

Формирование белок-липидных доменов в плазматических мембранах

Мокрушников П.^{1*}, Рудяк В.^{1, 2}

¹ Новосибирский государственный архитектурно-строительный университет (Сибстрин),
Новосибирск, Россия

² Институт теплофизики им. С.С. Кутателадзе СО РАН, Новосибирск, Россия

* pavel.mokrushnikov@bk.ru

Ключевые слова: белок-белковые и белок-липидные взаимодействия; белок-липидные домены; β -структуры; структурные изменения плазматических мембран

Мотивация и цель: В настоящее время установлено, что при взаимодействии гормонов стресса и андрогенов с плазматическими мембранами происходит изменение их структуры [1, 2]. Под изменением структуры (конформации) плазматических мембран понимается изменение вторичной, третичной и четвертичной структур мембранных белков, фаз липидного бислоя, перераспределение белков и липидов по бислою, изменение их морфологии мембран. При этом в плазмалеммах меняются взаимодействия между белками и липидами, образуется неподвижная квазипериодическая сеть белок-липидных доменов, связанных с цитоскелетом. В этих доменах прилегающие к белкам липиды сильнее притягиваются к белкам, поменявшим свою конформацию, что ведет к изменению поля механических напряжений в мембране [3], функции мембран и клеток [4, 5]. Инициаторами образования белок-липидных доменов являются мембранные белки, которые изменили свою конформацию при взаимодействии мембраны с гормонами [1]. Вместе с тем все еще не ясно, какие именно изменения во вторичной структуре мембранных белков способствуют образованию вокруг них белок-липидных доменов. Целью данной работы является установление вторичных структур мембранных белков, появление которых способствует увеличению притяжения липидов к мембранным белкам и, как следствие, появлению белок-липидных доменов в мембране.

Методы и алгоритмы: В представленном докладе экспериментально исследуется изменение структуры мембран эритроцитов крыс при их связывании с андрогенами (андростероном, тестостероном, дегидроэпиандростероном (ДЭА), дегидроэпиандростерон сульфатом (ДЭАС)) и гормонами стресса (кортизолом, адреналином, норадреналином). С этой целью использовались флуоресцентные методы измерения тушения собственной флуоресценции мембранных белков, измерения микровязкости мембран с помощью зонда пирена и поглощения мембранами инфракрасного излучения.

Результаты: Методом измерения тушения собственной флуоресценции мембранных белков установлено, что все исследуемые гормоны связывались с мембранными белками. Максимальная величина тушения оказалось различной для разных гормонов. Это свидетельствует о разном сродстве гормонов с мембранными белками. Измерение микровязкости мембран показало, что при их связывании с гормонами, за исключением ДЭА, происходило образование неподвижной квазипериодической сети белок-липидных доменов, связанной с

цитоскелетом через узловый и анкириновый комплексы. При этом микровязкость липидного бислоя в белок-липидной области взаимодействия увеличивалась при меньшей удельной концентрации гормонов во взвеси. Это увеличение оказалось заметно больше, чем в липид-липидной области взаимодействия. Такое поведение свидетельствует о том, что усиливается взаимодействие между мембранными белками и окружающими их липидами. Эти липиды сместились ближе к мембранным белкам, произошло образование белок-липидных доменов. Липиды в этих доменах находятся в жидко упорядоченном состоянии L_o , липиды в пространстве между доменами находятся в жидко неупорядоченном состоянии L_d . При взаимодействии ДЭА с мембранами изменение микровязкости происходило одинаково в белок-липидной и липид-липидной областях взаимодействия. Это означает, что белок-липидные домены не сформировались, микровязкость увеличивалась равномерно по всему липидному бислою.

