

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Станишневa-Коновaловa Тaтьянa Бoрисовнa

**РЕГУЛЯЦИЯ ДИНАМИКИ МЕМБРАН F-BAR-ДОМЕННЫМ БЕЛКОМ
NERVOUS WRECK**

Специальность: 03.01.02 – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
доцент Ольга Сергеевна Соколова

Москва 2016

Оглавление

Список сокращений.....	3
Введение.....	4
Цель и задачи исследования	5
Научная новизна и практическая значимость работы.....	5
Литературный обзор.....	6
Цитоплазматическая мембрана.....	6
Механизмы изменения формы мембран.....	8
Семейство белков BAR	10
Основы метода молекулярной динамики	28
Основы метода электронной микроскопии и получения трёхмерных реконструкций молекул	34
Материалы и методы.....	46
Результаты и обсуждение	53
Молекулярная динамика мембран ДПФХ и ДПФХ/ДПФИ	53
Молекулярная динамика F-BAR-домена Nwk с липидной мембраной.....	57
Олигомеризация F-BAR домена Nwk на мембране.....	64
Структура автоингибированного Nwk.....	69
Структура связанного с мембраной Nwk	71
Заключение.....	77
Выводы	78
Благодарности.....	79
Список литературы.....	80

Список сокращений

А.о. – аминокислотный остаток

ДАГ – диацилглицерол

ДОФС – диолеилфосфатидилсерин

ДОФХ – диолеилфосфатидилхолин

И(1,4,5)Ф₃ – инозитол-1,4,5-трифосфат

ИнзФ₆ – мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат

МД – молекулярная динамика

ОКФ - объёмная корреляция Фурье, Fourier shell correlation (FSC)

ПОФЭ – пальмитоилолеилфосфатидилэтаноламин

СКО – среднее квадратичное отклонение

СКФ – среднее квадратичные флуктуации

СМ – сфингомиелин

ФИ – фосфатидилинозитол

ФИ(4,5)Ф₂ – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат

ФК – фосфатидная кислота

ФРТ – функция рассеяния точки, point spread function (PSF)

ФС – фосфатидилсерин

ФХ – фосфатидилхолин

ФЭ – фосфатидилэтаноламин

ЧКХ – частотно-контрастная характеристика, contrast transfer function (CTF)

Введение

Клеточные мембраны – динамичные структуры, способные изгибаться, разделяться и сливаться в процессе жизнедеятельности клетки [1,2]. Эти процессы регулируются цитозольными белками, которые обратимо связываются с мембранами для формирования необходимых структур [3–5]. Многие из этих белков содержат BAR-домены, связывающиеся с отрицательно заряженными липидами, в частности фосфоинозидами [6]. Локальное увеличение концентрации фосфоинозитидов служит одним из механизмов привлечения BAR-доменных белков к местам мембранных перестроек. Помимо BAR-домена, белки этой группы часто содержат домены, привлекающие к мембране актин-связывающие белки и белки эндоцитарного аппарата [7].

Объект исследования данной работы – BAR-доменный белок Nervous wreck (Nwk), функции которого связаны с интернализацией рецепторов фактора роста в нервно-мышечном синапсе (НМС) *Drosophila melanogaster*. Определение механизмов, которые контролируют скорость и направление потока эндосом с рецепторами, имеет большое значение для понимания процессов передачи сигнала в нейронах, и НМС служит удобной моделью для их изучения.

В первой части работы методом молекулярной динамики изучается влияние увеличения концентрации фосфоинозитол-4,5-бисфосфата (ФИ(4,5)Ф₂) на свойства липидной мембраны. Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение количества ФИ(4,5)Ф₂ в мембране приводит к возрастанию упорядоченности окружающих липидов. Биологическое значение этого процесса заключается в повышении устойчивости к вертикальному смещению, вызываемому связывающимися с ФИ(4,5)Ф₂ белками.

Во второй части работы исследуется взаимодействие F-BAR-домена белка Nwk с липидной мембраной и определяются аминокислотные остатки, играющие главную роль в связывании с ФИ(4,5)Ф₂. Поскольку для изменения формы мембраны на большой поверхности необходимо воздействие множества BAR-доменов [8], в следующей части работы с помощью метода электронной микроскопии изучался способ олигомеризации Nwk на мембране. Было показано, что олигомеры Nwk отличаются от олигомеров других белков этой группы, а также предложена модель, объясняющая эффекты, наблюдаемые при экспрессии Nwk в клетках. Наконец, в третьей части работы из двумерных проекций были построены трёхмерные реконструкции полноразмерного Nwk на липидах и на углеродной подложке, из чего был сделан вывод об изменении конформации белка при связывании с липидами.

Цель и задачи исследования

Цель данного исследования – изучить механизмы регуляции динамики мембран F-BAR-доменным белком Nwk. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Создание модельных липидных мембран, содержащих отрицательно заряженный липид ФИ(4,5)Ф₂;
- Изучение влияния концентрации ФИ(4,5)Ф₂ на свойства мембраны методом молекулярной динамики;
- Изучение взаимодействия F-BAR-домена Nwk с ФИ(4,5)Ф₂-содержащей липидной мембраной методом молекулярной динамики и определение аминокислотных остатков, критических для взаимодействия;
- Изучение способа олигомеризации F-BAR-доменов Nwk на липидном монослое с помощью электронной микроскопии;
- Получение трёхмерных реконструкций полноразмерного Nwk на липидах и на углеродной подложке с помощью электронной микроскопии макромолекул и изучение конформационных изменений белка при взаимодействии с мембраной.

Научная новизна и практическая значимость работы

Данная диссертация посвящена актуальной проблеме регуляции динамики клеточных мембран представителем семейства BAR-доменных белков. Белки этой группы являются центральными регуляторами мембранных перестроек у всех эукариот и активно изучаются в настоящее время. Изменения уровня экспрессии или мутации в генах, кодирующих BAR-доменные белки, связаны с рядом серьёзных неврологических и аутовоспалительных заболеваний, а также некоторыми видами инвазивных опухолей, что делает эти белки потенциальной терапевтической мишенью [9]. Структуры подавляющего большинства BAR-доменов пока не определены, также не изучены механизмы их воздействия на мембрану и способы регуляции активности в контексте полноразмерных белков. В данной работе впервые получена реконструкция полноразмерного белка Nwk и описан способ его олигомеризации на мембране, а также предложена модель его взаимодействия с мембраной.

Литературный обзор

Цитоплазматическая мембрана

Мембраны играют важнейшую роль в структурной организации и функционировании прокариотических и эукариотических клеток. Они не только разделяют клетку на отдельные компартменты, но и участвуют в регуляции взаимодействий между внутренней и внешней сторонами этих компартментов. Принципы структурной организации одинаковы для всех мембран, однако различие функций приводит к большому разнообразию.

Плазматическая мембрана образует границу между клеткой и её окружением. Механическую опору для мембраны обеспечивает цитоскелет, определяя таким образом форму клетки. Процессы, связанные с перестройкой плазматической мембраны и перемещением мембранных органелл, также происходят при участии цитоскелета. Взаимодействие между ним и мембраной реализуется через специализированные белки, одни из которых связываются с мембраной, а другие с цитоскелетом.

Плазматическая мембрана в основном состоит из фосфолипидов, в состав которых входит жирные кислоты и полярная группировка, образованная остатком фосфорной кислоты и соединённой с ней группой атомов различной химической природы. Жирные кислоты, как правило, содержат чётное число атомов углерода от 14 до 20 и могут быть как насыщенными, так и ненасыщенными. В составе природных фосфолипидов обычно имеется одна насыщенная и одна ненасыщенная цепи. Основными фосфолипидами эукариотических клеток являются фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ) и сфингомиелин (СМ), на долю которых приходится 45-55, 15-25 и 5-10% соответственно (рис. 1) [10]. Важную роль также играют отрицательно заряженные липиды фосфатидилсерин (ФС), фосфатидная кислота (ФК) и фосфатидилинозитол (ФИ), составляющие 2-10, 1-2 и 10-15% от общего числа липидов соответственно [11].

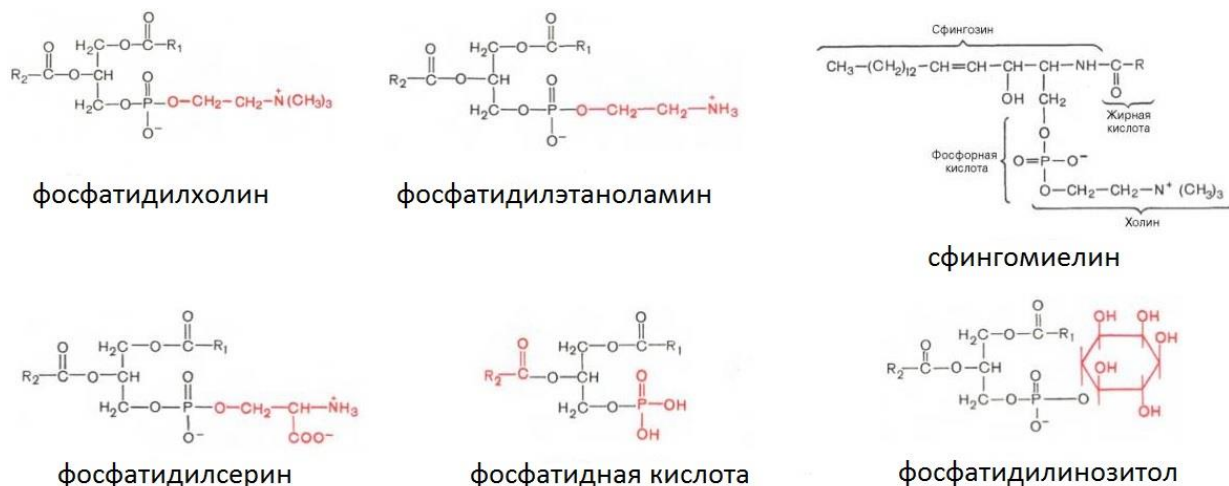


Рисунок 1. Основные липиды эукариотических клеток.

Для клеточных мембран характерна асимметрия состава: ФХ и СМ в основном располагаются во внешнем липидном монослое, а ФС и ФИ во внутреннем. Фосфорилированные производные ФИ, фосфоинозитиды, встречаются в мембранах в следовых количествах, однако играют важную роль в передаче сигнала. ФИ фосфорилируется различными киназами и дефосфорилируется фосфатазами в ответ на внеклеточные стимулы. Инозитольное кольцо ФИ может быть фосфорилировано по гидроксильным группам в положениях С-3, С-4 и С-5 в различных комбинациях. Производные ФИ связываются с белками, специфически узнающими определённые фосфоинозитиды. Наиболее распространённым фосфоинозитидом, составляющим около 1% от общего числа липидов в клетке, является фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат (ФИ(4,5)Ф₂) [12,13].

Заряд ФИ(4,5)Ф₂ может быть равен -3, -4 или -5 в зависимости от степени протонированности фосфатных групп, определяемой такими факторами как pH и взаимодействие с белками [14,15]. Раньше ФИ(4,5)Ф₂ рассматривался исключительно как предшественник вторичных мессенджеров инозитол-1,4,5-трифосфата (И(1,4,5)Ф₃) и диацилглицерола (ДАГ) [16]. Однако, более поздние исследования показали, что ФИ(4,5)Ф₂ сам по себе выполняет множество функций в клетке, в том числе играет важную роль в эндоцитозе и регуляции взаимодействия цитоскелета с плазматической мембраной. Было показано, что ФИ(4,5)Ф₂-богатые везикулы способны индуцировать полимеризацию актина в клеточных экстрактах *Xenopus laevis* [17]. Кроме того, гиперэкспрессия ФИ(4,5)Ф₂-киназы индуцирует формирование актиновых филаментов, а гиперэкспрессия ФИ(4,5)Ф₂-связывающего PLCδ-PH-домена ингибирует полимеризацию актина [12,18].

Ряд белков имеет домены, избирательно связывающиеся с ФИ(4,5)Ф₂. Одним из таких доменов является PH (pleckstrin homology) домен длиной около 120 аминокислотных

остатков, два из которых (Lys30 и Lys57) формируют гидрофобные связи с фосфатами ФИ(4,5)Ф₂ [19]. Обычно одного РН-домена недостаточно для обеспечения стабильного связывания с мембраной и многие содержащие РН-домен белки, например, динамин, формируют на мембране олигомеры [19]. Другим доменом, связывающимся с ФИ(4,5)Ф₂, является ENTH (epsin NH2-terminal homology) домен. Он присутствует в белках эпсин и CALM, регулирующих сборку клатриновой решётки при эндоцитозе [20,21]. Сайт связывания ФИ(4,5)Ф₂ у CALM представляет собой кластер лизиновых остатков, отличный от липид-связывающего кармана РН. Помимо эпсина и CALM некоторые другие регуляторы эндоцитоза также связывают ФИ(4,5)Ф₂. Существуют данные о том, что дефосфорилирование ФИ(4,5)Ф₂ приводит к расформированию клатринового пузырька [22]. Названные выше домены имеют структуру, позволяющую им специфически связываться с ФИ(4,5)Ф₂. Однако, существуют и домены, неспецифически связывающиеся с фосфоинозиотидами за счёт электростатических взаимодействий, например, BAR домены [3][23][24].

Кроме привлечения белков к мембране ФИ(4,5)Ф₂ также может их активировать. Примером такого взаимодействия являются белки, содержащие N-концевой FERM-домен. В неактивном состоянии этот домен ингибируется С-концевым участком белка. При связывании с ФИ(4,5)Ф₂ автоингибирование снимается и белок может взаимодействовать с другими белками, например, CD44, и связывать актиновые филаменты с мембраной [25,26]. Сайт связывания ФИ(4,5)Ф₂ у FERM представляет собой углубление между двумя субдоменами, причём туда входит только 4-фосфат. Кроме того, ФИ(4,5)Ф₂ активирует белки семейства ERM, связывающие актиновые филаменты с мембранными белками, участвует в активации белков фокальной адгезии, талина и винкулина, и различным образом регулирует активности белков, сшивающих актиновые филаменты (например, α-актинин активируется, а филамин ингибируется) [18].

Механизмы изменения формы мембран

Локальное изменение формы мембраны необходимо для многих процессов жизнедеятельности эукариотических клеток. Липидные бислои устойчивы к спонтанным изгибам, поэтому изменение их формы является активным процессом.

Одним из механизмов формирования мембранного изгиба является изменение липидного состава монослоя (рис. 2). Образование в верхнем монослое кластера липидов с маленькими полярными головками (например, ФЭ, ДАГ, кардиолипина) приведёт к формированию негативного изгиба, в то время как липиды с большими головками (ФИ) вызывают позитивный изгиб [4,27,28]. Наличие двойных связей в углеводном хвосте липида также влияет на вероятность образования спонтанного изгиба, т.к. увеличивает

соотношение объёма, занимаемого хвостом, к объёму полярной головки. Активное поддержание асимметрии липидного состава монослоёв осуществляется АТФазами Р-типа, переносящими липиды между монослоями. Флиппазы переносят ФЭ и ФС из внешнего монослоя в цитозольный, а флоппазы осуществляют перенос в обратном направлении [29]. Последняя реакция является более медленной и не имеет липидной специфичности. Помимо липидов, локальный изгиб может вызывать кластеризация трансмембранных белков конусообразной формы [30–34] (рис. 2).

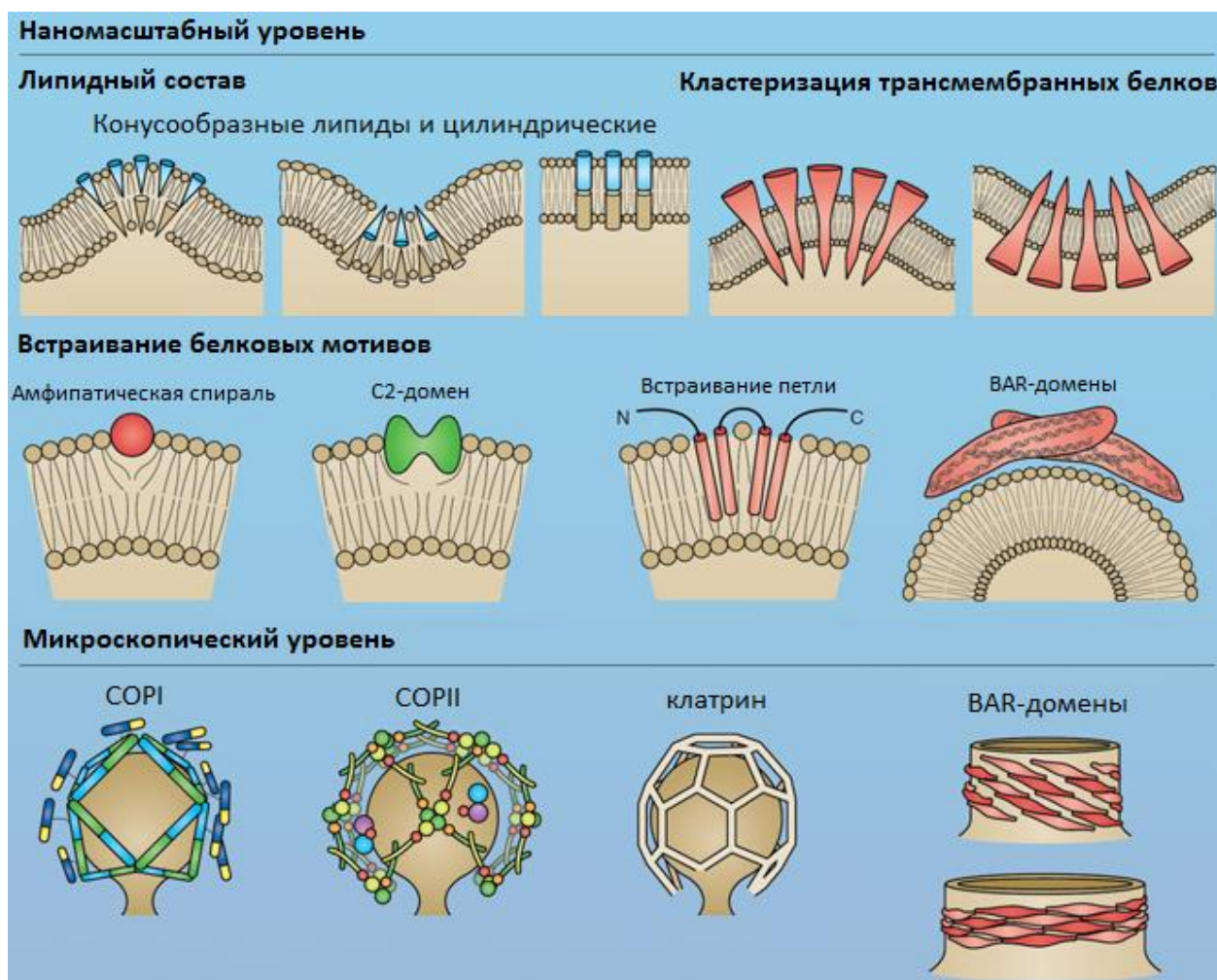


Рисунок 2. Механизмы формирования мембранных изгибов [35].

Другим способом создания локального изгиба мембраны является встраивание небольших амфипатических спиралей в область полярных головок [36,37] (рис.2). Такие спирали присутствуют у многих белков, вовлечённых в моделирование мембраны, и величина изгиба зависит от глубины встраивания [36,38].

Формирование и стабилизация более крупных изгибов сопряжены с олигомеризацией белков. Примером такого процесса является образование везикул, в котором участвуют белки клатрин, COP I и COP II [39]. Эти связываются не с мембраной, а

со специфическими адаптерными белками. Существуют и белки, непосредственно связывающиеся с мембранами за счёт электростатических взаимодействий положительно заряженных аминокислот с отрицательно заряженными липидами. Одним из крупнейших семейств таких белков является семейство BAR.

Семейство белков BAR

Белки семейства BAR являются центральными регуляторами мембранных перестроек у всех эукариот. Изначально BAR домены были определены как консервативные участки белков Rvs161 и Rvs167 дрожжей, а также амфифизин и BIN животных [40]. На данный момент по данным базы Uniprot семейство BAR включает более 220 белков [41], из которых только около 60 имеют кристаллические структуры [42]. Общим для всех BAR доменов является формирование димеров с положительно заряженной поверхностью, которая связывается с отрицательно заряженными липидными мембранами [8,43]. По структурным и филогенетическим свойствам BAR-домены делятся на несколько групп: классические BAR/N-BAR, F-BAR и I-BAR (рис. 3) [6]. Димеры классических BAR и N-BAR имеют серповидную форму и связываются с мембраной вогнутой поверхностью. По сравнению с ними F-BAR-домены чуть более вытянуты и имеют больший радиус кривизны, а I-BAR-домены изогнуты в противоположную сторону.

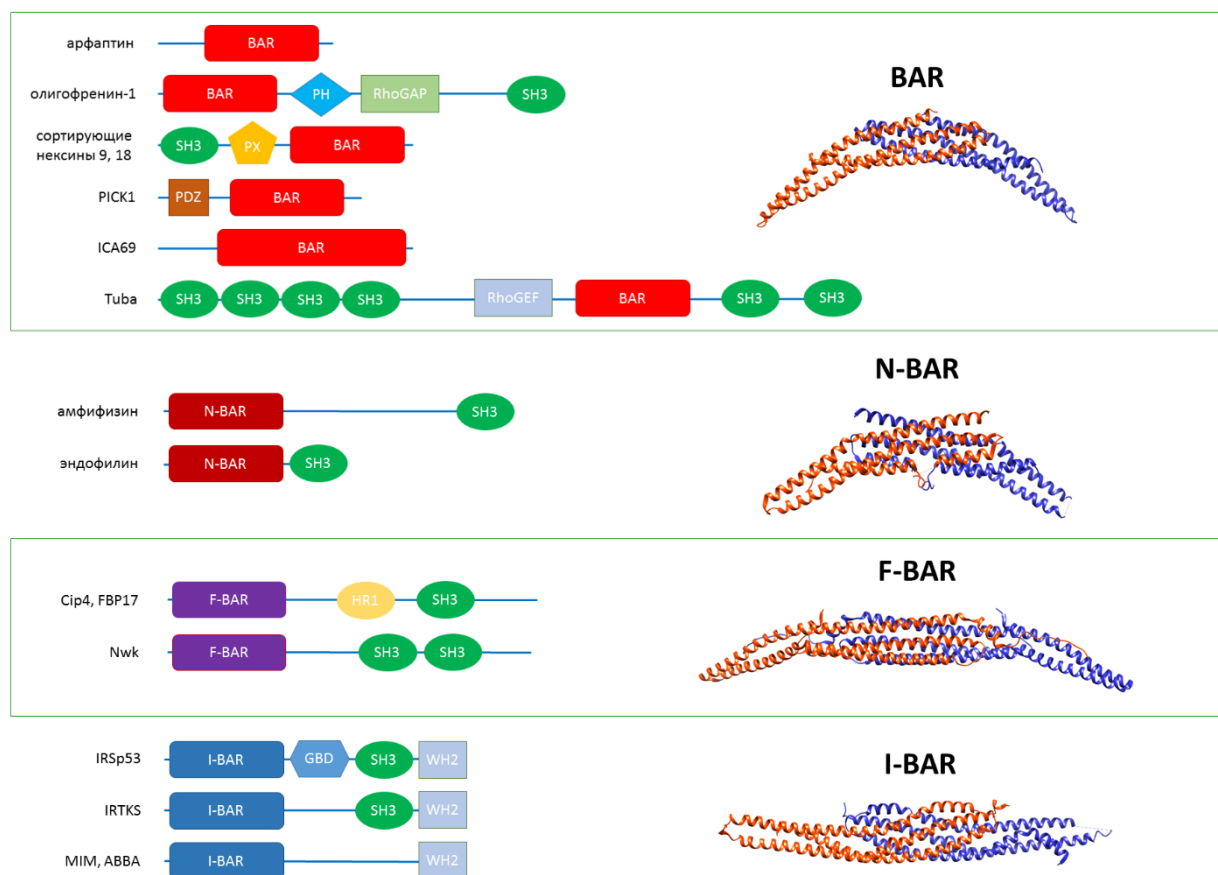


Рисунок 3. Доменная структура белков семейства BAR (слева) и димеры, образуемые BAR-доменами (справа).

Классические BAR-домены и N-BAR-домены

Большинство белков, содержащих классические BAR-домены, присутствуют в нервных клетках млекопитающих, где участвуют в формировании синаптических контактов и в процессах, связанных с передачей сигнала [44]. Одними из наиболее изученных BAR-доменных белков являются амфифизины, функции которых часто связаны с эндоцитозом в нейронах [45]. У млекопитающих есть два гена, кодирующих амфифизины. Изоформа амфифизина 2, также как амфифинин дрозофилы, экспрессируется не в нейронах, а в мышечных клетках, где участвует в формировании и стабилизации Т-трубочек [46,47]. Мутации в человеческом амфифизине 2/BIN1 вызывают наследственное нейромышечное заболевание, называемое центронуклеарная миопатия или миотубулярная миопатия [48]. Единственным консервативным участком амфифизинов различных организмов является N-концевой BAR-домен.

Кристаллическая структура BAR-домена амфифизина дрозофилы была получена в 2004 году и в той же работе было предсказано, что подобные домены встречаются у многих групп белков [43]. BAR-домен был закристаллизован в виде изогнутого димера с радиусом

кривизны около 220 Å, где каждый мономер состоит из трёх α-спиралей общей длиной 205 а.о. (рис. 4).

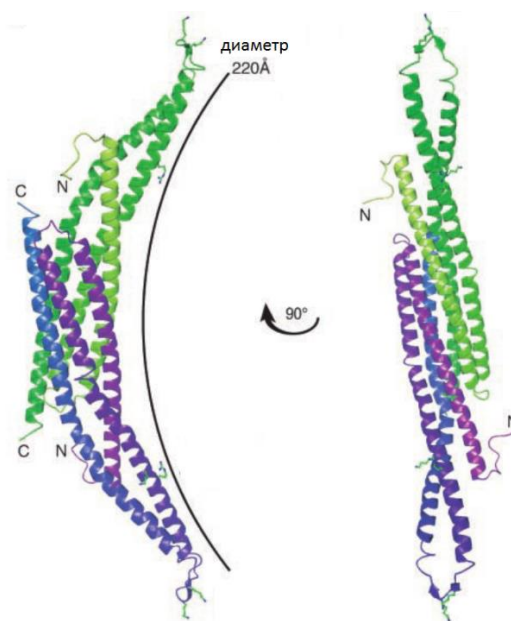


Рисунок 4. Структура BAR-домена амфифизина [43].

На N-конце располагается последовательность длиной 26 а.о., которая имеет неупорядоченную структуру в растворе, но складывается в амфипатическую спираль при взаимодействии с липидами. Она присутствует у многих других BAR-доменных белков и вместе с BAR-доменом образует структурную единицу N-BAR. На концах димера, между 2 и 3 α-спиралями, находится небольшая петля с положительно заряженными остатками, на вогнутой поверхности тоже присутствуют кластеры положительно заряженных а.о. Было предположено, что вогнутая поверхность и концевые участки отвечает за связывание с мембраной. Ранее у амфифизина уже была обнаружена способность формировать мембранные трубки на липосомах [49] и чтобы подтвердить, что эта активность связана с BAR-доменом, были проведены мутации заряженных а.о. на концевых петлях и на вогнутой поверхности. Как и ожидалось, мутанты демонстрировали меньшую способность связываться с мембраной и образовывать трубочки. Аналогичная картина наблюдалась при удалении N-концевой спирали.

На основании структурного сходства и несмотря на низкую степень гомологичности последовательностей, к семейству BAR-доменов была отнесена определённая ранее структура С-концевого домена арфаптина [50]. Ранее было показано, что арфаптин взаимодействует с ГТФ-азами Arf, Arl и Rac, но обнаружение у него BAR-домена позволило предположить, что он также взаимодействует с мембраной. Как и у амфифизина, мутации

положительно заряженных а.о. на вогнутой поверхности снижали способность формировать трубочки на липосомах.

В 2005 году была получена кристаллическая структура BAR-домена эндофилина [51]. На тот момент в ряде работ уже была отмечена важная роль эндофилина в эндоцитозе и его взаимодействия с амфифизином и динамином [52][53]. Полученная структура аналогична известным BAR-доменам: мономеры длиной 256 а.о., состоящие из трёх α -спиралей, образуют димер с радиусом кривизны около 300 Å, а на N-концах присутствуют неупорядоченные последовательности длиной 27 а.о. (рис. 5).

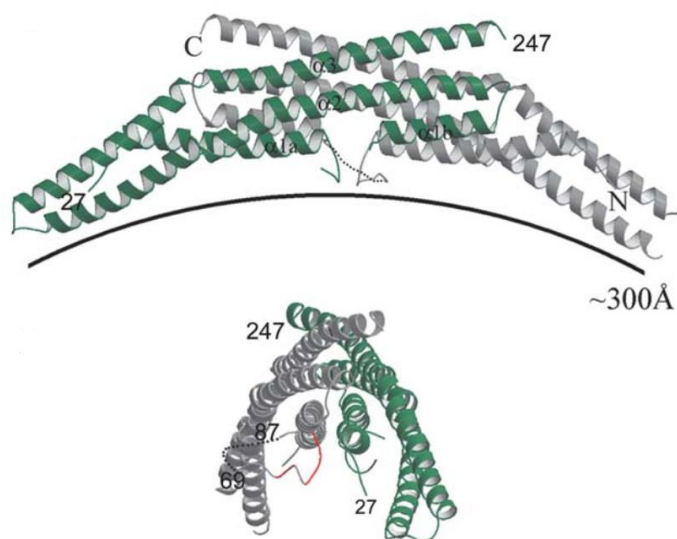


Рисунок 5. Структура N-BAR-домена эндофилина [51].

Основное отличие заключается в том, что в первой спирали есть вставка, которая образует петлю на вогнутой поверхности димера. Ряд данных свидетельствует о том, что эти вставки могут осуществлять ацилтрансферазную функцию [54], но помимо этого они могут участвовать в связывании с мембраной. Кристаллографический анализ также показал, что у эндофилина есть 11 сайтов связывания кадмия. Это означает, что *in vivo* вместо кадмия могут связываться ионы кальция, имеющие почти такой же радиус (0,97 Å у кадмия и 0,99 Å у кальция) [55]. Это согласуется с существующими данными о взаимодействии эндофилина с кальциевым каналом и предполагаемой роли Ca^{2+} в регуляции эндоцитоза [56].

I-BAR-домены

I-BAR-домен был впервые определён как гомологичный N-концевой домен белков млекопитающих IRSp53 и MIM и назван IM-доменом [57]. Изначально предполагалось, что IM-домен связывает актиновые филаменты, однако последующие исследования опровергли это предположение. В связи с их способностью вызывать деформацию клеточных мембран

и структурным сходством с BAR-доменами, они получили название I-BAR (inverse BAR) [58]. I-BAR-доменные белки присутствуют как у высших, так и у низших эукариот, однако отсутствуют у дрожжей.

У млекопитающих есть пять I-BAR-доменных белков: IRSp53, MIM, IRTKS, ABBA и Pinkbar [59]. Каждый из них содержит на С-конце актин-связывающий WH2-домен (WASP-homology 2), а некоторые также SH3-домен, взаимодействующий с белками, регулирующими динамику актина [60].

Ген, кодирующий IRSp53, активно экспрессируется в различных клетках и тканях млекопитающих, особенно в нейронах. Нокаутные по IRSp53 мыши имеют дефекты в способности к обучению и памяти [61]. IRSp53 содержит CRIB-мотив, который связывается с ГТФ-азой Cdc42, и SH3-домен, взаимодействующий с WAVE. В комплексе с Cdc42 и белком Eps8 он может вызывать формирование филоподий [62], а в комплексе с WAVE – ламеллоподий [63]. Регуляция IRSp53 происходит за счёт фосфорилирования двух треониновых остатков, что приводит к связыванию с ним белка 14-3-3 и последующей инактивации [64].

IRTKS, являясь ближайшим гомологом IRSp53, в меньших количествах присутствует в мозге, но есть в мочевом пузыре, печени, семенниках, сердце и лёгких. В отличие от IRSp53 он не связывается с Cdc42 и при экспрессии в клетках вызывает образование кластеров коротких актиновых филаментов, а не филоподий, однако конкретные биологические функции ещё неизвестны [65].

MIM (Missing-in-metastasis) получил своё название благодаря тому, что его экспрессия была понижена в некоторых метастазирующих линиях клеток [66], однако, более поздние исследования показали, что в других метастазирующих линиях его экспрессия может быть, наоборот, повышена [67]. В процессе развития MIM активно экспрессируется в сердце, скелетных мышцах и центральной нервной системе. Гиперэкспрессия MIM в клеточных линиях млекопитающих приводит к исчезновению стрессовых фибрилл актина и появлению множества небольших выступов на поверхности клеток, что указывает на его способность вызывать образование выступов [68]. Также как и у IRSp53, активность MIM регулируется фосфорилированием остатка в центральной части белка (вне I-BAR-домена) [69]. Существуют данные об участии MIM в образовании цилий [70], однако точно его роль в развитии и физиологии животных также не ясна.

