

УДК 577.352.26

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И СЛИЯНИЕ БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН*

Г. Б. МЕЛИКЯН

Исследованы молекулярные механизмы взаимодействия и слияния бислойных липидных мембран. Показано, что при их взаимодействии имеет место следующая последовательность событий: монослойное слияние, полное слияние и деление мембран. Изучены молекулярные механизмы монослойного слияния, а также электростимулируемого и Ca^{2+} -индуцируемого слияния, которые приводят к потягиванию мембранной трубки. Выявлены причины дестабилизации такой трубки и деления ее на два бислоя.

Ключевые слова: бислойные липидные мембраны, триламнарная структура, деление мембранной трубки.

Слияние биологических мембран является одной из необходимых стадий многих физиологических процессов, таких, как экзоцитоз, оплодотворение, биогенез мышечных волокон и т. п. С другой стороны, разработка методов направленного слияния клеток *in vitro* с целью получения соматических гибридов и, в частности, гибридом, имеет важное значение для генной инженерии и биотехнологии.

Несмотря на значительное количество работ [14], посвященных изучению слияния мембран, механизм этого явления остается невыясненным. Однако имеются многочисленные данные, указывающие на то, что структурные перестройки, приводящие к слиянию, в значительной мере обусловлены взаимодействием липидных матриц биологических мембран [13, 14]. В связи с этим для изучения слияния мембран в последние годы широко применяются различные модельные системы — липидные бислои, липосомы и т. д. Особенно интересна, на наш взгляд, модельная система двух бислойных липидных мембран (БЛМ), предложенная Либерманом и Ненашевым [2], которая позволяет исследовать единичные акты слияния бислоев. В настоящей работе приводятся данные, полученные при исследовании взаимодействия двух БЛМ, и обсуждаются молекулярные механизмы различных стадий их взаимодействия.

Материал и методика. Для формирования БЛМ использовали следующие липиды: азолектин—Аз (Ассошиэйтед Кош.), фосфатидилэтаноламин—ФЭА (Кох-Лайт), янчий фосфатидилхоллин—ФХ, кардиоллин—КЛ (Харьковский завод бактериальных препаратов), а также лизофосфатидилхоллин—ЛФХ (Сигма), диолеилфосфатидилхоллин—ДОФХ, холестерин (Серва). В качестве растворителей липидов использовали *n*-декан (хч) и сквален (Мерк, 97% чистоты). Сквален дополнительно очищали от полярных примесей при помощи окиси алюминия (Хемалол). Эксперименты проводили в 0,01—1 М растворах KCl (осч) при 30°.

* Основные результаты работы получены в лаборатории биоэлектрохимии Института электрохимии АН СССР.

Конструкция трехкамерной измерительной ячейки и принцип визуального контроля за взаимодействием БЛМ подробно описаны [4, 11].

В основу получения не содержащих растворителя БЛМ была положена идея Уайта [16]: использовать с этой целью растворы липидов в сквалене. Такой подход позволял нам впервые получить мембраны без растворителя из различных фосфолипидов [7].

Установка для измерения сопротивления, емкости, разности граничных потенциалов, натяжения и других параметров БЛМ, а также для исследования основных стадий слияния мембран описана ранее [7, 8, 11].

