

## РОЛЬ ЛАТЕРАЛЬНОГО НАТЯЖЕНИЯ В КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМОМ СЛИЯНИИ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Чантурия А.Н.

Eastern Scientific

Роквилл, США; e-mail: alexandr32@hotmail.com

Поступила в редакцию: 14.07.2021

**Аннотация.** Слияние гранул кортекса яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* исследовалось в экспериментальной системе, позволяющей медленное увеличение концентрации кальция в микромолярном диапазоне. Установлено, что кроме пороговой концентрации, запускающей слияние гранул с плазматической мембраной, существует порог скорости роста концентрации, ниже которого слияние не происходит. Так же показано что инкубация препаратов кортекса в растворах с повышенным содержанием кальция приводит к инактивации гранул, выражающейся в потере ими способности сливаться при более высоких концентрациях кальция. Полученные данные указывают на то, что опосредованное белками слияние мембран может происходить вследствие возникновения латерального стресса по типу ранее предложенного механизма слияния чисто фосфолипидных мембран.

**Ключевые слова:** Мембраны, кальций, латеральное натяжение, слияние, микроскопия.

Слияние клеточных мембран играет ключевую роль в передаче нервных импульсов, оплодотворении, секреции гормонов, внутриклеточном транспорте белков и проникновении вирусов в клетки. Несмотря на идентификацию ряда белков участвующих в этом процессе [1, 2], мы всё еще далеки от понимания их роли в глубокой реорганизации мембран, происходящей при слиянии. Логично предположить, что регулируемое специфическими белками слияние мембран эволюционировало из примитивных, ранних безбелковых систем и может базироваться на тех же принципах.

Исследование слияния в безбелковой системе липосомы/плоская мембрана (БЛМ) продемонстрировало зависимость порога кальций-индуцируемого слияния от заряда фосфолипидов липосом, но не от заряда БЛМ. Это различие указывает на ключевую роль латерального натяжения мембраны в запуске механизма слияния [3].

Созданные для проверки этой гипотезы компьютерные модели продемонстрировали не только возможность слияние моно- и би-слоев при определенных параметрах безбелковой модели, но и слияние белоксодержащих модельных мембран так же по механизму латерального стресса, но индуцированного молекулами белка [4].

Удобной моделью для исследования механизма слияния клеточных мембран являются яйцеклетки морских ежей. Наружная, плазматическая мембрана яйцеклетки выстлана изнутри слоем т. н. кортикальных гранул, размером порядка 1  $\mu\text{m}$ . Слияние этих гранул с плазматической мембраной яйцеклетки естественным образом индуцируется сперматозоидом и необходимо для предотвращения полиспермии [5]. Для слияния *in vitro* не требуются никакие цитоплазматические факторы, кроме свободного кальция в концентрации выше 0,1–10  $\mu\text{M}$  [6–8]. Более того, гранулы кортекса способны сливаться не только с плазматической мембраной, но и друг с другом что означает присутствие в них всех компонентов, которые необходимы и достаточны для слияния. Белок, безусловно, является одним из компонентов механизма слияния, поскольку модификаторы белка эффективно ингибируют слияние [9].

В данной работе представлена попытка проверить применимость к природным мембранам ранее представленной гипотезы об основной и универсальной роли латерального натяжения в механизме слияния как чисто фосфолипидных, так и белок-содержащих мембран.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### Приготовление препаратов кортекса.

Препараты кортекса производили по методу [8] с незначительными изменениями, путем помещения дежелированных яйцеклеток на полоски шириной 5–6 мм, из покровного стекла №2, обработанные поли-L-лизинном. После прилипания, яйцеклетки лизировали струей раствора РКМЕ (50 мМ PIPES, 450 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ EGTA, 1 мМ бензамидина, pH 6,7), либо IB(220 мМ глутамата калия, 500 мМ глицина, 10 мМ NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ EGTA, pH-6,7), а затем помещали в раствор IB и хранили на льду.

