

УДК 577.352

РАСЧЕТ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ОБРАЗОВАНИЯ МОНОСЛОЙНОГО СТАЛКА В ПРОЦЕССЕ СЛИЯНИЯ ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ

© 2024 г. Р. Ю. Молотковский^{а, *}

^а Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия

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

Поступила в редакцию 09.11.2023

После доработки 07.12.2023

Принята к печати 13.12.2023

Липидные капли — это органеллы, отвечающие за накопление и расщепление нейтральных жиров в организме человека. Липидные капли имеют монослойную оболочку из фосфолипидов, препятствующую их спонтанному слиянию. Слияние липидных капель осуществляется специализированными белками слияния и регулируется липидным составом монослойной оболочки. Эффективность слияния определяется энергией, затрачиваемой на локальное сближение липидных капель и топологическую перестройку их оболочек. В данной работе слияние монослойных оболочек моделируется в рамках теории упругости мембран. Энергетический барьер на слияние рассчитывается при различных условиях, моделирующих возможные составы монослойных оболочек, а также воздействие белков. Результаты расчетов показывают, что высота барьера в наибольшей степени зависит от расстояния между липидными каплями, которое определяется белками слияния. Липидный состав также влияет на характерное время ожидания слияния и может изменять его в несколько десятков раз, что соответствует полученным ранее данным по бислойному слиянию.

Ключевые слова: сенсоры ДНК/РНК, цитокины, интерфероны, cGAS, STING, иммунные клетки

DOI: 10.31857/S0233475524020035, **EDN:** xvuiyf

ВВЕДЕНИЕ

Эукариотические клетки, как правило, состоят из множества взаимодействующих органелл. Это взаимодействие часто осуществляется путем контакта и перестройки липидных мембран, окружающих органеллы и выполняющих барьерную функцию. Одной из форм процессов перестройки мембран является их слияние, т.е. объединение материала самих мембран и объемов воды, которые они окружают. Слияние мембран необходимо для успешного протекания множества биологических процессов, таких как экзоцитоз, оплодотворение, секреция, синаптическая передача и т.д. [1, 2].

Для осуществления слияния мембранам необходимо сблизиться на небольшое расстояние порядка нескольких нанометров и совершить топологическую реконфигурацию, для чего мембраны должны быть деформированы. Согласно имеющимся представлениям, этот процесс происходит через несколько промежуточных метастабильных состояний, разделенных энергетическими барьерами [2, 3]. Высоты энергетических барьеров определяют

кинетические параметры слияния, такие как среднее время ожидания слияния, и поэтому являются важнейшими физическими величинами. Ключевым метастабильным состоянием является сталк — структура, в которой контактные монослои уже слились, а дистальные — еще нет [4, 5]. Сталк является первой структурой, в которой осуществляется физический контакт сливающихся мембран; сталк наблюдался в экспериментах по рентгеновскому рассеянию на мультислоях, а также в исследованиях методами молекулярной динамики [3, 5]. В дальнейшем эволюция системы может идти по разным траекториям, на которых системе необходимо преодолеть еще один или два энергетических барьера [6–8]. Классическая теория предполагает дальнейшее расширение сталка и образование так называемой диафрагмы полуслияния — структуры с протяженным бислоем, образованным дистальными монослоями мембран, расположенным в центре между радиально разошедшимися слившимися контактными монослоями [9]. Затем в диафрагме полуслияния образуется сквозная

пора, и слияние завершается. Различные оценки дают для высот барьеров величины в несколько десятков $k_B T$ ($k_B T = 4 \times 10^{-21}$ Дж) [10–12].

Как правило, в слиянии участвуют бислойные мембраны, однако в природе существует уникальный случай слияния монослойных мембран. Этот процесс реализуется при взаимодействии так называемых липидных капель, органелл, используемых для запасаения нейтральных жиров. Липидные капли имеют монослойную оболочку из фосфолипидов, которая предотвращает их спонтанное слияние [13]. Считается, что процессы слияния липидных капель контролируются специализированными белковыми комплексами и определенным липидным составом поверхностного монослоя, влияющими на высоту энергетического барьера слияния. В большинстве случаев перетекание жира из одной капли в другую полностью контролируется белковыми комплексами CideA, которые, как предполагается, формируют белковые поры в монослойных оболочках липидных капель [14]. Данный механизм взаимодействия не предполагает объединения липидных оболочек и не является слиянием в смысле определения, данного выше. В слиянии могут участвовать комплексы SNARE (soluble NSF attachment protein receptor), которые, как предполагается, удерживают вместе сливающиеся оболочки липидных капель [15]. В большинстве работ, исследующих слияние липидных капель, уделяется мало внимания влиянию липидного состава на этот процесс. В некоторых работах констатируется увеличение эффективности слияния липидных капель при модулировании их состава, в частности, при увеличении концентрации фосфатидной кислоты [16]. Известно, что изменение липидного состава влияет на упругие характеристики сливающихся бислойных мембран, в частности на так называемую спонтанную кривизну — параметр, характеризующий равновесную форму свободного монослоя [17]. Повышенное содержание диолеилфосфатидилхолина (DOPC), имеющего примерно нулевую спонтанную кривизну, ингибирует слияние. Увеличение доли липидов с отрицательной спонтанной кривизной, таких, как диолеилфосфатидилэтанолламин (DOPE), способствует слиянию [3]. Известно, что фосфатидная кислота, увеличивающая эффективность слияния липидных капель, имеет отрицательную спонтанную кривизну, как и DOPE [18]. Кроме того, известно, что в составе оболочек липидных капель доминируют липиды DOPC и DOPE [19, 20], поэтому можно ожидать, что и в случае монослойного слияния состав монослойных оболочек также будет иметь значение. Исследования слияния бислойных мембран позволяют предположить, что

эффективность монослойного слияния определяется совместным действием липидной мембраны и белков, аналогично классическому случаю. При описании бислойного слияния белки рассматриваются как объекты, приводящие к локальному изменению упругих свойств мембран или уменьшающие эффективное расстояние между ними за счет механической работы [10, 21, 22]. При этом на стадии образования столкновения влияние липидной компоненты на эффективность слияния является ключевым, поскольку для успешного слияния область контакта липидных оболочек должна быть свободна от белков.

