



HAL
open science

Tubular biological micro- and nanostructures : Physical mechanisms of self-assembly and functioning

Ivan Golushko

► **To cite this version:**

Ivan Golushko. Tubular biological micro- and nanostructures : Physical mechanisms of self-assembly and functioning. Physics [physics]. Université Montpellier; Rostovskij gosudarstvennyj universitet, 2018. Russian. NNT : 2018MONT098 . tel-02176889

HAL Id: tel-02176889

<https://theses.hal.science/tel-02176889>

Submitted on 8 Jul 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Physique

École doctorale Information Structures et systèmes (I2S)

Unité de recherche L2C-UMR 5221

En partenariat international avec Southern Federal University, Russie

Micro- et nanostructures biologiques tubulaires: Mécanismes physiques de l'auto-assemblage et du fonctionnemen

Présentée par Ivan GOLUSHKO

Le 21 novembre 2018

Sous la direction de Andrea PARMEGGIANI
et Vladimir LORMAN
et Sergei ROCHAL

Devant le jury composé de

Serguei NECHAEV, Directeur de recherche, Université Paris XI

Eugene POSTNIKOV, Professeur, Kursk State University

Karima KISSA, Chargé de recherche, Université de Montpellier

Olga KONEVTSOVA, Chargé de recherche, Southern Federal University

Andrea PARMEGGIANI, Professeur, Université de Montpellier

Sergei ROCHAL, Professeur, Southern Federal University

Vladimir LORMAN, Professeur, Université de Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Co-directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Acknowledgements

This thesis has become a very important part of my life during the last four years. I was very lucky to meet so many great people who supported and guided me through my journey to become a doctor. It is difficult to thank every single one of them, but I will try to do my best.

First of all, I would like to thank my scientific advisors Prof. Sergei Rochal, Prof. Vladimir Lorman, and Prof. Andrea Parmeggiani. Sergei basically brought me to science, under his guidance I performed my first real research and published my very first paper. I really appreciate his support and guidance not only in physics but also in life. Vladimir encouraged me to pursue a joint Ph.D. program between France and Russia and introduced me to the Charles Coulomb laboratory team. I really enjoyed discussions we had, which always motivated me to keep working and become a better scientist. Working with Vladimir and learning from him was a great pleasure. Vladimir's death was a big shock for me and at one point, I started to doubt if I could continue my work at the Charles Coulomb laboratory. Fortunately, Andrea Parmeggiani kindly agreed to guide me through the rest of my thesis. Andrea is a great open person and scientist with extensive knowledge of the field, he always exudes enthusiasm for life and science. Without Andrea's help and support my successful defense would not be possible. I feel that I developed a strong bond with these people and I am very happy to have them in my life.

I would also like to thank all the members of the Charles Coulomb laboratory team, who were very kind and supportive to me, and especially Gabriel David. Gabriel helped me a lot with various formalities and documents regarding my living in France. I always have a lot of fun just discussing things with him.

Furthermore, I would like to thank Dr. Karima Kissa with whom I had a pleasure to work and discuss the biological aspect of some problems addressed in the thesis.

This thesis would not be possible without the Vernadski scholarship provided by the French Embassy in Russia. I would like to thank Arielle Michel and Smahane

Hadouche, they as representatives of the Campus France Montpellier helped me a lot by organizing my stay in France and provided me with the necessary information.

I deeply appreciate the support of my colleagues from the Nanotechnology department. I also want to thank Galina Geguzina, who helped me with proofreading of the thesis and Prof. Vladimir Chupin, who organized a seminar at Moscow Institute of Physics and Technology to discuss my work.

I am grateful to the referees Dr. Serguei Nechaev and Prof. Eugene Postnikov, who read my thesis, provided thoughtful reviews, and participated in the defense in person, despite their busy schedule. It was a pleasure to meet them.

Finally, I want to thank my parents, Natalia and Yury Golushko, for their limitless love and support.

EXTENDED SUMMARY

Motivation of the thesis

The first images of living cells were obtained by the English natural philosopher, architect and polymath Robert Hooke. In 1665 a hand drawn sketch of the cork cellular structure that he observed with a microscope were published in probably the very first scientific bestseller: “Micrographia: or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses. With Observations and Inquiries Thereupon”. Ever since scientific community has been actively studying this elementary unit of life.

The membrane is one of the main components of living cell. Cell membranes take part in a great number of processes that are indispensable for functioning of both prokaryotic and eukaryotic cells. Despite the crucial role of these systems, first correct predications about their structure and lipid nature were made only at the turn of the XIX century.

For a long time in biology in general and in cell investigation, in particular, the main purpose of physics was to develop new experimental techniques providing scientists with higher quality data. The development of classical experimental methods of condensed matter physics such as X-ray diffraction analysis and electron microscopy provided scientists with the tools to obtain detailed structure of cell membranes and membrane proteins. Moreover, a growing tendency to apply methods and approaches of theoretical physics for the description of living organisms allowed for deeper understanding of various biological processes and gave birth to a new interdisciplinary science known as biophysics.

Today classical theory of elasticity and its more generalized versions are actively used for modelling of mechanical properties of various biomimetic and biological objects such as lipid vesicles , protein microtubules [2], intestine [3] and blood vessels [4]. Viral capsids and processes of their maturation are described in terms of phase transition theory in crystals [5]. The mechanistic model of membranes proposed in the pioneer works of Peter Canham and Wolfgang Helfrich [6,7] and based on the similarities between lipid

bilayer and liquid crystals provided a backbone of the majority of modern papers that consider cellular membranes in the framework of continuum approaches. Today, the development of both theoretical models and biomimetic model systems allows not only for a better qualitative but also for a quantitative description of cellular processes involving cell membranes.

We know that both endocytosis and exocytosis fundamental mechanisms are accompanied by significant modification of cellular membranes' shape. These shape changes are driven by specific curvature-generating proteins [8]. One of the most popular model systems to study properties of the lipid bilayer and mechanisms of its interactions with proteins are tubular lipid membranes (TLMs), which are usually formed from lipid vesicles by pulling [9]. Similar structures connect endocytic vesicles and serve as channels for matter transport in cells. They are observed in a number of organelles such as mitochondria, Golgi apparatus, and endoplasmic reticulum. Model systems formed *in vitro* are usually much more homogeneous than their biological counterparts. Thus model systems are much easier to describe in terms of classical concepts of condensed matter physics.

Another crucial process that motivated us to perform present research was the Endothelio-Haematopoietic Transition (EHT). EHT leads to the extrusion of haematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) which will later on colonize haematopoietic organs allowing haematopoiesis throughout adult life. EHT was discovered with a help of zebrafish (*Danio Rerio*), however the process seems to be universal and should apply also for both mammals and birds, which makes its investigation a fundamental problem of hematopoiesis, embryology and biology [10]. Zebrafish is another type of model system, which is a whole organism. It is a freshwater fish native to the Himalayan region. This species shares about 70 percent of genes with humans [11], zebrafish eggs are fertilized and developed outside of mother's body, moreover it is highly transparent in the optical spectrum. All these factors make *Danio Rerio* extremely popular model system to study.

An active use of model systems and development of measuring devices, demands for an appropriate development of theoretical models to provide tools for experimental data analysis. Thus, in order to understand physical mechanisms underlying the above-mentioned biological processes, we have developed theoretical models of TLM and zebrafish's dorsal aorta and applied the developed theory to the latest experimental data available.

The main objectives of the study

The main purpose of the first part of the work is to study how curvature-inducing proteins interact with lipid membranes. In order to perform this, we develop a physical model of tubular lipid membranewith curvature-inducing proteins adsorbed on its surface and apply it to the latest generation of in vitro experiments. During the work the following problems have been solved:

- To develop the TLM model that takes into account the external force applied along the tube axis, the surface tension and asymmetry of the lipid bilayer (namely spontaneous curvature), the pressure difference between inner and outer medium of the membrane, and the fact that the lipid tube is connected to the vesicle from where the tube is formed.
- To obtain the energy of the system in the linear approximation and establish the stability region of the cylindrical membrane.
- To describe the critical behavior of the axially compressed TLM in the framework of the Landau phase transition theory.
- To develop an approach for the description of the interactions between proteins induced by the membrane's deformation.
- To analyze experimental data on the interactions of TLMs with curvature-inducing proteins in the framework of our model in order to understand mechanisms regulating behavior of these systems.

The second part of the work focuses on Endothelio-Haematopoietic Transition (EHT), which is responsible for haematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) production. In order to rationalize the process from the physics perspective, we generalize

the developed TLM model for the case of the elastic dorsal aorta with nonzero shear modulus and apply it to the time-lapse observation of zebrafish embryo development. During the work, the following problems have been solved:

- To develop the DA model that takes into account longitudinal stress, hydrostatic blood pressure and influence of the tissues surrounding the aorta.
- To obtain the linearized expression for the free energy of the DA and establish stability domain of the system in the parameter space <hydrostatic pressure, longitudinal stress>
- To analyze experimental data obtained by time-lapse imaging of the growing zebrafish embryo and associate certain steps of the EHT with theoretically predicted mechanical instabilities of the DA.

Content of the manuscript

The **first chapter** of the thesis is devoted to the literature review and covers topics such as composition, structure and functions of cell membranes as well as their interactions with proteins. A special emphasis is put on spontaneous curvature, which is a parameter determining equilibrium shape of the free lipid membrane. We discuss Canham-Helfrich Hamiltonian commonly used to describe lipid membranes' bending energy and introduce a principle scheme of a TLM pulling experiment (fig. 1). This type of experimental setup is commonly used to study properties of lipid membranes and how they interact with curvature inducing proteins.

In **the second chapter** we have develop a model of tubular lipid membrane pulled out of a vesicle and established conditions for the joint equilibrium of the composite system TLM-vesicle. In order to do this, we first studied the stability of the individual TLM.

We use the following expression for the energy of the lipid tube with nonzero spontaneous curvature and pressure difference:

$$\Phi = \frac{\kappa}{2} \int (K - 2C_0)^2 dS + \sigma \int dS - \Delta P \int dV - FL. \quad (1)$$

In eq. (1) the first term is the Canham–Helfrich free energy, where κ is the bending rigidity of the membrane [6,7], $K = 1/R_1 + 1/R_2$ is the mean curvature of the TLM surface, C_0 is the spontaneous curvature of the lipid bilayer. The second and third terms represent the contributions of the surface tension σ and pressure difference $\Delta P = P_{in} - P_{out}$ in the media inside and outside of the TLM, where L is the TLM length, F is the tensile (for $F > 0$) force acting along the TLM axis. dV and dS are the volume and surface differentials, and the integration is performed over the whole tube surface and volume respectively. Assuming that equilibrium TLM has a shape of the right circular cylinder of length L and radius r we minimize its energy (1) with respect to r and L and thus obtain to generalized Laplace equations:

$$\sigma = r\Delta P + \frac{\kappa(1 - 4C_0^2 r^2)}{2r^2}, F = \pi r^2 \Delta P + \frac{2\kappa\pi(1 - 2C_0 r)}{r}. \quad (2)$$

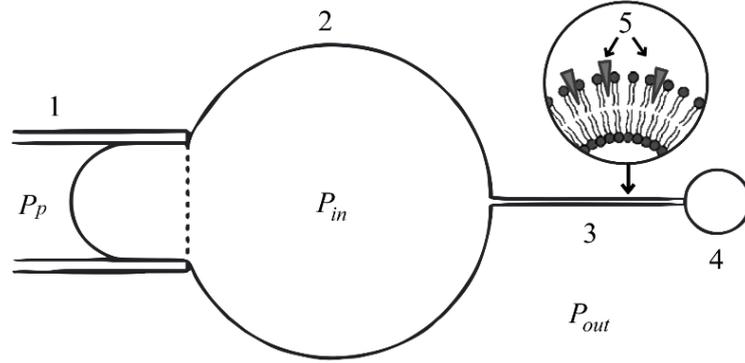


Figure 1. Schematic diagram of TLM pulling experiment: (1) micropipette; (2) vesicle; (3) TLM; (4) glass or polymer ball; (5) polymer molecules incorporated into lipid bilayer; P_p pressure in micropipette; P_{in} pressure inside vesicle; P_{out} pressure of liquid outside.

Even though equations (2) establish relations between parameters of the system they do not ensure that this shape corresponds to the minimum energy of TLM. Thus, we study stability of the individual TLM with respect to thermal fluctuations. We parametrize surface of the deformed membrane as $\langle [u_r(\phi, z) + r]\cos\phi, [u_r(\phi, z) + r]\sin\phi, z \rangle$, where $u_r(\phi, z)$ – radial displacement field of the TLM's surface. Then we expand the

displacement field as $u_r(\phi, z) = \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} A_{n,m} \exp(i(n\phi + k_m z))$, and obtain the following expansion of the free energy of the TLM under periodic boundary conditions:

$$\Phi = \frac{\pi L k}{r^3} \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} M_{n,m} A_{n,m} A_{n,m}^* . \quad (3)$$

In eq. (3) coefficients $M_{n,m}$ are given by the following expression:

$$M_{n,m} = (r^2 k_m^2 + n^2 - 1)^2 + (2\alpha_c - 2)(n^2 - 1) + \alpha_f (r^2 k_m^2 + n^2 - 1). \quad (4)$$

We reduce the number of system's control parameters down to two, namely: normalized axial force $\alpha_f = Fr/(\pi k)$ and normalized spontaneous curvature $\alpha_c = 2C_0 r$. Highly symmetric cylindrical phase of the TLM is stable when matrix $M_{n,m}$ is positively determined. Using this condition, we establish the stability domain of the individual TLM and show that depending on the values of control parameters $\langle \alpha_f, \alpha_c \rangle$ instability can be associated with two types of modes.

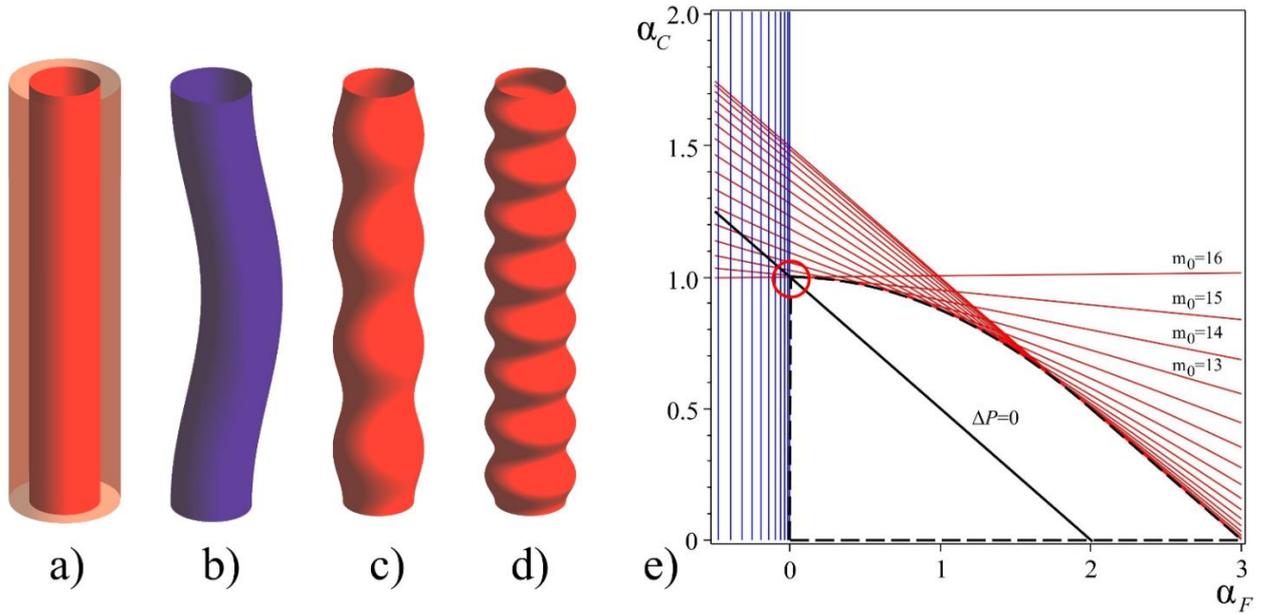


Figure 2. Possible soft TLM modes: a) $n=0, m=0$ (radial breathing mode); b) $n=1, m=1$ (buckling mode); c) $n=0, m=4$ (corrugation mode); (d) $n=0, m=8$ (corrugation mode). €

Stability domain of TLMs with $L/r=100$: red lines are set by equations $M_{n,m}=0$ and correspond to possible soft deformation modes; bold dashed line indicates the boundary of TLM stability domain; black solid line is set by equation $\alpha_c = 1 - \alpha_f / 2$ and corresponds to zero pressure difference ($\Delta P = 0$). Red circle highlights complex instability point.

The first mode type is two-fold degenerate mode with $n=0$ and $m=\pm m_0$, where $m_0=0,1,2\dots m_{max}$ and $m_{max}=\text{round}(L/(2\pi r))$ (fig. 2 a,c,d), where the function $\text{round}(x)$ rounds the value of x to the nearest integer.

The second mode type is four-fold degenerate buckling modes with $n=\pm 1$ and $m=\pm 1$ (fig. 2 b). Let us note that in the case of periodic boundary conditions modes with $n=\pm 1$ and $m=0$ are translational and do not influence the stability of the system.

The stability domain of the individual TLM in the parameter space $\langle \alpha_F, \alpha_C \rangle$ on the left is bounded by the vertical line $\alpha_F = -(2\pi r / L)^2$, and on the top right is bounded by the polygon formed by a straight segments set by equations $M_{0,m}=0$ where m goes from 0 to $m_{max}=\text{round}(L/(2\pi r))$, which can be also approximated as:

$$\alpha_F < 3 - 2\alpha_C, \text{ if } \alpha_F \geq 2 \text{ and } \alpha_C < 1 - \alpha_F^2 / 8, \text{ if } \alpha_F \leq 2. \quad (5)$$

The origin of the bottom boundary $\alpha_C = 0$ is related to the fact that in the systems under consideration [A1,9,12,13] the protein solution is introduced from the outside leading to the generation of positive spontaneous curvature.

After that we performed an analogous analysis for the spherical vesicle with constant volume and zero spontaneous curvature of the lipid bilayer (according to experimental data at low concentrations, curvature inducing proteins primarily affect spontaneous curvature of the TLM, whereas spontaneous curvature of the vesicle remains unchanged [A1]). We show that stability of the equilibrium vesicle described by the classic Laplace law ($\sigma = 1/2 R \Delta P$) can be estimated as:

$$\Delta P_{ins}^{ves} = -\frac{12\kappa}{R^3}. \quad (6)$$

Having stability domains and Laplace equation for both vesicle and individual TLM we assume that pressure difference ΔP and surface tension σ are equilibrated over the whole system and obtain the following equations describing composite system TLM-vesicle:

$$F \approx \frac{2\kappa\pi(1-\alpha_C)}{r} + \gamma \frac{\kappa\pi(1-\alpha_C^2)}{r}, \sigma \approx \frac{\kappa(1-\alpha_C^2)}{r^2}(1+2\gamma), \Delta P \approx \frac{\kappa(1-\alpha_C^2)}{r^2 R}(1+2\gamma). \quad (7)$$

In eqs. (7) $\gamma = r/R$ is a small parameter characterizing the relation between tube and vesicle radii. Equations (7) account for the influence of the vesicle on the TLM and reduce its stability domain to a single curve in the $\langle \alpha_F, \alpha_C \rangle$ space:

$$\alpha_F \approx 2 - 2\alpha_C + \gamma(1 - \alpha_C^2). \quad (8)$$

Curve (8) slightly deviates from the straight line $\alpha_C = 1 - \alpha_F/2$, which characterizes system with zero pressure difference. Contributions to the free energy of the TLM-vesicle system given by the pressure difference and surface tension relate as r/R , and thus pressure difference plays a minor role. Basing on this result we omit the pressure difference and estimate value of the mean-square fluctuations of the TLM radius at the point $\alpha_F = 0$, which corresponds to the absence of the axial pulling force. For TLM with $L/r = 100$ and bending rigidity $\kappa \approx 12k_B T$ [9] this value is about 700-800% of the equilibrium radius. Moreover the main contribution to the standard deviation is given by the four-fold degenerate mode with $n = \pm 1$ and $m = \pm 1$ (about 600%) whereas contribution of the corrugation mode does not exceed that of all other modes. Softness of the buckling modes of such TLM could explain irregular shapes of the membranes observed both *in vivo* and *in vitro*.

In **the third chapter** we perform a detailed analysis of the critical instabilities arising in a TLM which is connected to a vesicle and subjected to a compressive axial force. Fig. 2d shows that in the vicinity of the point $\alpha_F = 0$ two types of modes become soft simultaneously, namely radial corrugation and long-wave buckling. In order to study the behavior of the system in the case of small negative α_F values we omit pressure difference in the system and apply Landau phase transition theory. According to it, in the vicinity of the phase transition point the free energy of the system is mainly determined by the critical modes. So instead of the full free energy of the system we utilize Landau-type energy expansions with a single control parameter α_F , with amplitudes of corrugation ($n=0, k_m^2 r^2 \approx 1$) and buckling modes ($n=\pm 1, m=\pm 1$) playing the role of order parameters (they vanish in the highly symmetrical cylindrical phase whereas their

fluctuations diverge in the vicinity of the critical point). Comparison of the expansions of the 4th, 6th and higher orders shows that minimal critical displacement field can be written as [A2]:

$$u(\phi, z) = r \left[a \cos\left(\frac{2\pi m_0}{L} z\right) + b \cos\left(\phi - \frac{2\pi}{L} z\right) \right], \quad (9)$$

where a and b are dimensionless real amplitudes. Corresponding minimal Landau-type expansion describing the instability has the following form [A2]:

$$F^{(4)} = \frac{\pi K}{32\gamma} (16F_{2,0}a^2 + 64F_{0,2}b^2 + 4F_{2,2}a^2b^2 + F_{4,0}a^4 + F_{0,4}b^4) \quad (10)$$

where coefficients $F_{i,j}$ are functions of α_F (normalized axial force applied to TLM):

$$\begin{aligned} F_{2,0} &= \alpha_F + \alpha_F \delta + \delta^2, \\ F_{0,2} &= \pi^2 \gamma^2 (\alpha_F + 4\pi^2 \gamma^2), \\ F_{2,2} &= 3\delta - \delta^2 - 2\alpha_F(1 + \delta) + 4\pi^2 \gamma^2 [3 - (1 + \delta)(5\delta + 4\alpha_F + 20\pi^2 \gamma^2)] - 1, \\ F_{4,0} &= 11 - 10\delta - 19\delta^2 - 4\alpha_F(1 + \delta)^2, \\ F_{0,4} &= (1 + 4\pi^2 \gamma^2) [11 - 4\pi^2 \gamma^2 (40\pi^2 \gamma^2 + 4\alpha_F + 9)]. \end{aligned} \quad (11)$$

In expressions (10) and (11), $\gamma = r/R$ and $\delta = k_m^2 r^2 - 1$ are small expansion parameters.

The expansion (10) describes two consecutive second order phase transitions. $F_{2,0}$ is the first coefficient to change its sign when α_F decreases (which corresponds to the increase of the TLM axial compression). $F_{2,0}$ vanishes at the point $\alpha_F = -\delta^2/(\delta + 1)$ where the first second-order phase transition occurs, leading to the TLM corrugation with the period equal to the TLM cross-section perimeter (see fig. 3). Since $F_{2,2}$ is negative, the nonlinear biquadratic coupling term decreases the free energy of the system and thus the second second-order phase transition leading to the spontaneous symmetry breaking occurs *almost* simultaneously with the first one. TLM develops chiral buckling with period equal to the tube length, at the point:

$$\alpha_F = \alpha_b \approx -\delta^2 + \delta^3 - (88\pi^4 \gamma^4 - 22\pi^2 \gamma^2 \delta^2 + \delta^4), \quad (12)$$

where expression in the brackets corresponds to the additional compression required to bend the TLM.

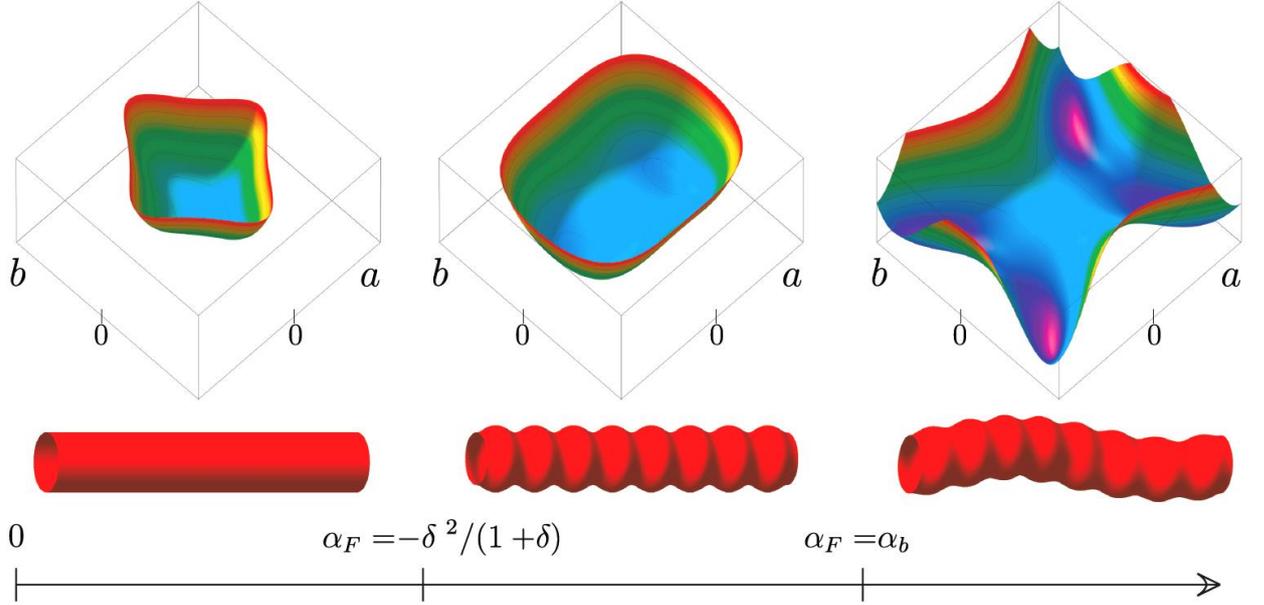


Figure 3. Complex instability in TLM. Increase of the axial compressing load leads to the corrugation and then to the chiral buckling. Free energy of the system is approximated by the Landau potential with amplitudes of critical corrugation a and buckling b being two critical order parameters.

In **the fourth chapter** of the manuscript, we develop ideas introduced in [14] and propose a model of the lipid tube with curvature-generating proteins adsorbed on its surface, which utilizes a novel multipole approach.

It is well known that even individual molecules of curvature-inducing proteins can locally deform lipid membrane. However, the induced deformation cannot be strongly localized, since this would lead to the emergence of regions with extremely high curvature and thus high energy [15-17]. Due to this fact long range forces between proteins at the TLM surface should exist. The way proteins interact with a membrane depends on various factors [A1,9,12,13,18], and building a microscopic model of such complex system is a very difficult problem. Thus, in order to describe an action of proteins on a TLM we introduced a phenomenological field of radial forces $\Pi(\phi, z)$, which deforms the membrane in a similar manner to the modeled protein molecule. In the present work we do not consider electrostatic interactions between proteins and use expression (13) for the free energy of the coupled system TLM-proteins [14].

$$\Phi_p = \Phi - \int u_r(\phi, z) \Pi(\phi, z) dS + \Delta\Phi_{chem}. \quad (13)$$

In eq. (13) term Φ represents energy (1), $u_r(\phi, z)$ – is the radial displacement field of the TLM surface, $\Delta\Phi_{chem}$ is the energy of chemical interaction between proteins and membrane, which depends exclusively on the number of adsorbed molecules. It is important to note that, since adsorption of proteins is an energetically favorable process, $\Delta\Phi_{chem}$ should be greater by absolute value than membranes bending energy induced by the field $\Pi(\phi, z)$. We neglect the pressure difference and study the behavior of the system in the stability domain of the TLM cylindrical phase $\alpha_f \in [\sim 0..2]$. Assuming that membrane deformation is small, we use the following expansions for the deformation and force fields:

$$\begin{aligned} u_r(\phi, z) &= \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} A_{n,m} \exp(i(n\phi + k_m z)), \\ \Pi(\phi, z) &= \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} \Pi_{n,m} \exp(i(n\phi + k_m z)), \end{aligned} \quad (14)$$

and obtain the free energy of the system in linear approximation:

$$\Delta\Phi = \frac{\pi L k}{r^3} \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} M_{n,m} A_{n,m} A_{n,m}^* - 2\pi r L \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} \Pi_{n,m}^* A_{n,m} + \Delta\Phi_{chem}, \quad (15)$$

where matrix $M_{n,m}$ has a simplified form:

$$M_{n,m} = (r^2 k_m^2 + n^2 - 1)^2 + \alpha_f r^2 k_m^2. \quad (16)$$

By minimizing eq. (15) we establish relations between coefficients $A_{n,m}$ and $\Pi_{n,m}$ and thus relate the deformation of the TLM to the perturbation induced by proteins:

$$A_{n,m} = \frac{r^4}{k} \frac{\Pi_{n,m}}{M_{n,m}}, \quad (17)$$

which allows to write down the deformation energy as a function of $\Pi(\phi, z)$:

$$E_d = \frac{\pi L r^5}{k} \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} \frac{\Pi_{nm} \Pi_{nm}^*}{M_{n,m}} \quad (18)$$

After that, we introduce several assumptions in order to simplify the use of eq. (18).

- interactions between N adsorbed proteins are additive and a perturbation induced by proteins is just an ordinary sum of force fields produced by each

curvature-generating molecule (generally speaking this assumption is automatically fulfilled since our theory is harmonic).

- adsorbed proteins maintain their orientation on the TLM surface (according to the known experimental data on structure of N-BAR proteins, and their orientation on the TLM surface [19-23], as well as MD simulations [24], these proteins align themselves perpendicularly to the TLM axis)

Having these in mind, we can write down interaction energy of a pair of proteins as:

$$E_d = \frac{\pi L r^5}{\kappa} \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} \frac{2\Pi_{nm}^0 (\Pi_{nm}^0)^* \left(\cos\left(n\Delta\phi + \frac{2\pi m\Delta z}{L} \right) + 1 \right)}{M_{n,m}}, \quad (19)$$

In eq. (19) $\Delta\phi = \phi_i - \phi_j$ is an angular distance between multipoles' centers, $\Delta z = z_i - z_j$ is a distance between their centers along the TLM axis, Π_{nm}^0 is a perturbation induced by the multipole located in the origin point.

The simplest way to introduce a force field that approximates the action of curvature-generating protein is to construct a superposition of forces F_i normal to the TLM surface, localized in the area occupied by the modeled protein molecule. These forces should satisfy conditions of mechanical equilibrium: their sum and also the sum of their moments should be equal to zero. We analyze three types of such multipoles: dipole, tripole and quadrupole. The structure of multipoles, the deformations that they induce and the energy of their pairwise interaction are depicted in fig. 4.

Based on the obtained results we conclude that the equilibrium distance between two interacting multipoles is mainly regulated by their geometry i.e. relative position of forces within the multipole. In all considered cases, the behavior of the system is qualitatively independent on the value of the axial force applied to TLM in the range $\alpha_F \in [0.5..2]$. The variation of the α_F influences the amplitude of the TLM deformation and depth of the energetic minima (both increase with the decrease of α_F) whereas their positions remain practically unchanged. However, when α_F approaches to zero (and thus the critical instability point) protein interaction radius drastically increases. Detailed analysis of this case is out of the scope of the manuscript, since in the vicinity of the

critical point linear model can no longer describe adequately the system. As it is shown in the fig. 5 obtained distribution of quadrupoles is reminiscent of that of F-BAR Toca family proteins in regular structures that they form on the surface of lipid tubes [19].

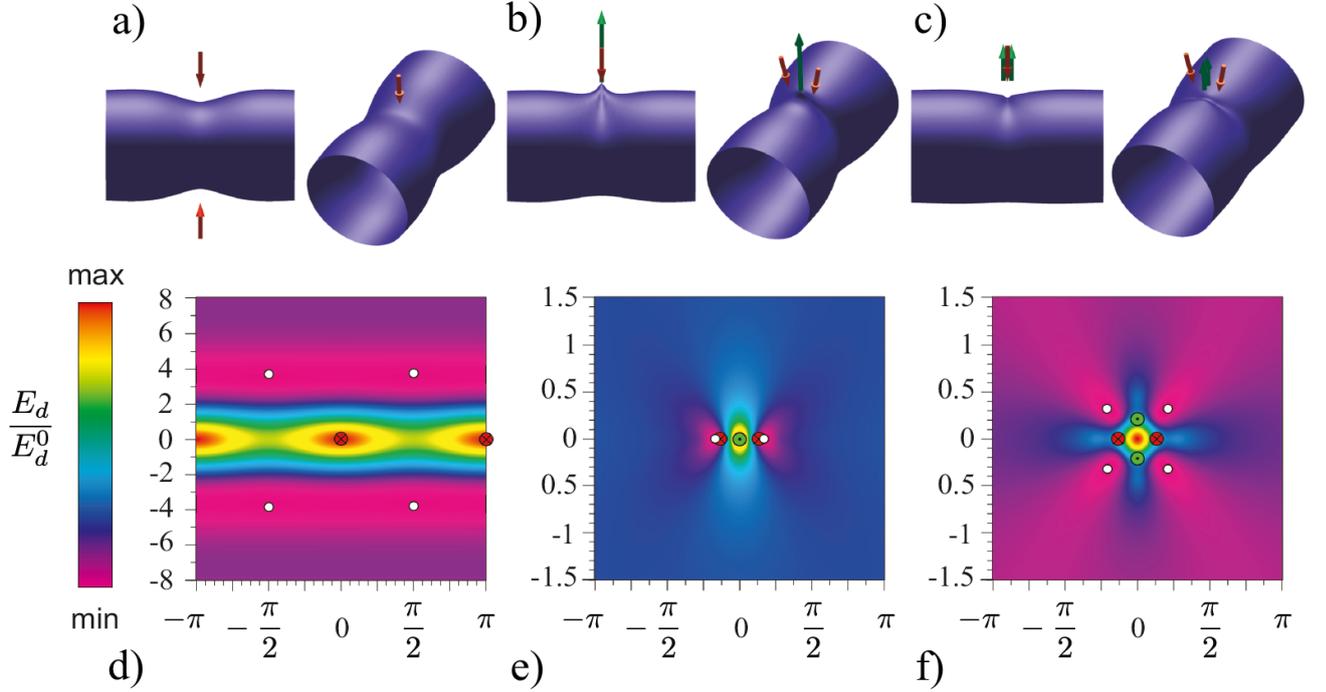


Figure 4. TLM deformation induced by force multipoles and energy of their coupling.

The TLM shape under the action of multipoles (which model the interaction of the protein molecule with the lipid bilayer) is shown in the top panels. Green and red vectors depict radial forces of different sign forming the multipoles. The bottom panels show the coupling energy E between two multipoles as a function of the distance ($\Delta\phi$, Δz) between them. Green and red circles depict the radial force sign. The distance (Δz) along the TLM axis is measured in TLM radius unit. Energy minima are shown with white circles. The following multipoles are represented: (a,d): dipole composed of a pair of diametrically opposite forces, $\min(E/E_d^0) \approx 0.86$, $\max(E/E_d^0) \approx 2.03$; (d,e): tripole formed by three forces situated in the TLM cross section perpendicular to its axis, the angular separation between forces is $\Delta\phi_0 = \pi/15$ $\min(E/E_d^0) \approx 0.66$, $\max(E/E_d^0) \approx 2$; (c,f): symmetrical quadrupole with the forces applied at the points $(\pm\pi/15, 0)$ and $(0, \pm\pi/15)$, $\min(E/E_d^0) \approx 0.88$, $\max(E/E_d^0) \approx 2$). All plots are given for the TLM with $L/r=100$ and $\alpha=1$.

E_d^0 is the energy of the TLM strain which is induced by two uncoupled multipoles (located far from one another).

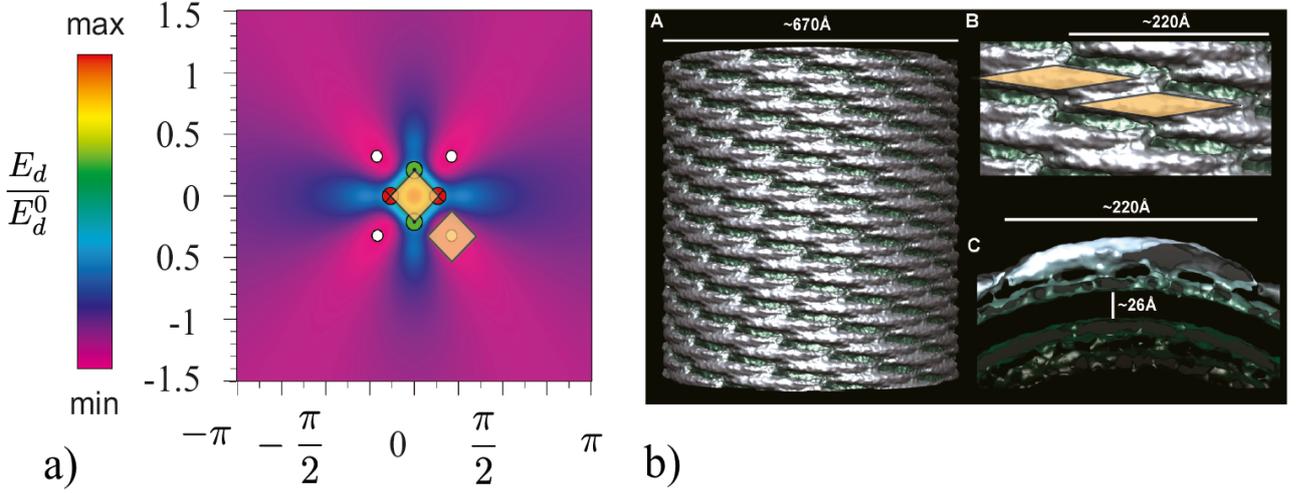


Figure 5. Similarities in arrangement of quadrupoles and real proteins. a) minimal energy configuration of the system consisting of two quadrupoles represented by yellow squares; b) single particle helical reconstruction of a CIP4 F-BAR domain-induced 67nm membrane tubule at 17 Å resolution [19]. The protein coat is colored blue-gray, and the underlying membrane is green.

In the fourth chapter we also study the behavior of the system in the case of pinned TLM. First, we examine TLM with no proteins on its surface. In order to do that we expand displacement field of the TLM surface in a new set of orthonormal eigenfunctions compatible with the pinned boundary conditions $u_r(\phi, z) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=1}^{\infty} A_{n,m} \exp(in\phi) \sin(k_m z)$ and obtain the following expression for the free energy of the TLM:

$$\Phi_{\text{pinned}} = \frac{1}{2} \frac{\pi L k}{r^3} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=1}^{\infty} M_{n,m} A_{n,m} A_{n,m}^* + k\pi\alpha_F \sum_{m=1}^{\infty} A_{0,m} k_m (1 - (-1)^m) \quad (20)$$

$$M_{n,m} = (r^2 k_m^2 + n^2 - 1)^2 + \alpha_F r^2 k_m^2$$

Our analysis shows that shape of the pinned TLM slightly differs from the right circular cylinder (see fig. 6). As a matter of fact, unlike eq. (3), eq. (20) contains linear terms in displacement amplitudes.

We then analyzed how new boundary conditions affect the way proteins interact with membrane and between each other. By taking the deformed cylinder minimizing energy (20) as reference state and expanding the perturbation field as $\Pi(\phi, z) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=1}^{\infty} \Pi_{n,m} \exp(in\phi) \sin(k_m z)$ we obtain the deformation energy of the pinned TLM with a protein molecule adsorbed at its surface (21).

$$E_d = \frac{F_0^2 r^3}{\kappa \gamma L} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=1}^{\infty} \frac{\left(\frac{\cos(k_m \Delta z_0) - \frac{\cos(n \Delta \phi_0)}{\cos(\Delta \phi_0)}}{M_{n,m}} \right)^2}{\sin^2(k_m z)}, \quad (21)$$

In eq. (21), the protein action on the membrane is approximated by a quadrupole. When the forces comprising multipole are strongly localized, its characteristic size can be estimated as a half of the TLM radius (this estimation is in good agreement with the known size relations in living systems [19,20,25,26]). In this case the membrane deformation energy as a function of the z coordinate of the multipole center rapidly decays to zero in the regions about 2 tube radii in size at the tube's ends (see fig. 7). Everywhere but in the above mentioned regions, dependence on the z coordinate of eq. (21) is negligibly weak, and thus positions of proteins do not influence the way they interact with membrane and each other.

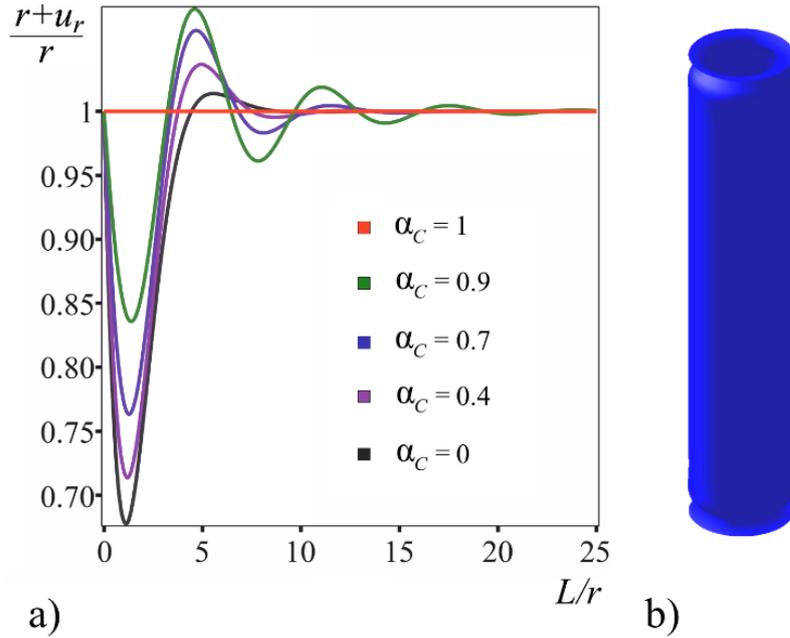


Figure 6. Shape of the pinned TLM with $L/r=100$. a) Generatrix of the TLM at different spontaneous curvature values: $\alpha_c = 1$ (red line), $\alpha_c = 0.9$ (green line), $\alpha_c = 0.7$ (blue line), $\alpha_c = 0.4$ (purple line), $\alpha_c = 0$ black line. b) TLM with zero spontaneous curvature of the lipid bilayer (proportions of the tube have been changed).

