижнего монослоя L_o -фазы и верхнего монослоя L_d -фазы (площадь области $S_{int}/2$); (3) $2B_{1int} = B_{1R} + B_{2S}$ в области, где бислоем состоит из верхнего монослоя L_o -фазы и нижнего монослоя L_d -фазы (площадь области $S_{int}/2$); (4) $2B_R = B_{1R} + B_{2R}$ в области совмещенных монослойных доменов L_o -фазы (площадь такой области S_R).

товый предел волновых векторов, т.е. задающий максимально возможный волновой вектор, при котором еще можно использовать для мембраны модель сплошной среды. В используемых приближениях функционал деформационной энергии рассматриваемой области в представлении Фурье запишется в следующем виде:

$$\begin{aligned} W &= \int_S \frac{2B}{2} (\Delta u(\mathbf{r}))^2 d^2r = \\ &= \sum_{\frac{2\pi}{L} < \sqrt{q_n^2 + q_m^2} < q_{UV}} \frac{2B}{2} h^4 (q_n^2 + q_m^2)^2 |u_{nm}|^2 = \\ &= 2h^4 \frac{2B}{2} \sum_{\substack{\frac{2\pi}{L} < \sqrt{q_n^2 + q_m^2} < q_{UV}, \\ q_n > 0}} (q_n^2 + q_m^2)^2 |u_{nm}|^2, \end{aligned} \quad (2)$$

где $q_n = \frac{2\pi n}{L_x}$, $q_m = \frac{2\pi m}{L_y}$; здесь и ниже $B = B_S, B_R, B_{1int}, B_{2int}$. Во втором равенстве учтено, что функция $u(x, y)$ — вещественная. Для нахождения полной площади перекрытия L_o - и L_d -фаз необходимо вычислить среднее по всем возможным формам поверхности мембраны и площадям перекрытия фаз:

$$\langle S_{int} \rangle = \frac{\int_0^{\min\{2S_{0R}, 2S_{0S}\}} e^{-W/k_B T} S_{int} Du(\mathbf{r}) ds_{int}}{\int_0^{\min\{2S_{0R}, 2S_{0S}\}} e^{-W/k_B T} Du(\mathbf{r}) ds_{int}}, \quad (3)$$

где k_B — константа Больцмана; T — абсолютная температура. Обозначим функциональный интеграл по всем возможным формам мембраны через $Z_{def} = \int e^{-W/k_B T} Du(\mathbf{r})$. Интеграл по всем возможным формам мембраны можно выразить через произведение интегралов по действительным и мнимым частям коэффициентов разложения смещения u_{nm} в ряд Фурье, предварительно перейдя к безразмерному смещению для удобства вычислений. Интегрирование нужно производить лишь по половине переменных u_{nm} , поскольку смещение $u(x, y)$ вещественно:

$$\begin{aligned} Z_{def} &= \prod_{\substack{\frac{2\pi}{L} < \sqrt{q_n^2 + q_m^2} < q_{UV}, \\ q_n > 0}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{W}{k_B T}} d \operatorname{Im}(u_{nm}) d \operatorname{Re}(u_{nm}) = \\ &= \prod_{\substack{\frac{2\pi}{L} < \sqrt{q_n^2 + q_m^2} < q_{UV}, \\ q_n > 0}} \frac{\pi k_B T}{2h^4 B (q_n^2 + q_m^2)^2}. \end{aligned} \quad (4)$$