В данной работе разрабатывается теоретическая модель безбелкового слияния монослойных оболочек. В качестве основы используются теоретические модели бислойного и бислой-монослойного слияния [22, 23]. Для расчета деформаций применяется теория упругости липидных мембран, адаптированная для случая монослоев. Это позволяет рассчитать энергетический барьер на образование монослойного столкновения. В работе исследуется зависимость высоты данного барьера от ключевых упругих характеристик монослоев и от их липидного состава. Полученные данные сопоставляются с результатами для бислойного и монослой-бислойного слияния. Определение высоты энергетического барьера позволяет также оценить возможность протекания безбелкового слияния для липидных капель с разным составом оболочки.

ПОСТАНОВКА И РЕШЕНИЕ ЗАДАЧИ

Мы рассматриваем образование монослойного столкновения в процессе слияния идентичных липидных капель путем локального сближения двух монослоев. Считаем, что размеры липидных капель много больше характерных размеров области слияния. Это позволяет представлять начальное состояние системы как два плоских монослоя, разделенных водной средой и расположенных на равновесном расстоянии H_0 друг от друга (рис. 1а). Равновесное расстояние по порядку величины составляет несколько нанометров и может уменьшаться до 1 нм при стягивающем воздействии белков слияния [10]. Глобальное уменьшение расстояния между монослоями не выгодно из-за действия сил гидратационного отталкивания, поэтому мы рассматриваем локальное выпячивание монослоев друг к другу при фиксированном расстоянии H_0 на удалении от этого выпячивания (рис. 1б). Считаем, что выпячивания расположены на расстоянии d симметрично друг относительно друга; это позволяет рассматривать только один монослой. Энергия системы в этом случае равна сумме

удвоенной упругой энергии монослоя и энергии межмонослойного взаимодействия. Образование монослойного сталка соответствует случаю $d = 0$ (рис. 1в).

Рассмотрим сначала упругую энергию монослоя. Она определяется деформациями монослоя и латеральным натяжением $\bar{\sigma}$. Для описания деформаций мы используем энергетический функционал Хамма—Козлова [24]. Состояние деформированного участка липидного монослоя определяется векторным полем единичных векторов $\mathbf{n}$, называемых директорами, характеризующими среднюю ориентацию липидных молекул. Поле директоров задается на так называемой нейтральной поверхности, проходящей внутри монослоя параллельно его границе с водой в области сочленения полярных головок с гидрофобными цепями липидов. На этой поверхности деформации поперечного изгиба и латерального растяжения/сжатия энергетически независимы [24]. Форма нейтральной поверхности характеризуется векторным полем ее единичных нормалей $\mathbf{N}$. Деформации будем считать малыми и будем вычислять энергию в квадратичном приближении. Деформация поперечного изгиба характеризуется дивергенцией директора вдоль нейтральной поверхности, $\text{div}(\mathbf{n})$. Деформация наклона характеризуется вектором наклона, который для малых деформаций имеет вид $\mathbf{t} = \mathbf{n} - \mathbf{N}$ [24]. Энергия деформации W участка монослоя площади A при наличии ненулевого натяжения σ может быть записана в виде [17]:

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

где B и K_t — упругие модули изгиба и наклона соответственно, J_s — спонтанная кривизна монослоя, dS — элемент площади поверхности, A_0 — площадь

монослоя в недеформированном состоянии. Для описания деформаций монослоя мы вводим систему координат $\{O, z, r\}$ с осью z , направленной перпендикулярно монослою посередине его выпуклости, и осью r , направленной перпендикулярно оси z так, что она касается нейтральной поверхности монослоя на бесконечности. В предположении малости деформаций состояние монослоя описывается проекциями директора и вектора наклона на ось r $a(r)$ и $t(r)$ соответственно, а также расстоянием $H(r)$ от нейтральной поверхности до плоскости $z = 0$. Дивергенция директора при этом заменяется на выражение $da/dr + a/r$. Также мы учитываем, что вектор наклона $\mathbf{t} \approx \mathbf{n} - \mathbf{N}$ [24]; это позволяет связать проекцию вектора наклона с формой нейтральной поверхности $H(r)$ согласно формуле $t(r) = a(r) - dH(r)/dr$. В результате поверхностная энергия монослоя может быть записана в виде [25]:

$$w = 2\pi r \left\{ \frac{B}{2} \left(\frac{da}{dr} + \frac{a}{r} + J_s \right)^2 - \frac{B}{2} J_s^2 + \frac{K_t}{2} \left(a - \frac{dH}{dr} \right)^2 + \frac{\tilde{\sigma}}{2} \left(\frac{dH}{dr} \right)^2 \right\}. \quad (2)$$

Варьируя функционал $\int w dr$, мы получаем уравнения Эйлера—Лагранжа, описывающие функции $a(r)$ и $H(r)$. Решение данных уравнений позволяет найти в явном виде функции $a(r)$ и $H(r)$, зависящие от неопределенных коэффициентов. Эти коэффициенты определяются из граничных условий, задающих геометрию системы и имеющих следующий вид:

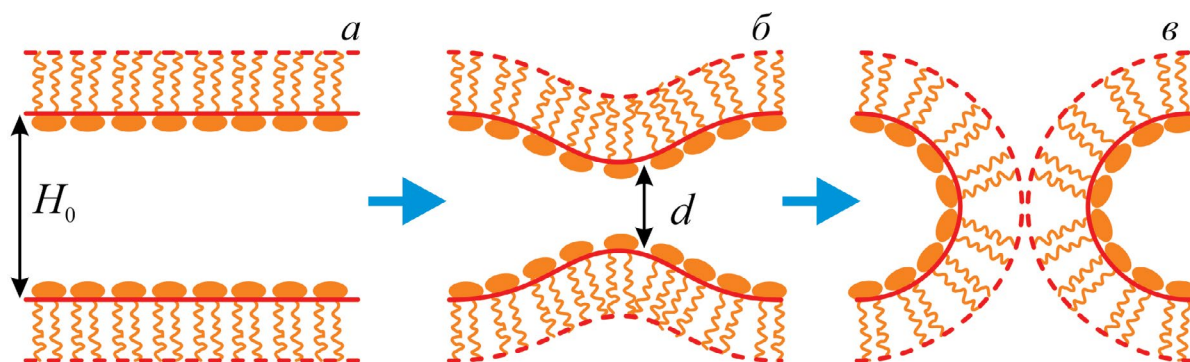


Рис. 1. Схематичное изображение процесса монослойного слияния. а — Начальное состояние: два плоских монослоя находятся на расстоянии H_0 друг от друга. б — Образование локальных симметричных выпуклостей на расстоянии d . в — Образование монослойного сталка, т.е. плотного контакта мембран друг с другом.