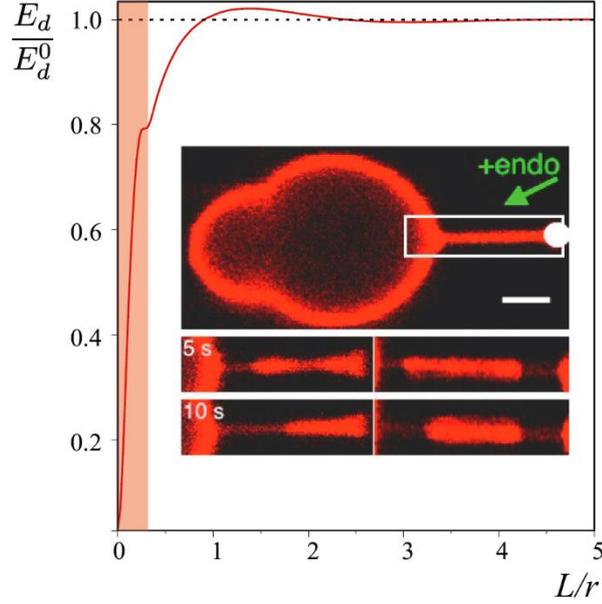


Figure 7. High affinity of curvature-mediating proteins to TLM ends. Deformation energy E_d induced by binding of a single quadrupole. E_d^0 is the energy of the TLM deformation which is induced by a single quadrupole located in the middle of the tube. Insert: scaffolding by endophilin A2. Endophilin A2 N-BAR domain (endo) binds to the tube's ends and forms a scaffold that continuously grows along the tube. $t=0$ marks the time when protein was detected on the tube, scale bar $2 \mu\text{m}$ [A1].

In **the fifth chapter** we generalize the developed TLM model for the case of the zebrafish dorsal aorta which has nonzero shear modulus. We model DA as a thin cylindrical shell of isotropic elastic material subjected to the pressure difference and external elastic forces applied by the tissue matrix surrounding the DA.

Since deformation energy of the DA depends on all three components of the displacement field (unlike in the case of TLM, whose deformation energy is determined exclusively by its geometrical shape) we parametrize surface of the aorta as follows:

$$\begin{aligned}
 x' &= [(R+u_r) \cos \varphi - u_\varphi \sin \varphi] \\
 y' &= [(R+u_r) \sin \varphi + u_\varphi \cos \varphi] \\
 z' &= z + u_z
 \end{aligned} \tag{22}$$

where R is the tube's radius in the relaxed state and $u = [u_r, u_\varphi, u_z]$ is a field characterizing displacements of the DA surface in cylindrical coordinates.

Assuming that DA is subjected to the homogeneous longitudinal stress σ_{zz} , due to the growth rate difference between surrounding tissues and aorta itself, we write the DA energy as follows:

$$\Phi = \int_S \left[\frac{\lambda}{2} (\varepsilon_{ii})^2 + \mu (\varepsilon_{ik})^2 + \frac{\kappa}{2} (\Delta H')^2 - \sigma_{zz} \cdot \partial_z u_z \right] dS - \Delta P V, \quad (23)$$

where ε_{ij} is a two-dimensional nonlinear deformation tensor, λ and μ are two-dimensional analogs of Lamé coefficients, κ is a bending rigidity, $\Delta H' = (\partial_\phi^2 u_r + R^2 \partial_z^2 u_r - \partial_\phi u_\phi) / R^2$ is a renormalized average curvature variation, which does not account for homogeneous radius variation. Integration is performed over the DA surface. V stands for the DA volume and ΔP stands for the pressure difference in the system.

Homogeneous mechanical stress induced by the external tissues and hydrostatic pressure (terms $\sigma_{zz} \cdot \partial_z u_z$ and $\Delta P V$) leads to a homogeneous deformation of the cylindrical shell, maintaining its symmetry, thus we represent total displacement field (caused by both thermal fluctuations and external forces) of the DA surface as:

$$u = u_0 + u' \quad (24)$$

Providing that both control parameters $\Delta P R$ and σ_{zz} are significantly smaller (in absolute value) than any of the Lamé coefficients and deformations are small, we can find the free energy of the system $\Delta \Phi(u')$, as a function of the additional virtual displacements u' , taking stressed cylinder with energy $\Phi(u_0)$ as a reference state:

$$\Delta \Phi(u') = \Phi(u) - \Phi(u_0) \quad (25)$$

We expand the displacement field of thermal fluctuations as:

$$u'_i(\varphi, z) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=-\infty}^{\infty} (A_{n,m}^i e^{i(k_m z + n\varphi)}), \quad (26)$$

where L is the length of the DA, $k_m = \frac{2\pi m}{L}$, n and m are wave numbers and $A_{n,m}^i$ ($i = 1..3$) are complex amplitudes of the field harmonics. After performing all the substitutions in eq. (25) and retaining only members not higher than the second order in the components of the displacement field u' and their spatial derivatives, we integrate the expression and obtain the harmonic energy of the system eq. (27).

$$\Delta\Phi=2\pi RL \sum_{n=-\infty, m=-\infty}^{\infty} M_{n,m}^{i,j} A_{n,m}^i A_{n,m}^{j*} \quad (27)$$

where the matrix M has the following form (28)

$$\begin{bmatrix} \frac{\lambda+2\mu}{R^2} + \frac{\kappa(R^2 k_m^2 + n^2)^2}{R^4} + \frac{\Delta P(R^2 k_m^2 + 2n^2 - 2)}{2R} + \sigma_{zz} k_m^2 & -i \left(\frac{\kappa(R^2 k_m^2 + n^2)}{R^4} + \frac{\lambda+2\mu}{R^2} \right) n & -i \left(\frac{\lambda - \Delta PR}{R} \right) k_m \\ i \left(\frac{\kappa(R^2 k_m^2 + n^2)}{R^4} + \frac{\lambda+2\mu}{R^2} \right) n & \frac{R^2(\lambda+2\mu) + \kappa}{R^4} n^2 + \left(\frac{3\Delta PR + 8\mu + 2\sigma_{zz}}{8} \right) k_m^2 & \left(\frac{\lambda + \mu - \frac{\sigma_{zz}}{4}}{R} - \frac{3\Delta P}{8} \right) n k_m \\ i \left(\frac{\lambda - \Delta PR}{R} \right) k_m & \left(\frac{\lambda + \mu - \frac{\sigma_{zz}}{4}}{R} - \frac{3\Delta P}{8} \right) n k_m & (\lambda + 2\mu) k_m^2 + \left(\frac{3\Delta PR + 8\mu + 2\sigma_{zz}}{8R^2} \right) n^2 \end{bmatrix}$$

The matrix M defines conditions of the possible coexistence of phases. In high symmetry phase matrix M should satisfy the inequality $Det(M) > 0$. Thus the points of the parameter space $\langle \Delta PR, \sigma_{zz} \rangle$ which violate this inequality for the specific n and m wave numbers correspond to the adjacent low-symmetry phase.

In the **sixth chapter** we establish stability domain of the highly symmetrical cylindrical phase of the DA and discuss critical modes existing in the system, we also apply results of our theoretical analysis to the time-lapse imaging of zebrafish embryo development. Since matrix M is quite complex straightforward analytical analysis of the equation $Det(M)=0$ is extremely difficult. Thus we introduce a number of assumptions which allow us to simplify the matrix and at the same time do not violate self-consistency of the developed theory.

First, we consider modes with rotational symmetry and assume that $n=0$, which reduces equation $Det(M)=0$ down to:

$$M_{11}M_{33} - M_{13}M_{31} = 0 \quad (29)$$

By solving this equation with respect to longitudinal stress component σ_{zz} , and then minimizing it with respect to the wave vector k_m , we obtain σ_{zz}^{corr} , which corresponds to the development of the corrugation mode (similar to that depicted in the fig. 2). After using the relations $(\sigma_{zz}, \Delta PR \ll \lambda, \mu)$ we can write down:

$$\sigma_{zz}^{corr} = -\frac{\Delta PR}{2} \left(1 + 2(2\nu_{2D} - 1) \sqrt{\frac{\kappa}{E_{2D}R^2}} \right) - \frac{2\sqrt{\kappa E_{2D}}}{R} \quad (30)$$

where $E_{2D} = \frac{4\mu(\lambda+\mu)}{\lambda+2\mu}$ is a two-dimensional Young modulus and $\nu_{2D} = \frac{\lambda}{\lambda+2\mu}$ is a two-dimensional Poisson's ratio. Expression (30) shows that longitudinal compression,

which can be generated by the growth rate difference between the aorta and surrounding tissues, leads to the destabilization of the system and appearance of the corrugation pattern, on contrary positive blood pressure increases stability of the system.

Second, we examine stability of the system with respect to long wave buckling and solve the equation $Det(M)=0$ taking the wave number $n=1$. Following work [27] we use approximation of the long tube ($L \gg R$) and assume that the wave vector k_m has small but finite value and obtain the expression for the critical load leading to the aorta buckling.

$$\sigma_{zz}^{buck} = -2\mu \frac{(\lambda + \mu)R^2 + \kappa}{(\lambda + 2\mu)R^2 + \kappa} (k_m R)^2 \quad (31)$$

Finally yet importantly, we examine the stability of the DA cross-section with respect to pressure difference. We assume that tube preserves its translational symmetry along the main axis and set the wave vector k_m to be zero, which greatly simplifies equation $Det(M)=0$:

$$M_{11}M_{22} - M_{12}M_{21} = 0 \quad (32)$$

Taking into account that $\kappa \ll \lambda R^2, \mu R^2$ we obtain expression for the critical value of the pressure difference:

$$\Delta P = -\frac{3\kappa}{R^3} \quad (33)$$

with corresponding critical mode being two-fold degenerate transversal buckling $|n|=2, k_m=0$. This result shows that external hydrostatic compression makes tube's cross-section take an oval shape.

After that, we compare stability of the DA with respect to all three of these modes. To do that we introduce two small dimensionless parameters: the normalized pressure $p = \Delta PR / E_{2D}$ and the normalized bending rigidity $\gamma = \sqrt{\frac{\kappa}{E_{2D}R^2}}$, and obtain stability domain of the DA in the space of these parameters (fig. 8).

In the sixth chapter, we also use results of our theoretical study to explain experimental data on EHT in zebrafish obtained by the means of 4D-fluorescence microscopy [10]. We propose that modulation of the aorta radius appearing in the system during the EHT is a result of mechanical instability rather than specific genetic control of

the process. It is shown that compressing longitudinal stress originating from the growth rate difference between aorta and tissues around it can lead to the DA corrugation. We also suggest that deformation of individual cells occurring prior to their exit from aorta is associated with another type of mechanical instability.

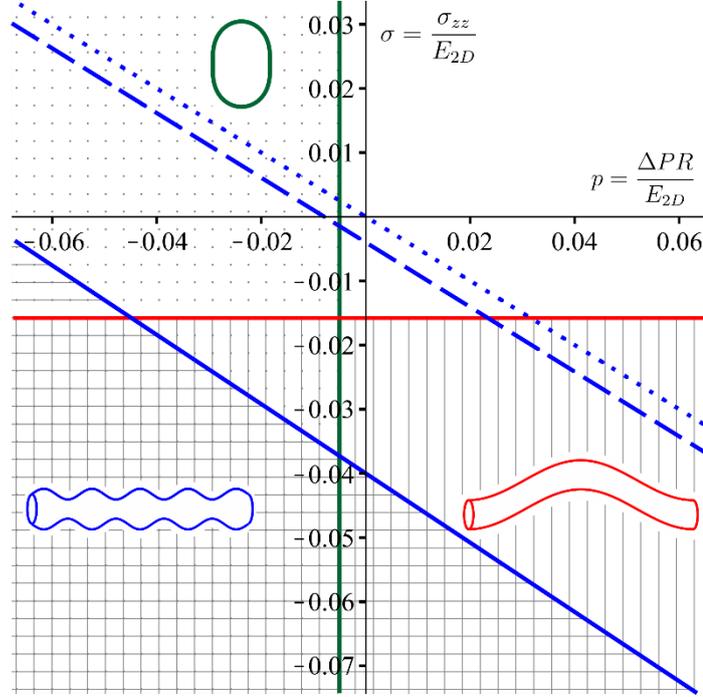


Figure 8. Stability domain of the incompressible tube with radius to length ratio $R/L=1/50$. Non-shaded area corresponds to the high-symmetry cylindrical phase. Red line corresponds to the critical values of the axial stress σ_{zz} leading to the Euler instability. Green vertical line corresponds to the critical value of pressure leading to the transversal buckling with wave numbers $|n|=2, m=0$ of tube with bending rigidity $\gamma=1/25$. Set of blue lines corresponds to the critical values of stress σ_{zz} leading to the corrugation instability of tubes with various normalized bending rigidities: solid line $\gamma=1/25$, dashed line $\gamma=1/250$, dotted line $\gamma=0$.

Finally, we compare results of our analysis to the results obtained for analogous system and discuss how properties of the surrounding tissues affect stability of the DA. In order to do that we introduce member $\int_s \frac{C}{2} u_r^2 dS$ to the free energy of the system, where C is a radial pinning coefficient (see papers [27,28]). This leads to the emergence of the single additional term C in the element M_{11} of the matrix M . Analysis shows that

estimation that was previously made for critical value of the longitudinal stress σ_{zz} leading to the DA corrugation holds, however in that case effective 2D Young modulus should be used $E'_{2D}=E_{2D}+CR^2$.

The major results of the work

1. We have developed a model of the TLM connected to a vesicle, which takes into account spontaneous curvature of the lipid bilayer, surface tension, pressure difference and applied longitudinal force.

2. We have shown that joint equilibrium of the system TLM-vesicle is described by a well-defined curve in the space of control parameters, i.e. the normalized spontaneous curvature and the normalized longitudinal force. The curve terminates at the instability point of Euler type and corresponds to low values of pressure difference.

3. With the help of the Landau phase transition theory we have built a theory that describes critical and supercritical behavior of a TLM. We have shown that a lipid tube subjected to an axial compression develops corrugation and then unconventional chiral buckling.

4. We have developed a novel multipole approach for the description of anisotropic interactions between proteins adsorbed at the membrane's surface. Our approach models the action of curvature-generating proteins via force multipoles, sets of forces satisfying mechanical equilibrium conditions and organizing themselves into patterns similar to the ones observed experimentally.

5. By imposing for the first time pinned boundary conditions for the system, we have described high affinity of the curvature-generating proteins to the TLM ends as experimentally observed.

6. We have shown that even in the simplest case with zero pressure difference and spontaneous curvature the equilibrium shape of the pinned TLM differs from the simple circular cylinder.

7. We have generalized the TLM model for the case of the elastic tube with nonzero shear modulus, which is embedded in a tissue matrix and subjected to the

pressure difference and axial tension, and use it in the novel context of the endothelio-hematopoietic transition in the dorsal aorta zebrafish embryo.

8. We have established stability domain of the dorsal aorta in the parameter space <normalized pressure, normalized axial stress> and showed that it is confined by three types of modes, namely: corrugation, transversal buckling and classical long-wave Euler buckling.

9. By comparing results of our theoretical analysis to experimental data we were able to rationalize such aspects of the EHT as large scale shape changes of the dorsal aorta and initiation of the exit of single cells, and suggest that these events are a result of instabilities arising in the system due to the mechanical stress and not necessarily genetic regulation.

References

1. Rochal, S.B. Viscoelastic dynamics of spherical composite vesicles / S.B. Rochal, V.L. Lorman, G. Mennessier // *Phys. Rev. E.* – 2005. – V. 71. – №. 2. – P. 021905.
2. Brangwynne, C.P. Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement / C.P. Brangwynne, F.C. MacKintosh, S. Kumar, N.A. Geisse, J. Talbot, L. Mahadevan, K.K. Parker, D.P. Ingber, D.A. Weitz // *JCB.* – 2006. – V. 173 – №. 5. – P. 733-741.
3. Savin, T. On the growth and form of the gut / T. Savin, N. Kurpios, A. Shyer, P. Florescu, H. Liang, L. Mahadevan, C.J. Tabin // *Nature.* – 2011. – V. 476. – №. 7358. – P. 57-62.
4. Alstrom, P. Instability and "Sausage-String" Appearance in Blood Vessels during High Blood Pressure / P. Alstrom, V. Eguiluz, M. Colding-Jorgensen // *Phys. Rev. Lett.* – 1999. – V. 82. – №. 9/ – P. 08585-3.
5. Konevtsova, O.V. Theory of morphological transformation of viral capsid shell during the maturation process in the HK97 bacteriophage and similar viruses / O.V. Konevtsova, V.L. Lorman, S.B. Rochal // *Phys. Rev. E.* – V. 93. – №. 5. – 2016. – P. 052412.

6. Canham, P.B. The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell/ P.B. Canham // *J Theor. Biol.* – 1970. – V. 26. – №. 1. – P. 61-81.
7. Helfrich, W. Elastic Properties of Lipid Bilayer: Theory and Possible Experiments / W. Helfrich // *Z. Naturforsch.* – 1973. – №. 28. – P. 693-703.
8. McMahon, H.T. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling / H.T. McMahon, J.L. Gallop // *Nature.* – 2005. – V. 438. – №. 7068. – P. 590-6.
9. Sorre, B. Nature of curvature coupling of amphiphysin with membranes depends on its bound density / B. Sorre, A. Callan-Jones, J. Manzi, B. Goud, J. Prost, P. Bassereau, A. Roux // *PNAS.* – 2012. – V. 109. – №. 1. – P. 173-178.
10. Kissa, K. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition / K. Kissa, P. Herbomel // *Nature* – 2010. – V. 464. – P. 112-115.
11. Howe, K. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome / K. Howe, M.D. Clark, C.F. Torroja, J. Torrance, et. al. // *Nature* – 2013. – V. 25. – P. 498-503.
12. Roux, A. Membrane curvature controls dynamin polymerization / A. Roux, G. Koster, M. Lenz, B. Sorre, J.B. Manneville, P. Nassoy, P. Bassereau // *PNAS.* – 2010 – V. 107. – №. 9. – P. 4141-6.
13. Heinrich, M.C. Quantifying Membrane Curvature Generation of *Drosophila* Amphiphysin N-BAR Domains / M.C. Heinrich, B.R. Capraro, A. Tian, J.M. Isas, R. Langen, T. Baumgart // *J Phys. Chem. Lett.* – 2016. – V. 1. – №. 23. – P. 3401-3406.
14. Monnier, S. Long-range protein coupling mediated by critical low-energy modes of tubular lipid membranes / S. Monnier, S.B. Rochal, A. Parmeggiani, V.L. Lorman // *Phys. Rev. Lett.* – 2010. – V. 105. – N. 2. – P. 2010.
15. Weikl, T.R. Interaction of conical membrane inclusions: Effect of lateral tension / T.R. Weikl, M.M. Kozlov, W. Helfrich // *Phys. Rev. E.* – 1998. – V. 57. – №. 6, – P. 6988.

16. Dommersnes, P.G. The many-body problem for anisotropic membrane inclusions and the self-assembly of "saddle" defects into an "egg carton" / P.G. Dommersnes, J.B. Fournier // *Biophys. J.* – 2002. – V. 83 – №. 6. – P. 2898-2905.
17. Fošnarič, M. The Influence of Anisotropic Membrane Inclusions on Curvature Elastic Properties of Lipid Membranes / M. Fošnarič, K. Bohinc, D.R. Gauger, A. Iglič, V. Kralj-Iglič, S. May // *J. Chem. Inf. Model.* – 2005. – V. 45. – №. 6. – P. 1652-1661.
18. Zhu, C. Nonlinear sorting, curvature generation, and crowding of endophilin N-BAR on tubular membranes / C. Zhu, S.L. Das, T. Baumgart // *Biophys J.* – 2012. – V. 102. – №. 8 – P. 1837-1845.
19. Frost, A. Structural Basis of Membrane Invagination by F-BAR Domains / A. Frost, R. Perera, A. Roux, K. Spasov, O. Destaing, E.H. Egelman, P. De Camilli, V.M. Unger // *Cell.* – 2008. – V. 132. – №. 5. – P. 807-817.
20. Mim, C. Structural Basis of Membrane Bending by the N-BAR Protein Endophilin / C. Mim, H. Cui, J.A. Gawronski-Salerno, A. Frost, E. Lyman, G.A. Voth, V.M. Unger // *Cell.* – 2012. – V. 149. – №. – P. 137-145.
21. Zimmerberg, J. Membrane curvature: how BAR domains bend bilayers / J. Zimmerberg, S. McLaughlin // *Curr Biol.* – V. 14. – №. 6. – P. R250-2.
22. Gallop, J.L. Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature / J.L. Gallop, C.C. Jao, H.M. Kent, P.J. Butler, P.R. Evans, R. Langen, H.T. McMahon // *EMBO J.* – 2006. – V. 25. – №. 12. – P. 2898-2910.
23. Kabaso, D. Attachment of rod-like (BAR) proteins and membrane shape / D. Kabaso, E. Gongadze, P. Elter, U. van Rienen, J. Gimsa, V. Kralj-Iglič, A. Iglič // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2011. – V. 11. – №. 4. – 2011. – P. 272-282.
24. Ramakrishnan, N. Membrane-Mediated Aggregation of Curvature-Inducing Nematogens and Membrane Tubulation / N. Ramakrishnan, P.B. Sunil Kumar, J.H. Ipsen // *Biophys. J.* – 2013. – V. 104. – №. 5. – P. 1018-1028.

25. Masuda, M. Structural characteristics of BAR domain superfamily to sculpt the membrane / M. Masuda, N. Mochizuki // *Semin. Cell. Dev. Biol.* – 2010. – V. 21. – №. 4. – P. 391-398.
26. Fernandes, F. Role of Helix 0 of the N-BAR Domain in Membrane Curvature Generation / F. Fernandes, M.S. Loura, F.J. Chichon, J.L. Carrascosa, A. Fedorov, M. Prieto // *Biophys. J.* – 2008. – V. 94. – №. 8. – P. 3065-3073.
27. Hannezo, E. Mechanical Instabilities of Biological Tubes / E. Hannezo, J. Prost, J.-F. Joanny // *Phys. Rev. Lett.* – 2012. – V. 109. – N. 1. – P. 018101.
28. Avramenko, M.V. Vibrational heat capacity of carbon nanotubes at low and ultra-low temperatures / M.V. Avramekno, I.Yu. Golushko, A.E. Myasnikova, S.B. Rochal // *Physica E.* – 2015, – V. 68, – P. 133-139.

Selected author's publications

- A1. Simunovic, M. How curvature-generating proteins build scaffolds on membrane nanotubes / M. Simunovic, E. Evergren, I. Golushko, C. Prévost, H.F. Renard, L. Johannes, H.T. McMahon, V. Lorman, G.A. Voth, P. Bassereau // *PNAS* – 2016. – V. 113. – №. 40. – P. 11226-11231.
- A2. Golushko, I.Yu. Complex instability of axially compressed tubular lipid membrane with controlled spontaneous curvature / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal, V.L. Lorman // *EPJ E.* – 2015. – V. 38. – №. 10. – P. 112.
- A3. Golushko, I.Yu, Tubular Lipid Membranes Pulled from Vesicles: Dependence of System Equilibrium on Lipid Bilayer Curvature / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal, // *JETP.* – 2016. – V. 122. – № 1. – C. 169-175.
- A4. Golushko, I.Yu. Multipole analysis of the strain-mediated coupling between proteins adsorbed at tubular lipid membrane surface / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal, V.L. Lorman // *EPJ E.* – 2016. – V. 39. – № 12. – P. 128.
- A5. Golushko, I.Yu. Interaction of proteins on lipid bilayer surface (in Russian) // “All-Russian youth competition of students’ and postgraduates’ research works in

physics” collection of letters edited by V.N. Zimin, V.N. Naumov, A.N. Morozov, Publishing House of Bauman MSTU, Moscow –2012. –P. 159-161.

A6. Golushko, I.Yu. Investigation of Phase Transitions Associated with Shape Instabilities of Tubular Lipid Membranes // Proceeding of XII International Conference on Nanostructured Materials “NANO 2014”. – Russia, Moscow. – 2014. – P. 797.

A7. Golushko, I. Yu. Influence of boundary conditions on instabilities and shape phase transitions in tubular lipid membranes (in Russian) / I. Yu. Golushko, S. B. Rochal, A. Parmeggiani and V. L. Lorman // Proceeding of XLIX Winter School of Petersburg Nuclear Physics Institute on Condensed Matter Physics, – Russia, St. Petersburg –2015. –P. 148.

A8. Golushko, I. Yu. Joint stability analysis of the vesicle and tubular lipid membrane pulled out of it (in Russian) / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal // Proceeding of L Winter School of Petersburg Nuclear Physics Institute on Condensed Matter Physics, – Russia, St. Petersburg –2016. –P. 154.

A9. Golushko, I.Yu. Complex instability of tubular lipid membrane with nonzero spontaneous curvature under axial tension / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal, V.L. Lroman // Proceedings of 26th IUPAP International conference on Statistical Physics “Statphys26”. – France, Lyon. – 2016. – P. 390.

A10. Golushko, I.Yu. Membrane-mediated interaction of curvature active proteins / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal, V.L. Lroman // Proceedings of 18th EMBL PhD symposium “Life by Numbers” – Germany, Heidelberg. –2016. – P. 143.

A11. Golushko, I. Yu. Multipole approach for the description of membrane-mediated protein-protein interactions (in Russian) / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal, V.L. Lorman // Proceeding of LI Winter School of Petersburg Nuclear Physics Institute on Condensed Matter Physics, – Russia, St. Petersburg –2017. –P. 164.

A12. Golushko, I.Yu. Interactions of curvature-active proteins with tubular lipid membranes and each other: a simple multipole approach / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal, V.L. Lorman // Proceedings of 2017 Annual Meeting of the International Physics of Living Systems “iPoLS”. – France, Pars. – 2017. – P. 13.

A13. Golushko, I.Yu. Tubular lipid membranes connected to a vesicle: conditions of equilibrium and interaction with proteins / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal, V.L. Lorman // Program and Proceeding of the Meeting in honor of Professor Vladimir Lorman “Biophysics: Today and Beyond. The Physics of Unconventional Systems” – France, Montpellier. – 2018. – P. 14.

СОДЕРЖАНИЕ

Acknowledgements	2
EXTENDED SUMMARY	4
ВВЕДЕНИЕ.....	33
1 БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ	41
1.1 Теория упругости липидного бислоя	46
1.2 Причины возникновения спонтанной кривизны липидного бислоя: влияние липидного состава.....	50
1.3 Причины возникновения спонтанной кривизны липидного бислоя: влияние клеточных белков.....	53
1.4 Трубочатые липидные мембраны	56
2 МОДЕЛЬ ТЛМ	60
2.1 Энергия системы.....	60
2.2 Устойчивость индивидуальной ТЛМ	62
2.3 Устойчивость липидной везикулы.....	68
2.4 Закон Лапласа для ТЛМ, вытянутой из везикулы.....	72
2.5 Потеря устойчивости композитной системы ТЛМ-везикула	75
3 КРИТИЧЕСКОЕ И ЗАКРИТИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ТЛМ.....	80
3.1 Критическое поле смещений и голдстоуновские переменные	80
3.2 Свойства разложения энергии типа потенциала Ландау.....	82
3.3 Возможные в системе низкосимметричные фазы и минимальный потенциал Ландау.	84
4 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ НА ПОВЕРХНОСТИ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ.....	90
4.1 Энергия ТЛМ, на поверхности которой адсорбированы молекулы индуцирующих кривизну белков	90

4.2	Применение мультипольного подхода для исследования взаимодействий между белками, переносчиком которых является мембрана.	96
4.3	Закрепленная на концах ТЛМ	106
4.4	Закрепленная на концах ТЛМ, на поверхности которой адсорбированы молекулы индуцирующих кривизну белков	111
4.5	Результаты экспериментальных исследований и их анализ	114
5	МОДЕЛЬ АОРТЫ ЭМБРИОНА ДАНИО РЕРИО	120
5.1	Модель аорты	121
5.2	Нелинейный тензор деформации.	122
5.3	Перенормировка средней кривизны поверхности	124
5.4	Объем деформированной аорты	125
5.5	Напряженное состояние системы и матрица устойчивости	126
6	АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ ДОРСАЛЬНОЙ АОРТЫ	130
6.1	Осесимметричные критические моды.....	130
6.2	Эволюция формы реальной системы.....	132
6.3	Неосесимметричные неустойчивости в дорсальной аорте и обсуждение схожих систем.	134
6.4	Вклад окружающих тканей в устойчивость системы.	137
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	142
	Список литературы	143
	Основные публикации автора:.....	155
	Résumé de la thèse en français:	159
	Thesis summary in English:	159

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Одним из основных компонентов клетки является ее липидная мембрана, которая выполняет множество функций, обеспечивающих жизнедеятельность прокариотических и эукариотических, растительных и животных клеток. Совершить качественный скачок в изучении строения мембран и входящих в ее состав компонент (преимущественно белков) позволило развитие таких классических для физики конденсированного состояния методов экспериментального исследования, как рентгеноструктурный анализ и электронная микроскопия. Более того, с середины прошлого века методы физики конденсированного состояния активно используются для математического описания объектов живой природы. Классическая теория упругости и ее обобщения применяются для моделирования механических свойств различных биомиметических и биологических объектов, таких как везикулы [1], белковые нанотрубки (микротрубочки) [2], кишечник [3] и кровеносные сосуды [4]. Изменения структур капсидов вирусов при их созревании исследуются с помощью методов теории структурных фазовых переходов в кристаллах [5]. Предложенная в пионерских работах Питера Канама и Вольфгана Хелфрика [6, 7] и основанная на сходстве липидных мембран с нематическими жидкими кристаллами механистическая модель липидного бислоя до сих пор лежит в основе большинства современных работ, рассматривающих клеточные мембраны в рамках континуального подхода.

Теперь, когда состав и строение клеточных мембран хорошо изучены, внимание исследователей сосредоточено на изучении активных процессов с участием клеточных мембран. В настоящий момент известно, что процессы эндоцитоза и экзоцитоза сопровождаются значительными изменениями формы клеточных мембран, осуществляемыми специализированными белками, индуцирующими кривизну липидного бислоя [8]. Одним из наиболее современных

инструментов для исследования особенностей взаимодействия этих белков с мембраной и друг с другом являются эксперименты с участием трубчатых липидных мембран (ТЛМ), в которых последние формируются путем вытягивания из везикулы [9]. Подобные структуры возникают при образовании эндоцитотических пузырьков (кавеол), а также служат в качестве каналов для переноса веществ в клетке. Сформированные *in vitro* системы ввиду своей простоты и высокой однородности по сравнению с реальными клеточными структурами с хорошей точностью могут быть описаны подобно классическим объектам рассмотрения механики и физики твердого тела.

Еще один важный процесс, который исследуется в данной работе, – эндотелио-гемопозитический переход (ЭГП). Этот процесс ведет к появлению гемопозитических стволовых клеток из дорсальной аорты, которые в последствии заселяют кроветворные органы, делая возможным гемопоз. ЭГП был открыт в процессе исследования эмбрионов рыбы данио рерио, однако этот процесс, по всей видимости, является общим для рыб, млекопитающих и птиц, что делает его изучение фундаментальной проблемой эмбриологии. Данио рерио – это модельная система, отличного от ТЛМ типа, представляющая собой целый организм. Ее геном на 70% идентичен геному человека, а тело прозрачно в оптическом диапазоне. Яйца данио рерио оплодотворяются и развиваются вне материнского организма. Все эти факторы делают эту рыбку чрезвычайно популярной модельной системой.

Несмотря на использование новых модельных систем, а также усовершенствование измерительных приборов, при исследовании клеточных мембран до сих пор часто используются теоретические модели, разработанные в конце прошлого века и не всегда соответствующие условиям эксперимента. Создание адекватных эксперименту физических моделей биологических модельных систем является важной задачей физики конденсированного состояния, поскольку их использование позволяет глубже понять многие процессы протекающие в живых организмах на клеточном и тканевом уровне.

Цели и задачи работы

Основной целью **первой** части работы является построение модели трубчатой липидной мембраны с адсорбированными на ее поверхности молекулами белка для описания механизмов взаимодействия индуцирующих кривизну белков с клеточными мембранами. Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- разработать модель трубчатой липидной мембраны (ТЛМ), учитывающую приложенную вдоль ее главной оси силу, энергию поверхностного натяжения и асимметрию липидного бислоя, перепад давления между внутренним пространством мембраны и внешней средой, а также связь ТЛМ с везикулой;
- построить квадратичную энергию системы и определить область устойчивости, описываемой ею равновесной цилиндрической фазы ТЛМ;
- описать критическое поведение ТЛМ на границе области устойчивости цилиндрической фазы, вызываемое приложением сжимающей силы, при помощи формализма теории фазовых переходов Ландау;
- разработать подход силовых мультиполей, позволяющий описывать взаимодействия между белками, адсорбированными на поверхности ТЛМ, вызванные ее деформацией;
- сравнить поведение модели ТЛМ с периодическими граничными условиями и с шарнирно закрепленными концами;
- применить разработанную модель ТЛМ для интерпретации экспериментальных данных о взаимодействии трубчатых липидных мембран с индуцирующими кривизну белками.

Вторая часть работы посвящена исследованию эндотелио-гемопозитического перехода – процесса образования кроветворных стволовых клеток, а основной ее целью является рассмотрение этого процесса с позиций физики. Для этого мы обобщили развитую в первой части диссертации модель на случай дорсальной

аорты, обладающей ненулевым модулем сдвиговой упругости, попутно решив следующие задачи:

- разработать модель дорсальной аорты (ДА), учитывающую продольные механические напряжения, гидростатическое давление крови и влияние окружающих аорту тканей;
- получить энергию системы в гармоническом приближении и определить область устойчивости, описываемой ею равновесной цилиндрической фазы в пространстве параметров <гидростатическое давление, продольная компонента механического напряжения>;
- провести анализ экспериментальных данных, полученных при помощи флуоресцентной микроскопии и связать возникающие в системе изменения формы и теоретически обнаруженными механическими неустойчивостями в ДА;

Научная новизна

В ходе выполнения работы впервые:

- определена область устойчивости композитной системы ТЛМ-везикула и показано, что ТЛМ, собственная кривизна липидного бислоя которой совпадает с ее фактической кривизной, устойчива и без растягивающей внешней силы;
- при помощи формализма теории фазовых переходов Ландау показано, что под действием осевой сжимающей силы ТЛМ теряет устойчивость сначала по моде радиальной гофрировки, а затем по моде хирального изгиба;
- установлено, что равновесная форма закрепленной на концах ТЛМ с нулевой собственной кривизной липидного бислоя несколько отличается от прямого кругового цилиндра постоянного радиуса;
- экспериментально обнаруженная склонность таких белков, как эндофинин, к осаждению в областях вблизи концов липидной трубки,

объяснена при помощи предложенных граничных условий, соответствующих шарнирно закрепленной на концах ТЛМ;

- показано, что глобальные изменения формы дорсальной аорты в процессе ЭГП связаны с развитием неустойчивости типа радиальная гофрировка, возникающей под действием сжимающих продольных напряжений, вызванных различиями в скорости роста аорты и окружающих ее тканей.

Практическая значимость

Построенная модель системы ТЛМ-везикула в совокупности с разработанным подходом силовых мультиполей подходит для анализа результатов экспериментов по вытягиванию ТЛМ, используемых для изучения липидных мембран и их взаимодействий с биополимерами. Теория позволяет моделировать анизотропные взаимодействия между адсорбированными на поверхности липидной трубки белками, вызванные деформацией липидного бислоя. Она описывает ряд особенностей начальных стадий образования белковых каркасов на поверхности липидных трубок, обнаруженных экспериментально: характерный порядок расположения и склонность к осаждению у концов трубки, таких белков как эндофинин. Коллективное действие подобных индуцирующих кривизну липидного бислоя молекул играет важнейшую роль в процессах, требующих существенных изменений формы клеточных мембран: эндо-, экзоцитозе, а также заражении клетки вирусами с последующим формированием дочерних вирионов [10]. Исследование механизмов, лежащих в основе последнего процесса, может привести к разработке принципиально новых методов борьбы с рядом вирусных заболеваний.

Обобщённая модель, учитывающая наличие сдвиговых напряжений, может быть использована не только для анализа устойчивости аорты, но и других систем со схожей геометрией и свойствами: уретры, вен или обычных водопроводных труб. Проведенное на основе разработанной модели исследование процесса

эндотелио-гемопозитического перехода в дорсальной аорте эмбриона рыбы данио рерио позволяет лучше понять механизм производства гемопозитических стволовых клеток и роль механических напряжений на клеточном и тканевом уровне. Изучение этой модельной системы *in vivo* способствует развитию методов производства стволовых клеток *in vitro*.

Положения, выносимые на защиту

Свободный обмен веществом между липидной трубкой и везикулой приводит к тому, что устойчивое равновесие системы характеризуется перепадом давления, дающим пренебрежимо малый вклад в свободную энергию системы.

Липидные трубки, собственная кривизна липидного бислоя которых совпадает с фактической кривизной поверхности, существуют без внешней растягивающей силы, а их неправильная форма вызвана длинноволновыми термическими флуктуациями.

Под действием осевой сжимающей силы липидная трубка приобретает форму, сочетающую длинноволновый хиральный изгиб с радиальной гофрировкой, имеющей период порядка периметра трубки.

Подход силовых мультиполей, разработанный для описания анизотропных взаимодействий между индуцирующими кривизну белками, в совокупности с предложенной моделью мембраны объясняет склонность таких белков, как эндофинин, к осаждению у концов липидной трубки, а также формирование белковых агрегатов на ее поверхности, наблюдаемые экспериментально.

Возникающая в процессе эндотелио-гемопозитического перехода деформация дорсальной аорты типа гофрировка является следствием потери устойчивости системы под действием механических напряжений, связанных с различиями в скорости роста аорты и окружающих ее тканей.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием классических, многократно апробированных методов и подходов физики

конденсированного состояния в ходе теоретического исследования системы ТЛМ-везикула-белки. Результаты проведенного анализа согласуются с известными решениями для классических систем, имеющих общие черты с системой, рассматриваемой в работе. Теоретические предсказания разработанных в диссертации моделей подтверждаются экспериментальными данными, в том числе полученными нашими французскими коллегами – исследовательской группой Института Кюри (франц. Institut Curie) под руководством Патриции Басро (франц. Patricia Bassereau) и группой проф. Каримы Киссы (франц. Karima Kissa) университета Монпелье (франц. Université de Montpellier), и опубликованными в ведущих международных журналах.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на 64 Студенческой научной конференции физического факультета ЮФУ (Ростов-на-Дону, 2012), Региональной студенческой конференции «Фестиваль Недели науки Юга России» (Ростов-на-Дону, 2012), 5 Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2012), Международной школе-конференции по статистической физике «International Summer School Fundamental Problems in Statistical Physics XIII» (Левен, Бельгия, 2013), XII International Conference on Nanostructured Materials «NANO 2014» (Москва, 2014), Международной научно-технической конференции «Нанотехнологии в электронике и МЭМС» (Таганрог, 2014), XI Ежегодной научной конференции студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН (Ростов-на-Дону, 2015), 26th IUPAP International conference on Statistical Physics «Statphys26» (Лион, Франция, 2016), 18th EMBL PhD Symposium «Life by Numbers: Towards Quantitative Biology» (Гейдельберг, Германия, 2016), Международном междисциплинарном симпозиуме «Физика поверхностных явлений, межфазных границ и фазовые переходы» (Туапсе, пос. Южный, 2015), XLIX, L и LI Школе

ПИАФ по физике конденсированного состояния, (Санкт-Петербург 2015, 2016 и 2017), 2017 Annual Meeting of the International Physics of Living Systems (iPoLS) (Париж, Франция, 2017), Международной конференции «Современные проблемы механики сплошной среды» (Москва, 2017), Labex EpiGenMed & Labex Numev & Grisbi Joint Meeting Biophysics: Today and Beyond. The Physics of Unconventional Systems (Монпелье, Франция 2018).

Публикации автора

Основные результаты диссертации опубликованы в 19 работах, из них 4 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в базах Scopus и Web of Science, 3 из которых – в международных журналах, и 1 – в российском журнале, а также 15 статей и тезисов, опубликованных в сборниках трудов всероссийских и международных конференций.

Личный вклад автора

Постановка темы, цели и задач работы, а также формулировка моделей и обсуждение полученных результатов и выводов проводились автором совместно с научными руководителями: профессором Южного федерального университета Рошалем С.Б. и профессорами Университета Монпелье Лорманом В.Л. и Пармеджиани А. Автор, проведя аналитический и численный анализ, определил область устойчивости системы ТЛМ-везикула в рамках разработанных моделей, предложил подход силовых мультиполей для описания действия индуцирующих кривизну белков на липидную мембрану, применил полученные теоретические результаты для интерпретации данных экспериментов по вытягиванию ТЛМ, принимал активное участие в разработке модели дорсальной аорты и определении критических мод системы, сформулировал основные результаты, выводы и научные положения, выносимые на защиту.

1 БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Клетку можно определить, как элементарную структурно-функциональную единицу всего живого. Обладая обменом веществ, она может существовать и воспроизводиться самостоятельно. Неотъемлемой частью всех клеток, а, следовательно, и всех существующих живых организмов (не считая вирусов и вирионов, занимающих сумеречную зону между живой и неживой природой) являются мембраны. Биологические мембраны (от латинского *membrana* – перепонка) – это состоящие всего из нескольких молекулярных слоев структуры, которые формируют большинство внутриклеточных органелл, а также образуют сеть каналов, складок и замкнутых полостей внутри клетки.

Несмотря на фундаментальную роль биологических мембран, современные представления о их структуре сложились сравнительно недавно. По-видимому, первыми, кто установили, что основным компонентом клеточной мембраны является двойной слой липидов, были Эверт Гортер (нед. Evert Gorter) и Франсуа Грендель (франц. François Grendel).

В своем эксперименте Гортер и Грендел использовали липиды эритроцитов, чтобы получить тонкую липидную пленку на границе раздела вода-воздух. Они постепенно уменьшали площадь поверхности, занимаемую экстрагированными липидами, при помощи подвижной плавающей рамки, пока система не начинала оказывать некоторое сопротивление. Возникновение сопротивления при этом объяснялось образованием плотно упакованного липидного монослоя. Гортер и Грендел заметили, что площадь, занимаемая пленкой, в два раза больше суммарной площади поверхности эритроцитов, из липидов которых она была получена. На основании этих данных они и выдвинули предположение о том, что клеточные мембраны представляют собой липидный бислой [11].