Двойное произведение можно вычислить, взяв от него логарифм, перейдя от произведения под логарифмом к суммированию соответствующих логарифмов, и затем от суммирования к интегрированию. Прделав это, получим эффективную свободную энергию флуктуаций мембраны:

$$\begin{aligned}
 -\frac{F_{\text{def}}}{k_B T} &\equiv \ln Z_{\text{def}} = \ln \prod_{\substack{2\pi < \sqrt{q_n^2 + q_m^2} < q_{UV}, \\ q_n > 0}} \frac{\pi k_B T}{2h^4 B (q_n^2 + q_m^2)^2} = \\
 &= \sum_{\substack{2\pi < \sqrt{q_n^2 + q_m^2} < q_{UV}, \\ q_n > 0}} \ln \frac{\pi k_B T}{2h^4 B (q_n^2 + q_m^2)^2} = \\
 &= \frac{1}{2} \int_{\substack{2\pi < \sqrt{q_x^2 + q_y^2} < q_{UV}}} \ln \left(\frac{\pi k_B T}{2h^4 B (q_x^2 + q_y^2)^2} \right) \times \\
 &\times \frac{dq_x}{(2\pi/L_x)} \frac{dq_y}{(2\pi/L_y)} = \frac{S}{2(2\pi)^2} \int_{2\pi/L}^{\pi/a} \ln \left(\frac{\pi k_B T}{2h^4 B q^4} \right) \times \\
 &\times 2\pi q dq = (L \gg a) = \frac{S}{2(2\pi)^2} \int_0^{\pi/a} \ln \left(\frac{\pi k_B T}{2h^4 B q^4} \right) \times \\
 &\times 2\pi q dq = -\frac{\pi S}{8a^2} \ln \left(\frac{e^2}{2\pi^3} \frac{a^4}{h^4} \frac{B}{k_B T} \right).
 \end{aligned} \quad (5)$$

Заметим, что параметр a имеет порядок латерального размера липидной молекулы, и a^2 пропорционально средней площади молекулы липида в соответствующей области мембраны. Поэтому мы будем различать этот параметр в различных областях мембраны, обозначая его соответствующими индексами. Закон сохранения полного числа частиц (липидных молекул) накладывает следующее ограничение:

$$\frac{1}{a_R^2} + \frac{1}{a_S^2} = \frac{1}{a_{\text{int}}^2} + \frac{1}{a_{2\text{int}}^2}. \quad (6)$$

Для простоты записей введем некоторый средний характерный латеральный размер липидной молекулы a_0 и будем считать, что $a_{\text{int}} = a_{2\text{int}} = a_{\text{int}}$. Перенормируем модули упругости следующим

образом: $\tilde{B} = k_B T \left(\frac{2\pi^3 h^4}{e^2} \frac{B}{a^4 k_B T} \right)^{\frac{\pi a_0^2}{8a^2}}$ для каждой из областей. Выражение (5) позволяет записать энергию системы W_{total} в виде:

$$\begin{aligned}
 W_{\text{total}} &= \alpha - \beta k_B T \frac{S_{\text{int}}}{2a_0^2}, \quad \text{где} \\
 \beta k_B T &= -2a_0^2 W_{\text{int}} + k_B T \ln \left(\frac{\tilde{B}_r \tilde{B}_s}{\tilde{B}_{\text{int}} \tilde{B}_{2\text{int}}} \right).
 \end{aligned} \quad (7)$$

Параметр α не входит в итоговое выражение для площади перекрытия монослоев L_o - и L_d -фаз S_{int} , поэтому здесь в явном виде не приводится. Урав-

нение (7) позволяет вычислить среднюю площадь перекрытия монослоев L_o - и L_d -фаз в явном виде.

$$\begin{aligned}
 \langle S_{\text{int}} \rangle &= \frac{\int_0^{\min\{2S_{0R}, 2S_{0S}\}} S_{\text{int}} e^{-W_{\text{total}}/(k_B T)} dS_{\text{int}}}{\int_0^{\min\{2S_{0R}, 2S_{0S}\}} e^{-W_{\text{total}}/(k_B T)} dS_{\text{int}}} = \\
 &= \frac{\min\{2S_{0R}, 2S_{0S}\}}{1 - e^{-\beta \min\{2S_{0R}, 2S_{0S}\}/2a_0^2}} - \frac{2a_0^2}{\beta}.
 \end{aligned} \quad (8)$$