ABBA, ближайший гомолог MIM, экспрессируется у мышей в глиальных клетках центральной нервной системы, но отсутствует в нейронах. В культуре глиальных клеток

C6-R он локализуется в области кортикального актина и его нокдаун приводит к дефектам в формировании ламеллоподий [71].

Подобно классическим BAR-доменам, I-BAR-домены состоят из трёх α -спиралей и формируют димеры, многие из которых в опытах *in vitro* связываются с липосомами и формирует трубочки [72]. Однако, кластеры положительно заряженных аминокислот, отвечающих за связывание с мембраной, располагаются у них не на выпуклой, а на вогнутой поверхности. В соответствии с этим они вызывают образование трубочек в противоположную сторону [57]. Методом крио-электронной микроскопии было подтверждено, что I-BAR-домены связываются с их внутренней поверхностью [59].

Первой была определена кристаллическая структура димеризованного I-BAR-домена белка IRSp53 (insulin receptor tyrosine kinase substrate p53), хотя в той работе он был описан как актин-связывающий домен [73]. Каждый мономер состоит из трёх длинных α -спиралей и одной короткой С-концевой, но димер имеет менее изогнутую форму, чем классический BAR. В 2007 году была получена структура I-BAR домена MIM, которая была очень похожа на структуру IRSp53 несмотря на низкую степень гомологии последовательностей [74]. В 2011 году появилась структура I-BAR-домена белка Pinkbar (planar intestinal- and kidney-specific BAR), которая обладала практически нулевой кривизной (рис. 6) [75]. Pinkbar экспрессируется в эпителиальных клетках кишечника и почки и участвует в структуризации мембраны в зоне межклеточных контактов.

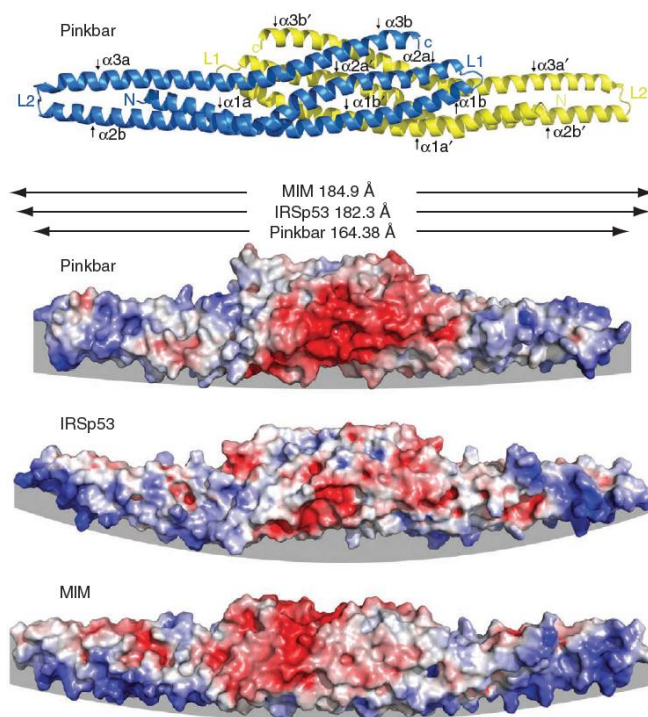


Рисунок 6. Структуры I-BAR-доменов [75].

F-BAR-домены

Ещё одна группа BAR-доменных белков содержит F-BAR (Fes/CIP4 homology-BAR) домен. Впервые F-BAR домен был обнаружен в белке CIP4 (CDC42-interacting protein 4) [76]. Консервативный N-концевой участок длиной 60 аминокислотных остатков белков CIP4 и FES был назван FCH (FES/CIP4 homology). Он расположен рядом с доменом, похожим по структуре на BAR домен, и вместе с ним образует функциональную единицу, обозначенную F-BAR. Белки, содержащие F-BAR-домен, присутствуют у всех эукариот, кроме растений, и считаются важнейшими регуляторами изгиба клеточных мембран. Они участвуют в эндо- и фагоцитозе, формировании филоподий и ламеллоподий, клеточном движении, адгезии, а также различных сигнальных путях [77].

Разнообразие функций, выполняемых F-BAR доменными белками, связано не только со специфическим строением отдельных F-BAR-доменов, но и с другими доменами, входящими в состав белков. К ним относятся SH3 (Src homology-3), SH2 (Src homology-2), тирозинкиназный домен, RhoGAP (Rho GTPase-activating protein), WW домен, HR1 (protein kinase C-related kinase homology region 1) домен и μ HD (μ -homology domain) [78]. Поскольку наиболее изучены на данный момент F-BAR-доменные белки млекопитающих, остановимся подробнее на их классификации и функциях. Основываясь на структуре, было предложено разделить их на несколько подгрупп: CIP4, FCHO, SrGAP, PACSIN, PSTPIP, FCHSD, FES/FER-тирозинкиназы, NOSTRIN и GAS7 [9].

Белки подгруппы CIP4 содержат F-BAR-домен на N-конце, HR1 в центральной части и SH3-домен на C-конце. В эту подгруппу входит три белка: CIP4, FBP17 и Тоса-1. Их функции заключаются в привлечении WASP и динамина посредством SH3-домена для инициации отделения пузырька в клатрин-зависимом эндоцитозе [8,79]. На FBP17 было впервые показано, что его мутантная форма, не способная связываться с динамином, вызывает образование трубочек, которые не отделяются от мембраны [80]. Тоса-1 участвует как в эндоцитозе, так и в формировании филоподий [81]. Учитывая, что F-BAR-домены формируют трубочки большего диаметра, чем классические BAR [82][83], а также связываются с большими липосомами в опытах *in vitro* [84], можно предположить, что в процессе эндоцитоза BAR и F-BAR белки связываются с разными частями формирующегося пузырька [77].

В подгруппу FCHO входят белки FCHO1 и FCHO2, содержащие F-BAR и μ HD-домен. Последний связывается с белками Eps15 и интерсектином для инициации сборки клатрина. Подавление экспрессии генов, кодирующих FCHO, приводит к блокированию эндоцитоза на ранней стадии [85].

Подгруппа SrGAP состоит из четырёх членов: srGAP1, srGAP2, srGAP3 и srGAP4, которые предположительно вовлечены в процесс миграции нейронов и ангиогенез. Помимо F-BAR, они содержат RhoGAP и SH3-домены. Известно, что srGAP1-3 индуцируют формирование филоподий в клетках мышечной нейробластомы Neuro2a [86], а srGAP4 ингибирует миграцию клеток NIH/3T3 и рост аксонов [87]. Предполагается, что srGAP1 связывается с Cdc42 и RhoA, srGAP2 и srGAP3 взаимодействуют с Rac1, а srGAP4 связывается как с Cdc42, так и с Rac1 посредством RhoGAP-домена, чтобы стимулировать гидролиз ГТФ [87–89].

Подгруппа PACSIN/синдапина включает PACSIN1, PACSIN2 и PACSIN3. Все они содержат F-BAR, SH3 и NPF-мотив. Они участвуют в эндоцитозе, связывая SH3-доменами WASP и динамин [90]. F-BAR-домены этих белков содержат гидрофобную петлю, которая встраивается в мембрану и способствует отделению пузырька.

В подгруппу PSTPIP входит два члена: PSTPIP1 и PSTPIP2. PSTPIP1 содержит N-концевой F-BAR-домен, PEST-мотив (последовательность, богатая пролином (P), глутаматом (E), серином (S) и треонином (T)) и C-концевой SH3-домен, а у PSTPIP2 последние два домена отсутствуют. PSTPIP1, как и многие другие F-BAR-доменные белки, связывается с N-WASP и динамином для регуляции эндоцитоза [83]. Кроме того, ряд исследований указывает на его роль в адгезии Т-клеток [91] и цитокинезе клеток COS [92]. Участие в цитокинезе показано и для F-BAR-доменного дрожжевого белка Cdc15p, который привлекает специфические белки в область формирования актомиозинового кольца [93]. PSTPIP2 регулирует формирование филоподий и подвижность макрофагов [94]. Интересно, что нокдаун PSTPIP2 в макрофагах способствует сборке FBP17 и последующему образованию подосом, что говорит о возможном антагонизме этих белков в процессе регуляции полимеризации актина [95].

Белки FCHSD1 и FCHSD2 образуют подгруппу FCHSD. Каждый из них содержит один F-BAR и два SH3-домена, которые связываются с WASP в процессе эндоцитоза. Предполагается также, что FCHSD2 участвует в процессах регуляции клеточного роста, миграции и адгезии [9].

Ещё одну подгруппу образуют белки FES и FER, содержащие N-концевой F-BAR-домен, центральный SH2-домен и C-концевой тирозинкиназный домен. Регион, соседний с F-BAR-доменом, также обладает способностью связываться с фосфолипидами и обозначается FX-домен. F-BAR и FX образуют один мембран-связывающий модуль и индуцируют формирование филоподий [96].

NOSTRIN также является эндоцитозным белком, привлекающим N-WASP и динамин [97], но помимо этого он способен образовывать комплекс с эндотелиальной синтазой оксида азота (eNOS) и кавеолином-1. Гиперэкспрессия NOSTRIN приводит к активации кавеолин-зависимого эндоцитоза, в результате чего eNOS перемещается из плазматической мембраны внутрь клетки и её активность снижается [98].

Наконец, последним F-BAR-доменным белком млекопитающих, выделяемом в отдельную подгруппу, является GAS7. В отличие от других белков своей группы, в N-концевой части располагаются SH3 и WW-домены, а F-BAR-домен занимает центральную часть. GAS7 человека активирует SH3-доменом N-WASP, индуцирует формирование филоподий и регулирует рост аксонов в дифференцированных нейронах мозга [99].

Таким образом, большая часть известных F-BAR-доменных белков вовлечена в клатрин-зависимый или кавеолин-зависимый эндоцитоз. Многие также участвуют в образовании филоподий и ламеллоподий. При этом если филоподии необходимы для формирования аксонов [100], то ламеллоподии, напротив, ингибируют этот процесс [101]. Обе эти структуры могут как обеспечивать миграцию нормальных клеток, так и участвовать в распространении метастазирующих [102]. Ещё одним важным процессом, нарушения которого приводят к развитию опухолей, является клеточное деление, в которое также вовлечены некоторые F-BAR-доменные белки. К заболеваниям, вызванным изменением уровня экспрессии или мутациями в генах, кодирующих белки этой группы, относятся нарушения развития, неврологические и аутовоспалительные заболевания, инвазивные опухоли, сердечная гипертрофия, нарушения углеводного обмена и дисфункция почек, что делает F-BAR-доменные белки потенциальной терапевтической мишенью [9].

Кристаллические структуры F-BAR доменов белков млекопитающих FBP17 и CIP4 показали, что по сравнению с классическими BAR-доменами, F-BAR-домены имеют менее изогнутую и более удлинённую форму [8]. Они состоят из пяти α -спиралей: короткой N-концевой, трёх длинных и короткой C-концевой, за которой следует небольшая последовательность, ответственная за гомодимеризацию. Поверхности, которыми мономеры взаимодействуют друг с другом, содержат в основном гидрофобные остатки и несколько заряженных. Седиментационный анализ показал, что в растворе F-BAR-домены присутствуют в димеризованной форме.

На вогнутой стороне димеров были обнаружены кластеры консервативных положительно заряженных а.о., мутации которых приводили к снижению способности связываться с мембраной и вызывать образование трубочек в опытах *in vitro* и *in vivo* [8,83].

Исследования последних лет указывает на избирательность связывания фосфолипидов некоторыми F-BAR-доменами [103,104]. Один из таких F-BAR-доменов принадлежит дрожжевому белку Rgd1p, активирующему ГТФ-азы Rho3 и Rho4, которые участвуют в регуляции динамики актина [105]. У данного F-BAR-домена был обнаружен сайт связывания фосфоинозитидов, отсутствующий у других дрожжевых F-BAR-доменных белков Bzz1p и Hof1p [106]. Опыты *in vitro* показали его предпочтительное связывание с липосомами, содержащими ФИ(4,5)Ф₂, по сравнению с липосомами, где отрицательный заряд нёс ФС. Такой избирательности не наблюдалось у Bzz1p и Hof1p. Получение кристаллографической структуры Rgd1p в комплексе с мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфатом (ИнзФ6), выступающим в роли аналога фосфоинозитидной липидной головки, позволило найти аминокислоты, образующие сайт связывания. В его состав входит шесть аминокислот: R141, K142, K145, K149 и K153 на спирали α₃, а также K52 на спирали α₂. На основании полученной структуры был сделан вывод об отсутствии предпочтительной ориентации у ИнзФ6 в сайте связывания, а исследования методом поверхностного плазмонного резонанса указали на одинаковую аффинность сайта к фосфоинозитидам ФИ(4,5)Ф₂, ФИ(3,4)Ф₂ и ФИ(3,5)Ф₂. Отсутствие сайта связывания фосфоинозитидов у Hof1p может быть связано с иными механизмами привлечения белка к мембране: недавно в опытах *in vitro* и *in vivo* было показано, что эту функцию могут выполнять септины, непосредственно связывающиеся с N-концевой частью F-BAR-домена Hof1p [107].

Некоторые элементы данного сайта присутствуют и у F-BAR-доменов млекопитающих, например, у CIP4, FBP17 и FCHo2, однако, помимо перечисленных аминокислот, в связывании с мембраной участвуют и другие. Это говорит о делокализации сайта связывания и согласуется с тем фактом, что данные белки обладают меньшей специфичностью к фосфоинозитидам [8,83,84]. Наибольшая степень сходства сайта связывания фосфоинозита обнаруживается у человеческого белка Gmip [108], который активирует ГТФ-азу RhoA и играет важную роль в перестройке кортикального актина в раннем митозе [109], а также в миграции нейронов [110]. И в том и в другом процессе фосфоинозитиды являются важными регуляторами. Таким образом, специфичность связывания некоторых F-BAR-доменов с липидами позволяет привлекать их к определённым участкам мембраны. F-BAR-домены в свою очередь могут стабилизировать определённые липидные микродомены или рафты, что также может иметь важное функциональное значение [104,111].

Взаимодействие BAR-доменов с мембранами

Основные функции BAR-доменов заключаются в **формировании** мембранного изгиба, его **распространении** и стабилизации и/или **распознавании** с последующим привлечением цитозольных факторов к определённом месту [6]. При этом формирование изгиба и его распространение являются связанными процессами: локальные деформации, обусловленные одним димером, облегчают связывание для других димеров.

Начальные этапы **формирования** мембранного изгиба происходят за счёт электростатического связывания димеризованного BAR-домена серповидной формы с мембраной и в некоторых случаях встраивания в мембрану АС, расположенной на N-конце белка [112]. В основе связывания лежит взаимодействие положительно заряженных аминокислот с отрицательно заряженными липидами, причём некоторые BAR-домены предпочтительно связываются с фосфоинозиотидами [106]. Показано также, что АС некоторых BAR-белков играют ключевую роль в фрагментировании небольших липосом [113]. Однако экспериментальные данные о связывании с мембранами BAR доменов, не имеющих АС [114,115], оставляют спорным вопрос о роли АС в генерации мембранного изгиба.

Для **распространения** изгиба необходимо взаимодействие многих BAR-доменов. Структуру, которую они образуют на поверхности мембраны, называют скаффолдом. Считается, что формирование скаффолда является общей чертой для всех BAR-доменных белков и его структура во многом определяет результат воздействия на мембрану. В свою очередь, структура скаффолда зависит от концентрации белка и натяжения мембраны. Методом крупно-зернистой молекулярной динамики было показано, что при низкой концентрации N-BAR-доменов, они собираются на плоских мембранах и липосомах в нитевидные структуры и сетки, а при достижении поверхностной плотности 20% начинают формировать мембранный выступ [116]. N-BAR белок эндофилин, функции которого связаны с эндоцитозом, способен индуцировать формирование трубок на гигантской липосоме при плотности около 5%, и при малом поверхностном натяжении (ПН). Для формирования трубок при большом ПН требуется большая плотность белков, а при ПН выше 0,25 мН/м формирование трубок полностью ингибируется. Это говорит о том, что уменьшение ПН может запускать механизм быстрой активации эндоцитоза [117].

В некоторых случаях BAR-домены не формируют, а **распознают** уже существующий изгиб, и потому лучше связываются с изогнутыми, чем с плоскими мембранами [43]. К таким относятся BAR-домены олигофренина/ASAP и centaурин. Было показано, что они предпочтительнее связываются с липосомами диаметром 0,05 мкм, чем с

липосомами большего размера. BAR-домены арфатина и амфифизина, напротив, одинаково хорошо связывались со всеми липосомами. Изолированные I-BAR-домены могут активно формировать мембранный изгиб [59], но поскольку у полноразмерных белков эта способность менее выражена [68], то на самом деле их роль также может заключаться в распознавании уже существующего изгиба. Функции восприятия и генерации изгиба не являются взаимоисключающими, поэтому можно предположить, что поведение белка зависит от его концентрации: при низкой концентрации они распознают существующий изгиб и привлекают к нему другие белки, а при высоких могут собираться в олигомеры и активно участвовать в его распространении [118].

Чтобы объяснить, почему похожие по структуре BAR-домены воздействуют на мембраны по-разному, необходимо рассмотреть способы организации множества BAR-доменов на мембране. С помощью метода криоэлектронной микроскопии удалось получить трёхмерные реконструкции олигомеров BAR-доменов на мембранах [119–121]. В 2012 году были получены реконструкции олигомеров полноразмерного эндофилина и отдельно его N-BAR домена, связанные с мембранными трубками разных диаметров (рис. 7, сверху) [119].

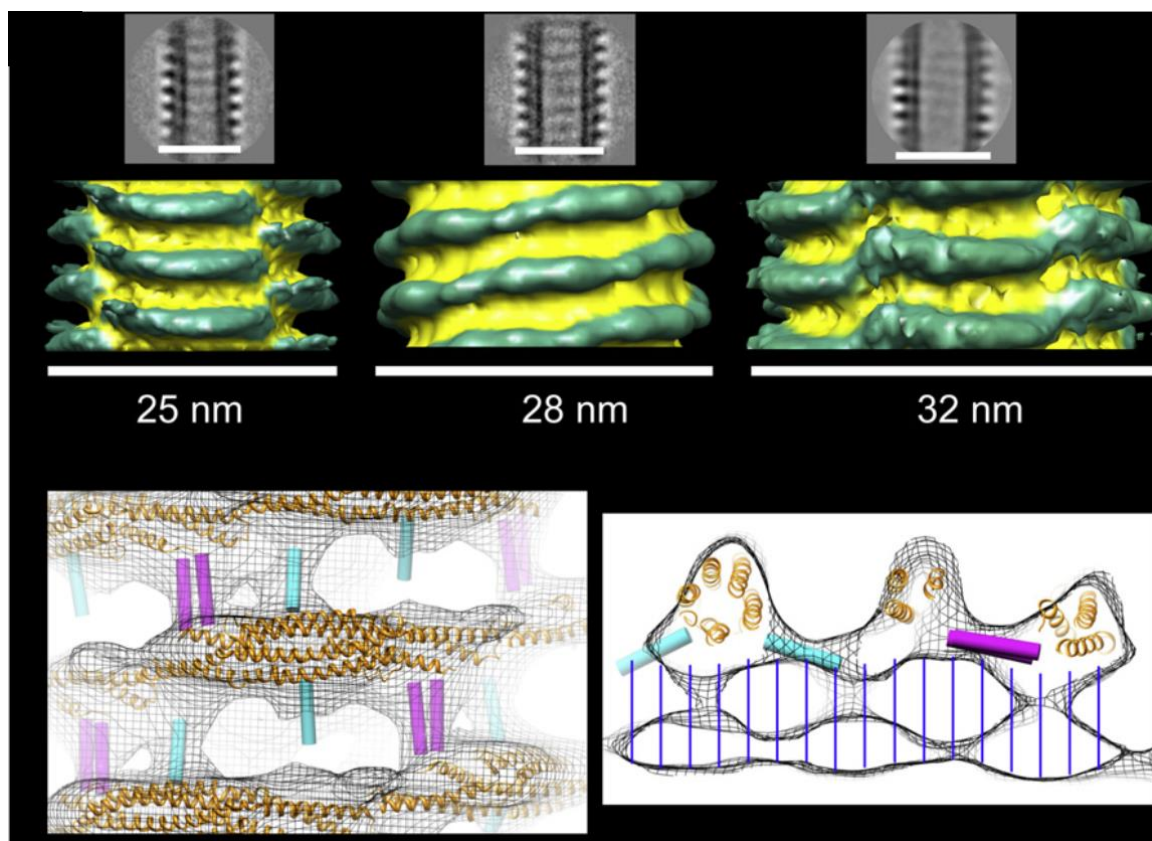


Рисунок 7. Олигомеры эндофилина на мембранных трубках разного диаметра [119].

Было показано, что трубкам разного размера отвечают разные способы организации белка, а на трубках одного диаметра полноразмерный белок и N-BAR-домен образовывали одинаковые структуры. Это указывает на то, что именно N-BAR-домен ответственен за олигомеризацию. Было выделено три класса трубок с диаметрами 25, 28 и 32 нм. В трубках 28 и 32 нм димеры располагались перпендикулярно длинной оси трубки, а в трубках 28 нм под углом 10°. Примечательно, что в трубках 25 нм не наблюдалось концевых контактов между димерами. Характерной чертой для всех трубок были большие участки мембраны между соседними тяжами, расположенными на расстоянии около 50 Å. Это может быть связано с необходимостью обеспечить доступ ГТФ-азам, с которыми эндофилин сотрудничает в эндоцитозе [122].

Отсутствие точной информации о расположении N-концевых (Н0) спиралей, возможно, было связано с их подвижностью и усреднением их электронной плотности при суммировании изображений в процессе создания реконструкции. Тем не менее, было предположено, что в трубочках 28 нм спирали из соседних тяжей взаимодействуют друг с другом антипараллельным образом (рис. 7, снизу) [119]. Важность Н0-спиралей была продемонстрирована как методами компьютерного моделирования, так и *in vitro*. Методом молекулярной динамики сравнивались белковые решётки, образованные N-BAR-доменом дикого типа, и решётки из N-BAR без Н0-спиралей. В первом случае решётка была стабильна, во втором олигомер разупорядочивался. В опытах *in vitro* отсутствие Н0-спиралей приводило к неспособности тубулировать липосомы. В более позднем исследовании, однако, методом электронного парамагнитного резонанса было показано, что Н0-спирали проникают в липидный бислой на 8-11 Å ниже уровня фосфатных групп и не находятся в прямом контакте друг с другом [123]. Авторы предполагают, что важность Н0 для олигомеризации может быть связана с совместной координацией липидов между ними.

Ещё одну сложность представляла локализация вставки, находящихся в центральной части димера. Структура, полученная из крио-электронной микроскопии, указывала на то, что вставки соседних (по направлению длинной оси трубки) димеров не взаимодействуют друг с другом и направлены к мембране. Это отличалось от их расположения в кристаллической структуре и в связанном с липосомами состоянии. Различие было впоследствии объяснено наличием двух конформационных состояний: при высоких концентрациях белка, достаточных для формирования олигомера, N-BAR-домен оказывается ближе расположенным к мембране, что способствует более глубокому встраиванию данного участка [123]. Встраивание в свою очередь препятствует

спонтанному мембранному изгибу и стабилизирует трубку. Переключение между конформациями может быть также связано с фосфорилированием остатка серина 75: появление негативного заряда мешает встраиванию в мембрану и стабилизации трубочек. Известно, что мутации LRRK2-киназы, связанные с заболеванием Паркинсона, приводят к повышению фосфорилирования серина 75 и нарушениям эндоцитоза в синапсах [124].

Получение структуры олигомеров полноразмерного эндофилина на мембранных трубках позволило сделать важный вывод о расположении SH3-доменов. Сравнение олигомеров полноразмерного эндофилина с олигомерами отдельного N-BAR-домена на трубках диаметра 25 нм не выявило наличия дополнительной электронной плотности. Это говорит о подвижности SH3-доменов, которая приводит к «размазыванию» плотности в процессе получения реконструкции. В случае же трубок диаметра 28 нм, дополнительные плотности располагались возле концевых участков димеров, причём таким образом, что SH3-домены соседних димеров должны были контактировать. Для подтверждения этой гипотезы на предполагаемой контактной поверхности SH3-доменов соседних димеров были вставлены остатки Cys, и было показано, что они образуют дисульфидные мостики. Эти результаты позволяют понять, как может достигаться специфичность привлечения белков, связывающихся с SH3-доменами. Димеры, образуемые SH3-доменами эндофилина на 28 нм трубках, могут специфически привлекать динамин, имеющий две расположенные рядом богатые пролином последовательности. Это согласуется с тем фактом, что диаметр трубки 28 нм находится в диапазоне значений, подходящих для динамин-зависимого разделения мембраны [125].

Ещё одной олигомерной структурой, изученной с помощью электронной микроскопии, стала структура олигомеров изоформы амфифизина 2, вовлечённого в организацию Т-трубочек (рис. 8) [120].

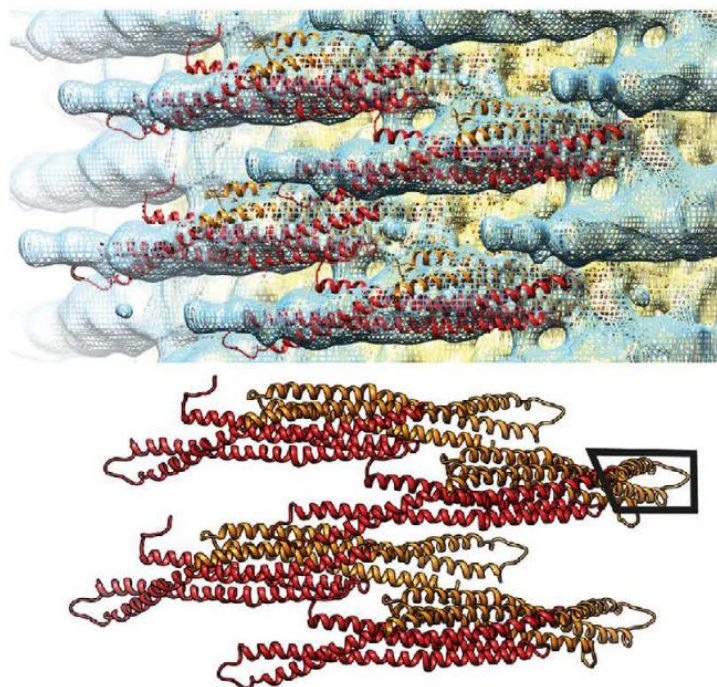


Рисунок 8. Олигомеры амфифизина [120].

Несмотря на сходство кристаллических структур, олигомеры амфифизина 2 и эндофилина сильно отличаются. Димеры амфифизина упакованы значительно плотнее и таким образом, что один конец BAR-домена направлен в мембрану, а другой от неё. Они стабильно соединены друг с другом N0-спиралями, которые, как предполагается, также участвуют в инициации изгиба. Как следствие, трубочки, формируемые амфифизином, намного более жёсткие. Это согласуется с биологическими функциями белков: амфифизин формирует стабильные Т-трубочки, а эндофилин динамичные структуры, быстро формирующиеся и разбирающиеся в процессе эндоцитоза.

I-BAR-домен белка Pinkbar, в отличие от других I-BAR-доменов, вызывает образование не мембранных трубочек, а уплощённых участков (рис. 9) [58].

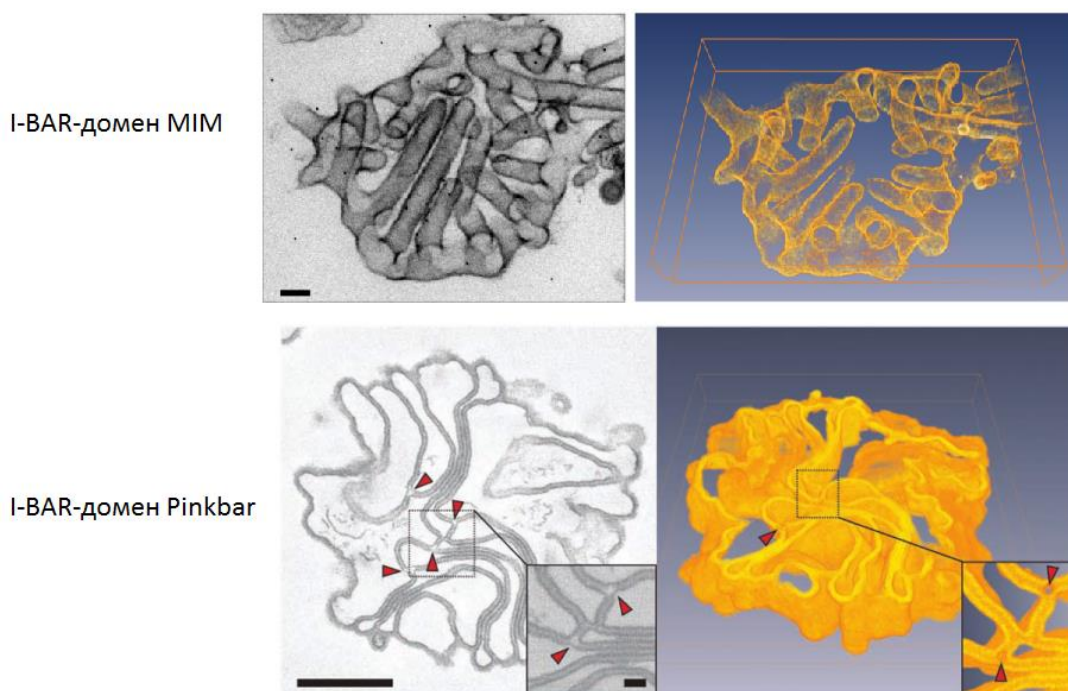


Рисунок 9. Взаимодействие I-BAR-доменов белков MIM (сверху) и Pinkbar (снизу) с липосомами [58].

Было показано, что он способен формировать стабильные плоские олигомеры, причём как на липидной мембране, так и в растворе [75]. Следствием олигомеризации, помимо деформации мембраны, является также кластеризация ФИ(4,5)Ф₂. По сравнению с классическими BAR-доменами, I-BAR-домены обладают более высоким электростатическим потенциалом и способны формировать кластеры ФИ(4,5)Ф₂ на микроскопических масштабах [59].

С помощью методов кристаллографии удалось не только получить структуры отдельных F-BAR-доменов, но и предложить схему их взаимодействия с мембранами. В кристаллах F-BAR-домены формируют линейные филаменты, взаимодействуя концевыми остатками. При взаимодействии с мембраной такой филамент может приобретать форму спирали, закручивающейся вокруг формирующейся трубки [8]. Это предположение подтвердилось, когда из изображений крио-электронной микроскопии была построена модель олигомерных структур F-BAR-доменов на мембранной трубке, разрешение которой позволило различить отдельные димеры [121]. В этом исследовании было показано, что формирование и рост трубки происходят за счёт спиральной организации доменов, которые распространяют мембранный изгиб. Из полученной структуры были определены остатки, ответственные за взаимодействие с мембраной: два кластера по 5 а.о. в центральной части димера и два кластера по 4 а.о. в концевой части димера, что согласовывалось с проведёнными ранее мутационными экспериментами [8]. Между собой димеры

взаимодействуют концевыми и латеральными участками, причём угол наклона определяет диаметр трубки (рис. 10) [121].

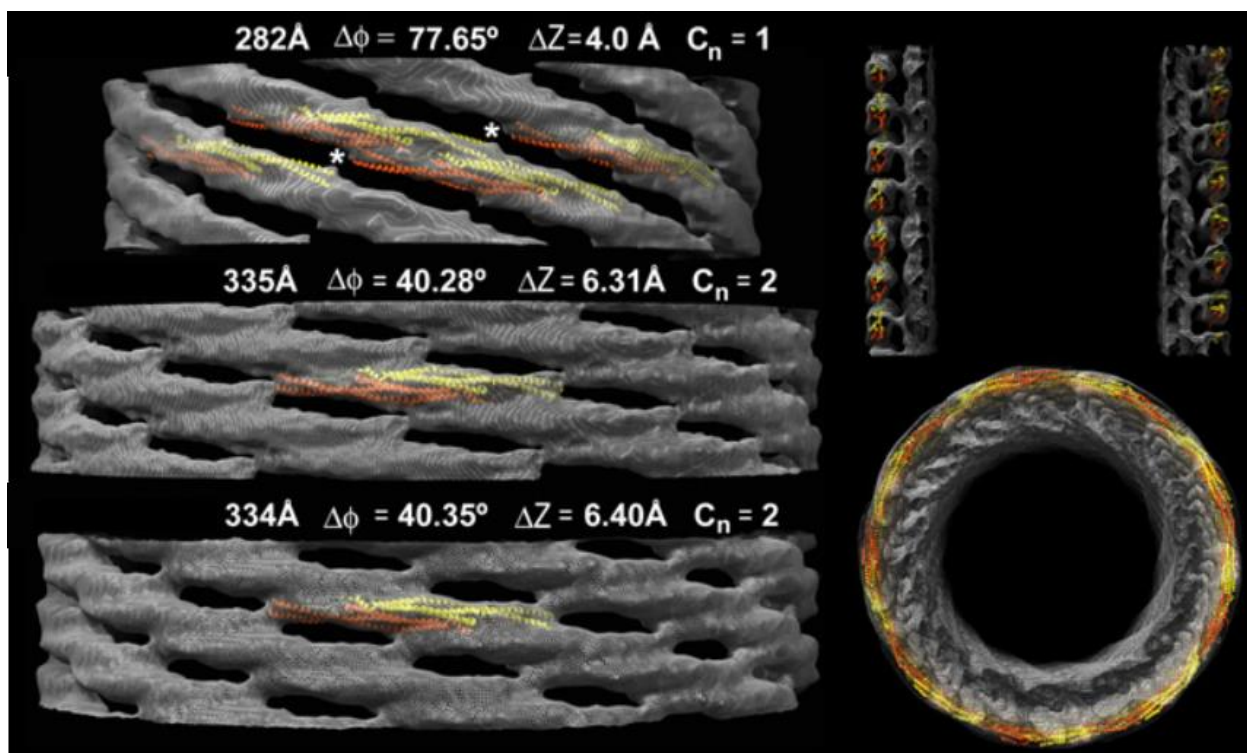


Рисунок 10. Олигомеры, формируемые F-BAR-доменами [121].