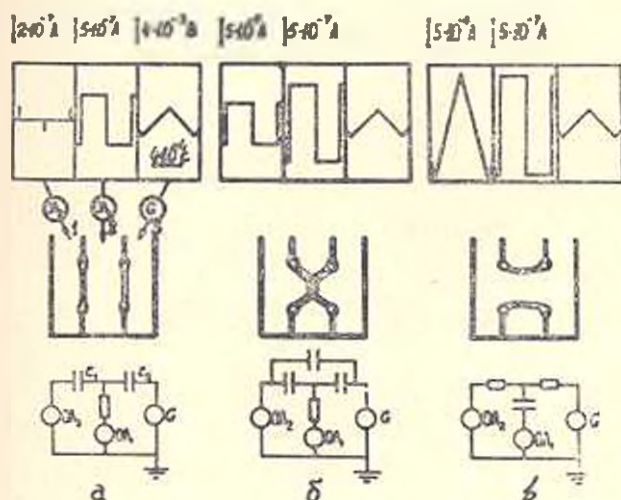


Рис. 1. Принцип емкостного контроля за взаимодействием БЛМ. а—плоские БЛМ, не приведенные в контакт, б—триламнарная структура, в—мембранная трубка. В верхней части рисунка показаны осциллограммы сигналов, регистрируемые на выходе операционных усилителей ОА₁ и ОА₂ и генератора линейной развертки напряжения G, подключенных к хлор-серебряным электродам 2, 1 и 3 соответственно. В нижней части рисунка приведены эквивалентные схемы соответствующих состояний системы, поясняющие характерную форму емкостных сигналов на выходе ОА₁ и ОА₂.

Примененный нами емкостный метод контроля за взаимодействием БЛМ [5, 11, 12] позволяет четко различать стадии слияния мембран (рис. 1). Как видно из рисунка, осциллограммы токов на выходе операционного усилителя ОА₂ для различных состояний системы качественно отличаются.

Результаты и обсуждение. При взаимодействии мембран из различных липидов и их смесей, содержащих или не содержащих органический растворитель, наблюдается следующая последовательность событий. После сближения БЛМ посредством выдавливания их до полусферической формы между ними устанавливается плоскопараллельный контакт (рис. 2б) [9]. Через некоторый промежуток времени, зависящий от ионной силы и состава фонового электролита [7, 11], заряд бислой и содержания в них растворителя, происходит монослойное слияние БЛМ и образование триламнарной структуры (ТС), изображенной на рис. 2 в. При этом в области контакта двух мембран формируется одиночный бислой (контактный бислой), имеющий совпадающее с обычной БЛМ значение удельной емкости [5].

Триламнарная структура стабильна, но при определенных условиях может быть осуществлен переход системы в мембранную трубку

(рис. 2 г), т. е. полное слияние БЛМ. При повышении гидростатического давления снаружи мембранной трубки происходит коллапс трубки, приводящий к делению ее на две мембраны. Система снова возвращается в исходное состояние (рис. 2 а). Таким образом, в системе двух

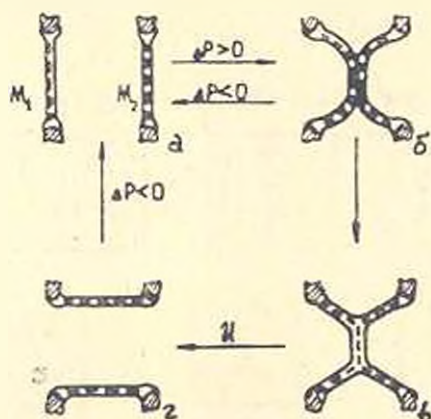


Рис. 2 Цикл слияние—деление БЛМ. а—две мембраны до прижатия в контакт. б—плоскопараллельный контакт БЛМ, в—триламнарная структура, г—мембранная трубка, образованная в результате полного слияния мембран. ΔP —трансмембранная разность гидростатических давлений, $\Delta \psi$ —разность потенциалов на мембране.

БЛМ реализуется цикл—монослойное слияние, полное слияние, деление мембран,—который можно повторять многократно на одной паре мембран.

Исследование механизма монослойного слияния. Ранее было установлено [9], что образование триламнарной структуры в случае с бислоями, содержащими растворитель, инициируется при контакте микролиз взаимодействующих БЛМ и, следовательно, не может служить моделью для изучения монослойного слияния биологических мембран. Поэтому мы исследовали механизм возникновения ТС при взаимодействии бислоев, не содержащих органического растворителя. Нам была обнаружена сильная зависимость средних времен ожидания монослойного слияния $t_{\text{мр}}$ (т. е. промежутка времени с момента образования плоскопараллельного контакта до инициации ТС) от липидного состава БЛМ.