Поскольку рассматриваются только макроскопические домены, то площадь домена, отнесенная к латеральной площади одной молекулы липида, является большой величиной, т.е. $\min\{S_{0R}, S_{0S}\}/a^2 \gg 1$, и выражение (8) можно переписать в следующем виде:

$$\langle S_{\text{int}} \rangle = \begin{cases} \min\{2S_{0R}, 2S_{0S}\}, & \beta > 0, \\ -\frac{2a_0^2}{\beta}, & \beta < 0, \end{cases} \quad (9)$$

т.е. при $\beta < 0$ перекрытие монослоев L_o - и L_d -фаз пренебрежимо мало по сравнению с площадью доменов ($S_{\text{int}} \ll \min\{S_R, S_S\}$), а при $\beta > 0$, L_o - и L_d -фазы перекрываются полностью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Приравнявая β нулю и используя условие сохранения числа частиц (6), мы окончательно находим критическую плотность энергии индуцированного взаимодействия W^* монослоев L_o - и L_d -фаз, при которой домены будут существовать исключительно в бислойном состоянии:

$$\begin{aligned}
 W^* &= -W_{\text{int}} (\beta = 0) = -\frac{k_B T}{2a_0^2} \ln \left(\frac{\tilde{B}_r \tilde{B}_s}{\tilde{B}_{\text{int}} \tilde{B}_{2\text{int}}} \right) = \\
 &= -\frac{k_B T}{2a_0^2} \ln \left(\frac{\left(\frac{a_0^4 B_R}{a_R^4 k_B T} \right)^{\frac{\pi a_0^2}{8a_R^2}} \left(\frac{a_0^4 B_S}{a_S^4 k_B T} \right)^{\frac{\pi a_0^2}{8a_S^2}}}{\left(\frac{a_0^4 B_{\text{int}}}{a_{\text{int}}^4 k_B T} \right)^{\frac{\pi a_0^2}{8a_{\text{int}}^2}} \left(\frac{a_0^4 B_{2\text{int}}}{a_{2\text{int}}^4 k_B T} \right)^{\frac{\pi a_0^2}{8a_{2\text{int}}^2}}} \right).
 \end{aligned} \quad (10)$$

В случае, когда упругие характеристики фаз одинаковы в противоположных монослоях ($B_{1R} = B_{2R} = B_R$, $B_{1S} = B_{2S} = B_S$, $a_{1R} = a_{2R} = a_{1S} = a_{2S} = a$), из формулы (10) следует уточненный нами, полученный ранее результат [30]:

$$W^* = \frac{\pi k_B T}{16 a^2} \ln \left(\frac{(B_S + B_R)^2}{4 B_R B_S} \right). \quad (11)$$

Выражение под логарифмом всегда больше единицы, поэтому $W^* > 0$, и, следовательно, $W_{\text{int}} < 0$; это означает, что L_o - и L_d -фазы в противополож-

ных монослоях отталкиваются, что эквивалентно эффективному притяжению доменов L_o -фазы в противоположных монослоях. В случае одинаковых параметров ультрафиолетовых пределов у всех фаз ($a_{1R} = a_{2R} = a_{1S} = a_{2S} = a$), получим выражение (10) в виде

$$W^* = \frac{\pi k_B T}{16 a^2} \ln \left(\frac{(B_{1R} + B_{2S})(B_{2R} + B_{1S})}{(B_{1R} + B_{2R})(B_{1S} + B_{2S})} \right). \quad (12)$$

Упорядоченная фаза в каждом из монослоев по своему определению имеет более высокий модуль изгиба, чем неупорядоченная фаза в том же монослое, т.е. $B_{1R} > B_{1S}$, $B_{2R} > B_{2S}$. Если считать, что разные фазы в противоположных монослоях лишь слабо напрямую взаимодействуют друг с другом, т.е. $|W_{\text{int}}| \ll k_B T$, то $\beta > 0$, и L_o -домены всегда будут бислойными. Таким образом, при слабом прямом взаимодействии между монослоями в мембране не могут образовываться макроскопические области, в которых один монослой находится в жидко-упорядоченном, а другой — в жидко-неупорядоченном состоянии. Учет асимметричности липидного состава мембраны не приводит к качественному изменению критической плотности энергии взаимодействия, а лишь к количественному уточнению величины этой энергии.

