

УДК 577.352

КОНФИГУРАЦИИ ГРАНИЦЫ УПОРЯДОЧЕННОГО ДОМЕНА В ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЕ НА ТВЕРДОЙ ПОДЛОЖКЕ

© 2021 г. Т. Р. Галимзянов^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 03.03.2021 г.

После доработки 18.03.2021 г.

Принята к публикации 19.03.2021 г.

Латеральное распределение белков и липидов в плазматических мембранах клеток млекопитающих неоднородно. Липид-белковые домены, обогащенные сфингомиелином и холестерином, называют рафтами. Размер рафтов клеточных мембран чрезвычайно мал, что существенно затрудняет их экспериментальное исследование. В модельных мембранах, липидный состав которых близок к составу плазматической мембраны, возможно образование упорядоченных доменов в результате фазового разделения, индуцируемого понижением температуры. Эффективным методом исследования модельных рафтов является атомно-силовая микроскопия, позволяющая регистрировать домены, размер которых меньше дифракционного предела видимого света. Однако этот метод предполагает нанесение мембраны на твердую подложку. За счет электростатических, ван-дер-ваальсовых и гидратационных взаимодействий с подложкой ближайший к ней монослой мембраны оказывается в физических условиях, отличных от условий, в которых находится удаленный от подложки монослой. Вследствие асимметрии физических условий изменяется структура и энергия границы рафта. В результате, из двух возможных состояний границы равной энергии в свободной мембране на подложке практически реализуется только одно. Это может приводить к изменению эффективности специфических линейно-активных липидов, накапливающихся на границе доменов и регулирующих их размер за счет понижения энергии границы, аналогично действию поверхностно-активных веществ в трехмерных системах.

Ключевые слова: липидная мембрана, упорядоченный домен, атомно-силовая микроскопия, твердая подложка, гидратационное отталкивание, теория упругости

DOI: 10.31857/S0233475521040046

ВВЕДЕНИЕ

Внешние оболочки животных клеток представляют собой липидные мембраны с погруженными в них белковыми молекулами. Как липидный, так и белковый состав мембран очень разнообразен — клеточные цитоплазматические мембраны содержат порядка ста видов различных липидов и сотни видов различных белков [1, 2]. Было показано, что латеральное распределение липидов и мембранных белков крайне неоднородно. Липиды и белки могут формировать специфические домены, состав которых существенно отличается от среднего состава мембраны. Одним из видов таких доменов являются так называемые рафты — домены, обогащенные сфингомиелином и холестерином [3], относительно устойчивые к действию неионных детергентов [4, 5]. Большой интерес к исследованию рафтов связан с тем, что содержащиеся в них белки принимают активное участие в таких жизненно важных процессах, как

внутриклеточная передача сигналов [6], инфицирование клеток оболочечными вирусами [7], кавеолин-зависимый эндоцитоз [4], дефосфорилирование [8] и т.д. Для нормального функционирования белков требуется специфическое микроокружение, которое обеспечивается в рафтах благодаря специфическому липидному составу и их физико-химическим свойствам. При экстракции из плазматической мембраны холестерина, приводящей к разрушению рафтов [5], протекание некоторых клеточных процессов изменяется [9]. Экспериментальное исследование рафтов *in vivo* затруднительно из-за сложного состава клеточных мембран и относительно малого размера доменов, который составляет 10–200 нм [10–12]. Однако в модельных чисто липидных мембранах в результате фазового разделения в жидко-неупорядоченной (L_d) мембране могут формироваться жидко-упорядоченные (L_o) домены микронных размеров, которые используются в качестве мо-

дели клеточных рафтов и которые могут быть исследованы различными экспериментальными методами [13–16].

Одним из эффективных инструментов исследования мембранных доменов является атомно-силовая микроскопия (АСМ). В отличие от флуоресцентной микроскопии разрешение АСМ не ограничено дифракционным пределом видимого света. В АСМ экспериментах было установлено, что домены в плоскости мембраны, как правило, имеют форму круга, т.е., по-видимому, липид в них находится в жидком состоянии. Толщина L_0 -бислоя на 1–2 нм больше толщины окружающей мембраны. Методами флуоресцентной микроскопии было обнаружено, что в модельных мембранах домены практически всегда имеют бислойную структуру, т.е. располагаются в моно-слоях мембраны один под другим [14, 16–18]. Ранее было показано [19], что одной из возможных причин стабилизации бислойной структуры L_0 -доменов могут являться упругие деформации мембраны, возникающие на границе домена для компенсации разности толщин бислоев. Если бы при скачке толщины бислоя на границе домена в 1–2 нм мембрана оставалась бы недеформированной, это привело бы к контакту гидрофобной зоны мембраны с водой или с липидными полярными группами и, как следствие, к большой величине линейного натяжения границы – 20–40 пН. В такой ситуации энергетически выгодно деформировать мембрану на границе таким образом, чтобы полностью сгладить скачок толщины и обеспечить непрерывность поверхности мембраны. При этом с точки зрения минимизации энергии деформаций оказывается выгоден небольшой относительный сдвиг границ монослойных доменов, составляющих бислойный рафт, на величину 2–4 нм. Эти результаты, полученные в теоретических работах [19–21], подтверждаются данными молекулярного моделирования методами молекулярной динамики [22, 23]. Энергетически выгодно формирование бислойных доменов таких, что радиусы составляющих их монослойных соседних доменов в разных монослоях отличаются на 2–4 нм. Для определенности, бислойный L_0 -домен будем называть рафтом; таким образом, рафт состоит из двух монослойных L_0 -доменов. В экспериментах с гигантскими липосомами, мембранами Мюллера–Рудина и т.д. монослои мембраны одинаковы и находятся в практически идентичных условиях. Поэтому при фазовом разделении площади образующейся L_0 -фазы в обоих монослоях должны совпадать. Однако в АСМ мембрана наносится на твердую слюдяную подложку. Липидный монослой, прилегающий к подложке, находится в физических условиях, отличающихся от физических условий, в которых находится противоположный монослой, обращенный в объем-

ную водную фазу. Исследованию некоторых эффектов, возникающих вследствие такой асимметрии граничных условий, посвящена настоящая работа.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