Существенный вклад в дальнейшее развитие модели липидной мембраны внесли Джеймса Даниелли (англ. James Danielli) и Хью Дэвсона (англ. Hugh Davson). В работе 1935 года [12] они предложили так называемую модель

«сэндвича», в которой предполагалось, что белки образуют сплошной монослой, покрывающий обе стороны липидного бислоя.

В это же время начинает применяться принципиально новый метод исследования биологических мембран, а именно рентгеноструктурный анализ. До этого предположения об устройстве мембран строились исключительно на основании данных, полученных в экспериментах, подобных проведенному Гортером и Гренделем, поскольку размеры клеточных мембран в одном из измерений лежат далеко за пределами разрешающей способности оптического микроскопа. Применение рентгеноструктурного анализа позволило получать данные о строении мембран не косвенным образом, а напрямую.

На протяжении следующих 30 лет модель Дэвсона-Даниелли оставалась доминирующей, выдерживая проверку новыми экспериментальными данными. Это связано с тем, что рентгеноструктурный анализ подходит лишь для исследования определенного класса мембранных систем с периодической структурой. Примером такой структуры может служить миелиновая оболочка периферических нервных волокон – регулярная структура, сформированная множеством слоев мембраны, обернутых вокруг аксона. Исследование дифракции рентгеновских лучей на миелине и ряде похожих систем подтвердило адекватность модели липидного бислоя. В то же время данные, полученные о распределении белков обладали достаточно посредственной точностью и слабо отличались для мембран, содержание белка в которых могло различаться в 1.5-2 раза.

Следующий важный шаг в построение мембранной теории удалось совершить благодаря применению еще одного классического для физики твердого тела метода исследования – электронной микроскопии. Метод замораживания-скалывания (freeze-etching), который заключается в исследовании электронной микроскопией реплик, полученных от сколов, замороженных при высоком вакууме суспензий мембран, позволил опровергнуть ошибочное предположение о наличии сплошного белкового слоя [13]. На основании накопившихся к началу 70-х годов XX века экспериментальных данных Джонатан Сингер (англ. Jonathan Singer) и

Гарф Николсон (англ. Garth Nicolson) предложили жидкомозаичную модель клеточной мембраны. Она рассматривает мембрану, как текучий бислои, состоящий из липидов, в котором «плавают» различные белки. При этом молекулы белков, погруженные в матрицу липидов, не образуют дальнего порядка. Основные положения модели были изложены Сингером и Николсоном в классической работе 1972 года [14]. Несмотря на то, что, фактически, представленная модель носила качественный характер, она отражала ключевые особенности строения мембран, которые остаются актуальными и по сей день.

Основными строительными блоками биологических мембран являются липиды, белки и углеводы. В водной среде молекулы липидов, стремясь понизить свою энергию, образуют бислои, являющийся матрицей для остальных компонент мембраны. Свойства липидного бислоя во многом определяют механические характеристики мембраны [7, 15, 16]. Он имеет толщину порядка пяти нанометров, а толщина клеточных мембран обычно не превышает десяти нанометров. В тоже время из-за сравнительно высокой плотности упаковки молекул липидов и белков в мембранах, а также существенной суммарной площади этих структур, на них приходится больше половины сухой массы клетки (а в некоторых случаях порядка 80%). Соотношение массы липидов к массе белков может колебаться в широких пределах. Так сухая масса миелина состоит на 75% из липидов, а в мембранах митохондрий массовая доля липидов составляет уже порядка 28%, оставшийся же вес приходится преимущественно на белки [17] (доля углеводов в мембранах редко составляет более 10% [15, 16]).

В свою очередь липиды, входящие в состав животных клеточных мембран, относятся преимущественно к трем классам: фосфолипиды, гликолипиды и стероиды. Фосфолипиды состоят из так называемой заряженной гидрофильной головки, образованной остатком фосфорной кислоты с различными добавочными группами атомов, и связанного с ней гидрофобного хвоста, сформированного двумя остатками жирных кислот. У гликолипидов полярные головки образованы углеводородами, что отражается в их названии (от греч. glykos – сладкий).

Гликолипиды играют важную роль в межклеточных взаимодействиях, обеспечивая клеточное распознавание – механизм, без которого невозможны процессы иммунного ответа и эмбрионального развития [16]. Стероиды – это биологически активные соединения животного или растительного происхождения, в основе которых лежит конденсированная тетрациклическая система гонана. Она состоит из четырех углеводородных колец, образующих пространственную структуру. Одним из самым распространенных примеров животных стероидов является холестерол. Сам по себе холестерол не может формировать бислои в водной среде, однако он может встраиваться в фосфолипидный бислой так, что его полярная гидроксильная группа располагается по соседству с головками фосфолипидов. В зависимости от температуры холестерол может по-разному влиять на свойства мембраны. При высоких температурах он стесняет движение хвостов фосфолипидов, затрудняя проникновение небольших молекул через мембрану (пассивный транспорт) и повышая ее жесткость. При низких температурах, напротив, холестерол ослабляет взаимодействие между липидами, тем самым понижая температуру плавления мембраны [18]. В миелине холестерол составляет порядка 40% от сухой массы, в мембранах митохондрий доля холестерола составляет порядка 15%, а вот в мембранах растений, грибов и прокариот он не содержится вовсе [17].

В состав мембран входит большое количество различных белков, согласно классификации, введенной Сингером и Николсоном, их можно разделить на интегральные, пронизывающие липидный бислой насквозь, и периферические, лишь частично погруженные в него. Периферические белки определяются следующими критериями: (i) могут быть сравнительно легко отделены от мембраны (например, повышением ионной силы среды) без повреждения их структуры; (ii) после выделения свободны от липидов; (iii) имеют достаточно высокую растворимость в нейтральных водных средах. Интегральные белки в свою очередь: (i) значительно сложнее отделяются от мембраны (требуется использование желчной кислоты или органических растворителей); (ii) после

выделения часто остаются связанными с липидами; (iii) будучи очищенными от липидов плохо растворяются в нейтральных водных средах [14].

Благодаря своему строению и составу клеточная мембрана может выполнять различные жизненно необходимые функций. В первую очередь она осуществляет гомеостаз как всей клетки в целом, так и отдельных органелл за счет избирательной проницаемости. Мембрана участвует в поддержании ионных градиентов и необходимого уровня рН. Через нее осуществляется доставка питательных веществ в клетку и вывод продуктов их распада наружу. Транспорт веществ разделяют на активный и пассивный. При пассивном транспорте вещества диффундируют через липидный бислой по градиенту концентрации и без энергетических затрат, в то время как при активном – энергия расходуется на перенос веществ против градиента концентрации. Гидрофильные вещества или же объекты крупного размера переносятся в клетку через интегральные белки-каналы и/или посредством эндоцитоза. Между органеллами клетки транспорт веществ может осуществляться при помощи везикул (небольших пузырьков, сформированных мембраной). Везикулы отпочковываются от компартмента донора и осуществляют транспорт к определенной органелле, являющейся акцептором, в которую они выгружают свое содержимое в результате слияния [19]. Этот процесс был подробно исследован и описан группами Рэнди Шекмана (англ. Randy Schekman) и Джима Ротмана (англ. Jim Rothman) в работах [20, 21].

Поскольку липидный бислой выступает в роли своеобразной матрицы для погруженных в него белков, обеспечивая определенную ориентацию, расположение и конформацию белковых молекул [22], мембранам часто приписывают матричную функцию. В свою очередь белки, входящие в состав клеточной мембраны, могут являться рецепторами или же ферментами, реализуя рецепторную и каталитическую функции мембраны, соответственно.

Таким образом, исследование клеточных мембран является неотъемлемым шагом на пути к пониманию фундаментальных процессов обмена веществ,

иммунного ответа и самовоспроизведения, лежащих в основе жизнедеятельности всех организмов.

1.1 Теория упругости липидного бислоя

Как уже упоминалось выше, основной строительный блок биологических мембран – липидный бислой, являющийся результатом самоорганизации фосфолипидов в водной среде. Именно он во многом определяет механические свойства клеточных мембран. Полярные молекулы липидов в водной среде стремятся понизить свою энергию, максимально уменьшая площадь контакта гидрофобных хвостов с водой и увеличивая ее для гидрофильных головок. В результате процессов самоорганизации таких молекул могут образовываться мицеллы (однослойные компактные структуры с гидрофобным ядром и гидрофильной оболочкой), либо липидные бислои. Таким образом, гидрофобный эффект препятствует выходу молекул из бислоя. Однако, если мы рассмотрим перемещение молекул в пределах одного монослоя, то заметим, что площадь контакта гидрофильных и гидрофобных участков с водой практически не изменяется, а, следовательно, не изменяется и энергия системы (диссипативные процессы, возникающие при движении, для наглядности опустим). Поэтому молекулы липидов в мембране сохраняют индивидуальную подвижность и способны диффундировать в пределах монослоя.

Диффузия липидов в плоскости бислоя – сравнительно быстрый процесс, так во многих синтезированных *in vitro* и биологических мембранах коэффициент латеральной диффузии D для спин-меченых и флуоресцентных фосфолипидов находится в пределах $10^{-7} - 10^{-8}$ см²/с. Среднеквадратичное расстояние, преодолеваемое молекулой за отрезок времени t , определяется формулой $\bar{l} = \sqrt{4Dt}$. Таким образом за одну секунду фосфолипид проходит расстояние порядка $5 \cdot 10^3$ нанометров [15]. Скорость латеральной диффузии существенно зависит от липидного состава мембран и температуры, так при температурах ниже точки

плавления углеводородных цепей липида константа латеральной диффузии снижается примерно на порядок и более [15].

Вращательное движение молекул вокруг оси, нормальной к поверхности мембраны, является еще менее энергетически затратным. Время корреляции вращательного движения (время поворота на угол, равный один рад) молекул фосфолипидов, стеринов и жирных кислот в различных искусственных и биологических мембранах составляет, примерно, $5 \cdot 10^{-9}$ с [15].

Еще одним типом движения липидов в мембранах является трансбислойное движение (флип-флоп переход). Вероятность такого перехода сравнительно мала из-за высоты потенциального барьера при перебросе молекулы из одного монослоя в другой. В модельных мембранных системах время переноса половины молекул из одного монослоя в другой достигает 10-20 и более часов. В природных мембранах этот процесс может протекать существенно быстрее, благодаря активным процессам переноса липидов между монослоями [23, 24], например, в мембранах эритроцитов он занимает всего 20-30 минут [15].

Липидный бислой является весьма привлекательной для математического описания структурой, поскольку, если опустить тепловые флуктуации, он обладает высокой степенью однородности, достигающей размеров отдельных молекул. Соответственно, его механические свойства должны поддаваться континуальному описанию. Такой подход может быть распространен и на биологические мембраны, хотя в этом случае может понадобиться усреднение уже по областям, включающим сотни липидных молекул, поскольку наличие белков может нарушать локальную однородность мембраны [7].

В 1973 Вольфганг Хелфрик (нем. Wolfgang Helfrich) предложил гамильтониан, описывающий упругую энергию липидного бислоя (практически идентичный подход был предложен Питером Канамом (англ. Peter Canham) тремя годами ранее в его работе [6], поэтому гамильтониан также часто называют гамильтонианом Канама-Хелфрика). Основываясь на предположении о неограниченной внутренней текучести, Хелфрик предложил рассматривать теорию

упругости бислоя как особый случай классической теории тонкой оболочки, в которой отсутствуют сдвиговые напряжения. Используя концепцию директора из теории жидких кристаллов для описания «средней» ориентации углеводородных хвостов, Хелфрик предположил, что директор образует нормаль к поверхности бислоя, тем самым исключая возможные напряжения, связанные с коллективным наклоном липидов. В своей классической работе [7] он рассмотрел вклады в упругую энергию системы, связанные с однородным растяжением и изгибом липидного бислоя. Оценки соответствующих упругих констант показали, что деформация изгиба является наименее энергетически затратной, и при рассмотрении целого класса задач о нахождении минимизирующей энергию мембраны формы деформациями однородного растяжения можно пренебречь.

Таким образом, гамильтониан Хелфрика представляет собой функционал, задающий энергию двумерной поверхности в трехмерном пространстве:

$$\Phi = \frac{\kappa}{2} \int (K - 2C_0)^2 dS + \bar{\kappa} \int K_G dS \quad (1.1)$$

Здесь κ , $\bar{\kappa}$ – изгибные упругости, $K = 1/R_1 + 1/R_2$ – средняя кривизна поверхности, $K_G = R_1 \cdot R_2$ – Гауссова кривизна поверхности, C_0 – собственная кривизна липидного бислоя. Остановимся подробнее на перечисленных параметрах, характеризующих бислой. Собственная кривизна липидного бислоя (англ. *spontaneous curvature*) – это средняя кривизна поверхности, при которой в мембране отсутствуют изгибные напряжения. Причины возникновения и изменения этой характеристики липидного бислоя будут подробно рассмотрены в параграфах 1.2, 1.3. Обычно кривизну считают положительной в том случае, когда вектор нормали поверхности мембраны направлен во внутрь ограниченного ею пространства, и отрицательной, когда вектор нормали направлен наружу.

Изгибная упругость κ имеет размерность энергии и обладает весьма очевидным физическим смыслом, ее прямым аналогом в классической механике является цилиндрическая жесткость [25]. Изгибная упругость мембраны может быть определена при помощи измерения отношения между поверхностным

натяжением и величиной флуктуаций поверхности мембраны [26], которые могут быть исследованы при помощи фликер-спектроскопии [27 – 30], рассеяния рентгеновского излучения [31] или нейтронных спин-эхо измерений [32]. Альтернативой такому подходу, не основанной на изучении флуктуаций, является вытягивание тонких липидных трубок из везикул, сопровождаемое измерением зависимостей между геометрическими параметрами системы и контролируемыми внешними параметрами (например, растягивающей силой и поверхностным натяжением) [33, 34].

Модуль Гауссовой изгибной упругости $\bar{\kappa}$ измерить экспериментально гораздо сложнее. Согласно теореме Гаусса-Бонне, интеграл Гауссовой кривизны по поверхности зависит от эйлеровой характеристики поверхности и интеграла геодезической кривизны по ее границе [35]. Следовательно, чтобы получить отклик системы, по которому можно было бы оценить величину модуля $\bar{\kappa}$, необходимо приложить такое воздействие, которое бы контролируемо изменило один из упомянутых выше интегралов. Реализация подобных экспериментов является чрезвычайно нетривиальной задачей. Одним из возможных решений данной проблемы является оценка модуля Гауссовой кривизны при помощи моделирования методом молекулярной динамики [36].

Процессы образования пор, слияния и разделения мембран, играющие важнейшую роль в везикулярном транспорте, экзоцитозе, эндоцитозе и клеточном делении, сопровождаются изменением топологии мембраны, а энергия таких систем не может рассматриваться без учета интеграла Гауссовой кривизны поверхности. Изменение границ без изменения топологии наблюдается, например, при изменении области контакта между доменами липидов, находящихся в различных фазах. Таким образом, движущей силой для процессов образования везикул может служить не только энергия раздела фаз [37,38], запасенная на линии границы домена, но и моменты сил, возникающие из-за различия между модулями Гауссовой кривизны граничащих фаз липидов [39 – 41]. В случае же, когда рассматривается мембрана с неизменной границей или мембрана, не имеющая ее

вовсе (например сферическая везикула), при условии сохранения топологии ее поверхности, интеграл, стоящий при $\bar{\kappa}$, можно вовсе исключить из рассмотрения ввиду его постоянства. Такой прием очень часто используется при рассмотрении клеточных и биомиметических систем, поскольку снимает необходимость получения каких-либо оценок модуля $\bar{\kappa}$.

Одним из первых больших успехов модели Канама-Хелфрика является объяснение двояковогнутой формы красных кровяных телец [42], а также возникновение ехиноцитов [43]. В работе 1976 года Хелфрику и Дюлингу (англ. Deuling) в рамках модели удалось получить большое количество встречающихся в природе форм клеточных мембран при помощи простой минимизации упругой энергии при условии постоянства внутреннего объема и площади мембраны. Одной из таких форм был двояковогнутый диск эритроцита, соответствующий некоторому отрицательному значению собственной кривизны липидного бислоя C_0 . Благодаря своей эффективности и простоте предложенная Хелфриком модель липидного бислоя с некоторыми изменениями и надстройками и по сей день активно используется для описания клеточных мембран и модельных систем [9, 44, 45].

1.2 Причины возникновения спонтанной кривизны липидного бислоя: влияние липидного состава

Рассмотренные механические свойства липидного бислоя играют ключевую роль во множестве процессов, протекающих с непосредственным участием мембран, от деления и обмена веществ в клетке, до ее движения. Генерация и стабилизация формы липидных мембран, необходимые для протекания этих процессов, могут осуществляться различными способами.

Так, форма мембран может поддерживаться за счет особенностей липидного состава бислоя, а также его асимметрии [8, 46, 47]. Благодаря полиморфизму липиды могут обладать различными соотношениями размеров их гидрофобных хвостов и гидрофильных головок. Величина этого соотношения влияет на

собственную кривизну мембран. Это становится очевидным, если представить, что занимаемый липидом объем описывается усеченным прямым круговым конусом. Кривизна слоя, состоящего из соприкасающихся вдоль образующей копий такого конуса, будет зависеть от отношения радиусов его оснований. С другой стороны, мембрана может обладать ненулевой собственной кривизной просто из-за разного количества липидных молекул в составляющих ее монослоях [48, 49]. Так, везикула с внешним радиусом $R=50$ нм и толщиной мембраны $h=5$ нм, состоящая из одного сорта липидов и свободная от упругих напряжений, во внешнем монослое должна содержать на 23,5% больше липидов, чем во внутреннем $((R/(R-h))^2 - 1)$. В клетке перебор липидов из одного монослоя в другой может происходить как пассивно, так и активно – при помощи флиппаз. Это особые мембранные ферменты, переносящие липиды из одного слоя в другой за счет потребления АТФ [8].

Помимо рассмотренной прямой зависимости кривизны мембраны от ее состава, существует и обратная зависимость. Текучесть липидных мембран не только приводит к отсутствию сдвиговых напряжений, но и позволяет мембране посредством латеральной диффузии перераспределять входящие в ее состав липиды, локально подстраивая свой состав под обусловленную внешними воздействиями форму [50, 51]. В результате этого процесса понижается энергия упругой деформации системы.

Несмотря на кажущуюся простоту данного механизма, его нельзя рассматривать как процесс, регулируемый исключительно формой и жесткостью липидов, а также формой самой мембраны. В этом легко убедиться при помощи следующей несложной оценки. Пусть имеется система, состоящая из везикулы и вытянутой из нее трубчатой липидной мембраны радиусом $r=50$ нм. Предположим, что упругость липидов системы примерно одинакова, а константа изгибной упругости бислоя, формирующего систему, составляет $50k_B T$. Площадь, занимаемую одним липидом a , оценим как $a=65 \text{ \AA}^2$ [52], а его собственную кривизну как $C_0 = 1/6 \text{ нм}^{-1}$ [48]. Тогда, полагая, что радиус везикулы по сравнению

с трубкой настолько велик, что ее поверхность можно считать плоской, оценим выигрыш в энергии при переносе липида с поверхности везикулы на поверхность трубки при помощи следующего выражения:

$$\Delta\Phi_{trans} = a \frac{50k_B T}{2} \int (C_0^2 - (C_0 - 1/r)^2) \quad (1.2)$$

Подставляя упомянутые выше значения, получаем $\approx 0.19k_B T$. Поскольку это значение гораздо ниже энергии теплового движения в системе, действие энтропии нивелирует выигрыш в упругой энергии при переносе липида. Стоит, однако, отметить, что приведенные рассуждения являются справедливыми для простейшего случая, когда мембрана рассматривается как идеальный раствор липида [51].

Изменение собственной кривизны мембраны путем создания асимметрии липидного бислоя и вариации его состава успешно воспроизводится *in vitro*. Так, авторам работы [53] за счет добавления флиппаз во внешний монослой везикулы удалось вызвать в нем существенное увеличение числа липидов. Это в свою очередь привело к увеличению спонтанной кривизны липидного бислоя и образованию многочисленных пузырьков на его поверхности. В работах [48, 54] было показано, что значительное повышение молярной доли ряда липидов способно деформировать везикулы в трубки. Похожее поведение было продемонстрировано и в работе [55], но уже благодаря использованию другого механизма. Авторам удалось вызвать формирование трубок из везикул при помощи локального изменения рН среды, приводящего к уменьшению среднего объема, занимаемого липидами внешнего монослоя.

Сформированные рассмотренными способами структуры обычно обладают сравнительно малой кривизной поверхности. В то же время такие динамические процессы, как эндоцитоз и везикулярный транспорт, требуют образования и последующей стабилизации форм с кривизнами порядка нескольких сотен или даже десятков нанометров. Столь существенные деформации клеточной мембраны

реализуются при помощи ряда специализированных клеточных белков, взаимодействующих с липидным бислоем.

1.3 Причины возникновения спонтанной кривизны липидного бислоя: влияние клеточных белков

Механизмы деформации липидного бислоя белковыми молекулами можно разделить на следующие основные категории:

1. Полимеризация актинового цитоскелета или же действие молекулярных моторов, например, кинезинов – суперсемейства молекулярных белков, которые способны двигаться вдоль микротрубочек цитоскелета, используя энергию АТФ [56]. Этот механизм во многом можно рассматривать как простое приложение внешней силы к мембране, приводящее к ее деформации.
2. Влияние интегральных белков, обладающих конической формой, которая, локально изменяя расположение липидных молекул, влияет на собственную кривизну бислоя, или же интегральных белков, приобретающих эту способность в результате олигомеризации [47, 51];
3. Скаффолдинг (англ. scaffolding) липидного бислоя – изменение кривизны липидного бислоя в результате адсорбции обладающих собственной кривизной и достаточной жесткостью белков. Скаффолдингом называют как действие отдельных белков, имеющих высокое сродство к липидному бислою, так и белковых агрегатов, полимеризованных в некоторое подобие внешнего каркаса, индуцирующего кривизну мембраны [47, 51];
4. Внедрение в один из слоев мембраны амфипатических спиралей, которые действуя подобно «клиньям», изменяют упаковку липидных головок и вызывают деформации, приводящие к увеличению собственной кривизны бислоя [47, 51, A1]. (Вообще говоря, в настоящее время роль амфипатических спиралей в процессах формообразования мембран все еще активно обсуждается. Существуют предположения о том, что

амфипатические спирали также могут способствовать реализации механизма скаффолдинга, ориентируя белки на поверхности мембраны наиболее эффективным образом [51, 57]).

5. Краудинг (англ. crowding) – неспецифический механизм свойственный для целого ряда белков, обладающих достаточным сродством к липидам бислоя. В результате стерического отталкивания между адсорбированными белками возникает двумерный аналог давления в газе. Латеральное давление стремится увеличить площадь доступную взаимодействующим белкам. Поскольку, как было упомянуто ранее, растяжение липидного бислоя – гораздо более энергозатратный процесс, чем его изгиб, это увеличение реализуется за счет искривления липидного бислоя [58]. Похожая ситуация наблюдается и в масштабах отдельной молекулы в случае, когда гибкий полимер связан с мембраной некоторым участком цепи. Оставшаяся часть полимера оказывает давление на мембрану, которое имеет энтропийное происхождение (мембрана ограничивает число возможных конфигураций полимерной цепи) [59, 60].

Представленная классификации механизмов не является строгой, а деформация, вызванная даже отдельной молекулой белка, может являться следствием действия сразу нескольких из них [51, 61, A1]. Рассмотрим конкретный пример N-BAR белка эндофилина. Белки из семейства BAR содержат серпообразный Bin/amphiphysin/Rvs домен и являются одними из самых распространенных регуляторов кривизны в клетке. В состав эндофилина также входит пара амфипатических спиралей, в результате чего его действие на липидный бислой является комбинацией второго, третьего, четвертого и пятого (как самого универсального) механизмов из приведенной классификации.

Более того, характер взаимодействия белковых молекул с мембраной может зависеть не только от строения белка, но и от физического состояния системы, а именно: от концентрации белка на поверхности мембраны, кривизны и поверхностного натяжения липидного бислоя [9, 61, 62, A1]. Таким образом,

изменение нескольких физических параметров системы может кардинальным образом изменить то, как белок взаимодействует с мембраной.

Как уже было упомянуто выше, за счет высокого коэффициента диффузии мембрана способна локально подстраивать свой липидный состав в зависимости от внешних воздействий. Молекулы белков в мембранах также проявляют латеральную подвижность (вследствие большой массы они движутся медленнее липидных молекул, коэффициент латеральной диффузии белков в природных мембранах при комнатных температурах обычно находятся в пределах $10^{-10} - 10^{-12}$ см²/с [16]) и способны перемещаться в области с наиболее соответствующей их структуре кривизной липидного бислоя, понижая тем самым энергию системы. При этом форма мембраны может быть обусловлена действием молекулярных моторов или других индуцирующих кривизну белков. О таком поведении, наблюдаемом при низких поверхностных концентрациях для целого ряда белков (например, эпсин или представители семейства BAR белков амфифизин и эндофиллин), говорят, как о способности «чувствовать» кривизну липидного бислоя [8, 47, 51, 62, 63, A1]. Клетка использует этот механизм для быстрого повышения локальной концентрации индуцирующих кривизну белков около областей, подвергаемых существенным деформациям, а также привлечения к этим областям белков, хуже «чувствующих» кривизну бислоя, однако обладающих высоким сродством к белкам «сенсорам» кривизны [64].

Поскольку отдельные молекулы белка могут как «чувствовать», так и индуцировать кривизну липидного бислоя (что, вообще говоря, разные проявления одних и тех же механизмов), то, следовательно, они способны взаимодействовать друг с другом через мембрану клетки. Изучение таких взаимодействий является весьма нетривиальной задачей из-за малых размеров системы и существенной роли тепловых флуктуаций. В настоящий момент наблюдение в реальном времени взаимодействий между отдельными адсорбированными на мембране белками, а также измерение сил, действующих между ними, не представляются возможными. На текущем этапе развития экспериментальных методов исследования мы можем

либо наблюдать в динамике более глобальные процессы, являющиеся результатом взаимодействий между индуцирующими кривизну белками, как например в работах [9, 61, 65, A1], либо изучать уже сформированные белковые агломераты с разрешением, позволяющим различать отдельные молекулы белка [66 – 70].

1.4 Трубочатые липидные мембраны

Эффективным способом экспериментального исследования рассмотренных в предыдущем подразделе особенностей взаимодействия белков с клеточными мембранами, а также роли этих взаимодействий в процессах, протекающих в клетке, является использование модельных систем. Такой подход позволяет рассмотреть отдельные аспекты процесса, а также управлять различными физическими параметрами исследуемой системы. Очевидно, что биомиметические системы поддаются теоретическому описанию гораздо лучше, чем живые клетки, и в совокупности с адекватными эксперименту физическими моделями могут служить источником не только качественных, но и количественных данных. В то же время главным недостатком данного подхода является невозможность учесть коллективное влияние всего многообразия факторов, встречающихся в клетке.

Одна из наиболее часто используемых модельных систем – трубчатая липидная мембрана (ТЛМ). ТЛМ представляют собой цилиндрические оболочки, сформированные липидным бислоем и достигающие в длину сотен микрометров при толщине всего в несколько десятков нанометров. Они участвуют в большинстве внутриклеточных обменных процессов, образуя сложные высокодинамичные сети, и были обнаружены в целом ряде органелл, таких как митохондрии, комплекс Гольджи и эндоплазматический ретикулум [71, 72]. Через ТЛМ также осуществляются взаимодействия между соседними клетками многоклеточных организмов, например, направленный транспорт органелл и компонент плазматической мембраны (что в свою очередь означает непосредственное участие в процессах иммунного ответа и эмбрионального развития) [73]. *In vitro* формирование ТЛМ из искусственно синтезированных

фосфолипидных везикул обычно осуществляется следующими способами: направленным потоком жидкости [74 – 77], микропипеткой [26, 78, 79] или же оптическим пинцетом [9, 50, 61, 80, 81]. Последний метод во многом схож с одним из механизмов образования ТЛМ в живых клетках, в котором вытягивание ТЛМ осуществляется моторными белками, перемещающимися вдоль микротрубочек цитоскелета.

Принципиальная схема эксперимента по вытягиванию ТЛМ из везикулы оптическим пинцетом изображена на рисунке 1.1 [9, 50, 61, 80, 81]. Везикула фиксируется при помощи микропипетки, схематически изображенной в виде полого цилиндра большого радиуса. Затем, везикулу подводят к удерживаемому оптическим пинцетом полимерному шарик. Шарик обладает высоким сродством к мембране, поэтому, по мере того как везикула возвращается в свое исходное положение, из нее вытягивается ТЛМ. В работах [9, 50, 61, 80, 81, A1] это осуществляется за счет покрытия шарика белком стрептавидином и добавления в состав везикулы биотина (биотин-стрептавидиновое взаимодействие является одним из сильнейших нековалентных взаимодействий, встречающихся в природе). После формирования везикулы в область вокруг ТЛМ могут вводиться растворы различных белков, взаимодействие которых с мембраной требуется рассмотреть (как в работах [9, 61, 65, A1]).

Поверхностное натяжение в системе контролируется при помощи микропипетки. Уменьшение давления внутри микропипетки P_p приводит к увеличению погруженной внутрь нее части везикулы и увеличению перепада давления $\Delta P = P_{in} - P_{out}$, что, в свою очередь, вызывает увеличение поверхностного натяжения липидного бислоя (увеличение давления в микропипетке ведет к обратному процессу). Использование оптического пинцета для удержания полимерного шарика, приклеенного к концу ТЛМ, позволяет измерять силу F , вытягивающую (удерживающую) ТЛМ из везикулы. Это осуществляется за счет измерения отклонения шарика от фокуса оптического пинцета. Соотношение между силой и отклонением при этом обычно аппроксимируется классическим

линейным выражением $P_p = \kappa \Delta x$, где κ – жесткость ловушки, Δx – отклонение шарика из положения равновесия в фокусе оптического пинцета [A1].

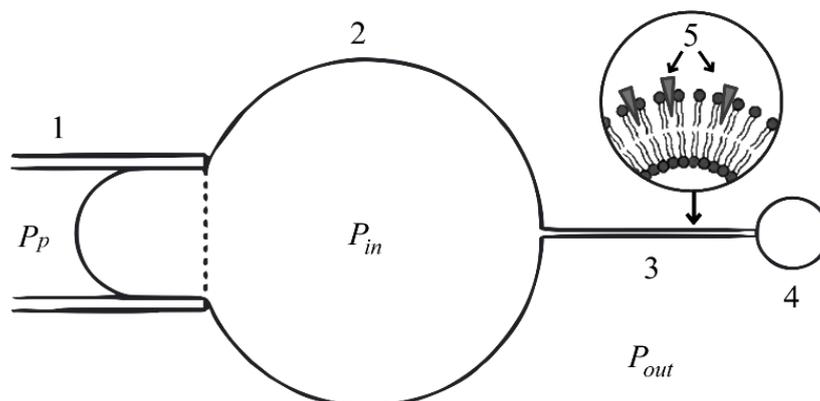


Рисунок 1.1 – Схема эксперимента по вытягиванию ТЛМ. 1 – микропипетка, 2 – везикула, 3 – стеклянный или полимерный шарик, 4 – ТЛМ, 5 – молекулы полимера, внедрившиеся в бислой, P_p – давление внутри микропипетки, P_{in} – давление внутри везикулы, P_{out} – давление окружающей ТЛМ жидкости

Для визуализации системы используется конфокальная и флуоресцентная микроскопия. Использование разных флуоресцентных марок позволяет рассматривать такие процессы, как адсорбция белков [9, 61, 65, A1], нуклеация и эволюция липидных доменов [50, 81] в реальном времени. Радиус липидной трубки может быть определен из закона Лапласа для цилиндра при помощи измерения растягивающей ТЛМ силы и поверхностного натяжения (в простейшей модели для липидной трубки соответствующий закон имеет вид $r = F/4\pi\sigma$ [82]), или же из соотношения интенсивностей флуоресценции:

$$r/R = K_c I_{l,t} / I_{l,v}, \quad (1.3)$$

где r – радиус трубки, R – радиус везикулы (который сравнительно легко измерить), K_c – калибровочный коэффициент, а $I_{l,t}, I_{l,v}$ – интенсивности флуоресценции меченых липидов в везикуле и трубке соответственно. Аналогичным образом можно определить соотношение между концентрациями белка:

$$s = \frac{I_{p,t} / I_{p,v}}{I_{l,t} / I_{l,v}}, \quad (1.4)$$

В выражении (1.4) $I_{p,t}, I_{p,v}$ – интенсивности флуоресценции меченых белков, адсорбированных на поверхности везикулы и трубки соответственно. Для определения абсолютных величин концентраций обычно устанавливают соотношение между силой флуоресцентного сигнала и концентрацией меченых молекул на поверхности бислойа при помощи систем с заданными параметрами [9, 50]. Так в работе [9] показано, что эта зависимость в широком диапазоне концентраций носит линейный характер.

2 МОДЕЛЬ ТЛМ

Одной из первоочередных задач, стоящих перед автором, являлось построение модели трубчатой липидной мембраны, отвечающей современным представлениям о системе, сложившимся в результате экспериментальных исследований. В данном разделе разрабатывается модель липидной трубки, вытянутой из везикулы, а также выводятся условия совместного равновесия этой системы. Получены соотношения, устанавливающие связь между геометрическими и физическими параметрами композитной системы, управление которыми стало возможным благодаря развитию экспериментальных методов исследования липидных мембран. В частности, помимо энергии поверхностного натяжения разработанная теория учитывает перепад давления в системе и спонтанную кривизну липидного бислоя, из которого сформирована трубка. Определена область устойчивости высокосимметричной цилиндрической фазы трубчатой липидной мембраны и показано, что липидная трубка может существовать и после выключения сформировавшей ее растягивающей силы. Также обсуждается потеря устойчивости системы под действием малой сжимающей силы, направленной вдоль оси ТЛМ. Основные результаты исследования описаны в [A2, A3].

2.1 Энергия системы

Рассмотрим весьма популярную ранее среди экспериментаторов минимальную модель ТЛМ [82 – 84]. Она использует достаточно тривиальное выражение для энергии системы:

$$\Phi = \kappa \frac{\pi L}{r} - 2\pi r L \sigma - FL. \quad (2.1)$$

Первое слагаемое представляет собой упругую энергию Канама-Хелфрика для липидной трубки с нулевой собственной кривизной, радиусом r , длиной L , и изгибной жесткостью κ . σ – коэффициент поверхностного натяжения мембраны. Член FL учитывает потенциальную работу продольной растягивающей силы F ,

удерживающую липидную трубку в положении равновесия. Воспользовавшись данной энергией, можно получить следующие выражения, связывающие между собой приложенную к мембране силу, ее радиус и поверхностное натяжение при заданной величине κ :

$$r = \sqrt{\frac{\kappa}{2\sigma}}, F = 2\pi\sqrt{2\sigma\kappa}. \quad (2.2)$$

Благодаря своей простоте выражения (2.2) активно использовались для определения параметров ТЛМ в экспериментах с их участием. Однако, на сегодняшний день развитие экспериментальных методов исследования липидных мембран в целом и, в частности, экспериментов по вытягиванию ТЛМ, рассмотренных ранее, позволило наряду с упомянутыми параметрами контролировать перепад давлений в системе, а также изменение величины собственной кривизны липидного бислоя C_0 .

Таким образом, для адекватной интерпретации современных экспериментов по вытягиванию ТЛМ минимальная модель должна учитывать асимметрию липидного бислоя, силу поверхностного натяжения, перепад давления между внутренним пространством мембраны и внешней средой, а также приложенную вдоль оси липидной трубки силу. Запишем выражение для свободной энергии такой ТЛМ, считая при этом, что ее форма может несколько отличаться от формы идеального цилиндра:

$$\Phi = \frac{\kappa}{2} \int (K - 2C_0)^2 dS + \sigma \int dS - \Delta P \int dV - FL. \quad (2.3)$$

Как и в выражении (2.1) первый член представляет собой свободную энергию Канама-Хелфриха [6, 7], здесь $K = 1/R_1 + 1/R_2$ – средняя кривизна поверхности ТЛМ, а C_0 – средняя собственная кривизна липидного бислоя. Третий член в выражении для энергии системы (2.3) учитывает вклад перепада давления $\Delta P = P_{in} - P_{out}$, где P_{in} – давление жидкости внутри ТЛМ, а P_{out} – снаружи. dS и dV – дифференциалы площади и давления соответственно. Отметим, что для простоты в разрабатываемой модели мы считаем собственную кривизну липидного бислоя

величиной постоянной на всей поверхности ТЛМ, не учитывая возможные неоднородности состава мембраны и/или распределения белков.

Предположим, что равновесная ТЛМ имеет форму цилиндра с радиусом r и длиной L , причем $r/L \ll 1$, энергия такой липидной трубки будет задаваться выражением:

$$\Phi_{cylindrical} = \kappa \left(\frac{1}{r} - 2C_0 \right)^2 \pi r L + \sigma 2\pi r L - \Delta P \pi r^2 L - FL. \quad (2.4)$$

После чего, следуя стандартному подходу (см., например, [85]), потребуем равенства нулю первых производных выражения (2.4) по r и L .

$$\frac{\partial \Phi}{\partial r} = 0, \frac{\partial \Phi}{\partial L} = 0. \quad (2.5)$$

В итоге получим два обобщенных уравнения Лапласа для ТЛМ:

$$\sigma = r\Delta P + \frac{\kappa(1 - 4C_0^2 r^2)}{2r^2}, F = \pi r^2 \Delta P + \frac{2\kappa\pi(1 - 2C_0 r)}{r}. \quad (2.6)$$

Легко заметить, что условия $\Delta P = 0$ и $C_0 = 0$ переводят уравнения (2.6) в упрощенные зависимости (2.2). Несмотря на то, что соотношения (2.6) более точно устанавливают связь между параметрами системы, они все также не позволяют ответить на вопрос: «*При каких условиях форма правильного прямого цилиндра соответствует минимуму энергии ТЛМ?*». Для того чтобы установить область существования цилиндрической, высокосимметричной фазы ТЛМ, необходимо рассмотреть устойчивость системы к тепловым флуктуациям.

