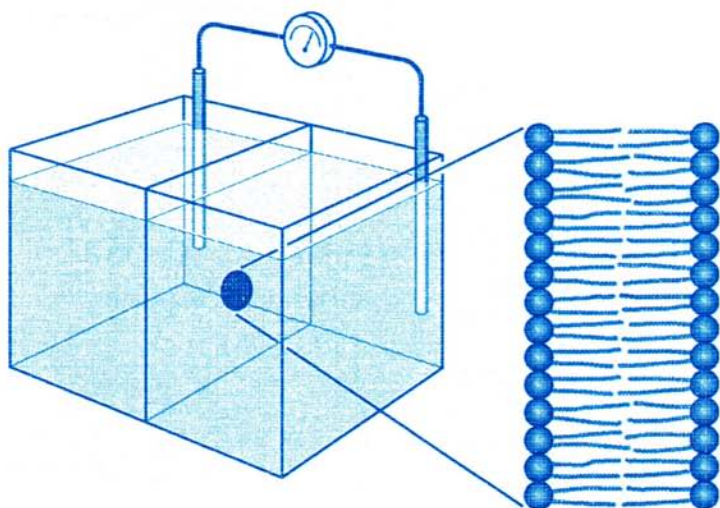


А. Н. Огурцов, Н. Ю. Масалитина

СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОМЕМБРАН



Учебное пособие

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
«Харьковский политехнический институт»

А.Н. Огурцов, Н.Ю. Масалитина

СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОМЕМБРАН

Учебное пособие
по курсу «Методы анализа биологических систем»

для студентов направления подготовки
051401 «Биотехнология»,
в том числе для иностранных студентов

Утверждено
редакционно-издательским
советом университета,
протокол № 3 от 28.12.2009 г.

Харьков НТУ «ХПИ» 2010

ББК 28.05
О 39
УДК 577.352

Рецензенты:

В.В. Давыдов, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией возрастной
эндокринологии и обмена веществ Института охраны
здоровья детей и подростков АМН Украины

В.В. Россихин, д-р мед. наук, профессор кафедры урологии
Харьковской медицинской академии последипломного образования
МОЗ Украины

Навчальний посібник містить основні поняття теорії біологічних мембран,
розглянуті їх функції та властивості, ліпідний та білковий склад, викладені
основні аналітичні методи дослідження біомембран.

Призначено для студентів спеціальностей біотехнологічного профілю всіх
форм навчання.

Огурцов, А. Н.

О-39 Структура, функции и аналитические методы исследования
биомембран [Текст] : учеб. пособие [по курсу «Методы анализа
биологических систем» для студ. направл. подг. 051401 «Биотех-
нология», в т. ч. иностр. студ.] / А. Н. Огурцов, Н. Ю. Масалитина. –
Харьков : НТУ «ХПИ», 2010. – 240 с. – На рус. яз.

ISBN 978-966-593-785-2

Учебное пособие включает основные понятия теории биологических мембран,
рассмотрены их функции и свойства, липидный и белковый состав, изложены
основные аналитические методы исследования биомембран.

Предназначено для студентов специальностей биотехнологического профиля
всех форм обучения.

Ил. 119. Табл. 4. Библиогр.: 46 назв.

ББК 28.05

ISBN 978-966-593-785-2

© А. Н. Огурцов, Н. Ю. Масалитина, 2010

ВСТУПЛЕНИЕ

Биологические мембраны играют особую роль в биотехнологии, по-
скольку без их прямого или косвенного участия не протекает ни один ме-
таболический процесс в клетке. Знание структуры, функций и
аналитических методов анализа биомембран составляет основу профес-
сионализма инженера-биотехнолога. Именно мембранная физиология
организмов-продуцентов во многом определяет эффективность биотехно-
логических этапов в промышленной биотехнологии, и именно через мем-
бранные структуры биотехнологи могут управлять биохимическими
преобразованиями в клетках. Настоящее учебное пособие предназначено
преимущественно для изучения в курсе "Методы анализа биологических
систем", на который в учебном плане отведено 198 часов. Материал посо-
бия будет полезен также и при изучении курсов "Клеточная биология",
"Ферментативный катализ", "Молекулярная биология" и, в особенности,
"Биологические мембраны", первая часть которого как раз посвящена
структуре и функциям биомембран, знание которых совершенно необхо-
димы для изучения раздела "Электрогенез биомембран и механизмы мем-
бранной сигнализации".