В работе [24] было рассмотрено взаимодействие плоской мембраны с локально сферическим зондом в АСМ экспериментах. Сферичность зонда учитывалась в рамках теории Дерягина [25]. Считалось, что сила взаимодействия включает электростатическое взаимодействие мембраны с отрицательно заряженным зондом и ван-дер-ваальсово притяжение. Известно, что как у слюды, так и у полярных головок липидных молекул имеются гидратные оболочки, состоящие из частично ориентированных молекул воды; эти гидратные оболочки взаимно отталкиваются [26]. По аналогии с расчетом взаимодействия мембраны и зонда можно рассчитать взаимодействие мембраны и плоской подложки. С учетом электростатических взаимодействий, ван-дер-ваальсова притяжения и гидратационного отталкивания, полная сила взаимодействия мембраны с плоской заряженной подложкой, отнесенная к единице площади, может быть записана в виде [24, 26]:

$$f = \frac{2\sigma_m\sigma_p}{\epsilon_0\epsilon_w}e^{-\frac{z}{l_D}} - \frac{H_a}{12\pi l_D z^2} + P_0 e^{-\frac{z}{l_h}}, \quad (1)$$

где z – координата вдоль оси, перпендикулярной подложке; σ_m – поверхностная плотность заряда мембраны; σ_p – поверхностная плотность заряда подложки; ϵ_0 – диэлектрическая проницаемость вакуума; ϵ_w – диэлектрическая проницаемость воды; l_D – длина Дебая электролита; H_a – константа Гамакера, $H_a \approx (3-10) \times 10^{-21}$ Дж; P_0 – расклинивающее давление, $P_0 \approx 4 \times 10^7-10^{10}$ Па; l_h – характерная длина гидратационного отталкивания, $l_h \approx 0.1-0.3$ нм [27]. Первое слагаемое в выражении (1) соответствует электростатическим взаимодействиям, второе слагаемое – ван-дер-ваальсовым, третье слагаемое – гидратационным. Свободная энергия взаимодействия мембраны и подложки, отнесенная к единице площади, может быть найдена согласно соотношению:

$$w(H) = \int_H^\infty f dz = \frac{2l_D\sigma_m\sigma_p}{\epsilon_0\epsilon_w}e^{-\frac{H}{l_D}} - \frac{H_a}{12\pi l_D H} + P_0 l_h e^{-\frac{H}{l_h}}, \quad (2)$$

где H – расстояние от подложки до мембраны. При физически разумных значениях параметров эта энергия имеет минимум, однако положение минимума H_0 не может быть найдено аналитически. Разлагая энергию в окрестности точки H_0 до второго порядка, найдем эффективный квадратичный потенциал, в котором находится мембрана:

$$w \approx \frac{k_h}{2} (H - H_0)^2 = w_h. \quad (3)$$

Для численной оценки коэффициента k_h будем считать, что мембрана находится в бинарном электролите с концентрацией 100 мМ. Дебаевская длина l_D находится согласно выражению:

$$l_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_w k_B T}{e^2 J}}, \quad (4)$$

где e — заряд электрона; J — ионная сила раствора; k_B — константа Больцмана; T — абсолютная температура. В рассматриваемом случае 100 мМ бинарного электролита $J = 1.2 \times 10^{26} \text{ м}^{-3}$ и $l_D \approx 1 \text{ нм}$. Считая, что мембрана не содержит заряженных компонентов, т.е. $\sigma_m = 0$, поверхностная плотность заряда подложки $\sigma_p = -0.032 \text{ Кл/м}^2$ [24], $\epsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12} \text{ Ф/м}$, $\epsilon_w = 81$, заряд электрона $e = 1.6 \times 10^{-19} \text{ Кл}$, $l_h = 0.2 \text{ нм}$, $P_0 = 4 \times 10^7 \text{ Н/м}^2$ [27], $H_a = 5 \times 10^{-21} \text{ Дж}$ [24], для крутизны потенциала получается значение $k_h = 0.3 \times 10^{15} \text{ Дж/м}^4 = 0.08 k_B T/\text{нм}^4$ ($k_B T \approx 4 \times 10^{-21} \text{ Дж}$). Минимуму энергии w_h соответствует расстояние между подложкой и мембраной $H_0 \approx 1 \text{ нм}$. При вариации характерной длины гидратационного отталкивания в диапазоне $l_h = 0.1\text{--}0.3 \text{ нм}$ [27] крутизна потенциала варьирует в диапазоне $k_h = 1.13\text{--}0.02 k_B T/\text{нм}^4$, а положение равновесия — $H_0 = 0.4\text{--}2 \text{ нм}$. При этом значения характерной длины гидратационного отталкивания l_h и, соответственно, параметров k_h и H_0 , сильно зависят от химической структуры и поверхностной плотности липидных головок и могут быть разными при взаимодействии с подложкой монослойного домена и окружающей его мембраны. Заряд мембраны также существенно влияет на потенциал адгезии липидной мембраны к подложке. Если считать, что мембрана содержит 20 мол.% отрицательно заряженного липида (например, диолеоилфосфатидилсерина), то крутизна потенциала при $l_h = 0.2 \text{ нм}$ станет равна $k_h \approx 0.0003 k_B T/\text{нм}^4$, а равновесное расстояние $H_0 \approx 10 \text{ нм}$. В этом случае энергия взаимодействия мембраны с подложкой, по-видимому, недостаточна, чтобы удержать мембрану на слюде без добавления, например, кальция, образующего “мостики” между электрическим зарядами слюды и мембраны.

Таким образом, вблизи твердой подложки незаряженная или слабо заряженная мембрана оказывается в потенциале, минимум которого расположен на некотором расстоянии H_0 от подложки. Это налагает на систему дополнительные граничные условия. В частности, если в мембране сосуществуют макроскопические фазы с разной толщиной бислоя, то эффективный измеряемый методом АСМ перепад толщины на границе фаз должен быть бислойный, а не монослойный, как в случае свободной мембраны, поскольку вдали от границы домена $H = H_0$ для обеих фаз (рис. 1),

при условии, что фазы одинаково взаимодействуют с подложкой. Кроме того, новое граничное условие приводит к изменению энергии границы рафта, т.е. ее линейного натяжения, что, в свою очередь, должно влиять на распределение рафтов по размерам [28]. Ниже вычисляется линейное натяжение границы рафта в случае мембраны, находящейся вблизи твердой подложки.

РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ

Будем считать, что рафт представляет собой совокупность двух монослойных доменов, расположенных в разных монослоях мембраны; положения границ доменов могут не совпадать. Для простоты рассмотрим случай рафта большого радиуса, такого, что кривизной границ составляющих его доменов локально можно пренебречь и приближенно считать границы прямыми линиями. В этом случае система обладает трансляционной симметрией вдоль границы рафта. Деформации мембраны вблизи границ монослойных доменов будем описывать в рамках теории упругости жидких кристаллов, адаптированной к липидным мембранам [29]. Средняя ориентация липидных молекул характеризуется векторным полем единичных векторов $\mathbf{n}$, называемых директорами. Будем учитывать две основные моды упругих деформаций — поперечный изгиб и наклон. Деформация изгиба характеризуется дивергенцией директора вдоль поверхности монослоя, деформация наклона характеризуется разностью директора и единичной нормали $\mathbf{N}$ к поверхности монослоя. Деформации предполагаются малыми, и поверхностная плотность энергии монослоя вычисляется в квадратичном приближении по ним согласно выражению [29]:

$$w = \frac{B}{2} (\text{div } \mathbf{n})^2 + \frac{K_t}{2} (\mathbf{n} - \mathbf{N})^2, \quad (5)$$

где B — модуль изгиба; K_t — модуль наклона. Для нижнего монослоя помимо упругой энергии необходимо учесть также взаимодействие с подложкой согласно выражению (3). Полная энергия верхнего (W_u) и нижнего (W_d) монослоев, таким образом, может быть записана в виде:

$$W_u = \int w_u dS_u, \quad W_d = \int (w_d + w_h) dS_d. \quad (6)$$

Здесь и ниже индексы “ u ” и “ d ” относятся к верхнему и нижнему монослоям соответственно; интегрирование ведется по поверхности соответствующего монослоя. Полная энергия бислойной мембраны дается выражением:

$$W = W_u + W_d. \quad (7)$$

Минимизация функционала (7) по распределению директора в верхнем и нижнем монослоях и форме межмонослойной поверхности приводит к системе линейных дифференциальных уравне-

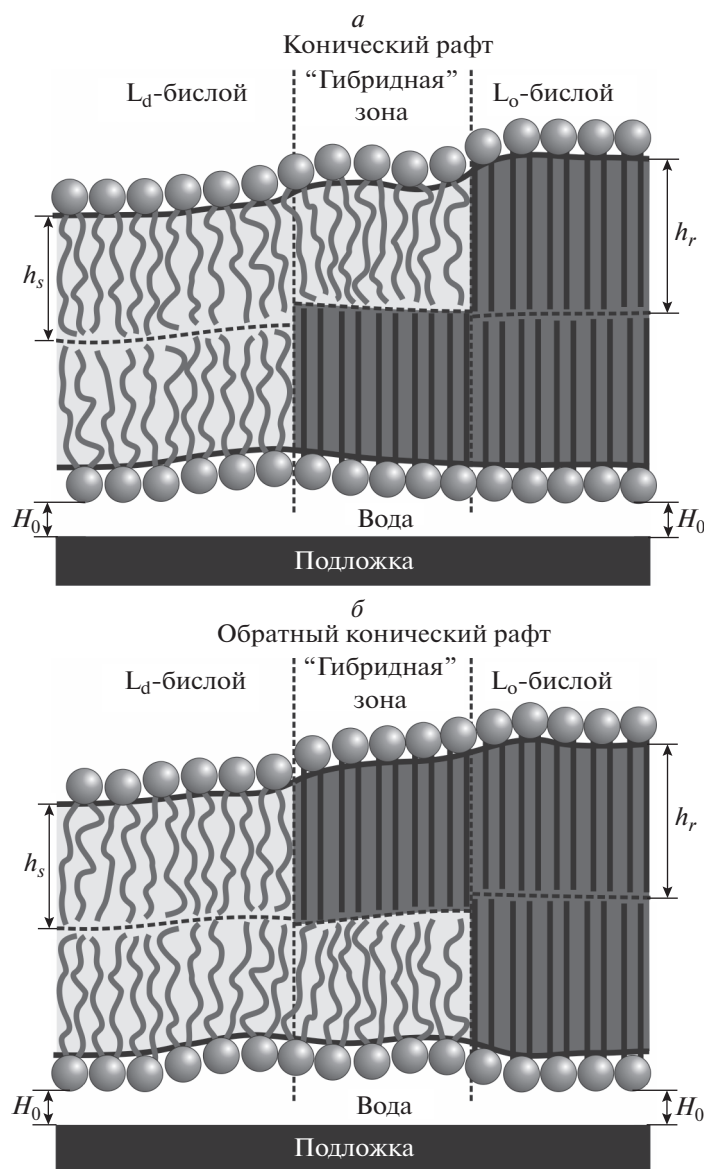


Рис. 1. Структура границы рафта в мембране, нанесенной на твердую подложку. Упорядоченные домены (толщина монослоя h_r) закрашены темно-серым цветом, неупорядоченная мембрана (толщина монослоя h_s) — светло-серым цветом; H_0 — равновесная толщина слоя воды между нижним монослоем мембраны и подложкой. Между бислойными L_o - и L_d -фазами расположена “гибридная” зона, в которой один монослой упорядоченный, а другой — неупорядоченный. Возможны две конфигурации гибридной зоны в зависимости от состояния ближайшего к подложке монослоя: упорядоченный (а) и неупорядоченный (б). Этим двум конфигурациям гибридной зоны соответствует “конический” рафт (а) и “обратный конический” рафт (б).

ний Эйлера–Лагранжа. Обозначим толщину монослоя L_o -домена h_r , а толщину L_d -монослоя окружающей мембраны — h_s . При условии возможного латерального сдвига границ монослойных доменов, расположенных в противоположных монослоях, вариационные уравнения необходимо решить в трех зонах, характеризующихся различным соотношением толщин монослоев (рис. 1): 1) бислойная L_d -мембрана, $h_u = h_s$, $h_d = h_s$; 2) переходная зона “гибридного” бислоя, $h_u = h_s$,

$h_d = h_r$ (рис. 1а) либо $h_u = h_r$, $h_d = h_s$ (рис. 1б); 3) бислойный L_o -домен, $h_u = h_r$, $h_d = h_r$.

Решения дифференциальных уравнений Эйлера–Лагранжа содержат неопределенные коэффициенты, которые находятся из следующих граничных условий: 1) деформации ограничены и затухают при удалении от границы рафта, 2) директор непрерывен в каждом из монослоев, 3) поверхность каждого монослоя непрерывна. Оставшиеся после подстановки этих граничных условий неопределенные коэффициенты находятся

путем минимизации по ним полной энергии системы (7). В силу трансляционной симметрии системы вдоль границы рафта энергию будем относить к единице длины вдоль границы, т.е. вычислять линейное натяжение границы рафта. Более подробно алгоритм вычисления изложен в Приложении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения количественных результатов будем использовать следующие численные значения параметров: модуль изгиба $B = 10 k_B T$ (на один монослой) [30], модуль наклона $K_t = 40$ мН/м (на один монослой) [29], толщина монослоя рафта $h_r = 1.8$ нм, толщина монослоя окружающей мембраны $h_s = 1.3$ нм [22, 23].