2.2 Устойчивость индивидуальной ТЛМ

Для описания формы флуктуирующей ТЛМ рассмотрим ее поверхность, как двумерное многообразие $\mathbf{R}(x, y, z)$ в трехмерном пространстве. Параметризуем мембрану при помощи поля радиальных смещений элемента поверхности $u_r(\phi, z)$ относительно недеформированного прямого цилиндра радиуса r . Тогда вектор декартовых координат элемента поверхности можно записать как:

$$\mathbf{R}_x = [u_r(\phi, z) + r] \cos \phi, \mathbf{R}_y = [u_r(\phi, z) + r] \sin \phi, \mathbf{R}_z = z. \quad (2.7)$$

Среднюю кривизну поверхности найдем по формуле:

$$K = \frac{EN - 2FM + GL}{EG - F^2}, \quad (2.8)$$

где E, G, F – коэффициенты первой квадратичной формы поверхности, а N, M, L – коэффициенты второй квадратичной формы поверхности. Они задаются следующими выражениями:

$$\begin{aligned} E &= \left(\frac{\partial}{\partial \phi} x \right)^2 + \left(\frac{\partial}{\partial \phi} y \right)^2 + \left(\frac{\partial}{\partial \phi} z' \right)^2, \\ G &= \frac{\partial}{\partial \phi} x \frac{\partial}{\partial z} x + \frac{\partial}{\partial \phi} y \frac{\partial}{\partial z} y + \frac{\partial}{\partial \phi} z' \frac{\partial}{\partial z} z', \\ G &= \left(\frac{\partial}{\partial z} x \right)^2 + \left(\frac{\partial}{\partial z} y \right)^2 + \left(\frac{\partial}{\partial z} z' \right)^2, \end{aligned} \quad (2.9)$$

$$N = \frac{\begin{vmatrix} \partial_\phi x & \partial_\phi y & \partial_\phi z \\ \partial_z x & \partial_z y & \partial_z z \\ \partial_\phi^2 x & \partial_\phi^2 y & \partial_\phi^2 z \end{vmatrix}}{\sqrt{EG - F^2}}, M = \frac{\begin{vmatrix} \partial_\phi x & \partial_\phi y & \partial_\phi z \\ \partial_z x & \partial_z y & \partial_z z \\ \partial_\phi \partial_z x & \partial_\phi \partial_z y & \partial_\phi \partial_z z \end{vmatrix}}{\sqrt{EG - F^2}}, L = \frac{\begin{vmatrix} \partial_\phi x & \partial_\phi y & \partial_\phi z \\ \partial_z x & \partial_z y & \partial_z z \\ \partial_z^2 x & \partial_z^2 y & \partial_z^2 z \end{vmatrix}}{\sqrt{EG - F^2}}, \quad (2.10)$$

Площадь поверхности также найдем через коэффициенты первой квадратичной формы поверхности:

$$S = \iint_D \sqrt{EG - F^2} d\phi dz. \quad (2.11)$$

Объем ТЛМ найдем по формуле:

$$V = \frac{1}{2} \int_0^L \int_0^{2\pi} (R_x^2 + R_y^2) d\phi dz. \quad (2.12)$$

После введения параметризации (2.7) и подстановок (2.8), (2.11) и (2.12) в (2.3), выражение для свободной энергии мембраны принимает следующий вид:

$$\Phi = \int_0^L \int_0^{2\pi} \left[\frac{\kappa}{2} \left(\frac{EN - 2FM + GL}{EG - F^2} - 2C_0 \right)^2 + \sigma \right] \sqrt{EG - F^2} - \frac{\Delta P}{2} (R_x^2 + R_y^2) d\phi dz - FL. \quad (2.13)$$

Введем два безразмерных внешних параметра, контролирующих поведение системы, а именно: нормализованную осевую силу α_F и нормализованную собственную кривизну липидного бислоя α_C . Они задаются выражениями (2.14).

$$\alpha_F = \frac{Fr}{\pi k}, \alpha_C = 2C_0 r. \quad (2.14)$$

Воспользовавшись выражениями (2.6), мы можем выразить величины разности давления ΔP и поверхностного натяжения σ , через параметры α_C и α_F :

$$\Delta P = \frac{\kappa(\alpha_F - 2 + 2\alpha_C)}{r^3}, \quad \sigma = \frac{\kappa(2\alpha_F - 3 + 4\alpha_C - \alpha_C^2)}{2r^2}. \quad (2.15)$$

Тогда, используя выражения (2.15), мы можем переписать (2.13) как функцию параметров α_C и α_F :

$$\Phi = \frac{\kappa}{2} \int_0^L \int_0^{2\pi} \left[\left(\frac{EN - 2FM + GL}{EG - F^2} - \frac{\alpha_C}{r} \right)^2 - \frac{(3 + \alpha_C^2 - 4\alpha_C - 2\alpha_F)}{r^2} \sqrt{EG - F^2} - \frac{(-2 + 2\alpha_C - \alpha_F)(R_x^2 + R_y^2)}{r^3} \right] d\phi dz - FL. \quad (2.16)$$

Предполагая, что в области устойчивого равновесия цилиндрической высокосимметричной фазы поле смещений $u_r(\phi, z)$, вызванное тепловыми флуктуациями и играющее роль возмущения, является малым, вместо выражения (2.16) мы воспользуемся его разложением в ряд до членов второго порядка малости по полю смещений и его производным. Запишем это разложение в явном виде:

$$\Phi = \frac{\kappa}{2r^3} \int_0^L \int_0^{2\pi} \left[r^2(2\alpha_C + \alpha_F - 2) \left(\frac{\partial}{\partial z} u_r(\phi, z) \right)^2 + \alpha_F \left(\frac{\partial}{\partial \phi} u_r(\phi, z) \right)^2 + \left(r^2 \frac{\partial^2}{\partial z^2} u_r(\phi, z) + \frac{\partial^2}{\partial \phi^2} u_r(\phi, z) \right)^2 + (3 - 2\alpha_C - \alpha_F) u_r(\phi, z)^2 + 2u_r(\phi, z) \left(r^2 \alpha_C \frac{\partial^2}{\partial z^2} u_r(\phi, z) - \alpha_C \frac{\partial^2}{\partial \phi^2} u_r(\phi, z) + 2 \frac{\partial^2}{\partial \phi^2} u_r(\phi, z) \right) + 2r^3(\alpha_C - 1) \frac{\partial^2}{\partial z^2} u_r(\phi, z) + 2r(\alpha_C - 1) \frac{\partial^2}{\partial \phi^2} u_r(\phi, z) \right] d\phi dz. \quad (2.17)$$

Само поле смещений также представим в виде разложения в ряд, но уже по ортонормированному базису вида:

$$u_r(\phi, z) = \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} A_{n,m} \exp(i(n\phi + k_m z)), \quad (2.18)$$

В выражении (2.18) $k_m = 2\pi m/L$ – волновой вектор ТЛМ с индексом m , m и n – целые числа. Такое разложение соответствует случаю ТЛМ с периодическими

граничными условиями, которые традиционно используются в подавляющем большинстве теоретических работ, рассматривающих липидные трубки [9, 86 – 89]. Проинтегрировав выражение (2.17) с учетом проделанных разложений, получаем следующее выражение для квадратичной энергии системы:

$$\Phi = \frac{\pi L \kappa}{r^3} \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} M_{n,m} A_{n,m} A_{n,m}^*, \quad (2.19)$$

где матрица коэффициентов $M_{n,m}$ имеет следующий вид:

$$M_{n,m} = (r^2 k_m^2 + n^2 - 1)^2 + (2\alpha_C - 2)(n^2 - 1) + \alpha_F (r^2 k_m^2 + n^2 - 1). \quad (2.20)$$

Отметим, что при выборе периодических граничных условий все линейные по амплитудам поля смещений члены в (2.17) обращаются в ноль. При этом, очевидно, что цилиндрическая высокосимметричная фаза является устойчивой при тех значениях эффективных параметров α_C и α_F , для которых все коэффициенты $M_{n,m}$ положительны. Проанализировав выражение (2.20) легко заметить, что потеря устойчивости цилиндрической трубки в зависимости от контролирующих параметров α_C, α_F может быть связана с двумя типами мод. Первый тип мод – это двукратно вырожденные моды, для которых $n=0$ и $m=\pm m_0$, где $m_0=0,1,2\dots m_{max}$ и $m_{max} = \text{round}(L/(2\pi r))$ (см. рис. 2.1 (а),(в),(г)), здесь функция $\text{round}()$ выделяет целую часть из своего аргумента. Второй тип мод – это четырехкратно вырожденные изгибные моды с $n=\pm 1$ и $m=\pm 1$ (см. рис. 2.1 (б)). В рассматриваемом случае с периодическими граничными условиями моды $n=\pm 1$ и $m=0$ всегда являются безэнергетическими голдстоуновскими (трансляционными) и никак не сказываются на устойчивости мембраны. Соответствующие им элементы матрицы коэффициентов $M_{n,m}$ обращаются в ноль независимо от величин управляющих параметров.

Рассмотрим область устойчивости цилиндрической фазы ТЛМ в пространстве параметров $\langle \alpha_F, \alpha_C \rangle$, изображенную на рисунке 2.2. Сверху она ограничена прямоугольником со сторонами, задаваемыми уравнениями прямых $M_{0,m}=0$, где m изменяется от 0 до $m_{max} = \text{round}(L/(2\pi r))$. Несмотря на то, что область

устойчивости цилиндрической фазы зависит от соотношения радиуса ТЛМ к ее длине r/L , набор прямых $M_{0,m}=0$, $m=1..m_{max}$ имеет общую касательную параболу, а, значит, с очень хорошей степенью точности верхнюю границу области устойчивости можно задать следующим образом, положив m величиной с непрерывным спектром значений:

$$\alpha_F < 3 - 2\alpha_C, \text{ при } \alpha_F \geq 2 \text{ и } \alpha_C < 1 - \alpha_F^2/8, \text{ при } \alpha_F \leq 2. \quad (2.21)$$

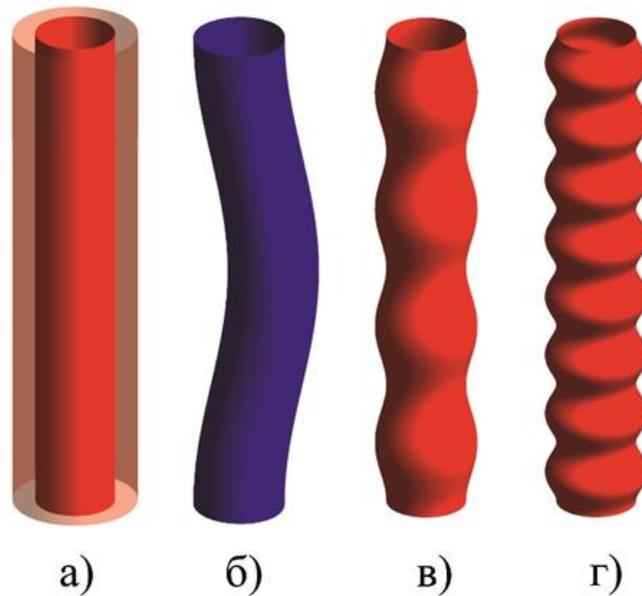


Рисунок 2.1 – Возможные критические моды в ТЛМ. а) $n=0$, $m=0$ (радиальная дыхательная мода); б) $n=1$, $m=1$ (изгибная мода); в) $n=0$, $m=4$ (мода гофрировки); г) $n=0$, $m=8$ (мода гофрировки)

Существование нижней границы области устойчивости $\alpha_C = 0$ обусловлено особенностью экспериментов по вытягиванию ТЛМ с участием индуцирующих кривизну белков [9, 61, 65, A1]. В них раствор, содержащий белки, вводится в область вокруг ТЛМ, что приводит к возникновению положительной собственной кривизны липидного бислоя.

Проанализируем ситуацию, когда давление внутри трубчатой липидной мембраны совпадает с давлением снаружи, а следовательно $\Delta P = 0$. Этот частный случай часто рассматривается в литературе, посвященной липидным мембранам (см., например, [82]). На фазовой диаграмме, изображенной на рисунке 2.2, ему

соответствует линия $\alpha_C = 1 - \alpha_F / 2$. Хорошо видно что, вблизи точки $\alpha_F = 0, \alpha_C = 1$ (в окрестности этой точки ΔP мало), неустойчивость имеет комплексный характер, и в области небольших отрицательных величин α_F ТЛМ теряет устойчивость практически одновременно относительно мод гофрировки ($n=0, m=\pm m_{max}$) и изгиба ($n=\pm 1, m=\pm 1$).

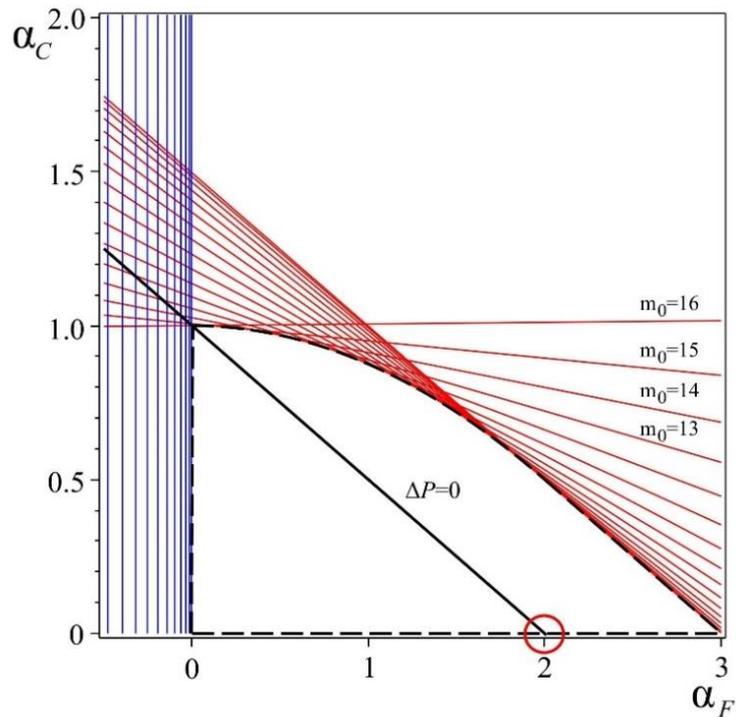


Рисунок 2.2 – Область устойчивости цилиндрической фазы для ТЛМ с отношением длины к радиусу $L/r=100$. Сплошные красные и синие линии задаются уравнениями $M_{n,m}=0$ и соответствуют возможным в ТЛМ мягким модам. Черная пунктирная линия очерчивает границу устойчивости ТЛМ, сплошная черная линия задается уравнением $\alpha_C = 1 - \alpha_F / 2$ и соответствует системе с нулевым перепадом давлений $\Delta P = 0$. Красным кружком выделена точка, соответствующая минимальной модели, описываемой энергией (2.1).

Среднеквадратичные флуктуации амплитуд критических мод ТЛМ при приближении к границам области существования цилиндрической фазы (за исключением границы $\alpha_c = 0$) стремятся к бесконечности. Схожим образом ведет себя и величина среднеквадратичных радиальных флуктуаций трубчатой мембраны $\langle |u_r|^2 \rangle$:

$$\langle |u_r|^2 \rangle = \frac{k_B T r^3}{2\kappa \pi L} \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} \frac{1}{M_{n,m}}. \quad (2.22)$$

В выражении (2.22) k_B – постоянная Больцмана, T – температура, а из суммы исключаются слагаемые, соответствующие движению ТЛМ как целого, то есть пара голдстоуновских мод с $n=\pm 1$ и $m=0$. Таким образом, выражение (2.22) наглядно показывает, что расходимость $\langle |u_r|^2 \rangle$ вызвана стремлением к нулю коэффициентов $M_{n,m}$, выступающих в роли эффективных упругостей для соответствующих критических мод.

В заключение еще раз отметим, что все это время мы формально рассматривали индивидуальную ТЛМ. Было продемонстрировано, что такая трубка может существовать в сравнительно широком диапазоне контролирующих параметров $\langle \alpha_c, \alpha_f \rangle$, при ненулевой разности давлений и положительной собственной кривизне липидного бислоя. Однако, как в живых клетках, так и в модельных системах ТЛМ чаще всего соединены с везикулой, из материала которой они были сформированы. Как будет показано в дальнейшем, эта особенность рассматриваемой системы существенным образом влияет на разрешенные значения параметров $\langle \alpha_c, \alpha_f \rangle$.

2.3 Устойчивость липидной везикулы

Рассмотрим систему, состоящую из везикулы и вытянутой из нее ТЛМ, подобную использованной в работах [9, 50, 61, 80, 81, A1]. Между ее частями свободно осуществляется обмен веществом, а, следовательно, достаточно быстро устанавливается равновесие. Условия этого равновесия, как будет показано в

дальнейшем, и определяют путь, по которому может двигаться система в пространстве параметров $\langle \alpha_C, \alpha_F \rangle$.

В данной работе исследуется случай, в котором собственная кривизна везикулы является пренебрежимо малой и постоянной, в то время как собственная кривизна ТЛМ может изменяться под действием тех или иных факторов (например, под действием белков, как в работах [9, 61, 65, A1]). Согласно данным флуоресцентной микроскопии при использовании растворов с низкой концентрацией белков, их молекулы осаждаются преимущественно на ТЛМ [9, 61, A1]. Перепад концентрации адсорбированных белков, а, следовательно, и собственной кривизны липидного бислоя между везикулой и ТЛМ существует за счет рассмотренной в подразделе 1.3 способности белков «чувствовать» кривизну мембраны. Концентрация изменяющих кривизну липидного бислоя агентов на поверхности ТЛМ считается достаточно низкой для того, чтобы ее энергию можно было описать гамильтонианом Канама-Хелфрика, поскольку после того, как концентрация некоторых белков (например, эндофилина) превышает пороговое значение, мембрана обрастает жестким белковым каркасом, качественно меняя свои механические свойства.

Наиболее очевидным способом определения параметров физической системы является минимизация ее свободной энергии. Для того, чтобы записать энергию рассматриваемой сложной системы, последнюю обычно мысленно разделяют на части с различной геометрией. Так, в работе [9] этих частей три: липидная трубка, часть везикулы снаружи микропипетки и часть везикулы внутри нее (см. рис. 1.1). Расчет и минимизация свободной энергии такой системы является весьма трудоемкой задачей по ряду причин. Одной из них является сложность учета энергии переходных областей, в которых резко изменяется кривизна липидного бислоя. Кроме того, расчет энергии части везикулы, погруженной в микропипетку, также является отдельной нетривиальной задачей [90].

Однако, вышеупомянутых трудностей можно избежать, отказавшись от расчета свободной энергии системы как целого. Вместо этого мы воспользуемся

тем фактом, что значения перепада давления ΔP и поверхностного натяжения σ одинаковы во всех частях системы. Действительно, величина поверхностного натяжения σ для ведущего себя подобно двумерной жидкости липидного бислоя играет ту же роль, что и давление для трехмерной жидкости, а, следовательно, двумерный аналог закона Паскаля приводит к выравниванию значения σ во всей системе.

Теперь рассмотрим отдельно устойчивость везикулы, из которой была сформирована ТЛМ. Следуя работам [9, 90], будем считать, что часть везикулы снаружи микропипетки обладает формой практически идеального сферического сегмента. Поскольку, как обсуждалось ранее, липидный бислой, формирующий эту часть системы, имеет пренебрежимо малую собственную кривизну, мы можем записать энергию везикулы как:

$$\Phi_{sp} = \frac{\kappa}{2} \int \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)^2 dS + \sigma \int dS - \Delta P \int dV. \quad (2.23)$$

Сферическая везикула, которая описывается такой энергией и находится под действием постоянной разности давления $\Delta P > 0$, неустойчива в отличие от липидной трубки, удерживаемой внешней силой F . Это связано с тем, что при такой постановке задачи неумещающаяся с изменением радиуса положительная величина ΔP приводит к неограниченному расширению сферической мембраны. В аналогичных условиях неустойчив и обычный мыльный пузырь, обладающий нулевой изгибной упругостью κ . Устойчивость мыльного пузыря обеспечивается за счет постоянства массы содержащегося внутри него воздуха. Поэтому, для того чтобы проанализировать устойчивость сферической липидной мембраны с радиусом R , описываемой энергией (2.23), мы должны либо явно учесть объемную упругость содержащейся в ней жидкости, либо наложить дополнительное условие постоянства ее объема (2.24).

$$\int dV \equiv V_0 = \frac{4}{3} \pi R^3. \quad (2.24)$$

Стоит отметить, что перепад давления все также входит в энергию системы, однако здесь он играет роль множителя Лагранжа при условной минимизации функционала.

По аналогии с проведенным ранее анализом устойчивости ТЛМ, рассмотрим устойчивость везикулы, подверженной термическим флуктуациям, введя поле смещений $u_r^{ves}(\phi, \theta)$ относительно поверхности недеформированной сферы радиуса R . Компоненты вектора декартовых координат точек деформированной поверхности при этом представим как:

$$\begin{aligned} R'_x &= (u_r^{ves} + R) \sin \theta \cos \phi, \\ R'_y &= (u_r^{ves} + R) \sin \theta \sin \phi, \\ R'_z &= (u_r^{ves} + R) \cos \theta, \end{aligned} \quad (2.25)$$

где ϕ, θ – углы полярной системы координат. Для определения объема мембраны параметризуем точки, заключенные внутри замкнутой поверхности, как:

$$\mathbf{R}^{in} = \beta \mathbf{R}', \quad (2.26)$$

где величина β изменяется от нуля до единицы. Тогда объем деформированной сферы можно записать как:

$$V = \int d^3 \mathbf{R}^{in} = \int_{\beta=0}^{\beta=1} \int_{\theta=0}^{\theta=\pi} \int_{\varphi=0}^{\varphi=2\pi} \left| \frac{\partial \mathbf{R}_x^{in}, \partial \mathbf{R}_y^{in}, \partial \mathbf{R}_z^{in}}{\partial \alpha, \partial \varphi, \partial \theta} \right| d\varphi d\theta d\beta. \quad (2.27)$$

В выражении (2.27) под знаком интеграла стоит якобиан перехода к новой системе координат. После интегрирования по параметру β записываем в явном виде:

$$V = \frac{1}{3} \int_{\theta=0}^{\theta=\pi} \int_{\varphi=0}^{\varphi=2\pi} \det \begin{vmatrix} R'_x & R'_y & R'_z \\ \partial_\theta R'_x & \partial_\theta R'_y & \partial_\theta R'_z \\ \partial_\varphi R'_x & \partial_\varphi R'_y & \partial_\varphi R'_z \end{vmatrix} d\theta d\varphi. \quad (2.28)$$

Как и ранее разложим свободную энергию системы до членов второго порядка малости по полю смещений и его производным, после чего разложим само поле радиальных смещений по сферическим гармоникам (2.29).

$$u_r^{ves}(\theta, \phi) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{l=-m}^{l=m} A_{l,m} Y_{l,m}(\theta, \phi). \quad (2.29)$$

Выполнив соответствующие подстановки и взяв интегралы, получим выражение для квадратичной энергии системы аналогичное (2.19), но содержащее помимо квадратичных по амплитудам поля смещений членов, также члены линейные по амплитуде $Y_{0,0}$. В минимуме энергии условие отсутствия линейных членов приводит к тому, что для равновесной сферической везикулы должен выполняться обычный закон Лапласа (2.30).

$$\sigma = \frac{1}{2} R \Delta P \quad (2.30)$$

Учитывая тот факт, что объем, ограниченный липидной мембраной, должен сохраняться, получаем квадратичную по амплитудам $Y_{l,m}$ часть энергии (2.23):

$$\Phi_2 = 8\kappa\pi + \frac{2}{3} \pi R^3 \Delta P + \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{l=-m}^{l=m} \zeta_l Y_{l,m} Y_{l,m}^*, \quad (2.31)$$

где коэффициенты ζ_l задаются выражением:

$$\zeta_l = R \Delta P [l(l+1)/4 - 1/2] + \frac{\kappa}{2R^2} [(l-1)l(l+1)(l+2)]. \quad (2.32)$$

Мода с $l=1$ является безэнергетической и соответствует движению сферической мембраны как целого, а, следовательно, равенство нулю коэффициента ζ_1 не связано с потерей устойчивости. Анализ значений ζ_l при $l > 1$ показывает, что сферическая липидная везикула может быть устойчива при положительном перепаде давления $\Delta P > 0$, однако, только в весьма ограниченной области. Везикула теряет устойчивость при $\Delta P < \Delta P_{ins}^{ves}$ по модам с $l=2$, где

$$\Delta P_{ins}^{ves} = -\frac{12\kappa}{R^3} \quad (2.33)$$

2.4 Закон Лапласа для ТЛМ, вытянутой из везикулы

Теперь, имея в нашем распоряжении уравнения Лапласа для липидной везикулы (2.30) и ТЛМ (2.6), мы можем перейти к рассмотрению композитной

системы. Для этого воспользуемся предположением об однородности величин перепада давления ΔP и поверхностного натяжения σ во всей системе и запишем совместное решение уравнений Лапласа, описывающих систему ТЛМ-везикула в области устойчивости (при этом выражение (2.30) используется для расчета разности давлений внутри и снаружи системы):

$$F = \frac{\kappa\pi(1-\alpha_c)(r\alpha_c+2R-3r)}{r(R-2r)}, \sigma = \frac{\kappa(1-\alpha_c^2)R}{2r^2(R-2r)}. \quad (2.34)$$

Поскольку характерные размеры везикул, используемых в экспериментах по вытягиванию ТЛМ, могут достигать до десятков микрометров, в то время как размеры ТЛМ редко превышают сто нанометров, мы можем ввести малый параметр γ , равный отношению радиуса ТЛМ к радиусу везикулы r/R . Тогда выражения (2.34) в первом приближении по γ можно записать как:

$$F \approx \frac{2\kappa\pi(1-\alpha_c)}{r} + \gamma \frac{\kappa\pi(1-\alpha_c^2)}{r}, \sigma \approx \frac{\kappa(1-\alpha_c^2)}{2r^2} + \gamma \frac{\kappa(1-\alpha_c^2)}{r^2}. \quad (2.35)$$

Если устремить нормализованную собственную кривизну липидного бислоя к нулю $\alpha_c \rightarrow 0$ (что эквивалентно $C_0 \rightarrow 0$) и $\gamma \rightarrow 0$, то уравнения (2.34) и (2.35) приобретают следующий вид:

$$F = \frac{2\kappa\pi}{r}, \sigma = \frac{\kappa}{2r^2}. \quad (2.36)$$

Легко заметить, что эта система уравнений идентична системе (2.2), которая была выведена для ТЛМ с нулевой спонтанной кривизной в предположении $\Delta P = 0$ [82]. Предложенный нами подход, напротив, дает некоторую положительную разность давлений:

$$\Delta P \approx \frac{\kappa(1-\alpha_c^2)}{r^2 R} + \gamma \frac{2\kappa(1-\alpha_c^2)}{r^2 R}. \quad (2.37)$$

Проведем оценку перепада давления, задаваемого выражением (2.37). Для системы с нулевой собственной кривизной липидного бислоя, величиной изгибной упругости $12k_B T$, радиусом везикулы порядка $R \approx 5 \cdot 10^{-6}$ нм и радиусом ТЛМ $r \approx 25 \cdot 10^{-9}$ нм величина перепада давления составляет порядка $\Delta P \approx 16$ Па. Теперь

сравним вклад перепада давления в энергию системы с энергией поверхностного натяжения мембраны. Поскольку поверхностное натяжение имеет отличную от давления размерность ($[\text{Дж}/\text{м}^2]$ и $[\text{Дж}/\text{м}^3]$, соответственно), вместо величины ΔP мы воспользуемся величиной $r\Delta P$. Действительно, энергию поверхностного натяжения в системе можно оценить как $\sigma \cdot 2\pi rL$, в тоже время $r\Delta P \cdot 2\pi rL$ представляет собой потенциальную энергию сил гидростатического давления. В итоге, сравнивая (2.35) и (2.37) получаем соотношение $\sigma/r\Delta P = r/R$.

Теперь рассмотрим, как полученные соотношения трансформируют область устойчивости индивидуальной ТЛМ. Воспользовавшись выражением для перепада давлений в системе (2.37) и уравнениями (2.15) для ТЛМ, получаем кривую, описывающую устойчивость композитной системы ТЛМ-везикула в пространстве нормализованных параметров $\langle \alpha_F, \alpha_C \rangle$:

$$\alpha_F \approx 2 - 2\alpha_C + \gamma(1 - \alpha_C^2). \quad (2.38)$$

Последнее слагаемое в (14) превращает прямую $\alpha_C = 1 - \alpha_F/2$ с нулевой разностью давлений $\Delta P = 0$ в кривую, характеризующую систему с ненулевым перепадом давления. Эти две линии пересекаются в точке $\alpha_C = 1$. Как было замечено ранее, величина ΔP стремится к нулю с ростом собственной кривизны C_0 и в точке $\alpha_C = 1$ обращается в ноль вместе с растягивающей ТЛМ силой F и поверхностным натяжением σ (в точке $\alpha_C = 1$ собственная кривизна липидного бислоя совпадает с фактической кривизной липидной трубки).

Таким образом, полученные приближенные уравнения (2.35), описывающие поведение композитной системы, позволяют учесть влияние везикулы на устойчивость вытянутой из нее липидной трубки. Они сокращают область значений контролируемых параметров $\langle \alpha_F, \alpha_C \rangle$ (см. рис. 2.2), соответствующую равновесной индивидуальной ТЛМ, до единственной кривой (2.38), которая описывает композитную систему с небольшим, но ненулевым перепадом давления, задающимся выражением (2.37).

2.5 Потеря устойчивости композитной системы ТЛМ-везикула

Перейдем к более детальному анализу критического поведения системы. Из фазовой диаграммы, изображенной на рисунке 2.2, хорошо видно, что минимальная сдавливающая сила, приложенная вдоль оси ТЛМ, должна приводить к возникновению классической эйлеровой неустойчивости (моды с $n=\pm 1$ и $m=\pm 1$) сочетающейся с гофрировкой (моды с $n=0$, $k_m^2 r^2 \approx 1$). Как было показано ранее, учет перепада давления в системе ТЛМ-везикула дает поправки в выражения для поверхностного натяжения и приложенной силы (2.35). Малость этих поправок с одной стороны определяется малостью отношения радиуса ТЛМ к радиусу везикулы $\gamma = r/R$, а с другой – малостью самого значения ΔP (вблизи критической неустойчивости в точке $\alpha_C = 1$ кривая состояния (14), описывающая систему, пересекает прямую $\alpha_C = 1 - \alpha_F/2$, характеризующую систему с нулевой разностью давлений). Поэтому, для упрощения анализа мы можем перейти к рассмотрению ТЛМ с нулевым перепадом давления $\Delta P = 0$. Тогда энергия системы вблизи критической точки будет задаваться выражением:

$$\Phi = \frac{\kappa}{2} \int (K - 2C_0)^2 dS + \sigma \int dS - FL \quad (2.39)$$

а обобщенные уравнения Лапласа примут вид:

$$\sigma = \frac{k(1 - 4C_0^2 r^2)}{2r^2}, F = \sigma 2\pi r + \frac{k\pi(1 - 2C_0^2 r^2)^2}{r} \quad (2.40)$$

При этом общий вид выражения для квадратичной энергии (2.19) остается неизменным, а уравнение для коэффициентов $M_{n,m}$ существенно упрощается простой подстановкой $\alpha_C = 1 - \alpha_F/2$ в (2.20):

$$\Phi = \frac{\pi L k}{r^3} \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} M_{n,m} A_{n,m} A_{n,m}^* \quad (2.41)$$

$$M_{n,m} = (r^2 k_m^2 + n^2 - 1)^2 + \alpha_F r^2 k_m^2 \quad (2.42)$$

В результате мы переходим к ТЛМ с единственным управляющим параметром – нормализованной силой α_F .

Рассмотрим устойчивость системы в такой постановке задачи. Как и ранее появление неположительных значений в матрице коэффициентов $M_{n,m}$ свидетельствует о наличии критических точек. Из выражения (2.42) получаем, что потеря устойчивости относительного мод гофрировки с $n=0$, $k_m^2 r^2 \approx 1$ (см. рис. 2.3) возникает в точке $\alpha_F = \alpha_1$. Соответствующее значение силы при этом определяется выражением (2.43), где $\delta = k_m^2 r^2 - 1$ – малый параметр, характеризующий данную критическую точку.

$$\alpha_1 = -\delta^2 / (1 + \delta) \quad (2.43)$$

Неустойчивость относительно изгибных мод с $n=\pm 1$ и $m=\pm 1$ появляется в точке $\alpha_F = \alpha_2$, где

$$\alpha_2 = -(2\pi r / L)^2 \quad (2.44)$$

Заметим, что при этом имеет место неравенство $\alpha_2 \leq \alpha_1 \leq 0$. Правая граница этого неравенства соответствует случаю, когда $L = 2\pi r \cdot m$, где m – целое число, а, следовательно, длина трубки кратна ее радиусу. Левая граница соответствует случаю, когда $L = 2\pi r \sqrt{m_0(m_0 + 1)}$, где, как и ранее, $m_0 = \text{round}(L / (2\pi r))$ – целая часть отношения длины ТЛМ к ее радиусу. Таким образом, мода гофрировки с индексом $m = m_0$ теряет устойчивость раньше изгибных мод, за исключением точки $\alpha_2 = \alpha_1$, в которой одновременно становятся неустойчивыми две моды гофрировки с волновыми векторами $k_m = 2\pi m_0 / L$ и $k_{m+1} = 2\pi(m_0 + 1) / L$ и четырехкратно вырожденная мода изгиба. На вставке рисунка 2.3 изображены точки конденсации критических мод в трех рассмотренных случаях.

Теперь, для того чтобы обсудить возможность экспериментального наблюдения обнаруженных неустойчивостей, вернемся к полученным ранее законам Лапласа для ТЛМ (2.6) и сферической везикулы (2.30). Поскольку вблизи

точки неустойчивости с хорошей точностью выполняется соотношение $\alpha_c \approx 1$, мы можем оценить критическое значение перепада давления ΔP_{ins} , подставив выражение для поверхностного натяжения σ из (2.6) в (2.30). В результате получаем:

$$\Delta P_{ins} = \frac{\kappa \alpha_F^{ins}}{r^2 R}, \quad (2.45)$$

где α_F^{ins} – малая сжимающая сила, приводящая к потере устойчивости ТЛМ.

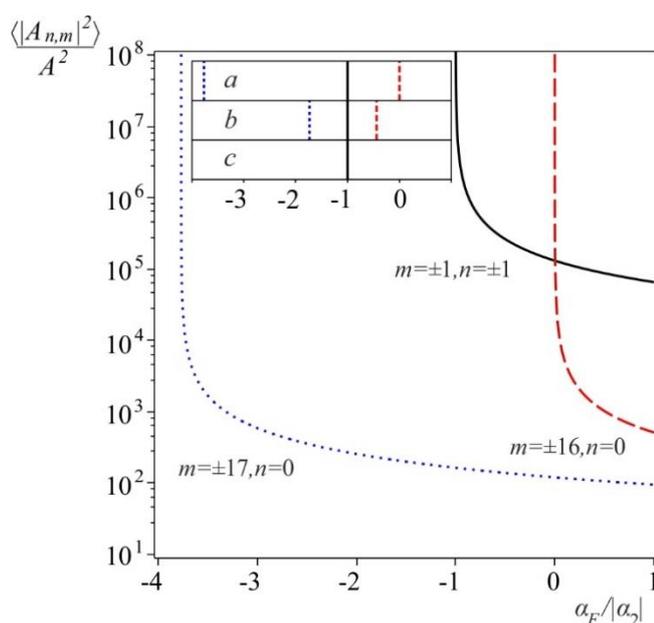


Рисунок 2.3 – Зависимости приведенных амплитуд среднеквадратичных флуктуаций критических мод ТЛМ от отношения $\alpha_F / |\alpha_2|$. Красная линия – моды с $m=\pm 16, n=0$, синяя линия – моды с $m=\pm 17, n=0$, черная линия – моды с $m=\pm 1, n=\pm 1$. На вставке изображены положения точек потери устойчивости, соответствующих представленным критическим модам, для ТЛМ с немного различающимися отношениями длины к радиусу а) $L/r = 2\pi \cdot 16$; б) $L/r = 2\pi \cdot 16.33$; в) $L/r = 2\pi \cdot \sqrt{16 \cdot 17}$. В последнем случае ТЛМ одновременно теряет устойчивость относительно обеих мод гофрировки ($m=\pm 16, m=\pm 17$) и изгибной моды в точке $\alpha_F / |\alpha_2| = -1$

С другой стороны, проведенный в разделе 2.3 анализ определяет границу устойчивости везикулы, как $\Delta P_{ins}^{Ves} = -12\kappa/R^3$. Поскольку для ТЛМ выполняется соотношение $\alpha_2 \leq \alpha_1 \leq 0$, мы можем использовать для верхней оценки устойчивости композитной системы значение $\alpha_F^{ins} = \alpha_2 = -(2\pi r/L)^2$:

$$\frac{12\kappa}{R^3} \geq \frac{(2\pi r/L)^2 \kappa}{r^2 R}. \quad (2.46)$$

Упрощая неравенство (2.46), получаем:

$$\frac{L}{R} \geq \frac{\pi}{\sqrt{3}} \quad (2.47)$$

То есть, когда длина липидной трубки примерно в два раза больше радиуса везикулы, последняя теряет устойчивость позже, чем ТЛМ. Таким образом, экспериментальное исследование критического поведения ТЛМ, которая подвергнута осевому сжатию возможно, однако должно проводиться над достаточно длинными липидными трубками.

Одним из наиболее физиологически релевантных случаев является ТЛМ, существующая без приложения каких-либо внешних механических сил. Рассмотрим среднеквадратичные флуктуации радиуса такой трубки при $\alpha_F = 0$ (в этой точке $\alpha_C = 1$). Как было продемонстрировано ранее в постановке задачи с периодическими граничными условиями, в трубке, длина которой удовлетворяет условию $L = 2\pi r \cdot m$, мода гофрировки ($n=0$, $k_m^2 r^2 \approx 1$) вырождается в точке $\alpha_F = 0$ и потеря устойчивости цилиндрической фазы происходит сразу же после выключения растягивающей силы. В этом случае анализ, проведенный с использованием квадратичной энергии (2.41), теряет свою актуальность, и система требует более детального рассмотрения, выходящего за рамки данной работы. Однако, если отношение длины трубки к ее периметру отлично от целого числа более чем на 10%:

$$\frac{L/(2\pi r) - \text{round}(L/(2\pi r))}{\text{round}(L/(2\pi r))} > 0.1, \quad (2.48)$$

величина среднеквадратичных флуктуаций радиуса слабо зависит от отношения L/r . Так, для ТЛМ с отношением $L/r = 100$ и изгибной жесткостью $\kappa \approx 12k_B T$ [9] эта величина составляет порядка 700-800% от равновесного значения радиуса. Причем, главный вклад в среднеквадратичное отклонение, составляющий порядка 600%, дает четырехкратно вырожденная изгибная мода ($n = \pm 1$ и $m = \pm 1$). Таким образом, данную моду можно наблюдать в свободной от внешних механических сил ТЛМ экспериментально. Вклад моды гофрировки с $n=0$ и $k_m^2 r^2 \approx 1$, в свою очередь, не превышает вклада всех остальных мод (за исключением упомянутой моды прогиба), и, экспериментальное наблюдение данной моды затруднено.

В данном разделе была построена модель вытянутой из везикулы липидной трубки, обладающей ненулевой кривизной бислоя и находящейся под действием перепада давления. Проведенное в гармоническом приближении исследование модели показало, что равновесие композитной системы ТЛМ-везикула описывается кривой $\alpha_F \approx 2 - 2\alpha_C + \gamma(1 - \alpha_C^2)$, лежащей в плоскости параметров $\langle \alpha_F, \alpha_C \rangle$, где α_F – нормализованная осевая сила, приложенная к ТЛМ, α_C – нормализованная собственная кривизна материала трубки. Было продемонстрировано, что для рассматриваемой системы вклад перепада давления в свободную энергию является величиной следующего порядка малости по сравнению с вкладом энергии поверхностного натяжения. Анализ показал, что липидная трубка, собственная кривизна бислоя которой совпадает с ее фактической кривизной, устойчива и без приложения внешней растягивающей силы, однако такая ТЛМ находится вблизи критической точки и даже небольшой сжимающей силы достаточно для ее дестабилизации. В окрестности этой точки сразу два типа мод с различной симметрией становятся мягкими, а именно: мода гофрировки с периодом порядка периметра ТЛМ и мода изгиба с периметром, равным длине ТЛМ. Это приводит к тому, что липидная трубка подвергается существенным тепловым флуктуациям. Мягкость изгибных мод, по всей видимости, является причиной неправильной формы мембран, наблюдаемой как *in vivo* так и *in vitro*.

3 КРИТИЧЕСКОЕ И ЗАКРИТИЧЕСКОЕ ПОВЕДЕНИЕ ТЛМ

Как было показано в предыдущем разделе диссертации, соединенные с везикулой липидные трубки, собственная кривизна мембраны которых совпадает с их фактической кривизной, могут существовать и без приложения стабилизирующей растягивающей силы. В данном разделе подробно исследуется критическое и закритическое поведение ТЛМ, находящейся под действием слабой сжимающей силы, приложенной вдоль главной оси симметрии трубки. Показано, что процесс потери устойчивости ТЛМ существенно сложнее, чем классическая эйлерова неустойчивость стержней и пластинок [91]. Изменение формы ТЛМ рассматривается, как два последовательных фазовых перехода второго рода с амплитудами критических мод смещений, выступающими в качестве параметров порядка. При помощи формализма теории фазовых переходов Ландау установлено, что возникающая в системе неустойчивость приводит к хиральному изгибу липидной трубки, за которым следует появление гофрировки. Основные результаты исследования представлены в [А3].

3.1 Критическое поле смещений и голдстоуновские переменные

В предыдущем разделе диссертации в рамках гармонического приближения развиваемой теории ТЛМ, вытянутой из везикулы, были определены критические моды системы и построена ее область устойчивости на плоскости контролирующих параметров: нормализованной силы и кривизны поверхности (см. рис. 2.2). Однако, в рамках квадратичной энергии (2.41) невозможно подробно проанализировать развитие неустойчивости липидной трубки в области отрицательных значений α_F . Ясно, что критические моды могут нелинейно взаимодействовать друг с другом, и появление гофрировки может уменьшить, либо, наоборот, увеличить силу, необходимую для появления изгиба ТЛМ. Кроме того, на основании квадратичной энергии (2.41) невозможно определить происходит ли фазовое превращение скачком, либо протекает непрерывно, как фазовый переход второго рода. Для

проведения такого анализа нужно учитывать члены разложения свободной энергии более высоких порядков. Учесть все старшие члены, соответствующие вкладам различных мод, пусть даже ограничив степень разложения, крайне сложно. Поэтому, далее мы воспользуемся стандартной для теории фазовых переходов идеей и вместо полной энергии ТЛМ будем рассматривать ее разложение, аналогичное потенциалу Л.Д. Ландау [92]. То есть, мы будем учитывать лишь критические моды, так как согласно идее Ландау, в окрестности фазового перехода именно они дают основной вклад в энергию системы.

Как уже упоминалось ранее, при специфических длинах трубки $L = 2\pi r \sqrt{m^2 + m}$ прогиб трубки и ее гофрировка с волновыми числами m и $m+1$ происходят одновременно при величине нормализованной силы $\alpha_F = \alpha_2$ (см. подраздел 2.5). Однако, интересно проанализировать более общий случай, когда неустойчивость развивается по этапам, первый из которых – гофрировка ТЛМ с волновым числом $m_0 = \text{round}(L/(2\pi r))$. Для большей наглядности в проводимом анализе мы ограничимся минимальным набором критических мод, и гофрировку с волновым вектором $|m|=m_0+1$, происходящую после прогиба (см. рис. 2.3), учитывать не будем.

Так как рассматриваемые критические моды вырождены (четырекратно вырожденная мода прогиба с $n=\pm 1$, $m=\pm 1$ и двукратно вырожденная мода гофрировки с $n=0$, $k_m^2 r^2 \approx 1$), то соответствующий потенциал Ландау – функционал шести комплексных амплитуд. Поле смещений (2.18) является действительным, а, следовательно, все комплексные амплитуды должны удовлетворять равенству $A_{n,m} = (A_{-n,-m})^*$. Чтобы записать в действительном виде потенциал Ландау для ТЛМ переопределим критические комплексные амплитуды как:

$$\begin{aligned} A_{0,m_0} &= r a \exp(i\theta_0) / 2, \\ A_{1,1} &= r b_1 \exp(i\theta_1) / 2, \\ A_{1,-1} &= r b_2 \exp(i\theta_2) / 2. \end{aligned} \tag{3.1}$$

В выражении (3.1) a , b_1 и b_2 – безразмерные действительные амплитуды, а переменные θ_i являются действительными фазами. Критическая часть поля смещений (2.18) может быть записана как:

$$u(\phi, z) = r \left[a \cos\left(\frac{2\pi m_0}{L} z + \theta_0\right) + b_1 \cos\left(\frac{2\pi}{L} z + \phi + \theta_1\right) + b_2 \cos\left(\frac{2\pi}{L} z - \phi + \theta_2\right) \right] \quad (3.2)$$

Теперь введем следующую линейную комбинацию фаз θ_i :

$$\phi_0 = (\theta_1 - \theta_2)/2, z_0 = -\frac{L(\theta_1 + \theta_2)}{4\pi}, z_1 = \frac{L(m_0(\theta_1 + \theta_2) - 2\theta_0)}{4\pi m_0} \quad (3.3)$$

Тогда выражение (3.2) примет форму (3.4), из которой хорошо видно, что введенные линейные комбинации ϕ_0 и z_0 соответствуют однородному вращению поля смещений вокруг главной оси симметрии липидной трубки и его смещению как целого вдоль этой оси, соответственно.

$$u(\phi, z) = r \left[\begin{array}{l} a \cos\left(\frac{2\pi m_0}{L} (z - z_0 - z_1)\right) \\ + b_1 \cos\left(\phi + \phi_0 - \frac{2\pi}{L} (z - z_0)\right) \\ + b_2 \cos\left(-\phi + \phi_0 + \frac{2\pi}{L} (z - z_0)\right) \end{array} \right] \quad (3.4)$$

Следовательно, энергия системы, как функция рассматриваемого критического поля смещений, не зависит от этих голдстоуновских переменных. Оставшаяся фазовая переменная z_1 соответствует сдвигу гофрировки относительно изгиба ТЛМ.