Согласно стalkerной гипотезе монослойного слияния Маркина и Козлова [1], на контактирующих монослоях образуются локальные дефекты—«вспучивания»,—закрывание которых друг на друга даст начало перемычке—сталке между двумя бислоями (рис. 3). Очевидно, что при образовании сталка монослой сильно изгибается и должен обладать упругой энергией, зависящей от эффективной формы липидных молекул, составляющих бислой [1, 6]. Для молекул, имеющих цилиндрическую форму (площадь полярной головки в плане равна площади гидрофобной части молекулы), например, для ФХ, «ненапряженной» является плоская форма монослоя и бислоя. Молекулы, имеющие форму прямого (ЛФХ) или обратного конуса (ненасыщенный ФЭА), умень-

адают энергию образования дефектов типа гидрофильных пор в бислое (ЛФХ) или типа «вспучиваний» (ФЭА). Очевидно, что эти структурные перестройки предполагают изгиб монослоя в противоположных направлениях, следовательно, энергия таких дефектов должна противо-

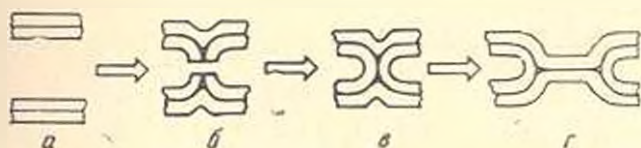


Рис. 3. Сталкерный механизм формирования триламнарной структуры. Показан процесс возникновения на контактирующих монослоях «вспучиваний», замыкание которых друг на друга дает начало триламнарной структуре.

положным образом зависеть от формы липидных молекул. Эта идея была положена в основу проверки сталкерного механизма монослойного слияния с использованием двух независимых экспериментальных подходов [6].

Из теории следует липидная зависимость времени ожидания монослойного слияния от эффективной формы липидных молекул: в данном случае для изменения эффективной кривизны молекул бислоя из ФЭА мы вводили в раствор ЛФХ, который внедрялся в состав БЛМ.

$$\lg t_{MF} = B + 6,15 \frac{\xi}{kT} C_0 \quad (1)$$

где B — объединяет все сомножители, не зависящие от объемной концентрации ЛФХ C_0 ; ξ — параметр, характеризующий эффективную форму липидных молекул; k — постоянная Больцмана; T — абсолютная температура. Полученные экспериментальные значения t_{MF} при различных C_0 ложатся на прямую (рис. 4).

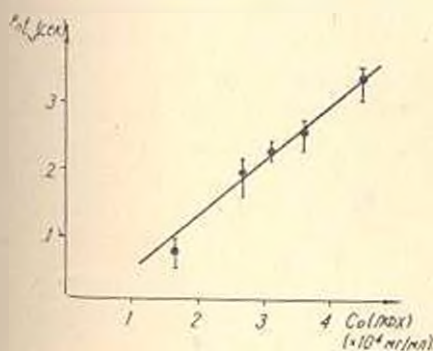


Рис. 4.

Рис. 4. Зависимость времени ожидания монослойного слияния БЛМ от концентрации ЛФХ в растворе. Мембраны из раствора ФЭА в сквалене. 0,1 М раствор KCl. Сплошная кривая получена теоретически.

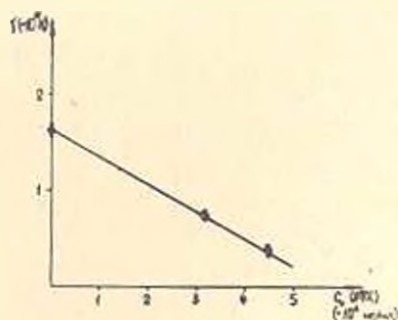


Рис. 5.

Рис. 5. Линейное натяжение пор γ в присутствии различных концентраций ЛФХ. Точки на рисунке получены из экспериментальных зависимостей $\lg |I|$ (U). БЛМ из ФЭА в сквалене, 0,1 М KCl.

Известно, с другой стороны, что наложение электрического поля на мембраны способствует образованию в них гидрофильных пор, приво-

лящих к электрическому пробое БЛМ. Параметром, характеризующим энергию образования такой поры, является ее линейное напряжение γ , которое можно определить из экспериментальных зависимостей среднего времени жизни БЛМ t_1 от амплитуды наложенного на нее напряжения U [6].