На рис. 2а представлена зависимость линейного натяжения от величины относительного сдвига границ монослойных доменов, составляющих бислойный рафт (от ширины гибридной зоны, L), в случае “свободной” мембраны, т.е. мембраны, находящейся вдали от подложки, для которой $k_h = 0$. Из графика видно, что в этом случае минимальной граничной энергии соответствует конфигурация, в которой расстояние между границами монослойных доменов составляет некоторую конечную величину ($L \approx 3$ нм на рис. 2а). Подобный равновесный сдвиг границ монослойных доменов, составляющих бислойный рафт, наблюдался в ряде работ методами молекулярной динамики [22, 23]. Этот же результат был получен нами в предшествующих теоретических работах [19–21]. Из зависимости рис. 2а следует, что упругие деформации, возникающие на границе рафта при компенсации гидрофобного несоответствия, стабилизируют его бислойную структуру с точностью до небольшого сдвига границ ~ 3 нм. Кроме того, при отражении свободной мембраны относительно плоскости межмонослойной поверхности структура границы рафта и, следовательно, энергия деформаций мембраны остаются неизменными, т.е. конфигурации конического рафта и обратного конического рафта имеют одинаковую энергию. Иными словами, в симметричной по липидному составу монослоев свободной мембране, расположенной далеко от подложки, при условии равенства площадей L_o -фазы в обоих монослоях с точки зрения минимизации граничной энергии выгодно формирование ансамбля рафтов, такого, что у половины рафтов нижний домен имеет радиус на 3 нм больший, чем верхний (конический рафт), а у другой половины — верхний домен имеет радиус на 3 нм больший, чем нижний (обратный конический рафт) (рис. 1). Более точный расчет энергии круглых доменов, подтверждающий этот вывод, проделан в работе [20].

Наличие подложки нарушает симметрию границы рафта. На рис. 2б–2г приведена зависимость граничной энергии бислойного рафта от разности координат границ верхнего и нижнего монослойных доменов при различных значениях длины гидратационного отталкивания l_h упорядоченной фазы. Значение l_h определяется средней степенью гидратации полярных головок липидов, которая, в свою очередь, определяется их химической структурой и поверхностной плотностью. Различия параметров в L_o - и L_d -фазах обусловлены различной концентрацией сфингомиелина, предположительно ослабляющего гидратационное отталкивание L_o -фазы и слюдяной подложки. Мы рассмотрели три значения длины гидратационного отталкивания L_o -фазы: $l_h = 0.1$ нм (рис. 2б), $l_h = 0.2$ нм (рис. 2в) и $l_h = 0.3$ нм (рис. 2г), зафиксировав при этом $l_h = 0.1$ нм для L_d -фазы окружающей мембраны. При данных значениях длины гидратационного отталкивания получаются следующие величины жесткости потенциала k_h и равновесного расстояния H_0 : $l_h = 0.1$ нм соответствует $k_h = 1.1 k_B T/\text{нм}^4$ и $H_0 = 0.37$ нм; $l_h = 0.2$ нм соответствует $k_h = 0.07 k_B T/\text{нм}^4$ и $H_0 = 1.2$ нм; $l_h = 0.3$ нм соответствует $k_h = 0.02 k_B T/\text{нм}^4$ и $H_0 = 2.2$ нм. На каждом графике изображены зависимости энергии от ширины гибридной зоны L для конического и обратного конического рафтов (рис. 2). Из приведенных графиков видно, что оптимальная ширина переходной области ~ 3 нм слабо зависит от величины l_h и конфигурации границы. Также видно, что при взаимодействии с подложкой появляется асимметрия, т.е. при одинаковой ширине переходной области линейное натяжение границы конического рафта будет отличаться от линейного натяжения границы обратного конического рафта. При оптимальной ширине переходной области ($L \approx 3$ нм) линейное натяжение границы конического рафта оказывается выше линейного натяжения границы обратного конического рафта (рис. 2б–2г).

Несмотря на небольшое различие в энергии различных типов границ, оно может приводить к существенному дисбалансу количества конических и обратных конических рафтов. Рассмотрим систему при $l_h = 0.3$ нм (рис. 2г). При оптимальной ширине гибридной зоны линейное натяжение границы обратного конического рафта равно $0.52 k_B T/\text{нм}$, конического рафта — $0.59 k_B T/\text{нм}$. Таким образом, разница погонной энергии границы в этих двух конфигурациях составляет $0.07 k_B T/\text{нм}$. Для рафта диаметром 10 нм это соответствует разности энергий $E = \pi \times 10 \text{ нм} \times 0.07 k_B T/\text{нм} \approx 2.2 k_B T$, при диаметре 50 нм — $E = \pi \times 50 \text{ нм} \times 0.07 k_B T/\text{нм} \approx 11 k_B T$. В равновесных условиях долю рафтов определенного типа можно считать пропорциональной больцмановскому