При этом кривизна F-BAR-доменов на мембране не отличается от кривизны кристаллографической структуры, полученной в отсутствие липидов. При низких температурах, когда мембрана более устойчива к изгибам, F-BAR-домены по-прежнему образуют филаменты за счёт концевых взаимодействий, но с мембраной взаимодействуют не вогнутой поверхностью, а плоской боковой. Всё это указывает на способность F-BAR-доменов формировать мембранный изгиб, передавая ей свою форму. Однако, в последние годы появляются свидетельства того, что эта активность не характерна для всех без исключения F-BAR-доменов. Дрожжевой белок Cdc15p, вовлечённый в цитокinesis, олигомеризуется в филаменты, но не вызывает образование трубочек [126]. Олигомеризация необходима для формирования контрактильного кольца, однако в данном случае белок не вызывает изменение формы мембраны, а лишь привлекает к ней другие белки. Отсутствие способности формировать трубки также было показано для шести F-BAR-доменов млекопитающих. Возможно, F-BAR-доменные белки стоит рассматривать как устройства, которые в общем случае используются для привлечения и пространственной организации других белков, но в некоторых случаях непосредственно изменяют форму мембран [127].

Регуляция активности BAR-доменов часто осуществляется за счёт внутримолекулярного ингибирования SH3-доменами. Методом молекулярной динамики было показано, что в растворе SH3-домен эндофилина связывается с N-концевой спиралью за счёт гидрофобных взаимодействий и формирования солевых мостиков между заряженными остатками [128]. Отрицательный электростатический потенциал оказывается сконцентрирован на SH3-домене, а положительный на H0, поэтому когда белок подходит к мембране, H0-спираль поворачивается к ней, а SH3-домен от неё. С одной стороны, в такой автоингибированной форме SH3-домен не взаимодействует с другими белками в растворе, а с другой стороны, белок «ищет» в мембране место, подходящее по электростатическому потенциалу и имеющее дефекты в упаковке липидов, куда может произойти встраивание H0.

Интересный пример регуляции активности BAR-домена демонстрирует белок PICK, функции которого связаны с интернализацией и экспонированием на поверхность клетки AMPA-рецепторов [129]. Он ингибируется другим BAR-доменным белком - ICA69 [130], причём на данный момент не ясно, является ли это следствием образования гетеродимера из BAR-доменов ICA69 и PICK или совместной олигомеризации их гомодимеров. Второй вариант кажется более вероятным, учитывая стабильность димеров BAR-доменных белков и потенциальное участие C-концевого участка ICA69 во взаимодействии.

F-BAR-доменный белок *Nervous wreck*

Рост нейронов и образование новых связей – процессы, лежащие в основе обучения и памяти, – контролируются факторами роста. Рецепторы, связавшиеся с факторами роста, убираются внутрь клетки путём эндоцитоза и направляются в специфические клеточные компартменты, где могут подвергаться модификации, деградации или взаимодействовать с другими белками [131]. Определение механизмов, которые контролируют скорость и направление потока эндосом с рецепторами, имеет большое значение для понимания процессов передачи сигнала. Нервно-мышечный синапс *Drosophila melanogaster* служит удобной моделью для изучения регуляции синаптического роста, поскольку за четыре дня площадь мышцы увеличивается более чем в 100 раз, что сопровождается значительным увеличением количества контактов с нейронами. Регуляция процесса роста нейронов включает как ретроградные сигналы от мышцы, так и антероградные сигналы от нейрона к мышце [132]. Известно, что мутации белков-регуляторов эндоцитоза приводят к избыточному количеству ответвлений аксона, поскольку препятствуют затуханию сигнала от рецепторов фактора роста [133–135]. Одним из таких белков является F-BAR-доменный белок *Nervous wreck* (Nwk), гомологи которого присутствуют у многих организмов, от

насекомых до высших позвоночных. В геноме млекопитающих были обнаружены два гомолога, которые вовлечены в мембранные перестройки в стереоцилиях и нейронах мозжечка [136,137].

При экспрессии в клетках S2, не имеющих эндогенного Nwk, наблюдается активное формирование клеточных выступов, требующее также полимеризации актиновых филаментов. Сформированные выступы, однако, не реагируют на обработку ингибитором полимеризации актина латрункулином В. Это указывает на то, что актин необходим для их формирования, но не для поддержания. [138]. Интересен тот факт, что возникшие выступы отличаются по структуре от филоподий, поскольку содержат помимо актиновых филаментов микротрубочки. Обработка нокадазолом, деполимеризатором микротрубочек, также не приводит к разрушению выступов.

Функционирование Nwk в нейронах обеспечивается не только его F-BAR-доменом, но и двумя SH3-доменами (SH3a и SH3b), каждый из которых связывается с определёнными белками. Показано, что в рециркулирующих эндосомах Nwk взаимодействует с белком из группы сортирующих нексинов SNX16, который в свою очередь связан с пресинаптическим рецептором роста Tkv [139]. Взаимодействие Nwk с SNX16 приводит к понижению сигнала от Tkv и необходимо для возвращения рецептора на мембрану. Кроме того, известно, что Nwk связывает белки-регуляторы эндоцитоза Dap160, динамин и Wsp. Опыты с мутантными SH3a и SH3b доменами показали, что SH3a связывает динамин и Wsp, а SH3b отвечает за связывание с Dap160 [140]. Wsp является активатором Arp2/3-комплекса, который запускает полимеризацию актина, необходимую для осуществления эндоцитоза [141]. Однако, Nwk активирует Wsp значительно слабее, чем SH3-доменные белки млекопитающих, например, Nck, активируют WASP [142]. Усиление эффекта достигается за счёт совместного воздействия Nwk с другим активатором Wsp, ГТФ-азой Cdc42. Таким образом, посредством SH3 доменов Nwk взаимодействует с эндоцитарным аппаратом и вместе с Cdc42 активирует Wsp/Arp2-3 – зависимую полимеризацию актина для регуляции синаптического роста.

Основы метода молекулярной динамики

Вычислительные эксперименты активно используются для исследования физических и биологических систем на атомарном уровне. Впервые метод молекулярной динамики был использован в 50-е годы [143], а в 70-е начал применяться для исследования свойств полимерных цепей и релаксации кристаллических структур белков [144,145]. С тех пор метод получил значительное развитие и сейчас позволяет моделировать фолдинг белков [146], взаимодействие лиганда с рецептором [147], наблюдать структурные

переходы в молекулярных комплексах [148] и т.д. Подобное развитие не было бы возможным без постоянного улучшения алгоритмов расчёта и возникновения программных пакетов для молекулярного моделирования, наиболее распространёнными из которых являются CHARMM [149], GROMOS [150], Amber [151], NAMD [152] и GROMACS [153]. В данной работе использовался программный пакет GROMACS, поэтому принципы вычислительного эксперимента будут более подробно рассмотрены на его примере.

Уравнение Шрёдингера описывает свойства системы с большой точностью, но исследовать с его помощью системы, состоящие из большого количества атомов, не представляется возможным. Для этого используются различные приближения, причём чем больше размер системы и длительность изучаемого процесса, тем значительнее допущения. В методе молекулярной динамики движение атомов описывается уравнениями классической механики, что накладывает ряд ограничений на область применения метода. В частности, он не позволяет рассматривать образование и разрыв химических связей, для этого необходимо комбинировать подходы классической и квантовой механики. Несмотря на это, метод молекулярной динамики в принципе позволяет изучать структуры с атомарным разрешением. Если для решения данной задачи такая степень детализации не является необходимой, то модель системы можно упростить. Это может быть сделано различными подходами, от способа рассмотрения группы из нескольких атомов в качестве единого целого, до мезоскопической динамики, в которой вместо атомов и скоростей рассматриваются плотности и их флуктуации [154,155].

Молекулярно-динамические расчёты численно решают уравнение движения Ньютона для системы из N взаимодействующих частиц:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = \vec{F}_i, i = 1 \dots N \quad (1)$$

Сила $\vec{F}_i$ определяется как отрицательная производная потенциальной энергии $U(r_1, r_2 \dots r_N)$:

$$\vec{F}_i = - \frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i} \quad (2)$$

Начальные скорости обычно выбираются в соответствии с распределением Максвелла для заданной температуры. При известных начальных координатах и скоростях частиц, для каждого атома i можно вычислить действующую на него силу $\vec{F}_i$:

$$\vec{F}_i = \sum_j \vec{F}_{ij} \quad (3)$$

Она складывается из сил взаимодействия ковалентно связанных с ним атомов, невалентных взаимодействий и в некоторых случаях дополнительных внешних сил. После этого рассчитываются координаты и скорости атомов в следующий момент времени $t + \Delta t$:

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + \Delta t \vec{v}_i(t) + \frac{1}{2} (\Delta t)^2 \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i} \quad (4)$$

$$\vec{v}_i(t + \Delta t) = \vec{v}_i \left(t + \frac{\Delta t}{2} \right) + \frac{1}{2} (\Delta t)^2 \frac{\vec{F}_i(t + \Delta t)}{m_i} \quad (5)$$

Необходимо, чтобы величина шага Δt была меньше периода самых быстрых колебаний системы. Обычно выбирается величина 1-2 фс, что в несколько раз быстрее времени осцилляции валентной связи C-H, равного 10 фс.

Потенциальная энергия системы складывается из валентных взаимодействий (потенциалы валентных связей, валентных углов и торсионных углов) и невалентных взаимодействий (потенциал Леннарда-Джонса и кулоновский потенциал):

$$U(r) = U_b + U_a + U_d + U_{LJ} + U_c \quad (6)$$

Для описания взаимодействия двух ковалентно связанных атомов i и j используется гармонический потенциал:

$$U_b(r_{ij}) = \frac{1}{2} k_{ij}^b (r_{ij} - b_{ij})^2, \quad (7)$$

где k_{ij}^b - константа жёсткости, b_{ij} - равновесная длина связи, r_{ij} - фактическая длина связи.

Аналогичным образом описывается энергия валентного угла, образованного атомами i - j - k :

$$U_a(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2, \quad (8)$$

где k_{ijk}^θ - константа жёсткости, θ_{ijk} и θ_{ijk}^0 - фактическое и равновесное значение угла соответственно.

Для четвёрки атомов $i - j - k - l$ торсионным углом называется двугранный угол между плоскостями ijk и jkl . Его энергия может быть записана следующим образом:

$$U_a(\varphi_{ijkl}) = k_\varphi(1 + \cos(n\varphi - \varphi_s)) \quad (9)$$

Для торсионных углов алканов часто используется потенциал Рикерта-Беллеманса:

$$U_{rb}(\varphi_{ijkl}) = \sum_{n=0}^5 C_n(\cos(\varphi - \pi))^n \quad (10)$$

Потенциал Леннарда-Джонса записывается следующим образом:

$$U_{LJ}(r_{ij}) = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right], \quad (11)$$

где r_{ij} - расстояние между атомами, ε - глубина потенциальной ямы, σ - расстояние, при котором энергия взаимодействия равна 0. Член $\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12}$ описывает отталкивание атомов на близком расстоянии, а $\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6$ притяжение на большом расстоянии. Значения ε и σ задаются в силовом поле для каждого атома, ε_{ij} рассчитывается как среднее геометрическое ε_i и ε_j , а σ_{ij} - или как среднее геометрическое, или как среднее арифметическое σ_i и σ_j в зависимости от силового поля.

Иногда вместо потенциала Леннарда-Джонса используют потенциал Бакингема с более реалистичным экспоненциальным отталкиванием, однако он менее удобен для расчётов:

$$U_{Bh}(r_{ij}) = A_{ij} \exp(-B_{ij}r_{ij}) - \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (12)$$

Кулоновская энергия взаимодействия описывается следующим выражением:

$$U_c(r_{ij}) = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon\varepsilon_0 r_{ij}}, \quad (13)$$

Где q_i и q_j - парциальные заряды атомов, ε и ε_0 - диэлектрическая проницаемость вакуума и среды соответственно, r_{ij} - расстояние между атомами.

Термостаты и баростаты

Температура системы T связана с кинетической энергией следующим выражением:

$$E_{kin} = \frac{3}{2} N k_B T, \quad (14)$$

где N - число частиц, k_B - константа Больцмана.

Кинетическая энергия системы из N частиц вычисляется как:

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 \quad (15)$$

В конце каждого шага интегрирования некоторые атомы могут оказаться на слишком близком расстоянии и на следующем шаге получить большую скорость, что приведёт к увеличению кинетической энергии и разогреванию системы. Чтобы этого избежать, используются алгоритмы поддержания постоянной температуры – термостаты.

Наиболее простым термостатом является термостат Берендсена. Каждые n_{TC} шагов скорость каждой частицы умножается на фактор λ , заданный следующим выражением:

$$\lambda = \left[1 + \frac{n_{TC} \Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T(t - \frac{1}{2} \Delta t)} \right) - 1 \right]^{1/2}, \quad (16)$$

где T_0 – заданная температура термостата, τ_T – параметр, связанный с временной константой термостата τ .

В результате изменение температуры со временем можно записать как:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T}{\tau}, \quad (17)$$

где τ – временная константа термостата.

Этот термостат часто используется на этапе уравнивания системы, однако обычно не применяется в самой динамике, поскольку обладает рядом серьёзных недостатков. Он подавляет флуктуации кинетической энергии в системе и не отвечает каноническому распределению Гиббса, кроме того, в небольших молекулярных системах вызывает перекачивание энергии из высокочастотных в низкочастотные моды колебаний.

В термостате Нозе-Гувера, который является более корректным для проведения расчётов молекулярной динамики, в уравнение движения частицы вводятся дополнительные параметры:

$$\frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = \frac{\vec{F}_i}{m_i} - \frac{p_\xi}{Q} \frac{d\vec{r}_i}{dt} \quad (18)$$

Q – параметр массы, p_ξ – импульс параметра трения ξ , который связан с температурой следующим образом:

$$\frac{dp_\xi}{dt} = T - T_0 \quad (19)$$

Подобно поддержанию температуры, в молекулярной динамике часто используются алгоритмы поддержания давления – баростаты. Наиболее распространены баростаты Берендсена и Парринелло-Рамана.

Баростат Берендсена пересчитывает координаты и размеры ячейки с помощью матрицы μ для того, чтобы привести систему к заданному давлению P_0 :

$$\frac{d\mathbf{P}}{dt} = \frac{\mathbf{P}_0 - \mathbf{P}}{\tau_P} \quad (20)$$

Матрица μ задаётся следующим выражением:

$$\mu_{ij} = \delta_{ij} - \frac{n_{PC}\Delta t}{3\tau_P} \beta_{ij} \{P_{0ij} - P_{ij}(t)\}, \quad (21)$$

β – коэффициент изотермической сжимаемости.

В баростате Парринелло-Рамана векторы периодической ячейки представлены матрицей $\mathbf{b}$, которая подчиняется уравнению движения:

$$\frac{d^2\mathbf{b}}{dt^2} = V\mathbf{W}^{-1}\mathbf{b}'^{-1}(\mathbf{P} - \mathbf{P}_{ref}), \quad (22)$$

V – объём ячейки, $\mathbf{W}$ – матрица, определяющая силу баростатирования, $\mathbf{P}$ и $\mathbf{P}_{ref}$ – текущее и заданное значения давления соответственно.

Также как в термостате Нозе-Гувера, изменяются и уравнения движения частиц:

$$\frac{d^2\mathbf{r}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i} - \mathbf{M} \frac{d\mathbf{r}_i}{dt}, \quad (23)$$

$$\mathbf{M} = \mathbf{b}^{-1} \left[\mathbf{b} \frac{d\mathbf{b}'}{dt} + \frac{d\mathbf{b}}{dt} \mathbf{b}' \right] \mathbf{b}'^{-1} \quad (24)$$

Баростат может применяться изотропно, анизотропно и семиизотропно. Последний способ часто используется при моделировании систем, где присутствует граница раздела фаз, например, в системах с липидной мембраной и водой. В таком случае z-направление рассчитывается независимо от x/y.

Силовые поля

Силовое поле складывается из двух компонент: набора уравнений, описывающих потенциальные энергии, и параметров, входящих в эти уравнения. Силовые поля, в которых каждый атом в системе представляется отдельной материальной точкой, называются полноатомными. Они используются в тех случаях, когда требуется точно знать положение атомов водорода. В тяжело-атомных (united-atom) силовых полях атомы водорода и атом углерода в каждой метильной группе и каждом метиленовом мостике объединяются в одну материальную точку с соответствующей массой. Ещё более упрощённое представление

системы дают крупно-зернистые (coarse-grained) силовые поля, в которых объединяются группы из четырёх или более атомов.

Основы метода электронной микроскопии и получения трёхмерных реконструкций молекул

Метод создания трёхмерных реконструкций молекул из изображений, получаемых с помощью электронной микроскопии, начал разрабатываться более 40 лет назад. За последнее десятилетие он стал важным инструментом структурной биологии благодаря техническому развитию микроскопии и появление компьютерных комплексов, позволяющих обрабатывать большие массивы данных. Разрешение реконструкций постоянно улучшается и уже достигло 2.2 Å [156].

Основные системы электронного микроскопа

Идея создания микроскопа, в котором вместо света использовался бы пучок электронов, возникла в 20-е годы прошлого века вместе с открытием волновых свойств электрона и развитием теории корпускулярно-волнового дуализма. Первый электронный микроскоп был создан Эрнстом Руской и Максом Кноллем в 1931 году, за что в 1986 году Руска был удостоен Нобелевской премии по физике. К середине 50-х годов трансмиссионные электронные микроскопы уже активно использовались в материаловедении, а в 60-е годы начали применяться для исследования структуры белков. В 1968 году из изображений отдельных частиц была получена первая трёхмерная реконструкция биологического объекта – хвоста бактериофага T4 [157]. В 80-е годы появилась крио-электронная микроскопия, позволившая изучать объекты без окрашивания путём помещения их в моментально замороженный слой воды [158].

Общая схема строения современного электронного микроскопа представлена на рисунке 11.

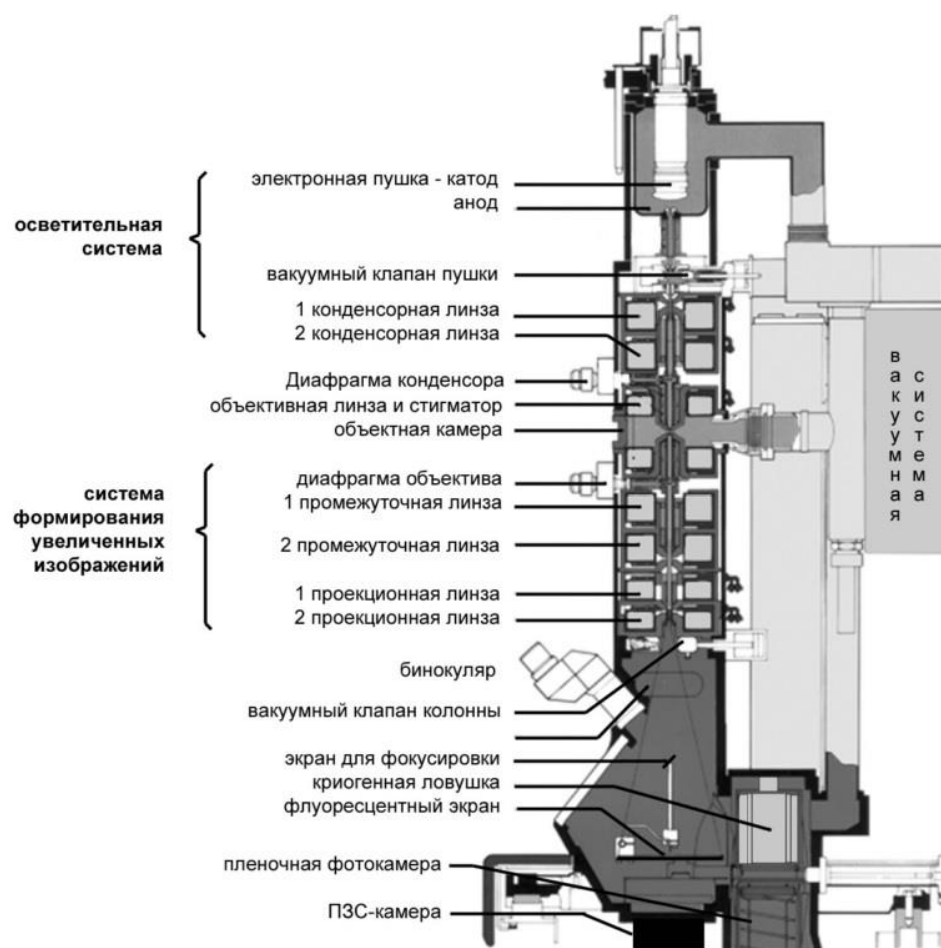


Рисунок 11. Схема строения электронного микроскопа.

Осветительная система микроскопа создаёт поток ускоренных электронов (электронный луч) и позволяет регулировать диаметр освещённой области в соответствии с выбранным увеличением. Она состоит из электронной пушки и конденсорных линз с диафрагмами и стигматорами. В качестве источника электронов в электронной пушке чаще всего используются вольфрамовый катод. Для исследований, требующих увеличения более чем в 100 000 раз, используется катод из гексаборида лантана LaB_6 . Наилучшее разрешение позволяют получить электронные пушки с полевой эмиссией, однако их стоимость высока, а процедура замены полевого катода является весьма сложной и длительной.

Конденсорные линзы представляют собой магнитные катушки, функцией которых является фокусировка электронного пучка. За ними располагается стигматор, корректирующий магнитное поле линзы и восстанавливающий его симметрию. Диафрагма – тонкая пластинка с отверстием, которая отсекает периферийную область электронного луча и повышает его монохроматичность.

В **объектной камере** находятся объектные столики, шлюзовая камера для ввода образцов в вакуум, манипулятор для перемещения образца между объектным столиком и шлюзовой камерой и система защиты объекта от загрязнения.

Система формирования увеличенных изображений состоит из нескольких линз: объективной, промежуточных и проекционной, а также дефлекторов и стигматоров. Объектная линза формирует первичное увеличенное изображение и позволяет фокусировать его, а диаметр отверстия диафрагмы регулирует контрастность. Промежуточные линзы служат для управления увеличением в широком диапазоне без изменения фокусировки. Проекционные линзы также вносят вклад в общее увеличение и обеспечивают глубину фокуса и сохранение резкости изображения при фокусировке с помощью дополнительного бинокулярного микроскопа.

Камера наблюдения расположена в нижней части колонны микроскопа со смотровыми окнами, через которые виден люминесцентный экран. Стёкла смотровых окон содержат большое количество оксида свинца, который поглощает рентгеновское излучение, возникающее при торможении экраном электронов. Люминесцентный экран, на котором формируется конечное увеличенное изображение, представляет собой алюминиевую пластинку, покрытую смесью люминофоров. Светооптический бинокулярный микроскоп с десятикратным увеличением подводится к смотровому окну и значительно облегчает фокусировку изображения.

Вакуумная система обеспечивает поддержание в колонне давления остаточного воздуха не выше 3×10^{-5} мм рт.ст. При таком давлении средняя длина свободного пробега электрона в несколько раз превышает длину колонны. Кроме того, вакуум необходим для нормальной работы раскалённого катода, подвергающегося бомбардировке ионами остаточных газов.

К дополнительным системам электронного микроскопа относятся **система электропитания** линз и электронной пушки, обеспечивающая высокую стабильность питающих напряжений и токов, и **система охлаждения** колонны.

Получение и обработка изображений для создания трёхмерной реконструкции

Существуют два типа контраста изображений: амплитудный и фазовый. Амплитудный контраст обусловлен изменением интенсивности электронного луча при прохождении через образец. Изменение интенсивности возникает из-за того, что часть электронов падающего пучка поглощается образцом или рассеивается под большими углами и отсекается объективной диафрагмой. Однако, биологические образцы состоят из

лёгких атомов (Н, О, N и С) и практически не дают амплитудного контраста. Основной вклад в формирование изображения вносит фазовый контраст. Для понимания фазового контраста необходимо рассмотреть электрон с точки зрения его волновой природы. Каждый прошедший через образец электрон характеризуется прямой (нерассеянной) волной и рассеянными волнами. Чем больше угол рассеивания, тем меньше расстояние между рассеивающими центрами в образце. В качестве рассеивающих центров в биологическом образце могут выступать молекулы белка, α -спирали, отдельные атомы и т.д. Все волны имеют одинаковую длину волны, определяемую энергией электрона (около 2 пм для ускоряющего напряжения 300 кВ) и различные фазы, которые зависят от угла рассеяния. В плоскости изображения эти волны интерферируют и результат интерференции зависит от разности фаз суммируемых волн. Квадрат суммарной амплитуды пропорционален вероятности нахождения электрона в данной точке пространства, и, следовательно, определяет яркость точки на изображении.

Результат интерференции двух волн с одинаковой длиной волны может быть представлен с помощью диаграммы Аргана (рис. 12).

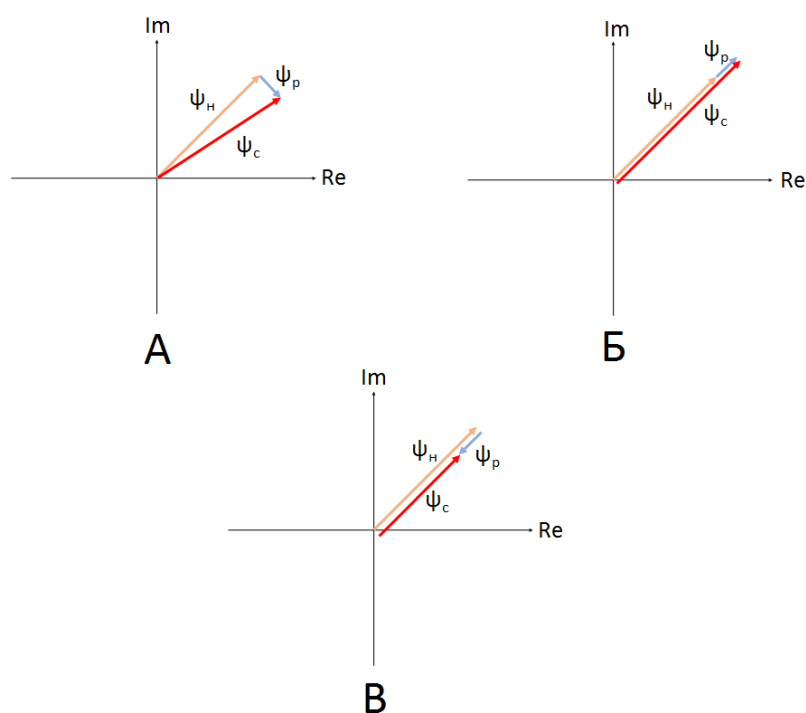


Рисунок 12. Диаграмма Аргана (пояснения в тексте).

Каждой волне соответствует вектор, длина которого равна амплитуде волны, а угол между осью абсцисс (осью действительных чисел) и вектором равен фазе. При некоторой разности фаз нерассеянной (ψ_n) и рассеянной (ψ_p) волн (эта разность фаз близка к 90° , если амплитуда рассеянной волны мала), амплитуда суммарной волны (ψ_c) равна амплитуде нерассеянной волны (рис. 12 А). Если разность фаз равна 0° , то амплитуды нерассеянной и

рассеянной волн складываются (рис. 12 Б), если 180° , то вычитаются (рис 12 В). Вклад амплитуды рассеянной волны в суммарную амплитуду описывается частотно-контрастной характеристикой (ЧКХ, англ. contrast transfer function – CTF). Уравнение функции выглядит следующим образом:

$$CTF = \sin \left[-\pi \Delta z \lambda k^2 + \frac{\pi C_s \lambda^3 k^4}{2} \right] \quad (25)$$

где Δz – дефокус (расстояние от фокальной плоскости), λ – длина волны, k – пространственная частота, C_s – коэффициент сферической абберации.

Влияние значения дефокуса на кривую CTF и получаемое изображение показано на рис. 13 [159].

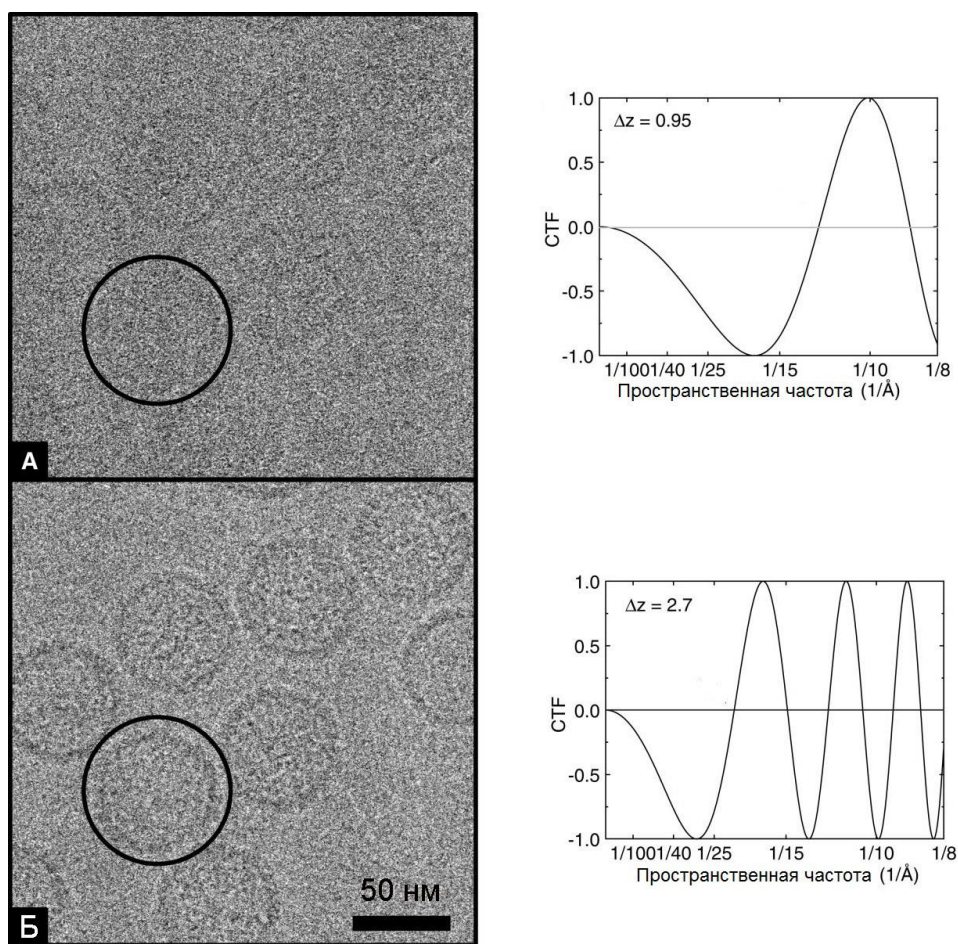


Рисунок 13. CTF-кривые для разных значений дефокуса [159].

На этих микрофотографиях видны частицы икосаэдрического вируса, снятые при значениях дефокуса 0,95 мкм и 2,7 мкм. Толщина оболочки вируса составляет около 4 нм и её контрастность на изображении определяется компонентой, соответствующей пространственной частоте $\frac{1}{4} \text{ нм}^{-1}$. Модуль значения CTF в данной точке больше при дефокусе 2,7 мкм, поэтому на рисунке 13 Б оболочка различима значительно лучше.

Однако, при больших значениях дефокуса частые осцилляции кривой могут затруднять интерпретацию данных высокого разрешения.

Помимо осцилляции для кривых СТФ характерно затухание с увеличением пространственной частоты. Одной из причин этого является ограниченная пространственная когерентность электронного пучка: прохождение электронов через образец под разными углами приводит к потере высокочастотного сигнала. Другой причиной затухания является ограниченная временная когерентность и разброс электронов по энергиям. Кроме того, при больших значениях дефокуса затухание происходит быстрее, чем при маленьких. Кривая, описывающая затухание СТФ с увеличением пространственной частоты называется огибающей.