Причину такого разного взаимодействия гормонов с мембранами удалось установить с помощью измерения поглощения инфракрасного излучения. Оказалось, что по сравнению с образцами мембран эритроцитов, в которые добавлялись гормоны, в спектрах поглощения мембран, инкубированных с ДЭА, не появляются полосы поглощения 1685 см^{-1} , указывающие на появление в мембранных белках межмолекулярных β -листов [6]. Кроме того, не появляется полоса поглощения 1636 см^{-1} , присущая появлению в мембранных белках внутримолекулярных β -листов. При взаимодействии других гормонов с мембранами эти полосы в спектре поглощения мембран фиксировались, что говорит о переходе клубок $\rightarrow$ β -структура в белках этих мембран. Вместе с тем при инкубации ДЭА с мембранами в их белках происходил переход клубок $\rightarrow$ α -структура. Об этом свидетельствует увеличение интегральной интенсивности полосы 1654 см^{-1} , которая является характерной полосой α -спиралей в пептидах. Таким образом, показано, что за образование белок-липидных доменов в плазматических мембранах ответственны не α -спирали, а β -структуры в мембранных белках.

Выводы: Установлено *in vitro*, что инициаторами появления белок-липидных доменов в плазматических мембранах, образующих неподвижную квазипериодическую сеть, связанную с цитоскелетом, являются мембранные белки, в которых после взаимодействия с гормонами появляются β -структуры. При этом появление новых α -спиралей в мембранных белках не усиливает взаимодействие между белками и окружающими их липидами, липиды не притягиваются ближе к белкам и не образуют белок-липидные домены.

Финансирование: Исследование поддержано мегагрантом Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2021-575).

Formation of protein-lipid domains in plasma membranes

Mokrushnikov P.^{1*}, Rudyak V.^{1, 2}

¹ Novosibirsk State University of Architecture and Civil Engineering (SIBSTRIN), Novosibirsk, Russia

² Institute of Thermophysics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* pavel.mokrushnikov@bk.ru

Key words: protein-protein and protein-lipid interactions; protein-lipid domains; β -structures; structural changes in plasma membranes

Motivation and Aim: It has now been established that when stress hormones and androgens interact with plasma membranes, a membrane structural changes occur [1, 2]. Structural changes of plasma membranes mean changes in the secondary, tertiary and quaternary structures of membrane proteins, phases of the lipid bilayer, redistribution of proteins and lipids throughout the bilayer, and changes in membrane morphology. At the same time, the interactions between proteins and lipids in the plasma membranes change, and a stationary quasiperiodic network of protein-lipid domains associated with the cytoskeleton is formed. In these domains, lipids adjacent to proteins are more strongly attracted to proteins that have changed their conformation, which leads to a change in the mechanical stress field in the membrane [3], the function of membranes and cells [4, 5]. The initiators of the formation of protein-lipid domains are membrane proteins that change their conformation during the interaction of the membrane and hormones [1]. At the same time, it is still unclear what changes in the secondary structure of membrane proteins contribute to the formation of protein-lipid domains around them. The purpose of this work is to establish the secondary structures of membrane proteins, the appearance of which in membrane proteins contributes to an increase in the attraction of lipids to membrane proteins and, as a consequence, the appearance of protein-lipid domains in the membrane.

Methods and Algorithms: The rat erythrocyte membranes changes are studied experimentally at the presented report when they were bound to androgens (androsterone, testosterone, dehydroepiandrosterone (DHEA), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S)) and stress hormones (cortisol, adrenaline, norepinephrine). For this purpose, fluorescent methods were used to measure the quenching of the membrane proteins fluorescence intrinsic, to measure the microviscosity of membranes using a pyrene probe and the infrared radiation absorption.

Results: By measuring the membrane proteins fluorescence intrinsic quenching, it was established that all the studied hormones were bound to membrane proteins. The maximum magnitude of quenching was different for different hormones. This indicates a different affinity of hormones for membrane proteins. Membrane microviscosity measurements showed that when they were bound to hormones, with the exception of DHEA, a stationary quasiperiodic network of protein-lipid domains was formed, connected to the cytoskeleton through the junctional and ankyrin complexes. In this case, the microviscosity of the lipid bilayer in the protein-lipid interaction region began to increase at a lower specific concentration of hormones in the suspension. This increase was noticeably greater than in the lipid-lipid interaction region. This means that the interaction between membrane proteins and their surrounding lipids has increased. These lipids moved closer to the membrane proteins, and the formation of protein-lipid domains occurred. The lipids in these domains are in the liquid ordered state L_o , and the lipids in the space between the domains are in the liquid disordered state L_d . When DHEA interacted with membranes, the change in microviscosity occurred equally in the protein-lipid and lipid-lipid interaction regions. This means that protein-lipid domains were not formed, and the increase in microviscosity occurred uniformly throughout the lipid bilayer.