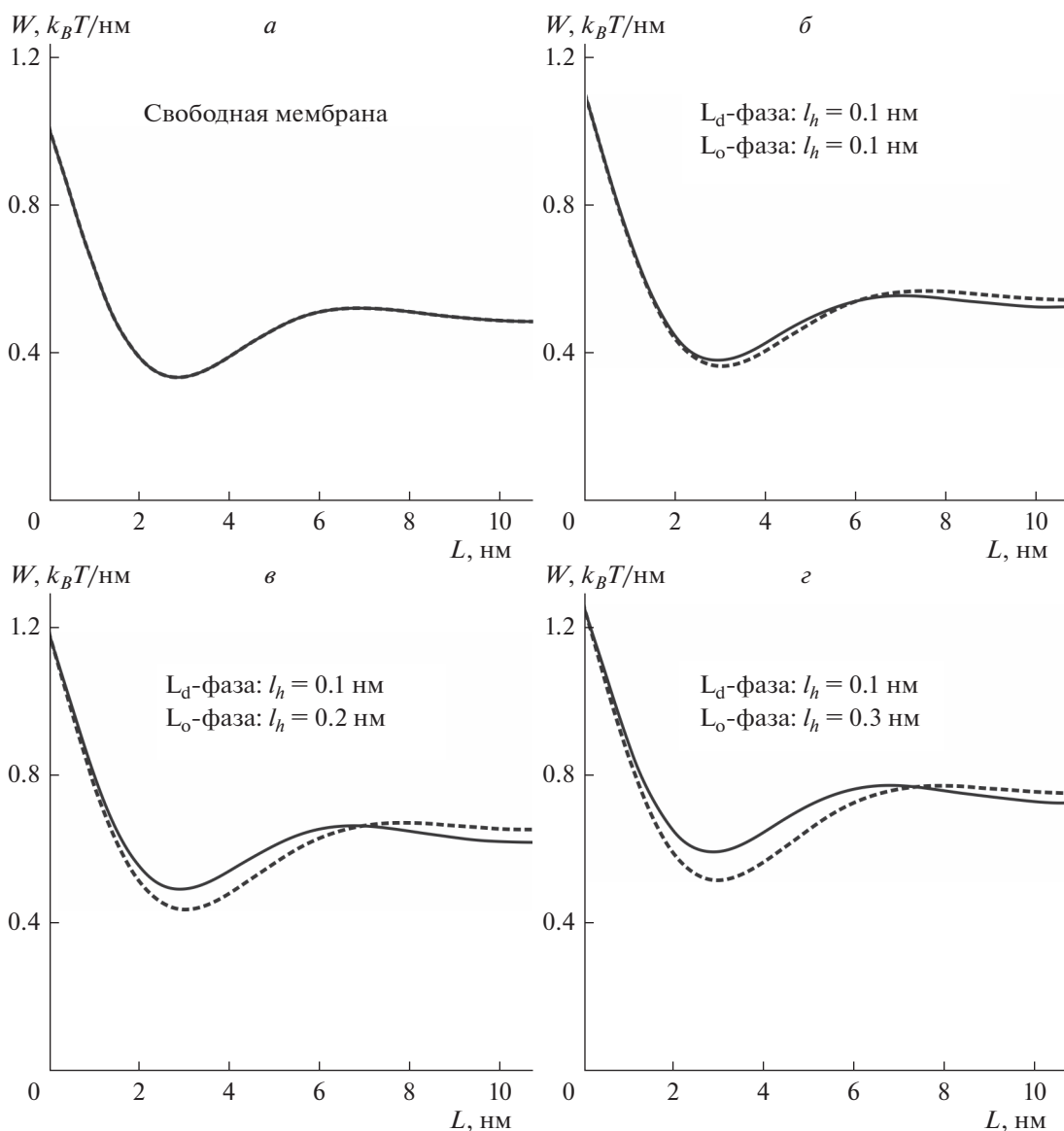


Рис. 2. Зависимость линейного натяжения границы рафта от ширины гибридной зоны: *а* – в случае свободной мембраны ($k_h = 0$); *б–г* – для случая мембраны, нанесенной на твердую подложку. Характерная длина гидратационного отталкивания L_o -монослоя и подложки считалась равной: *б* – $l_h = 0.1$ нм; *в* – $l_h = 0.2$ нм; *г* – $l_h = 0.3$ нм; для L_d -монослоя во всех случаях $l_h = 0.1$ нм. Сплошные кривые – конический рафт, штриховые кривые – обратный конический рафт, в соответствии с рис. 1.

фактору $\sim \exp(-E/k_B T)$. С учетом этого фактора, в случае рафтов диаметром 10 нм доля конических рафтов будет составлять $\sim 11\%$ от полного числа рафтов. При среднем диаметре рафтов 50 нм доля конических рафтов будет составлять $\sim 1.7 \times 10^{-3}\%$, т.е. практически все домены будут иметь обратную коническую структуру.

Разница радиусов монослойных доменов в противоположных монослоях должна приводить к разности площадей L_o -фазы в верхнем и нижнем монослоях. Этот дисбаланс, в принципе, может компенсироваться образованием монослой-

ных L_o -доменов в нижнем монослое мембраны, прилегающем к подложке, таким образом, чтобы все рафты имели энергетически выгодную обратную коническую структуру, а избыток L_o -фазы образовывал монослойные L_o -домены в нижнем монослое. Формирование монослойных доменов должно приводить к повышению общей энергии системы за счет увеличения длины совокупной границы L_o - и L_d -фаз. Предположим, что избыток площади L_o -фазы от каждого L_o -домена собирается в n монослойных доменов, где n может быть меньше единицы, что означает конденса-

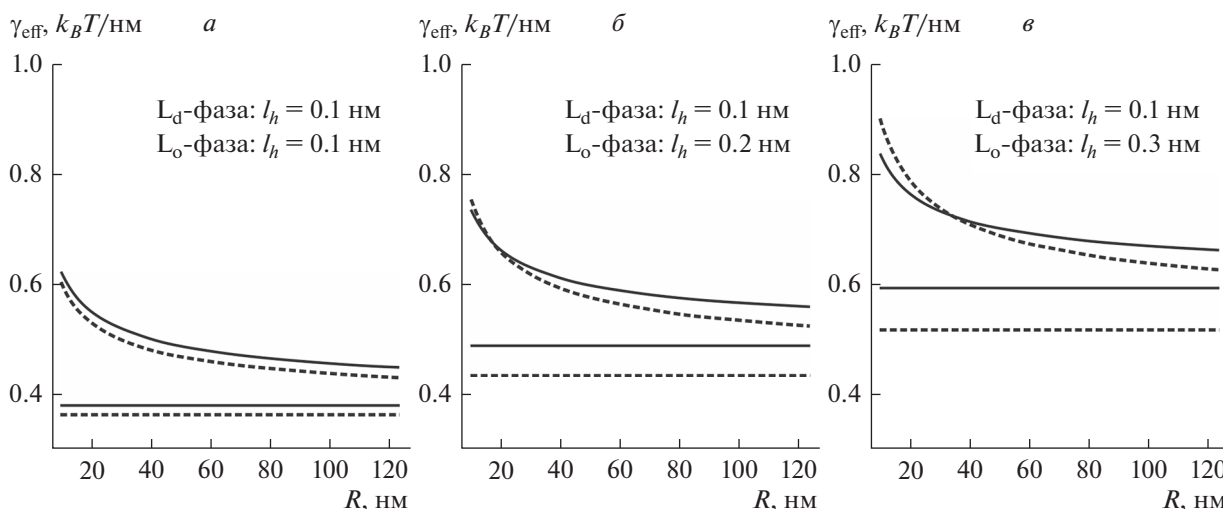


Рис. 3. Зависимость эффективного линейного натяжения рафтов от их радиуса при $n = 1$. Длина гидратационного отталкивания для L_o -фазы составляет: а – $l_h = 0.1$ нм; б – $l_h = 0.2$ нм; в – $l_h = 0.3$ нм. Сплошные кривые – конические рафты; штриховые кривые – обратные конические рафты. Горизонтальные прямые соответствуют величине эффективного линейного натяжения равного минимальному линейному натяжению на кривых рис. 2б–2г.