#### Экспериментальная система.

В большинстве экспериментов использовалась фторопластовая ячейка, с внутренним объемом 1 мл, имеющей стеклянные стенки с двух сторон. На дне ячейки помещалась миниатюрная магнитная мешалка. В экспериментах по исследованию влияния температуры, ячейка охлаждалась при помощи тепловой помпы на элементе Пельтье; остальные эксперименты проводились при комнатной температуре 22–24 °C.

Ячейка помещалась перед объективом специально сконструированного, на базе оптического конструктора (Spindler and Hoyer, Германия) горизонтального микроскопа с супер длиннофокусными объективами (ELWD - Nikon, Japan) расположенными друг против друга. 40-х, 0.5 NA использовался в качестве конденсора, для освещения, а 60х, 0.7 NA для наблюдения.

Изображение проецировалось на CCD камеру, соединенную с видеомонитором, и записывалось на видеодиск. Количественные измерения слияния кортикальных гранул (КГ) с плазматической мембраной (ПМ), производились при большой плотности кортексов на стекле, с объективом меньшего увеличения (10x, 0.2 Н.А.) и конденсором в режиме тёмного поля. Это позволяло усреднять светорассеяние с большей площади, что уменьшало ошибку измерений.

Процент слившихся гранул ( $F$ ) рассчитывался по изменению светорассеяния по формуле:

$$F = 100 \cdot [1 - (I - I_{\min}) / (I_{\max} - I_{\min})]$$

где  $I$  – интенсивность рассеянного света;  $I_{\min}$  – максимальное значение в начале эксперимента;  $I_{\max}$  – минимальное значение в тёмной зоне изображения.

Непосредственно перед экспериментом полоска стекла с препаратом кортекса помещалась в микроманипулятор и её нижний конец опускался в ячейку с раствором ИМ (800 мМ глицин, 20 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ PIPES, 1 мМ бензамидин, 10 или 30 мМ EGTA, pH - 6,7).

Раствор кальция подавался в ячейку при помощи шприца (Hamilton Co, США), поршень которого был соединён с шаговым двигателем, что позволяло варьировать скорость подачи раствора с высокой точностью и в широком диапазоне. Концентрация свободного кальция рассчитывалась по известной константе связывания Ca-EGTA комплекса с использованием стандартных формул. Кроме отдельно описанных случаев, везде в тексте приводится расчётная концентрация свободного кальция.

Реактивы, используемые в экспериментах, были приобретены у Fluka (KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, EGTA, глицин, бензамидин) и Sigma chemical Co. (PIPES, К-глутамат)

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При добавлении кальция к препаратам кортекса слияние гранул наблюдалось со 100% воспроизводимостью при расчётных концентрациях свободного кальция выше 20 мкМ. Более высокие концентрации кальция (0,1–0,2 мМ) вызывали практически полное и быстрое слияние всех гранул препарата, в то время как при меньших концентрациях слияние происходило почти так же быстро, но сливалась только часть гранул (рис. 1).

Концентрации кальция в ячейке увеличена с нуля (10 мМ EGTA) до 33 мкМ через 5-10 секунд после снимка на панели А. Цифры вверху справа на панелях А-С – часы:минуты:секунды. Комнатная температура. Шкала 20 мкм. Изображения получены с использованием оптики дифференциально-интерференционной контрастности (DIC-Nomarsky).

Такое поведение препаратов кортекса наблюдалось в диапазоне температур от +2 °С до +38 °С, а при температурах выше 42 °С доля слившихся гранул резко падала. В экспериментах при пониженных температурах было отмечено, что слияние при температуре 2–4 °С начинается на 15–20 секунд позже чем при комнатной температуре, однако статистически достоверного снижения процента слившихся КГ не наблюдалось. Этой задержкой вероятно объясняются небольшие различия кинетики слияния в экспериментах с постепенным увеличением концентрации кальция при низкой температуре (рис. 2).