Рассмотрим эффект различия параметров ультрафиолетовых пределов в различных областях мембраны. Для упрощения анализа положим модули изгиба монослоев всех фаз равными некоторой величине B . Тогда выражение (10) с учетом условия сохранения числа частиц (6) преобразуется к следующему виду:

$$W^* = -\frac{\pi k_B T}{4} \left(\frac{1}{a_R^2} \ln \left(\frac{a_{\text{int}}}{a_R} \right) + \frac{1}{a_S^2} \ln \left(\frac{a_{\text{int}}}{a_S} \right) \right). \quad (13)$$

Раскладывая выражение (13) в ряд по малой разности $a_R - a_S$, получим:

$$W^* = -\frac{\pi k_B T}{8} \frac{(a_R - a_S)^2}{\left(\frac{a_R + a_S}{2} \right)^4}. \quad (14)$$

Таким образом, видно, что из-за разности $\delta = a_R - a_S$ характерных размеров, определяющих ультрафиолетовые пределы в L_o - и L_d -фазах, могут возникать силы, направленные на разделение бислойных упорядоченных доменов на монослойные, т.е. различие параметров ультрафиолетовых пределов имеет обратный эффект по сравнению с разностью модулей изгиба монослоев упорядоченной и неупорядоченной фаз.

Таким образом, мы показали, что изгибные флуктуации формы мембраны индуцируют сопряжение монослойных жидко-упорядоченных доменов в бислойные структуры. Это связано с тем, что оба монослоя имеют почти одинаковую локаль-

ную кривизну при любых флуктуациях формы межмонослойной (средней) поверхности мембраны. Для минимизации полной энергии системы жидко-упорядоченные домены, имеющие большую изгибную жесткость, склонны распределяться в участки с наименьшей кривизной, совпадающие в противоположных монослоях. Это приводит к тому, что монослойные L_o -домены, отличающиеся по изгибной жесткости от фоновой L_d -фазы, сопрягаются друг с другом в противоположных монослоях. Движущая сила сопряжения — различие изгибных жесткостей участков мембраны — является общей, в том смысле, что проявляется независимо от природы возникновения доменов, их состава и т.д. Предложенный механизм позволяет также объяснить сопряжение полипептидов, адсорбированных на разных поверхностях мембраны [39]. Однако существенное различие площади на молекулу для липидов, составляющих L_o - и L_d -фазу, может индуцировать обратное разделение бислойных доменов на их монослойные части. Таким образом, в реальных системах оба эти фактора необходимо учитывать при количественной оценке энергии сопряжения монослойных доменов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, а также при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 17-00-00488 и № 18-04-01363).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. **387**, 569–572.
2. Bocharov E.V., Mineev K.S., Pavlov K.V., Akimov S.A., Kuznetsov A.S., Efremov R.G., Arseniev A.S. 2017. Helix-helix interactions in membrane domains of biotopic proteins: Specificity and role of lipid environment. *Biochim. Biophys. Acta*. **1859**, 561–576.
3. Kabouridis P.S., Janzen J., Magee A.L., Ley S.C. 2000. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **30**, 954–963.
4. Grassme H., Jekle A., Riehle A., Schwarz H., Berger J., Sandho K., Kolesnick R., Gulbins E. 2001. CD95 signaling via ceramide rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **276**, 20589–20596.
5. Burek C., Roth J., Koch H.G., Harzer K., Los M., Shlutze-Osthoff K. 2001. The role of ceramide in receptor- and stress-induced apoptosis studied in acidic ceramidase Farber disease cells. *Oncogene*. **20**, 6493–6502.
6. Hueber A.O., Bernard A.M., Herincs Z., Couzinet A., He H.T. 2002. An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes. *EMBO Rep.* **3**, 190–196.
7. Молотковская И.М., Свищевская Е.В., Литвинов И.С., Михалев И.И., Дятловицкая Э.В., Молотковский Ю.Г., Бергельсон Л.Д. 1992. Исследование иммуносупрессорных свойств гликофинголипидов. Изучение взаимодействия интерлейкина-2