цию избытка от $1/n$ рафтов в один монослойный домен. При таких предположениях эффективное линейное натяжение конического/обратного конического рафта дается выражением:

$$\gamma_{\text{eff}}^{d,u} = \gamma_0^{d,u} + \gamma_{\text{mono}}^{\mu,d} \sqrt{\frac{2\pi RL}{n\pi R^2}} = \gamma_0^{d,u} + \gamma_{\text{mono}}^{\mu,d} \sqrt{\frac{2L}{nR}}, \quad (8)$$

где R – радиус домена, $\gamma_0^{d,u}$ – линейное натяжение границы конического/обратного конического рафта при оптимальной ширине гибридной зоны, $\gamma_{\text{mono}}^{\mu,d}$ – линейное натяжение монослойного домена, расположенного в верхнем/нижнем монослое соответственно. γ_{mono} вычисляется аналогично линейному натяжению границы бислойного домена при учете энергии деформаций только в области бислойной L_d -фазы и в гибридной зоне и условии $L \rightarrow \infty$. При $l_h = 0.1$ нм $\gamma_{\text{mono}}^d = 0.30 k_B T / \text{нм}$, $\gamma_{\text{mono}}^u = 0.30 k_B T / \text{нм}$; при $l_h = 0.2$ нм $\gamma_{\text{mono}}^u = 0.31 k_B T / \text{нм}$, $\gamma_{\text{mono}}^d = 0.40 k_B T / \text{нм}$; при $l_h = 0.3$ нм $\gamma_{\text{mono}}^u = 0.32 k_B T / \text{нм}$, $\gamma_{\text{mono}}^d = 0.49 k_B T / \text{нм}$. Зависимость эффективного линейного натяжения рафтов от их радиуса при $n = 1$ приведена на рис. 3. Видно, что при малых радиусах доменов энергетически выгодна конфигурация конических рафтов, а при больших радиусах – обратных конических рафтов (рис. 3б, 3в). При увеличении n и радиусов доменов кривые будут приближаться к своим асимптотикам, т.е. значениям, даваемым минимумом соответствующих кривых, приведенных на рис. 2.

На рис. 4 показаны характерные профили верхней поверхности мембраны вблизи границы рафта для обоих типов границ. Из рисунка видно, что в случае свободной мембраны различие уровней верхних поверхностей L_o - и L_d -фаз мембраны вдали от границы составляет 0.5 нм, что соответ-

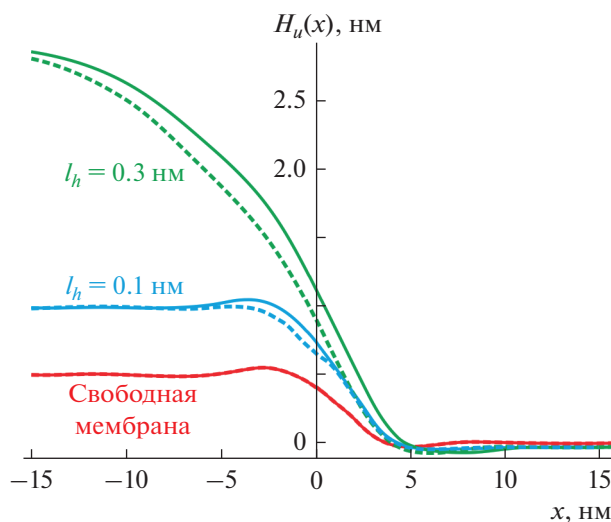


Рис. 4. Форма верхней поверхности мембраны $H_u(x)$ для случаев: свободной мембраны (красные кривые); мембраны на твердой подложке с одинаковой длиной гидратационных взаимодействий $l_h = 0.1$ нм для L_o и L_d фазы (синие кривые); мембраны на твердой подложке с длиной гидратационных взаимодействий $l_h = 0.1$ нм для L_d фазы и $l_h = 0.3$ нм для L_o фазы (зеленые кривые). Сплошные кривые – конический рафт; штриховые кривые – обратный конический рафт. Ширина гибридной зоны во всех случаях равна 3 нм.

ствуется разности толщин упорядоченного и неупорядоченного монослоев (рис. 4, красные кривые). При одинаковой длине гидратационных взаимодействий L_o - и L_d -фаз $l_h = 0.1$ нм различие уровней составляет 1 нм, что соответствует разности толщин упорядоченного и неупорядоченного бислоев (рис. 4, синие кривые). При различной длине гидратационных взаимодействий L_o - и L_d -фаз разность уровней верхних поверхностей мембраны определяется комбинацией перепада толщины бислоя на границе фаз (1 нм) и разностью равновесных расстояний H_0 между подложкой и нижними L_o - и L_d -монослоями (рис. 4, зеленые кривые). Во всех случаях взаимодействия мембраны с подложкой профили верхней поверхности мембраны слабо зависят от типа границы (конический/обратный конический рафты), т.е. практически неразличимы методом атомно-силовой микроскопии. При одинаковой длине гидратационных взаимодействий $l_h = 0.1$ нм для L_o - и L_d -фазы деформации затухают на расстоянии порядка 10 нм от границы (рис. 4, синие кривые). В случае различного взаимодействия с подложкой липидов упорядоченной и неупорядоченной фаз деформации затухают на расстоянии от переходной области порядка 5 нм в сторону неупорядоченной фазы и на расстоянии порядка 15 нм в сторону упорядоченной фазы (рис. 4, зеленые кривые).