$$\begin{aligned} H(0) &= \frac{H_0 - d}{2}, \\ H|_{r \rightarrow \infty} &= 0, \end{aligned} \quad (3)$$

где d — расстояние между вершинами монослойных выпуклостей. Граничные условия (3) означают, что решения уравнений должны быть ограничены как в нуле, так и на бесконечности. Для удовлетворения этим условиям мы вводим дополнительный параметр — радиус R — и делим рассматриваемую систему на две области: от 0 до R и от R до бесконечности (рис. 2а).

В первой области вводим функции $a_i(r)$ и $H_i(r)$, ограниченные в нуле, во второй области — функции $a_e(r)$ и $H_e(r)$, ограниченные на бесконечности. Каждый из этих наборов функций удовлетворяет уравнениям Эйлера–Лагранжа, но имеет меньше неопределенных коэффициентов в своем составе. В явном виде эти функции имеют следующий вид:

$$\begin{aligned} a_i(r) &= c_1 I_1(r_\sigma), \\ H_i(r) &= c_1 I_0(r_\sigma) \frac{l}{\sqrt{\sigma(\sigma+1)}} + c_2, \\ a_e(r) &= c_3 K_1(r_\sigma), \\ H_e(r) &= c_3 K_0(r_\sigma) \frac{l}{\sqrt{\sigma(\sigma+1)}} + c_4. \end{aligned} \quad (4)$$

Здесь $\sigma = \frac{\tilde{\sigma}}{K_i}$ — безразмерное латеральное натяжение, $l = B/K_p$, $r_\sigma = \frac{r}{l} \sqrt{\frac{\sigma}{\sigma+1}}$, $I_j(r)$ и $K_j(r)$ — модифицированные функции Бесселя j -го порядка первого и второго типа соответственно, c_i , $i = 1 \dots 4$ — неопределенные коэффициенты. Определенные

формулой (4) функции непрерывно сшиваются на границе двух областей:

$$\begin{aligned} a_i(R) &= a_e(R), \\ H_i(R) &= H_e(R). \end{aligned} \quad (5)$$

Совокупность граничных условий (3) и (5) позволяет определить все неопределенные коэффициенты c_i . После этого мы интегрируем поверхностную плотность энергии (2) в двух областях и в итоге получаем полную упругую энергию монослоя W_{el}^1 как функцию R и $H_0 - d$. В явном виде данная энергия имеет вид:

$$\begin{aligned} W_{el}^1 &= \frac{\pi K_t}{4} \frac{R}{l} (H_0 - d)^2 \sigma^{\frac{3}{2}} \sqrt{\sigma+1} \cdot I_1(R_\sigma) \cdot K_1(R_\sigma) \times \\ &\times \frac{I_1(R_\sigma) \cdot K_0(R_\sigma) + I_0(R_\sigma) \cdot K_1(R_\sigma)}{\left((I_0(R_\sigma) - 1) \cdot K_1(R_\sigma) + I_1(R_\sigma) \cdot K_0(R_\sigma) \right)^2}. \end{aligned} \quad (6)$$

Здесь $R_\sigma = \frac{R}{l} \sqrt{\frac{\sigma}{\sigma+1}}$. Заметим, что энергия W_{el}^1 не зависит от спонтанной кривизны J_s и от равновесной толщины монослоя. Также мы рассматриваем гидратационное отталкивание между мембранами, возникающее из-за взаимодействия примембранных слоев воды при субнанометровых расстояниях между монослоями. Поверхностная энергия гидратационного отталкивания w_h вычисляется на основе эмпирического соотношения

$$w_h = P_0 \xi_h \exp\left(-\frac{z(r)}{\xi_h}\right), \quad (7)$$

где $z(r)$ — расстояние между мембранами как функция координаты r , ξ_h — характерная длина порядка 0.3 нм, P_0 — давление при нулевом расстоянии,

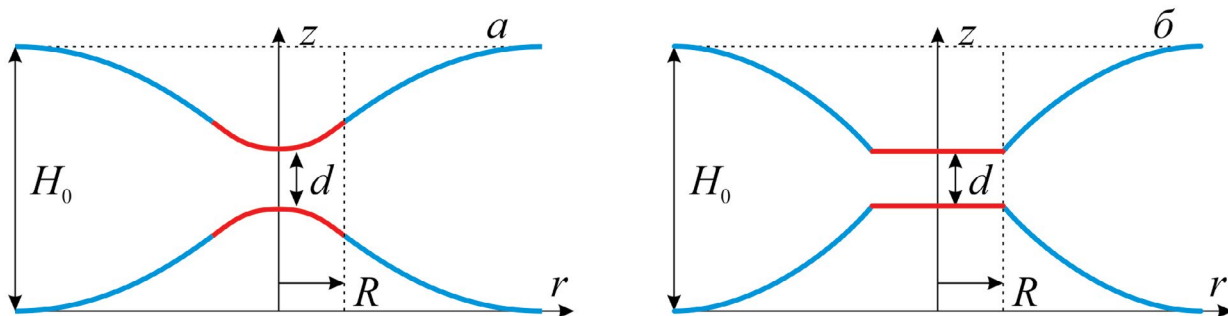


Рис. 2. Модели промежуточных стадий монослойного слияния. а — Локальные выпуклости радиуса R , находящиеся на расстоянии d друг от друга. б — Монослой с гидрофобными дефектами. Расстояние между мембранами при $r \rightarrow \infty$ равно H_0 и не меняется в процессе слияния.