Всё это приводит к тому, что изображения в электронной микроскопии получаются размытыми по сравнению с проекцией объекта. Функция рассеяния точки (ФРТ) (point spread function, PSF) описывает связь между оригинальной точкой и её изображением и является преобразованием Фурье для СТФ. Наблюдаемое изображение I является результатом свёртки идеального изображения объекта O с PSF :

$$I = O \otimes PSF \quad (26)$$

Применив преобразование Фурье к обоим частям уравнения получим следующее:

$$F\{I\} = F\{O\} \cdot CTF \quad (27)$$

Отсюда выводится уравнение для идеального изображения объекта:

$$O = F^{-1} \left[\frac{F\{I\}}{CTF} \right] \quad (28)$$

Из этого выражения становится понятно, как можно улучшить полученное изображение: необходимо разделить его трансформант Фурье на СТФ и произвести обратное преобразование Фурье с частным. Этот процесс называется СТФ коррекцией. При отсутствии шума в изображениях, по этой формуле можно было бы делать СТФ коррекцию во всех точках, где функция не равна 0. Однако, на практике при небольших значениях СТФ сигнал подавляется шумом, поэтому простое деление на СТФ приводило бы к амплификации шума. Для решения этой проблемы используется фильтр Винера, который позволяет восстанавливать сигнал более корректно. Формула для СТФ коррекции в таком случае изменяется следующим образом:

$$O = F^{-1} \left[\frac{F\{I\}}{CTF^2 + c} \right] \quad (29)$$

где c – величина, обратная отношению сигнал-шум.

Проведение STF-коррекции является первым этапом обработки изображений отдельных частиц в процессе получения трёхмерной реконструкции молекулы. Далее необходимо провести нормализацию изображений: изменить гистограмму распределения интенсивностей каждого изображения таким образом, чтобы у всех изображений была одинаковая средняя интенсивность и стандартное отклонение. Нормализация особенно важна для следующего этапа – выравнивания.

Каждое из откорректированных изображений представляет собой двумерную проекцию молекулы, в которой, помимо сигнала, содержится шум от различных источников. К ним относятся неравномерное распределение красителя или различная толщина льда, повреждение объекта в процессе подготовки или из-за облучения и шум детектора. Увеличение отношения сигнал-шум достигается за счёт суммирования изображений, соответствующих одной и той же проекции объекта. Для нахождения таких изображений проводится выравнивание. Как средство оценки сходства изображений используется кросс-корреляционная функция (CCF):

$$CCF(\vec{s}) = \frac{\int f(\vec{r} + \vec{s})g(\vec{r})d\vec{r}}{\sqrt{\int f^2(\vec{r})d\vec{r} \times \int g^2(\vec{r})d\vec{r}}} \quad (30)$$

$f(\vec{r})$ и $g(\vec{r})$ – выравниваемые изображения, $\vec{r}$ и $\vec{s}$ – векторы в плоскости изображений, $\vec{s}$ – сдвиг между изображениями. Максимальное значение CCF достигает, когда изображения идентичны и идеально выровнены. Первое выравнивание изображений неизвестной структуры часто делается по общей сумме изображений. Это итеративный процесс и после нескольких раундов изображения становятся центрированными. Далее с центрированными изображениями проводятся новые циклы выравнивания, причём как трансляционного, так и поворотного.

Следующий после выравнивания этап – классификация, в результате которой изображения частиц в одинаковой ориентации объединяются в один класс. На суммарном изображении – классовой сумме – отношение сигнал-шум выше, чем на исходных, и детали структуры становятся лучше различимы. Существует несколько подходов к анализу набора изображений и последующей классификации.

В методе главных компонент (principal component analysis) каждому изображению размером $I \times J$ пикселей ставится в соответствие точка в многомерном пространстве размерности $I \times J$, координаты которой определяются значением интенсивности каждого пикселя. Например, если изображение состоит из двух пикселей, то ему в соответствие

ставится точка в двумерном пространстве, координаты которой по осям x и y равны значением интенсивности первого и второго пикселей соответственно (рис. 14).

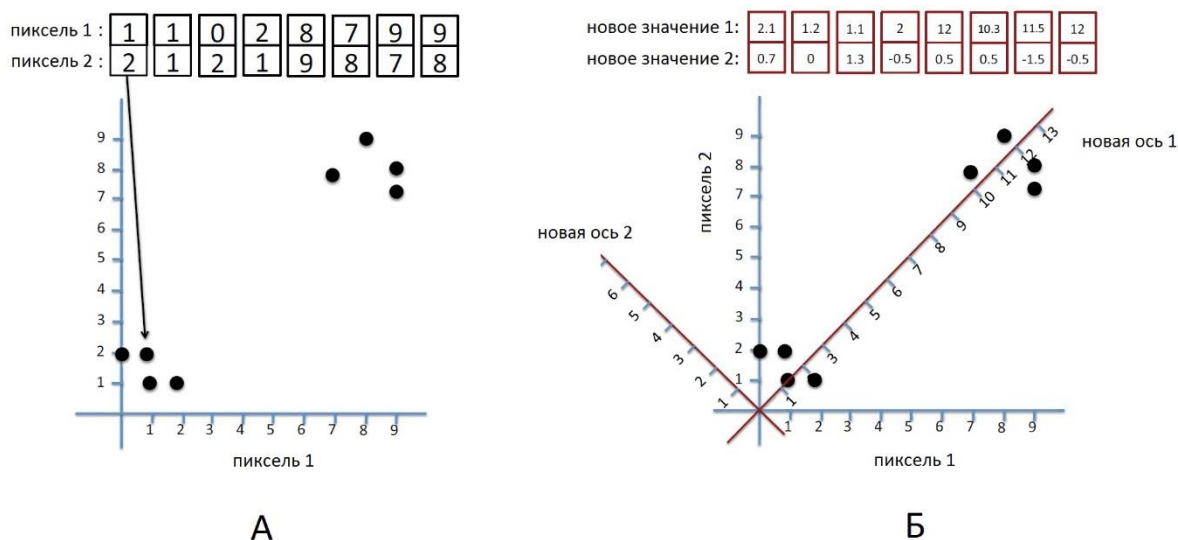


Рисунок 14. Принцип классификации изображений на примере изображений из двух пикселей.

Похожие изображения в таком пространстве будут соответствовать близко расположенным точкам, которые должны быть объединены в один класс. Однако, работа с пространством высокой размерности требует огромных вычислительных ресурсов. Для упрощения задачи в данном методе используется уменьшенное число независимых координат: исходная система координат поворачивается таким образом, чтобы новые оси располагались вдоль направлений с наибольшим разбросом точек. В примере с изображениями из двух пикселей это достигается поворотом осей на 45° против часовой стрелки (рис. 15, Б). В таком случае значения координат точек по оси y примерно равны 0 и классификация может быть проведена на основании только координат по x . Векторы, задающие новые оси координат, называются собственными векторами (eigen-vectors), а конец каждого координатного вектора – это собственное изображение (eigen-images). Собственные изображения показывают регионы наибольших различий интенсивности в наборе данных.

Существуют различные алгоритмы классификации точек в многомерном пространстве, заданном собственными векторами. Во многих программных пакетах, в том числе в использованных в данной работе, применяется метод k -средних (рис. 15).

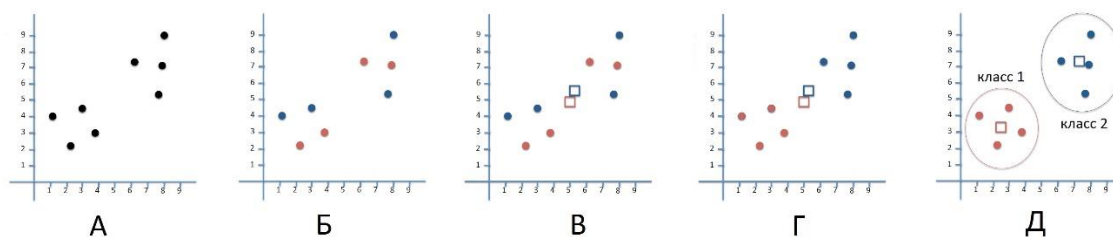


Рисунок 15. Метод К-средних (пояснения в тексте).

В начале набор точек случайным образом разбивается на заданное количество классов k (на рис. 15 $k=2$), затем для каждого класса вычисляются координаты центра масс. Далее вычисляется расстояние от каждой точки до центров масс всех классов. После этого точке присваивается тот класс, к центру которого она оказалась ближе, и центры классов рассчитываются заново. В результате после некоторого количества итераций точки перестают менять класс и процесс завершается. Метод k -средних хорошо и быстро работает в многомерных пространствах, однако не гарантирует нахождение оптимального решения. Эту проблему можно решить, меняя начальное распределение по классам случайным образом, или используя более сложные модификации метода.

Для того, чтобы построить трёхмерную реконструкцию из серии проекций (т.е. классовых сумм), нужно определить их взаимную ориентацию. Существует два подхода к решению этой проблемы: экспериментальный и вычислительный.

В экспериментальном подходе каждая частица снимается под двумя разными углами, что достигается за счёт поворота объектного столика в микроскопе. Этот метод был разработан в 1987 году и получил название метод случайного конического наклона (random conical tilt, RCT) [160]. Больше всего он подходит для получения реконструкций частиц, имеющих предпочтительную ориентацию на подложке. В таком случае все изображения, снятые без поворота сетки, окажутся после выравнивания одной и той же проекцией частицы, а снятые при повёрнутой сетке изображения будут соответствовать проекциям, лежащим на конусе ориентаций (рис. 16) [161]. Если частицы располагаются на сетке в нескольких ориентациях, то сначала они разделяются на классы.

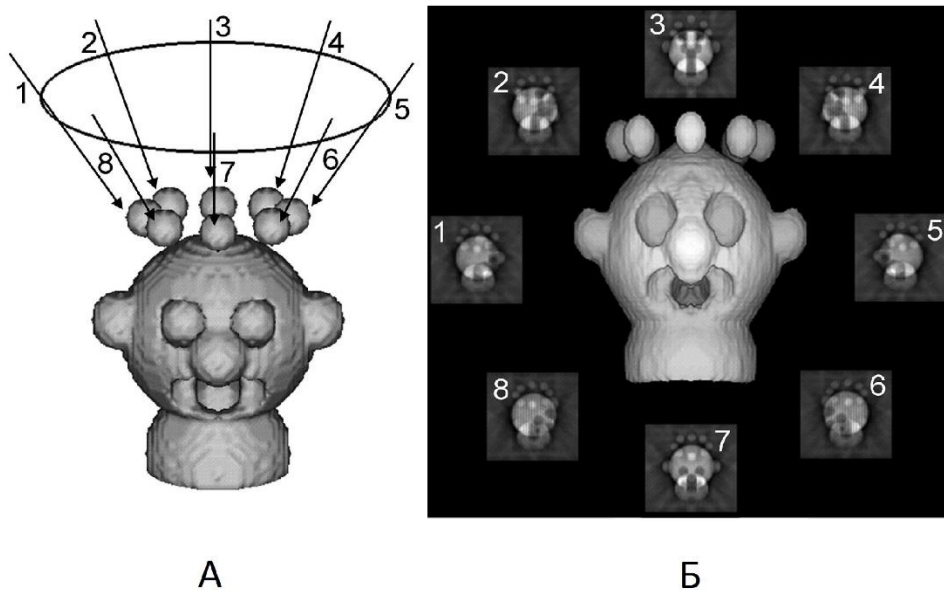


Рисунок 16. Реконструкция методом случайного конического наклона [161].

В вычислительном подходе реконструкция строится из частиц, собранных с сетки без поворота. В основе метода лежит следующая теорема: у каждой пары двумерных проекций есть как минимум одна общая линия [162,163]. Для того, чтобы определить взаимную ориентацию проекций их должно быть минимум три, т.к. две проекции не позволяют определить угол между их плоскостями. Этот метод был разработан для икосаэдрических вирусных частиц [164], при этом поиск общих линий проводился для трансформант Фурье. В последствие он был доработан таким образом, что поиск общих линий стал проводиться непосредственно для изображений [163]. Для каждого изображения строится синограмма – набор из 360 одномерных проекций, каждая из которых соответствует повороту изображения на определённый угол от 0° до 360° (рис. 17) [161]. Задача состоит в том, чтобы найти общие линии (т.е. линии с самым высоким коэффициентом кросс-корреляции) для каждой пары синограмм, это позволяет установить взаимные ориентации проекций.

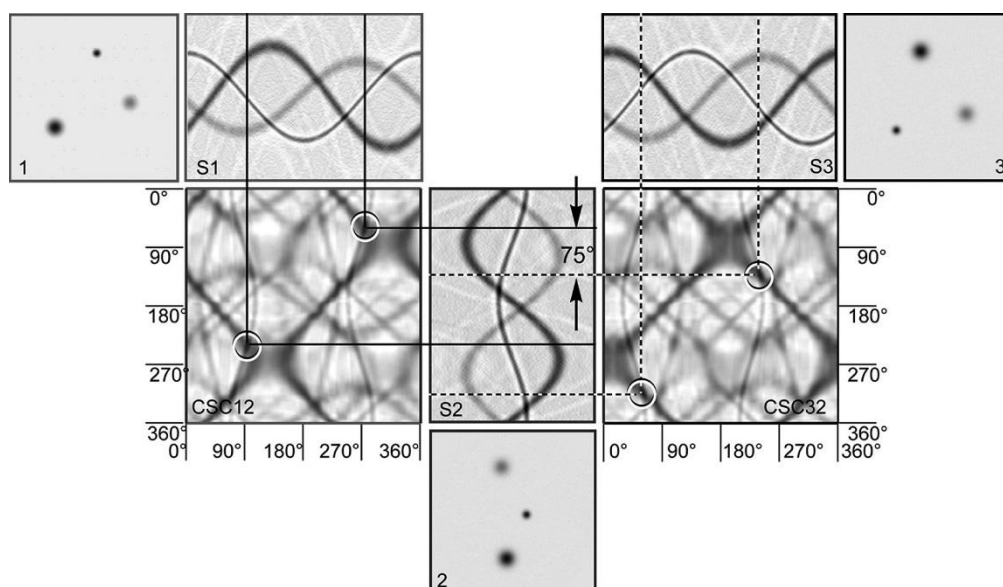


Рисунок 17. Построение синогамм [161].

Существуют различные алгоритмы получения реконструкции трёхмерного объекта по двумерным проекциям [161]. В программе IMAGIC, использовавшейся в данной работе, применяется алгоритм фильтрованного обратного проецирования (filtered back projection) [165]. Обратное проецирование, как следует из названия, является операцией, обратной проецированию трёхмерного объекта на плоскость: плотности двумерного изображения растягиваются в трёхмерный объект в направлении, перпендикулярном плоскости (рис. 18) [166].

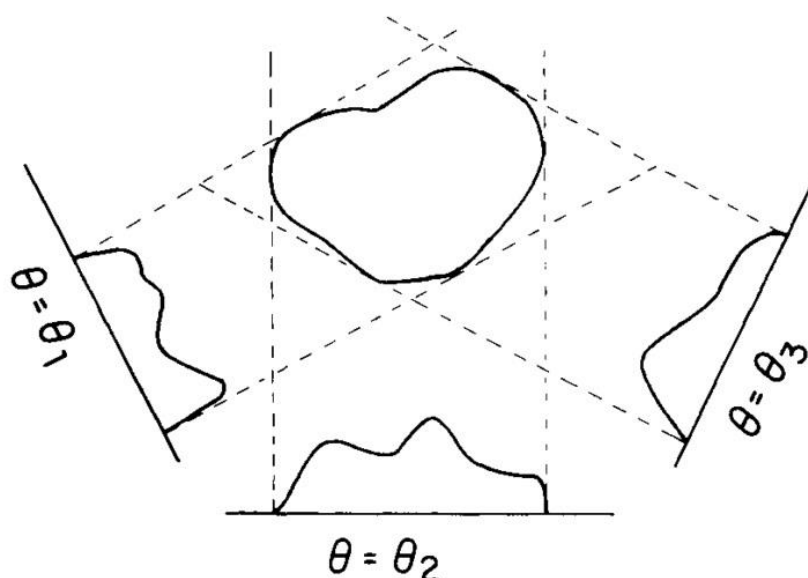


Рисунок 18. Принцип обратного проецирования [166].

Из каждого пикселя получается линия пикселей, называемая лучевой суммой. Значение интенсивности пикселя в каждой точке объёма реконструкции складывается из

всех лучевых сумм, проходящих через эту точку. Фильтрованное обратное проектирование является модификацией алгоритма, в которой с помощью фильтров корректируется размытость деталей реконструкции, внесённая ФРТ.

Далее обычно проводится несколько циклов улучшения первичной реконструкции: она используется для получения репроекций под разными углами, по которым проводится следующий цикл выравнивания частиц, строится следующая реконструкция и т.д. Качество финальной реконструкции во многом зависит от распределения проекций по углам, которое можно отобразить с помощью сферы Эйлера. Это мнимая сфера с центром в центре масс объекта и ориентация каждой проекции определяется как точка пересечения направления проекции со сферой (рис. 19) [161]. К сожалению, в большинстве случаев проекции распределены на сфере неравномерно и разрешение реконструкции анизотропно из-за отсутствия информации в определённых направлениях.

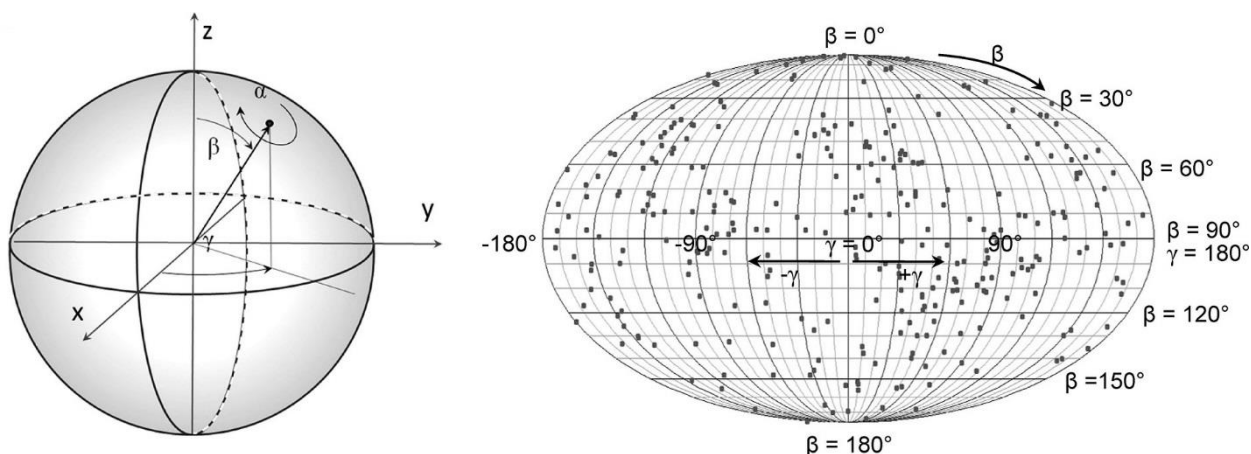


Рисунок 19. Сфера Эйлера [161].

Наиболее распространённым методом определения разрешения реконструкции, полученной из отдельных частиц, является метод объёмной корреляции Фурье (ОКФ, англ. *fourier shell correlation – FSC*) [167]. Набор частиц разделяется пополам (обычно на чётные и нечётные номера), из каждой половины набора строится своя реконструкция, а затем рассчитывается кросс-корреляция их трансформант Фурье. Разрешение определяется по кривой зависимости корреляции от пространственной частоты, которая падает от 1 при низком разрешении до 0 при высоком. Обычно разрешение определяется по пространственной частоте на уровне корреляции 0,5, но есть и другие критерии, например, сравнение с уровнем шума [168,169].

Материалы и методы

В данной работе моделирование липидной мембраны проводилось в тяжело-атомном поле Gromos53a6 [170] и крупно-зернистом поле MARTINI [171]. Взаимодействие F-BAR домена с мембраной изучалось с помощью Gromos53a6.

Тяжело-атомная модель

В первой части работы исследовались свойства модельного липидного бислоя, состоящего из липидов дипальмитоил-фосфатидилхолина (ДПФХ) и дипальмитоил-фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (ДПФИ). Бислой состава 127 ДПФХ/1 ДПФИ был взят с ресурса <http://lipidbook.bioch.ox.ac.uk/> [172]. Из него путём замены 11 фосфатидилхолиновых групп на фосфатадилинозитольные был получен бислой состава 116 ДПФХ/12 ДПФИ (по 6 ДПФИ в каждом монослое). Замена производилась в программе Rmol [173]. Топология липидов ДПФИ и ДПФХ были взяты из публикаций [172] и [174] соответственно. По сравнению со стандартной топологией ДПФХ, в использованной нами топологии были изменены парциальные заряды липидной головки и тип атомов углерода карбоксильных групп. В работе [175] было показано, что эти модификации позволяют достичь лучшей согласованности с экспериментальными данными. В качестве растворителя использовалась модель воды SPC и для воспроизведения физиологической концентрации соли в систему было добавлено 100 mM NaCl. Поскольку ДПФИ несут отрицательный заряд, дополнительные ионы Na^+ добавлялись для его нейтрализации. Протокол молекулярной динамики (таблица 1) был составлен с учётом результатов работы [176], в которой проводился сравнительный анализ силовых полей и параметров расчёта.

Для изучения влияния ДПФИ на свойства бислоя, вычислялись следующие параметры: площадь и объём, приходящиеся на одну липидную головку, толщина бислоя, параметр порядка углеводородных цепей и коэффициент диффузии. Все параметры усреднялись по траектории и сравнивались с экспериментальными данными для мембраны из ДПФХ. Ниже приведены способы расчёта данных параметров.

Средняя площадь на липид вычислялась делением площади сечения ячейки в плоскости x/y на количество липидов в одном монослое. Объём на липид вычислялся по формуле:

$$V_L = \frac{V_B - V_W}{2n_L}, \quad (31)$$

где V_B – объём ячейки, V_W – объём ячейки с тем же количеством молекул воды при тех же условиях, n_L – число липидов в одном монослое.

Таблица 1. Основные параметры протокола молекулярной динамики в силовом поле Gromos 53a6.

Параметр	Значение
Шаг по времени, пс	0,002
Число шагов	75000000
Радиус обрезания электростатических взаимодействий, нм	0,9
Радиус обрезания потенциала Леннарда-Джонса, нм	1,2
Метод расчёта электростатических взаимодействий	PME
Термостат	Нозе-Гувера
Температура термостата, К	323
Баростат	Парринелло-Рамана
Давление, бар	1

Толщина бислоя рассчитывалась как расстояние между пиками электронной плотности холиновых групп. Распределение электронной плотности определялось программой *g_density* из пакета GROMACS.

Параметр порядка углеводородных цепей рассчитывался в программе *g_order* по формуле:

$$S_{CH} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle, \quad (32)$$

где θ – угол между связью углерод-водород и нормалью к плоскости бислоя, скобки обозначают усреднение по времени и всем фосфолипидам.

Коэффициент латеральной диффузии липидов ДПФХ был получен из графика зависимости среднеквадратичного отклонения от времени (программа *g_msd*):

$$MSD = 4D_{lat}t \quad (33)$$

Расчёт проводился на линейном участке кривой с усреднением по всем ДПФХ липидам.

Крупно-зернистая модель

После 150 нс динамики модель бислоя состава 116 ДПФХ/12 ДПФИ была переведена из тяжёло-атомного представления в крупно-зернистое с помощью программы *g_fg2cg* пакета GROMACS 4.5.3. Для этого в топологию липидов была вписана секция, в которой определялся порядок объединения атомов (рис. 20). Схема объединения атомов для

липид ДПФХ была предложена создателем силового поля MARTINI Марринком и его коллегами [177], а схема для ДПФИ в данной работе была основана на работах Лопеза [178] и Левцовой [179].

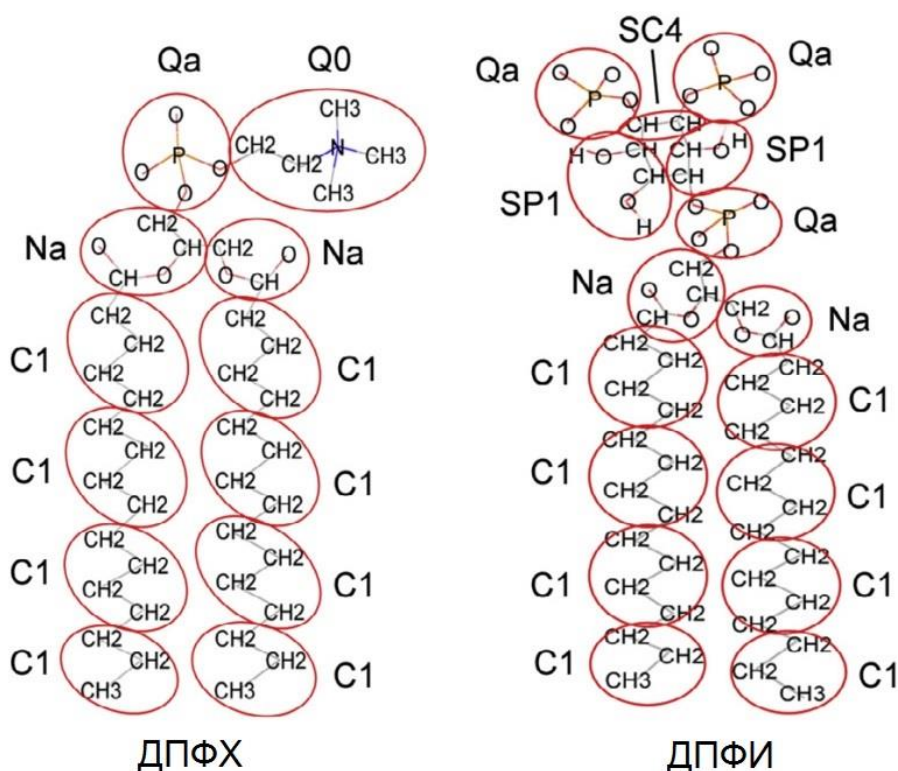


Рисунок 20. Схема перевода липидов ДПФХ и ДПФИ из тяжёло-атомного представления в крупно-зернистое.

После конвертации модель бислоя была реплицирована пять раз вдоль оси X и два раза вдоль оси Y, таким образом, был получен бислой, состоящий из 1160 ДПФХ и 120 ДПФИ. Так же как и в предыдущем эксперименте, в систему были добавлены атомы воды и ионы. Молекулярная динамика проводилась в силовом поле MARTINI с параметрами, рекомендованными для использования с данной моделью молекул воды (таблица 2) [180].

Следует отметить, что в MARTINI массы всех атомов равны 72 а.е.м. что продиктовано соображениями вычислительной эффективности и может влиять на поведение системы. Чтобы оценить это влияние, мы провели расчёт с массами по умолчанию и с массами, соответствующими реальным значениям. Из проведённых расчётов вычислялся тот же набор параметров, что в тяжёло-атомных моделях, за исключением параметра порядка углеводородных цепей, который подразумевает задание всех атомов цепи в явном виде.

Таблица 2. Основные параметры протокола молекулярной динамики в силовом поле MARTINI.

Параметр	Значение параметра
Шаг по времени, пс	0,02
Число шагов	5000000
Радиус обрезания электростатических взаимодействий, нм	1,2
Радиус обрезания потенциала Леннарда-Джонса, нм	1,2
Метод расчёта электростатических взаимодействий	PME
Термостат	Нозе-Гувера
Температура термостата, К	323
Баростат	Парринелло-Рамана
Давление, бар	1

Модель взаимодействия F-BAR-домена с мембраной

Молекулярная динамика мембраны с F-BAR-доменом проводилась в тяжёло-атомном силовом поле *gromos53a6*. Модель димеризованного F-BAR-домена Nwk была построена в программе Pyyre [181] по гомологии с известной кристаллической структурой F-BAR-домена FCHO2 (код 2v0o в базе Protein Data Bank). В программе Packmol [182] была собрана мембрана, в которой верхний монослой состоял из 45 ДПФХ и 1 ДПФИ, а нижний из 50 ДПФХ. Затем в верхний монослой было добавлено ещё четыре молекулы ДПФИ, после чего была проведена динамика бислоя в течение 1 нс. Далее этот фрагмент мембраны был реплицирован четыре раза по оси X и три раза по оси Y, в результате чего была получена мембрана из 1200 липидов, содержащая ~10% ДПФИ в одном монослое.

В программе Rymol [173] была собрана система, в которой F-BAR-домен был обращён к мембране вогнутой стороной и расстояние от концевых участков димера до мембранной поверхности составляло около 1,3 нм. В систему были добавлены атомы воды и ионы натрия и хлора до концентрации 0,15 мМ. Расчёт проводился в программе GROMACS-5.0.4, длина траектории составила 150 нс. Для анализа взаимодействий белка с мембраной использовались программы пакета GROMACS *g_rms*, *g_rmsf*, *g_mindist*.

Все расчёты в данной работе проводились на суперкомпьютерном комплексе МГУ «Ломоносов» [183].

Электронная микроскопия

Для получения белковых образцов, кДНК, кодирующая Nwk¹⁻⁴²⁸, была клонирована в вектор pET28a (EMD Millipore), кДНК фрагмента Cip4¹⁻³¹² – в вектор pTrcHisA (Invitrogen). Нарботка белков проводилась в клетках *E. coli* BL21 DE3, очистка белков (с 6-his-тагом) проводилась с помощью аффинной хроматографии (ИМАС) и гель-фильтрации (Superose 12)¹.

Для исследования самоорганизации F-BAR-доменов белков Cip4 и Nwk на липидных монослоях, 1 мкл липидного раствора с концентрацией липидов 1 мг/мл (65% ДОФХ, 14.5% ПОФЭ, 10% ДОФС, 10% ФИ(4,5)Ф₂, 0.5% родамин ФЭ, растворённые в 20:9:1 хлороформ:метанол:вода) был добавлен на 25 мл каплю буфера (20 мМ HEPES, 100 мМ NaCl, pH 7,5) и проинкубирован на тефлоновой подложке во влажной камере при 4°C в течение 1 часа (методика описана в [184]). Затем полученные монослои были перенесены на углеродные сетки (рис. 21), буфер был заменён на раствор, содержащий 1 мкМ Cip4¹⁻³¹² или 1,4 мкМ Nwk¹⁻⁴²⁸ и проинкубирован 2-15 минут¹. Образцы окрашивались 1% раствором уранилацетата, изображения были получены на электронном микроскопе Tecnai G12 (FEI) при ускоряющем напряжении 120 кВ.

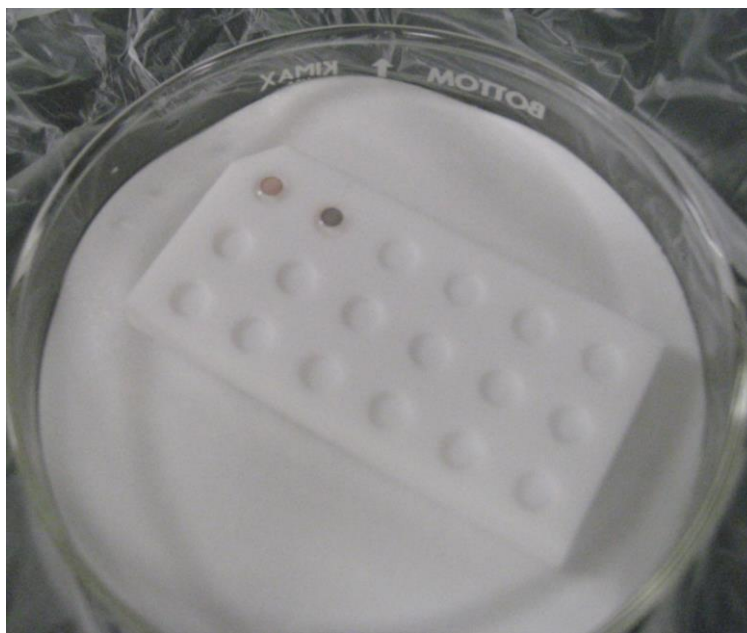


Рисунок 21. Приготовление сеток с липидным монослоем.

С помощью программы EMAN2 [185] было собрано 910 частиц димеров Cip4 и 680 Nwk, а также 350 V-образных структур, образованных димерами Cip4 и Nwk. Обработка и классификация собранных частиц проводилась в программе IMAGIC [165]. Чтобы

¹ Работа проводилась в лаборатории др. А. Родал (Университет Брандайс, США)

интерпретировать положение димеров в V-образных структурах, мы выравнивали их по референсным проекциям. 20 проекций отличались поворотом димера вокруг его длинной оси и были получены из предсказанной в программе Phyre структуры Nwk¹⁻³¹³, отфильтрованной до разрешения 20 Å. Ориентация димера определялась по той референсной проекции, с которой достигался наибольший коэффициент корреляции.

Для построения трёхмерной реконструкции полноразмерного Nwk на углеродной подложке образцы готовились следующим образом: 3 мкл 0,7 мМ раствора Nwk в буфере (20 мМ HEPES, 100 мМ NaCl, pH 7,5) были проинкубированы в течение 30 с на углеродных сетках, предварительно обработанных тлеющим разрядом, а затем окрашены 1% раствором уранилацетата.