- с ганглиозидами на клетках и в модельных системах. *Биол. мембраны*. **9**, 143–151.
8. Honerkamp-Smith A.R., Cicuta P., Collins M.D., Veatch S.L., den Nijs M., Schick M., Keller S.L. 2008. Line tensions, correlation lengths, and critical exponents in lipid membranes near critical points. *Biophys. J.* **95**, 236–246.
 9. Lillemeier B.F., Pfeiffer J.R., Surviladze Z., Wilson B.S., Davis M.M. 2006. Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 18992–18997.
 10. Ayuyan A.G., Cohen F.S. 2008. Raft composition at physiological temperature and pH in the absence of detergents. *Biophys. J.* **94**, 2654–2666.
 11. Frisz J.F., Klitzing H.A., Lou K., Hutcheon I.D., Weber P.K., Zimmerberg J., Kraft M.L. 2013. Sphingolipid domains in the plasma membranes of fibroblasts are not enriched with cholesterol. *J. Biol. Chem.* **288**, 16855–16861.
 12. Veatch S.L., Polozov I.V., Gawrisch K., Keller S.L. 2004. Liquid domains in vesicles investigated by NMR and fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **86**, 2910–2922.
 13. Samsonov A.V., Mihalyov I., Cohen F.S. 2001. Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys. J.* **81**, 1486–1500.
 14. 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.
 15. Ayuyan A.G., Cohen F.S. 2006. Lipid peroxides promote large rafts: Effects of excitation of probes in fluorescence microscopy and electrochemical reactions during vesicle formation. *Biophys. J.* **91**, 2172–2183.
 16. Rukmini R., Rawat S.S., Biswas S.C., Chattopadhyay A. 2001. Cholesterol organization in membranes at low concentrations: Effects of curvature stress and membrane thickness. *Biophys. J.* **81**, 2122–2134.
 17. Harris J.S., Epps D.E., Davio S.R., Kezdy F.J. 1995. Evidence for transbilayer, tail-to-tail cholesterol dimers in dipalmitoylglycerophosphocholine liposomes. *Biochemistry* **34**, 3851–3857.
 18. Williamson J.J., Olmsted P.D. 2015. Registered and antiregistered phase separation of mixed amphiphilic bilayers. *Biophys. J.* **108**, 1963–1976.
 19. Williamson J.J., Olmsted P.D. 2015. Nucleation of symmetric domains in the coupled leaflets of a bilayer. *Soft Matter*. **11**, 8948–8959.
 20. Галимзянов Т.Р., Молотковский Р.Ю., Кузьмин П.И., Акимов С.А. 2011. Стабилизация бислоидной структуры рафтов за счет упругих деформаций мембраны. *Биол. мембраны*. **28**, 307–314.
 21. 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.
 22. Rinia H.A., Snel M.M., van der Eerden J.P., de Kruijff B. 2001. Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Lett.* **501**, 92–96.
 23. Galimzyanov T.R., Lyushnyak A.S., Aleksandrova V.V., Shilova L.A., Mikhalyov I.I., Molotkovskaya I.M., Akimov S.A., Batishchev O.V. 2017. Line activity of ganglioside GM1 regulates the raft size distribution in a cholesterol-dependent manner. *Langmuir*. **33**, 3517–3524.
 24. Risselada H.J., Marrink S.J. 2008. The molecular face of lipid rafts in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 17367–17372.
 25. Perlmutter J.D., Sachs J.N. 2011. Interleaflet interaction and asymmetry in phase separated lipid bilayers: Molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 6563–6577.
 26. Pantano D.A., Moore P.B., Klein M.L., Discher D.E. 2011. Raft registration across bilayers in a molecularly detailed model. *Soft Matter*. **7**, 8182–8191.
 27. Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J., Cohen F.S., Pohl P., Akimov S.A. 2016. Comment on “Elastic membrane deformations govern interleaflet coupling of lipid-ordered domains” Reply. *Phys. Rev. Lett.* **116**, 079802.
 28. Pan J., Tristram-Nagle S., Nagle J.F. 2009. Effect of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation. *Phys. Rev. E*. **80**, 021931.
 29. Baumgart T., Das S., Webb W.W., Jenkins J.T. 2005. Membrane elasticity in giant vesicles with fluid phase coexistence. *Biophys. J.* **89**, 1067–1080.
 30. Galimzyanov T.R., Kuzmin P.I., Pohl P., Akimov S.A. 2017. Undulations drive domain registration from the two membrane leaflets. *Biophys. J.* **112**, 339–345.
 31. 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**, 14 554–14 559.
 32. Helfrich W. 1973. Elastic properties of lipid bilayers: Theory and possible experiments. *Z. Naturforsch. C* **28**, 693–703.
 33. Harmandaris V.A., Deserno M. 2006. A novel method for measuring the bending rigidity of model lipid membranes by simulating tethers. *J. Chem. Phys.* **125**, 204 905.
 34. 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.
 35. 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.
 36. 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**, P. 12509.
 37. 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.
 38. 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.
 39. Horner A., Antonenko Y.N., Pohl P. 2009. Coupled diffusion of peripherally bound peptides along the outer and inner membrane leaflets. *Biophys. J.* **96**, 2689–2695.