Зависимость γ от эффективной формы липидов выражается в виде:

$$\gamma = D - \frac{2\pi}{h} \varepsilon C_0, \quad (2)$$

где D — объединяет все параметры, не зависящие от объемной концентрации ЛФХ C_0 ; h — толщина монослоя. Сравнение этого уравнения с уравнением (1) выявляет одинаковую комбинацию параметров ξ в них. Экспериментальная зависимость γ от C_0 согласно теоретическому выражению (2), линейна (рис. 5). Из наклона прямой $\gamma(C_0)$ можно определить ξ и, подставив его в выражение (1), получить теоретическую зависимость $\lg t_{\text{жизни}}(C_0)$, которая представляется в виде прямой. Как видно из рис. 4, экспериментальные точки хорошо ложатся на теоретическую прямую. Поскольку теория не имеет ни одного свободного параметра [6], совпадение наклонов экспериментальной и теоретической зависимостей $\lg t_{\text{жизни}}(C_0)$ доказывает, что при монослойном слиянии двух БЛМ реализуется стокерный механизм.

Полное слияние БЛМ. Поскольку спонтанный переход ТС в мембранную трубку — событие достаточно редкое, для реализации полного слияния необходимы специальные условия. Так, слияния можно добиться наложением на ТС напряжения, вызывающего разрушение контактного бислоя и образование мембранной трубки. На рис. 6 показана

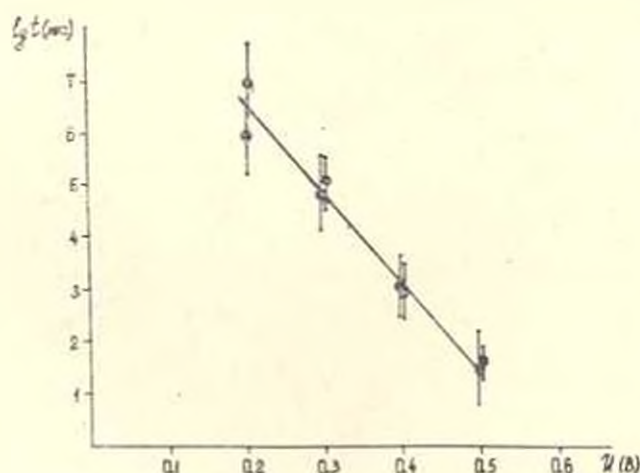


Рис. 6 Зависимости от напряжения среднего времени жизни обычной БЛМ (○) и средней длительности импульса, необходимого для индукции полного слияния двух мембран (●); площади БЛМ и области контакта одинаковы и составляют $\sim 1,7 \cdot 10^{-2} \text{ см}^2$. БЛМ из смеси ДОФХ/холестерин (9/1 по весу), 0,1 М раствор KCl. Каждая точка на графике соответствует среднему из десяти измерений.

на зависимость промежутка времени с момента наложения на контактный бислой прямоугольного импульса напряжения до образования трубки от амплитуды импульса (черные точки). Эта кривая совпадает во всем исследованном диапазоне с зависимостью времени жизни обычной мембраны от напряжения (белые точки). Следовательно, в основе электростимулируемого слияния лежит необратимый электрический пробой контактного бислоя, т. е. образование в нем гидрофильной поры надкритического радиуса [11].

Нами обнаружено и исследовано также явление полного слияния кардиолипидсодержащих скваленовых БЛМ в присутствии между ними ионов Ca^{2+} (~ 1 мМ). Отметим, что Ca^{2+} , введенный лишь в среднее отделение ячейки, не может модифицировать и дестабилизировать контактный бислой, сформированный из внешних монослоев двух БЛМ [3, 5, 12]. Результаты экспериментов, в которых мембранную трубку получали при введении Ca^{2+} после монослойного слияния, позволяют предположить, что этот катион дестабилизирует участок соединения трех бислоев и ТС, т. е. периметр контактного бислоя (рис. 2в) [5].

Необходимо подчеркнуть, что как при электростимулируемом, так и при Ca^{2+} -индуцируемом слиянии образование ТС обязательно предшествует слиянию. Так, наложение электрического поля на БЛМ до монослойного слияния приводит к их разрушению, но не вызывает слияния. Таким образом, формирование одного бислоя в области контакта двух БЛМ является необходимой стадией взаимодействия мембран, предшествующей слиянию.