Для реконструкции Nwk на липидном монослое 1 мкл 1 мг/мл раствора липидов (молярные доли ФХ/ФЭ/ФС/ФИ(4,5)Ф₂ составляли 65/15/10/10 соответственно, <0.1% родамин-ФЭ для визуализации, растворено в 20:9:1 хлороформ:метанол:вода) был проинкубирован на 25 мкл капле буфера (20 мМ HEPES, 100 мМ NaCl, pH 7,5) на тефлоновой подложке во влажной камере при 4°C в течение 1 часа. Затем липидные монослои были перенесены на углеродные сетки, буфер был заменён на 0,7 мМ раствор Nwk и проинкубирован 30 минут во влажной камере. Образцы негативно контрастировались 1% раствором уранилацетата, изображения были получены на микроскопе JEOL 2100 (JEOL) с ускоряющим напряжением 200 кВ, при увеличении 40000 и 1,5-1,8 мкм дефокусе. В микроскопе использовалась CCD камера Ultrascan 1000XP (Gatan). Микрофотографии Nwk¹⁻⁷³¹ на липидах снимались при 0° и 45° углах поворота, остальные изображения снимались без поворота сетки.

Трёхмерная реконструкция Nwk¹⁻⁷³¹ на углероде была построена из 2500 изображений отдельных частиц размером 90 × 90 пикселей, собранных с микрофотографий в программе Boxer, которая является частью пакета EMAN [186]. Они были отфильтрованы, нормализованы со стандартным отклонением 1 и обработаны далее в программе IMAGIC [165]. Первичная реконструкция была построена из 50 классов, затем она использовалась для получения репроекций для следующих циклов выравнивания. На последнем этапе обработки к реконструкции была применена C2-симметрия.

Начальная модель полноразмерного Nwk на липидном монослое была реконструирована из 647 частиц, собранных с повернутых микрофотографий, в EMAN2 с применением метода RCT [185]. Частицы с неповёрнутых снимков были подвергнуты коррекции CTF, а затем классифицированы. Реконструкция строилась из повернутых

изображений, соответствующих лучшему классу, а затем улучшена с использованием всех 647 пар частиц. Следующий этап улучшения проводился в программе FREALIGN [187] и для него к исходным частицам были добавлены новые, собранные в программе Boxer (всего 5017 частиц). На последнем этапе обработки к реконструкции также была применена C2-симметрия.

Для визуализации различий между полноразмерным белком Nwk и его F-BAR доменом, модели F-BAR [188] и SH3b [189] доменов, отфильтрованные с разрешением 20 Å, были вписаны в реконструкцию с помощью программы Chimera 1.9 [190].

Распределение по ориентациям частиц Nwk на липидах и на углероде изучалось через сравнение с проекциями, как было описано выше. Для каждого образца было собрано, обработано и расклассифицировано около 1000 частиц, все этапы обработки проводились в программе IMAGIC.

Результаты и обсуждение

Молекулярная динамика мембран ДПФХ и ДПФХ/ДПФИ

BAR-доменные белки связываются с мембранами за счёт электростатических взаимодействий положительно заряженных аминокислотных остатков BAR-домена с отрицательно заряженными липидами. Многие белки этой группы, в том числе объект данного исследования Nervous wreck, предпочтительно связываются с фосфоинозиотидами, в частности с ФИ(4,5)Ф₂. Локальное увеличение концентрации ФИ позволяет привлекать BAR-доменные белки к местам мембранных перестроек. Для того чтобы оценить, как увеличение концентрации ФИ влияет на свойства мембраны, в первой части работы методом тяжёло-атомной и крупно-зернистой молекулярной динамики исследовались модельные липидные бислои, состоящие из дипальмитоил-фосфатидилхолина (ДПФХ) и дипальмитоил-фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (ДПФИ).

Тяжёло-атомный подход использовался для моделирования двух бислоев с разными концентрациями ДПФИ: первый бислой состоял из 127 молекул ДПФХ и 1 молекулы ДПФИ, второй из 116 ДПФХ и 12 ДПФИ (по 6 ДПФИ в каждом монослое). Из полученных траекторий длиной 150 нс вычислялись следующие параметры: площадь и объём, приходящиеся на одну липидную головку, толщина бислоя, параметр порядка углеводородных цепей и коэффициент диффузии. Все параметры усреднялись по траектории и сравнивались с существующими экспериментальными данными для мембраны из ДПФХ.

Величина площади на липид для бислоя 127 ДПФХ/1 ДПФИ рассчитывалась на интервале 100-150 нс и составила 0,57 нм², что меньше экспериментально полученного значения для чистого ДПФХ бислоя [191–195]. Для бислоя 116 ДПФХ/12 ДПФИ эта величина составила 0,53 нм² (рис. 22 А). Объём на липид для первой и второй систем был равен 1,21 и 1,14 нм³, в то время как экспериментальное значение для бислоя из ДПФХ равно 1,23 нм³ [194,195]. Толщина бислоя, напротив, была ниже у первой системы: 4,2 нм против 4,5 (экспериментальное значение – 3,8 нм [191–195]). Также был рассчитан коэффициент латеральной диффузии ДПФХ: $1,33 \cdot 10^{-7}$ и $1,02 \cdot 10^{-7}$ см²/с для систем с 1 ДПФИ и 12 ДПФИ соответственно (рис. 22 Б). Экспериментальные значения при температуре 321 К находятся в диапазоне от 0,85 до $1,2 \cdot 10^{-7}$ см²/с [196]. Описанные различия свойств могли быть вызваны выпрямлением углеводородных цепей и процессом упорядочивания липидов. Чтобы подтвердить эту гипотезу, мы рассчитали параметр порядка углеводородных цепей ДПФХ липидов и сравнили его с имеющимися

экспериментальными данными для первой цепи (рис. 22 В, Г). [197]. Значения были выше в системе с большим количеством ДПФИ и обе кривые лежали выше экспериментальной.

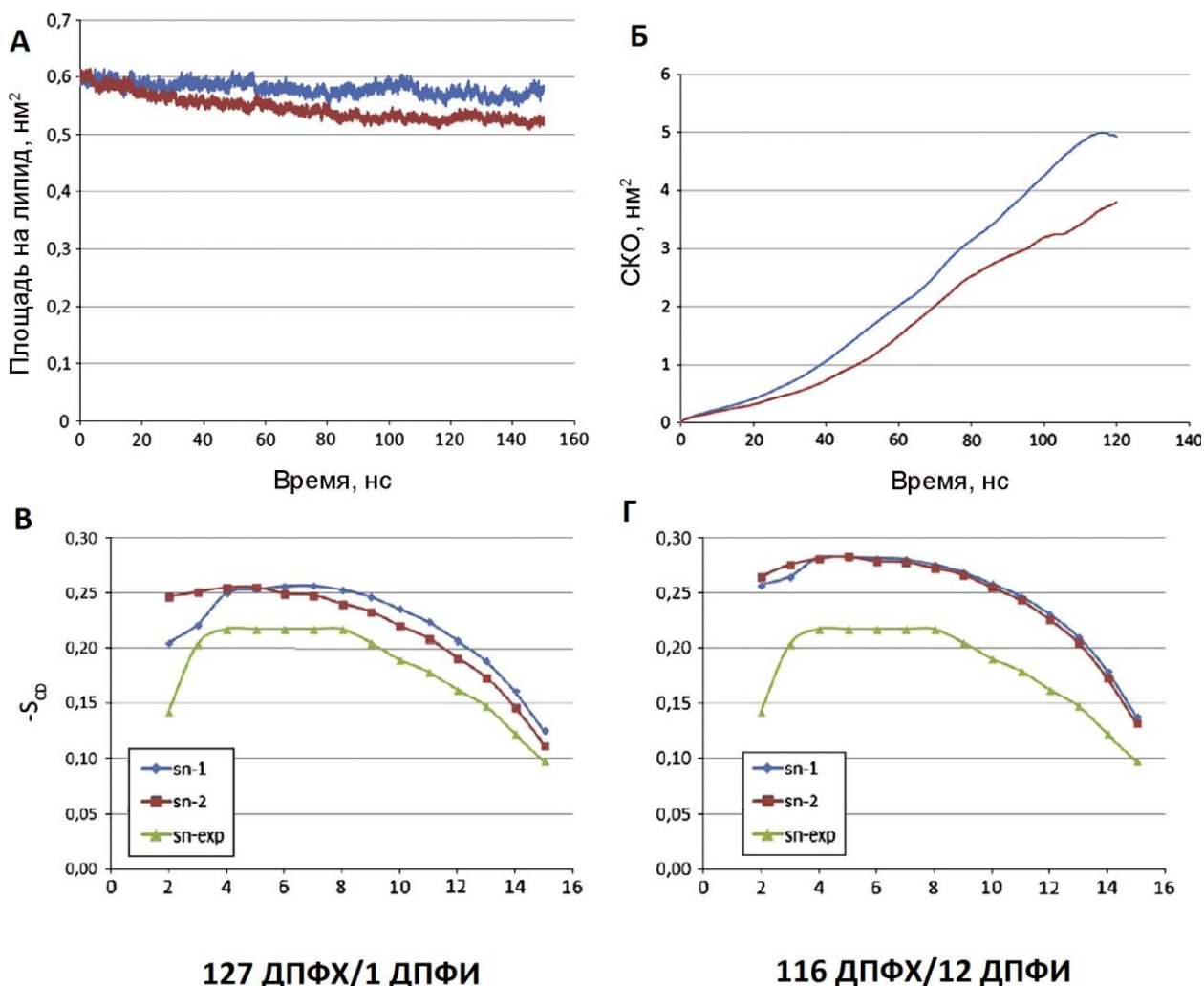


Рисунок 22. Сравнение параметров мембран с разной концентрацией ДПФИ. (А) Площадь на липид в системах 127 ДПФХ/1 ДПФИ (синяя кривая) и 116 ДПФХ/12 ДПФИ (красная кривая). (Б) СКО липидов ДПФХ. Коэффициент диффузии рассчитывался на интервале 30-110 нс. (В) Параметры порядка углеводородных цепей в системах с 1 ДПФИ и (Г) 12 ДПФИ [198].

Полученные результаты указывают на то, что увеличение количества ДПФИ в мембране приводит к возрастанию упорядоченности ДПФХ. В системе, содержащей одну молекулу ДПФИ, значения были близки к результатам, полученным для чистого ДПФХ бислоя. Однако, более низкие значения площади на липид, толщины бислоя и особенно параметр порядка углеводородных цепей указывают на некоторое изменение в организации ДПФХ. Эти различия становятся более значительными, когда количество ДПФИ липидов увеличивается до 6 в каждом монослое.

На следующем этапе мы провели исследование более крупного бислоя состава 1160 ДПФХ/120 ДПФИ в течение 100 нс, для чего был использован метод крупно-зернистой молекулярной динамики. Мы сравнили параметры данного бислоя с параметрами бислоя с

той же концентрацией ДПФИ в тяжёло-атомном представлении. Из соображений вычислительной эффективности в силовом поле MARTINI все атомы по умолчанию имеют массу 72 а.е.м., что может повлиять на поведение системы. Мы провели один расчёт с массами по умолчанию и второй с массами, соответствующими реальным значениям для каждого крупно-зернистого атома. Сравнение свойств бислоя в двух системах не выявило значительных отличий, но для второй системы требовалось больше вычислительных ресурсов, поэтому в дальнейшем использовалась модель с массами по умолчанию.

По сравнению с тяжёло-атомным представлением, в крупно-зернистом возрастает площадь на липид и уменьшается толщина бислоя, что свидетельствует о меньшей упорядоченности липидов. Из-за этого влияние ДПФИ может быть неразличимо, если параметры крупно-зернистой модели бислоя сравниваются непосредственно с экспериментальными данными для мембраны из ДПФХ. Наибольшее различие проявляется в коэффициентах диффузии (таблица 3).

Таблица 3. Сравнение параметров бислоёв с разной концентрацией ДПФИ.

Параметр	ДПФХ (эксперим.)	1% ДПФИ (тяжёло-атомная модель)	9% ДПФИ (тяжёло- атомная модель)	9% ДПФИ (тяжёло- атомная модель)
Площадь на липид, нм ²	0,63-0,64	0,57	0,53	0,6
Объём на липид, нм ³	1,23	1,21	1,14	1,15
Толщина бислоя, нм	3,8	4,2	4,5	4,2
Коэффициент латеральной диффузии, 10 ⁻⁷ см ² /с	0,85-1,2	1,33	1,02	2,62

Как было ранее отмечено Марринком [171], динамика крупно-зернистых моделей идёт в среднем от 2 до 10 раз быстрее по сравнению с моделями с атомарным разрешением. Основной причиной этого является отсутствие трения, возникающего на атомарных степенях свободы, которые отсутствуют в крупно-зернистых моделях. Оценку ускорения для каждого конкретного случая можно проводить на основе различия в коэффициентах диффузии. В нашем случае ускорение составило 2,5 раза.

Таким образом, в первой части работы было продемонстрировано, что увеличение количества липидов ДПФИ приводит к уменьшению площади и объёма на липид, а также коэффициента латеральной диффузии ДПФХ. Толщина бислоя и параметр порядка

углеводородных цепей, напротив, увеличиваются. Полученные результаты указывают на способность ДПФИ упорядочивать окружающие ДПФХ. Это согласуется с МД экспериментами, проведёнными ранее для бислоя с одной молекулой ФИФ₂, встроенной в бислой из 71 ДПФХ [199]. Эффект упорядочивания также наблюдался в случае обогащённых холестерином ДПФХ бислоёв [200], однако механизмы в этих случаях различны. Как показано в [200], холестерол остаётся заякоренным на уровне карбонильных групп ДПФХ, упорядочивая углеводородные цепи за счёт жёстких колец. Изменение содержания холестерина является путём адаптации физических свойств мембраны, в том числе жёсткости, водопроницаемости и текучести, к условиям среды. В отличие от колец холестерина, большие полярные головки фосфоинозотида располагаются в водной фазе над уровнем холиновых групп. Головки липидов ДПФХ, находящихся в непосредственном контакте с ФИФ₂, располагаются перпендикулярно поверхности бислоя, в то время как в чистом ДПФХ бислое они практически параллельны [199]. С помощью атомно-силовой микроскопии было показано, что вытаскивание липида ДПФХ, находящегося в контакте с ФИФ₂, требует примерно на 50% больше работы, чем вытаскивание ДПФХ из чистого ДПФХ бислоя. Таким образом, ФИФ₂ формирует микродомен с окружающими липидами, что повышает его устойчивость к вертикальному смещению, вызываемому связывающимися белками.

Другой механизм реорганизации холиновых групп был описан для ПОФХ/ПОФС бислоёв в 1 М растворе соли [201]. Исследование релаксации растворителя методом флуоресцентной спектроскопии, а также молекулярно-динамические эксперименты в программе GROMACS позволили авторам продемонстрировать, что изменения связаны с адсорбцией катионов карбонильными группами липидов. Присутствие катионов на поверхности мембраны вызывает поднятие холиновых головок ПОФХ, в то время как отрицательно заряженные головки ПОФС остаются параллельны мембране. Ещё одним эффектом присутствия катионов является формирование мостиков между соседними липидами, как было показано вычислительно [202] и экспериментально [203]. Однако, другое компьютерное моделирование, проведённое в силовом поле CHARMM, указало на предпочтительное связывание Na⁺ с фосфатными группами, а не с карбонильными [204]. Это противоречие между двумя силовыми полями может быть связано с различиями ван-дер-ваальсовых радиусов ионов или парциальных зарядов липидных головок. Необходимо больше сравнительных исследований силовых полей и экспериментальных данных для того, чтобы выяснить, какие параметры лучше описывают липид-ионные взаимодействия. Тем не менее, имеющиеся на данный момент научные результаты позволяют сделать вывод о том, что катион натрия может связывать до четырёх молекул липидов, уменьшая их

подвижность. Число созданных ионом натрия кластеров и их стабильность зависят от состава мембраны. Например, димиристоил-фосфатидилсерин (ДМФС) более склонен образовывать кластеры вокруг натрия и исключать из них нейтральный димиристоил-фосфатидилхолин (ДМФХ), чем другие отрицательно заряженные липиды, такие как димиристоил-фосфатидилглицерол (ДМФГ) и димиристоил-фосфатидная кислота (ДМФК) [204]. С одной стороны, это вызвано способностью карбоксильной группы связывать Na^+ . С другой стороны, карбоксильная группа ДМФС предпочтительно образует водородную связь с аминогруппой другого ДМФС, а не с холиновой группой ДПФХ. Таким образом, липиды ДМФС формируют между собой сеть в бислое ДМФХ, что приводит к меньшим значениям площади на липид и большим значением параметра порядка, чем в чистом ДМФХ или ДМФХ/ДМФГ. Это соответствует данным о том, что фосфатидилсериновые липиды формируют рафты, играющие роль в регуляции клеточного цикла [205]. Как было отмечено выше, ФИФ₂ также локально увеличивает свою концентрацию, но этот процесс в основном регулируется белками, которые связываются с мембранами и секвестрируют ФИФ₂ за счёт электростатических взаимодействий [206]. Когда локальная внутриклеточная концентрация Ca^{2+} возрастает, Ca^{2+} /кальмодулин связывается с этими белками и отводит их от мембраны, позволяя ФИФ₂ осуществлять его функции.

Молекулярная динамика F-BAR-домена Nwk с липидной мембраной

Во второй части работы модельный бислой, содержащий 9% ДПФИ в бислое из ДПФХ, использовался для изучения взаимодействия F-BAR-домена Nwk с мембраной. Модель димеризованного F-BAR-домена Nwk была построена в программе Phyre по гомологии с известной кристаллической структурой F-BAR-домена FCHO2. Модель димера имеет характерную для BAR-доменов серповидную форму с боковой стороны и S-образную форму с выпуклой стороны (рис. 23).

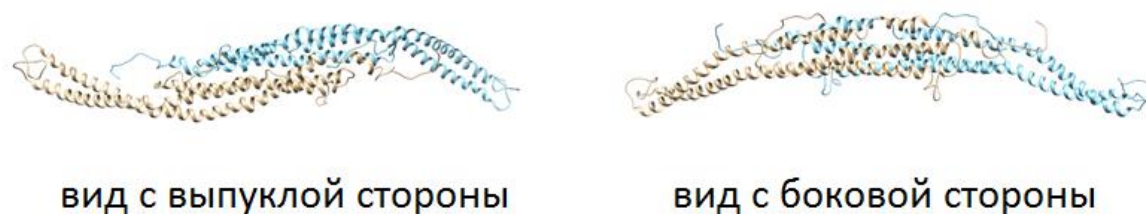


Рисунок 23. Модель димеризованного F-BAR-домена Nwk, построенная по гомологии с известной кристаллической структурой F-BAR-домена FCHO2.

Динамика мембраны с белком проводилась в течение 150 нс, начальная и конечная точки траектории представлены на рисунке 24.

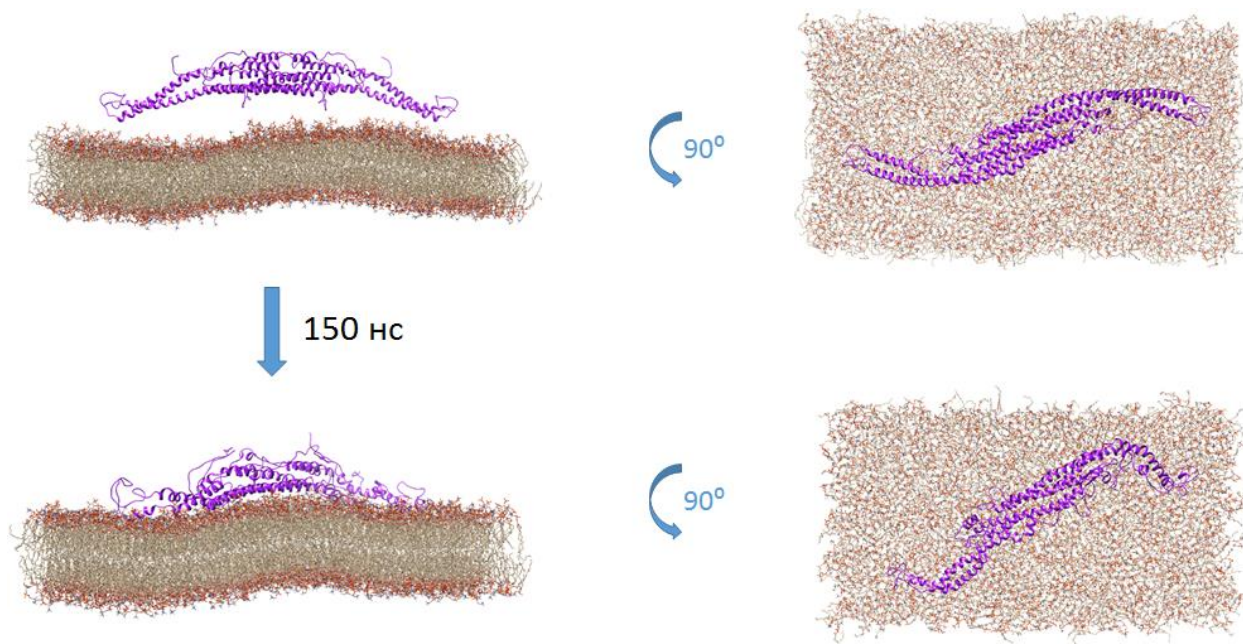


Рисунок 24. Начальная и конечная точки траектории.

Для оценки стабильности структуры белка в процессе динамики был построен график среднеквадратичного отклонения (СКО) атомов основной цепи белка от их начального положения в процессе динамики (рис. 25).

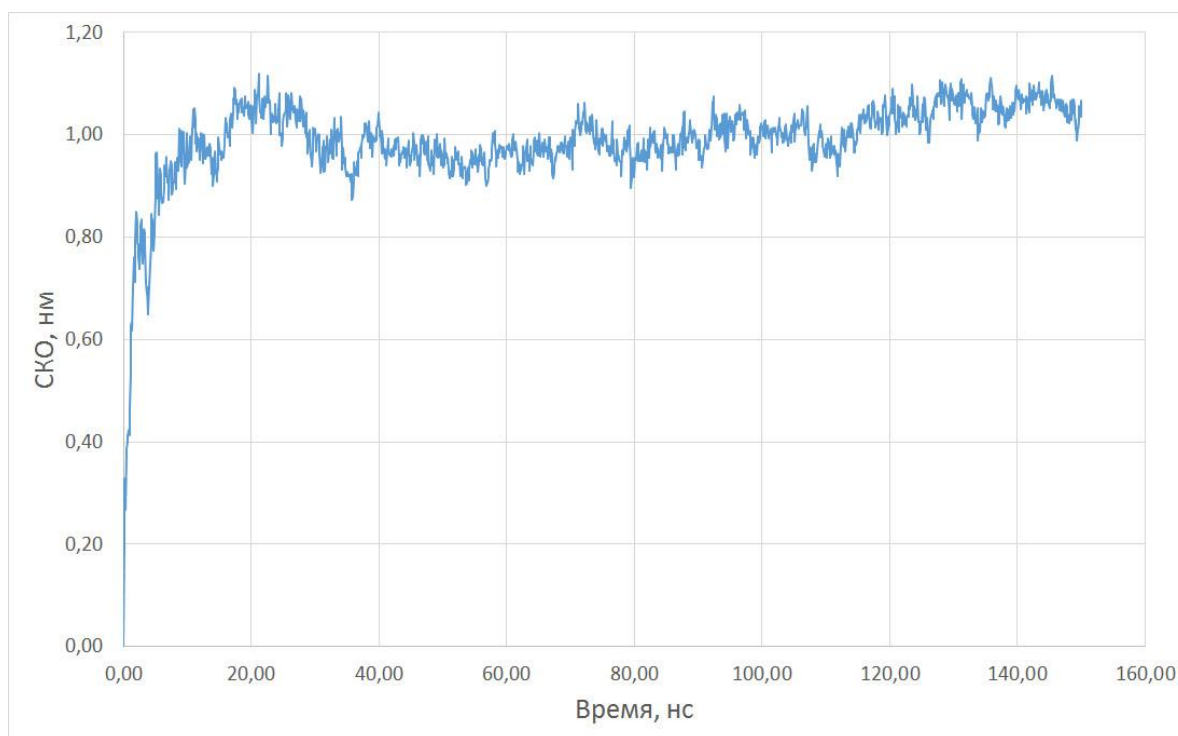


Рисунок 25. График среднеквадратичного отклонения атомов основной цепи белка от начального положения.

За первые 40 нс СКО достигает значения 1 нм и остаётся на этом уровне до конца динамики. Высокие значения СКО говорят о том, что за первые 40 нс белок претерпевает значительные изменения по сравнению с начальной конформацией. Для того, чтобы

оценить стабильность структуры после 40 нс, был построен график СКО атомов основной цепи от их положения на 40-ой нс (рис. 26). Из графика следует, что от 40 нс и до конца динамики структура сохраняет подвижность.

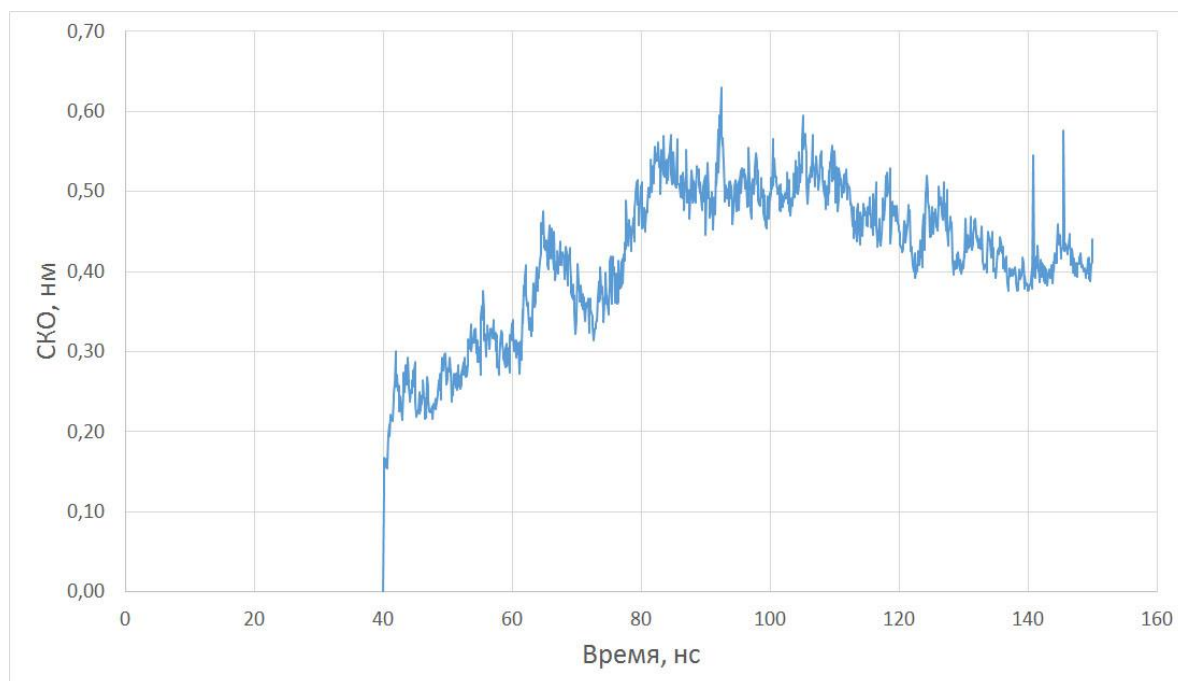


Рисунок 26. График среднев квадратичного отклонения атомов основной цепи от их положения на 40-ой нс.

Чтобы выявить наиболее подвижные участки, был построен график среднев квадратичных флуктуаций (СКФ) атомов в зависимости от номера остатка, которому они принадлежат (расчёт проводился от 40 нс до 150 нс) (рис. 27). Максимальные значения (от 0,4 до 1,4 нм) наблюдаются у остатков 176-196 первого мономера, которые соответствуют петле между второй и третьей спиралями и располагаются на концевых участках димера. Всего для каждого мономера на графике можно выделить два участка со значениями СКФ более 0,3 нм. В первом мономере это концевые участки димера (а.о. 164-200) и остатки, расположенные в верхней части димера, противоположной от мембран-связывающей поверхности (а.о. 272-284). Во втором мономере наиболее подвижны регион петли между первой и второй спиралями (а.о. 75-81) и концевые области (161-179). Подвижность концевых участков димера указывает на то, что они не находятся в стабильно связанном с мембраной состоянии.

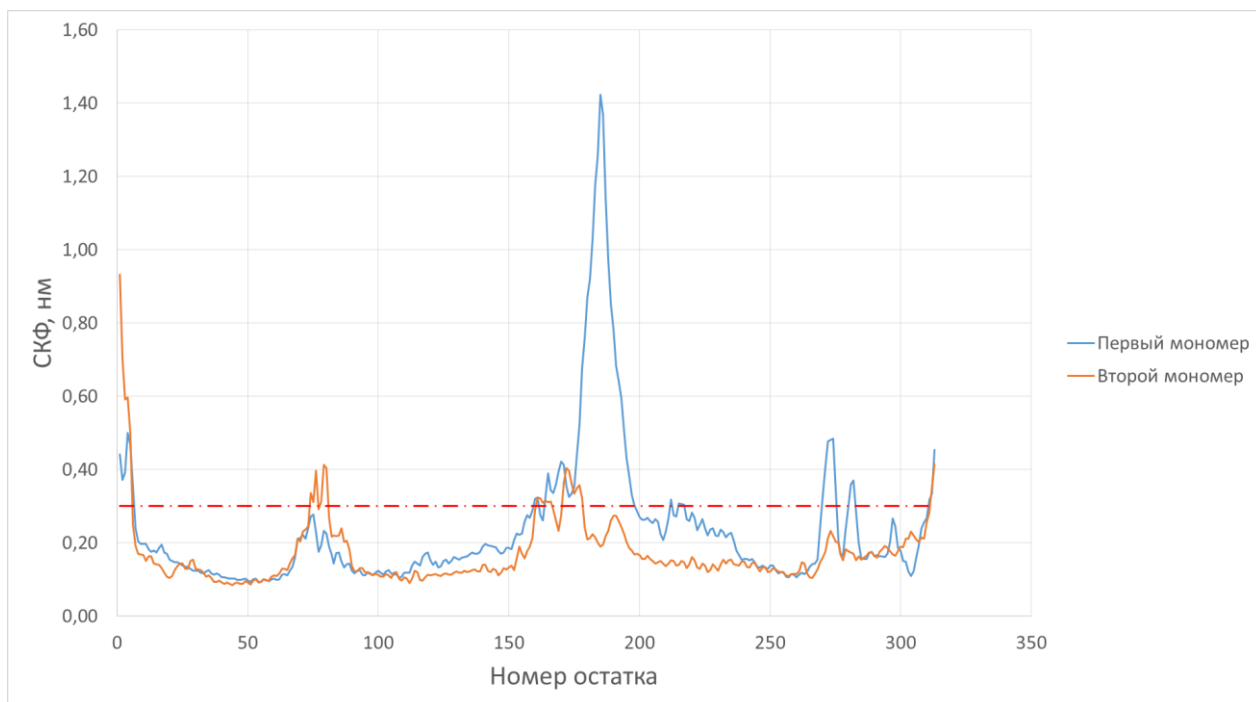


Рисунок 27. График среднеквадратичных флуктуаций (СКФ) остатков первого (синяя кривая) и второго (оранжевая кривая) мономера. Красная пунктирная линия обозначает значение СКФ 0,3 нм.

Как было показано многочисленными экспериментами [3,23,24], в основе связывания F-BAR-доменов с мембранами лежат электростатические взаимодействия положительно заряженных аминокислотных остатков с отрицательно заряженными липидами. Для того, чтобы выяснить, какие а.о. вносят основной вклад в связывание F-BAR-домена Nwk, мы изучали формирование солевых мостиков между остатками лизина/аргинина и фосфатными группами липидов ДПФИ. При образовании солевого мостика, между водородом аминогруппы а.о. и кислородном фосфатной группы образуется водородная связь. Поскольку длина водородной связи не превышает 0,26 нм, необходимым условием формирования солевого мостика можно считать сближение а.о. и липида ДПФИ на расстояние менее 0,26 нм. Расчёт минимального расстояния от а.о. до липида ДПФИ (т.е. расстояния между каким-либо атомом остатка и ближайшим атомом липида ДПФИ) позволяет выявить те а.о., для которых выполняется необходимое условие. В каждом мономере F-BAR-домена Nwk содержится 49 положительно заряженных остатков и для каждого из них был проведён расчёт минимального расстояния до липидов ДПФИ за всю траекторию. В первом и втором мономерах было найдено соответственно 22 и 16 остатков, потенциально образующих водородные связи с липидами, и для них были построены графики изменения минимального расстояния до ДПФИ. Визуализация траектории с помощью программы vmd позволила определить, в каких случаях сближение а.о. и липида соответствует образованию водородной связи.

Большинство из рассмотренных остатков не образовывали стабильных водородных связей с ДПФИ. В качестве примера на рисунке 27 приведён график для остатка лизина 69 первого мономера, который после 80 нс образует водородную связь с одним из липидов, однако она не сохраняется в течении дальнейшего времени динамики. Расстояние до ближайшего липида ДПФИ для этого остатка составляло в среднем 0,97 нм, что более чем в два раза превышает длину солевого мостика [207]. Эти данные указывают на то, что остаток не образовывал стабильных связей с мембраной в течение динамики.