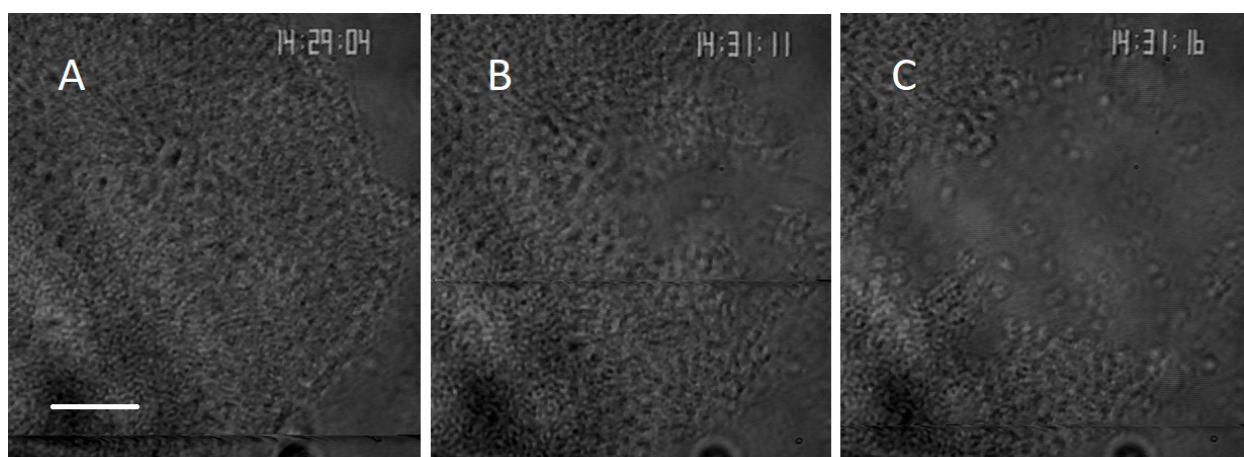
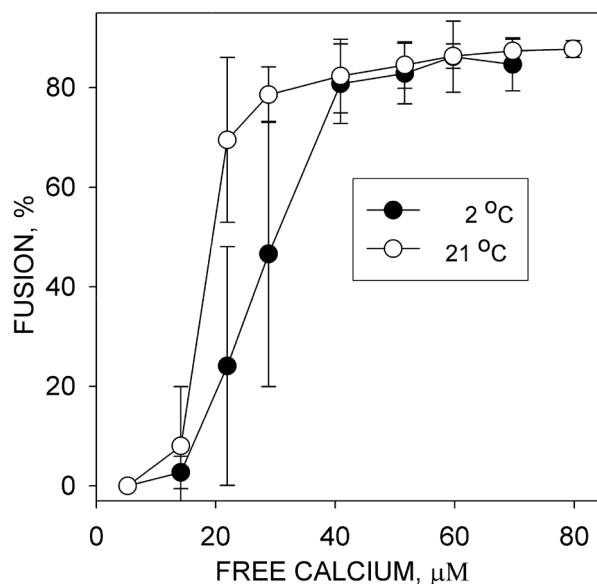


Рисунок 1. Кальций-индуцированное слияние гранул с плазматической мембраной кортекса