Исследование устойчивости мембранной трубки. Деление мембранной трубки носит пороговый характер: при увеличении гидростатического давления снаружи трубки происходит своеобразный коллапс, приводящий к делению трубки на две БЛМ [4]. Теоретическое и экспериментальное исследование устойчивости мембранной трубки показало, что в основе коллапса лежит потеря устойчивости трубки при определенном соотношении параметров системы: длины трубки L , радиуса ее основания R , трансмембранной разности гидростатических давлений ΔP и натяжения БЛМ σ . Дело в том, что не любым значениям названных параметров соответствует равновесная форма трубки, отвечающая минимуму свободной энергии [4].

Теоретические расчеты, произведенные Козловым [4], подтверждаются экспериментами и дают следующую зависимость критического давления, вызывающего коллапс, от параметров системы:

$$\Delta P^* = \frac{2,2\sigma}{R} \left(1 - 0,754 \frac{L}{R} \right). \quad (3)$$

Как следует из теории, при $\Delta P^* = 0$ трубка делится при $L/R = 1,325$. Анализ выражения (3) показывает, что из наклона зависимостей $\Delta P^*(L)$ можно определить натяжение БЛМ σ .

Система двух контактирующих БЛМ представляет собой упрощенную модель взаимодействия биологических мембран. Основные закономерности взаимодействия и слияния бислоев, обнаруженные нами,

наблюдаются, однако, и на биологических объектах. Так, экспериментально доказанный нами вывод о том, что слиянию бислоев обязательно предшествует образование ТС, подтверждается электронномикроскопическими данными, полученными, например, при слиянии секреторной везикулы с плазмалеммой [13, 14].

Условия реализации описанного выше Ca^{2+} -индуцируемого слияния БЛМ, не содержащих растворителя, близки к условиям слияния многобластов в культуре и *in vivo* [15]. В обоих случаях необходимо присутствие миллимолярных концентраций этого иона только между контактирующими мембранами. Необходимо подчеркнуть, что слияние БЛМ, подобно биологическим мембранам, может иметь Ca^{2+} -специфичность.

В последние годы успешно осуществлено электростимулируемое слияние животных и растительных клеток [17]. Авторы метода полагают, что в его основе лежит электрический пробой клеточных мембран в области контакта. Однако в этой системе не удастся определить величины потенциалов, падающих на мембранах клеток, и идентифицировать промежуточные стадии слияния. Исследование электростимулируемого слияния БЛМ позволило строго доказать, что механизм такого явления предполагает образование гидрофильной коры надкритического радиуса в контактном бислое после формирования ТС. Иными словами, полное слияние вызвано необратимым электрическим пробоем одиночного бислоя в области контакта.

Обращает на себя внимание также сходство эндоцитоза и деления клеток с описанным выше коллапсом мембранной трубки. Можно предположить, что эти процессы протекают по сходному механизму. Особенно наглядно это проявляется при получении мембранного пузырька в patch-clamp методе Хеера и соавт. [10].

Изложенный материал позволяет предположить, что молекулярные механизмы взаимодействия и слияния липидных бислоев, изученные нами в системе БЛМ—БЛМ, реализуются также при структурных перестройках биологических мембран, приводящих к слиянию.

Ереванский физический институт ГНАЭ СССР,

Поступило 25.X 1984 г.

ԵՐԿՇԵՐՏ ԻՌՊԻԴԱՅԻՆ ՄԵՄԲՐԱՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ՄԻԱՋՈՒԹՅՈՒՄԸ