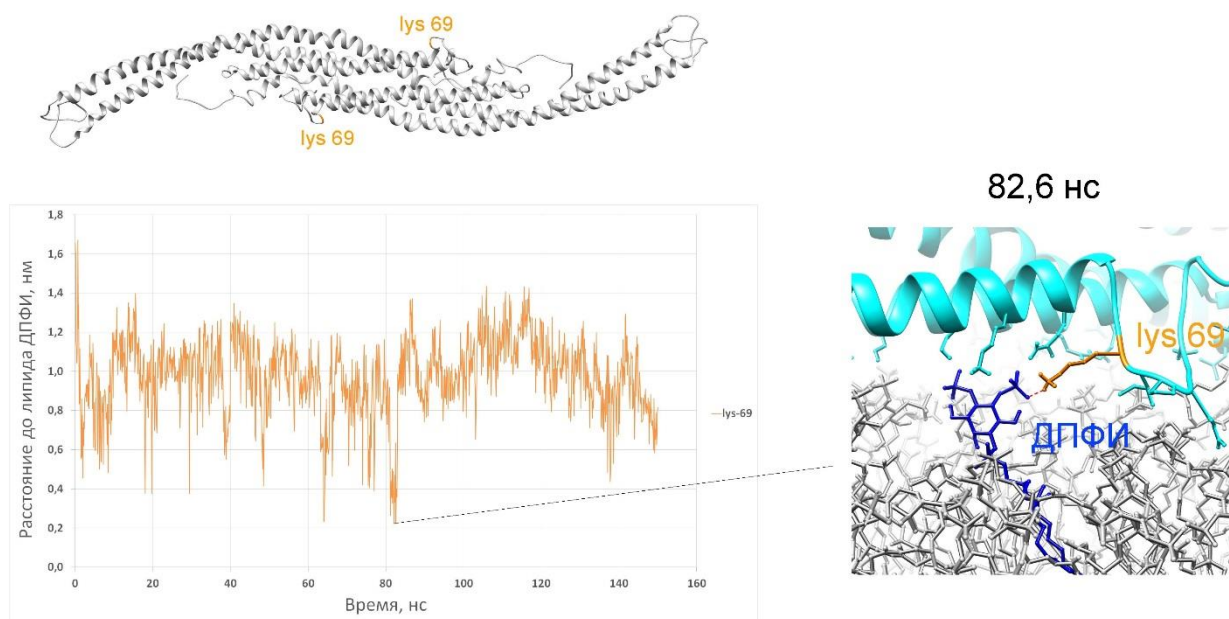


Рисунок 28. Образование нестабильного солевого мостика между остатком K69 и липидом ДПФИ.

На рисунке 29 приведены графики для остатков лизина 46 и 183 первого мономера. Из графика следует, что остаток 183 с 10 по 63 нс образует солевой мостик с липидом ДПФИ, а после 63 нс расстояние до ближайшего ДПФИ резко увеличивается. Аналогично выглядят графики для остатков лизина 179, 181 и 196, которые также расположены на концевых участках димера, между второй и третьей альфа-спиралями. Как было отмечено выше, для этого участка характерны максимальные значения СКФ. Остаток 46, наоборот, характеризуется низкими значениями СКФ и образует стабильную связь с липидом ДПФИ с 70 нс и до конца динамики. Похожим образом ведут себя остатки 52 и 60, также расположенные в центральной части димера.

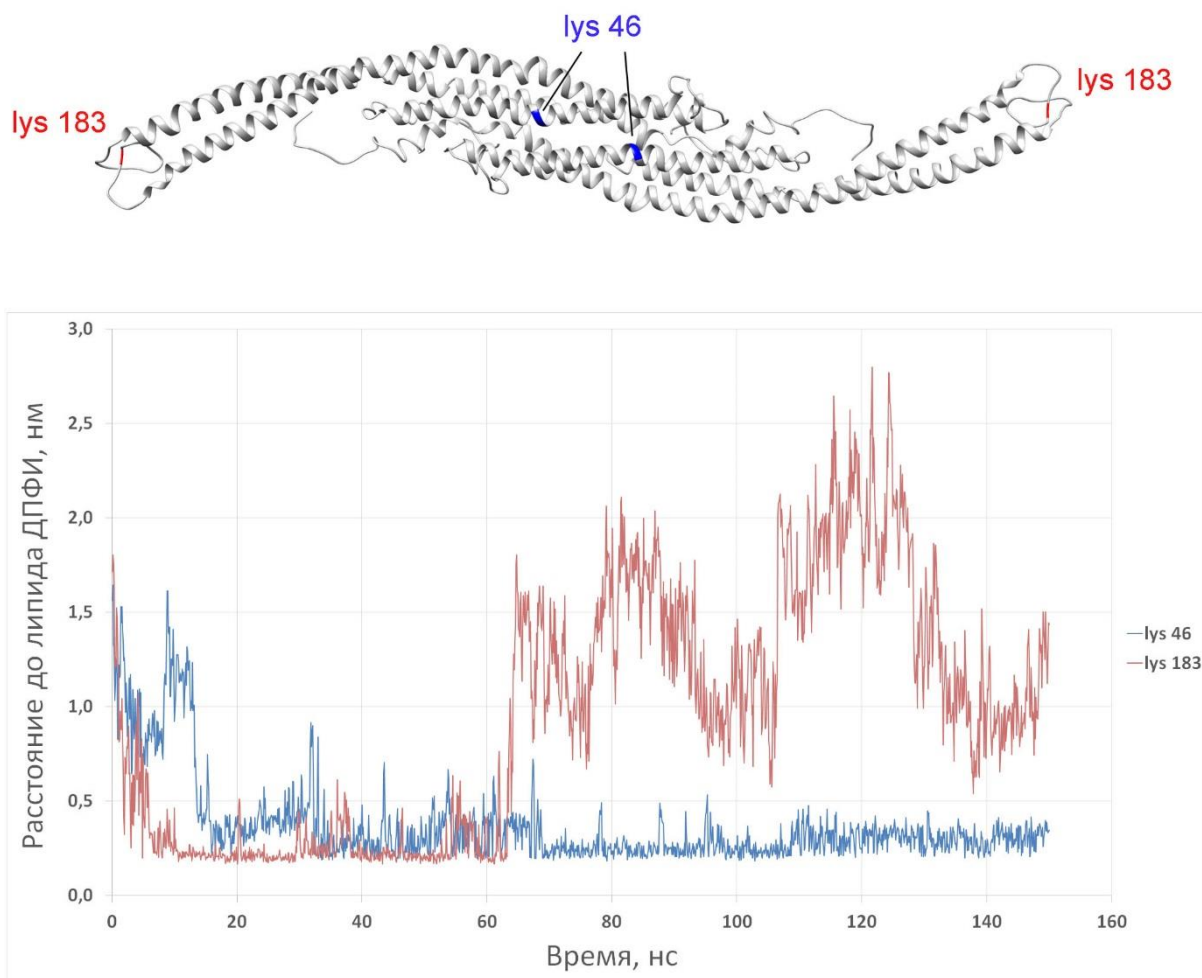


Рисунок 29. Взаимодействие остатков K46 и K183 с липидами ДПФИ.

На рисунке 30 отмечены остатки, образывавшие с ДПФИ солевые мостики, которые сохранялись на протяжении десятков наносекунд динамики. В первом мономере это остатки K25, K46, K60, K52, K154, K179, K181, K183, K196, R200, K302. Во втором мономере – K46, K60, K68, K77, K121, K157, R204. Наиболее стабильные связи с липидами формируются после 60 нс динамики остатками, расположенными в центральной части димера (K46, K60, K68). Остатки лизина, расположенные на петле между второй и третьей альфа-спиралями, связываются с ДПФИ в первые 50 нс, а затем теряют связь с мембраной и сохраняют высокую подвижность. Остаток K302, расположенный в неструктурированной С-концевой области F-BAR-домена, также образует солевой мостик с липидом ДПФИ, однако маловероятно, что это взаимодействие реализуется в случае полноразмерного белка, имеющего дополнительные домены на С-конце.

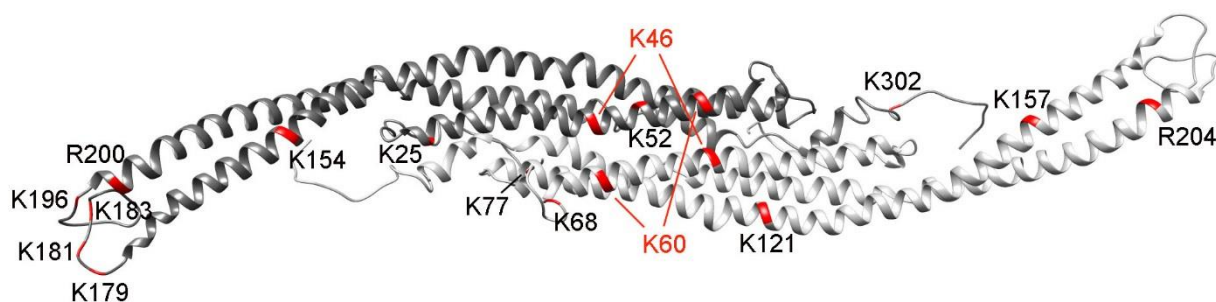


Рисунок 30. Остатки, образывавшие стабильные солевые мостики с липидами в процессе динамики.

Расчёты молекулярной динамики указывают на то, что наиболее важную роль в связывании F-BAR-домена Nwk с мембраной играют положительно заряженные остатки в центральной части димера K46 и K60. Данные результаты согласуются с результатами мутационного анализа, где сравнивались активности F-BAR-домена дикого типа и двух его мутантных форм. В первом мутанте остатки лизина 46 и 47 были заменены на глутаминовые остатки, во втором мутанте последовательности из нескольких лизинов, расположенные на концевых участках димера, заменялись на последовательности из аспарагина и лейцина. Обе мутантные формы были не способны вызывать образование клеточных выступов при экспрессии в клеточной линии S2 и располагались преимущественно в цитоплазме, что говорит о снижении способности связываться с мембраной [188]. Седиментационный анализ показал, что при средних скоростях центрифугирования лизата S2-клеток F-BAR-домен дикого типа выпадает в осадок вместе с мембранными компартментами (рис. 31, слева), мутант по 46 и 47 остаткам отсутствует в осадке (рис. 31, центр), а количество мутантного по концевым участкам белка в осадке заметно снижено (рис. 31, справа). Эти результаты говорят о том, что замена остатков лизина 46 и 47 нарушает способность F-BAR-домена связываться с мембраной сильнее, чем замена последовательностей на концевых участках. Таким образом, основную роль в связывании с мембраной играет центральная часть димера.

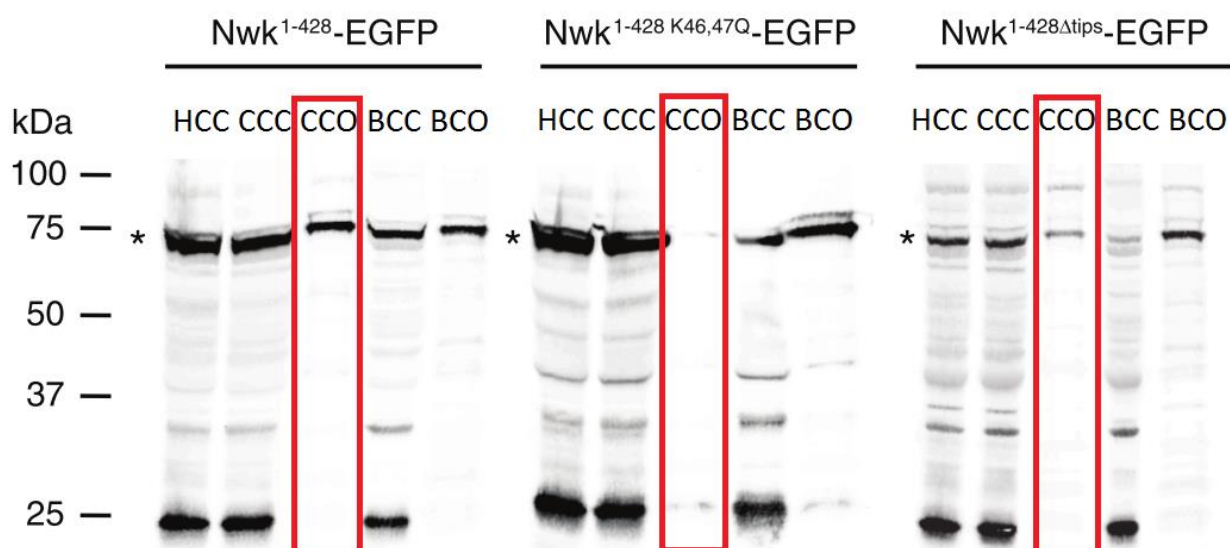


Рисунок 31. Седиментационный анализ взаимодействия мутантных F-BAR-доменов с мембранами. HCC – низкоскоростной супернатант, CCC – среднескоростной супернатант, CCO – среднескоростной осадок, BCC – высокоскоростной супернатант, VCO – высокоскоростной осадок.

Олигомеризация F-BAR домена Nwk на мембране

Для того, чтобы протестировать активность F-BAR-домена *in vivo*, использовалась клеточная линия S2, в которой не экспрессируется эндогенный Nwk [208]. Хотя исследования на клетках S2 не воспроизводят в точности процессы, происходящие при эндоцитозе в нервных клетках, они позволяют проследить, как F-BAR-домены взаимодействуют с актиновым цитоскелетом для изменения формы мембраны. В результате было обнаружено, что F-BAR-домен Nwk вызывает образование клеточных выступов, что является нетипичной активностью, поскольку большинство исследованных F-BAR-доменов вызывают образование мембранных трубочек, проникающих внутрь клетки. При этом F-BAR-домены собираются вокруг неё в спиральную структуру, что способствует распространению мембранного изгиба и росту трубочки [8,119,121]. Чтобы выяснить, является ли нетипичная активность Nwk следствием особого способа олигомеризации на мембране, мы сравнили организацию F-BAR-доменов Nwk (фрагмент Nwk¹⁻⁴²⁸) и F-BAR-доменов белка Cip4 (Cip4¹⁻³¹²) на отрицательно заряженных липидных монослоях с помощью электронной микроскопии негативного контрастирования. Cip4¹⁻³¹² собирался в линейные тяжи, где димеры взаимодействовали концевыми участками (рис. 32 А), что согласуется с ранее полученными результатами [82,121]. В отличие от него, димеры Nwk¹⁻⁴²⁸ собирались на мембране в V-образные, N-образные и зигзагообразные структуры более высокого порядка (рис. 32 В). В отсутствие липидного монослоя подобных структур не наблюдалось.

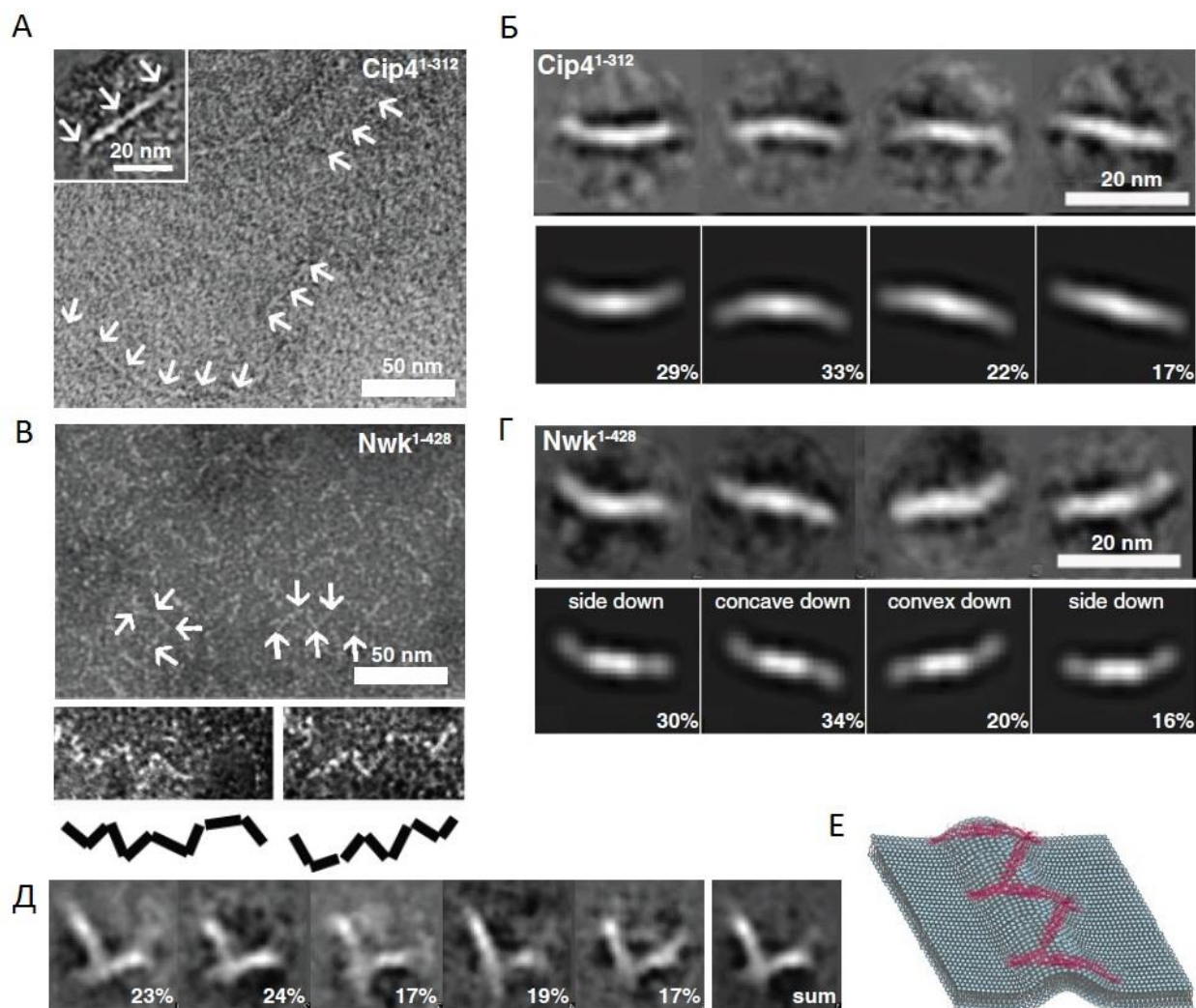


Рисунок 32. Олигомеризация F-BAR-доменов белков Cip4 и Nwk на мембранах (пояснения в тексте).

Построенная по гомологии модель F-BAR-домена Nwk имеет специфическую S-образную форму, а расчёты молекулярной динамики показывают, что эта форма сохраняется в процессе динамики. Это позволяет определить относительную ориентацию димера, т.е. отличить димер, обращённый к мембране вогнутой стороной, от димера, обращённого к мембране выпуклой стороной. Построенная по гомологии модель F-BAR-домена Nwk была отфильтрована в Chimera до разрешения 20 Å и использована для получения проекций с шагом 10° (рис. 33), по которым выравнивались изображения отдельных частиц. По проекции, с которой достигался наибольший коэффициент корреляции, определялась ориентация димера.

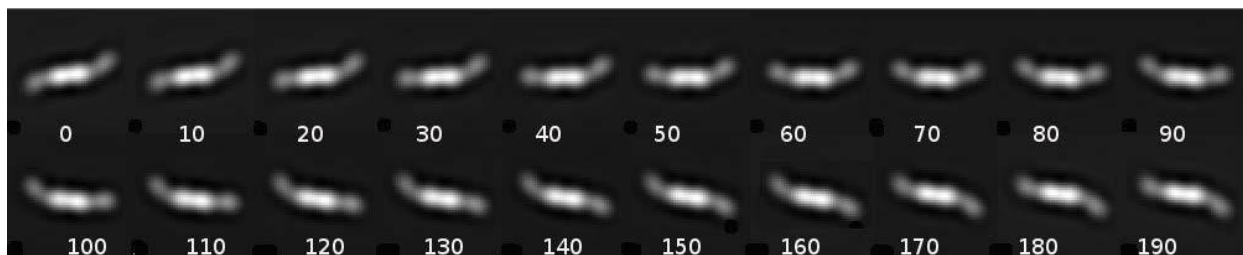
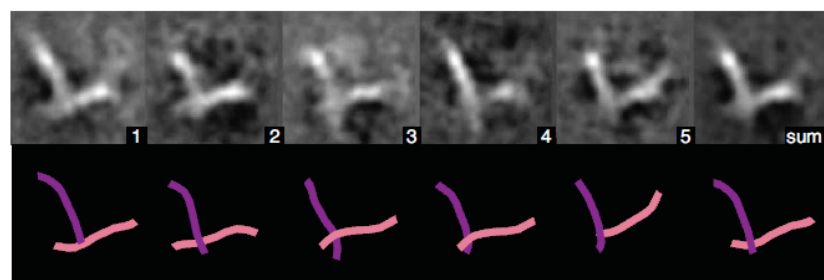


Рисунок 33. Проекция отфильтрованной модельной структуры F-BAR-домена Nwk.

Аналогичным образом с помощью известной структуры F-BAR-домена FBP17 определялась ориентация димеров классического F-BAR белка $Cip4^{1-312}$. Всего было собрано и расклассифицировано 910 частиц $Cip4^{1-312}$ и 680 частиц Nwk^{1-428} . Частицы $Cip4^{1-312}$ демонстрировали ожидаемую серповидную форму (рис. 32 Б), а Nwk^{1-428} S-образную. Анализ частиц показал, что 34% димеров Nwk^{1-428} обращены к липидному монослою вогнутой стороной, но большая часть (~50%) боковой (рис. 32 Г).

Чтобы определить взаимную ориентацию димеров в составе олигомеров, в программе EMAN2 было собрано 350 V-образных структур, которые затем анализировались в программе IMAGIC. Собранные структуры были расклассифицированы на пять классов, в каждом из которых угол между димерами составлял около 90° (рис. 32 Д, 34). В результате было показано, что в каждой V-образной структуре один димер обращён к мембране вогнутой стороной, а второй повернут на угол от 40° до 180° (рис. 34).

В работах других исследователей на жёстких липидных бислоях FBP17 также предпочтительно принимал боковую ориентацию, несмотря на то, что с мембранными трубочками взаимодействовал вогнутой стороной [8]. При этом концевые контакты, играющие решающую роль в формировании трубочек, сохранялись между димерами, ориентированными боковой стороной к мембране. Таким образом, на липидных бислоях (или монослоях, как в случае наших экспериментов), устойчивых к деформации, ориентация F-BAR-доменов может отличаться от ориентации на клеточных мембранах, но характерные структуры высокого порядка сохраняются.



классовая сумма	Относительная ориентация угол поворота/коэффициент корреляции		% частиц
	Левый димер	Правый димер	
1	70°/0.646	180°/0.744	22.7
2	60°/0.573	180°/0.697	24.3
3	180°/0.632	0°/0.631	17.5
4	90°/0.615	0°/0.667	18.7
5	130°/0.658	90°/0.667	16.8
общая сумма	70°/0.651	180°/0.757	100

Рисунок 34. Ориентация димеров в составе V-образных структур на мембране. В таблице указана относительная ориентация частиц и коэффициент корреляции с проекцией [188].

Полученные нами результаты позволили предположить механизм формирования трубочек F-BAR-доменами Nwk, отличающийся от известной ранее схемы спиральной организации доменов вокруг трубочки (рис. 35).

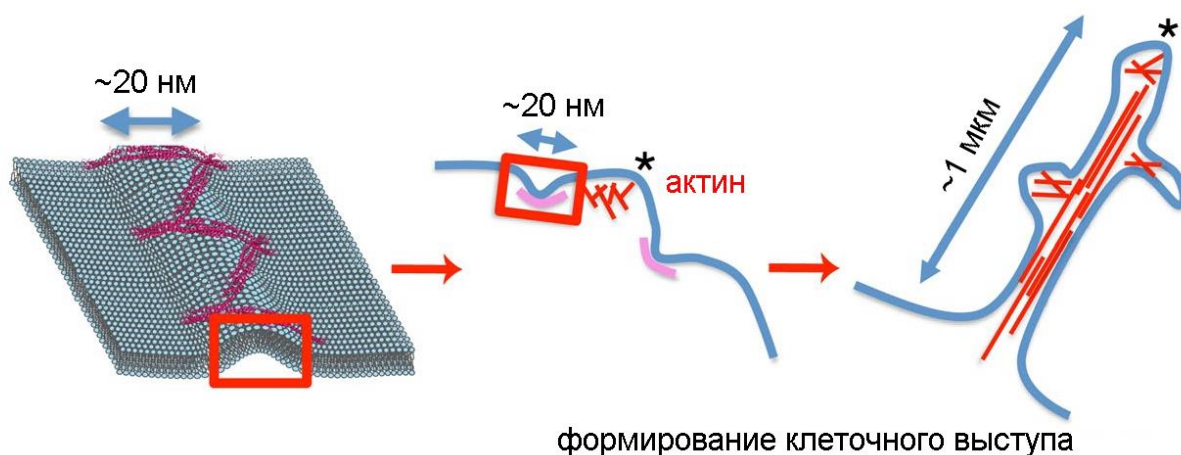


Рисунок 35. Модель активности F-BAR-домена Nwk в клетках S2.

Согласно нашей модели, зигзагообразные структуры создают на мембране гребешок, геометрия которого зависит от угла между димерами и частоты встречаемости димеров, обращённых вогнутой стороной к мембране (рис. 32 E). В клетках участок мембраны между такими гребешками преобразуется в выступ за счёт полимеризации

актиновых филаментов. Данная модель объясняет наблюдаемый эффект при экспрессии F-BAR-домена Nwk в клетках S2, не имеющих эндогенного Nwk. Биологическая роль формирования мембранных гребешков белком Nwk в нейронах дрозофилы связана с динамин-зависимым эндоцитозом. Динамин привлекается к мембране за счёт связывается с SH3а-доменом Nwk [140].

SH3-домены встречаются у многих BAR-доменных белков и помимо взаимодействия с белками-партнёрами, они также могут выполнять функцию ингибирования активности BAR-домена [103,128,209]. Фрагмент Nwk, содержащий F-BAR-домен и два SH3-домена, демонстрировал меньшую аффинность к заряженным липосомам, чем F-BAR-домен отдельно [188], а в клетках S2 не вызывал образование характерных клеточных выступов [189]. Также в опытах *in vitro* было показано, что SH3-домены напрямую связываются с F-BAR-доменом и это взаимодействие носит электростатический характер [189]. Эти результаты говорят о том, что SH3-домены регулируют активность F-BAR-домена Nwk. Однако, связывание SH3-доменов не полностью ингибирует мембран-связывающую активность F-BAR-домена, а лишь повышает необходимую для связывания концентрацию ФИ(4,5)Ф₂: если для связывания F-BAR-домена достаточно 5%-ой концентрации ФИ(4,5)Ф₂ в липосомах, то присутствие SH3-доменов повышает необходимую концентрацию до 20% (рис. 36) [189].

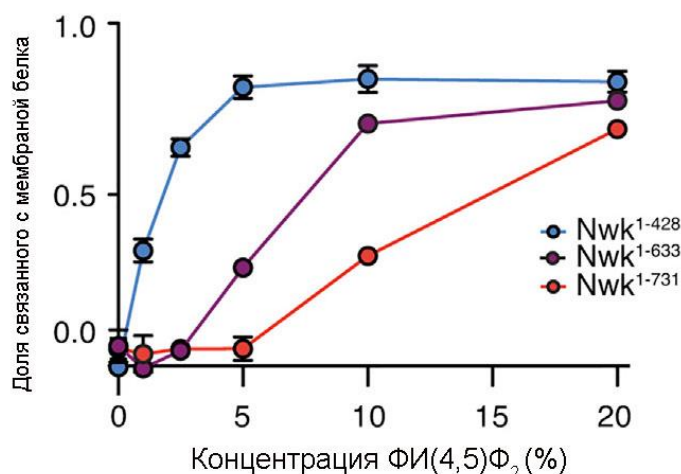


Рисунок 36. Влияние SH3-доменов на связывание F-BAR-домена с мембраной [189].

При достаточном количестве ФИ(4,5)Ф₂ как F-BAR-домен отдельно, так и полноразмерный белок индуцируют формирование трубочек на липосомах, однако, слишком большой негативный заряд препятствует деформации мембраны [189]. Возможно, это связано с тем, что высокие концентрации ФИ(4,5)Ф₂ приводят к повышению жёсткости мембраны, а также затруднению перемещения белков, необходимого для формирования

олигомеров [210]. Состав мембраны может регулировать и другие BAR-доменные белки сходным образом: повышенное содержание ФИ(4,5)Ф₂ подавляет мембрано-деформирующую активность F-BAR-домена FBP17 в опытах *in vivo* [211].

Для того, чтобы выяснить, какие структурные изменения происходят в полноразмерном белке при связывании с липидной мембраной, в следующей части работы были получены трёхмерные реконструкции полноразмерного Nwk на углероде и на липидной мембране.

Структура автоингибированного Nwk

Для исследования структуры Nwk в несвязанном с мембраной автоингибированном состоянии, использовался Nwk¹⁻⁷³¹, который содержит оба SH3-домена и воспроизводит фенотип дикого типа в клетках дрозофилы [140]. Методом просвечивающей электронной микроскопии негативно контрастированных образцов были получены изображения белка на сетках с углеродной подложкой (рис. 37).

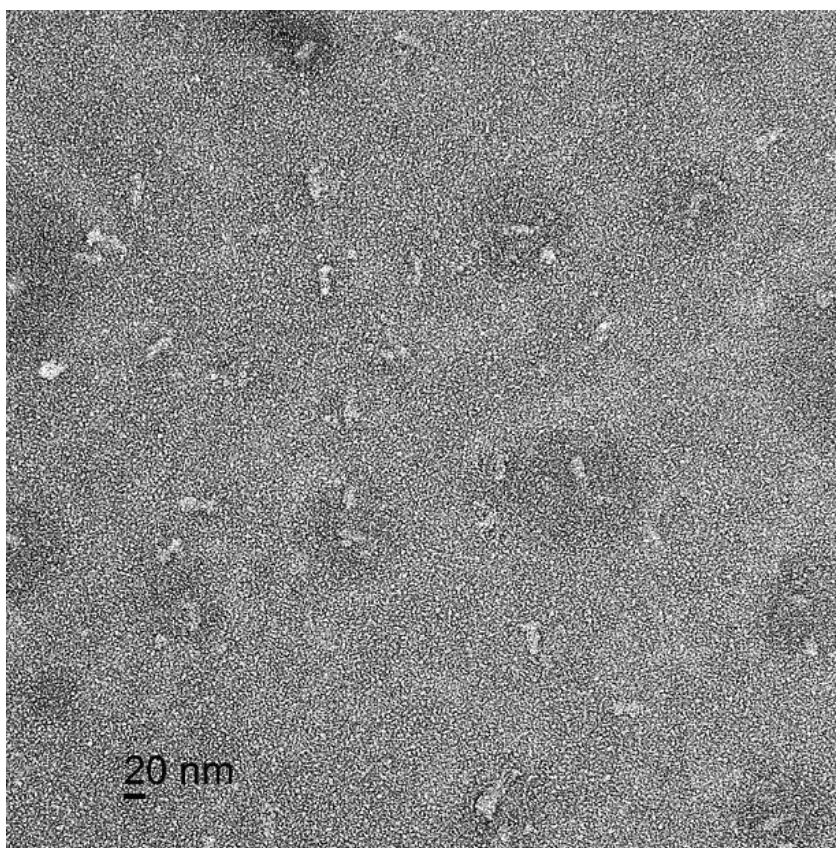


Рисунок 37. Микрофотография негативно контрастированных частиц Nwk¹⁻⁷³¹ на углеродной подложке.

Далее с полученных микрофотографий собирались отдельные частицы, проводилось их выравнивание и классификация (подробнее в разделе «Материалы и методы»). На

рисунке 38 представлены примеры классовых сумм, полученных в процессе создания реконструкции.

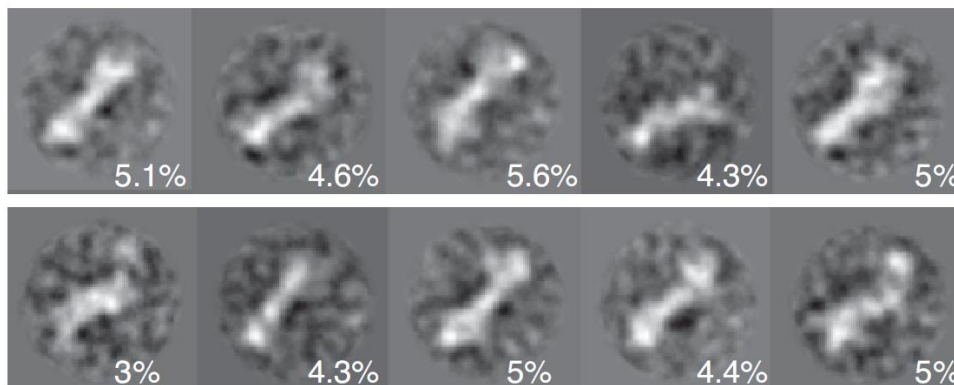


Рисунок 38. Классовые суммы, получаемые в процессе обработки частиц Nwk^{1-731} и создания трёхмерной реконструкции.