варьирующее в пределах $100\text{--}1000\text{ }k_B T/\text{нм}^3$ [8, 10]. В связи с экспоненциальным убыванием силы отталкивания при увеличении расстояния между мембранами обычно интегрирование ведется по областям мембран, соответствующим увеличению расстояния между ними на величину ξ_h . В рассматриваемом нами случае эта область определяется радиусом R_h , который находится из условия $H_i(0) - H_i(R_h) = \xi_h/2$. Проведенные нами вычисления показывают, что этот радиус мало отличается от радиуса R при достаточно больших значениях H_0 . Это позволяет нам еще больше упростить вычисления и проводить интегрирование по плоскостям, касающимся нейтральных поверхностей в точке $r = 0$ и отстоящим друг от друга на расстояние d . Таким образом, мы получаем приближенное значение энергии гидратационного отталкивания W_h :

$$W_h = \pi R^2 P_0 \xi_h \left(\exp\left(-\frac{d}{\xi_h}\right) - \exp\left(-\frac{H_0}{\xi_h}\right) \right). \quad (8)$$

Полная энергия системы W_{tot}^1 равна сумме удвоенной упругой энергии и энергии гидратационного отталкивания: $W_{tot}^1 = 2W_{el}^1 + W_h$. При небольших расстояниях d становится энергетически выгодно образование локальных гидрофобных дефектов на вершинах взаимодействующих выпуклостей (рис. 2б). Энергия взаимодействия гидрофобных дефектов определяется следующим соотношением:

$$W_p = 2\pi R^2 \sigma_p \left(1 - \exp\left(-\frac{d}{\xi_p}\right) \right), \quad (9)$$

где σ_p — натяжение на границе вода/масло, ξ_p — характерная длина гидрофобного взаимодействия. Поскольку выпуклости заменяются дефектами, меняется геометрия системы, что приводит к изменению граничных условий. При наличии дефектов монослои остаются деформированными только в области $r > R$, при этом граничные условия имеют вид:

$$\begin{aligned} H_e(R) &= \frac{H_0 - d}{2}, \\ H_e|_{r \rightarrow \infty} &= 0. \end{aligned} \quad (10)$$

Решение уравнений (10) относительно коэффициентов c_3 и c_4 позволяет найти изменившуюся энергию деформаций W_{el}^2 :

$$\begin{aligned} W_{el}^2 &= \frac{\pi K_t}{4} \frac{R}{l} (H_0 - d) \left((H_0 - d) \sigma + \right. \\ &\quad \left. + 4J_s l^2 \right) \sigma^{\frac{3}{2}} \sqrt{\sigma + 1} \frac{K_1(R_\sigma)}{K_0(R_\sigma)}. \end{aligned} \quad (11)$$

Образование дефектов также приводит к разрыву непрерывности директора; теперь директор не определен в области $r < R$. Это приводит к появлению ненулевого вклада в энергию от Гауссовой кривизны. Энергия Гаусса монослоя равна $W_{Gauss} = -\pi K_G a_e(R)^2$, где K_G — модуль Гауссовой кривизны, $K_G < 0$, $a_e(R)$ — значение граничного директора в точке $r = R$ [21]. Граничный директор задается коэффициентами c_3 и c_4 согласно уравнениям (4). В рассматриваемом случае эти коэффициенты находятся из граничных условий (10); в соответствии с этим, энергия Гаусса для одного монослоя оказывается равна

$$W_{Gauss} = -\frac{\pi K_G \sigma (\sigma + 1) (H_0 - d)^2}{l^2} \frac{K_1(R_\sigma)^2}{K_0(R_\sigma)^2}. \quad (12)$$

Полная энергия системы из двух монослоев с взаимодействующими гидрофобными дефектами будет равна $W_{tot}^2 = 2W_{el}^2 + 2W_{Gauss} + W_h$. Как видно из формулы (9), гидрофобное взаимодействие уменьшается при малых значениях d , что приводит к эффективному притяжению монослоев.

Алгоритм расчета. Описанные выше предположения позволяют найти энергетическую траекторию образования монослойного скалка в процессе слияния двух монослоев. Под энергетической траекторией понимается некоторая траектория вдоль энергетической гиперповерхности в координатах $\{R, d\}$, переводящая систему из начального состояния в состояние скалка. Мы фиксируем расстояние H_0 между монослоями и рассматриваем зависимость энергии системы от наименьшего расстояния d между мембранами. В данном случае параметр d является координатой реакции. Монослой может находиться в двух состояниях — монослой с выпуклостью или монослой с гидрофобным дефектом. При каждом фиксированном значении расстояния d находим зависимость энергии W_{tot}^1 выпуклостей от R . Эта энергия имеет минимум, соответствующий $R_{min}^1 \sim 0.5\text{--}1\text{ нм}$ (см. рис. 3а). Минимальная энергия W_{min}^1 составляет несколько десятков $k_B T$ и быстро растет с уменьшением d . Мы находим минимальное значение энергии W_{min}^1 и соответствующее ему значение радиуса выпуклости R_{min}^1 .

Аналогичным образом рассматриваем зависимость энергии монослоев с дефектами W_{tot}^2 от R при

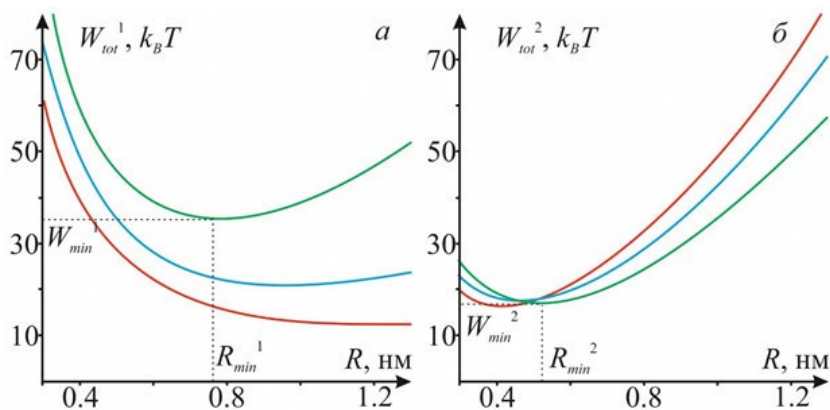


Рис. 3. Зависимость полной энергии выпуклостей W_{tot}^1 (панель *a*) и энергии дефектов W_{tot}^2 (панель *б*) от радиуса R при фиксированных значениях расстояния d между монослоями. Красные кривые соответствуют $d = 1$ нм, синие кривые соответствуют $d = 0.8$ нм, зеленые — $d = 0.6$ нм. Остальные параметры системы имеют следующие значения: $H_0 = 3$ нм, $P_0 = 800 k_B T / \text{нм}^3$, $\xi_h = 0.2$ нм, $\xi_p = 1$ нм, $J_s = -0.1 \text{ нм}^{-1}$, $K_G = -5 k_B T$, $K_t = 10 k_B T / \text{нм}^2$, $l = 1$ нм, $\sigma_p = 12.5 k_B T / \text{нм}^2$, $\sigma = 0.05 k_B T / \text{нм}^2$.