Normal Fluctuations of Biological Membrane Shape as a Coupling Factor for Ordered Monolayer Domains

T. R. Galimzyanov^{1,2}, M. A. Kalutsky^{1,2}, O. V. Kondrashov^{1,3}, K. V. Pinigin^{1,3},
R. J. Molotkovsky¹, P. I. Kuzmin¹, O. V. Batishchev^{1,3}, and S. A. Akimov^{1,2,*}

¹*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences,
Leninskiy pr. 31/5, Moscow, 119071 Russia*

²*National University of Science and Technology "MISiS",
Leninskiy pr. 4, Moscow, 119049 Russia*

³*Moscow Institute of Physics and Technology (State University),
Moscow oblast, Dolgoprudnyy, 141700 Russia*

*e-mail: akimov@isis.ru

It is believed that separation of lipid matrix of biological membranes into ordered and disordered phases plays an important role in the lateral distribution of proteins and transduction of cellular signals through the plasma membrane. In model lipid membranes with symmetric composition of monolayers, such phase separation, always leads to formation of bilayer domains. However, the lipid composition of outer and inner monolayers of the plasma membranes of cells is different, i.e., these membranes are asymmetric. The mechanism of coupling of monolayer domains into bilayer structures in cells still remains unexplained. The ordered lipid domain is thicker than the surrounding membrane; as a result, elastic deformations occur at their boundary. Minimization of the elastic part of the boundary energy contributes to the coupling of monolayer domains in opposite monolayers. However, this driving force is not enough to ensure that domains will come into register: at a certain fraction of the membrane area occupied by the domains, the elastic energy can reach the minimum in antisymmetric configurations (the ordered domain in the upper monolayer is opposed by disordered monolayer of the surrounding membrane). As an alternative factor of the coupling, we considered curvature thermal fluctuations of the membrane shape. Our theoretical analysis of elastic deformations in a lipid bilayer that is asymmetric in monolayer composition shows that more rigid lipid domains tend to distribute into the region with lower curvature of the monolayer; these regions naturally coincide in opposite monolayers. Thus, the coupling of ordered domains in different monolayers is provided by their greater bending stiffness as compared to the surrounding membrane. At the same time, greater ordering leads to lateral condensation, i.e., to the decrease of the average area per lipid molecule. The difference in area per lipid molecule in the coexisting membrane phases, on the contrary, tends to separate bilayer domains into their monolayer components. To quantify the coupling energy of ordered domains, it is necessary to take both of these effects into account.

Keywords: lipid membrane, ordered domain, line tension, thermal fluctuations, theory of elasticity