Кроме непосредственного влияния подложки на конфигурацию доменов в мембране, она также должна изменять латеральное распределение линейно-активных липидов, действие которых аналогично действию поверхностно-активных веществ в трехмерных системах. В работе [31] было показано, что ганглиозид GM1 накапливается на границе упорядоченных доменов, существенно изменяя их распределение по размерам. Там же было показано, что преимущественной областью распределения GM1 является упорядоченный монослой в гибридной зоне границы. В случае “обратной конической” конфигурации рафта эта область расположена в верхнем монослое, а в случае “конической” конфигурации – в нижнем монослое, обращенном к подложке. Таким образом, наличие подложки в данном случае ведет к тому, что экзогенно добавляемый ганглиозид GM1 будет распределяться на границу практически всех доменов, поскольку энергетически выгодна конфигурация обратных конических рафтов, и именно в этой конфигурации в промежуточной приграничной области мембраны верхний монослой находится в упорядоченном состоянии (рис. 1б). При отсутствии взаимодействия с подложкой лишь в половине доменов выгодная для распределения ганглиозида зона будет доступна из объемной водной фазы, и экзогенно добавленный компонент будет преимущественно распре-

деляться на границу только половины общего числа рафтов.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Для простоты рассмотрим случай рафта большого радиуса, такого, что кривизной границ составляющих его доменов локально можно пренебречь и приближенно считать границы прямыми линиями. В этом случае система обладает трансляционной симметрией вдоль границ, т.е. все переменные зависят только от координаты, перпендикулярной границе. Введем декартову систему координат, начало которой расположено на границе одного из доменов (для определенности, нижнего), ось Ox направлена перпендикулярно границам, ось Oy направлена вдоль границ, ось Oz направлена перпендикулярно плоскости мембраны. В рассматриваемом случае трансляционной симметрии вдоль оси Oy все переменные зависят только от координаты x . В этом случае векторные величины могут быть заменены их проекциями на ось Ox , т.е. $\mathbf{n} \rightarrow n_x = n$, $\mathbf{N} \rightarrow N_x = N$. Для малых деформаций $\text{div } \mathbf{n} \approx dn/dx$, $N \approx dH(x)/dx = H'(x)$, где $H(x)$ – функция, характеризующая форму поверхности монослоя, штрих здесь и ниже обозначает производную по координате x .

Будем считать, что гидрофобная часть липидного монослоя локально объемно несжимаема, т.е. объем любого элемента не изменяется при деформациях. Условие локальной объемной несжимаемости может быть записано в виде [29]:

$$h(x) = h_0 - \frac{h_0^2}{2} n'(x), \quad (\text{A1})$$

где $h(x)$ – текущая толщина гидрофобной части монослоя; h_0 – толщина гидрофобной части монослоя в недеформированном состоянии. Для простоты будем называть толщину гидрофобной части монослоя просто толщиной монослоя.

Формы поверхностей верхнего и нижнего монослоя, а также межмонослойной поверхности мембраны будем характеризовать тремя функциями $H_u(x)$, $H_d(x)$ и $M(x)$ соответственно. В таких обозначениях условия объемной несжимаемости для верхнего и нижнего монослоев могут быть записаны в виде:

$$H_u - M = h_u - \frac{h_u^2}{2} n_u', \quad M - H_d = h_d - \frac{h_d^2}{2} n_d', \quad (\text{A2})$$

где n_u и n_d – проекции директора верхнего и нижнего монослоев на ось Ox , h_u и h_d – толщины верхнего и нижнего монослоев в недеформированном состоянии, соответственно; аргумент x опущен.

С учетом (5) и (A1) плотность энергии деформации участка монослоя имеет вид:

$$\begin{aligned} w_u &= \frac{B}{2} (n_u')^2 + \frac{K_t}{2} \left(n_u - M' + \frac{h_u^2}{2} n_u'' \right)^2, \\ w_d &= \frac{B}{2} (n_d')^2 + \frac{K_t}{2} \left(n_d + M' + \frac{h_d^2}{2} n_d'' \right)^2 \end{aligned} \quad (A3)$$

для верхнего и нижнего монослоев, соответственно. Функционал полной энергии бислойной мембраны с учетом (3) и (A2) дается выражением:

$$\begin{aligned} W &= \int \left\{ \frac{B}{2} (n_u')^2 + \frac{K_t}{2} \left(n_u - M' + \frac{h_u^2}{2} n_u'' \right)^2 + \right. \\ &+ \frac{B}{2} (n_d')^2 + \frac{K_t}{2} \left(n_d + M' + \frac{h_d^2}{2} n_d'' \right)^2 + \\ &+ \left. \frac{k_h}{2} \left(M - h_d + \frac{h_d^2}{2} n_d' - H_0 \right)^2 \right\} dx. \end{aligned} \quad (A4)$$

Вариация функционала по функциям $n_u(x)$, $n_d(x)$ и $M(x)$ приводит к следующей системе дифференциальных уравнений Эйлера–Лагранжа:

$$\begin{cases} h_u^4 n_u^{(4)} + 4(h_u^2 - l^2) n_u'' + 4n_u - 2h_u^2 M''' - 4M' = 0 \\ h_d^4 n_d^{(4)} + 4(h_d^2 - l^2) n_d'' + 4n_d + 2h_d^2 M''' - \\ - \left(4 - 2\frac{k_h h_d^2}{k} \right) M' = 0 \\ h_u^2 n_u''' - h_d^2 n_d''' + 2n_u' - \left(2 - \frac{k_h h_d^2}{k} \right) n_d' - 4M'' + \\ + 2\frac{k_h}{k^2} (M - h_d - H_0) = 0. \end{cases} \quad (A5)$$

Обозначим уравнения системы (A5) через E_1 , E_2 и E_3 . Комбинация $\frac{E_1}{h_u^2} - \frac{E_2}{h_d^2} - \frac{dE_3}{dx}$ позволяет выразить $M'(x)$ через проекции директора n_u и n_d и их вторые производные. Дифференцируя это выражение по x и подставляя M'' в E_3 , получим уравнение, из которого выражается $M(x)$ через проекции директора n_u и n_d , их первые и третьи производные. Это позволяет исключить функцию $M(x)$ из системы (A5). Аналогично, исключая из получающейся системы двух уравнений проекцию директора n_d , получим изолированное уравнение на проекцию директора n_u :

$$\begin{aligned} &\frac{l^2 K_t^2}{k_h} (h_u^4 + h_d^4) n_u^{(8)} + \\ &+ l^2 \left(\frac{4K_t^2}{k_h} (h_u^2 + h_d^2 - 2l^2) - h_u^4 - h_d^4 \right) n_u^{(6)} + \\ &+ \left(4l^4 + \frac{8K_t^2 l^2}{k_h} - 4h_u^2 l^2 + h_u^4 \right) n_u^{(4)} + \\ &+ 4(h_u^2 - 2l^2) n_u'' + 4n_u = 0. \end{aligned} \quad (A6)$$

Корни λ_j ($j = 1, 2, \dots, 8$) характеристического уравнения находятся аналитически, но очень громоздки. Все корни комплексные и представимы в виде:

$$\begin{aligned} \lambda_1 &= \alpha + i\beta, \quad \lambda_2 = \alpha - i\beta, \\ \lambda_3 &= -\alpha + i\beta, \quad \lambda_4 = -\alpha - i\beta, \\ \lambda_5 &= \phi + i\phi, \quad \lambda_6 = \phi - i\phi, \\ \lambda_7 &= -\phi + i\phi, \quad \lambda_8 = -\phi - i\phi, \end{aligned} \quad (A7)$$