3.2 Свойства разложения энергии типа потенциала Ландау

Для того чтобы установить, насколько существенным является влияние фазовой переменной z_1 на энергию системы, воспользуемся рядом известных свойств потенциалов Ландау [92]. В свободной энергии Ландау каждый член представляет собой инвариант относительно группы симметрии высокосимметричной фазы. В случае ТЛМ – это группа симметрии бесконечного

цилиндра $\overline{m\overline{m}m}$. Построение потенциала Ландау существенно упрощается при переходе к формально комплексному виду, в котором каждый член n -ого порядка представляет собой произведение амплитуд критических мод. Каждому такому произведению соответствует замкнутая ломанная, составленная из волновых векторов n гармоник, входящих в его состав [92], что гарантирует трансляционную инвариантность полученной свободной энергии. Поскольку в данной работе мы учитываем как вращательную, так и трансляционную симметрию цилиндрической фазы, построение инвариантов из комплексных амплитуд $A_{n,m}$ критических мод в соответствии с упомянутым принципом приводит к тому, что простейший член, не зависящий от z_l имеет следующий вид:

$$F_L(z_1) = (A_{1,1}A_{-1,1})^{m_0/l} (A_{0,-m_0})^{2/l} + (A_{-1,-1}A_{1,-1})^{m_0/l} (A_{0,m_0})^{2/l} \quad (3.5)$$

где $l=1$ если m_0 – четное число, и $l=2$ если m_0 – нечетное. В комплексной форме инвариантность (3.5) относительно фазовой переменной z_l неочевидна, однако в этом можно убедиться, перейдя к действительному виду при помощи подстановки выражений (3.1) в уравнение (3.5):

$$F_L(z_1) = \left(\frac{r}{2}\right)^{(m_0+2)/l} a^{2/l} (b_1 b_2)^{m_0/l} \cos((m_0(\phi_1 + \phi_2) - 2\phi_0)/l) \quad (3.6)$$

Таким образом, первый член, зависящий от фазовой переменной z_l , имеет степень $(m_0+2)/l$. Это связано с тем, что критическая волна гофрировки осциллирует гораздо чаще, чем критическая волна изгиба, период которой всегда равен L . В липидной трубке с соотношением $L/r \approx 100$ (см. рис. 2.3) волновое число критической моды гофрировки $m_0=16$, а, следовательно, ее длина волны в 16 раз короче длины волны изгибной моды. Для такой ТЛМ наименьшая степень членов потенциала Ландау, зависящих от z_l , равна 10. По понятным причинам рассмотрение членов столь высокого порядка не имеет смысла в рамках развиваемой полу-качественной модели.

Подставляя (3.4) в (2.23) и используя любую программу для аналитических вычислений, можно легко получить разложения энергии эквивалентные

потенциалам Ландау. Как и следует из общих соображений об инвариантности таких потенциалов [92], они оказываются четными функциями каждой из безразмерных амплитуд a , b_1 и b_2 и не зависят ни от одного из трех рассмотренных переменных фазового типа. Несмотря на то, что мы учитываем только критические моды, получаемые разложения весьма громоздки, поэтому мы ограничились анализом потенциалов 4-й и 6-й степени. Численное исследование показало, что при малых значениях управляющего параметра α_F развитие неустойчивости, описываемое потенциалом 4-й и 6-й степени качественно не отличается. Сначала путем фазового перехода второго рода в точке $\alpha_F = \alpha_1$ (см. подраздел 2.5) происходит гофрировка. Затем минимальное увеличение сжимающей силы приводит к следующему переходу второго рода, в результате которого ТЛМ прогибается. Второй переход происходит гораздо раньше точки $\alpha_F = \alpha_2$ (см. подраздел 2.5). В следующем подразделе будет продемонстрировано, что это связано с сильным нелинейным взаимодействием мод гофрировки и прогиба, которое уменьшает свободную энергию системы.

3.3 Возможные в системе низкосимметричные фазы и минимальный потенциал Ландау.

Перейдем к более подробному рассмотрению набора низкосимметричных фаз, описываемых потенциалами 4-й и 6-й степени. После первого фазового перехода система оказывается в фазе $\langle |a|=a(\alpha_F), b_1=0, b_2=0 \rangle$. Затем второй фазовый переход переводит систему в хиральную фазу $\langle |a|=a(\alpha_F), |b_1|=b(\alpha_F), b_2=0 \rangle$ (решение уравнения состояния $\langle |a|=a(\alpha_F), b_1=0, |b_2|=b(\alpha_F) \rangle$ обладает той же энергией, но представляет собой ТЛМ, закручивающуюся в противоположную сторону). Для обоих потенциалов 4-й и 6-й степени ахиральное решение $\langle |a|=a(\alpha), b_1=b(\alpha_F), |b_2|=b(\alpha_F) \rangle$ оказывается неустойчивым. На рисунке 3.1 показаны возможные фазовые состояния сжатой ТЛМ.

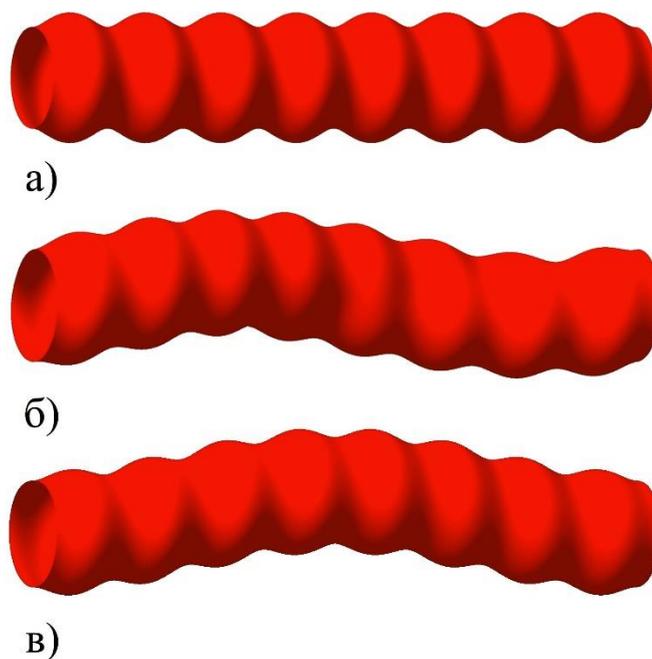


Рисунок 3.1 – Возможные низкосимметричные решения уравнения состояния трубчатой липидной мембраны с ненулевой спонтанной кривизной липидного бислоя, соответствующие различным величинам сжимающей силы:

- а) гофрированная фаза $\langle |a|=a(\alpha), b_1=0, b_2=0 \rangle$; б) гофрированная изогнутая хиральная фаза $\langle |a|=a(\alpha), |b_1|=b(\alpha), b_2=0 \rangle$; в) гофрированная изогнутая ахиральная фаза $\langle |a|=a(\alpha), |b_1|=|b_2|=b(\alpha) \rangle$

Поскольку в предложенной модели ахиральное решение вне зависимости от степени разложения энергии критического поля смещений всегда оказывается неустойчивым, то для более подробного исследования последовательности фазовых переходов потенциал можно упростить, положив в критическом поле смещений (3.4) $b_1=b$ и $b_2=0$. Также учитывая, что согласно численным оценкам при малых α_F потенциалы 4-ой и 6-ой степени оказываются практически эквивалентными, мы можем ограничить разложение членами четвертого порядка малости по амплитудам критических мод смещений. В итоге получаем простейший потенциал Ландау, описывающий критическое поведение данной системы:

$$F^{(4)} = \frac{\pi\kappa}{32\gamma} (16F_{2,0}a^2 + 64F_{0,2}b^2 + 4F_{2,2}a^2b^2 + F_{4,0}a^4 + F_{0,4}b^4) \quad (3.7)$$

В многочлене (3.7) коэффициенты $F_{i,j}$ – функции переменной α_F (нормализованная осевая сила):

$$\begin{aligned}
 F_{2,0} &= \alpha + \alpha\delta + \delta^2, \\
 F_{0,2} &= \pi^2\gamma^2(\alpha + 4\pi^2\gamma^2), \\
 F_{2,2} &= 3\delta - \delta^2 - 2\alpha(1 + \delta) + 4\pi^2\gamma^2(3 - (1 + \delta)(5\delta + 4\alpha + 20\pi^2\gamma^2)) - 1, \\
 F_{4,0} &= 11 - 10\delta - 19\delta^2 - 4\alpha(1 + \delta)^2, \\
 F_{0,4} &= (1 + 4\pi^2\gamma^2)(11 - 4\pi^2\gamma^2(40\pi^2\gamma^2 + 4\alpha + 9)),
 \end{aligned} \tag{3.8}$$

В выражениях (3.8), как и ранее, введенный малый параметр γ равен отношению радиуса липидной трубки к ее длине $\gamma = r/L$, а малый параметр δ задается выражением $\delta = k_m^2 r^2 - 1$. Потенциал (3.7) – стандартный потенциал теории Ландау с двумя параметрами порядка (ПП) (здесь роль ПП выполняют безразмерные амплитуды критических мод a и b), описывающий два взаимодействующих фазовых перехода второго рода. С уменьшением параметра α_F (или, другими словами, при увеличении сжимающей ТЛМ силы) сначала становится отрицательным член $F_{2,0}$. В точке, где $F_{2,0}=0$, и $\alpha_F = \alpha_1$, происходит первый фазовый переход второго рода, приводящий к возникновению гофрировки (см. рис. 3.2). После перехода амплитуду a в выражении (3.4) можно рассчитать как

$$a = \sqrt{-\frac{F_{2,0}}{2F_{4,0}}} \approx \sqrt{\frac{8(1 + \delta)}{10\delta + 15\delta^2 + 6\delta^3 - 11}} (\alpha_F - \alpha_1) \tag{3.9}$$

Поскольку член $F_{2,2}$ существенно отрицателен, нелинейное биквадратное взаимодействие между параметрами порядка уменьшает свободную энергию системы. Как следствие, второй фазовый переход, связанный с изгибом ТЛМ, происходит существенно раньше, в точке, где в ноль обращается величина $F_{0,2} + a^2 F_{2,2}$. Таким образом, для нахождения точки второго перехода нужно решить относительно α_F следующее уравнение:

$$2F_{0,2}F_{4,0} - F_{2,2}F_{2,0} = 0 \tag{3.10}$$

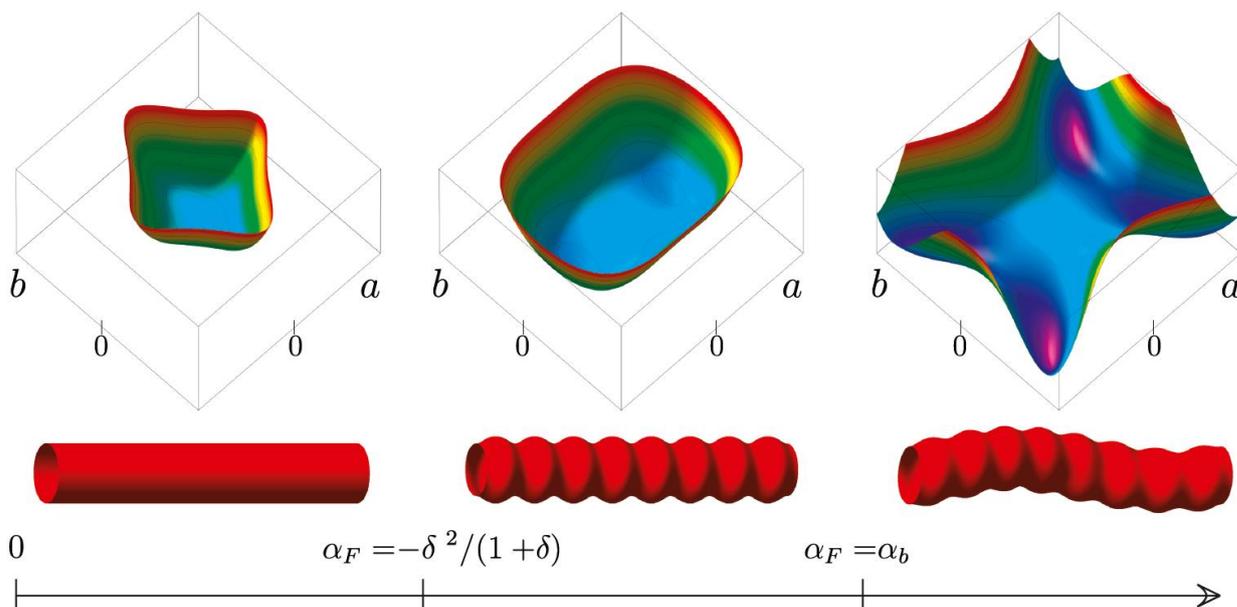


Рисунок 3.2 – Развитие неустойчивости в ТЛМ как последовательность двух фазовых переходов второго рода. Увеличение сжимающей силы приводит к гофрировке, а затем к хиральному изгибу ТЛМ. Энергия системы задается потенциалом Ландау с двумя критическими параметрами порядка a и b , являющимися амплитудами критических мод гофрировки и изгиба, соответственно

Точное решение уравнения (3.10) – весьма громоздкое, однако интересующий нас корень хорошо разлагается в ряд по введенным ранее малым параметрам γ и δ . Разложение четвертой степени для данного решения имеет простой вид:

$$\alpha_b = -\delta^2 + \delta^3 - (88\pi^4\gamma^4 - 22\pi^2\gamma^2\delta^2 + \delta^4), \quad (3.11)$$

где величина в круглых скобках соответствует дополнительному сжатию ТЛМ, необходимому для того, чтобы вызвать второй переход второго рода и изогнуть ТЛМ (см. рис. 3.2). Выражение (3.11) хорошо показывает близость двух переходов, так как величина в круглых скобках имеет четвертый порядок по малым параметрам γ и δ .

Проведем численную оценку положения точек фазовых переходов. Рассмотрим трубки, фигурировавшие при построении рисунка 2.3 (подраздел 2.5). Так, для трубки с $\gamma^{-1} = 100$ гофрировка происходит в точке $\alpha_1 \approx -1.122 \cdot 10^{-4}$; член $F_{0,2}$ обращается в ноль в точке $\alpha_2 \approx -3.948 \cdot 10^{-2}$, однако изгиб трубки ввиду нелинейного взаимодействия мод происходит существенно раньше в точке $\alpha_b \approx -1.956 \cdot 10^{-4}$. Для трубки с $\gamma^{-1} = 2\pi \cdot 16.33$ координаты этих точек $\alpha_1 \approx -1.167 \cdot 10^{-3}$, $\alpha_2 \approx -3.75 \cdot 10^{-3}$ и $\alpha_b \approx -1.708 \cdot 10^{-3}$. Заметим, что расчет точки второго фазового перехода по приближенной формуле (3.11) в обоих случаях сдвигает координату точки α_b не более чем на 0.125% по сравнению с (3.10).

Теперь рассмотрим, как влияет на положения критических точек использование потенциала Ландау более высокого порядка. В случае потенциала 6-й степени позиции критических точек сдвигаются всего на 0.01% относительно положений, задаваемых потенциалом 4-й степени. Очевидно, что столь малые поправки не играют существенной роли в развиваемой в данной работе полукачественной модели.

Таким образом, в данной главе диссертации было исследовано критическое и слабозакритическое поведение ТЛМ, вытянутой из везикулы и подверженной действию сжимающей осевой силы. Потеря устойчивости цилиндрической фазы ТЛМ была рассмотрена, как последовательность из двух фазовых переходов второго рода со взаимодействующими параметрами порядка. Установлено, что форма деформированной ТЛМ сочетает в себе гофрировку с периодом близким к периметру трубки и хиральный изгиб с периодом равным ее длине, впервые обсуждаемый для подобного рода систем. Показано, что из-за нелинейного взаимодействия параметров порядка, роль которых в используемом формализме играют амплитуды критических мод смещений, гофрировка ТЛМ возникает гораздо раньше, чем это предсказывает гармоническая теория (см. раздел 2).

Несмотря на то, что низкосимметричные фазы ТЛМ напоминают ранние стадии известной неустойчивости типа перлинг (pearling instability), также

наблюдаемой в ТЛМ [93, 94] или варикозной неустойчивости (*varicose instability*) [95], характерной для артерий, физические причины, ведущие к развитию особенностей формы этих систем, – различны. В отличие от исследованной в данной работе гофрировки, перлинг возникает в ходе растяжения ТЛМ потоком жидкости [93, 94], а деформации варикозного типа возникают в системах обладающих сдвиговой упругостью, и, следовательно, качественно отличающихся от липидных мембран [95].

4 ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ НА ПОВЕРХНОСТИ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ

Трубчатые липидные мембраны часто используются экспериментаторами для исследования свойств индуцирующих кривизну белков и функций, которые они выполняют в клетке. В настоящем разделе диссертации разрабатывается модель такой ТЛМ с адсорбированными на ее поверхности белковыми молекулами. Индуцирующие кривизну липидного бислоя белки способны взаимодействовать друг с другом за счет создаваемых ими деформаций мембраны. Развиваемый подход моделирует воздействие белковых молекул на мембрану при помощи «силовых мультиполей», представляющих собой наборы точечных сил, приложенных по нормали к поверхности мембраны. Продемонстрировано, что для того чтобы придать мультиполю размеры сравнимые с размерами реальных белковых молекул, не нарушая при этом условий механического равновесия, достаточно набора из трех. В области устойчивости цилиндрической фазы ТЛМ радиус индуцированного деформацией мембраны взаимодействия между мультиполями составляет порядка периметра липидной трубки, в то время как вблизи критической точки он резко возрастает. Проводится сравнительный анализ полученных результатов с поведением реальных систем. Наблюдаемое экспериментально высокое сродство белковых молекул к концам ТЛМ, объясняется особенностями закрепления липидной трубки, также обсуждаются причины формирования белковых агрегатов на поверхности клеточных мембран. Основные результаты исследования представлены в [A1, A4].

4.1 Энергия ТЛМ, на поверхности которой адсорбированы молекулы индуцирующих кривизну белков

До настоящего момента мы рассматривали ТЛМ с однородной по всей поверхности собственной кривизной липидного бислоя, не связывая ее происхождение с каким-то конкретным механизмом (см. подразделы 1.2, 1.3). Как отмечалось ранее (см. подраздел 1.3), некоторые белки способны существенным

образом изменять форму мембран, участвующих в таких процессах как, например, эндоцитоз. При этом ключевым фактором зачастую является именно коллективное действие большого количества молекул белка.

Так молекулы белков, содержащие N-BAR домен, способны формировать белковые каркасы, служащие различным целям. При эндоцитозе они сжимают липидные трубки, соединяющие мембрану с везикулой, тем самым облегчая их разрушение молекулами динамина [96] или просто растягивающей силой [97]. Также такие каркасы контролируют кривизну мембраны при построении сложных мембранных систем, таких как T-трубочки и митохондрии [98, 99]. В лабораторных условиях липидные трубки, покрытые белками, были получены, а затем исследованы при помощи методов электронной микроскопии в работах [66, 67, 100]. Липидные трубки формировались преимущественно из сильно заряженных липосом в среде с очень высокой концентрацией белка. Несмотря на полученные данные о строении образующихся в таких условиях плотных белковых каркасов, остается неясным как происходит рост подобных структур, а также насколько результаты этих исследований применимы к живым клеткам, в которых концентрации белков значительно ниже. Для того чтобы попытаться ответить на эти вопросы необходимо понять: *«Каким образом могут взаимодействовать белковые молекулы, адсорбированные на поверхности липидного бислоя?»*

Очевидно, что образующие регулярные структуры типа двумерных молекулярных квазикристаллов белки способны взаимодействовать друг с другом за счет близкодействующих сил химического происхождения. С другой стороны, даже отдельные молекулы белка способны локально изменять состояние мембраны, однако область деформации липидной мембраны, возникающая в результате прикрепления белка, не может быть сильно локализована, так как при этом появится энергетически невыгодный участок мембраны с очень большой средней кривизной [101 – 103]. Таким образом, между индуцирующими собственную кривизну липидного бислоя белками должны

действовать еще и далекодействующие механические силы, переносчиком которых является мембрана.

Мы опускаем электростатические силы, действующие между молекулами белка непосредственно, и рассматриваем ситуацию, в которой концентрация адсорбированных молекул еще недостаточна для образования экзоскелета, покрывающего ТЛМ и кардинально изменяющего ее механические свойства. Как и в разделе 3 мы пренебрегаем перепадом давления и рассматриваем липидную трубку, свободная энергия которой задается выражением (2.39), а состояние однозначно определяется единственным управляющим параметром – нормализованной силой α_F .

Как уже упоминалось в подразделе 1.3 адсорбируемые белковые молекулы взаимодействуют с ТЛМ весьма сложным образом, зависящим от множества факторов [9, 61, 65, 104, A1]. Построение микроскопической модели подобной комплексной системы является весьма непростой задачей, поэтому для описания взаимодействия белков с ТЛМ мы вводим некоторое феноменологическое поле поверхностной плотности радиальных сил, действующих на мембрану со стороны адсорбированных молекул. Обозначим поверхностную плотность данного поля как $\Pi(\phi, z)$. Вследствие этого воздействия цилиндрическая форма, удовлетворяющая необходимым условиям равновесия (2.40), деформируется. Форму деформированной мембраны параметризуем тем же образом, что и в разделах 2 и 3 (параметризация (2.7)), тогда, чтобы учесть потенциал введенного поля сил, связанного с действием белковых молекул, мы должны включить в свободную энергию системы член следующего вида (по аналогии с членом $-FL$ в выражениях (2.3) (2.39)):

$$\Delta\Phi^{(1)} = -\int u_r(\phi, z)\Pi(\phi, z)dS. \quad (4.1)$$

Очевидно, что деформация, вызываемая белками, приводит к повышению энергии мембраны. В то же время адсорбция индуцирующих кривизну белков на поверхность клеточной мембраны – энергетически выгодный процесс (иначе они не могли бы выполнять свои функции). Это связано с тем, что белки

взаимодействуют с липидами бислоя, образуя химические связи. Чтобы учесть соответствующий выигрыш в свободной энергии системы ТЛМ-белки, введем член $\Delta\Phi_{chem}$. Для упрощения будем считать, что энергия химического взаимодействия $\Delta\Phi_{chem}$ – отрицательная величина, пропорциональная числу протеинов N и не зависящая ни от места прикрепления белков, ни от внешних параметров системы. При этом она по абсолютному значению должна быть больше энергии деформации мембраны (индуцируемой полем $\Pi(\phi, z)$), в противном случае произойдет десорбция белков.

Поскольку в данном разделе диссертации мы рассматриваем липидную трубку, которая находится в цилиндрической фазе и считаем возникающие деформации небольшими (действительно, отдельные молекулы белка не могут существенно деформировать мембрану), то как и в разделе 2 мы воспользуемся разложением энергии системы до членов второго порядка малости по смещениям $u_r(\phi, z)$ и их производным. При этом разложение поверхностной плотности поля сил $\Pi(\phi, z)$ выполним аналогичным с (2.18) образом, соответствующим задаче с периодическими граничными условиями:

$$\Pi(\phi, z) = \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} \Pi_{n,m} \exp(i(n\phi + k_m z)), \quad (4.2)$$

В результате получим:

$$\Delta\Phi = \Delta\Phi^{(0)} + E_d - 2\pi r L \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} \Pi_{n,m}^* A_{n,m}, \quad (4.3)$$

где член E_d полностью аналогичен выражению (2.41) с матрицей коэффициентов (2.42). Область применимости выражения (4.3) совпадает с областью устойчивости цилиндрической фазы и находится в интервале значений $\alpha_F \in [\sim 0..2]$ (см. подраздел 2.5). Заметим, однако, что ТЛМ, на которую не действует внешняя растягивающая сила ($\alpha_F = 0$), должна обладать высоким значением спонтанной кривизны C_0 , что в реальных экспериментах зачастую осуществляется уже после формирования белкового каркаса [9, 61, 67, 105], который качественно изменяет механические

свойства липидной трубки. Поэтому при малых положительных α_F разложение (4.3) может стать неадекватным.

Минимизация (4.3) по отношению к амплитудам поля деформаций позволяет получить следующую связь между коэффициентами $A_{n,m}$ и $\Pi_{n,m}$:

$$A_{n,m} = \frac{r^4}{k} \frac{\Pi_{n,m}}{M_{n,m}}, \quad (4.4)$$

откуда:

$$E_d = \frac{\pi L r^5}{k} \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} \frac{\Pi_{nm} \Pi_{nm}^*}{M_{n,m}}. \quad (4.5)$$

Комплексные амплитуды разложения поля радиальных сил $\Pi_{n,m}$ зависят от числа адсорбированных белков N и их координат (ϕ_i, z_i) . Как следствие, и величины амплитуд поля смещений $A_{n,m}$ (4.4), и энергия деформации E_d (4.5) также являются функциями этих переменных. Тогда минимизация выражения (4.5) по координатам адсорбированных молекул белка должна задавать их равновесное положение на поверхности ТЛМ.

До сих пор мы проводили все рассуждения в весьма общем виде, однако для получения результатов, описывающих поведение реальных биологических систем, необходимо ввести ряд допущений, позволяющих упростить использование выражения (4.5):

1. белки воздействуют на ТЛМ аддитивно, и суммарное поле сил может быть представлено просто как сумма полей, создаваемых отдельными молекулами белка (вообще говоря, данное приближение накладывается автоматически, поскольку мы работаем в рамках квадратичной энергии);
2. ориентация белков на поверхности ТЛМ не изменяется (согласно имеющимся данным о структуре ряда белков, содержащих в своем составе N-BAR домен, имеющий серпообразную форму, и их ориентации на поверхности ТЛМ [66 – 70], а также данным, полученным методами молекулярной динамики [106], молекулы этих белков при адсорбции ориентируются перпендикулярно главной оси липидной трубки)

Математически первое приближение выражается как

$$\Pi(\phi, z) = \sum_{i=1}^N \Pi^i(\phi, z, \phi_i, z_i). \quad (4.6)$$

Второе приближение позволяет считать воздействия, оказываемые молекулами, прикрепленными в разных точках мембраны, эквивалентными друг другу. Математически его можно выразить в виде:

$$\Pi^i(\phi - \phi_i, z - z_i) = \Pi^j(\phi - \phi_j, z - z_j) \quad (4.7)$$

В случае периодических граничных условий равенство (4.7) ведет к следующей связи между коэффициентами разложения:

$$\Pi_{n,m}^j = \exp[-i(n(\phi_i - \phi_j) + k_m(z_i - z_j))] \Pi_{n,m}^i. \quad (4.8)$$

Тогда энергия индуцированного мембраной «механического» взаимодействия двух молекул, адсорбированных на ТЛМ в точках (ϕ_i, z_i) и (ϕ_j, z_j) , принимает вид:

$$E_d = \frac{\pi L r^5}{\kappa} \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} \frac{2\Pi_{nm}^i (\Pi_{nm}^i)^* \left(\cos\left(n\Delta\phi + \frac{2\pi m \Delta z}{L}\right) + 1 \right)}{M_{n,m}}, \quad (4.9)$$

где $\Delta\phi = \phi_i - \phi_j$ – угловое расстояние между центрами полей деформации, создаваемых каждым белком, $\Delta z = z_i - z_j$ – тоже самое, но вдоль главной оси ТЛМ.

Еще раз подчеркнем, что поскольку разложение энергии (4.3) является квадратичным, энергия «механического» взаимодействия N молекул состоит исключительно из парных взаимодействий вида (4.9). Тот факт, что произведение $\Pi_{n,m}^i (\Pi_{n,m}^i)^*$ не зависит от положения адсорбированных белков на поверхности мембраны, существенным образом упрощает использование выражения (4.9).

Более того, коэффициенты $\Pi_{n,m}^i$ можно переписать как

$$\Pi_{n,m}^i(\phi_i, z_i) = \Pi_{n,m}^0 \exp(i(n\phi_i + k_m z_i)), \quad (4.10)$$

где $\Pi_{n,m}^0$ – амплитуды разложения поля плотности сил, генерируемого белком, с центром в точке $(\phi = 0, z = 0)$, тогда выражение (4.9) примет вид (4.11).

$$E_d = \frac{\pi L r^5}{\kappa} \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} \frac{2\Pi_{nm}^0 (\Pi_{nm}^0)^* \left(\cos\left(n\Delta\phi + \frac{2\pi m\Delta z}{L}\right) + 1 \right)}{M_{n,m}}, \quad (4.11)$$

В следующем разделе будут сконструированы несколько простых полей Π^0 , которые могут быть использованы для описания действия адсорбированных белков на липидную трубку и изучения белок-белковых взаимодействий, индуцированных ее деформацией.

4.2 Применение мультипольного подхода для исследования взаимодействий между белками, переносчиком которых является мембрана.

Наиболее простой способ ввести поле сил, аппроксимирующее действие индуцирующего кривизну белка на поверхность мембраны, – представить его как суперпозицию нескольких точечных сил F_i , приложенных к ТЛМ вдоль нормали к ее поверхности в пределах области локализации белковой молекулы. Согласно условиям механического равновесия, сумма этих сил и сумма создаваемых ими моментов должны равняться нулю. В самом простом случае таких сил две, они равны по величине и приложены к диаметрально противоположным точкам трубки. Поскольку радиус ТЛМ обычно составляет порядка нескольких десятков нанометров [9, 62, 67, 104, 107], очевидно, что расстояние между точками приложения силы намного больше размеров белковой молекулы [57, 66, 105, 108]. Несмотря на это, анализ данного случая, как простейшего, удовлетворяющего условиям механического равновесия, является полезным для наглядного представления модели. Коэффициенты разложения соответствующего поля поверхностной плотности сил записываются как

$$\Pi_{nm}^0 = \frac{F^0}{\pi r L} (\cos(\pi n) + 1). \quad (4.12)$$

Деформация мембраны, вызываемая действием рассматриваемой пары сил (которую мы будем называть «силовым диполем»), представлена на рисунке 4.1 (а). Зависимость энергии «механического» взаимодействия (4.9) двух таких силовых диполей от расстояния между их центрами $\{\Delta\phi, \Delta z\}$ изображена на рисунке 4.1 (д).

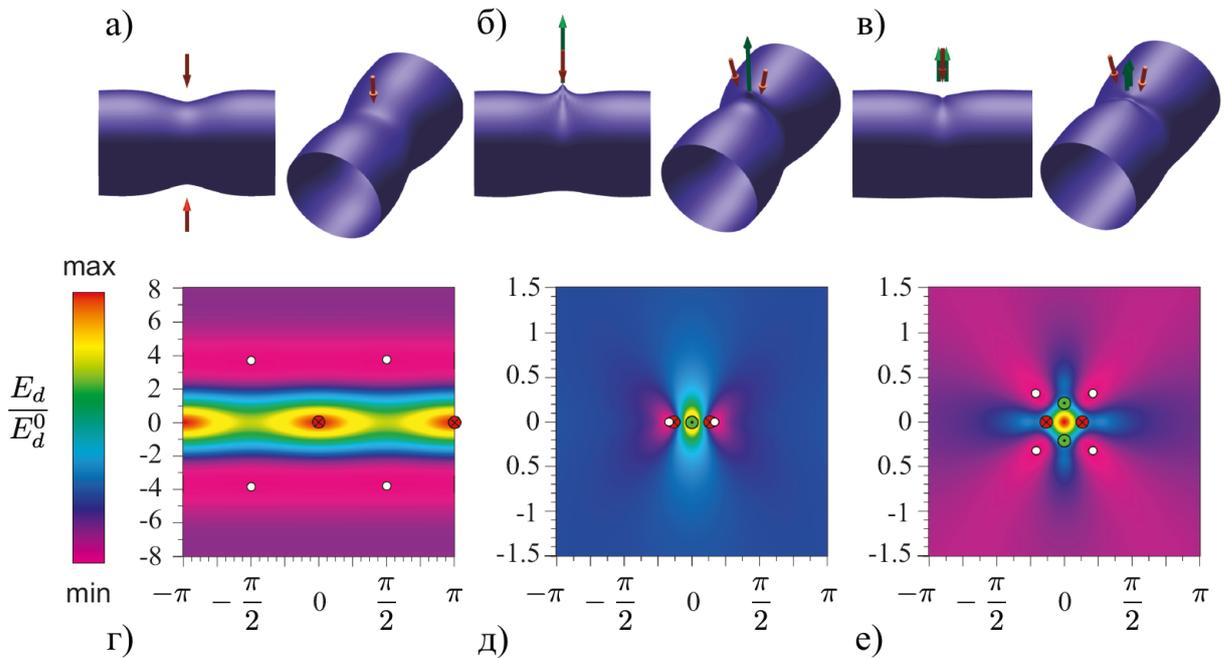


Рисунок 4.1 – Деформации ТЛМ, создаваемые силовыми мультиполями, и энергия парных взаимодействий между мультиполями. В верхнем ряду изображена форма ТЛМ, находящейся под воздействием мультиполей, моделирующих действие белковой молекулы на мембрану. Векторами зеленого цвета и зелеными кружками изображены силы, действующие в направлении нормали цилиндра, векторами красного цвета и перечеркнутыми красными кружками – в противоположном направлении. В нижнем ряду изображена энергия деформационного взаимодействия пары мультиполей, как функция расстояния $\{\Delta\phi, \Delta z\}$ между ними (один из мультиполей помещен в центр рисунка, а энергия является функцией положения второго). Минимумы энергии отмечены пустыми черными кружками. Представлены мультиполи: а),г) диполь, образованный парой диаметрально противоположных сил, $\min(E/E_d^0) \approx 0.86, \min(E/E_d^0) \approx 2.03$; б),д) триполь, образованный тремя силами, расположенными в сечении перпендикулярном оси ТЛМ, расстояние между силами $\Delta\phi_0 = \pi/15$, $\min(E/E_d^0) \approx 0.66, \min(E/E_d^0) \approx 2$; в),е) симметричный квадруполь, образованный силами, приложенными в точках $(\pm\pi/15, 0)$ и $(0, \pm\pi/15)$, $\min(E/E_d^0) \approx 0.88, \min(E/E_d^0) \approx 2$. Все изображения построены для ТЛМ с $L/r=100$ и $\alpha_F = 1$. Нормирующий множитель E_d^0 – энергия деформации ТЛМ, вызванная двумя невзаимодействующими мультиполями.

Вид энергетического ландшафта свидетельствует о том, что наиболее выгодным является расположение пары диполей под углом 90° друг к другу со смещением вдоль оси z на величину порядка 3.5 радиусов трубки $\Delta\phi_{\min} = \pi / 2, \Delta z_{\min} = 3.5r$.

Построенный энергетический профиль существенно отличается от такового, полученного ранее в рамках работы [86], где действие белковой молекулы аппроксимировалось при помощи единственной дельта-подобной функции давления. В рамках развиваемого в диссертации формализма соответствующую функцию плотности распределения сил можно определить с помощью следующих соотношений:

$$\Pi_{nm}^0 = 0, \text{ если } |n|=1 \text{ и } m=0; \text{ иначе } \Pi_{nm}^0 = \frac{F^0}{\pi r L}. \quad (4.13)$$

Заметим, что в работе [86] явный вид (4.13) был выбран исходя из простейшего соображения о том, что моды, соответствующие движению трубки как целого, тождественно обращают в ноль матрицу коэффициентов (2.42) и должны исключаться из рассмотрения. Фактически же давление (4.13) соответствует паре противодействующих сил, одна из которых нелокальна и распределена по всей поверхности трубки. Именно это и приводит к тому, что в модели [86] взаимодействие между белками распространяется на расстояния сопоставимые с длиной трубки L , а не с длиной ее периметра $2\pi r$, как это получается в развиваемом соискателем подходе.

Аналогичное простое возмущение было использовано в работе [109]. В ней рассматривается взаимодействие пары круговых филаментов, прикладываемых к мембране момент сил. Воздействие каждого из этих филаментов на мембрану можно представить как воздействие двух колец, разнесенных на расстояние Δz_0 , одно из которых однородно сжимает ТЛМ, а другое – растягивает с такой же по модулю силой. Обозначим отношение силы, с которой кольцо действует на

мембрану, к периметру ТЛМ как F_p^0 , тогда в развиваемом соискателем формализме действие кругового филамента можно описать следующим полем радиальных сил:

$$\Pi_{nm}^0 = \frac{F_p^0}{L} \sin\left(\frac{2\pi m}{L} \Delta z_0\right). \quad (4.14)$$

Проведенный соискателем анализ показал, что в общем случае относительное расположение филаментов, минимизирующее энергию системы, зависит как от радиуса ТЛМ r , так и от величины Δz_0 , которая фактически определяет ширину филамента, представленного дуплетом колец. Однако, стоит заметить, что, когда Δz_0 достигает предельного значения $\Delta z_0 \approx 0.2r$, дальнейшее уменьшение расстояния между кольцами, моделирующими филамент, практически не влияет на равновесное относительное расположение филаментов. Этот результат согласуется с результатами работы [21], в которой был рассмотрен предельный случай $\Delta z_0 \rightarrow 0$.

Чтобы сделать следующий шаг, рассмотрим ситуацию, когда силы, действующие на ТЛМ со стороны мультиполя, локализованы в области сопоставимой с размерами адсорбируемой белковой молекулы, которые обычно значительно меньше радиуса ТЛМ [57, 66, 105, 108]. В простейшем случае таких сил F_i должно быть, как минимум, три. Принимая во внимание вытянутую серпообразную форму N-BAR домена, а также то, что согласно экспериментальным данным протеины адсорбируются преимущественно поперек ТЛМ [66 – 70], расположим точки приложения силы в сечении перпендикулярном к оси трубки. Тогда, чтобы удовлетворялись условия равновесия, должны выполняться следующие соотношения:

$$\begin{aligned} F_1(\phi_0 = 0, z_0 = 0) &= 2F^0, \\ F_2(\phi_0 - \Delta\phi_0, z_0) &= -F^0 / \cos(\Delta\phi_0), \\ F_3(\phi_0 + \Delta\phi_0, z_0) &= -F^0 / \cos(\Delta\phi_0). \end{aligned} \quad (4.15)$$

Точки приложения сил, в выражении (4.15):

$$(\phi_1 = 0, z_1 = 0), (\phi_2 = -\Delta\phi_0, z_2 = 0), (\phi_3 = \Delta\phi_0, z_3 = 0), \quad (4.16)$$

В выражении (4.16) $\Delta\phi_0$ – угловое расстояние между точками приложения сил. Силы (4.15) создают радиальное поле $\Pi^0(\phi - \phi_0, z - z_0)$ (структура мультиполей подробно представлена на рисунке 4.2 на примере квадруполья, который будет рассмотрен ниже), коэффициенты разложения которого в ряд (4.6) не зависят от m и имеют вид:

$$\Pi_{n,m}^0 = \frac{F^0}{\pi r L} \left(1 - \frac{\cos(n\Delta\phi_0)}{\cos(\Delta\phi_0)} \right) \quad (4.17)$$

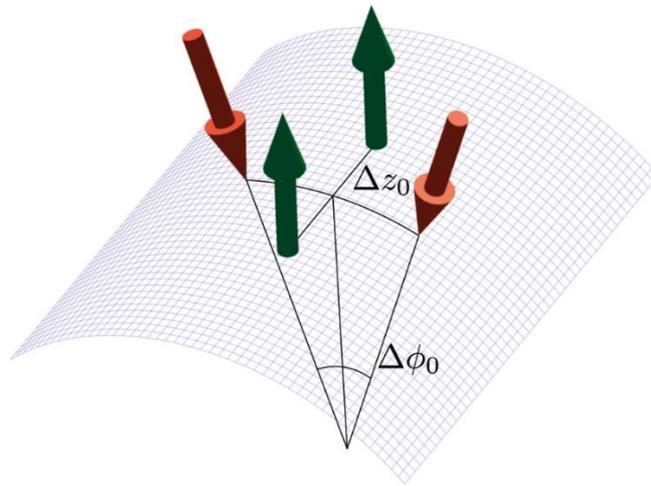


Рисунок 4.2 – Структура квадруполья. Силы, составляющие мультиполь, изображены стрелками, Δz_0 – расстояние вдоль оси ТЛМ, отсчитываемое от середины мультиполя, $\Delta\phi_0$ – угловое расстояние, отсчитываемое от середины мультиполя.

На рисунке 4.1 (б) показана деформация ТЛМ, вызванная силами (4.15). Видно, что деформация локализована сильнее, чем в случае диполя, однако все равно существенно выходит за пределы области прикрепления рассматриваемой гипотетической белковой молекулы. Энергия взаимодействия двух частиц, вызывающих такое поле деформации, изображена на рисунке 4.1 (е). Взаимодействие между триполями спадает быстрее, чем в случае силовых диполей (см. рис. 4.1 (д)). Минимумы энергии располагаются на угловом расстоянии порядка $\Delta\phi_{\min} \approx 1.25\Delta\phi_0$ (где для определенности $\Delta\phi_0 = \pi/15$) по обе стороны от центра

молекулы, находящейся в начале координат. Расстояние между минимумами энергии, отсчитываемое вдоль главной оси ТЛМ, равно нулю ($\Delta z_{\min} = 0$). Поскольку рассматриваемые мультиполи пересекаются в наиболее энергетически выгодной конфигурации, для моделирования самоорганизации подобных частиц требуется введение дополнительных отталкивающих потенциалов, как это было сделано в работах [102, 109, 110]. Простейший способ учесть конечные размеры белков в направлении перпендикулярном оси трубки – ввести минимально допустимое расстояние между молекулами. Стоит также отметить, что изменение угловых размеров мультиполя никак не влияет на их стремление занять позиции с одинаковым z .