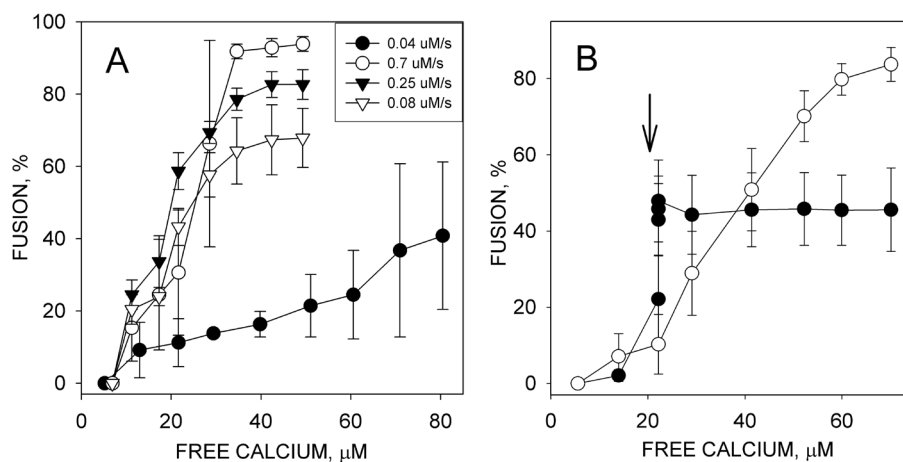
**Рисунок 2.** А –КГ-ПМ слияние при разных температурах. Скорость увеличения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ячейке  $0.6 \mu\text{M}/\text{с}$ . Здесь и далее представлены средние значения и стандартное отклонение, полученные в 3–5 экспериментах.

Поскольку значительного влияния температуры, на слияние обнаружено не было, дальнейшие эксперименты проводились при комнатной температуре  $22\text{--}24 \text{ }^\circ\text{C}$ . Было обнаружено, что при замедлении скорости подачи кальция в ячейку, наблюдается снижение процента слившихся КГ (рис. 3А). При этом, в случае остановки подачи кальция на 30 минут, препарат кортекса полностью терял способность к слиянию при последующем повышении концентрации кальция (рис. 3В). В случае 15 минутной остановки подачи кальция, ингибирования слияния не было – процент слившихся КГ рос и не отличался от контроля при концентрации кальция  $60\text{--}70 \mu\text{M}$ .

Поскольку медленное увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ячейке требует значительного времени (более 30 минут чтобы достичь концентрации  $80 \mu\text{M}$  при скорости  $0.04 \mu\text{M}/\text{с}$ ), можно предположить, что препараты за это время инактивируются. Для проверки этого предположения, была проведена серия экспериментов, в которой увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ячейке начиналось после того, как препараты кортекса длительное время находились в ней при комнатной температуре. Однако ни 20 минутная, ни 60 минутная инкубация в без кальциевых растворах не влияла на слияние при последующей подаче кальция в ячейку.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Общепризнано, что ключевую роль в слиянии клеточных мембран играют конформационные изменения мембранных белков, запускаемые изменениями в ионном составе среды. В случае вирусного слияния это



**Рисунок 3.** А – Зависимость слияния КГ с ПМ от скорости увеличения концентрации кальция. В – Ингибирование КГ-ПМ слияния инкубацией кортексов в кальций-содержащем растворе. Скорость увеличения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в ячейке  $0.9 \mu\text{M}/\text{с}$ . Стрелкой отмечена концентрация, по достижении которой введение Са в ячейку было остановлено на 30 минут

изменения рН, а в синаптических окончаниях или, в исследованных в настоящей работе, яйцеклетках морских ежей - скачек концентрации кальция. При этом, несмотря на огромный прогресс в идентификации и получении детальных характеристик белков слияния, их роль в механике слияния до сих пор до конца не выяснена. На сегодняшний день доминирует модель в которой молекулы белка в области контакта, каким-то образом подтягивают мембраны друг к другу и создают условия для их слияния [2]. Это, по сути, является экстраполяцией модели, предложенной для объяснения кальций зависимого слияния безбелковых мембран (липосом или липосом с плоскими мембранами). Для этих систем, так же предполагается, что двухвалентный ион кальция связывается с отрицательно заряженными головками фосфолипидов соседних мембран, приводя их в близкий контакт [10], а также создаёт благоприятную для слияния эффективную форму липидных молекул, связываясь с фосфатными группами в области контакта. Обе эти модели предполагают, что слияние будет происходить при достижении определённой концентрации кальция или фактора, вызывающего конформационные изменения белка, вне зависимости от пути достижения этой концентрации.