этом же фиксированном значении d (рис. 3б). Эта энергия также имеет минимум, соответствующий другому значению радиуса R_{min}^2 ; минимальное значение энергии обозначаем как W_{min}^2 . Таким образом, имеем зависимости энергий W_{min}^1 и W_{min}^2 от d . Эти две зависимости пересекаются при определенном значении d_{opt} . При $d > d_{opt}$ энергия системы определяется зависимостью W_{min}^1 , а при $d < d_{opt}$ — зависимостью W_{min}^2 . В результате получаем энергетическую траекторию системы в зависимости от координаты реакции d ; пример такой траектории показан на рис. 4. Высота барьера определяется как разность максимальной энергии на траектории и энергии начального состояния. В точке траектории, соответствующей $d = 0$, образуется монослойный сталк. При этом мы пренебрегаем изменением энергии, связанным со скачкообразным изменением радиуса системы. При малых значениях d энергия системы с гидрофобным дефектом достаточно слабо зависит от R (см. рис. 3, панель *б*). Поэтому искомое изменение энергии можно оценить в несколько единиц $k_B T$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы находим зависимость высоты энергетического барьера E_{Barr} от состава сливающихся монослойных оболочек. Описанный выше алгоритм позволяет определить энергетический барьер монослойного слияния, если известны упругие параметры монослоев, параметры гидратационного отталкивания и равновесное расстояние H_0 между монослоями. Изменение состава моделируется как добавление DOPE в мембрану, состоящую из DOPC. Параметры P_0 и ξ_h экспериментально определены для ограниченного набора составов мембраны, а именно — для мембран с соотношением DOPC : DOPE = 1:0, 3:1 и 1:1 [26]. Следует

отметить, что данные параметры получены при анализе расстояний между плоскими мембранами вплоть до величины 0.9 нм. В нашей работе формирование контакта между мембранами происходит при $d = 0.5 - 1$ нм, т.е. при несколько меньших расстояниях. В этом смысле применение данных значений параметров является экстраполяцией. В нашем анализе мы рассматриваем именно эти составы. Зависимость спонтанной кривизны от состава определяется в соответствии с формулой

$$J_s = c_{DOPE} j_{DOPE} + (1 - c_{DOPE}) j_{DOPC}, \quad (13)$$

где c_{DOPE} — поверхностная доля DOPE в составе мембраны; j_{DOPC} и j_{DOPE} — спонтанные кривизны DOPC и DOPE соответственно. Также мы учитываем зависимость модуля изгиба B_{eff} от состава [27]:

$$B_{eff} = \frac{B}{1 + \frac{B a j_{DOPE} c_{DOPE} (1 - c_{DOPE})}{k_B T}}, \quad (14)$$

где a — средняя площадь липидной молекулы, которую мы в дальнейшем принимаем равной примерно 0.7 нм^2 , B — модуль изгиба DOPC, равный $10 k_B T$ [28]. Зависимости величин от липидного состава сведены в табл. 1.

Модуль наклона K_t считаем не зависящим от липидного состава и равным $K_t = 10 k_B T / \text{нм}^2$ [30]; поверхностное натяжение мембраны задаем равным $\sigma = 0.05 k_B T / \text{нм}^2$. Также от состава не зависит длина гидрофобного взаимодействия $\xi_p \approx 1$ нм [21]. Модуль Гауссовой кривизны K_G определен в нескольких работах и варьирует от $-3.3 k_B T$

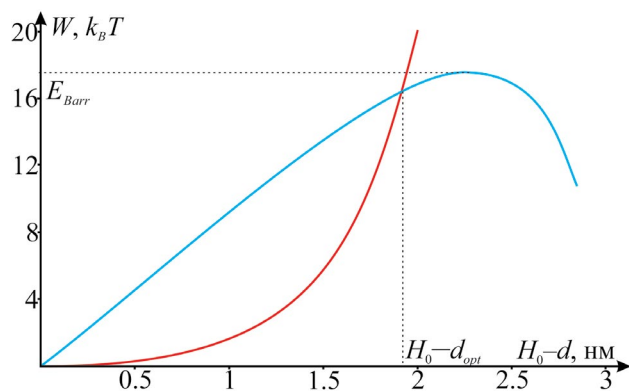


Рис. 4. Энергетическая траектория монослойного слияния в координатах $(H_0 - d, W)$. Начало слияния находится слева и соответствует отсутствию выпуклостей, конец траектории находится справа и соответствует образованию монослойного stalка ($d = 0$). Красным показана равновесная энергия выпуклостей W_{tot}^1 ; синим показана равновесная энергия монослоев с гидрофобными дефектами W_{tot}^2 . Параметры системы те же, что и на рис. 3.