Чтобы учесть протяженность белка в направлении оси z , достаточно заменить центральную, действующую в направлении нормали ТЛМ, силу парой сил (сонаправленных и с одинаковыми амплитудами F_0), разнесенных на расстояние Δz_0 вдоль оси трубки (см. рис. 4.2). Тогда, выбрав в качестве центра данного силового квадруполья середину между точками приложения этих сил и расположив его в точке ($\Delta\phi_0 = 0, \Delta z_0 = 0$), можно записать коэффициенты разложения соответствующего поля в виде:

$$\Pi_{n,m}^0 = \frac{F^0}{\pi r L} \left(\cos\left(\frac{2\pi n}{L} \Delta z_0\right) - \frac{\cos(n\Delta\phi_0)}{\cos(\Delta\phi_0)} \right) \quad (4.18)$$

Форма ТЛМ под действием этого квадрупольного воздействия изображена на рисунке 4.1 (в). Энергия взаимодействия двух таких квадрупольей обладает уже не двумя, а четырьмя симметрично расположенными минимумами. В показанном на рисунке 4.1 (в) случае точки приложения сил образуют правильный четырехугольник, лежащий на поверхности цилиндра, с координатами:

$$(\phi_1 = 0, z_1 = \Delta z_0), (\phi_2 = 0, z_2 = -\Delta z_0), (\phi_3 = \Delta\phi_0, z_3 = 0), (\phi_4 = -\Delta\phi_0, z_4 = 0), \quad (4.19)$$

В выражении (4.19) для определенности возьмем $\Delta\phi_0 = \pi/15, \Delta z_0 = r\Delta\phi_0$. При этом координаты энергетических минимумов взаимодействия двух таких квадрупольей также располагаются в вершинах правильного четырехугольника с координатами

$(\sim \pm 1.56\Delta\phi_0, 0), (0, \sim \pm 1.56\Delta z_0)$. Таким образом, равновесное расстояние между центрами квадруполей, отмеряемое в направлении перпендикулярном главной оси ТЛМ, оказывается меньше размеров квадруполя в этом направлении. В тоже время соседние квадруполи не перекрываются за счет некоторого разнесения их центров по z . Полученное расположение квадруполей напоминает расположение F-BAR белков семейства Тока (Toca family) в регулярных структурах, которые они формируют на поверхности липидных трубок. Согласно полученным при помощи криоэлектронной микроскопии данным белки этого семейства расположены таким образом, что молекулы имеют большую площадь контакта с соседями, а их центры разнесены в направлении перпендикулярном оси ТЛМ на расстояние порядка половины длины белка [66]. На рисунке 4.3 проводится аналогия между расположением мультиполей, полученным в рамках развиваемого соискателем подхода, и данными криоэлектронных исследований.

Относительное расположение двух квадруполей, полученное для рассмотренного случая, является достаточно общим. При уменьшении размеров мультиполя $\Delta\phi_0$ и Δz_0 происходит практически линейное уменьшение соответствующих равновесных расстояний между центрами мультиполей $\Delta\phi_{\min}, \Delta z_{\min}$. Однако, с увеличением размеров квадруполя цилиндрическая форма ТЛМ нарушает эту линейную зависимость. Так, например, в случае $\Delta\phi_0 = \pi/5, \Delta z_0 = r\Delta\phi_0$ минимумы энергии находятся в точках с координатами $(\sim \pm 1.225\Delta\phi_0, 0), (0, \sim \pm 2.05\Delta z_0)$. В тоже время независимо от размеров мультиполя деформация, создаваемая парой взаимодействующих гипотетических молекул белка, остается локальной, а ее энергия практически не зависит от длины ТЛМ, при условии, что выполняется соотношение $L/r \gg 10$.

Во всех рассмотренных примерах с мультиполями различной конфигурации изменение внешней растягивающей ТЛМ силы в диапазоне значений $\alpha_F \in [0.5..2]$ качественно не влияет на поведение системы. Величина нормализованной силы α_F сказывается преимущественно на амплитуде деформации и глубине

энергетических минимумов (обе величины возрастают с уменьшением α_F), практически не смещая их положения. Таким образом, можно заключить, что параметром, определяющим равновесные расстояния между взаимодействующими мультиполями, в первую очередь является расположение точек приложения силы, а не ее амплитуда.

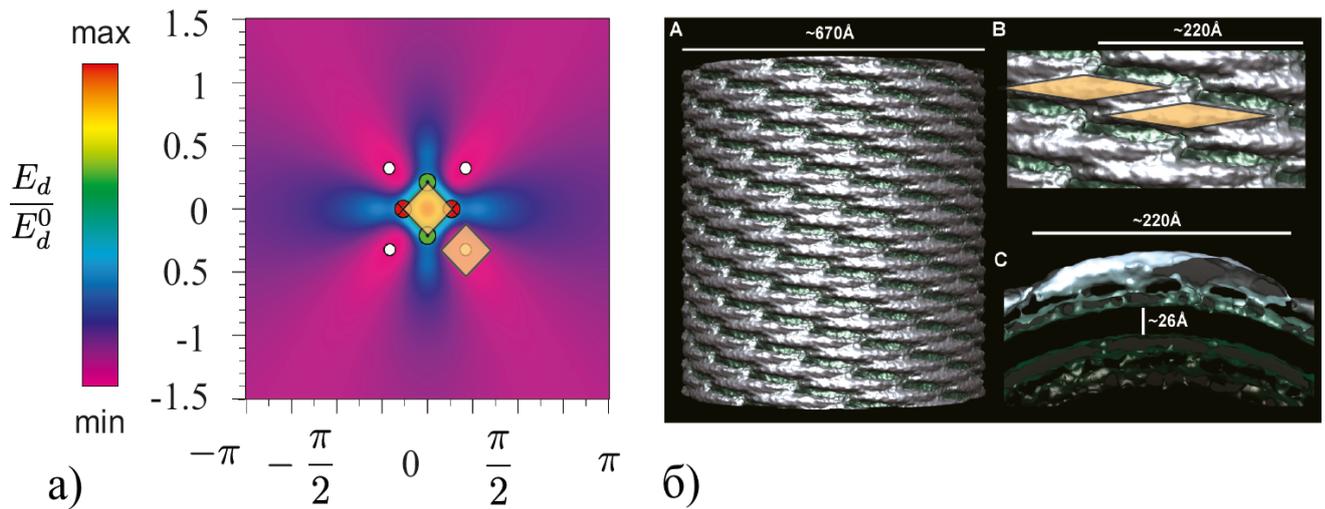


Рисунок 4.3 – Сходство в расположении квадрупольей и реальных белковых молекул. а) система, состоящая из двух квадрупольей, изображенных желтыми ромбами (остальные обозначения в точности соответствуют таковым на рис. 4.3); б) трехмерная структура липидной трубки, покрытой F-BAR белком CIP4 из семейства Тока, зеленым цветом изображены липиды, металлическим – белки, разрешение 17 Å [66]

В области параметров описывающих равновесную систему расстояние, на котором взаимодействуют белки, практически не зависит ни от α_F ни от длины ТЛМ (при условии, что выполняется соотношение $L/r \gg 10$). Однако при стремлении α_F к нулю (при приближении к неустойчивости системы) радиус взаимодействия между гипотетическими молекулами белка в модели резко возрастает. Рассмотрение поведения системы в таких условиях выходит за рамки данной диссертационной работы. Во-первых, при приближении к критической точке линейная модель уже не может с достаточной степенью точности описывать

поведение системы. Во-вторых, в рассматриваемых экспериментальных работах [9, 61, 67, 105] приближение к точке, в которой действующая на ТЛМ сила равна нулю, сопряжено с значительным повышением поверхностной концентрации белка и/или образованию белкового каркаса, что также делает нецелесообразным применение развиваемой соискателем модели. С другой стороны, о похожем увеличении радиуса взаимодействия между адсорбированными белками сообщается в работах [62, 86, 101, 109], где было показано, что для плоской липидной мембраны уменьшение поверхностного натяжения приводит к увеличению эффективного радиуса взаимодействия между белками. В случае ТЛМ, увеличение собственной кривизны липидного бислоя, приводящее к уменьшению растягивающей силы, также ведет к уменьшению поверхностного натяжения в системе.

Деформация мембраны, вызываемая всеми типами рассмотренных мультиполей (см. рис. 4.1), ведет к уменьшению площади поперечного сечения ТЛМ и поэтому фактически уменьшает средний радиус липидной трубки в сечении, проходящем через область прикрепления молекулы белка. Согласно экспериментальным данным в реальных системах при низких концентрациях белка распределение адсорбированных молекул является примерно однородным (за исключением концов мембраны [61, A1], адсорбция белка у которых будет рассмотрена в подразделе 4.4). Однородное распределение мультиполей приводит к уменьшению радиуса ТЛМ, пропорциональному их концентрации. Похожее поведение модельных систем с участием индуцирующих кривизну белков неоднократно наблюдалось экспериментально [9, 61].

Для того, чтобы лучше понять сильные стороны разработанной модели, ее полезно сравнить с уже существующими аналогами, имеющимися в литературе. Наиболее идеологически близким к разработанному соискателем является подход, предложенный в работе [109], использующий формализм точечных моментов, деформирующих мембрану. Действие отдельных белковых молекул моделируется при помощи так называемых «твистеров» (twisters) – пар антипараллельных точечных моментов, расположенных бесконечно близко друг к другу.

Взаимодействия таких частиц существенным образом отличаются от взаимодействий мультиполей. Так радиус взаимодействия твистеров, является функцией поверхностного натяжения, возрастая с его уменьшением, в предложенном же соискателем подходе первоочередным фактором является геометрия мультиполей (относительное расположение и направленность точечных сил), что делает модель более гибкой и подходящей для моделирования взаимодействий между белками конечного размера.

Другой популярный подход был предложен в работе [111] и получил развитие в работах [112, 113]. Он описывает белки как твердые включения, имеющие жестко заданную форму и угол контакта с мембраной на границе. Такой подход использует фиксированный ансамбль деформаций, а не сил, для моделирования действия молекулы белка на мембрану. Однако, в рамках предложенного в работе [111] подхода анализ даже простейшего случая с двумя абсолютно твердыми дисками, встроенными в плоскую мембрану со стремящимся к нулю поверхностным натяжением, является чрезвычайно сложной математической задачей. Поэтому использование развиваемой соискателем модели, ввиду ее простоты, является гораздо более выгодным при изучении систем с цилиндрической и сферической геометрией, таких как липидные везикулы и трубки.

Рассмотрим еще один подход, предложенный в [102], который также использовался для описания взаимодействий между белками, находящимися на поверхности ТЛМ [110]. В работах [102, 110] действие белка на липидный бислой описывается при помощи тензора, задающего кривизну мембраны в точке прикрепления белка, что делает их идеологически схожими с работами [111, 112, 113]. В рамках такого подхода начиная с некоторого расстояния точечные молекулы стремятся максимально сблизиться. Это приводит к необходимости введения дополнительных отталкивающих потенциалов для рассмотрения белков конечных размеров. В развиваемой соискателем теории равновесное расстояние между некоторыми типами мультиполей оказывается несколько больше размеров

самого мультиполя, в таком случае в принципе можно обойтись и без введения дополнительных отталкивающих потенциалов.

Предсказания разработанной соискателем модели также подтверждаются результатами, полученными в ходе экспериментального исследования модельных систем, однако ряд вопросов, касающихся поведения белковых молекул на концах липидной трубки, остается открытым. В следующих подразделах будет проведен сравнительный анализ разных типов граничных условий, налагаемых на ТЛМ и связанных со спецификой используемых экспериментаторами модельных систем. Будет продемонстрировано, как выбор граничных условий влияет на: (i) равновесную форму ТЛМ; (ii) характер взаимодействия белковых молекул друг с другом; (iii) распределение белковых молекул на поверхности ТЛМ.

4.3 Закрепленная на концах ТЛМ

Согласно последним данным, полученным в экспериментах по вытягиванию и стабилизации ТЛМ (см. подраздел 1.4) адсорбция ряда индуцирующих кривизну белков имеет не совсем однородный характер. Так в работе [A1] было установлено, что при постепенном повышении концентрации эндофилина в растворе, в котором находится ТЛМ, молекулы этого белка адсорбируются в первую очередь на концах трубки (более подробно результаты проведенного в работе экспериментального исследования будут обсуждаться в подразделе 4.4). Аналогичная тенденция была обнаружена и для других индуцирующих кривизну белков [9, 61, 81, A1].

Очевидно, что объяснить такое поведение в рамках модели с традиционно используемыми при изучении ТЛМ периодическими граничными условиями не представляется возможным. В перечисленных экспериментах один из концов ТЛМ прикреплен к полимерному шарiku, удерживаемому оптическим пинцетом, что не только фиксирует длину ТЛМ, но и ее радиус в точке прикрепления. Соединенный с везикулой конец трубки также остается неподвижным, а постоянство его радиуса обеспечивается за счет высокой плотности энергии на границе контакта ТЛМ-везикула и практически нулевой собственной кривизны липидного бислоя

везикулы. Для того, чтобы изучить упомянутые особенности поведения системы, в данном подразделе будет рассмотрена ТЛМ с шарнирно закрепленными концами. Такие граничные условия с одной стороны лучше соответствуют условиям проведения эксперимента, а с другой – являются наиболее простыми с точки зрения используемого математического аппарата.

Изменение граничных условий может повлиять не только на взаимодействия белков с мембраной и друг другом, но и на критическое поведение самой ТЛМ. Поэтому, как и в случае ТЛМ с периодическими граничными условиями начнем с анализа устойчивости цилиндрической фазы системы. Для перехода к закрепленной на концах ТЛМ достаточно вместо разложения поля радиальных смещений (2.18) перейти к разложению по новому набору базисных функций, удовлетворяющих новым граничным условиям:

$$u_r(\phi, z) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=1}^{\infty} A_{n,m} e^{i(n\phi)} \sin(k_m z), \quad (4.20)$$

где волновой вектор $k_m = \pi m / L$, $m = 1, 2, \dots, \infty$. Как и в подразделе 2.5 рассмотрим упрощенную модель с $\Delta P = 0$. Повторив все те же самые операции, но уже с разложением для $u_r(\phi, z)$ по новому базису функций (4.20), получаем следующее приближенное выражение для энергии закрепленной на концах ТЛМ:

$$\Phi_{pinned} = \frac{1}{2} \frac{\pi L k}{r^3} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=1}^{\infty} M_{n,m} A_{n,m} A_{n,m}^* + k \pi \alpha \sum_{m=1}^{\infty} A_{0,m} k_m (1 - (-1)^m) \quad (4.21)$$

$$M_{n,m} = (r^2 k_m^2 + n^2 - 1)^2 + \alpha_F r^2 k_m^2 \quad (4.22)$$

Проанализируем полученное выражение, сравнив его с выражением для энергии ТЛМ с периодическими граничными условиями (2.41). Квадратичный по амплитудам $A_{n,m}$ член совпадает с таковым из (2.41) с точностью до множителя $1/2$ и волнового вектора $k_m = \pi m / L$ (также отличаются пределы суммирования). Однако, выражение (4.21) содержит дополнительный линейный член по сравнению с (2.41), который, вообще говоря, свидетельствует о том, что форма прямого кругового

цилиндра не является равновесной. Исходя из вида линейного члена можно заключить, что главная ось симметрии ТЛМ сохраняется.

Прежде чем рассмотреть форму мембраны в действительном виде, определим область применимости разложения энергии (4.21). Для этого как и ранее в качестве критерия устойчивости фазы будем использовать расходимость среднеквадратичных флуктуаций критических мод:

$$\langle |u_r|^2 \rangle = \frac{k_B T r^3}{\kappa \pi L} \sum_{n,m=-\infty}^{\infty} \frac{1}{M_{n,m}}, \quad (4.23)$$

Поскольку матрица коэффициентов $M_{n,m}$ (4.22) имеет ту же структуру, что и в случае периодических граничных условий (2.42), то и устойчивость закрепленной на концах ТЛМ ограничена теми же типами мод: дважды вырожденной модой прогиба ($n=\pm 1, m=1$) и модой гофрировки ($n=0, k_m^2 r^2 \approx 1$). Однако, из-за того, что минимальный волновой вектор становится в два раза короче, аксиальная сила, необходимая для изгиба шарнирно закрепленной на концах липидной трубки, становится в четыре раза меньше по сравнению с критической силой в случае периодических граничных условий (2.44):

$$\alpha_2^{pinned} = -(\pi r / L)^2 \quad (4.24)$$

Таким образом, сила, приводящая к потере устойчивости цилиндрической фазы, закрепленной на концах ТЛМ, равна силе, необходимой для дестабилизации ТЛМ с периодическими граничными условиями в два раза большей длины. Аналогичное соотношение выполняется для тонких стержней [25]. Действительно, критическая аксиальная нагрузка, приводящая к изгибу стержня, задается выражением:

$$P_{crit} = \frac{JE\pi^2}{(\mu L)^2}, \quad (4.25)$$

В выражении (4.25) J – площадь поперечного сечения, E – модуль юнга, а μL – приведенная длина стержня. Коэффициент μ был впервые введен Феликсом Станиславовичем Ясинским и определяется характером закрепления концов

стержня: $\mu = 0.5$ для двух заземленных концов, $\mu = 1$ для двух шарнирно закрепленных концов, $\mu = 2$ для одного заземленного и одного свободного конца [114].

Подробный анализ закритического поведения ТЛМ с закрепленными концами связан с рядом нетривиальных задач. Подход теории групп, использованный для построения инвариантов в потенциале Ландау в разделе 3, не может быть напрямую использован для функций базиса разложения (4.20). Явный вид разложений энергии ТЛМ старших порядков существенным образом отличается от полученных для случая периодических граничных условий, поэтому в дальнейшем мы ограничимся рассмотрением поведения липидной мембраны и ее формы в области устойчивости цилиндрической фазы $\alpha_F \in [\sim 0..2]$.

Равновесную форму шарнирно закрепленной липидной трубки в рассматриваемой области легко получить, проминимизировав энергию (4.21) по амплитудам $A_{n,m}$, что фактически равносильно решению набора независимых квадратных уравнений. При рассмотрении равновесной формы ТЛМ для наглядности в качестве управляющего параметра будем использовать нормализованную кривизну липидного бислоя α_C . В случае нулевой разности давлений этот переход однозначно осуществляется при помощи уравнения $\alpha_F = 2 - 2\alpha_C$ (см. раздел 2). Еще раз напомним, что точка $\alpha_C = 1$ соответствует трубке, собственная кривизна липидного бислоя которой совпадает с фактической кривизной поверхности, а $\alpha_C = 0$ – трубке с нулевой кривизной липидного бислоя. Выполнив расчет для ТЛМ с соотношением $L/r = 100$, получаем набор кривых, изображенных на рисунке 4.4, которые представляют собой образующие липидной трубки для различных значений параметра α_C .

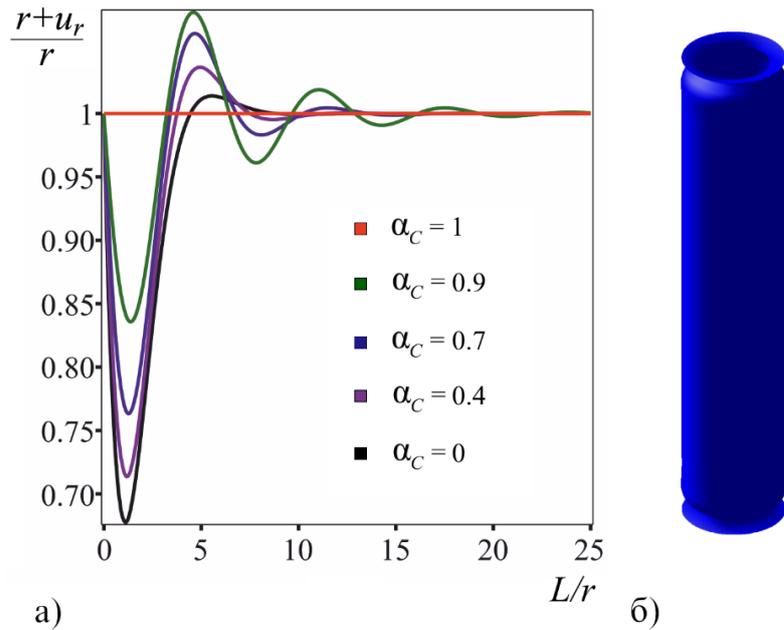


Рисунок 4.4 – Форма шарнирно закрепленной на концах ТЛМ с соотношением $L/r=100$: а) образующие шарнирно закрепленной ТЛМ для различных значений собственной кривизны липидного бислоя: красная линия – $\alpha_c = 1$, зеленая линия – $\alpha_c = 0.9$, синяя линия – $\alpha_c = 0.7$, фиолетовая линия – $\alpha_c = 0.4$, черная линия – $\alpha_c = 0$. Значения по оси ординат нормированы на радиус в середине трубки, значения по оси абсцисс также выражены в единицах этого радиуса; б) ТЛМ с нулевой собственной кривизной липидного бислоя (для наглядности пропорции трубки изменены)

Из рисунка хорошо видно, что линейные члены в выражении (4.21) приводят к возникновению характерных деформаций на концах мембраны, однако, большая ее часть все также сохраняет форму правильного кругового цилиндра. В случае ТЛМ, собственная кривизна липидного бислоя которой совпадает с ее фактической кривизной (в этой точке также отсутствует внешняя растягивающая сила), деформации полностью отсутствуют. При приближении к точке $\alpha_c = 0$, деформации постепенно возрастают, образуя две характерных области, в которых радиус ТЛМ составляет порядка 66% от его значения в недеформированной части трубки (для ТЛМ с соотношением $L/r=100$). Таким образом, впервые

использованные при рассмотрении ТЛМ граничные условия, соответствующие шарнирно закрепленной на концах липидной трубке, качественно влияют на поведение системы. Так даже в случае простейшей классической модели, характеризуемой нулевой собственной кривизной липидного бислоя, их применение приводит к тому, что форма ТЛМ на концах существенным образом отличается от цилиндра постоянного радиуса.

4.4 Закрепленная на концах ТЛМ, на поверхности которой адсорбированы молекулы индуцирующих кривизну белков

Теперь рассмотрим, каким образом переход к новым граничным условиям сказывается на взаимодействиях белков с мембраной в рамках разработанного подхода силовых мультиполей. Для этого используем тот же прием, что и в подразделе 4.3 и переразложим функцию плотности распределения сил как

$$\Pi(\phi, z) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=1}^{\infty} \Pi_{n,m} e^{i(n\phi)} \sin(k_m z), \quad (4.26)$$

где волновой вектор $k_m = \pi m / L$, и проведем рассуждения аналогичные использованным ранее для случая периодических граничных условий. Для наглядности рассмотрим случай, когда на поверхности ТЛМ адсорбирована одна единственная молекула белка. Действие белковой молекулы на ТЛМ будем моделировать при помощи силового квадрупольного возмущения, имеющего наиболее общий вид из введенных в подразделе 4.2. Действительно, изменяя параметры $\Delta\phi_0$ и Δz_0 , квадруполь можно свести к более простым мультиполям. Так в случае $\Delta\phi_0 \neq 0, \Delta z_0 = 0$ мы переходим к триполю, а, выбирая $\Delta\phi_0 \neq \pi$, – к диполю. В системе ортонормированных функций, по которым разложены поля (4.20), (4.26), коэффициенты разложения квадрупольного воздействия $\Pi_{n,m}$ примут вид, несколько отличающийся от выражения (4.18):

$$\Pi_{n,m} = \frac{F^0}{\pi r L} \left(\cos\left(\frac{\pi n}{L} \Delta z_0\right) - \frac{\cos(n\Delta\phi_0)}{\cos(\Delta\phi_0)} \right) \sin(k_m z) e^{i(n\phi)}, \quad (4.27)$$

В выражении (4.27) ϕ – угловая координата центра квадруполья, z определяет расстояние от центра квадруполья до конца ТЛМ, а волновой вектор k_m становится в два раза короче по сравнению с (4.18).

Как было показано в подразделе 4.3, даже при отсутствии белков на поверхности липидного бислоя шарнирно закрепленной ТЛМ равенство нулю всех коэффициентов $A_{n,m}$ не соответствует минимуму энергии системы. В то же время, если рассматривать деформацию ТЛМ, создаваемую адсорбированными белками, относительно ее новой равновесной формы, то вид формулы (4.3) остается неизменным с точностью до переопределения волнового вектора k_m . Однако в отличие от случая периодических граничных условий энергия деформации мембраны (4.5), содержащая произведение $\Pi_{n,m}\Pi_{n,m}^*$, теперь явно зависит от координаты z прикрепления белковой молекулы вдоль оси ТЛМ. Заметим, что для любого centrosymmetric мультиполья, середина которого выбрана в качестве координат белковой молекулы (ϕ_i, z_i) , выражение для коэффициентов разложения поля сил можно привести к виду, аналогичному (4.27) и содержащему такую же зависимость от координаты z . Таким образом, изменение энергии системы, вызванное адсорбцией белка, зависит от его положения на поверхности ТЛМ. Для квадруполья ее можно записать как

$$E_d = \frac{F_0^2 r^3}{\kappa \pi L} \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=1}^{\infty} \frac{\left(\cos(k_m \Delta z_0) - \frac{\cos(n \Delta \phi_0)}{\cos(\Delta \phi_0)} \right)^2}{M_{n,m}} \sin^2(k_m z), \quad (4.28)$$

В случае, когда силы, моделирующие воздействие белка на мембрану, достаточно сильно локализованы, можно оценить размеры мультиполья как половину радиуса ТЛМ (данная оценка хорошо согласуется с соотношениями размеров в реальных биологических системах [67, 66, 105, 108]). При таких размерах мультиполья энергия деформации мембраны как функция от z координаты прикрепления белковой молекулы резко убывает до нуля в областях на концах ТЛМ размером порядка двух радиусов нанотрубки (см. рис. 4.5). Всюду, за

исключением рассмотренных областей, наличие зависимости от координаты z в выражении (21) пренебрежимо слабо сказывается на характере взаимодействия мультиполей с мембраной и, как следствие, друг с другом. Численные расчеты энергии взаимодействия между квадрупольями показывают, что на расстоянии нескольких радиусов от конца ТЛМ величина этого взаимодействия определяется в первую очередь расстоянием между центрами мультиполей и практически не зависит от положения пары мультиполей относительно конца мембраны.

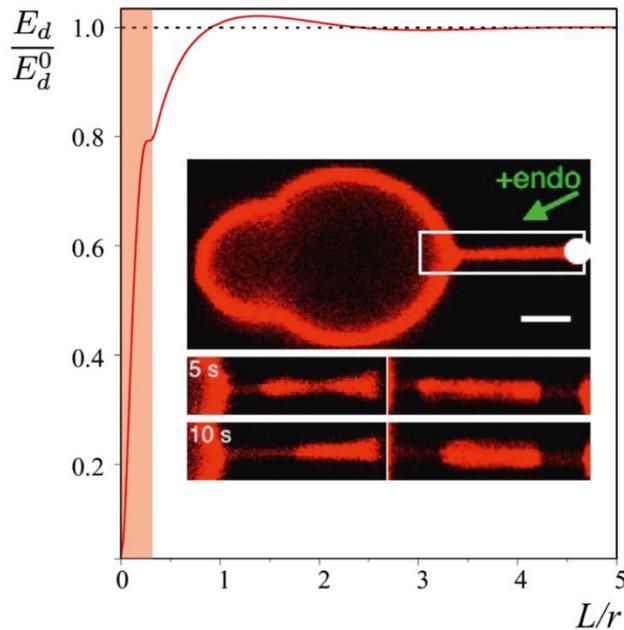


Рисунок 4.5 – Высокое сродство индуцирующих кривизну белков к концам ТЛМ. График – зависимость энергии деформации мембраны от положения квадруполья относительно конца ТЛМ. Расстояние вдоль главной оси трубки нормировано на ее равновесный радиус в середине, а энергия системы – на энергию деформации,

вызванную адсорбцией одной молекулы белка в середине ТЛМ E_d^0 . Красным цветом выделена область, которую необходимо исключить из рассмотрения ввиду конечных размеров белка. Вставка – скаффолдинг эндофилина A2. Эндофилин A2

за счет своего N-BAR домена прикрепляется к концам трубки, формируя зародыши белкового каркаса, которые со временем разрастаются, занимая всю поверхность липидной трубки. Моменту времени, в который на поверхности ТЛМ была зарегистрирована адсорбция белка, соответствует $t=0$. Размер масштабной

метки 2 микрометра [A1]

Полученные значения энергии совпадают с результатом расчета в приближении периодических граничных условий. С одной стороны, это подтверждает самосогласованность выбранной модели. С другой стороны, тот факт, что расположение мультиполей вблизи концов ТЛМ является наиболее энергетически выгодным, хорошо согласуется с экспериментально полученными распределениями молекул индуцирующих кривизну белков на поверхности ТЛМ, находящейся в их низко концентрированном растворе [A1] (см. рис. 4.5).

В следующем подразделе в рамках разработанной соискателем модели будут подробнее рассмотрены результаты, полученные в работе [A1] при экспериментальном исследовании адсорбции белков на модельной системе, состоящей из везикулы и вытянутой из нее ТЛМ.

4.5 Результаты экспериментальных исследований и их анализ

Одной из ключевых особенностей работы [A1] было систематическое исследование характерных особенностей взаимодействия целого ряда белков с различной структурой с липидными мембраны. Авторами работы была использована модельная система, состоящая из везикулы и вытянутой из нее липидной трубки, удерживаемой оптическим пинцетом, аналогичная рассмотренным в подразделе 1.4 данной диссертации. Везикулы были приготовлены из смеси общего липидного мозгового экстракта с фосфолипидом PI(4,5)P2 (молярные доли 95/5). Были использованы три белка с различной структурой: (i) эндофилин A2 (endophilin A2) – классический N-BAR белок, участвующий в клатрин-зависимом эндоцитозе и содержащий четыре амфипатические спирали, а также его модификация эндофилин A2, у которой отсутствуют амфипатические спирали; (ii) бета2-центаурин (β 2-centaurin) – белок семейства BAR, не содержащий амфипатические спирали; (iii) эпсин 1 (epsin 1) – белок, не содержащий BAR домена и прикрепляющийся к мембране за счет амфипатических спиралей.

Эндофилин продемонстрировал высокое сродство к концам липидной трубки. В 53 трех из 59 экспериментов адсорбция происходила в первую очередь на концах мембраны, в 27 из них – на конце трубки, соединенным с полимерным шариком (см. рис. 1.1). В 4 случаях была зарегистрированная однородная адсорбция эндофилина, однако это могло быть связано с недостаточной скоростью регистрации. И только в 2 случаях из 59 нуклеация эндофилина происходила вдали от концов ТЛМ.

После образования зерен нуклеации область, покрытая эндофилином, постепенно разрасталась, покрывая липидную трубку полностью либо частично. При этом уменьшение радиуса трубки наблюдается сразу же после начала адсорбции. Со временем такая ТЛМ изгибается подобно классическому эйлерову стержню, поскольку увеличение собственной кривизны приводит к возникновению эффективной сжимающей силы, действующей на трубку. Было также зарегистрировано, что радиус полностью покрытой эндофилином А2 трубки не зависит от величины поверхностного натяжения. Этот факт свидетельствует о том, что трубка обрастает жестким трехмерным каркасом, задающим ее радиус. Хотя белковый каркас и изменяет механические свойства системы качественным образом, аналогичное поведение предсказывается моделью, разработанной в ходе работы над диссертацией (см. подразделы 2.5 и 3.3). Использование модифицированного эндофилина А2 (без амфипатических спиралей) повлияло лишь на скорость адсорбции белка.

Несмотря на отсутствие амфипатических спиралей у бета2-центаурина, трубки, полностью покрытые этим белком, продемонстрировали поведение, аналогичное рассмотренному выше. Единственным отличием являлся радиус покрытых центаурином трубок: ~42.5 нм против ~10 нм для эндофилина. Это связано с тем, что собственная кривизна бета2-центаурина значительно меньше чем у эндофилина А2. Что касается процесса адсорбции, то в случае центаурина она с самого начала являлась *однородной*.

И наконец, рассмотрим поведение эпсина 1 – еще одного белка, играющего важную роль в процессах клатрин-зависимого эндоцитоза [115], но при этом не содержащего BAR домена. При введении раствора эпсина наблюдалось систематическое уменьшение радиуса липидной трубки, однако в отличие от центаурина и эндофилина ее радиус всегда зависел от величины поверхностного натяжения в системе. Жесткий белковый каркас не формировался даже в случае очень высоких концентраций центаурина в растворе (примерно в десять раз выше чем в экспериментах с эндофилином), а эффективная внешняя сила всегда оставалась растягивающей.

Для того, чтобы попытаться дать ответ на поставленный ранее вопрос: «*Каким образом могут взаимодействовать белковые молекулы, адсорбированные на поверхности липидного бислоя?*», результаты приведенных экспериментальных наблюдений представим в виде таблицы. На основании данных представленных в таблице 4.1 можно сделать вывод, о том, что BAR домен является необходимым структурным компонентом, позволяющим содержащим его белкам формировать жесткие каркасы на поверхности мембран. Наличие амфипатических спиралей не является необходимым условием для скаффолдинга, однако они способны повышать собственную кривизну липидного бислоя и, возможно, способствуют более эффективному осаждению белков на поверхность мембраны.

Таблица 4.1 – Результаты экспериментов по вытягиванию ТЛМ с участием индуцирующих кривизну липидного бислоя белков, проведенных в [A1].

белок	BAR домен	индуцируемая кривизна	скаффолдинг	средство к концам ТЛМ
Эндофилин A2	есть	сильная	есть	есть
Эндофилин A2 (модиф.)	есть	сильная	есть	есть
Бета2-центаурин	есть	слабая	есть	нет
Эпсин 1	нет	слабая	нет	нет

Высокое сродство к концам трубки, наблюдаемое для эндофилина, по всей видимости связано со значительной собственной кривизной входящего в его состав BAR домена и способностью эндофилина существенно изменять кривизну липидного бислоя. В рамках развиваемого в диссертации формализма силовых мультиполей эндофилину будет соответствовать набор сил с гораздо большими амплитудами, чем для центаурина и эпсина. Это приведет к тому, что энергетический барьер изображенный на рисунке 4.5 будет значительно выше $k_B T$, в то время как в случае центаурина и эпсина он, по всей видимости, просто экранируется тепловыми флуктуациями.

Таким образом, в данном разделе диссертации была построена теория, описывающая липидную трубку с адсорбированными на ее поверхности молекулами белка. Разработанная модель описывает дальнедействующие силы, возникающие между молекулами белка в результате перекрытия вызываемых ими полей деформаций мембраны. В качестве источников поля сил используются мультиполи, представляющие собой простейшие, удовлетворяющие условиям механического равновесия комбинации точечных сил, вызывающие такую деформацию ТЛМ, которая аналогична деформации, возникающей вследствие адсорбции рассматриваемого белка.

В данном разделе были рассмотрены мультиполи состоящие из двух, трех и четырех сил. Было показано, что если воздействие молекулы моделируется тремя силами, лежащими в плоскости, перпендикулярной оси ТЛМ, то их можно локализовать в области сопоставимой по размерам с гипотетической молекулой белка. Пара таких мультиполей стремится расположиться в одной плоскости, а, следовательно, индуцированное деформацией мембраны взаимодействие может приводить к образованию колец, опоясывающих ТЛМ. Тенденция к формированию линейных белковых агрегатов на поверхности трубчатых и плоских липидных мембран неоднократно обсуждалась в литературе [62, 110, 116]. Согласно данным криоэлектронной микроскопии молекулы ряда BAR белков образуют спирали с небольшим углом хиральности на поверхности трубчатых мембран [66, 67].

Аналогичное поведение воспроизводится и при помощи молекулярно-динамического моделирования [106]. В рамках разработанного соискателем подхода, по всей видимости, также можно сконструировать мультиполи, упорядочивающиеся в спиральные структуры. Если расположение точек приложения силы в мультиполе не является зеркально симметричным, то такой мультиполь, очевидно, создает хиральное поле деформаций. Однако численное моделирование процессов самоорганизации подобных мультиполей на трубчатых или плоских мембранах выходит за рамки данной диссертационной работы.

Установлено, что в области применимости модели (когда концентрация белка не достаточна для образования жесткого белкового каркаса, покрывающего липидную трубку) максимальный радиус взаимодействия между молекулами белка оказывается порядка периметра ТЛМ и практически не зависит от величины растягивающей ТЛМ силы. Основным фактором, влияющим на равновесные положения мультиполей является их строение. Вблизи точки неустойчивости, когда приложенная к ТЛМ сила, а вместе с ней и поверхностное натяжение обращаются в ноль, радиус взаимодействия между адсорбированными белковыми молекулами резко возрастает, подобно тому, как это происходит в случае плоской мембраны [62, 86, 101, 109].

Наряду с исследованием поведения системы при периодических граничных условиях, используемых в большинстве работ [9, 86 – 89], в настоящем разделе диссертации была рассмотрена ТЛМ с закрепленными концами. Показано, что использование данных граничных условий приводит к возникновению особых областей длиной порядка двух радиусов ТЛМ у концов мембраны. В этих областях адсорбция протеинов является гораздо более энергетически выгодной, чем на остальной поверхности липидной трубки. Данный теоретический результат согласуется с результатами, полученными в экспериментах по адсорбции белков на вытянутой из везикулы ТЛМ [A1].

Разработанный соискателем мультипольный подход является мощным инструментом для моделирования анизотропных взаимодействий между

белковыми молекулами конечного размера. Развитая теория может быть легко адаптирована для исследования мембран со сферической и планарной геометрией, что делает ее применимой для целого класса задач.

5 МОДЕЛЬ АОРТЫ ЭМБРИОНА ДАНИО РЕРИО

Механизм появления стволовых/унипотентных клеток из дорсальной аорты (ДА) был открыт в 2010 году в процессе исследования эмбриогенеза рыбы данио рерио и был назван эндотелио-гемопоэтическим переходом (ЭГП) (англ. endothelio-haematopoietic transition) [119]. В процессе ЭГП часть клеток, составляющих стенки дорсальной аорты эмбриона, покидают ее, не нарушая целостности, и переквалифицируются в стволовые, чтобы затем заселить кроветворные органы. Данный механизм, по всей видимости, является универсальным и реализуется в процессе эмбриогенеза птиц, рыб и млекопитающих. Дорсальная аорта эмбриона данио рерио представляет собой трубку диаметром несколько десятков микрометров, состоящую из одного слоя плоских клеток, заполненную кровью [119]. Несмотря на то, что ДА эмбриона данио рерио – очень компактная система (ее радиус составляет несколько десятков микрометров) в процессе эмбриогенеза она демонстрирует весьма сложное поведение. Процесс ЭГП сопровождается ростом, миграцией и деформацией, составляющих ДА клеток, а также изменением кровяного давления в системе, которые приводят к крупномасштабным изменениям размеров и формы дорсальной аорты [119]. Несмотря на то, что данный процесс был открыт почти 10 лет назад, нам не удалось найти в литературе попыток построить математическую модель данной системы и объяснить с позиций физики эволюцию системы в процессе развития эмбриона.

Изменения морфологии дорсальной аорты в процессе ЭГП схожи с деформациями возникающими во многих биотических и абиотических системах с подобной геометрией. Помимо неустойчивостей, возникающих в липидных мембранах, которые были подробно исследованы в разделах 2 и 3 данной диссертации, деформации аорты также напоминают неустойчивости в высыхающих гелях [120] и классических цилиндрических оболочках, находящихся под действием осевого сжатия [121]. Опираясь на эти аналогии, а также на данные полученные при микроскопическом исследовании развития эмбриона данио рерио, которые будут обсуждаться в дальнейшем, можно предположить, что глобальные

изменения формы аорты в процессе ЭГП связаны именно с возникающими в системе механическими напряжениями и являются результатом потери устойчивости системой и переходу ее в новое состояние, а не осуществляются заранее генетически запрограммированными механизмами эмбриогенеза.

Целью данного раздела диссертации является построение минимальной модели дорсальной аорты, объясняющей крупномасштабные изменения ее формы и размеров в процессе ЭГП. ДА рассматривается, как тонкая цилиндрическая оболочка из изотропного упругого материала, находящаяся под действием разности давления и внешних упругих сил, налагаемых матрицей окружающих ее тканей.

5.1 Модель аорты

Несмотря на наличие общих черт у трубчатых липидных мембран и дорсальной аорты рыбы данио рерио, эти системы обладают рядом существенных различий. Так дорсальная аорта в отличие от ТЛМ обладает типичной характеристикой твердого тела – наличием модулей сдвиговой упругости, и в отличие от липидной трубки энергия деформации аорты зависит не только от ее конечной формы (см. выражение (2.3)), но и от всех трех компонент поля смещений (у ТЛМ это только радиальная компонента). Учитывая эти различия, обобщим модель, построенную в предыдущих разделах диссертации, и рассмотрим ДА как двумерную упругую цилиндрическую оболочку в трехмерном пространстве. Мы параметризуем поверхность дорсальной аорты как:

$$\begin{aligned}x' &= [(R+u_r) \cos \varphi - u_\varphi \sin \varphi] \\y' &= [(R+u_r) \sin \varphi + u_\varphi \cos \varphi] \\z' &= z + u_z\end{aligned}\tag{5.1}$$

где R – радиус трубки в равновесном ненапряженном состоянии, а $\mathbf{u} = [u_r, u_\varphi, u_z]$ – поле смещений поверхности ДА в цилиндрической системе координат.

Важной особенностью ДА является тот факт, что во время большей части процесса ЕНТ она находится в напряженном состоянии (подобно многим другим

биологическим тканям при физиологических условиях [122]). Эти напряжения в основном вызваны давлением крови ΔP и различиями в скорости роста дорсальной аорты и окружающих ее тканей и могут быть как однородными, так и неоднородными. Неоднородные напряжения могут возникать, например, из-за неравномерности роста/деформации отдельных клеток, образующих ДА. Ниже, будет построена модель трубчатой упругой мембраны, сильно упрощающая реальную систему и не учитывающая подобные неоднородные напряжения, а затем будут рассмотрены пути ее модификации. Как будет продемонстрировано, несмотря на ряд существенных упрощений модель может быть использована для интерпретации экспериментальных данных и позволяет получить новые знания об аорте эмбриона данио рерио.

Предполагая наличие однородного напряжения с величиной σ_{zz} вдоль оси ДА, запишем ее свободную энергию как

$$\Phi = \int_S \left[\frac{\lambda}{2} (\varepsilon_{ii})^2 + \mu (\varepsilon_{ik}^2) + \frac{\kappa}{2} (\Delta H')^2 - \sigma_{zz} \cdot \partial_z u_z \right] dS - \Delta P V, \quad (5.2)$$

где ε_{ij} – двумерный нелинейный тензор деформаций, λ и μ – двумерные аналоги коэффициентов Ламе, κ – коэффициент изгибной упругости, $\Delta H' = (\partial_\phi^2 u_r + R^2 \partial_z^2 u_r - \partial_\phi u_\phi) / R^2$ – приведенное изменение кривизны поверхности дорсальной аорты. Интегрирование ведется по всей поверхности ДА. V – внутренний объем деформированной мембраны, а ΔP – перепад давления в системе. В следующих подразделах 5.2, 5.3 и 5.4 будут детально рассмотрены: построение нелинейного тензора деформации, выражение для приведенной кривизны поверхности и расчет объема деформированной дорсальной аорты, соответственно.

5.2 Нелинейный тензор деформации.