Трёхмерная реконструкция была построена из 2500 изображений отдельных частиц в программе IMAGIC. Разрешение реконструкции определялось методом объёмной корреляции Фурье по пространственной частоте на уровне корреляции 0,5 и составило около 20 Å (рис. 39).

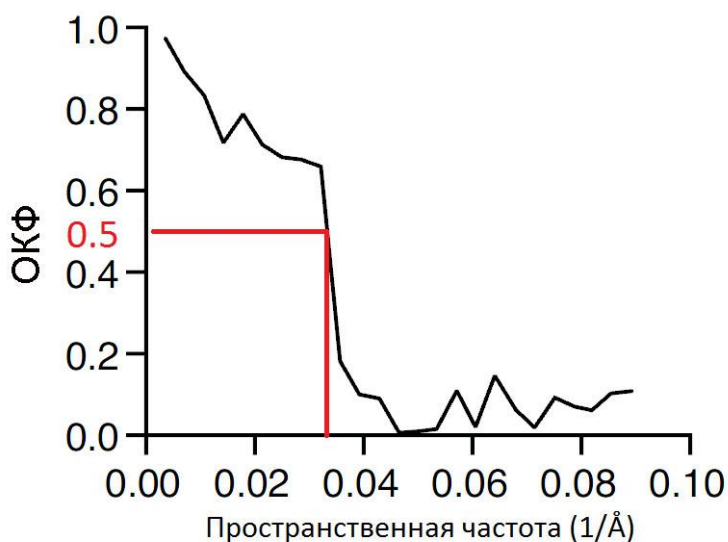


Рисунок 39. Определение разрешение реконструкции Nwk^{1-731} на углеродной подложке методом объёмной корреляции Фурье.

Для интерпретации полученной электронной плотности с помощью программы Chimera в неё была вписана электронная плотность F-BAR-домена, полученная из предсказанной по гомологии модели (рис. 40). Построенная реконструкция обладает дополнительной электронной плотностью со стороны мембран-связывающей поверхности F-BAR-домена.

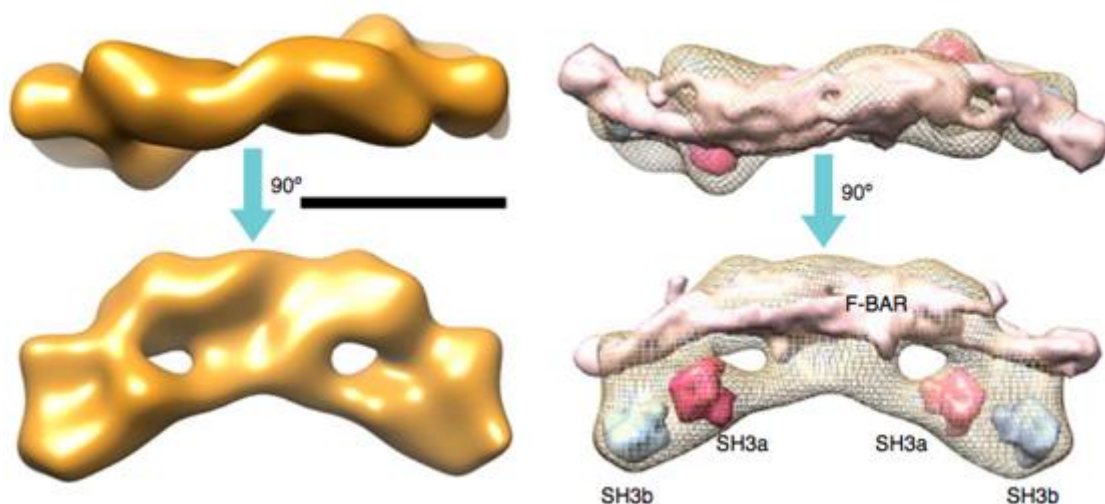


Рисунок 40. Реконструкция полноразмерного Nwk на углеродной подложке (бар – 10 Å).

Чтобы выяснить расположение SH3-доменов в дополнительной плотности, сравнивались изображения частиц Nwk¹⁻⁶³³ (фрагмент, у которого отсутствует SH3b-домен) и Nwk¹⁻⁴²⁸ (фрагмент без SH3-доменов). Разность электронных плотностей указывает на то, что дополнительная плотность первого фрагмента располагается в центральной части димера (рис. 41).

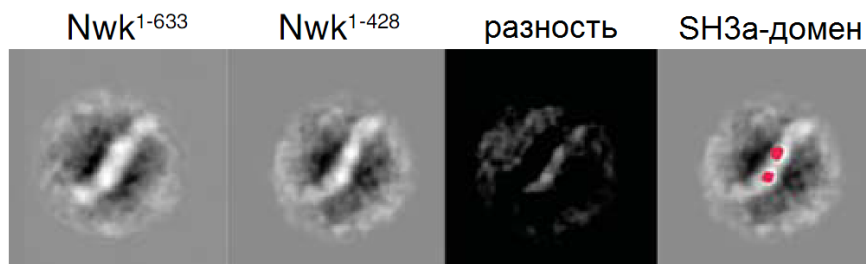


Рисунок 41. Разностная карта, показывающая положение SH3a-доменов (красные точки).

Следовательно, в построенной реконструкции SH3a-домен располагается в центральной области, а SH3b домен занимает положение ближе к концам (рис. 40, справа). Таким образом, по нашим данным в несвязанном с мембраной состоянии С-конец белка блокирует вогнутую поверхность F-BAR-домена, снижая его способность связываться с мембраной.

Структура связанного с мембраной Nwk

На рисунке 42 представлена микрофотография частиц Nwk¹⁻⁷³¹ на липидном монослое, содержащем 10% ФИ(4,5)Ф₂, ниже приведены примеры классовых сумм (рис. 43).

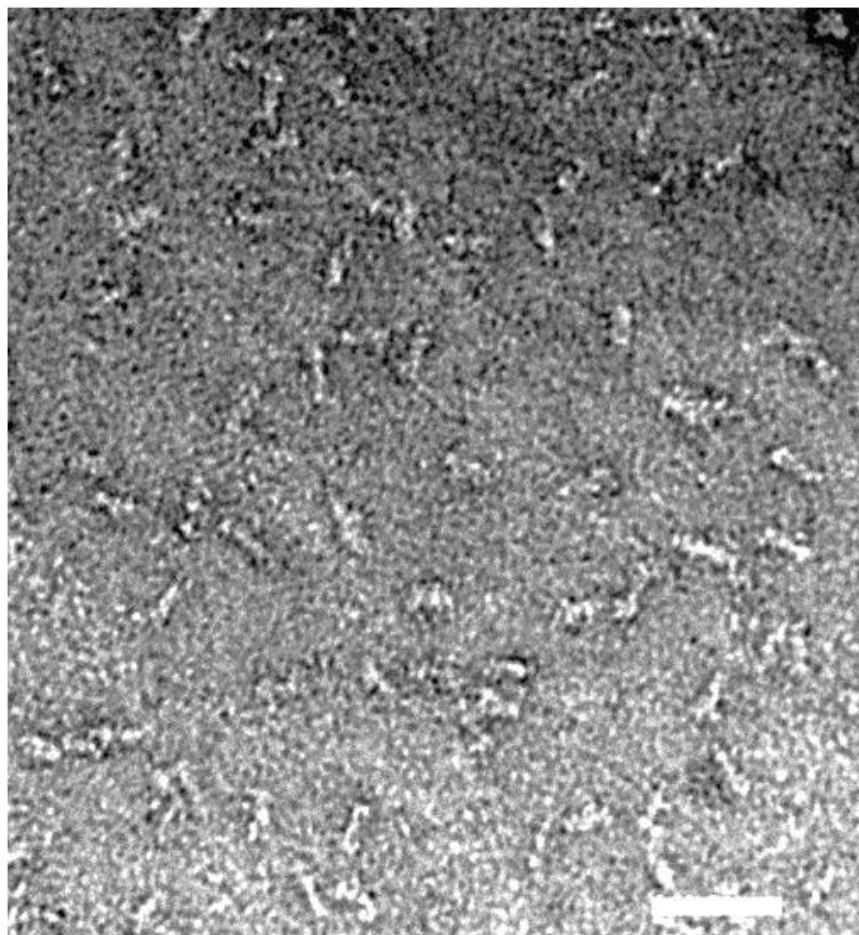


Рисунок 42. Микрофотография негативно контрастированных частиц Nwk^{1-731} на липидном монослое, содержащем 10% $PI(4,5)P_2$ (бар – 50 нм).

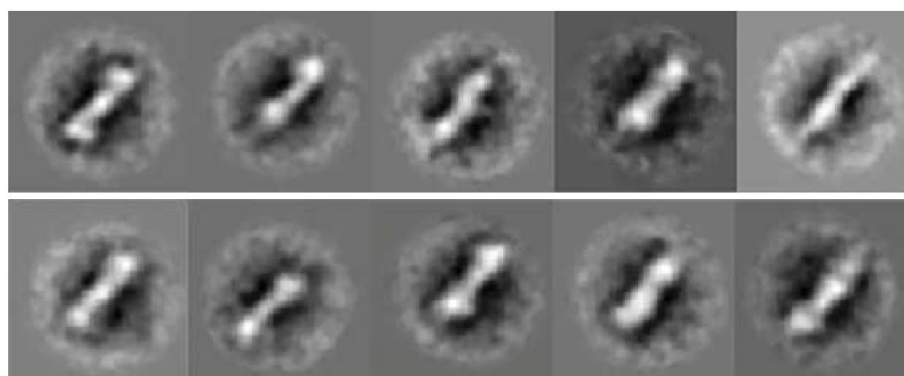


Рисунок 43. Примеры классовых сумм частиц Nwk^{1-731} на липидном монослое, содержащем 10% $PI(4,5)P_2$.

Трёхмерная реконструкция связанного с липидным монослоем Nwk^{1-731} была построена в программе EMAN2 с применением метода случайного конического наклона [185], а затем улучшалась в программе FREALIGN [187]. Разрешение реконструкции также составило около 30 Å (рис. 44).

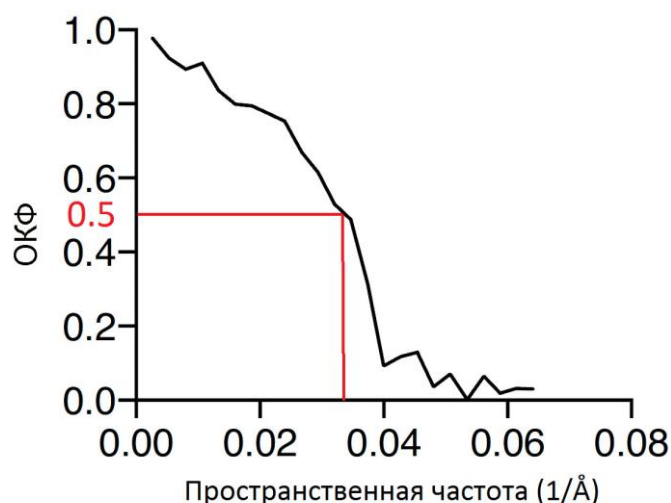


Рисунок 44. Определение разрешения реконструкции Nwk¹⁻⁷³¹ на липидном монослое методом объёмной корреляции Фурье.

Полученная реконструкция имела форму гантели, отличающуюся от формы Nwk на углеродной подложке (рис. 45).

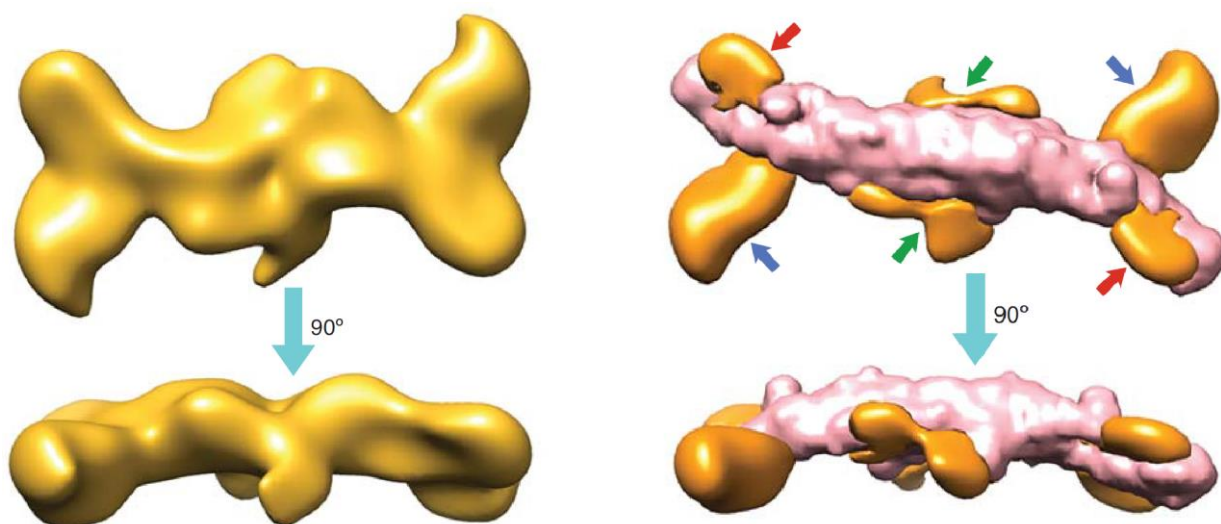


Рисунок 45. Реконструкция полноразмерного Nwk на липидах (слева) и она же со вписанным F-BAR-доменом (справа). Красные стрелки указывают расположение SH3a-доменов, синие SH3b-доменов, зелёные – С-концевой последовательности.

Сравнение со структурой F-BAR-домена показало наличие небольшой дополнительной массы на внутренней поверхности S-образного димера, большей массы на внешней поверхности, а также дополнительной массы рядом с центром F-BAR. Чтобы определить, какая из дополнительных плотностей отвечает каждому из SH3-доменов, мы так же проанализировали фрагменты Nwk, у которых не хватало одного или обоих SH3-доменов. Вычитание классовой суммы Nwk¹⁻⁴²⁸ из Nwk¹⁻⁶³³ показало наличие дополнительной массы на внутренней стороне кривой F-BAR домена (рис. 46, сверху). Вычитание Nwk¹⁻⁶³³ из Nwk¹⁻⁷³¹ выявило дополнительную массу на внешней стороне

кривой F-BAR домена (рис. 46, снизу). Это позволило сделать вывод о том, что небольшая масса на внутренней стороне кривой отвечает SH3a, а большая масса отвечает SH3b и, возможно, линкерной последовательности между ними. При этом SH3-домены не закрывали концы F-BAR, что согласуется с нашими результатами о вовлечённости концевых остатков в связывание мембраны [188].

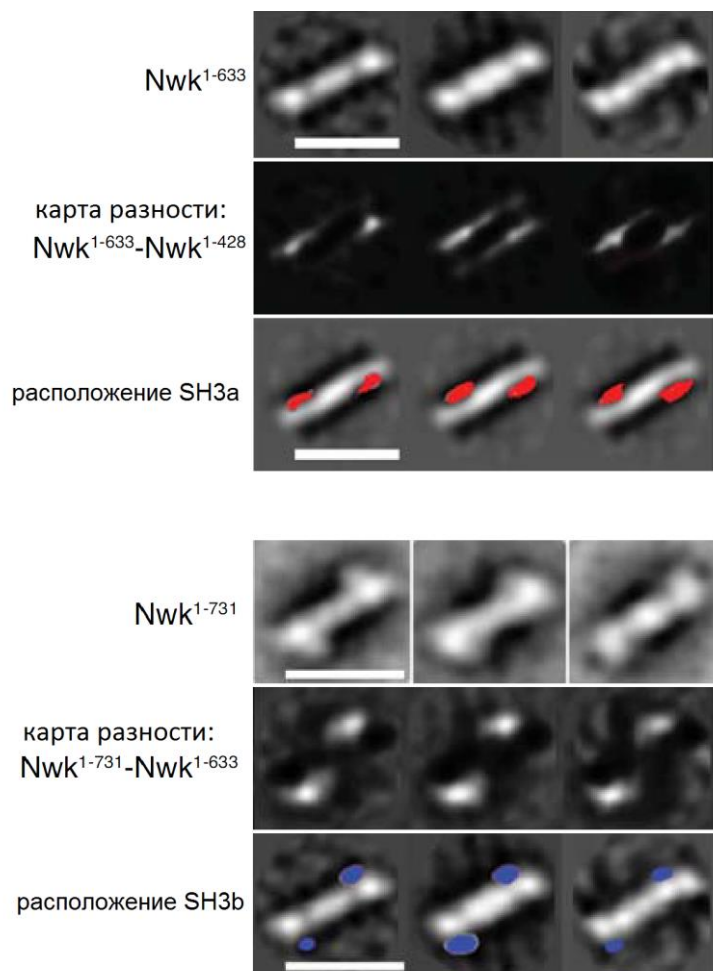


Рисунок 46. Разностная карта, показывающая положение SH3a- (красные) и SH3b- (синие) доменов.

Дополнительная плотность в центральной части реконструкции может соответствовать 115 а.о., С-терминальных по отношению к F-BAR, поскольку эта масса также видна при вычитании Nwk^{1-313} из Nwk^{1-428} (рис. 47, снизу). Данная плотность отсутствовала в структуре Nwk^{1-731} на углеродной подложке и в классовых суммах Nwk^{1-428} на углероде или была иначе ориентирована.

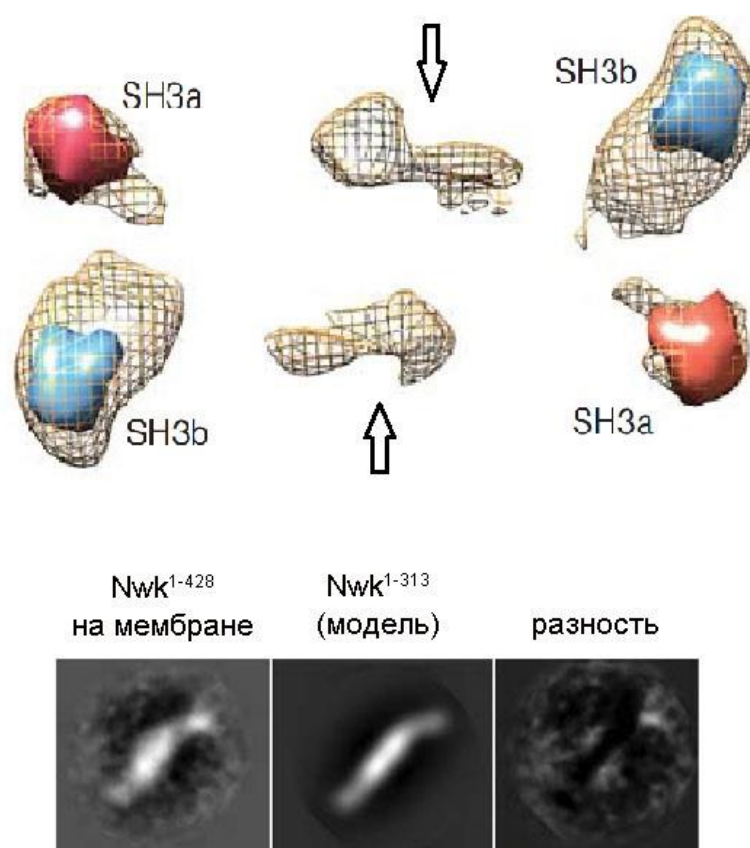


Рисунок 47. Дополнительная плотность в центральной части реконструкции, соответствующая N-концевой последовательности (стрелки) .

Таким образом, при связывании Nwk с мембраной, и С-концевая альфа-спираль и SH3 домены меняют свои позиции относительно F-BAR домена, перемещаясь от вогнутой стороны в положение в латеральной части F-BAR.

Чтобы выяснить, как связывание SH3-доменов с F-BAR-доменом влияет на взаимодействие SH3-доменов с лигандами, сравнивалась способность различных фрагментов Nwk активировать WASp-опосредованную полимеризацию актиновых филаментов (рис. 48). Было показано, что SH3a-домен отдельно (Nwk⁵³⁶⁻⁶⁰¹) и фрагмент F-BAR+SH3a (Nwk¹⁻⁶³³) значительно сильнее активируют WASp, чем фрагмент Nwk¹⁻⁷³¹, содержащий оба SH3-домена. Эти результаты говорят о том, что Nwk активирует WASp за счёт SH3a-домена и последовательности, расположенные к С-концу от SH3a негативно влияют на активацию.

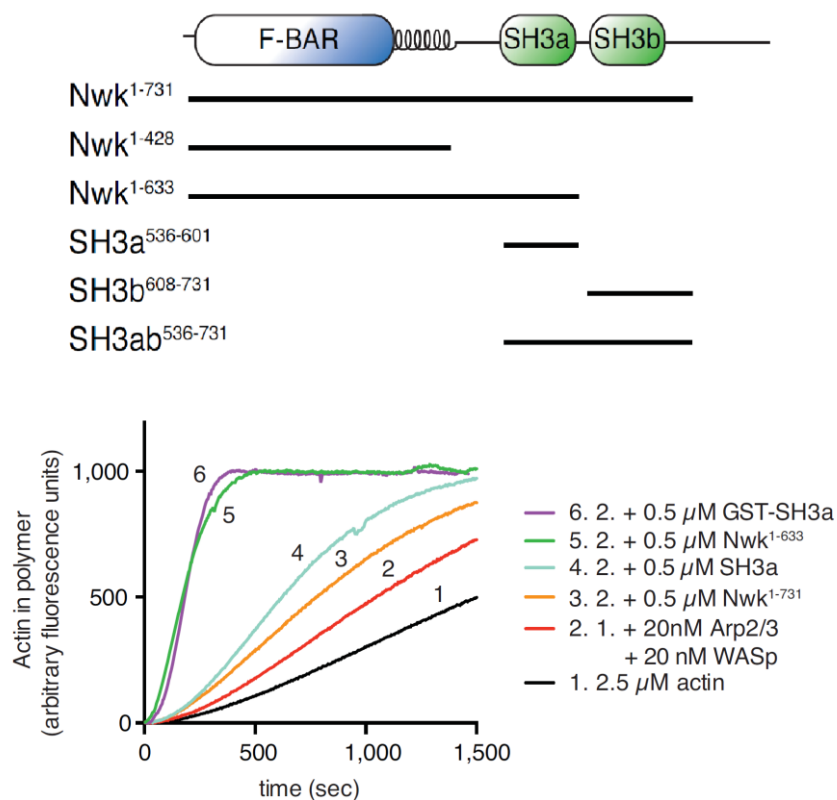


Рисунок 48. Роль SH3-доменов в активации WASp и WASp-зависимой полимеризации актина. Сверху показаны исследованные фрагменты, снизу кривые полимеризации актина².

Результаты данной работы позволяют предложить следующую модель взаимодействия Nwk с мембранами (рис. 49). Полноразмерный белок Nwk в клетке находится в автоингибированном состоянии, обусловленном внутримолекулярными взаимодействиями между F-BAR-доменом и SH3-доменами. В такой конформации снижена способность F-BAR-домена связываться с мембранами, а SH3-домена – с лигандами. При повышенном количестве ФИ(4,5)Ф₂ связывание с мембраной происходит и структура Nwk претерпевает значительные изменения, в ходе которых SH3-домены перемещаются с вогнутой поверхности F-BAR-домена к боковым сторонам. Однако, для полной активации белка необходимо взаимодействие с другими белками-партнёрами, которые ещё предстоит изучить.

² Данные получены в лаборатории др. А. Родал (Университет Брандайс, США).

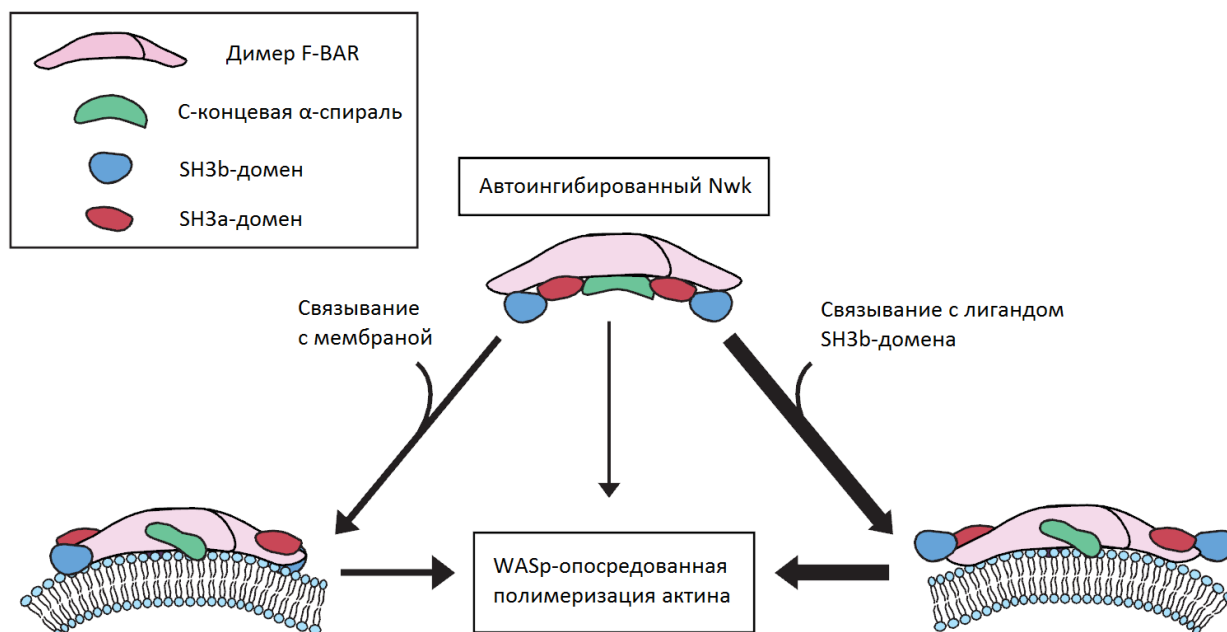


Рисунок 49. Модель взаимодействия Nwk с мембраной. При связывании автоингибированного Nwk с мембраной SH3-домены перемещаются с вогнутой поверхности на боковые стороны. Для полного снятия автоингибирования необходимо взаимодействие с другими белками.

Заключение

В данной работе исследовалось взаимодействие F-BAR-доменного белка Nervous wresk с мембранами, содержащими отрицательно заряженный липид $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$. Большинство F-BAR-доменов при гиперэкспрессии в клетках вызывают образование проникающих внутрь клетки трубочек, но F-BAR-домен Nwk вызывает образование клеточных выступов. Результаты молекулярной динамики указывают на важность центральных участков димера для связывания с $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$. С помощью метода электронной микроскопии было показано, что F-BAR-домены Nwk организуются на мембране особым образом, что является причиной нетипичной активности. В полноразмерном белке активность F-BAR-домена блокируется внутримолекулярным связыванием SH3-доменов. Получение трёхмерных реконструкции показало, как располагаются SH3-домены Nwk в растворе и как изменяется их расположение при связывании с мембраной. На основании полученных результатов была предложена модель активности Nwk, согласно которой связывание автоингибированного белка с мембраной и изменение его конформации является первым шагом к его активации.

Выводы

1. Молекулярная динамика модельных липидных мембран показывает, что увеличение количества $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ приводит к возрастанию упорядоченности липидов. В результате вокруг $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$ формируется микродомен, что может повышать его устойчивость к вертикальному смещению при связывании с белками.
2. Согласно результатам моделирования взаимодействия димеризованного F-BAR-домена Nwk с мембраной, сначала белок связывается с ней концевыми участками (а.о. K179, K181, K183, K196), а затем центральным участком (K46, K60). Вогнутая поверхность димера уплощается, K46 и K60 образуют стабильные солевые мостики с $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$, а концевые участки отделяются от мембраны.
3. Методом электронной микроскопии макромолекул продемонстрировано, что F-BAR-домен белка Nwk формирует зигзагообразные паттерны на поверхности липидной мембраны, содержащей $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$. Это приводит к появлению мембранных гребешков на поверхности липосом и к образованию выступов в клетках S2.
4. Полноразмерный Nwk в растворе автоингибирован SH3-доменами, которые связываются с вогнутой поверхностью F-BAR-домена и препятствуют его взаимодействию с мембраной при отсутствии в ней достаточного количества $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$. При связывании Nwk с мембраной, содержащей повышенную концентрацию $\text{ФИ}(4,5)\text{Ф}_2$, наблюдается значительное конформационное изменение структуры, при котором SH3-домены смещаются на боковую сторону димера.

Благодарности

Выражаю особую благодарность своему научному руководителю, доктору биологических наук Ольге Сергеевне Соколовой за помощь в освоении метода электронной микроскопии и научные консультации на протяжении всего срока обучения в аспирантуре и работы в группе структурной биотехнологии. Также благодарю наших американских соавторов Avital Rodal, Agata Becalska, Charlotte Kelley и Emily Messelaar. Хочу выразить признательность бывшим и нынешним сотрудникам кафедры биоинженерии биологического факультета В.Н. Новоселецкому, О.В. Левцовой, О.И. Волох, М.Г. Карловой, М.Е. Боздагян, А.А. Маслаковой, Г.С. Глухову, Г.А. Армееву, А.Д. Волынцевой за плодотворные дискуссии по теме работы. Я особенно признательна своей семье за оказанную поддержку.

Работа поддержана грантами CRDF (RUB1-7099-MO-13), РФФИ (№14-14-00234) и субсидией Минобрнауки РФ (№ соглашения 14.616.21.0044, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61615X0044).

Список литературы

1. Marsh M. The Structural Era of Endocytosis // *Science* (80-.). 1999. Vol. 285, № 5425. P. 215–220.
2. Lecuit T., Pilot F. Developmental control of cell morphogenesis: a focus on membrane growth // *Nat. Cell Biol.* 2003. Vol. 5, № 2. P. 103–108.
3. McMahon H.T., Gallop J.L. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling // *Nature*. 2005. Vol. 438, № 7068. P. 590–596.
4. Zimmerberg J., Kozlov M.M. How proteins produce cellular membrane curvature // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. Vol. 7, № 1. P. 9–19.
5. Cho W., Stahelin R. V. Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2005. Vol. 34. P. 119–151.
6. Frost A., Unger V.M., De Camilli P. The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules // *Cell*. 2009. Vol. 137, № 2. P. 191–196.
7. Itoh T., De Camilli P. BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. 2006. Vol. 1761, № 8. P. 897–912.
8. Shimada A. et al. Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis // *Cell*. 2007. Vol. 129, № 4. P. 761–772.
9. Liu S. et al. F-BAR family proteins, emerging regulators for cell membrane dynamic changes—from structure to human diseases // *J. Hematol. Oncol.* ???, 2015. Vol. 8, № 1. P. 1–14.
10. Vance J.E., Steenbergen R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. // *Prog. Lipid Res.* 2005. Vol. 44, № 4. P. 207–234.
11. Suetsugu S., Kurisu S., Takenawa T. Dynamic Shaping of Cellular Membranes by Phospholipids and Membrane-Deforming Proteins // *Physiol. Rev.* 2014. Vol. 94, № 4. P. 1219–1248.
12. McLaughlin S. et al. PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2002. Vol. 31. P. 151–175.
13. Rameh L.E., Cantley L.C. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 13. P. 8347–8350.
14. Toner M. et al. Adsorption of cations to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. // *Biochemistry*. 1988. Vol. 27, № 19. P. 7435–7443.
15. van Paridon P. a. et al. Polyphosphoinositides undergo charge neutralization in the physiological pH range: a ³¹P-NMR study // *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* 1986. Vol. 877, № 1. P. 216–219.
16. Berridge M.J., Irvine R.F. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. // *Nature*. 1984. Vol. 312, № 5992. P. 315–321.
17. Ma L. et al. Corequirement of specific phosphoinositides and small GTP-binding protein Cdc42 in inducing actin assembly in *Xenopus* egg extracts // *J. Cell Biol.* 1998. Vol. 140, № 5. P. 1125–1136.