до $-10 k_B T$ [31–33]. Мы используем две величины: $-5 k_B T$ и $-8 k_B T$ и приводим результаты для этих значений. Также мы варьируем начальное расстояние между монослоями H_0 и приводим зависимость высоты барьера от H_0 для различных составов. Результаты расчетов показаны на рис. 5.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами результаты позволяют оценить высоту E_{Barr} энергетического барьера на образование монослойного stalка и провести сравнение со случаем классического бислойного слияния. Одним из важных вопросов теории слияния является получение зависимости высоты такого барьера от состава сливающихся мембран. Известно, что увеличение доли DOPE в составе мембран приводит к облегчению слияния и увеличению стабильности stalка [34]. Имеющиеся экспериментальные данные по слиянию липидных капель также говорят о том, что увеличение доли DOPE или фосфатидной кислоты в составе их оболочки

приводит к увеличению эффективности слияния [16]. Наши результаты согласуются с этими предположениями. Как видно из рис. 5, увеличение доли DOPE на 50% приводит к уменьшению высоты барьера примерно на $5 k_B T$, которое становится тем больше, чем больше расстояние между монослоями H_0 . При этом увеличение H_0 с 2 до 4 нм приводит к росту высоты барьера в несколько раз, с 10 до 30–40 $k_B T$, в зависимости от остальных параметров системы. Таким образом, наши расчеты показывают, что изменение состава монослоев влияет на эффективность образования stalка значительно слабее, чем изменение начального расстояния между ними. Этот результат качественно соответствует полученным ранее результатам для бислойного и бислой-монослойного слияния [23]. Он также согласуется с результатами работы [12], согласно которым барьер для бислойного слияния уменьшается примерно на $3 k_B T$ при увеличении доли фосфатидилэтаноламина в составе мембран на 50%. В этой же работе показано, что барьер на слияние чрезвычайно сильно зависит от расстояния между мембранами и увеличивается в 2 раза при двукратном увеличении расстояния. При этом следует отметить, что уменьшение барьера даже на несколько единиц $k_B T$ ощутимо влияет на экспериментально регистрируемое время ожидания слияния. Так, например, в работе [35] демонстрируется, что уменьшение времени ожидания слияния в 35 раз соответствует уменьшению барьера на $3.5 k_B T$. Полученные зависимости позволяют объяснить эффективность белок-опосредованного слияния липидных капель как результат контроля межмонослойного расстояния: эктодомены белков слияния, таких как SNARE, удерживают монослои на фиксированном небольшом расстоянии, что резко понижает барьер на слияние и делает слияние реализуемым за физически адекватное время. Варьирование липидного состава позволяет более тонко влиять на высоту барьера, дополняя влияние белков и ускоряя или замедляя слияние в несколько раз.

Таблица 1. Значения параметров, зависящих от липидного состава

Липидный состав	DOPC : DOPE=1:0	DOPC : DOPE=3:1	DOPC : DOPE=1:1
$B_{eff}, k_B T$	10	8.3	7.8
$J_s, \text{нм}^{-1}$	–0.09	–0.17	–0.25
$P_0, k_B T/\text{нм}^3$	817	151	59
$\xi_h, \text{нм}$	0.235	0.321	0.368

Примечание. Параметры P_0 и ξ_h взяты из работы [26]; модуль изгиба и спонтанная кривизна определяются в соответствии с формулами (13) и (14). При расчетах спонтанная кривизна DOPC принимается равной $j_{DOPC} = -0.09 \text{ нм}^{-1}$; спонтанная кривизна DOPE $j_{DOPE} = -0.4 \text{ нм}^{-1}$ [29].

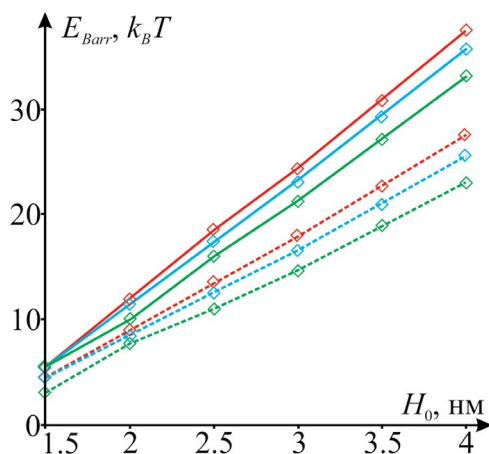


Рис. 5. Зависимость высоты барьера на образование монослойного столкновения E_{Barr} ($k_B T$) от H_0 для монослоев разного состава и при разном значении модуля Гауссовой кривизны K_G . Красным показаны зависимости для монослоев из чистого DOPC, синим — для монослоев состава DOPC : DOPE = 3:1, зеленым — для монослоев состава DOPC : DOPE = 1:1. Сплошными линиями показаны зависимости для случая $K_G = -8 k_B T$, пунктирными линиями — для случая $K_G = -5 k_B T$. Значения упругих модулей и спонтанной кривизны для монослоев разного состава указаны в табл. 1.

Наши результаты показывают, что Гауссова кривизна также оказывает значительное влияние на высоту барьера; количественно это влияние определяется величиной модуля Гауссовой кривизны K_G . Экспериментально оценить эту величину достаточно сложно; наиболее достоверные результаты были получены путем молекулярно-динамических расчетов [33]. Согласно этим данным, отношение K_G/B колеблется от -0.86 до -1.05 в зависимости от параметров симуляции, таких как площадь на головку липида. Данные [32] говорят о значении -0.83 для того же соотношения. В то же время в некоторых работах используется значение -0.5 и даже -0.3 [31]. Кроме того, в работе [36] показано, что для мембраны из DOPE модуль K_G составляет $-8.3 k_B T$, а для мембраны из DOPC $-7.6 k_B T$. В силу большой неопределенности в литературных данных мы взяли два характерных значения для модуля K_G , чтобы показать степень влияния на высоту барьера; при этом зависимость K_G от состава не рассматривалась. Из приведенных на рис. 5 данных следует, что изменение модуля Гауссовой кривизны K_G с -8 до $-5 k_B T$ приводит к падению высоты барьера в 1.5 раза. Это говорит о большой чувствительности энергии интермедиатов слияния к величине K_G , что является следствием топологической перестройки в процессе слияния [32].