Как известно, квадрат расстояния dr^2 между двумя соседними точками поверхности можно выразить с помощью ее метрического тензора g_{ij} и приращения dv_j вектора переменных, параметризующих поверхность:

$$dr^2 = g_{ij}dv_idv_j \quad (5.3)$$

Однако в случае поверхности деформированной цилиндрической мембраны, параметризованной вектором $\mathbf{v} = \langle \varphi, z \rangle$, вместо классического метрического тензора [123] удобнее использовать «нормализованный» метрический тензор $m_{ij} = m_{ij} = \gamma_{ik}g_{kl}\gamma_{lj}$, где $\gamma = \sqrt{g^0}$, а g^0 – метрический тензор недеформированной поверхности мембраны. Элементы этого тензора: $g_{21}^0 = g_{21}^0 = 0$, $g_{11}^0 = 1/R$, и $g_{22}^0 = 1$. Тогда выражение (5.3) можно переписать в виде:

$$dr^2 = m_{ij}dw_idw_j, \quad (5.4)$$

где $\mathbf{w} = \langle \varphi R, z \rangle$. После такой перенормировки тензор m_{ij} , характеризующий метрику недеформированной цилиндрической поверхности, становится безразмерным и идентичным таковому для Евклидова пространства размерности 2 – единичным тензором Кронекера δ_{ij} . Далее воспользуемся тем, что в случае деформации обычного Евклидова пространства любой малый вектор dX_i' деформированного пространства выражается через тот же вектор dX_i до деформации как

$$dX_i' = (\delta_{ij} + \varepsilon_{ij})dX_j \quad (5.5)$$

Причем в случае однородной деформации выражение (5.5) оказывается точным даже для немалых векторов. Используя (5.4) и (5.5) запишем

$$(\delta_{ij} + \Delta m_{ij})dw_idw_j = (\delta_{ik} + \varepsilon_{ik})(\delta_{jk} + \varepsilon_{jk})dw_idw_j \quad (5.6)$$

где $\Delta m_{ij} = m_{ij} - \delta_{ij}$ – изменение нормализованного метрического тензора при деформации. Решая уравнение (5.6) относительно компонент тензора деформации ε_{ij} , получаем:

$$\varepsilon = \sqrt{\mathbf{m}} - \delta \quad (5.7)$$

или с точностью до членов второго порядка малости по m_{ij} :

$$\varepsilon_{ij} = \frac{\Delta m_{ij}}{2} - \frac{\Delta m_{ik} \Delta m_{kj}}{8} \quad (5.8)$$

Посчитав коэффициенты метрического тензора деформированной поверхности в явном виде, получаем следующие выражения для компонент (5.8):

$$\begin{aligned} \varepsilon_{\varphi\varphi} &= \frac{u_r + \partial_\varphi u_\varphi}{R} + \frac{(\partial_\varphi u_z)^2 + (\partial_\varphi u_r - u_\varphi)^2}{2R^2} - \frac{(R\partial_z u_\varphi + \partial_\varphi u_z)^2}{8R^2} \\ \varepsilon_{\varphi z} &= \frac{R\partial_\varphi u_z + \partial_z u_\varphi}{2R} + \frac{\partial_z u_r (\partial_\varphi u_r - u_\varphi)}{4R} + \frac{(R\partial_z u_\varphi - \partial_\varphi u_z)(u_r + u_\varphi \partial_\varphi - R\partial_z u_z)}{4R^2} \\ \varepsilon_{zz} &= \partial_z u_z + \frac{(\partial_z u_\varphi)^2 + (\partial_z u_r)^2}{2} - \frac{(R\partial_z u_\varphi + \partial_\varphi u_z)^2}{8R^2} \end{aligned} \quad (5.9)$$

Подчеркнем, что, хотя данный вывод отличается от вывода в [124], линейные члены тензоров, получаемых в обоих подходах, совпадают (в [124] рассматривалась исключительно линейная задача).

5.3 Перенормировка средней кривизны поверхности

Перенормировка выражения для средней кривизны мембраны проводится для того, чтобы разделить энергетические вклады, связанные с деформациями различного типа, а именно, чтобы сделать вклад изгибной составляющей в энергии (5.2) независимым от произвольных однородных деформаций дорсальной аорты, сохраняющих ее цилиндрическую форму. Таким образом новое выражение для средней кривизны найдем как

$$\Delta H' = \Delta H - \Delta H^R \quad (5.10)$$

Рассмотрим изменение кривизны, связанное с однородным изменением радиуса трубки:

$$H^R = \frac{1}{R(1 + \varepsilon_{\varphi\varphi})} - \frac{1}{R} \quad (5.11)$$

Приведя полученное выражение к общему знаменателю, получаем:

$$H^R = -\frac{\varepsilon_{\varphi\varphi}}{R(1 + \varepsilon_{\varphi\varphi})} \quad (5.12)$$

Учитывая, что для произвольных малых деформаций $\varepsilon_{\varphi\varphi} \ll 1$ входящая в (5.12) компонента тензора деформации определяется выражением

$$\varepsilon_{\varphi\varphi} = \frac{(u_r + \partial_\varphi u_\varphi)}{R}, \quad (5.13)$$

а средняя кривизна мембраны ΔH задается выражением (см. работу [124]):

$$\Delta H = - \frac{\partial_\varphi^2 u_r + R^2 \partial_z^2 u_r + u_r}{R^2} \quad (5.14)$$

Можем записать в явном виде выражение (5.10):

$$\Delta H' = \frac{\partial_\varphi^2 u_r + R^2 \partial_z^2 u_r - \partial_\varphi u_\varphi}{R^2} \quad (5.15)$$

В результате получаем перенормированное изменение кривизны, не зависящее от однородного изменения радиуса цилиндрической поверхности. Действительно, в выражении (5.15) отсутствуют линейные компоненты тензора деформации ε_{ik}^0 . С физической точки зрения использование этого выражения допустимо, поскольку вклад в энергию системы от однородного увеличения радиуса аорты, связанный с ее растяжением/сжатием значительно превосходит вклад, от тех же деформаций, но связанный с изменением кривизны поверхности ввиду малости коэффициента изгибной упругости по сравнению с двумерными аналогами коэффициентов Ламе.

5.4 Объем деформированной аорты

Объем деформированной дорсальной аорты V будем рассчитывать при помощи выражения:

$$V = \int d^3 \mathbf{R}^{\text{in}} = \int_0^1 \int_0^{2\pi} \int_0^L \left| \frac{\partial(x, y, z)}{\partial(\alpha, \varphi, z)} \right| d\alpha d\varphi dz \quad (5.16)$$

где $\mathbf{R}^{\text{in}} = (\alpha x, \alpha y, z)$ – совокупность точек, заключенных внутри цилиндра, а выражение $\frac{\partial(x, y, z)}{\partial(\alpha, \varphi, z)}$ – якобиан перехода в новую систему координат. После интегрирования по α и переходу к интегрированию по поверхности ДА мы получаем выражение для объема деформированной трубки (5.17).

$$\begin{aligned}
V &= R \int_0^1 \int_0^{2\pi} \int_0^L \left| \frac{\partial(x, y, z)}{\partial(\alpha, \varphi, z)} \right| d\alpha d\varphi dz \\
&= \int_S \left[u_r \left(1 + \partial_z u_z + \frac{u_r}{2R} + \frac{\partial_\varphi u_\varphi}{2R} + \frac{u_r \cdot \partial_z u_z}{2R} + \frac{\partial_\varphi u_\varphi \cdot \partial_z u_z}{2R} \right) \right. \\
&\quad + \frac{u_\varphi}{2R} (u_\varphi - \partial_\varphi u_r - \partial_z u_z \cdot \partial_\varphi u_r + u_\varphi \cdot \partial_z u_z) + \frac{1}{2} \partial_\varphi u_\varphi (1 + \partial_z u_z) \\
&\quad \left. + \frac{1}{2} R \partial_z u_z - \frac{1}{2} \partial_\varphi u_z \cdot \left(\partial_z u_\varphi - \frac{u_\varphi \cdot \partial_z u_r}{R} + \frac{u_r \cdot \partial_z u_\varphi}{R} \right) + \frac{1}{2} R \right] dS
\end{aligned} \tag{5.17}$$

5.5 Напряженное состояние системы и матрица устойчивости

Наличие однородных механических напряжений, возникающих под действием окружающих аорту тканей и гидростатического давления (члены $\varepsilon_{zz}\sigma_{zz}$ и ΔPV в энергии (5.2)) ведет к возникновению однородной деформации дорсальной аорты, сохраняющей ее форму. При этом полное поле смещений (1) можно переписать как:

$$\mathbf{u} = \mathbf{u}_0 + \mathbf{u}' \tag{5.18}$$

где вызванное однородными внешними напряжениями поле имеет вид:

$$\mathbf{u}_0 = \langle \varepsilon_{\varphi\varphi}^0 R, 0, \varepsilon_{zz}^0 Z \rangle, \tag{5.19}$$

Найдем явный вид поля \mathbf{u}_0 и рассчитаем однородные деформации, возникающие в системе. Для этого достаточно рассмотреть линейную постановку задачи, записав энергию однородной деформации ДА как:

$$\begin{aligned}
\Delta E &= 2\pi RL \left(\frac{\lambda}{2} (\varepsilon_{\varphi\varphi}^0 + \varepsilon_{zz}^0)^2 + \mu ((\varepsilon_{\varphi\varphi}^0)^2 + (\varepsilon_{zz}^0)^2) - \sigma_{zz} \right) \\
&\quad - \Delta P \pi R^2 L (1 + 2\varepsilon_{\varphi\varphi}^0 + \varepsilon_{zz}^0)
\end{aligned} \tag{5.20}$$

В данном выражении отсутствует изгибная упругость k и соответствующий вклад связанный с изменением кривизны поверхности дорсальной аорты. Это вызвано тем, что выражение для $\Delta H'$ не зависит от однородных деформаций, не меняющих форму аорты. Минимизируя данное выражение по $\varepsilon_{\varphi\varphi}^0$ и ε_{zz}^0 получаем выражения

для однородных деформаций дорсальной аорты, не изменяющих симметрию системы:

$$\varepsilon_{\varphi\varphi}^0 = \frac{\Delta PR(\lambda + 4\mu) - 2\lambda\sigma_{zz}}{8\mu(\lambda + \mu)}, \varepsilon_{zz}^0 = \frac{2\sigma_{zz}(\lambda + 2\mu) - \Delta PR(\lambda - 2\mu)}{8\mu(\lambda + \mu)} \quad (5.21)$$

Стоит отметить, что поле деформаций (5) возникающие при решении линейной задачи также соответствует минимуму в нелинейной постановке. Это выполняется благодаря тому, что *нелинейный* тензор (5) остается *линейным* по величинам u_r и $\partial_z u_z$

Для того, чтобы деформации (5) оставались малыми мы полагаем, что оба контролирующих параметра ΔPR и σ_{zz} намного меньше (по абсолютному значению) чем любой из коэффициентов Ламе. В таком случае свободную энергию системы $\Delta\Phi$ можно найти как функцию дополнительных виртуальных дополнительных смещений \mathbf{u}' , выбрав напряженный цилиндр, описываемый полем смещений \mathbf{u}_0 и энергией $\Phi(\mathbf{u}_0)$ в качестве нового положения равновесия.

$$\Delta\Phi(\mathbf{u}') = \Phi(\mathbf{u}) - \Phi(\mathbf{u}_0), \quad (5.22)$$

Выполнив все необходимые подстановки в (5.22) и используя соотношения ($\sigma_{zz}, \Delta PR \ll \lambda, \mu$), линейризуем модель, оставляя лишь линейные члены по ΔP и σ_{zz} и члены первого и второго порядка по компонентам поля смещений \mathbf{u}' и их производным. Поскольку компоненты равновесного поля смещений \mathbf{u}_0 (5.19) являются линейными по напряжению σ_{zz} и давлению ΔP , то все содержащие их члены в выражении $-\Delta PV$ будут как минимум квадратичными по этим величинам. Следовательно, фактически изменение объема деформированной аорты не будет зависеть от начальных равновесных смещений \mathbf{u}_0 . Само же выражение для объема дающее вклад в (5.22) будет в точности повторять выражение (5.17), после замены $\mathbf{u} \rightarrow \mathbf{u}'$ и исключения кубических по смещениям и их производным членов, так как мы рассматриваем исключительно гармоническую теорию. Итак, в рамках линейризованной теории выражение для свободной энергии системы принимает вид (5.23).

$$\Delta\Phi = \Delta\Phi^{(1)} + \int_S \left[\left(\frac{\lambda}{2} (\varepsilon'_{ii})^2 + \mu (\varepsilon'_{ik})^2 \right) + \sigma_{zz} J_1 + \Delta P J_2 \right. \\ \left. + \frac{\kappa}{2} \left(\frac{\partial_\varphi^2 u_r + R^2 \partial_z^2 u_r - \partial_\varphi u_\varphi}{R^2} \right)^2 \right] dS \quad (5.23)$$

$$J_1 = \frac{1}{8} \frac{(2R\partial_l u_r)^2 + (R\partial_l u_\varphi - \partial_\varphi u_l)^2}{R^2}, \\ J_2 = \frac{1}{16R} \left((2R\partial_l u_r)^2 - 8R\partial_\varphi u_\varphi \cdot \partial_l u_l + 3(\partial_\varphi u_l)^2 + 8\partial_\varphi u_r (\partial_\varphi u_r - u_\varphi) \right. \\ \left. - 8u_r (u_r - \partial_\varphi u_\varphi + 2R\partial_l u_l) + R\partial_l u_\varphi (3R\partial_l u_\varphi + 2\partial_\varphi u_l) \right) \quad (5.24)$$

где $\Delta\Phi^{(1)} = \frac{\partial_\varphi u_\varphi \Delta P}{2}$, а ε'_{ik} – формально линейризованный тензор деформаций ε_{ik} , компоненты которого были получены в подразделе (5.2). Подчеркнем еще раз, что (5.22) – функционал исключительно неравновесного поля \mathbf{u}' , поэтому в (5.23) и далее для простоты мы опустим штрихи в обозначении этого поля.

Считая длину аорты равной L разложим поле смещений \mathbf{u}' в ряд по следующему базису ортонормированных функций:

$$u_i(\varphi, z) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \sum_{m=-\infty}^{\infty} (A_{n,m}^i e^{i(k_m z + n\varphi)}) \quad (5.25)$$

где $k_m = \frac{2\pi m}{L}$, n, m – целые волновые числа, $A_{n,m}^i, i = 1..3$ – комплексные амплитуды соответствующих гармоник разложения. После подстановки (5.25) в (5.23) и интегрирования, линейные члены в (5.23) исчезают и выражение превращается в

$$\Delta\Phi = 2\pi RL \sum_{n=-\infty, m=-\infty}^{\infty} M_{n,m}^{i,j} A_{n,m}^i A_{n,m}^{j*}, \quad (5.26)$$

где матрица M имеет следующий вид (5.27):

$$\left[\begin{array}{ccc} \frac{\lambda + 2\mu}{R^2} + \frac{\kappa(R^2 k_m^2 + n^2)^2}{R^4} + \frac{\Delta P(R^2 k_m^2 + 2n^2 - 2)}{2R} + \sigma_{zz} k_m^2 & -i \left(\frac{\kappa(R^2 k_m^2 + n^2)}{R^4} + \frac{\lambda + 2\mu}{R^2} \right) n & -i \left(\frac{\lambda - \Delta P R}{R} \right) k_m \\ i \left(\frac{\kappa(R^2 k_m^2 + n^2)}{R^4} + \frac{\lambda + 2\mu}{R^2} \right) n & \frac{R^2(\lambda + 2\mu) + \kappa n^2 + \left(\frac{3\Delta P R + 8\mu + 2\sigma_{zz}}{8} \right) k_m^2}{R^4} & \left(\frac{\lambda + \mu - \frac{\sigma_{zz}}{4}}{R} - \frac{3\Delta P}{8} \right) n k_m \\ i \left(\frac{\lambda - \Delta P R}{R} \right) k_m & \left(\frac{\lambda + \mu - \frac{\sigma_{zz}}{4}}{R} - \frac{3\Delta P}{8} \right) n k_m & (\lambda + 2\mu) k_m^2 + \left(\frac{3\Delta P R + 8\mu + 2\sigma_{zz}}{8R^2} \right) n^2 \end{array} \right]$$

Матрица M определяет условия возможного сосуществования фаз. В высокосимметричной цилиндрической фазе должно выполняться неравенство $Det(M) > 0$, а потеря матрицей M положительной определенности означает существование смежных форм равновесия. Точки пространства контролирующих параметров $\langle \Delta PR, \sigma_{zz} \rangle$, которые нарушают это неравенство для конкретных значений волновых чисел n, m , соответствуют точкам перехода в соответствующие низкосимметричные фазы.

В данном разделе мы обобщили развитую ранее в диссертации модель липидной мембраны на случай оболочки, обладающей ненулевым модулем сдвиговой упругости, и получили новую микромеханическую модель дорсальной аорты эмбриона рыбы данио рерио – чрезвычайно популярной модельной системы для экспериментального исследования процессов эмбриогенеза. Эта модель рассматривает аорту как изотропную трубчатую мембрану, обладающую сдвиговой упругостью, находящуюся под действием гидростатического давления крови и аксиальной нагрузкой, возникающей из-за различий в скорости роста между ДА и тканей вокруг нее. Построенная модель является сильным упрощением реальной системы, однако ее использование для получения качественных результатов и выявления ключевых факторов, влияющих на изменение морфологии поверхности дорсальной аорты, оправдано, поскольку в настоящий момент не имеется точных количественных данных ни о величине давления ни о материальных константах, характеризующих, как саму аорту, так и окружающие ее ткани. В отличие от работ [125, 126], рассматривающих аналогичные системы и налагающих ограничения на симметрию микротрубки еще на этапе формулировки модели, в разработанной в диссертации модели симметрия системы является произвольной, а полученная матрица позволяет исследовать устойчивость относительно полного набора мод.

6 АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ ДОРСАЛЬНОЙ АОРТЫ

В данном разделе диссертации при помощи полученной ранее матрицы M исследуется устойчивость дорсальной аорты эмбриона данио рерио. Для этого вводится ряд не нарушающих самосогласованность модели приближений, позволяющих получить аналитически выражения для критических значений контролируемых параметров: продольного осевого напряжения и перепада давления. Построенная теория используется для описания эволюции формы дорсальной аорты в процессе ЭГП. В разделе проводится сравнительный анализ полученных результатов с уже известными решениями для классических систем, рассматриваемых в механике.

6.1 Осесимметричные критические моды

Используя матрицу M весьма просто провести численную оценку области устойчивости высокосимметричной фазы относительно полного набора мод при условии, что известны значения материальных констант, характеризующих систему. Однако, ввиду сложности определителя, получить и проанализировать аналитические выражения для критических значений управляющих параметров ΔPR и σ_{zz} напрямую весьма сложно. Поэтому мы воспользуемся рядом приближений, не нарушающих самосогласованность модели. Так как характерные размеры ДА удовлетворяют соотношению $L \gg R$, мы можем рассматривать волновой вектор k_m , как величину с непрерывным спектром значений. В тоже время, поскольку согласно данным флуоресцентной микроскопии в ходе развития эмбриона ось ДА остается прямой, разумно предположить, что возможная потеря устойчивости в системе осесимметрична и считать волновое число n равным нулю. Тогда коэффициенты $M_{12}, M_{21}, M_{23}, M_{32}$ обращаются в ноль и матрица M квазидиагонализуется, а потеря устойчивости системой происходит относительно мод гофрировки в точке

$$M_{11}M_{33} - M_{13}M_{31} = 0 \quad (6.1)$$

Выражая из (6.1) σ_{zz} как функцию волнового вектора k_m , находим его значение, минимизирующее (по абсолютной величине) напряжение σ_{zz} :

$$k_m^2 = \sqrt{\frac{4\mu(\lambda + \mu) - \Delta PR(\Delta PR - \lambda + 2\mu)}{\kappa(\lambda + 2\mu)R^2}} \quad (6.2)$$

Как будет продемонстрировано в следующем подразделе, именно относительно критической моды гофрировки с таким волновым вектором система и потеряет устойчивость. При этом критическое значение σ_{zz} задается выражением:

$$\sigma_{zz} = -\frac{\Delta PR}{2} - \frac{2\sqrt{\kappa}}{R} \sqrt{\frac{4\mu(\lambda + \mu) - \Delta PR(\Delta PR - \lambda + 2\mu)}{\lambda + 2\mu}} \quad (6.3)$$

Оба управляющих параметра ΔPR и σ_{zz} много меньше любого из коэффициентов Ламе по абсолютному значению (малость этих параметров обеспечивает малость деформации). Вследствие этого, подкоренное выражение с точностью до членов второго порядка малости принимает вид:

$$\sigma_{zz} = -\frac{\Delta PR}{2} \left(1 + 2(2\nu_{2D} - 1) \sqrt{\frac{\kappa}{E_{2D}R^2}} \right) - \frac{2\sqrt{\kappa E_{2D}}}{R} \quad (6.4)$$

где $E_{2D} = \frac{4\mu(\lambda + \mu)}{\lambda + 2\mu}$ – двумерный модуль Юнга, а $\nu_{2D} = \frac{\lambda}{\lambda + 2\mu}$ – двумерный аналог коэффициента Пуассона. Поскольку толщина стенок ДА является малой по сравнению с ее диаметром, с хорошей точностью выполняется соотношение $\kappa \ll E_{2D}R^2$, тогда выражение в скобках при $-\frac{\Delta PR}{2}$ можно считать ≈ 1 . Таким образом, отрицательные (сжимающие) напряжения роста действительно могут дестабилизировать ДА, приведя к образованию гофрировки. При этом положительное гидростатическое давление крови наоборот является стабилизирующим фактором, так как для преодоления создаваемого им в мембране растягивающего напряжения $-\frac{\Delta PR}{2}$ нужно большее сжимающее напряжение. Выражение (6.4) интересно сравнить с классическим результатом для тонкостенной цилиндрической оболочки, сжимаемой вдоль ее главной оси. После

подстановки $\Delta P = 0$ в выражение (6.4), последнее становится аналогично классическому [121]:

$$\sigma_{zz} = -\frac{2\sqrt{DEh}}{R} \quad (6.5)$$

где h – толщина оболочки, E – модуль Юнга, R – радиус оболочки, D – ее цилиндрическая жесткость.

6.2 Эволюция формы реальной системы

Теперь перейдем к сравнению полученных результатов с экспериментально наблюдаемой формой ДА на временном промежутке 25-65 часов после оплодотворения (ЧПО), в котором протекают так или иначе связанные с эндотелио-гемопозитическим переходом процессы. За это время аорта претерпевает несколько глобальных изменений: на промежутке $\sim 25-30$ ЧПО ее радиус увеличивается почти в 2 раза, однако форма остается цилиндрической; около ~ 40 ЧПО в системе начинает развиваться неустойчивость с достаточно ярко выраженным волновым вектором (Рисунок 6.1) и наконец после $\sim 60-65$ ЧПО аорта возвращается к своим исходным размерам и форме.

Несмотря на то, что разработанная линеаризованная теория рассматривает сравнительно небольшие деформации системы, в то время как радиус аорты на исследуемом временном промежутке изменяется практически в 2 раза, неравновесные напряжения, вызывающие потерю цилиндрической формы, являются малыми, и модель может использоваться для анализа устойчивости системы в каждой точке процесса. При этом, материальные константы, характеризующие систему, определяются отдельно на каждом этапе ее развития, поскольку живые ткани при физиологических условиях в большинстве своем обладают нелинейной упругостью. Подобный подход часто используется для моделирования живых тканей [122].

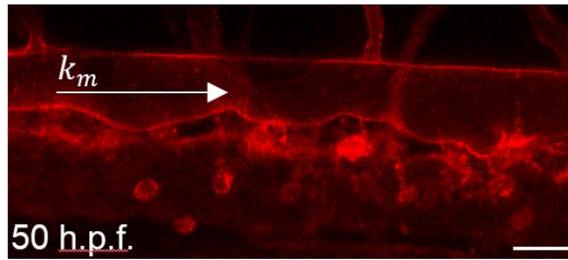


Рисунок 6.1 – Фотография сегмента дорсальной аорты эмбриона данио рерио – 50 часов после оплодотворения. Стрелкой показан волновой вектор k_m неустойчивости типа гофрировка, возникающей в системе. Масштабная метка – 25 микрометров.

По всей видимости, на начальных этапах рост трубки и окружающих ее тканей является однородным и не сопровождается возникновением напряжений, достаточных для возникновения деформаций, изменяющих симметрию системы. В тоже время увеличение радиуса трубки должно приводить к снижению кровяного давления и, согласно нашей модели (см. выражение (6.4)), к уменьшению устойчивости системы к аксиальной нагрузке. Затем, когда разность скорости роста становится достаточной для создания критического сжимающего напряжения в ДА, трубка теряет устойчивость и появляется деформация с волновым вектором k_m , изображенным на Рисунок 6.1. В дальнейшем отдельные клетки в результате развития процесса ЭГП начинают покидать ДА, что приводит к уменьшению площади ее поверхности, а, следовательно, и механических напряжений в системе, и микротрубка постепенно возвращается к своим исходным размерам и форме.

Инициация самого процесса выхода стволовых клеток из ДА также может быть обусловлена потерей устойчивости отдельными клетками аорты. Как обсуждалось в [119] использование реактивов, нарушающих полимеризацию и сокращение актина, формирующего кольцо вокруг клеток готовых к выходу из аорты клеток, приводит к тому, что часть таких клеток выпучивается не наружу, а во внутрь ДА. На основании этих данных мы можем предположить, что к неустойчивости, вызывающей ЭГП, приводят именно напряжения в плоскости аорты, создаваемые неоднородностями роста соседних клеток, а не

гидростатическое давление крови. При этом заметим, что устойчивость отдельных клеток может отличаться от устойчивости аорты как целой цилиндрической трубки. Так дополнительную жесткость ДА могут обеспечивать места соединения клеток друг с другом. Устойчивость отдельных клеток можно оценить, как устойчивость примерно плоских пластин со стороной R . При этом для величины критического напряжения имеем:

$$\sigma_{zz} = -\sigma_{zz}^{bl} - \kappa k^2 \quad (6.6)$$

где $k = l_c \pi / R$, а σ_{zz}^{bl} – положительные (растягивающие) напряжения, создаваемые кровью. Коэффициент l_c зависит от типа граничных условий. Так для шарнирно закрепленной на концах клетки $l_c=1$ (исходя из формы клеток и поведения их границ в процессе ЭГП, шарнирное закрепление является наиболее близким видом граничных условий из стандартного набора). Выражение (6.6) достаточно просто получить, в частности это можно сделать, исходя из того, что $M_{11} = 0$ при $R \rightarrow \infty$, что соответствует переходу от цилиндрической геометрии к плоской.

6.3 Неосесимметричные неустойчивости в дорсальной аорте и обсуждение схожих систем.

Развитая модель может быть использована и для описания других подобных аорте систем. Интересно сравнить предсказания модели с результатами исследований похожих систем, представленными в литературе. Так в работе [126] рассматривалась артерия, находящаяся под действием разности давлений и осевых напряжений. Согласно авторам под действием распирающего гидростатического давления $\Delta P > 0$ трубчатая мембрана может потерять устойчивость даже при положительных значениях напряжения σ_{zz} . При этом в качестве критической выступает мода прогиба с волновым вектором $k_m = \pi / L$. Аналогичная мода описывает потерю устойчивости упругого стержня с шарнирно закрепленными концами, подверженного осевому сжатию [91]. Рассматривать подобную неустойчивость ДА (в отличие от артерий) нецелесообразно, поскольку как

показывают экспериментальные данные ей не дает развиваться матрица окружающих аорту тканей. Тем не менее интересно рассмотреть устойчивость относительно подобной моды в рамках нашей модели. Для этого положим $n=1$ и, как и ранее, исследуем положительную определенность матрицы M . Определитель матрицы в таком случае является многочленом восьмой степени по волновому вектору k_m вида:

$$D = a_1 k_m^2 + a_2 k_m^4 + a_3 k_m^6 + a_4 k_m^8 \quad (6.7)$$

здесь, как и ранее, $k_m = \frac{2\pi m}{L}$, а коэффициенты a_i являются функциями параметров ΔP и σ_{zz} . Определитель (6.7) не содержит свободного члена и обращается в ноль при $k_m = 0$. Такое тривиальное решение соответствует безэнергетической (голдстоуновской) моде ($n=1, k=0$), описывающей движение трубки как целого. Чтобы найти критическое значение сжимающего напряжения σ_{zz} , приводящего к потере осесимметричной формы трубки, введем нормализованный волновой вектор $k = k_m R$. Учитывая, что для длинной трубки ($L \gg R$) критический волновой вектор k является малой, но в тоже время конечной величиной, значение параметра σ_{zz} , при котором развивается неустойчивость, можно оценить из уравнения $a_1 k^2 + a_2 k^4 = 0$. Для аналитической оценки решения воспользуемся соотношением $\Delta P R \ll \mu, \lambda$, а также малостью k . Тогда критическое сжимающее напряжение можно записать в следующем виде:

$$\sigma_{zz}^{buck} = -2\mu \frac{(\lambda + \mu)R^2 + \kappa}{(\lambda + 2\mu)R^2 + \kappa} k^2 \quad (6.8)$$

Теперь рассмотрим другой тип неустойчивости в системе, вызываемый разностью давлений ΔP . Предположим, что после потери устойчивости трубка сохраняет трансляционную симметрию и подставляем $k_m = 0$ в матрицу M . Если выполняется условие $|n| > 1$, устойчивость системы определяется следующим неравенством:

$$M_{11}M_{22} - M_{12}M_{21} > 0 \quad (6.9)$$

При этом случай с $|n| \leq 1$ должен рассматриваться отдельно, поскольку трансляция и поворот трубки как целого нарушают неравенство (6.9), но не влияют на устойчивость трубки. Решая неравенство (6.9) относительно ΔP , получаем выражение для разности давлений:

$$\Delta P > -\frac{(n^2 - 1)(\lambda + 2\mu)\kappa}{R^3(\lambda + 2\mu + \kappa/R^2)} \quad (6.10)$$

Принимая во внимание соотношения $\kappa \ll \lambda R^2, \mu R^2$, мы можем упростить (6.10) до:

$$\Delta P > -\frac{(n^2 - 1)\kappa}{R^3} \quad (6.11)$$

Из неравенства (6.11) легко получить, что рассматриваемая неустойчивость связана с дважды вырожденной модой $|n| = 2, k_m = 0$ и возникает, когда разность давлений достигает критического значения (6.12).

$$\Delta P = -\frac{3\kappa}{R^3} \quad (6.12)$$

Согласно этому классическому результату [121], поперечное сечение упругой цилиндрической оболочки, находящейся под действием критического сжимающего гидростатического давления, принимает овальную форму. Однако, как и рассмотренная ранее Эйлера неустойчивость, эта неустойчивость поперечного сечения также не наблюдается в дорсальной аорте, поскольку давление крови является, очевидно, положительным.

Теперь сравним устойчивость трубки относительно найденных критических мод длинноволнового изгиба, гофрировки и поперечного сечения. Для этого введем два малых безразмерных параметра: нормализованное давление $p = \Delta PR/E$ и нормализованную изгибную упругость $\gamma = \sqrt{\frac{\kappa}{E_{2D}R^2}}$ и для наглядности рассмотрим случай несжимаемого материала трубки, положив двумерный аналог коэффициента Пуассона равным единице $\nu_{2D} \approx 1$ (в отличие от трехмерного случая, в котором несжимаемому материалу соответствует значение $\nu = 1/2$). Тогда, оставив только первые значащие по γ и κ члены, выражения (6.4), (6.8) и (6.12) можно переписать соответственно как (6.13), (6.14) и (6.15) соответственно.

$$\sigma_{zz}^{corr} = - \left[\frac{p}{2} (1 + 2\gamma) + \gamma \right] E_{2D} \quad (6.13)$$

$$\sigma_{zz}^{buck} \approx - \frac{E_{2D}}{2} \left(\frac{2\pi R}{L} \right)^2 \quad (6.14)$$

$$p \approx -3\gamma^2 \quad (6.15)$$

Уравнение (6.14) показывает, что критическое значение осевого напряжения σ_{zz}^{buck} ведущее к Эйлеровой неустойчивости пропорционально квадрату отношения радиуса трубки к ее длине, в то время как устойчивость моды гофрировки не зависит от соотношения этих размеров вовсе (6.13). На рисунке 6.2 изображена область устойчивости системы в пространстве параметров нормализованного давления p и нормализованного осевого напряжения $\sigma = \frac{\sigma_{zz}}{E_{2D}}$. В рассматриваемом приближении граница устойчивости моды Эйлера изгиба будет представлять собой прямую горизонтальную линию, а граница устойчивости моды гофрировки будет задаваться прямой с коэффициентом наклона $\approx -\frac{1}{2}$, пересекающей ось абсцисс в точке $\sigma = -\gamma$, и, наконец, вертикальная прямая линия $p = -3\gamma^2$ соответствует неустойчивости поперечного сечения с волновыми числами $|n|=2, m=0$. В отличие от [126] в разработанной в диссертации модели растянутая трубка не может быть дестабилизирована положительным перепадом давления.

6.4 Вклад окружающих тканей в устойчивость системы.

Итак, в подразделах 6.1 и 6.3 были рассмотрены возможные критические моды, а также то, каким образом материальные константы, характеризующие трубку, определяют область устойчивости системы в пространстве контролируемых параметров $\langle \sigma, p \rangle$ (нормализованное осевое напряжение и нормализованное давление, соответственно). Однако все это время мы лишь косвенно учитывали влияние окружающих трубку тканей. В данном подразделе исследуется как устойчивость системы зависит от свойств окружающей матрицы тканей.

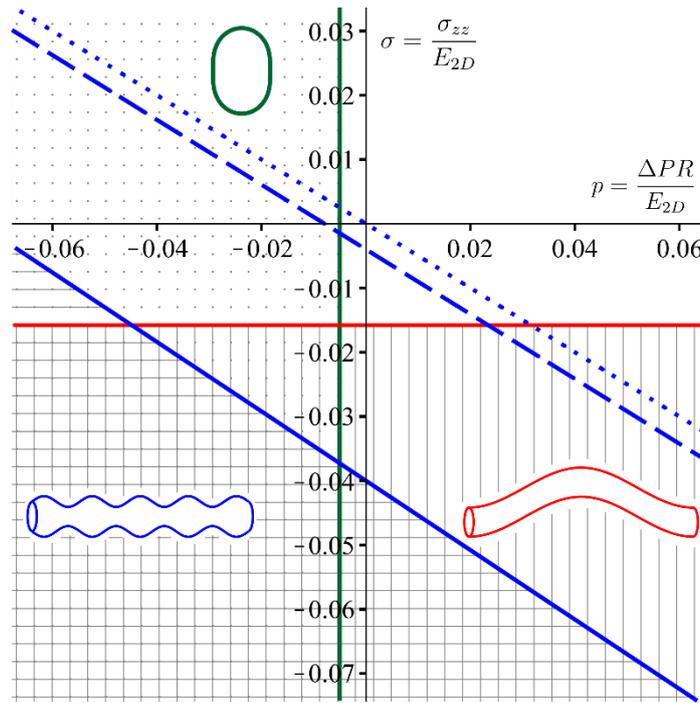


Рисунок 6.2 – Устойчивость критических мод трубки с соотношением $r/L=1/50$. Не закрашенная область соответствует высокосимметричной цилиндрической фазе. Красная линия соответствует критическим значениям аксиальной силы σ приводящим к возникновению классического баклинга с периодом равным длине аорты. Зеленая вертикальная линия соответствует критическому значению давления ведущему к неустойчивости поперечного сечения с волновыми числами $|n|=2, m=0$ для трубки с нормализованной изгибной упругостью $\gamma = 1/25$. Набор синих линий соответствует критическим значениям аксиальной силы σ , приводящим к возникновению неустойчивости типа гофрировка в трубках с различными изгибными жесткостями: сплошная линия – $\gamma = 1/25$, прерывистая линия – $\gamma = 1/250$, пунктирная линия – $\gamma = 0$.

Простейшим способом учесть влияние среды в случае ДА является введение в энергию (6) члена $-\frac{C}{2}u_r^2$, где C – феноменологический коэффициент пининга [124,125]. Обычно в случае цилиндрических оболочек, окруженных упругой эластичной средой, тангенциальный пининг намного слабее радиального, поэтому для большей наглядности мы оставляем лишь член пропорциональный квадрату радиальных смещений в энергии (5.23), как это было сделано в работах [124,125]. Заметим, что согласно экспериментальным данным в процессе развития эмбриона

(30-60 ЧПО) клетки, формирующие трубку, способны со временем мигрировать, обеспечивая целостность мембраны, после выхода отдельных клеток, превращающихся в стволовые [119]. Этот экспериментальный факт также подтверждает целесообразность использования исключительно радиального пининга. В матрице M это приведет к появлению дополнительного слагаемого C в элементе M_{11} . В результате из-за взаимодействий между аортой и окружающими ее тканями неравенство, описывающее неустойчивость поперечного сечения микротрубки (6.11) принимает следующий вид:

$$\Delta P > -\frac{CR}{(n^2 - 1)} - \frac{(n^2 - 1)\kappa}{R^3} \quad (6.16)$$

Если пининг достаточно слабый $CR^4 \leq \kappa$, то потеря устойчивости поперечного сечения происходит по моде $|n|=2, m=0$, как и в случае свободной трубки. Однако, когда взаимодействие с окружающей средой играет существенную роль $CR^4/\kappa \gg 1$ – трубка теряет устойчивость по модам с волновыми числами $|n|>2$.

Выражение для критического значения осевого напряжения σ_{zz} , соответствующего потери устойчивости относительно мод гофрировки, также изменяется при введении радиального пининга:

$$\sigma_{zz} = -\frac{\Delta PR}{2} \left(1 + 2(2\nu - 1) \sqrt{\frac{\kappa}{E'_{2D} R^2}} \right) - \frac{2\sqrt{\kappa E'_{2D}}}{R} \approx -\frac{\Delta PR}{2} - \frac{2\sqrt{\kappa E'_{2D}}}{R} \quad (6.17)$$

где $E'_{2D} = E_{2D} + CR^2$ – эффективный модуль Юнга. В тоже время после введения пининга в полиноме (6.7) появляется дополнительный свободный член, приводящий к тому, что моды с периодом порядка длины трубки уже не являются критическими. Таким образом, полученная ранее в подразделе 6.1 оценка критических сжимающих напряжений σ_{zz} остается адекватной, с той лишь разницей, что учет взаимодействия ДА с окружающими ее тканями может существенно повышать эффективный модуль Юнга аорты, не сказываясь при этом на изгибной жесткости κ . Аналогичный результат был получен в работе [125], где было проведено исследование схожей системы. Прост с соавторами показали, что

погруженная в матрицу тканей артерия теряет устойчивость именно при возникновении отрицательных сжимающих напряжений по модам гофрировки (называемых в работе [125] *varicose instability*), а не подобно Эйлеровому стержню, как в работе [126]. Стоит, однако, отметить ряд существенных отличий развиваемой в диссертации модели от модели из работы [125]. Прежде всего исследуемая в работе [125] артерия не находится под действием сжимающих осевых напряжений, но просто обладает энергией аналогичной энергии границы раздела сред, подобно липидной мембране. В [125] данная особенность объясняется существованием сложной структуры артерий, рассматриваемых как эластичные трубки, покрытые изнутри монослоем эпителиальных клеток, рост которых, согласно авторам, и приводит к возникновению аналога поверхностного натяжения. В то время как использование данного приближения по отношению к артериям может быть в ряде случаев оправданным, для описания дорсальной аорты эмбриона данио рерио, состоящей из одного слоя тонких клеток, использование компонент напряжений типа σ_{ii} является необходимым, ввиду наличия модулей сдвиговой упругости.

В данном разделе диссертации были рассмотрены критические неустойчивости возможные в ДА, а именно: радиальная гофрировка, длинноволновый изгиб и деформация поперечного сечения. Была найдена область устойчивости высокосимметричной цилиндрической фазы ДА в пространстве безразмерных параметров: нормализованное осевое напряжение и нормализованное гидростатическое давление, а также исследовано, как ее границы зависят от материальных констант, характеризующих аорту и окружающие ее ткани. Результаты проведенного теоретического анализа были использованы для интерпретации экспериментальных данных, полученных группой проф. Каримы Киссы (англ. Karima Kissa) в ходе исследования развития аорты эмбриона данио рерио. Было показано, что образование гофрировки аорты в процессе развития эндотелио-гемопоэтического перехода связано с потерей устойчивости системы под действием механических напряжений, а не осуществляется при помощи

специализированных генетически запрограммированных механизмов эмбриогенеза. Более того, изменение формы отдельных, покидающих аорту в процессе ЭГП, клеток также удалось объяснить с позиций построенной теории. Разработанная в диссертации модель может быть также использована для анализа поведения других систем со схожей геометрией, как биотических, так и абиотических: кровеносных сосудов, уретры, или обычных водопроводных труб. Предложенную теорию достаточно просто адаптировать на случай сферической геометрии для моделирования, например, композитных везикул.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты и выводы диссертации сводятся к следующему:

1. Разработана модель вытянутой из везикулы липидной трубки, учитывающая асимметрию липидного бислоя, силу поверхностного натяжения, перепад давления между внутренним пространством мембраны и внешней средой, а также приложенную к трубке осевую внешнюю силу.

2. Показано, что совместное равновесие липидной трубки и везикулы в пространстве: нормализованная осевая сила, приложенная к ТЛМ, и нормализованная собственная кривизна липидного бислоя, реализуется на некоторой кривой, которая характеризуется малыми значениями перепада давления и заканчивается в точке неустойчивости эйлерового типа.

3. При помощи формализма теории фазовых переходов Л. Д. Ландау в кристаллах и концепции критических параметров порядка построена теория, описывающая критическое и закритическое поведение липидной трубки, и показано, что трубка сначала претерпевает радиальную гофрировку с волновым вектором порядка периметра ТЛМ, а затем хиральный изгиб, впервые обнаруженный в такого рода системах.

4. Предложен подход, описывающий индуцированные мембраной анизотропные взаимодействия между белками, который моделирует действие адсорбированных белковых молекул на липидный бислой при помощи силовых мультиполей – наборов точечных сил, удовлетворяющих условиям механического равновесия.

5. Впервые использованные для такой системы граничные условия, соответствующие шарнирно закрепленной на концах ТЛМ, позволили описать склонность таких белков, как эндофилин, к осаждению в областях вблизи концов липидной трубки, наблюдаемую экспериментально.