С другой стороны, ранее было показано [3], что вышеописанная модель слияния фосфолипидных мембран, не может объяснить обратимое ингибирование, наблюдаемое при инкубации липосом в кальций содержащем растворе до приведения их в контакт с БЛМ. В качестве альтернативы была предложена и подтверждена компьютерной симуляцией модель, предполагающая латеральный стресс липосомальной мембраны как движущую силу слияния.

Обнаруженное в настоящей работе влияние скорости роста концентрации кальция на эффективность слияния (рис. 2) полностью согласуется с моделью латерального стресса [3], создаваемого, в данном случае, множеством молекул белков слияния на всей поверхности КГ.

Эта модель предполагает, что конформационное изменение мембранного белка может вести к удалению этих белков из внешнего монослоя мембраны [11], что приводит к возникновению напряжения из-за увеличения разделения между молекулами липидов. Альтернативно, конформационные изменения мембранных белков, вызванные кальцием или рН, могут привести к уменьшению площади, которую эти белки занимают во внешнем монослое везикулы. Если это произойдет, молекулы липидов должны следовать новым границам белок-липид, что так же приведет к увеличению напряжения во внешнем монослое. Очевидно, что жидкокристаллические свойства мембран, не допускают длительного сохранения энергетически невыгодного напряженного состояния. Перескок липидов из внутреннего монослоя в наружный и/или диффузия воды через бислои и ионные каналы, приведет к исчезновению напряжения в мембране.

Логично предположить, что возможная гетерогенность КГ морского ежа по числу находящихся в них белков слияния или по константе их связывания с кальцием отражается в зависимости доли слившихся гранул от концентрации ионов кальция. При возрастании концентрации, КГ с наибольшей плотностью молекул белка слияния, сольются с ПМ первыми, тогда как КГ с меньшей плотностью этого белка сольются позже. При этом, чем медленнее будет скорость роста концентрации кальция, тем больше будет влияние снижающих напряжение мембраны процессов, названных в предыдущем абзаце. При временной, полной остановке роста концентрации кальция, напряжение в мембране КГ, по-видимому, исчезает полностью и не возникает при последующем действии более высоких концентраций (рис. 3В). Последнее, можно интерпретировать как указание на то, что гетерогенность белков слияния по константе связывания с кальцием, либо отсутствует, либо не играет существенной роли в процессе слияния.

Поскольку количество белков слияния в вирусной оболочке или клеточной мембране довольно велико, относительно небольшое уменьшение их площади может создать достаточное для слияния напряжение в липидном монослое.

Модель латерального стресса не исключает возможности того, что белки в области контакта могут выполнять и более специфические функции при слиянии. Главным постулатом этой модели является то, что основная энергия для перестройки мембран поступает от белков, находящихся на вдали от места слияния.

Это позволяет предположить, что универсальное ингибирование слияния мембран лизолипидами [12] можно объяснить без привлечения представлений о геометрии фосфолипидов в зоне слияния, а как ослабление напряжения во внешнем монослое за счет включения в него лизолипидов.

Кроме того, модель латерального стресса может объяснить ряд экспериментальных данных, которые плохо поддаются объяснению на основе других моделей. Например, зависимость вирусного слияния от поверхностной плотности гемагглютинина [13,14], зависимость экзоцитоза от скорости увеличения концентрации кальция [15] и обратимость изменений, вызванных кальцием, в изолированных гранулах кортекса [8], естественным образом согласуется с этой моделью.