Գ. Բ. ՄԵԼԻՔՅԱՆ

Հետազոտված են երկշերտ լիպիդային մեմբրանների (ԵԼՄ-ների) փոխադրեցությունը և միաձուլումը: Ցույց է տրված, որ ԵԼՄ-ների փոխադրեցության ղեկավարում դիտվում է Երևույթների հետևյալ հաջորդականությունը՝ միաշերտ միաձուլում, լիպիդ միաձուլում և մեմբրանների բաժանում: Միաշերտ միաձուլման հիմքում ընկած է լույս ղեկավարող ատոմներով հարակից միաշերտների մեջ, որոնք սկիզբ են տալիս ելամինար կառուցվածքին (մեկ երկշերտ մեմբրան ԵԼՄ-ների հարակցման տիրույթում): Ուսումնասիրված է նաև մեմբրանային խողովակ առաջացնող էլեկտրախթանվող և Ca^{2+} -խթանվող միաձուլումների մեխանիզմը: Պարզաբանված են այս խողովակի անկայունացման և երկու ԵԼՄ-ների բաժանման պատճառները:

INTERACTION AND FUSION OF BILAYER LIPID MEMBRANES

G. B. MELIKYAN

The interaction and fusion of bilayer lipid membranes (BLM) have been studied. The interaction of BLM passes through 3 stages: monolayer fusion, complete fusion and fission of membranes. The structural rearrangement underlying the monolayer fusion involves the formation of a trilaminar structure (single bilayer formation in the BLM contact region) as a result of local defects in the interacting monolayers. Complete fusion gives rise to the membranous tube formation. The electrostimulated and Ca^{2+} -induced fusion mechanism and the reasons of membrane tube destabilization have been investigated.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Козлов М. М., Маркин В. С. Биофизика, 28, 242—247, 1983.
2. Либерман Е. А., Пенашев В. А. Биофизика, 13, 193—196, 1968.
3. Либерман Е. А., Пенашев В. А. Биофизика, 17, 1017—1023, 1972.
4. Меликян Г. Б., Козлов М. М., Черномордик Л. В., Маркин В. С. Докл. АН СССР, 274, 4, 1984.
5. Меликян Г. Б., Черномордик Л. В., Абидор И. Г., Чайлахян Л. М., Чизмаджян Ю. А. Докл. АН СССР, 269, 1221—1225, 1983.
6. Черномордик Л. В., Козлов М. М., Меликян Г. Б., Абидор И. Г., Маркин В. С., Чизмаджян Ю. А. Биологические мембраны, 1, 411—427, 1981.
7. Chernomordik L. V., Melikyan G. B., Dubrovina N. I., Abidor I. G., Chizmadzhev Yu. A. Bioelectrochem. and Bioenerg., 12, 155—166, 1984.
8. Cherny V. V., Sokolov V. S., Abidor I. G. Bioelectrochem. and Bioenerg., 7, 413—420, 1980.
9. Ferenowsky G. N., Gyulkhanyan M. Z. Stud. Biophys., 36, 19—20, 1976.
10. Jamil O. P., Morty A., Nher L., Salmann B., Sigworth F. J. Hügler Arch., 391, 85—100, 1981.
11. Melikyan G. B., Abidor I. G., Chernomordik L. V., Chaikhanyan L. M. Biochim. et Biophys. Acta, 730, 395—398, 1983.
12. Nher E. Biochim. et Biophys. Acta, 373, 328—336, 1974.
13. Pinto da Silva P., Nogueira M. L. J. Cell Biol., 692, 171—175, 1977.
14. Poste G., Nikolson G. L. (eds.) Membrane Fusion Amsterdam: Elsevier—North-Holland Biomedical Press, 835, 1978.
15. Schudt C., Fette D. FEBS Lett., 59, 36—38, 1975.
16. White S. H. Biophys. J., 23, 337—347, 1978.
17. Zimmermann U. Biochim. et Biophys. Acta, 694, 227—271, 1982.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVIII, № 1, 1985

УДК 577.352.36

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНДУЦИРОВАННОГО ИОНОФОРАМИ $\text{K}^+ - \text{H}^+$ ОБМЕНА В ЭРИТРОЦИТАХ

А. В. ГЮЛЬХАНДЯНИ

Исследовано влияние мембранного потенциала эритроцитов крысы на скорости выхода K^+ и входа H^+ . Показано, что при индуцировании вытока K^+ валиномином скорости $\text{K}^+ - \text{H}^+$ обмена повышаются при увеличении мембранного потенциала в сторону положительных значений. В случае вызванного Ca^{2+} -ионофором A23187 пере-