Результаты нашей работы позволяют оценить влияние суммарного числа монослоев в составе сливающихся мембран на энергетический профиль

системы. Ранее нами было показано, что стабильность столкновения повышается при уменьшении этого числа с четырех до трех [23]. Проведенные в этой работе вычисления методом молекулярной динамики показывают, что в случае мембран из чистого DOPC бислойный сток является нестабильной структурой, в то время как монослойно-бислойный сток является метастабильной структурой. В случае монослойно-бислойного слияния барьер на обратный переход из состояния столкновения в состояние невзаимодействующих мембран составляет несколько единиц $k_B T$. В настоящей работе демонстрируется, что дальнейшее уменьшение числа монослоев приводит к возрастанию величины обратного барьера. Вне зависимости от состава мембраны, в области $d < d_{opt}$ энергия понижается на несколько десятков единиц $k_B T$, как показано на рис. 4. Высота прямого барьера также понижается на $15 k_B T$ относительно бислойного слияния и при $H_0 \approx 2-3$ нм варьирует в интервале $10-25 k_B T$. Дальнейшая эволюция системы после образования монослойного столкновения должна быть связана с его расширением. В отличие от бислойного слияния, расширение монослойного столкновения приводит сразу к образованию поры слияния. В работе [25] нами были проведены расчеты, описывающие расширение столкновения в случае монослойно-бислойного слияния. Нами была произведена оценка высоты барьера на расширение столкновения в зависимости от доли DOPE в составе мембран; максимальное значение этого барьера E_{MB} составляет $10 k_B T$ в случае мембран без DOPE. Простые соображения позволяют связать с уже рассмотренной моделью случай расширения монослойного столкновения и получить оценку для его барьера. В случае бислойно-монослойного слияния бислойная мембрана практически не деформировалась, и образование столкновения было связано только с деформацией монослоя [25]. Согласно формулам (6) и (11), энергия деформаций монослоя квадратично зависит от высоты его подъема относительно начального положения. Можно оценить энергию на расширение монослойно-бислойного столкновения как $E_{MB} \approx F(R) \cdot H_0 F(R)$ — функция радиуса столкновения. В случае монослойного слияния в силу симметрии системы мы будем иметь два монослоя, каждый из которых поднят на высоту $H_0/2$, поэтому для энергии на расширение монослойного столкновения E_M можно будет записать

$$E_M \approx 2F(R) \cdot \left(\frac{H_0}{2}\right)^2 = F(R) \frac{H_0^2}{2} = \frac{1}{2} E_{MB},$$

т.е. энергия будет уменьшаться в 2 раза. Таким образом, для расширения монослойного столкновения

будет необходима энергия менее $5 k_B T$, т.е. можно считать, что расширение stalkа происходит практически безбарьерно. В этом состоит принципиальное отличие слияния монослоев от слияния бислойных мембран; в последнем случае процесс сложнее и требует преодоления нескольких энергетических барьеров. Различным стадиям слияния способствуют липиды с разными характеристиками. Так, для облегчения расширения бислойного stalkа до диаграммы полуслияния предпочтительны липиды с отрицательной спонтанной кривизной, а для облегчения образования поры слияния — липиды с положительной спонтанной кривизной [2]. В силу этого для повышения эффективности бислойного слияния в живых системах бывает необходимо использовать белки слияния. В то же время монослойное слияние в силу пониженности энергетического барьера и одностадийности может регулироваться только липидным составом без непосредственного участия белков.

В рамках проведенных расчетов были сделаны некоторые упрощающие предположения. Мы считаем, что гидратационное отталкивание ограничивается областью выпуклости, т.е. $r < R$. Такое предположение оправдано, если в этой области высота мембраны $H(r)$ меняется на большую величину, чем $\xi_H/2$. Поскольку значение ξ_H мало и составляет несколько ангстрем, это условие выполняется для большей части рассматриваемых систем, однако перестает работать при небольших межмонослойных расстояниях $H_0 < 1.5\text{--}2$ нм. Таким образом, используемая модель становится неприменимой в области малых значений H_0 . Гидратационным отталкиванием при рассмотрении гидрофобных дефектов мы полностью пренебрегаем, поскольку предполагаем, что их наличие приводит к локальному разупорядочиванию слоев воды при $r > R$. Это предположение нуждается в дополнительной проверке и может приводить к занижению энергии гидрофобных дефектов, особенно в области больших расстояний H_0 . Таким образом, сформулированная модель наиболее корректно описывает поведение системы в узком диапазоне значений H_0 примерно от 2 до 3 нм. Кроме того, предполагается, что переход из состояния выпуклости в состояние гидрофобного дефекта совершается безбарьерно. В то же время, несмотря на равенство энергий этих состояний, они могут отличаться величиной равновесного радиуса, т.е. $R_{min}^1 \neq R_{min}^2$. В дальнейшем мы планируем учесть этот недостаток и разработать непрерывную траекторию слияния монослойных оболочек.

Автор выражает глубокую признательность П.И. Кузьмину за доброжелательные и конструктивные замечания при выполнении расчетов и подготовке рукописи.

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Martens S., McMahon H.T. 2008. Mechanisms of membrane fusion: Disparate players and common principles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 543–556.
2. Akimov S.A., Molotkovsky R.J., Kuzmin P.I., Galimzanov T.R., Batishchev O.V. 2020. Continuum models of membrane fusion: Evolution of the theory. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3875.
3. Chernomordik L.V., Kozlov M.M. 2008. Mechanics of membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 675–683.
4. Markin V., Kozlov M., Borovjagin V. 1984. On the theory of membrane fusion. The stalk mechanism. *Gen. Physiol. Biophys.* **5**, 361–377.
5. Yang L., Huang H.W. 2002. Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science* **297**, 1877–1879.
6. Akimov S.A., Molotkovsky R.J., Galimzanov T.R., Radaev A.V., Shilova L.A., Kuzmin P.I., Batishchev O.V., Voronina G.F., Chizmadzhev Yu.A. 2014. Model of membrane fusion: Continuous transition to fusion pore with regard of hydrophobic and hydration interactions. *Biochem. (Mosc.) Suppl. A: Membr. Cell Biol.* **8**, 153–161.
7. Fuhrmans M., Marelli G., Smirnova Y.G., Müller M. 2015. Mechanics of membrane fusion/pore formation. *Chem. Phys. Lipids.* **185**, 109–128.
8. Ryham R.J., Klotz T.S., Yao L., Cohen F.S. 2016. Calculating transition energy barriers and characterizing activation states for steps of fusion. *Biophys. J.* **110**, 1110–1124.
9. Cohen F.S., Melikyan G.B. 2004. The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *J. Membr. Biol.* **199**, 1–14.
10. Kuzmin P.I., Zimmerberg J., Chizmadzhev Yu.A., Cohen F.S. 2001. A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 7235–7240.
11. Kawamoto S., Klein M.L., Shinoda W. 2015. Coarse-grained molecular dynamics study of membrane fusion: Curvature effects on free energy barriers along the stalk mechanism. *J. Chem. Phys.* **143**, 243112.
12. Poojari C.S., Scherer K.C., Hub J.S. 2021. Free energies of membrane stalk formation from a lipidomics perspective. *Nat. Commun.* **12**, 6594.
13. Tauchi-Sato K., Ozeki S., Houjou T., Taguchi R., Fujimoto T. 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *J. Biol. Chem.* **277**, 44507–44512.
14. Gao G., Chen F.J., Zhou L., Su L., Xu D., Xu L., Li P. 2017. Control of lipid droplet fusion and growth by CIDE family proteins. *BBA—Mol. Cell Biol. L.* **1862**, 1197–1204.