#### **Список литературы / References:**

1. Wang H., Zhang C., Xiao H. Mechanism of membrane fusion: protein-protein interaction and beyond. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.*, 2019, vol. 11, no. 6, pp. 250-225.
2. Martens S., McMahon H.T. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology (online publication)*, 2008. doi: 10.1038/nrm2417
3. Chanturiya A., Scaria P., Woodle M.C. The Role of Membrane Lateral Tension in Calcium-Induced Membrane Fusion. *J. Membr. Biology*, 2000, vol. 176, pp. 67-75.
4. Chanturiya A., Scaria P., Kuksenok O., Woodle M.C. Probing the mechanism of fusion in a two-dimensional computer simulation. *Biophys. J.*, 2002, vol. 82, no. 6 pp. 3072-3080.

5. Merkle C.G. and Chandler D.E. Cortical granules matrix disassembly during exocytosis in sea urchin eggs. *Developmental biology*, 1991, vol. 148, pp. 429-441.
6. Whitaker M.J., Baker P.F. Calcium-dependent exocytosis in an *in vitro* secretory granule plasma membrane preparation from sea urchin eggs and the effects of some inhibitors of cytoskeletal function. *Proceedings of the Royal Society B.*, 1983, vol. 218, pp. 397-413.
7. Zimmerberg J., Liu J. Ionic and permeability requirements for exocytosis in vitro in sea urchin eggs. *J. Membrane Biol.*, 1988, vol. 101, pp. 199-207.
8. Walley T., Whitaker M. Exocytosis reconstituted from the sea urchin eggs is unaffected by calcium pretreatment of granules and plasma membrane. *Bioscience Report*, 1988, vol. 8, no. 4, pp. 335-343.
9. Vogel S.S., Zimmerberg J. Proteins on exocytic vesicles mediate calcium-triggered fusion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, pp. 4479-4753.
10. Cohen F.S., Akabas M.H., Zimmerberg J., Finkelstein A. 1984 Parameters affecting the fusion of unilamellar phospholipid vesicles with planar bilayer membranes. *J. of Cell Biol.*, vol. 98, pp. 1054-1062.
11. Pantazatos D.P., MacDonald R.C. Directly Observed Membrane Fusion Between Oppositely Charged Phospholipid Bilayers. *The Journal of Membrane Biology*, 1999, vol. 170, pp. 27-38.
12. Chernomordik L.V., Vogel S.S., Sokoloff A.A., Onaran H.O., Leikina E.A., Zimmerberg J. Lysolipids reversibly inhibit (Ca<sup>2+</sup>), GTP- and pH dependent fusion of biological membranes. *FEBS Lett.*, 1993, vol. 318, pp. 71-76.
13. Chernomordik L.V., Frolov V.A., Leikina E., Bronk P., Zimmerberg J. The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusion and lipidic pore formation. *J. Cell Biol.* 1998, vol. 140, pp. 1369-1382.
14. White J. Membrane fusion. *Science*, 1993, vol. 258, pp. 917-924.
15. Knight D.E., Baker P.F. Calcium dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. *J. of Membrane Biology*, 1982, vol. 68, pp. 107-140.

#### THE ROLE OF THE LATERAL TENSION IN CALCIUM-DEPENDENT PHOSPHOLIPID MEMBRANE FUSION

Chanturia A.N.

Eastern Scientific

Rockville, USA; e-mail: alexandr32@hotmail.com

**Abstract.** Fusion of the cortical granules of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* eggs was studied in an experimental system that allows a slow increase in the concentration of calcium in micro-molar range. It was found that in addition to the threshold concentration that trigger fusion of granules with the plasma membrane, there is a threshold for the rate of concentration growth, below which fusion does not occur. It is also shown that incubation of cortex preparations in solutions with an increased calcium content leads to inactivation of granules, which is expressed in the loss of their ability to fuse at higher concentrations of calcium. These data indicate that protein-mediated membrane fusion can be driven by the membrane lateral stress, similarly to the earlier proposed mechanism for fusion of purely phospholipid membranes.

**Key words:** Membranes, calcium, tension, fusion, microscopy.