6. Доказано, что равновесная форма закрепленной на концах ТЛМ несколько отличается от идеального цилиндра, даже в простейшем случае с нулевой разностью давлений и нулевой собственной кривизной липидного бислоя.

7. Развитая модель ТЛМ обобщена на случай упругой трубки с ненулевым модулем сдвига, которая встроена в упругую матрицу тканей и находится под действие разности давления и осевых напряжения, и использована для описания эндотелио-гемопозитического перехода в дорсальной аорте эмбриона рыбы данио рерио.

8. Получена область устойчивости дорсальной аорты в пространстве параметров: нормализованное давление, нормализованное осевое напряжение, показано, что она ограничена тремя типами мод: гофрировка, неустойчивость поперечного сечения, неустойчивость эйлерового типа.

9. На основании проведенного теоретического анализа и данных электронной микроскопии было установлено, что крупномасштабные изменения формы дорсальной аорты, а также отдельных клеток, которые в последствии становятся стволовыми, являются следствием неустойчивостей, возникающих в системе под действием механических напряжений.

Список литературы

1. Rochal, S.B. Viscoelastic dynamics of spherical composite vesicles / S.B. Rochal, V.L. Lorman, G. Mennessier // *Phys. Rev. E.* – 2005. – V. 71. – N. 2. – P. 021905.
2. Brangwynne, C.P. Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement / C.P. Brangwynne, F.C. MacKintosh, S. Kumar, N.A. Geisse, J. Talbot, L. Mahadevan, K.K. Parker, D.P. Ingber, D.A. Weitz // *JCB.* – 2006. – V. 173. – N. 5. – P. 733-741.
3. Savin, T. On the growth and form of the gut / T. Savin, N. Kurpios, A. SHyer, P. Florescu, H. Liang, L. Mahadevan, C.J. Tabin // *Nature.* – 2011. – V. 476. – N. 7358. – P. 57-62.
4. Alstrom, P. Instability and "Sausage-String" Appearance in Blood Vessels during High Blood Pressure / P. Alstrom, V. Eguiluz, M. Colding-Jorgensen // *Phys. Rev. Lett.* – 1999. – V. 82. – N. 9. – P. 08585-3.

5. Konevtsova, O.V. Theory of morphological transformation of viral capsid shell during the maturation process in the HK97 bacteriophage and similar viruses / O.V. Konevtsova, V.L. Lorman, S.B. Rochal // *Phys. Rev. E.* – 2016. – V. 93. – N. 5. – P. 052412.
6. Canham, P.B. The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell / P.B. Canham // *J. Theor. Biol.* – 1970. – V. 26. – N. 1. – P. 61-81.
7. Helfrich, W. Elastic Properties of Lipid Bilayer: Theory and Possible Experiments / W. Helfrich // *Z. Naturforsch.* – 1973. – N. 28. – P. 693-703.
8. McMahon, H.T. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling / H.T. McMahon, J.L. Gallop // *Nature.* – 2005. – V. 438. – N. 7068. – P. 590-6.
9. Sorre, B. Nature of curvature coupling of amphiphysin with membranes depends on its bound density / B. Sorre, A. Callan-Jones, J. Manzi, B. Goud, J. Prost, P. Bassereau, A. Roux // *PNAS.* – 2012. – V. 109. – N. 1. – P. 173-178.
10. Solon, J. Membrane deformations induced by the matrix protein of vesicular stomatitis virus in a minimal system / J. Solon, O. Gareil, P. Bassereau, Y. Gaudin // *J. Gen. Virol.* – 2005. – V. 86. – N. 12. – P. 3357-63.
11. Gorter, E. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood / E. Gorter, F. Grendel // *J Exp. Med.* – 1925. – V. 41. – N. 4. – P. 439-443.
12. Danielli, J. A contribution to the theory of permeability of thin films / J. Danielli, H. Davson // *J. Cell. Comp. Physiol.* – 1935. – V. 5. – P. 495-508.
13. Steere, R.L. Electron microscopy of structural detail in frozen biological specimens / R.L. Steere // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* – 1957. – V. 1. – N. 3. – P. 45-60.
14. Singer, S.J. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes / S.J. Singer, G.L. Nicolson // *Science.* – 1972. – V. 175. – N. 4023. – P. 720-731.
15. Рубин, А.Б. Биофизика, учебник в 2 т. / А.Б. Рубин – 3-е изд.: издательство Московского университета, 2004. – Т. 2. – 464 с.

16. Геннис, Р. Бимомембраны. Молекулярная структура и функции: перевод с англ. / Р. Геннис – 1-е изд.: Мир, 1997. – 624 с.
17. O'Brien, J.S. Cell membranes—Composition: Structure: Function / J.S. O'Brien // *J. Theoret. Biol.* – 1967. – V. 15. – N. 3. – P. 307-312.
18. Cooper, G.M. *The Cell: A Molecular Approach* / G.M. Cooper – 2nd ed.: Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000. – <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/> pp.
19. Schekman, R. 23 genes 23 years later / R. Schekman, P. Novick // *Cell.* – 2004. – V. S116. – P. S13-S15.
20. Springer, S. Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs / S. Springer, R. Schekman // *Science.* – 1998. – V. 281. – N. 5377. – P. 698-700.
21. Rothman, J.E. Mechanisms of intracellular protein transport / J.E. Rothman // *Nature.* – 1994. – V. 372. – N. 6501. – P. 55-63.
22. Spceter, A.A. Membrane lipid composition and cellular function / A.A. Spceter, M.A. Yorek // *J. Lipid Res.* – 1985. – V. 26. – N. 9. – P. 1015-35.
23. Farge, E. Enhancement of endocytosis due to aminophospholipid transport across the plasma membrane of living cells / E. Farge, D.M. Ojcius, A. Subtil, A. Dautry-Varsat // *Am. J. Physiol.* – 1999. – V. 276. – N. 3. – P. c725-33.
24. Hua, Z. Requirement for Neolp in Retrograde Transport from the Golgi Complex to the Endoplasmic Reticulum / Z. Hua, T.R. Graham // *Mol. Biol. Cell.* – 2003. – V. 14. – N. 12. – P. 4971-4983.
25. Алфутов, Н.А. Основы расчета на устойчивость упругих систем / Н.А. Алфутов : Машиностроение, 1978. – 312 с.
26. Evans, E. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes / E. Evans, W. Rawicz // *Phys. Rev. Lett.* – 1990. – V. 64. – N. 17. – P. 2094-2097.
27. Brochard, F. Frequency spectrum of flicker phenomenon in erythrocytes / F. Brochard, J.F. Lennon // *J. Phys. France.* – 1975. – V. 36. – N. 11. – P. 1035-1047.

28. Brown, W.J. Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function / W.J. Brown, K. Chambers, A. Doody // *Traffic*. – 2003. – V. 4. – N. 4. – P. 214-21.
29. Faucon, J.F. Bending elasticity and thermal fluctuations of lipid membranes. Theoretical and experimental requirements / J.F. Faucon, M.D. Mitov, P. Méléard, I. Bivas, P. Bothorel // *J. Phys. France*. – 1989. – V. 50. – N. 17. – P. 2389-2414.
30. Brochard, F. Surface tension and deformations of membrane structures : relation to two-dimensional phase transitions / F. Brochard, P.G. De Gennes, P. Pfeuty // *J. Phys. France*. – 1976. – V. 37. – N. 10. – P. 1099-1104.
31. Liu, Y. Diffuse scattering provides material parameters and electron density profiles of biomembranes / Y. Liu, J. Nagle // *Phys. Rev. E*. – 2004. – V. 69. – N. 4. – P. 040901.
32. Pfeiffer, W. Neutron spin echo study of membrane undulations in lipid multibilayers / W. Pfeiffer, S. König, J.F. Legrand, T. Bayerl, D. Richter, E. Sackmann // *Europhys. Lett.* – 1993. – V. 23. – N. 6. – P. 457-462.
33. Bo, L. Determination of bilayer membrane bending stiffness by tether formation from giant, thin-walled vesicles / L. Bo, R.E. Waugh // *Biophys. J.* – 1989. – V. 55. – N. 3. – P. 509-17.
34. Waugh, R.E. Local and nonlocal curvature elasticity in bilayer membranes by tether formation from lecithin vesicles / R.E. Waugh, J. Song, S. Svetina, B. Zeks // *Biophys. J.* – 1992. – V. 61. – N. 4. – P. 974-82.
35. Gauss-Bonnet theorem [Электронный ресурс] // *Encyclopedia of Mathematics* – Режим доступа:
http://www.encyclopediaofmath.org/index.php?title=Gauss-Bonnet_theorem&oldid=33081.html.
36. Hu, M. Determining the gaussian curvature modulus of lipid membranes in simulations / M. Hu, J.J. Briguglio, M. Deserno // *Biophys. J.* – 1992. – V. 61. – N. 4. – P. 974-82.

37. Lipowsky, R. Budding of membranes induced by intramembrane domains / R. Lipowsky // *J. Phys. II France*. – 1992. – V. 2. – N. 10. – P. 1825-1840.
38. Lipowsky, R. Domain-induced budding of fluid membranes / R. Lipowsky // *Biophys. J.* – 1993. – V. 64. – N. 4. – P. 1133-1138.
39. Jülicher, F. Domain-induced budding of vesicles / F. Jülicher, R. Lipowsky // *Phys. Rev. Lett.* – 1993. – V. 70. – N. 19. – P. 2964-2967.
40. Jülicher, F. Shape transformations of vesicles with intramembrane domains / F. Jülicher, R. Lipowsky // *Phys. Rev. E*. – 1996. – V. 53. – N. 3. – P. 2670-2683.
41. Semrau, S. Accurate Determination of Elastic Parameters for Multicomponent Membranes / S. Semrau, T. Idema, L. Holtzer, T. Schmidt, C. Storm // *Phys. Rev. Lett.* – 2008. – V. 100. – N. 8. – P. 088101.
42. Deuling, H.J. Red blood cell shapes as explained on the basis of curvature elasticity / H.J. Deuling, W. Helfrich // *Biophys. J.* – 1976. – V. 16. – N. 8. – P. 861-868.
43. Leibler, S. Curvature instability in membranes / S. Leibler // *J. Phys. France*. – 1986. – V. 47. – N. 3. – P. 507-516.
44. Singh, P. Curvature sorting of proteins on a cylindrical lipid membrane tether connected to a reservoir. / P. Singh, P. Mahata, T. Baugmart, S.L. Das // *Phys. Rev. E*. – 2012. – V. 85. – N. 5. – P. 051906.
45. Jelerčič, Equilibrium shapes of tubular lipid membranes / Jelerčič // *Soft Matter*. – 2017. – V. 13. – N. 16. – P. 3048-3052.
46. Frolov, V.A. Lipid polymorphisms and membrane shape. / V.A. Frolov, A.V. Shnyrova, J. Zimmerberg // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2011. – V. 3. – N. 11. – P. a004747.
47. Kozlov, M.M. Mechanisms shaping cell membranes. / M.M. Kozlov, F. Campelo, N. Liska, L.V. Chernomordik, S.J. Marrink, H. McMahon // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2014. – V. 29. – P. 53-60.
48. Zimmerberg, J. How proteins produce cellular membrane curvature / J. Zimmerberg, M.M. Kozlov // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2006. – V. 7. – P. 9-19.

49. Mui, B.L. Influence of transbilayer area asymmetry on the morphology of large unilamellar vesicles / B.L. Mui, H.G. Döbereiner, T.D. Madden, P.R. Cullis // *Biophys. J.* – 1995. – V. 69. – N. 3. – P. 930-941.
50. Sorre, B. Curvature-driven lipid sorting needs proximity to a demixing point and is aided by proteins / B. Sorre, A. Callan-Jones, J.B. Manneville, P. Nassoy, J.F. Joanny, J. Prost, B. Goud, P. Bassereau // *PNAS.* – 2009. – V. 106. – N. 14. – P. 5622-5626.
51. Callan-Jones, A. Curvature-driven membrane lipid and protein distribution / A. Callan-Jones, P. Bassereau // *Curr. Opin. Solid State and Mater. Sci.* – 2013. – V. 17. – N. 4. – P. 143-150.
52. Kučerka, N. Fluid phase lipid areas and bilayer thickness of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature / N. Kučerka, M.P. Nieh, J. Katsaras // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – V. 1808. – N. 11. – P. 2761-71.
53. Papadopoulos, A. Flippase activity detected with unlabeled lipids by shape changes of giant unilamellar vesicles / A. Papadopoulos, S. Vehring, I. Lopez-Montero, L. Kutschenko, M. Stöckl, P.F. Devaux, M. Kozlov, T. Pomorki, A. Herrmann // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – N. 21. – P. 15559-68.
54. Mui, B.L. Influence of transbilayer area asymmetry on the morphology of large unilamellar vesicles / B.L. Mui, H.G. Döbereiner, T.D. Madden, P.R. Cullis // *Biophys. J.* – 1995. – V. 69. – N. 3. – P. 930-941.
55. Fournier, J.B. Chemically Triggered Ejection of Membrane Tubules Controlled by Intermonolayer Friction / J.B. Fournier, N. Khalifat, N. Puff, M.I. Angelova // *Phys. Rev. Lett.* – 2009. – V. 102. – N. 1. – P. 018102.
56. Hirokawa, N. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport / N. Hirokawa, Y. Noda, Y. Tanaka, S. Niwa // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – V. 10. – N. 10. – P. 682-96.
57. Blood, P.D. Direct observation of Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-induced membrane curvature by means of molecular dynamics simulations / P.D. Blood, G.A. Voth // *PNAS.* – 2006. – V. 103. – N. 41. – P. 15068-15072.

58. Stachowiak, J.C. Membrane bending by protein–protein crowding / J.C. Stachowiak, E.M. Schmid, C.J. Ryan, H.S. Ann, D.Y. Sasaki, M.B. Sherman, P.L. Geissler, D.A. Fletcher, C.C. Hayden // *Nat. Cell Biol.* – 2012. – V. 14. – N. 9. – P. 944-9.
59. Bickel, T. Local entropic effects of polymers grafted to soft interfaces / T. Bickel, C. Jeppesen, C.M. Marques // *Eur. Phys. J. E.* – 2001. – V. 4. – N. 1. – P. 33-43.
60. Breidenich, M. The shape of polymer-decorated membranes / M. Breidenich, R.R. Netz, R. Lipowsky // *EPL.* – 2000. – V. 49. – N. 4. – P. 431-437.
61. Roux, A. Membrane curvature controls dynamin polymerization / A. Roux, G. Koster, M. Lenz, B. Sorre, J.B. Manneville, P. Nassoy, P. Bassereau // *PNAS.* – 2010. – V. 107. – N. 9. – P. 4141-6.
62. Simunovic, M. When physics takes over / M. Simunovic, G.A. Voth, A. Callan-Jones, P. Bassereau // *Trends Cell Biol.* – 2015. – V. 25. – N. 12. – P. 780-92.
63. Capraro, B. Curvature Sensing by the Epsin N-Terminal Homology Domain Measured on Cylindrical Lipid Membrane Tethers / B. Capraro, Y. Yoon, W. Cho, T. Baumgart // *J Am. Chem. Soc.* – 2010. – V. 132. – N. 4. – P. 1200-1201.
64. Picas, L. BIN1/M-Amphiphysin2 induces clustering of phosphoinositides to recruit its downstream partner dynamin. / L. Picas, J. Viaud, K. Schauer, S. Vanni, K. Hnia, V. Fraisier, A. Roux, P. Bassereau, F. Gaits-lacovoni, B. Payrastre, et al. // *Nat. Commun.* – 2014. – V. 5. – N. 5647.
65. Heinrich, M.C. Quantifying Membrane Curvature Generation of Drosophila Amphiphysin N-BAR Domains / M.C. Heinrich, B.R. Capraro, A. Tian, J.M. Isas, R. Langen, T. Baumgart // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2016. – V. 1. – N. 23. – P. 3401-3406.
66. Frost, A. Structural Basis of Membrane Invagination by F-BAR Domains / A. Frost, R. Perera, A. Roux, K. Spasov, O. Destaing, E.H. Egelman, P. De Camilli, V.M. Unger // *Cell.* – 2008. – V. 132. – N. 5. – P. 807-817.
67. Mim, C. Structural Basis of Membrane Bending by the N-BAR Protein Endophilin / C. Mim, H. Cui, J.A. Gawronski-Salerno, A. Frost, E. Lyman, G.A. Voth, V.M. Unger // *Cell.* – 2012. – V. 149. – N. 1. – P. 137-145.

68. Zimmerberg, J. Membrane curvature: how BAR domains bend bilayers / J. Zimmerberg, S. McLaughlin // *Curr. Biol.* – 2004. – V. 14. – N. 6. – P. R250-2.
69. Gallop, J.L. Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature / J.L. Gallop, C.C. Jao, H.M. Kent, P.J. Butler, P.R. Evans, R. Langen, H.T. McMahon // *EMBO J.* – 2006. – V. 25. – N. 12. – P. 2898-2910.
70. Kabaso, D. Attachment of rod-like (BAR) proteins and membrane shape / D. Kabaso, E. Gongadze, P. Elter, U. van Rienen, J. Gimsa, V. Kralj-Iglič, A. Iglič – 2011. – V. 11. – N. 4. – P. 272-282.
71. Lee, C. Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells / C. Lee, L.B. Chen // *Cell.* – 1988. – V. 54. – N. 1. – P. 37-46.
72. Mollenhauer, H.H. The tubular network of the Golgi apparatus. / H.H. Mollenhauer, D.J. Morré // *Histochem. Cell Biol.* – 1998. – V. 109. – N. 5-6. – P. 533-43.
73. Gerdes, H.H. Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes / H.H. Gerdes, R.N. Carvalho // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2008. – V. 20. – N. 4. – P. 470-5.
74. Waugh, R. Surface viscosity measurements from large bilayer vesicle tether formation. II. Experiments. / R. Waugh // *Biophys. J.* – 1982. – V. 38. – N. 1. – P. 29-37.
75. Rossier, O. Giant vesicles under flows: extrusion and retraction of tubes / O. Rossier, D. Cuvelier, N. Borghi, P.H. Puech, I. Derényi, A. Buguin, P. Nassoy, F. Brochard-Wyart // *Langmuir.* – 2003. – V. 19. – N. 3. – P. 575-584.
76. Borghi, N. Hydrodynamic extrusion of tubes from giant vesicles / N. Borghi, O. Rossier, F. Brochard-Wyart // *EPL.* – 2003. – V. 64. – N. 6. – P. 837-843.
77. Kantsler, V. Critical dynamics of vesicle stretching transition in elongational flow / V. Kantsler, E. Segre, V. Steinberg // *Soft Matter.* – 2008. – V. 101. – N. 4. – P. 048101.
78. Evans, E. Hidden dynamics in rapid changes of bilayer shape / E. Evans, A. Yeung // *Chem. Phys. Lipids.* – 1994. – V. 73. – N. 1-2. – P. 39-56.

79. Fournier, J.B. Effective-Area Elasticity and Tension of Micromanipulated Membranes / J.B. Fournier, A. Ajdari, L. Peliti // *Phys. Rev. Lett.* – 2001. – V. 86. – N. 21. – P. 4970.
80. Roux, A. Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. / A. Roux, D. Cuvelier, P. Nassoy, J. Post, P. Bassereau, B. Goud // *EMBO J.* – 2005. – V. 24. – N. 8. – P. 1537-45.
81. Heinrich, M. Dynamic sorting of lipids and proteins in membrane tubes with a moving phase boundary / M. Heinrich, A. Tian, C. Esposito, T. Baumgart // *PNAS.* – 2010. – V. 106. – N. 16. – P. 7208-7213.
82. Derényi, I. Formation and interaction of membrane tubes. / I. Derényi, F. Jülicher, J. Prost // *Phys. Rev. Lett.* – 2002. – V. 88. – N. 23. – P. 238101.
83. Heinrich, V. A piconewton force transducer and its application to measurement of the bending stiffness of phospholipid membranes / V. Heinrich, E.R. Waugh // *Ann. of Biochem. Eng.* – 1996. – V. 24. – N. 5. – P. 595-605.
84. Cuvelier, D. Coalescence of membrane tethers: experiments, theory, and applications / D. Cuvelier, I. Derényi, P. Bassereau, P. Nassoy // *Biophys. J.* – 2005. – V. 88. – N. 4. – P. 2714-2726.
85. Philips, R. *Physical Biology of the Cell* / R. Philips, J. Kondev, J. Theriot – 2nd ed.: Garland Science, 2009. – 1057 pp.
86. Monnier, S. Long-range protein coupling mediated by critical low-energy modes of tubular lipid membranes / S. Monnier, S.B. Rochal, A. Parmeggiani, V.L. Lorman // *Phys. Rev. Lett.* – 2010. – V. 105. – N. 2. – P. 2010.
87. Fournier, J.B. Critical fluctuations of tense fluid membrane tubules / J.B. Fournier, P. Galatola // *Phys. Rev. Lett.* – 2007. – V. 98. – N. 1. – P. 018103.
88. Gurin, K.L. Dynamic instability of a membrane tube / K.L. Gurin, V.V. Lebedev, A.R. Muratov // *JETP.* – 1996. – V. 83. – N. 2. – P. 321-326.
89. Descerno, M. Fluid lipid membranes: from differential geometry to curvature stresses. / M. Descerno // *Chem. Phys. Lipids.* – 2015. – V. 185. – P. 11-45.

90. Fournier, J.B. Corrections to the Laplace law for vesicle aspiration in micropipettes and other confined geometries / J.B. Fournier, P. Galatola // *Soft Matt.* – 2008. – V. 4. – N. 12. – P. 2463-2470.
91. Ландау, Л.Д. Теоретическая физика: Учеб. пособ.: Для вузов. В 10 т. Теория упругости. / Л.Д. Ландау, Е.М. Лифшиц – 5-е изд.: ФИЗМАТЛИТ, 2003. – Т. VII. – 264 с.
92. Ландау, Л.Д. Теоретическая физика: Учеб. пособ.: Для вузов. В 10 т. Статистическая физика. Ч. I. / Л.Д. Ландау, Е.М. Лифшиц – 5-е изд.: ФИЗМАТЛИТ, 2002. – Т. V. – 616 с.
93. Bar-Ziv, R. Instability and "Pearling" States Produced in Tubular Membranes by Competition of Curvature and Tension / R. Bar-Ziv, E. Moses // *Phys. Rev. Lett.* – 1994. – V. 73. – N. 10. – P. 1392.
94. Bar-Ziv, R. Critical Dynamics in the Pearling Instability of Membranes / R. Bar-Ziv, T. Tlusty, E. Moses // *Phys. Rev. Lett.* – 1997. – V. 79. – N. 6. – P. 1158.
95. Hannezo, E. Mechanical instabilities of biological tubes / E. Hannezo, J. Prost, J.F. Joanny // *Phys. Rev. Lett.* – 2012. – V. 109. – N. 1. – P. 018101.
96. Morlot, S. Membrane Shape at the Edge of the Dynamin Helix Sets Location and Duration of the Fission Reaction / S. Morlot, V. Gali, M. Klein, N. Chiaruttini, J. Manzi, F. Humbert, L. Dinis, M. Lenz, G. Cappello, A. Roux // *Cell.* – 2012. – V. 151. – N. 3. – P. 619-629.
97. Renard, H.F. Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. / H.F. Renard, M. Simunovic, J. Lemiere, E. Boucrot, M.D. Garcia-Castillo, S. Arumugam, V. Chambon, C. Lamaze, C. Wunder, A.K. Kenworthy, et al. // *Nature.* – 2015. – V. 517. – N. 7535. – P. 493-496.
98. Lee, E. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle / E. Lee, M. Marcucci, L. Dainell, M. Pypaert, O.A. Weisz, G.C. Ochoa, K. Farsad, M.R. Wenk, P. De Camilli // *Science.* – 2002. – V. 297. – N. 5584. – P. 1193-1196.

99. Karbowski, M. Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology / M. Karbowski, S.Y. Jeong, R.J. Youle // *J. Cell Biol.* – 2004. – V. 166. – N. 7. – P. 1027-1039.
100. Ramesh, P. FBAR syndapin 1 recognizes and stabilizes highly curved tubular membranes in a concentration dependent manner. / P. Ramesh, Y.F. Baroji, S.N. Reihani, D. Stamou, L.B. Oddershede, P.M. Bendix // *Sci. Rep.* – 2013. – V. 3. – P. 1565.
101. Weikl, T.R. Interaction of conical membrane inclusions: Effect of lateral tension / T.R. Weikl, M.M. Kozlov, W. Helfrich // *Phys. Rev. E.* – 1998. – V. 57. – N. 6. – P. 6988.
102. Dommersnes, P.G. The many-body problem for anisotropic membrane inclusions and the self-assembly of "saddle" defects into an "egg carton" / P.G. Dommersnes, J.B. Fournier // *Biophys. J.* – 2002. – V. 83. – N. 6. – P. 2898-2905.
103. Fošnarič, M. The Influence of Anisotropic Membrane Inclusions on Curvature Elastic Properties of Lipid Membranes / M. Fošnarič, K. Bohinc, D.R. Gauger, A. Iglič, V. Kralj-Iglič, S. May // *J. Chem. Inf. Model.* – 2005. – V. 45. – N. 6. – P. 1652-1661.
104. Zhu, C. Nonlinear sorting, curvature generation, and crowding of endophilin N-BAR on tubular membranes. / C. Zhu, S.L. Das, T. Baumgart // *Biophys. J.* – 2012. – V. 102. – N. 8. – P. 1837-1845.
105. Masuda, M. Structural characteristics of BAR domain superfamily to sculpt the membrane. / M. Masuda, N. Mochizuki // *Semin Cell Dev Biol.* – 2010. – V. 21. – N. 4. – P. 391-398.
106. Ramakrishnan, N. Membrane-Mediated Aggregation of Curvature-Inducing Nematogens and Membrane Tubulation / N. Ramakrishnan, P.B. Sunil Kumar, J.H. Ipsen // *Biophys. J.* – 2013. – V. 104. – N. 5. – P. 1018-1028.
107. Tanaka-Takiguchi, Y. Physicochemical Analysis from Real-Time Imaging of Liposome Tubulation Reveals the Characteristics of Individual F-BAR Domain Proteins / Y. Tanaka-Takiguchi, T. Itoh, K. Tsujita, S. Yamada, M. Yanagisawa, K.

Fujiwara, A. Yamamoto, M. Ichikawa, K. Takiguchi // *Langmuir*. – 2013. – V. 29. – N. 1. – P. 328-336.

108. Fernandes, F. Role of Helix 0 of the N-BAR Domain in Membrane Curvature Generation / F. Fernandes, M.S. Loura, F.J. Chichon, J.L. Carrascosa, A. Fedorov, M. Prieto // *Biophys. J.* – 2008. – V. 94. – N. 8. – P. 3065-3073.

109. Fierling, J. How bio-filaments twist membranes / J. Fierling, A. Johner, I.M. Kulić, M.M. Müller // *Soft Matter*. – 2016. – V. 12. – N. 26. – P. 5747-5757.

110. Vahid, A. Pointlike Inclusion Interaction in Tubular Membranes / A. Vahid, T. Idema // *Phys Rev Lett*. – 2016. – V. 117. – N. 13. – P. 138102.

111. Goulian, M. Long-Range Forces in Heterogeneous Fluid Membranes / M. Goulian, R. Bruinsma, P. Pincus // *Europhysics Letters*. – 1993. – V. 22. – N. 2. – P. 145-150.

112. Kim, K.S. Curvature-mediated interactions between membrane proteins / K.S. Kim, J. Neu, G. Oster // *Biophys. J.* – 1998. – V. 75. – N. 5. – P. 2274-2291.

113. Fournier, J.B. High-order power series expansion of the elastic interaction between conical membrane inclusions / J.B. Fournier, P. Galatola // *Eur. Phys. J. E*. – 2015. – V. 38. – N. 8.

114. Горев, В.В. Металлические конструкции / В.В. Горев, Б.Ю. Уваров, В.В. Филипов – 3-е изд.: Высшая школа, 2004. – 551 с.

115. Chen, H. Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis / H. Chen, S. Fre, V.I. Slepnev, M.R. Capua, K. Takei, M.H. Butler, P.P. Di Fiore, P. De Camilli // *Nature*. – 1998. – V. 394. – N. 6695. – P. 793-797.

116. Šarić, A. Fluid Membranes Can Drive Linear Aggregation of Adsorbed Spherical Nanoparticles / A. Šarić, A. Cacciuto // *Phys. Rev. Lett*. – 2012. – V. 108. – N. 11. – P. 118101.

117. Robertson, J.D. The molecular structure and contact relationships of cell membranes / J.D. Robertson // *Prog. Biophys. Biophys. Chem.* – 1960. – V. 10. – P. 343-418.

118. Robertson, J.D. The ultrastructure of cell membranes and their derivatives / J.D. Robertson // *Biochem. Soc. Symp.* – 1959. – V. 16. – P. 3-43.
119. Kissa, K. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition / P. Herbomel // *Nature* – 2010. –V. 464. – P. 112-115.
120. Ciarletta, P. Peristaltic patterns for swelling and shrinking of soft cylindrical gels / M.B. Amar // *Soft Matter* – 2012. –V. 8. – N. 6. –P. 1760-1763.
121. Timoshenko, S. *Theory of Elasticity* / J.N. Goodier // McGraw-Hill Book Company, New York, 1951. –P. 506.
122. Fung, Y.C. *Biomechanics Mechanical Properties of Living Tissues* // Second Edition, Springer Science+Business Media New York, 1993. –P. 568.
123. Fleisch, D. *A Student's Guide to Vectors and Tensors* // Cambridge University Press, 2012. –P. 197.
124. Rochal, S.B. Two-dimensional elasticity determines the low-frequency dynamics of single- and double-walled carbon nanotubes / V.L. Lorman, Yu.I. Yuzyuk // *Phys. Rev. B.* –2013. – V.88. –N. 23. –P. 235435.
125. Hannezo, E. Mechanical Instabilities of Biological Tubes / J. Prost, J.-F. Joanny // *Phys. Rev. Lett.* – 2012. –V. 109. –N. 1. –P. 018101.
126. Han, H.-C. A Biomechanical Model of Artery Buckling // *J. Biomech.* – 2007. –V. 40. –N. 16. –P. 3672-3678.

Основные публикации автора:

- A1. Simunovic, M. How curvature-generating proteins build scaffolds on membrane nanotubes / M. Simunovic, E. Evergren, I. Golushko, C. Prévost, H.F. Renard, L. Johannes, H.T. McMahon, V. Lorman, G.A. Voth, P. Bassereau // *PNAS* – 2016. – V. 113. – №. 40. – P. 11226-11231.
- A2. Golushko, I.Yu. Complex instability of axially compressed tubular lipid membrane with controlled spontaneous curvature / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal, V.L. Lorman // *Eur. Phys. J. E.* – 2015. – V. 38. – №. 10. – P. 112.

А3. Голушко, И.Ю. Трубчатые липидные мембраны, вытягиваемые из везикулы: зависимость равновесия системы от кривизны липидного бислоя / И.Ю. Голушко, С.Б. Рошаль // ЖЭТФ. – 2016. – Т. 149. – № 1. – С. 192-199.

А4. Golushko, I.Yu. Multipole analysis of the strain-mediated coupling between proteins adsorbed at tubular lipid membrane surface / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal, V.L. Lorman // Eur. Phys. J. E. – 2016. – V. 39. – № 12. – P. 128.

А5. Голушко, И.Ю. Взаимодействие молекул белка на поверхности липидного бислоя // Фестиваль Недели науки Юга России. Материалы Региональной студенческой конференции: в 3 т. – Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета. – 2012. – Т. 1. – С. 548.

А6. Голушко, И.Ю. Взаимодействие молекул белка на поверхности липидного бислоя // Всероссийский молодежный конкурс научно-исследовательских работ студентов и аспирантов в области физических наук, Сборник трудов/под общ. ред. В.Н. Зимин, В.Н. Наумов, А.Н. Морозов.-М.:МГТУ им. Н.Э. Баумана. – 2012. – С. 159.

А7. Голушко, И.Ю. Исследование фазовых переходов, связанных с изменением формы, трубчатых липидных мембран // Сборник тезисов V Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины». – Россия, г. Ростов-на-Дону – 2013. – С. 268.

А8. Golushko, I.Yu. Investigation of Phase Transitions Associated with Shape Instabilities of Tubular Lipid Membranes // Proceeding of XII International Conference on Nanostructured Materials “NANO 2014”. – Россия, г. Москва. – 2014. – P. 797.

А9. Голушко, И.Ю. Стабильность трубчатых липидных наномембран // Сборник тезисов международной научно-технической конференции «Нанотехнологии в электронике и МЭМС» – Россия, г. Таганрог. – 2014. – С. 100.

А10. Голушко, И.Ю. Влияние граничных условий на неустойчивости и фазовые переходы формы в трубчатых липидных мембранах / И.Ю. Голушко, С.Б. Рошаль, А. Пармеджани, В.Л. Лорман // Сборник тезисов и список участников

XLIX Школы ПИЯФ по физике конденсированного состояния. – Россия, г. Санкт-Петербург. – 2015. – С. 148.

A 11. Голушко, И.Ю. Влияние спонтанной кривизны липидного бислоя на фазовые переходы в липидных наномембранах // Сборник тезисов XI Ежегодной научной конференции студентов и аспирантов базовых кафедр Южного научного центра РАН. – Россия, г. Ростов-на-Дону. – 2015. – С. 122.

A 12. Голушко, И.Ю. Взаимодействие неустойчивостей в трубчатой липидной мембране с изменяемой спонтанной кривизной липидного бислоя / И.Ю. Голушко, С.Б. Рошаль // Труды международного междисциплинарного симпозиума «Физика поверхностных явлений, межфазных границ и фазовые переходы» – Россия, г. Нальчик – г. Ростов-на-Дону – г. Грозный – пос. Южный. – 2015. – С. 57-60.

A 13. Голушко, И.Ю. Анализ зависимости совместной устойчивости везикулы и вытянутой из нее трубчатой липидной мембраны от кривизны липидного бислоя / И.Ю. Голушко, С.Б. Рошаль // Сборник тезисов и список участников L Школы ПИЯФ по физике конденсированного состояния. – Россия, г. Санкт-Петербург. – 2016. – С. 154.

A 14. Golushko, I.Yu. Complex instability of tubular lipid membrane with nonzero spontaneous curvature under axial tension / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal, V.L. Lroman // Proceedings of 26th IUPAP International conference on Statistical Physics “Statphys26”. – Франция, г. Лион. – 2016. – P. 390.

A 15. Golushko, I.Yu. Membrane-mediated interaction of curvature active proteins / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal, V.L. Lroman // Proceedings of 18th EMBL PhD symposium “Life by Numbers” – Германия, г. Гейдельберг – 2016. – P. 143.

A 16. Голушко, И.Ю. Мультипольный подход к описанию индуцированных деформаций мембраны белок-белковых взаимодействий / И.Ю. Голушко, С.Б. Рошаль, В.Л. Лорман // Сборник тезисов и список участников LI Школы ПИЯФ по физике конденсированного состояния. – Россия, г. Санкт-Петербург. – 2016. – С. 164.

A 17. Golushko, I.Yu. Interactions of curvature-active proteins with tubular lipid membranes and each other: a simple multipole approach / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal, V.L. Lorman // Proceedings of 2017 Annual Meeting of the International Physics of Living Systems “iPoLS”. – Франция, г. Париж. – 2017. – P. 13.

A 18. Голушко, И.Ю. Взаимодействия белков, индуцированные деформацией мембраны: мультипольный подход / И.Ю. Голушко, С.Б. Рошаль // Тезисы докладов Международной конференции «Современные проблемы механики сплошной среды». – Россия, г. Москва. – 2017. – С. 83-85.

A 19. Golushko, I.Yu. Tubular lipid membranes connected to a vesicle: conditions of equilibrium and interaction with proteins / I.Yu. Golushko, S.B. Rochal, V.L. Lorman // Program and Proceeding of the Meeting in honor of Professor Vladimir Lorman “Biophysics: Today and Beyond. The Physics of Unconventional Systems” – Франция, г. Монпелье. – 2018. – P. 14.

Résumé de la thèse en français:

Les méthodes classiques de physique de l'état solide telles que la diffraction des rayons X et la microscopie électronique ont permis la compréhension de la structure des membranes cellulaires. Aujourd'hui, leur composition et structure étant bien connues, les recherches se concentrent sur les processus actifs des membranes. Des processus tels que l'endocytose impliquent des modifications substantielles de la forme des membranes lipidiques, réalisées par des protéines induisant la courbure membranaire. L'une des méthodes expérimentales parmi les plus populaires est dite « TLM-pulling », où la membrane lipidique tubulaire (TLM) est formée à partir de la vésicule en tirant par une force externe. Des structures similaires relient les vésicules endocytiques aux compartiments du donneur et servent de canaux pour le transfert de matière dans la cellule et entre les cellules adjacentes, établissant ainsi une voie de communication intercellulaire. De tels systèmes formés *in vitro* en raison de leur simplicité et grande homogénéité peuvent être décrits avec précision par la physique théorique.

Dans la première partie de la thèse, nous développons un modèle théorique de TLM, basé sur la mécanique classique et la thermodynamique, et l'appliquons aux expériences de « TLM-pulling » avec adsorption de protéines induisant la courbure. Le modèle tient compte de l'asymétrie de la bicouche lipidique, de la tension superficielle, de la force longitudinale appliquée au TLM et de la différence de pression dans le système. Nous modélisons l'action que les protéines exercent sur la TLM via des ensembles de forces normales à la surface de la membrane à l'équilibre mécanique. Cette nouvelle approche multipolaire permet de modéliser les interactions anisotropes, entre les protéines adsorbées à la membrane, qui sont induites par sa déformation. Notre théorie décrit les premiers stades de la formation des échafaudages protéiques, c-à-d la disposition caractéristique des protéines et leur grande affinité avec les extrémités de la TLM. Le comportement collectif des protéines induisant la courbure est extrêmement important pour effectuer des déformations à grande échelle des membranes au cours de processus tels que l'endo et l'exocytose, l'entrée du virus dans la cellule hôte ainsi que la formation et la sortie des virions. L'étude de ce dernier processus pourrait conduire au développement de nouvelles méthodes de traitement en virologie.

La deuxième partie de la thèse est consacrée à l'étude de l'aorte dorsale (DA) de l'embryon de poisson Danio-Rerio. On étudie l'évolution de la forme du DA pendant la transition endothélio-hématopoïétique (EHT). Le processus EHT conduit à l'extrusion des cellules souches/hématopoïétiques qui coloniseront en suite la moelle osseuse permettant l'hématopoïèse tout au long de la vie. Ce processus semble être universel et devrait s'appliquer aussi bien aux mammifères qu'aux oiseaux, ce qui fait de son étude un problème fondamental de l'embryologie.

Le DA a une géométrie cylindrique et semblable aux TLM, mais en même temps, il est beaucoup plus gros que les tubes lipidiques, a un module de cisaillement non nul et est incorporé dans la matrice des tissus environnants : un système beaucoup plus complexe du point de vue mécanique. Nous relient les changements globaux de forme de l'aorte pendant l'EHT aux principes génériques de la mécanique et montrons que les instabilités mécaniques conduisant à l'évolution de la forme de l'aorte sont invoquées par des stress résultant des inhomogénéités de croissance et de l'interaction avec les tissus environnants. Sur la base de l'analyse théorique et des données en microscopie confocale 4D, nous proposons un schéma détaillé du processus et postulons que les instabilités mécaniques préparent l'ensemble du processus EHT avant son contrôle génétique spécifique, suggérant un mécanisme universel et auto-organisé du processus de réorganisation collective des tissus dans les organismes en croissance.

Thesis summary in English:

Applications of classical solid state physics methods such as X-ray diffraction analysis and electron microscopy allowed making a giant step in understanding of cellular membranes' structure. Today since their composition and structure are well known, the focus of research has shifted to active processes involving cell membranes. As we know, such processes as endocytosis involve substantial shape changes of cell membranes, which are performed by curvature-inducing proteins. One of the most popular methods to study how these proteins interact with lipid membranes and each other is TLM-pulling experiment, where tubular lipid membrane (TLM) is formed from the vesicle by pulling. Similar structures connect endocytic vesicles with the donor compartments and serve as channels for the matter transfer within the cell and between adjacent cells establishing cell-to-cell communication pathway. Such systems formed *in vitro* due to their simplicity and high homogeneity can be accurately described by the means of theoretical physics.

In the first part of the present thesis, we develop a theoretical model of the TLM pulled out of the vesicle on the basis of classical mechanics and thermodynamics and apply it to the TLM-pulling experiments with curvature-inducing proteins adsorption. The developed model takes into account asymmetry of the lipid bilayer, surface tension, longitudinal force applied to the TLM and pressure difference in the system. We model the action that proteins exert on TLM via sets of forces normal to the membrane's surface and satisfying conditions of mechanical equilibrium. This novel force multipole approach allows us to model anisotropic interactions between proteins adsorbed at the membrane surface that are induced by the membrane deformation. Our theory describes early stages of protein scaffolds formation i.e. characteristic arrangement of proteins and their high affinity to the membrane ends. Collective behavior of curvature-inducing proteins is extremely important for performing large scale deformations of lipid membranes during such processes as endo and exocytosis, virus entry in the host cell as well as formation and exit of daughter virions later on. Studying of the latter process can possibly lead to the development of fundamentally new methods of viral disease treatment.

The second part of the thesis is devoted to the study of zebrafish embryo's dorsal aorta (DA). It focuses on DA's shape evolution during the Endothelio-Haematopoietic Transition (EHT). The EHT process leads to the extrusion of haematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) which will later on colonize haematopoietic organs allowing haematopoiesis throughout adult life. This process seems to be universal and should also apply for both mammals and birds, which makes its investigation a fundamental problem of embryology.

DA has a cylindrical geometry that makes it similar to the TLM's, however at the same time DA is much bigger than lipid tubes, has a non-zero shear modulus and is embedded in the matrix of surrounding tissues, which makes it a much more complex system from the mechanical perspective. We relate the global shape changes of the aorta during EHT to generic principles of mechanics and show that mechanical instabilities leading to the aorta shape evolution are invoked by different stresses resulting from the growth inhomogeneities and interaction with surrounding tissues. Based on the performed theoretical analysis and the data obtained with a help of 4D confocal microscopy we propose a detailed scheme of the process and postulate that mechanical instabilities prepare and support the whole EHT process prior to its specific genetic control. Our interpretation suggests a universal and self-organized mechanism underlying collective tissue reorganization processes in the growing organisms such as EHT.