15. Boström P., Andersson L., Rutberg M., Perman J., Lidberg U., Johansson B.R., Fernandez-Rodriguez J., Ericson J., Nilsson T., Borén J., Olofsson S.O. 2007. SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1286–1293.
16. Fei W., Shui G., Zhang Y., Krahmer N., Ferguson C., Kapterian T.S., Lin R.C., Dawes I.W., Brown A.J., Li P., Huang X., Parton R.G., Wenk M.R., Yang H. 2011. A role for phosphatidic acid in the formation of “supersized” lipid droplets. *PLoS Genet.* **7**, e1002201.
17. Chernomordik L.V., Kozlov M.M., Melikyan G.B., Abidor I.G., Markin V.S., Chizmadzhev Y.A. 1985. The shape of lipid molecules and monolayer membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **812**, 643–655.
18. Kooijman E.E., Chupin V., Fuller N.L., Kozlov M.M., de Kruijff B., Burger K.N., Rand P.R. 2005. Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Biochemistry.* **44**, 2097–2102.
19. Penno A., Hackenbroich G., Thiele C. 2013. Phospholipids and lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta.* **1831**, 589–594.
20. Mather I.H., Masedunskas A., Chen Y., Weigert R. 2019. Symposium review: Intravital imaging of the lactating mammary gland in live mice reveals novel aspects of milk-lipid secretion. *J. Dairy Sci.* **102**, 2760–2782.
21. Molotkovsky R.J., Kuzmin P.I., Akimov S.A. 2015. Membrane fusion. Two possible mechanisms underlying a decrease in the fusion energy barrier in the presence of fusion proteins. *Biochem. (Mosc.) Suppl. A: Membr. Cell Biol.* **9**, 65–76.
22. Molotkovsky R.J., Galimzyanov T.R., Jiménez-Munguía I., Pavlov K.V., Batishchev O.V., Akimov S.A. 2017. Switching between successful and dead-end intermediates in membrane fusion. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2598.
23. Kalutsky M.A., Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J. 2022. A model of lipid monolayer–bilayer fusion of lipid droplets and peroxisomes. *Membranes*, **12**, 992.
24. Hamm M., Kozlov M.M. 2000. Elastic energy of tilt and bending of fluid membranes. *Eur. Phys. J. E.* **3**, 323–335.
25. Молотковский Р.Ю., Кузьмин П.И. 2022. Слияние мембран пероксисомы и липидной капли: расширение π-образной структуры. *Биол. мембраны.* **39** (5), 404–416.
26. Aeffer S., Reusch T., Weinhausen B., Salditt T. 2012. Energetics of stalk intermediates in membrane fusion are controlled by lipid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E1609–E1618.
27. Bashkurov P.V., Kuzmin P.I., Vera Lillo J., Frolov V.A. 2022. Molecular shape solution for mesoscopic remodeling of cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys.* **51**, 473–497.
28. 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.
29. Kollmitzer B., Heftberger P., Rappolt M., Pabst G. 2013. Monolayer spontaneous curvature of raft-forming membrane lipids. *Soft Matter.* **9**, 10877–10884.
30. Hamm M., Kozlov M.M. 1998. Tilt model of inverted amphiphilic mesophases. *Eur. Phys. J. B*, **6**, 519–528.
31. Shnyrova A.V., Bashkurov P.V., Akimov S.A., Pucadyil T.J., Zimmerberg J., Schmid S.L., Frolov V.A. 2013. Geometric catalysis of membrane fission driven by flexible dynamin rings. *Science.* **339**, 1433–1436.
32. Siegel D.P., Kozlov M.M. 2004. The Gaussian curvature elastic modulus of N-monomethylated dioleoylphosphatidylethanolamine: Relevance to membrane fusion and lipid phase behavior. *Biophys. J.* **87**, 366–374.
33. Hu M., Briguglio J.J., Deserno M. 2012. Determining the Gaussian curvature modulus of lipid membranes in simulations. *Biophys. J.* **102**, 1403–1410.
34. Chernomordik L.V., Kozlov M.M. 2003. Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 175–207.
35. Akimov S.A., Polynkin M.A., Jiménez-Munguía I., Pavlov K.V., Batishchev O.V. 2018. Phosphatidylcholine membrane fusion is pH-dependent. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1358.
36. Siegel D.P. 2008. The Gaussian curvature elastic energy of intermediates in membrane fusion. *Biophys. J.* **95**, 5200–5215.

Energy Barrier of a Monolayer Stalk Formation during Lipid Droplet Fusion

© 2024 г. R. J. Molotkovsky¹, *

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

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

Lipid droplets are organelles responsible for the accumulation and breakdown of neutral fats in the human body. Lipid droplets have a monolayer shell of phospholipids, which prevents their spontaneous fusion. The fusion of lipid droplets is carried out by specialized fusion proteins and is regulated by the lipid composition of the monolayer membrane. The efficiency of fusion is determined by the energy needed for the local approach of lipid droplets and the topological rearrangement of their monolayers. In this work, the fusion of monolayers is modeled within the framework of the theory of membrane elasticity. The energy barrier for fusion is calculated under various conditions simulating possible compositions of monolayers, as well as the possible effects of proteins. The calculation results show that the height of the barrier is most dependent on the distance between lipid droplets, which is determined by the fusion proteins. Lipid composition also affects the fusion efficiency and can change it several tens of times, which is consistent with previously obtained data on bilayer fusion.

Keywords: lipid membrane, theory of elasticity, membrane fusion, lipid droplet, spontaneous curvature, hydration repulsion