The reason for such different interactions of hormones with membranes was determined by measuring the absorption of infrared radiation. It turned out that, in comparison with

samples of erythrocyte membranes to which hormones were added, the absorption spectra of membranes incubated with DHEA did not contain absorption bands at 1685 cm^{-1} , indicating the appearance of intermolecular β -sheets in membrane proteins [6]. In addition, the absorption band at 1636 cm^{-1} , characteristic of the appearance of intramolecular β -sheets in membrane proteins, does not appear. When other hormones interacted with membranes, these bands appeared in the absorption spectrum of the membranes, which indicates a tangle $\rightarrow$ β -structure transition in the proteins of these membranes. At the same time, when DHEA was incubated with membranes, a tangle $\rightarrow$ α -helix transition occurred in their proteins. This is evidenced by an increase in the integral intensity of the band at 1654 cm^{-1} , which is a characteristic band of α -helix in peptides. Thus, it has been shown that it is not α -helix, but β -structures in membrane proteins that are responsible for the formation of protein-lipid domains in plasma membranes.

Conclusion: It has been established *in vitro* that the initiators of the protein-lipid domains in plasma membranes appearance, forming a stationary quasiperiodic network associated with the cytoskeleton, are membrane proteins in which β -structures appear after interaction with hormones. At the same time, the appearance of new α -helix in membrane proteins does not enhance the interaction between proteins and the surrounding lipids; lipids are not attracted closer to proteins and do not form protein-lipid domains.

Funding: The study is supported by a Megagrant from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-575).

Список литературы/References

1. Мокрушников П.В., Панин Л.Е., Панин В.Е., Козельская А.И., Зайцев Б.Н. Структурные переходы в мембранах эритроцитов (экспериментальные и теоретические модели). Новосибирск: Новосибирский государственный архитектурно-строительный университет (Сибстрин), 2019
[Mokrushnikov P.V., Panin L.E., Panin V.E., Kozelskaya A.I., Zaytsev B.N. Structural transitions in erythrocyte membranes (experimental and theoretical models). Novosibirsk: Novosibirsk State University of Architecture and Civil Engineering (Sibstrin), 2019 (in Russian)]
2. Mokrushnikov P.V. Mechanical Stresses in the Lipid Bilayer of Erythrocyte Membranes. In: Ashrafuzzaman M. (Ed.). Lipid Bilayers: Properties, Behavior and Interactions. NY: Nova Science Publishers, 2019;43-91
3. Мокрушников П.В., Рудяк В.Я. Механическая модель образования складок на плазматической мембране. Доклады Академии наук высшей школы Российской Федерации. 2023;2(59):29-40. doi 10.17212/1727-2769-2023-2-29-40
[Mokrushnikov P.V., Rudyak V.Ya. Model of plasma membrane folds formation. *Doklady Akademii Nauk Vysshei Shkoly Rossiiskoi Federatsii = Proceedings of the Russian Higher School Academy of Sciences*. 2023;59(2):29-40. doi 10.17212/1727-2769-2023-2-29-40 (in Russian)]
4. Mokrushnikov P.V., Rudyak V.Ya., Lezhnev E.V. Mechanism of gas molecule transport through erythrocytes' membranes by kinks-solitons. *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics*. 2021;12:22-31
5. Мокрушников П.В., Рудяк В.Я. Модель диффузии липидов в цитоплазматических мембранах. Биофизика. 2023;68(1):41-56. doi 10.31857/S0006302923010052
[Mokrushnikov P.V., Rudyak V.Ya. Model of lipid diffusion in cytoplasmic membranes. *Biofisica = Biophysics*. 2023;68(1):31-43. doi 10.1134/S0006350923010128 (in Russian)]
6. Yang H., Yang S., Kong J., Dong A., Yu S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nat Protoc*. 2015;10(3):382-396. doi 10.1038/nprot.2015.024