18. Hilpelä P., Vartiainen M.K., Lappalainen P. Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P₂ and PI(3,4,5)P₃. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2004. Vol. 282. P. 117–163.
19. Lemmon M. a, Ferguson K.M. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains // *Biochem. J.* 2000. Vol. 350 Pt 1. P. 1–18.
20. Gillooly D.J., Stenmark H. A lipid oils the endocytosis machine // *Science* (80-.). 2001. Vol. 291. P. 993–994.
21. Martin T.F.. PI(4,5)P₂ regulation of surface membrane traffic // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001. Vol. 13, № 4. P. 493–499.
22. Tsujishita Y. et al. Specificity Determinants in Phosphoinositide Dephosphorylation : Crystal Structure of an Archetypal Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase. 2001. Vol. 105. P. 379–389.
23. Antonny B. Mechanisms of membrane curvature sensing. // *Annu. Rev. Biochem.* 2011. Vol. 80. P. 101–123.
24. Shen H., Pirruccello M., De Camilli P. SnapShot: Membrane Curvature Sensors and Generators // *Cell*. 2012. Vol. 150, № 6. P. 1300, 1300.e1–e2.
25. Hamada K. et al. Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. 2000. Vol. 19, № 17.
26. Tsukita S., Yonemura S. Cortical Actin Organization: Lessons from ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) Proteins // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 49. P. 34507–34510.
27. Chernomordik L. V, Kozlov M.M. Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. Vol. 72. P. 175–207.
28. Di Paolo G., De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics // *Nature*. 2006. Vol. 443, № 7112. P. 651–657.
29. Graham T.R. Flippases and vesicle-mediated protein transport // *Trends Cell Biol.* 2004. Vol. 14, № 12. P. 670–677.
30. Fertuck H.C., Salpeter M.M. Localization of acetylcholine receptor by 125I-labeled alpha-bungarotoxin binding at mouse motor endplates. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1974. Vol. 71, № 4. P. 1376–1378.
31. Aimon S. et al. Membrane Shape Modulates Transmembrane Protein Distribution // *Dev. Cell*. Elsevier Inc., 2014. Vol. 28, № 2. P. 212–218.
32. Fribourg P.F. et al. 3D cryo-electron reconstruction of BmrA, a bacterial multidrug ABC transporter in an inward-facing conformation and in a lipidic environment. // *J. Mol. Biol.* 2014. Vol. 426, № 10. P. 2059–2069.
33. MacKinnon R. Potassium channels // *FEBS Lett.* 2003. Vol. 555, № 1. P. 62–65.
34. Unwin N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution // *J Mol Biol.* 2005. Vol. 346, № 4. P. 967–989.
35. McMahon H.T., Boucrot E. Membrane curvature at a glance // *J. Cell Sci.* 2015. Vol. 128, № 6. P. 1065–1070.
36. Campelo F., McMahon H.T., Kozlov M.M. The Hydrophobic Insertion Mechanism of Membrane Curvature Generation by Proteins // *Biophys. J. Elsevier*, 2008. Vol. 95, № 5. P. 2325–2339.

37. McMahon H.T., Kozlov M.M., Martens S. Membrane Curvature in Synaptic Vesicle Fusion and Beyond // *Cell*. 2010. Vol. 140, № 5. P. 601–605.
38. Zemel A., Ben-Shaul A., May S. Modulation of the spontaneous curvature and bending rigidity of lipid membranes by interfacially adsorbed amphipathic peptides // *J. Phys. Chem. B*. 2008. Vol. 112, № 23. P. 6988–6996.
39. Kirchhausen T. Three ways to make a vesicle. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000. Vol. 1, № 3. P. 187–198.
40. Sakamuro D. et al. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. // *Nat. Genet.* 1996. Vol. 14, № 1. P. 69–77.
41. Consortium T.U., The UniProt Consortium, Consortium T.U. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41, № Database issue. P. D43–D47.
42. Berman H.M. et al. The Protein Data Bank. // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, № 1. P. 235–242.
43. Peter B.J. et al. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. // *Science*. 2004. Vol. 303, № 5657. P. 495–499.
44. Kessels M.M., Qualmann B. Different functional modes of BAR domain proteins in formation and plasticity of mammalian postsynapses // *J. Cell Sci.* 2015. P. 1–9.
45. David C. et al. A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. Vol. 93, № 1. P. 331–335.
46. Lee E. et al. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. // *Science*. 2002. Vol. 297, № 5584. P. 1193–1196.
47. Razzaq A. et al. Amphiphysin is necessary for organization of the excitation–contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila* // *Genes Dev.* 2001. Vol. 15. P. 2967–2979.
48. Nicot A.S. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy // *Nat Genet.* 2007.
49. Takei K. et al. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. // *Nat. Cell Biol.* 1999. Vol. 1, № 1. P. 33–39.
50. Tarricone C. et al. The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between Rac and Arf signalling pathways. // *Nature*. 2001. Vol. 411, № 6834. P. 215–219.
51. Weissenhorn W. Crystal structure of the endophilin-A1 BAR domain // *J. Mol. Biol.* 2005. Vol. 351, № 3. P. 653–661.
52. Ringstad N. et al. Endophilin/sh3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis // *Neuron*. 1999. Vol. 24, № 1. P. 143–154.
53. Guichet A. et al. Essential role of endophilin A in synaptic vesicle budding at the *Drosophila* neuromuscular junction. // *EMBO J.* 2002. Vol. 21, № 7. P. 1661–1672.
54. Schmidt A. et al. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. // *Nature*. 1999. Vol. 401, № 6749. P. 133–141.
55. Swain a L., Kretsinger R.H., Amma E.L. Restrained least squares refinement of native

- (calcium) and cadmium-substituted carp parvalbumin using X-ray crystallographic data at 1.6-Å resolution. // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264, № 28. P. 16620–16628.
56. Chen Y. et al. Formation of an endophilin-Ca²⁺ channel complex is critical for clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. // *Cell*. 2003. Vol. 115. P. 37–48.
 57. Yamagishi A. et al. A Novel Actin Bundling/Filopodium-forming Domain Conserved in Insulin Receptor Tyrosine Kinase Substrate p53 and Missing in Metastasis Protein // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 15. P. 14929–14936.
 58. Mattila P.K. et al. Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P₂-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism // *The Journal of cell biology*. 2007. Vol. 176, № 7. P. 953–964.
 59. Saarikangas J. et al. Molecular mechanisms of membrane deformation by I-BAR domain proteins // *Curr. Biol.* 2009. Vol. 19, № 2. P. 95–107.
 60. Funato Y. et al. IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness. // *Cancer Res.* 2004. Vol. 64, № 15. P. 5237–5244.
 61. Kim M.-H. et al. Enhanced NMDA receptor-mediated synaptic transmission, enhanced long-term potentiation, and impaired learning and memory in mice lacking IRSp53. // *J. Neurosci.* 2009. Vol. 29, № 5. P. 1586–1595.
 62. Krugmann S. et al. Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex // *Curr. Biol.* 2001. Vol. 11, № 21. P. 1645–1655.
 63. Scita G. et al. IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions // *Trends Cell Biol.* 2008. Vol. 18, № January. P. 52–60.
 64. Robens J.M. et al. Regulation of IRSp53-dependent filopodial dynamics by antagonism between 14-3-3 binding and SH3-mediated localization. // *Mol. Cell. Biol.* 2010. Vol. 30, № 3. P. 829–844.
 65. Millard T.H., Dawson J., Machesky L.M. Characterisation of IRTKS, a novel IRSp53/MIM family actin regulator with distinct filament bundling properties. // *J. Cell Sci.* 2007. Vol. 120, № Pt 9. P. 1663–1672.
 66. Lee Y.-G. et al. MIM, a potential metastasis suppressor gene in bladder cancer // *Neoplasia*. 2002. Vol. 4, № 4. P. 291–294.
 67. Machesky L.M., Johnston S. a. MIM: a multifunctional scaffold protein. // *J. Mol. Med. (Berl)*. 2007. Vol. 85, № 6. P. 569–576.
 68. Woodings J. a, Sharp S.J., Machesky L.M. MIM-B, a putative metastasis suppressor protein, binds to actin and to protein tyrosine phosphatase delta. // *Biochem. J.* 2003. Vol. 371, № Pt 2. P. 463–471.
 69. Wang Y. et al. Tyrosine phosphorylation of missing in metastasis protein is implicated in platelet-derived growth factor-mediated cell shape changes // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282, № 10. P. 7624–7631.
 70. Bershteyn M. et al. MIM and cortactin antagonism regulates ciliogenesis and hedgehog signaling // *Dev. Cell*. 2010. Vol. 19, № 2. P. 270–283.
 71. Saarikangas J. et al. ABBA regulates plasma-membrane and actin dynamics to promote radial glia extension. // *J. Cell Sci.* 2008. Vol. 121. P. 1444–1454.
 72. Suetsugu S. et al. The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53

- induces RAC-dependent membrane deformation // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 46. P. 35347–35358.
73. Millard T.H. et al. Structural basis of filopodia formation induced by the IRSp53/MIM homology domain of human IRSp53. // *The EMBO journal*. 2005. Vol. 24, № 2. P. 240–250.
 74. Lee S.H. et al. Structural basis for the actin-binding function of missing-in-metastasis. // *Structure* (London, England : 1993). 2007. Vol. 15, № 2. P. 145–155.
 75. Pykäläinen A. et al. Pinkbar is an epithelial-specific BAR domain protein that generates planar membrane structures. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* Nature Publishing Group, 2011. Vol. 18, № 8. P. 902–907.
 76. Aspenström P. A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton. // *Curr. Biol.* 1997. Vol. 7, № 7. P. 479–487.
 77. Heath R.J.W., Insall R.H. F-BAR domains: multifunctional regulators of membrane curvature. // *J. Cell Sci.* 2008. Vol. 121, № Pt 12. P. 1951–1954.
 78. Liu S. et al. F-BAR family proteins, emerging regulators for cell membrane dynamic changes—from structure to human diseases // *J. Hematol. Oncol.* 2015. Vol. 8.
 79. Feng Y. et al. The Cdc42-interacting protein-4 (CIP4) gene knock-out mouse reveals delayed and decreased endocytosis // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285, № 7. P. 4348–4354.
 80. Kamioka Y. et al. A novel dynamin-associating molecule, formin-binding protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 38. P. 40091–40099.
 81. Bu W. et al. The Toca-1-N-WASP complex links filopodial formation to endocytosis. // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, № 17. P. 11622–11636.
 82. Itoh T. et al. Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins // *Dev. Cell.* 2005. Vol. 9, № 6. P. 791–804.
 83. Tsujita K. et al. Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis // *J. Cell Biol.* 2006. Vol. 172, № 2. P. 269–279.
 84. Henne W.M. et al. Structure and analysis of FCHo2 F-BAR domain: a dimerizing and membrane recruitment module that effects membrane curvature // *Structure*. 2007. Vol. 15, № 7. P. 839–852.
 85. Henne W.M. et al. FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. // *Science*. 2010. Vol. 328, № 5983. P. 1281–1284.
 86. Ma Y. et al. The Inverse F-BAR Domain Protein srGAP2 Acts through srGAP3 to Modulate Neuronal Differentiation and Neurite Outgrowth of Mouse Neuroblastoma Cells // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 3. P. e57865.
 87. Vogt D.L. et al. ARHGAP4 is a novel RhoGAP that mediates inhibition of cell motility and axon outgrowth. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2007. Vol. 36, № 3. P. 332–342.
 88. Soderling S.H. et al. The WRP component of the WAVE-1 complex attenuates Rac-mediated signalling. // *Nat. Cell Biol.* 2002. Vol. 4, № 12. P. 970–975.
 89. Guerrier S. et al. The F-BAR Domain of srGAP2 Induces Membrane Protrusions

- Required for Neuronal Migration and Morphogenesis // *Cell*. 2009. Vol. 138, № 5. P. 990–1004.
90. Qualmann B., Kelly R.B. Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization // *J. Cell Biol.* 2000. Vol. 148, № 5. P. 1047–1061.
 91. Badour K. et al. The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse // *Immunity*. 2003. Vol. 18, № 1. P. 141–154.
 92. Spencer S. et al. PSTPIP: a tyrosine phosphorylated cleavage furrow-associated protein that is a substrate for a PEST tyrosine phosphatase. // *J. Cell Biol.* 1997. Vol. 138, № 4. P. 845–860.
 93. Carnahan R.H., Gould K.L. The PCH family protein, CDc15p, recruits two F-actin nucleation pathways to coordinate cytokinetic actin ring formation in *Schizosaccharomyces pombe* // *J. Cell Biol.* 2003. Vol. 162, № 5. P. 851–862.
 94. Chitu V. et al. The PCH family member MAYP/PSTPIP2 directly regulates F-actin bundling and enhances filopodia formation and motility in macrophages // *Mol. Biol. Cell*. 2005. Vol. 16, № 6. P. 2947–2959.
 95. Tsujita K. et al. Antagonistic regulation of F-BAR protein assemblies controls actin polymerization during podosome formation. // *J. Cell Sci.* 2013. Vol. 126, № Pt 10. P. 2267–2278.
 96. Itoh T. et al. The tyrosine kinase Fer is a downstream target of the PLD-PA pathway that regulates cell migration. // *Sci. Signal*. 2009. Vol. 2, № 87. P. ra52.
 97. Icking A. et al. NOSTRIN functions as a homotrimeric adaptor protein facilitating internalization of eNOS. // *J. Cell Sci.* 2005. Vol. 118, № Pt 21. P. 5059–5069.
 98. Schilling K. et al. Translocation of Endothelial Nitric-Oxide Synthase Involves a Ternary Complex with Caveolin-1 and NOSTRIN // *Mol. Biol. Cell*. 2006. Vol. 17, № 2. P. 3870–3880.
 99. She B.-R., Liou G.-G., Lin-Chao S. Association of the growth-arrest-specific protein Gas7 with F-actin induces reorganization of microfilaments and promotes membrane outgrowth. // *Exp. Cell Res.* 2002. Vol. 273, № 1. P. 34–44.
 100. Dent E.W. et al. Filopodia are required for cortical neurite initiation. // *Nat. Cell Biol.* 2007. Vol. 9, № 12. P. 1347–1359.
 101. Tanaka E., Sabry J. Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. // *Cell*. 1995. Vol. 83, № 2. P. 171–176.
 102. Machesky L.M. Lamellipodia and filopodia in metastasis and invasion. // *FEBS Lett.* 2008. Vol. 582, № 14. P. 2102–2111.
 103. Wang Q. et al. Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pacsin/Syndapin. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009. Vol. 106, № 31. 12700–12705 p.
 104. Zhao H. et al. Membrane-Sculpting BAR Domains Generate Stable Lipid Microdomains // *Cell Rep*. 2013. Vol. 4, № 6. P. 1213–1223.
 105. Roumanie O. et al. Evidence for the genetic interaction between the actin-binding protein Vrp1 and the RhoGAP Rgd1 mediated through Rho3p and Rho4p in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Microbiol.* 2000. Vol. 36, № 6. P. 1403–1414.

106. Moravcevic K. et al. Comparison of *S. cerevisiae* F-BAR domain structures reveals a conserved inositol phosphate binding site // *Structure*. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 23, № 2. P. 352–363.
107. Oh Y. et al. Targeting and functional mechanisms of the cytokinesis-related F-BAR protein Hof1 during the cell cycle. // *Mol. Biol. Cell*. 2013. Vol. 24, № 9. P. 1305–1320.
108. Aresta S. et al. A novel Rho GTPase-activating-protein interacts with Gem, a member of the Ras superfamily of GTPases. // *Biochem. J*. 2002. Vol. 367, № Pt 1. P. 57–65.
109. Andrieu G. et al. Gem GTPase acts upstream Gmip/RhoA to regulate cortical actin remodeling and spindle positioning during early mitosis. // *Carcinogenesis*. 2014. Vol. 35, № 11. P. 2503–2511.
110. Ota H. et al. Speed control for neuronal migration in the postnatal brain by Gmip-mediated local inactivation of RhoA. // *Nat. Commun*. 2014. Vol. 5, № May. P. 4532.
111. Tanaka-Takiguchi Y. et al. Physicochemical analysis from real-time imaging of liposome tubulation reveals the characteristics of individual f-bar domain proteins // *Langmuir*. 2013. Vol. 29, № 1. P. 328–336.
112. Isas J.M. et al. Tubulation by Amphiphysin Requires Concentration-Dependent Switching from Wedging to Scaffolding // *Structure*. 2015. Vol. 23, № 5. P. 873–881.
113. Boucrot E. et al. Membrane fission is promoted by insertion of amphipathic helices and is restricted by crescent BAR domains // *Cell*. 2012. Vol. 149, № 1. P. 124–136.
114. Ramesh P. et al. FBAR syndapin 1 recognizes and stabilizes highly curved tubular membranes in a concentration dependent manner. // *Sci. Rep*. 2013. Vol. 3. P. 1565.
115. Prévost C. et al. IRSp53 senses negative membrane curvature and phase separates along membrane tubules // *Nat. Commun*. 2015. Vol. 6. P. 8529.
116. Simunovic M., Srivastava A., Voth G. a. Linear aggregation of proteins on the membrane as a prelude to membrane remodeling // *Proc.* 2013. Vol. 110, № 51. P. 20396–20401.
117. Shi Z., Baumgart T. Membrane tension and peripheral protein density mediate membrane shape transitions. // *Nat. Commun*. 2015. Vol. 6. P. 5974.
118. Zhao H., Pykäläinen A., Lappalainen P. I-BAR domain proteins: linking actin and plasma membrane dynamics // *Curr. Opin. Cell Biol*. 2011. Vol. 23, № 1. P. 14–21.
119. Mim C. et al. Structural basis of membrane bending by the N-BAR protein endophilin. // *Cell*. Elsevier Inc., 2012. Vol. 149, № 1. P. 137–145.
120. Adam J., Basnet N., Mizuno N. Structural insights into the cooperative remodeling of membranes by amphiphysin/BIN1 // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 5. P. 15452.
121. Frost A. et al. Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains // *Cell*. 2008. Vol. 132, № 5. P. 807–817.
122. Ringstad N., Nemoto Y., De Camilli P. The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1997. Vol. 94, № 16. P. 8569–8574.
123. Ambroso M.R., Hegde B.G., Langen R. Endophilin A1 induces different membrane shapes using a conformational switch that is regulated by phosphorylation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2014. Vol. 111, № 19. P. 6982–6987.

124. Matta S. et al. LRRK2 controls an EndoA phosphorylation cycle in synaptic endocytosis. // *Neuron*. 2012. Vol. 75, № 6. P. 1008–1021.
125. Faelber K. et al. Crystal structure of nucleotide-free dynamin. // *Nature*. 2011. Vol. 477, № 7366. P. 556–560.
126. McDonald N.A. et al. Oligomerization but Not Membrane Bending Underlies the Function of Certain F-BAR Proteins in Article Oligomerization but Not Membrane Bending Underlies the Function of Certain F-BAR Proteins in Cell Motility and Cytokinesis // *Dev. Cell*. Elsevier Inc., 2015. Vol. 35, № 6. P. 725–736.
127. Traub L.M. F-BAR/EFC Domain Proteins: Some Assembly Required // *Dev. Cell*. Elsevier Inc., 2015. Vol. 35, № 6. P. 664–666.
128. Vázquez F.X., Unger V.M., Voth G. a. Autoinhibition of endophilin in solution via interdomain interactions // *Biophys. J.* 2013. Vol. 104, № 2. P. 396–403.
129. Rocca D.L. et al. Inhibition of Arp2/3-mediated actin polymerization by PICK1 regulates neuronal morphology and AMPA receptor endocytosis. // *Nat. Cell Biol.* 2008. Vol. 10, № 3. P. 259–271.
130. Cao M. et al. PICK1-ICA69 heteromeric BAR domain complex regulates synaptic targeting and surface expression of AMPA receptors. // *J. Neurosci.* 2007. Vol. 27, № 47. P. 12945–12956.
131. Sadowski L., Pilecka I., Miaczynska M. Signaling from endosomes: Location makes a difference // *Exp. Cell Res.* 2009. Vol. 315, № 9. P. 1601–1609.
132. Collins C. a., DiAntonio A. Synaptic development: insights from *Drosophila* // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2007. Vol. 17, № 1. P. 35–42.
133. Dickman D.K. et al. Altered synaptic development and active zone spacing in endocytosis mutants. // *Curr. Biol.* 2006. Vol. 16, № 6. P. 591–598.
134. Khodosh R. et al. Bchs, a BEACH domain protein, antagonizes Rab11 in synapse morphogenesis and other developmental events. // *Development*. 2006. Vol. 133, № 23. P. 4655–4665.
135. Wang X. et al. *Drosophila* spichthyn inhibits BMP signaling and regulates synaptic growth and axonal microtubules. // *Nat. Neurosci.* 2007. Vol. 10, № 2. P. 177–185.
136. Cao H. et al. FCHSD1 and FCHSD2 Are Expressed in Hair Cell Stereocilia and Cuticular Plate and Regulate Actin Polymerization In Vitro // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 2. P. 1–11.
137. Sun X. et al. Transcription factor Sp4 regulates expression of nervous wreck 2 to control NMDAR1 levels and dendrite patterning. // *Dev. Neurobiol.* 2015. Vol. 75, № 1. P. 93–108.
138. Kelley C.F. et al. Assembly of actin filaments and microtubules in Nwk F-BAR-induced membrane deformations // *Commun. Integr. Biol.* 2015. Vol. 8, № 2. P. e1000703.
139. Rodal A. a. et al. A presynaptic endosomal trafficking pathway controls synaptic growth signaling // *J. Cell Biol.* 2011. Vol. 193, № 1. P. 201–217.
140. Rodal A. a, Motola-Barnes R.N., Littleton J.T. Nervous wreck and Cdc42 cooperate to regulate endocytic actin assembly during synaptic growth. // *J. Neurosci.* 2008. Vol. 28, № 33. P. 8316–8325.

141. Kaksonen M., Toret C.P., Drubin D.G. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. Vol. 7, № 6. P. 404–414.
142. Tomasevic N. et al. Differential regulation of WASP and N-WASP by Cdc42, Rac1, Nck, and PI(4,5)P2 // *Biochemistry*. 2007. Vol. 46, № 11. P. 3494–3502.
143. Alder B.J., Wainwright T.E. Phase Transition for a Hard Sphere System // *J. Chem. Phys.* 1957. Vol. 27, № 5. P. 1208.
144. Lifson S. Consistent Force Field for Calculations of Conformations, Vibrational Spectra, and Enthalpies of Cycloalkane and n-Alkane Molecules // *J. Chem. Phys.* 1968. Vol. 49, № 11. P. 5116.
145. Levitt M., Lifson S. Refinement of protein conformations using a macromolecular energy minimization procedure // *J. Mol. Biol.* 1969. Vol. 46, № 2. P. 269–279.
146. Van Der Spoel D., Seibert M.M. Protein folding kinetics and thermodynamics from atomistic simulations // *Phys. Rev. Lett.* 2006. Vol. 96, № 23. P. 1–4.
147. Chong L.T. et al. Molecular dynamics and free-energy calculations applied to affinity maturation in antibody 48g7 // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. Vol. 96, № 25. P. 14330–14335.
148. Nury H. et al. One-microsecond molecular dynamics simulation of channel gating in a nicotinic receptor homologue. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. Vol. 107, № 14. P. 6275–6280.
149. Brooks B.R. et al. CHARMM: the biomolecular simulation program. // *J. Comput. Chem.* 2009. Vol. 30, № 10. P. 1545–1614.
150. Christen M. et al. The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05 // *J. Comput. Chem.* 2005. Vol. 26. P. 1719–1751.
151. Case D.A. et al. The Amber biomolecular simulation programs. // *J. Comput. Chem.* 2005. Vol. 26, № 16. P. 1668–1688.
152. Phillips J.C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD // *J. Comput. Chem.* 2005. Vol. 26, № 16. P. 1781–1802.
153. Pronk S. et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit // *Bioinformatics*. 2013. Vol. 29, № 7. P. 845–854.
154. van Gunsteren W.F., Berendsen H.J.C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry // *Angew. Chemie Int. Ed. English*. 1990. Vol. 29, № 9. P. 992–1023.
155. Fraaije J.G.E.M. Dynamic density functional theory for microphase separation kinetics of block copolymer melts // *J. Chem. Phys.* 1993. Vol. 99, № 11. P. 9202.
156. Bartesaghi A. et al. 2.2 Å resolution cryo-EM structure of β -galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor. // *Science*. 2015. Vol. 348, № 6239. P. 1147–1151.
157. De Rosier D.J., Klug a. Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs // *Nature*. 1968. Vol. 217. P. 130–134.
158. Dubochet J. et al. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. // *Q. Rev. Biophys.* 1988. Vol. 21, № 2. P. 129–228.
159. Thuman-Commike P. a., Chiu W. Reconstruction principles of icosahedral virus structure determination using electron cryomicroscopy // *Micron*. 2000. Vol. 31, № 6. P. 687–711.

160. Radermacher M. et al. Three-dimensional structure of the large ribosomal subunit from *Escherichia coli* // *EMBO J.* 1987. Vol. 6, № 4. P. 1107–1114.
161. Orlova E. V, Saibil H.R. Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy. // *Chem. Rev.* 2011. Vol. 111, № 12. P. 7710–7748.
162. Radon J. On the determination of functions from their integrals along certain manifolds // *Berichte über die Verhandlungen der Sächsischen Akad. der Wissenschaften.* 1917. Vol. 69. P. 262–277.
163. Van Heel M. Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction. // *Ultramicroscopy.* 1987. Vol. 21, № 2. P. 111–123.
164. Crowther R.A. Procedures for Three-Dimensional Reconstruction of Spherical Viruses by Fourier Synthesis from Electron Micrographs // *Philos. Trans. R. Soc. London B.* 1971. Vol. 261, № 837. P. 221–230.
165. van Heel M. et al. A new generation of the IMAGIC image processing system. // *J. Struct. Biol.* 1996. Vol. 116, № 1. P. 17–24.
166. Frank J. Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies // *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies.* 1996. 54-125 p.
167. Saxton W.O., Baumeister W. The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein. // *J. Microsc.* 1982. Vol. 127, № Pt 2. P. 127–138.
168. Rosenthal P.B., Henderson R. Optimal Determination of Particle Orientation, Absolute Hand, and Contrast Loss in Single-particle Electron Cryomicroscopy // *J. Mol. Biol.* 2003. Vol. 333, № 4. P. 721–745.
169. Van Heel M., Schatz M. Fourier shell correlation threshold criteria // *J. Struct. Biol.* 2005. Vol. 151. P. 250–262.
170. Oostenbrink C. et al. Validation of the 53A6 GROMOS force field // *Eur. Biophys. J.* 2005. Vol. 34. P. 273–284.
171. Marrink S.J. et al. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations // *J. Phys. Chem. B.* 2007. Vol. 111, № 27. P. 7812–7824.
172. Holdbrook D.A. et al. Stability and membrane orientation of the fukutin transmembrane domain: a combined multiscale molecular dynamics and circular dichroism study // *Biochemistry.* 2010. Vol. 49, № 51. P. 10796–10802.
173. Rother K. Introduction to PyMOL // *Methods Mol. Biol. Clift. Nj.* 2005. Vol. 635, № 8. P. 0–32.
174. Kukol A. Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins // *J. Chem. Theory Comput.* 2009. Vol. 5, № 3. P. 615–626.
175. Chandrasekhar I. et al. A consistent potential energy parameter set for lipids: dipalmitoylphosphatidylcholine as a benchmark of the GROMOS96 45A3 force field // *Eur. Biophys. J.* 2003. Vol. 32, № 1. P. 67–77.
176. Piggot T.J., Piñeiro Á., Khalid S. Molecular Dynamics Simulations of Phosphatidylcholine Membranes: A Comparative Force Field Study // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. Vol. 8, № 11. P. 4593–4609.
177. Marrink S.J., de Vries A.H., Mark A.E. Coarse Grained Model for Semiquantitative Lipid Simulations // *J. Phys. Chem. B.* 2004. Vol. 108, № 2. P. 750–760.

178. Lo C.A. et al. Martini Coarse-Grained Force Field : Extension to Carbohydrates. 2009. P. 3195–3210.
179. Levtsova O. V et al. A molecular dynamics study of the interaction between domain I-BAR of the IRSp53 protein and negatively charged membranes // *Biophysics (Oxf)*. 2011. Vol. 56. P. 220–224.
180. Yesylevskyy S.O. et al. Polarizable water model for the coarse-grained MARTINI force field // *PLoS Comput. Biol.* 2010. Vol. 6, № 6. P. e1000810.
181. Kelley L.A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis // *Nat. Protoc.* 2015. Vol. 10, № 6. P. 845–858.
182. Martínez L. et al. Packmol: A Package for Building Initial Configurations for Molecular Dynamics Simulations // *J. Comput. Chem.* 2009. Vol. 30, № 13. P. 2157–2164.
183. Воеводин В.В. et al. Практика суперкомпьютера “Ломоносов” // *Открытые системы. СУБД*. 2012. Vol. 7. P. 36–39.
184. Taylor D.W. et al. On the freezing and identification of lipid monolayer 2-D arrays for cryoelectron microscopy // *J. Struct. Biol.* 2007. Vol. 160, № 3. P. 305–312.
185. Tang G. et al. EMAN2: An extensible image processing suite for electron microscopy // *J. Struct. Biol.* 2007. Vol. 157, № 1. P. 38–46.
186. Ludtke S.J., Baldwin P.R., Chiu W. EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. // *J. Struct. Biol.* 1999. Vol. 128, № 1. P. 82–97.
187. Grigorieff N. FREALIGN: high-resolution refinement of single particle structures. // *J. Struct. Biol.* 2007. Vol. 157, № 1. P. 117–125.
188. Becalska A.N. et al. Formation of membrane ridges and scallops by the F-BAR protein Nervous Wreck // *Mol. Biol. Cell.* 2013. Vol. 24, № 15. P. 2406–2418.
189. Kelley C.F. et al. Membrane Charge Directs the Outcome of F-BAR Domain Lipid Binding and Autoregulation // *CellReports*. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 13, № 11. P. 1–13.
190. Pettersen E.F. et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem.* 2004. Vol. 25, № 13. P. 1605–1612.
191. Kucerka N. et al. Lipid bilayer structure determined by the simultaneous analysis of neutron and X-ray scattering data // *Biophys. J.* 2008. Vol. 95, № 5. P. 2356–2367.
192. Kučerka N., Nieh M.-P., Katsaras J. Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature // *Biochim. Biophys. Acta*. 2011. Vol. 1808, № 11. P. 2761–2771.
193. Petrache H.I., Dodd S.W., Brown M.F. Phosphatidylcholines Determined by 2 H NMR Spectroscopy. 2000. Vol. 79, № September. P. 3172–3192.
194. Nagle J.F. Structure of lipid bilayers. 2009. Vol. 1469, № 3. P. 159–195.
195. Kucerka N., Tristram-Nagle S., Nagle J.F. Closer look at structure of fully hydrated fluid phase DPPC bilayers // *Biophys. J.* 2006. Vol. 90, № 11. P. L83–L85.
196. Sheats J.R., McConnell H.M. A photochemical technique for measuring lateral diffusion of spin-labeled phospholipids in membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1978. Vol. 75, № 10. P. 4661–4663.
197. Douliez J.P., Léonard A., Dufourc E.J. Restatement of order parameters in biomembranes:

- calculation of C-C bond order parameters from C-D quadrupolar splittings // *Biophys. J.* 1995. Vol. 68, № 5. P. 1727–1739.
198. Stanishneva-Konovalova T.B., Sokolova O.S. Molecular dynamics simulations of negatively charged DPPC/DPPI lipid bilayers at two levels of resolution // *Comput. Theor. Chem. Elsevier B.V.*, 2015. Vol. 1058. P. 61–66.
 199. Lupyan D. et al. A molecular dynamics investigation of lipid bilayer perturbation by PIP2 // *Biophys. J. Biophysical Society*, 2010. Vol. 98, № 2. P. 240–247.
 200. Hofsäss C., Lindahl E., Edholm O. Molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers with cholesterol // *Biophys. J.* 2003. Vol. 84, № 4. P. 2192–2206.
 201. Jurkiewicz P. et al. Structure, dynamics, and hydration of POPC/POPS bilayers suspended in NaCl, KCl, and CsCl solutions // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. Vol. 1818, № 3. P. 609–616.
 202. Gurtovenko A.A. Asymmetry of lipid bilayers induced by monovalent salt: atomistic molecular-dynamics study // *J. Chem. Phys.* 2005. Vol. 122, № 24. P. 244902.
 203. Leontidis E., Aroiti A. Liquid Expanded Monolayers of Lipids As Model Systems to Understand the Anionic Hofmeister Series: 2. Ion Partitioning Is Mostly a Matter of Size // *J. Phys. Chem. B.* 2009. Vol. 113, № 5. P. 1460–1467.
 204. Broemstrup T., Reuter N. Molecular dynamics simulations of mixed acidic/zwitterionic phospholipid bilayers // *Biophys. J. Biophysical Society*, 2010. Vol. 99, № 3. P. 825–833.
 205. Kantari C. et al. Proteinase 3, the Wegener autoantigen, is externalized during neutrophil apoptosis: evidence for a functional association with phospholipid scramblase 1 and interference with macrophage phagocytosis // *Blood.* 2007. Vol. 110, № 12. P. 4086–4095.
 206. McLaughlin S., Murray D. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics // *Nature.* 2005. Vol. 438, № 7068. P. 605–611.
 207. Kumar S., Nussinov R. Close-range electrostatic interactions in proteins // *ChemBioChem.* 2002. Vol. 3, № 7. P. 604–617.
 208. Cherbas L. et al. The transcriptional diversity of 25 Drosophila cell lines. // *Genome Res.* 2011. Vol. 21, № 2. P. 301–314.
 209. Rao Y. et al. Molecular basis for SH3 domain regulation of F-BAR-mediated membrane deformation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. Vol. 107, № 18. P. 8213–8218.
 210. Ruiz-Herrero T., Hagan M.F. Simulations Show that Virus Assembly and Budding Are Facilitated by Membrane Microdomains. // *Biophys. J.* 2015. Vol. 108, № 3. P. 585–595.
 211. Tsujita K., Takenawa T., Itoh T. Feedback regulation between plasma membrane tension and membrane-bending proteins organizes cell polarity during leading edge formation. // *Nat. Cell Biol.* 2015. Vol. 17, № 6. P. 749–758.