где α , β , ϕ , ϕ – некоторые действительные числа, зависящие от параметров системы; i – мнимая единица. Пространственное распределение проекции директора верхнего монослоя может быть записано как:

$$n_u(x) = \sum_{j=1}^8 c_j e^{\lambda_j x}, \quad (A8)$$

где c_j ($j = 1, 2, \dots, 8$) – комплексные коэффициенты, определяемые из граничных условий. Восемь комплексных коэффициентов эквивалентны шестнадцати действительным коэффициентам, однако на функцию $n_u(x)$ налагается условие вещественности при любых значениях x , которое уменьшает число независимых действительных коэффициентов до восьми. Из распределения проекции директора верхнего монослоя $n_u(x)$ находятся распределения проекции директора нижнего монослоя $n_d(x)$ и форма межмонослойной поверхности $M(x)$. Затем из условия локальной объемной несжимаемости (A2) находится форма поверхности верхнего, $H_u(x)$, и нижнего, $H_d(x)$, монослоев. Подставляя функции $n_u(x)$, $n_d(x)$, $M(x)$ в уравнение (A4) и интегрируя по x , найдем энергию деформированного участка мембраны, нанесенной на твердую подложку.

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

Источники финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо иссле-

дований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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.
- Ingólfsson H.I., Carpenter T.S., Bhatia H., Bremer P.T., Marrink S.J., Lightstone F.C. 2017. Computational lipidomics of the neuronal plasma membrane. *Biophys. J.* **113**, 2271–2280.
- Pike L.J. 2006. Rafts defined: A report on the Keystone Symposium on lipid rafts and cell function. *J. Lip. Res.* **47**, 1597–1598.
- Simons K., Ikonen, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. **387**, 569–572.
- Edidin M. 2001. Shrinking patches and slippery rafts: Scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol.* **11**, 492–496.
- 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.
- Ripa I., Andreu S., López-Guerrero J.A., Bello-Morales R. 2021. Membrane rafts: Portals for viral entry. *Frontiers Microbiol.* **12**, 120.
- Ayuyan A.G., Cohen F.S. 2008. Raft composition at physiological temperature and pH in the absence of detergents. *Biophys. J.* **94**, 2654–2666.
- Дунина-Барковская А.Я., Вишнякова Х.С., Баратова Л.А., Радюхин В.А. 2019. Модуляция холестерина-зависимой активности макрофагов IC-21 пептидом, содержащим два CRAC-мотива из белка М1 вируса гриппа. *Биол. мембраны*. **36**, 271–280.
- 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.
- Pralle A., Keller P., Florin E.L., Simons K., Hörber J.H. 2000. Sphingolipid–cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* **148**, 997–1008.
- 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.
- Samsonov A.V., Mihalov I., Cohen F.S. 2001. Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys. J.* **81**, 1486–1500.
- 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.
- Staneva G., Osipenko D.S., Galimzyanov T.R., Pavlov K.V., Akimov S.A. 2016. Metabolic precursor of cholesterol causes formation of chained aggregates of liquid-ordered domains. *Langmuir*. **32**, 1591–1600.
- Baumgart T., Hess S.T., Webb W.W. 2003. Imaging co-existing fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*. **425**, 821–824.
- 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.
- Vinklárík I.S., Vel'as L., Riegerová P., Skála K., Mikhalyov I., Gretskeya N., Hof M., Šachl R. 2019. Experimental evidence of the existence of interleaflet coupled nanodomains: An MC-FRET study. *J. Phys. Chem. Lett.* **10**, 2024–2030.
- Галимзянов Т.Р., Молотковский Р.Ю., Кузьмин П.И., Акимов С.А. 2011. Стабилизация бислоистой структуры рафтов за счет упругих деформаций мембраны. *Биол. мембраны*. **28**, 307–314.
- 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.
- 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.
- Risselada H.J., Marrink S.J. 2008. The molecular face of lipid rafts in model membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 17367–17372.
- 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.
- Müller D.J., Fotiadis D., Scheuring S., Müller S.A., Engel A. 1999. Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscope. *Biophys. J.* **76**, 1101–1111.
- Israelachvili J. 2011. *Intermolecular and Surface Forces*. London: Acad. Press.
- LeNeveu D.M., Rand R.P., Parsegian V.A. 1976. Measurement of forces between lecithin bilayers. *Nature*. **259**, 601–603.
- Lipowsky R., Sackmann E. 1995. *Handbook of biological physics. Chapter 11. Generic interactions of flexible membranes*. Amsterdam: Elsevier Science, p. 521–602.
- Акимов С.А., Фролов В.А., Кузьмин П.И. 2005. Линейное натяжение и функция распределения нанорафтов по размерам в бислоистых липидных мембранах. *Биол. мембраны*. **22**, 413–426.
- Hamm M., Kozlov M.M. 2000. Elastic energy of tilt and bending of fluid membranes. *Eur. Phys. J. E.* **3**, 323–335.
- 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.
- 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 raft size distribution in a cholesterol-dependent manner. *Langmuir*. **33**, 3517–3524.

Configurations of Ordered Domain Boundary in Lipid Membrane on Solid Support

T. R. Galimzyanov¹, S. A. Akimov^{1, *}

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

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

The lateral distribution of proteins and lipids in plasma membranes of mammalian cells is not uniform. Lipid-protein domains enriched with sphingomyelin and cholesterol are called rafts. The size of cell membrane rafts is extremely small, and this significantly complicates their experimental study. In model membranes, the lipid composition of which is close to the composition of the plasma membrane, the formation of ordered domains is possible as a result of phase separation induced by a decrease in temperature. An effective method for studying model rafts is atomic force microscopy, which makes it possible to register domains whose size is less than the diffraction limit of visible light. However, this method involves the deposition of the membrane on a solid support. Due to electrostatic, van der Waals, and hydration interactions with the support, the closest membrane monolayer appears in physical conditions that differ from the conditions of the monolayer distant from the support. The asymmetry of physical conditions leads to alteration of the structure and energy of the raft boundary. As a result, of the two possible states of the boundary of equal energy in a free membrane, only one is practically realized on the support. This can lead to a change in the efficiency of specific line-active lipids that accumulate at the boundary of domains and regulate their size by decreasing the boundary energy, similar to the action of surfactants in three-dimensional systems.

Keywords: lipid membrane, ordered domain, atomic force microscopy, solid support, hydration repulsion, theory of elasticity