Современные высокочувствительные методы исследования молеку-
лярных механизмов биомембранных процессов необходимо изучать соче-
тая все виды учебной деятельности. Методическими основами курса
являются лекции, в которых излагаются основные положения каждого
раздела, практические занятия и самостоятельная работа студентов, кото-

рая является основным способом усвоения материала в свободное от аудиторных занятий время.

Для самостоятельной работы выделяется больше половины общего объема времени, предназначенного для изучения данной дисциплины. Самостоятельная работа проводится по всем темам, которые входят в дисциплину, как по тем, по которым читаются лекции, так и по тем, для которых дается только план изучения и ссылки на литературу. В процессе самостоятельной работы студент учится самостоятельно приобретать знания, которые затем используются в ходе практических занятий, при подготовке к выполнению контрольных работ и к экзамену.

Настоящее пособие подготовлено на основе работ [1–26], послуживших также источником иллюстраций, таким образом, чтобы максимально облегчить усвоение материала курсов "Методы анализа биологических систем" и "Биологические мембраны" студентам направления подготовки 051401 "Биотехнология". Перед работой с пособием следует внимательно изучить материал пособий [1,4–7], без которого невозможно понимание клеточных мембранных механизмов и процессов на молекулярном уровне.

1. МЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ КЛЕТКИ

1.1. Основные компоненты архитектуры клетки

Прокариоты, строение клеток которых является наиболее *простым*, окружены *единственной плазматической мембраной* и не имеют в своем составе других компартментов. Хотя ДНК и сосредоточено в центральной области этих одноклеточных организмов (*нуклеоид*), большинство ферментов и метаболитов свободно диффундирует внутри единого внутреннего водного компартмента, где и происходят определенные метаболические реакции, например, синтез белков и анаэробный гликолиз. Другие процессы, такие как репликация ДНК и синтез АТФ, происходят на плазматической мембране.

Эукариоты, размер клеток которых *намного больше*, преодолевают диффузионные ограничения скоростей биохимических реакций, разбивая

внутреннее пространство клетки на компартменты-*органеллы*. Каждая органелла окружена одной или несколькими *биомембранами*, и каждый тип органелл содержит уникальный набор белков, как встроенных в эти мембраны, так и функционирующих во внутреннем водном пространстве органеллы, которое называется *люмен*. Уникальный белковый состав органеллы определяет специфичность протекающих в ней реакций, а значит и функциональную специфичность органеллы в клетке.

Цитоплазмой называется всё содержимое клетки между внешней мембраной ядра клетки и наружной плазматической мембраной клетки.

Цитозолем называется водный раствор цитоплазмы между органеллами.

Все биомембраны образуют *замкнутые поверхности*, отделяющие *люмен* данной органеллы от *цитозоля*, и имеющие схожую *бислойную* структуру.

Биомембраны контролируют *процессы перемещения молекул* как внутрь клетки и наружу из клетки, так и внутрь люмена данной органеллы и наружу из люмена в цитозоль эукариотической клетки.

Суммарная площадь внутренних мембран эукариот *вдесятеро* превышает площадь плазматической мембраны (рисунок 1).

Хотя основными элементами архитектуры эукариотических клеток являются мембраны, органеллы и цитозоль, каждый тип клеток имеет специфическую форму, определяющуюся внутриклеточным расположением органелл.

Структурной основой такого специфического дизайна клеток каждого типа является *цитоскелет* – прочный каркас из трех типов белковых филаментов, расположенный в цитозоле и механически поддерживающий клеточные мембраны.

Белки цитоскелета являются одними из самых мультикопийных и *поверхность* цитоскелета, площадь которого в десять раз больше площади всех мембран органелл (рисунок 1), служит местом *крепления* определенных белков, *протекания* множества клеточных процессов и "*заякорения*" мембран клетки.

Липиды, из которых собраны биомембраны, не только определяют форму и физико-химические свойства биомембран, но они также участ-

вуют в процессах *присоединения* белков к мембранам, *управления* активностью мембранных белков и *передачи сигналов* через мембрану.

Мембраны участвуют во взаимодействиях между компартментами, которые они разделяют, *двумя* способами

- 1) посредством *физического переноса* ионов или молекул через мембрану (внутри компартмента или из него)
- 2) в форме *передачи информации* при помощи конформационных изменений, индуцируемых в мембранных компонентах.

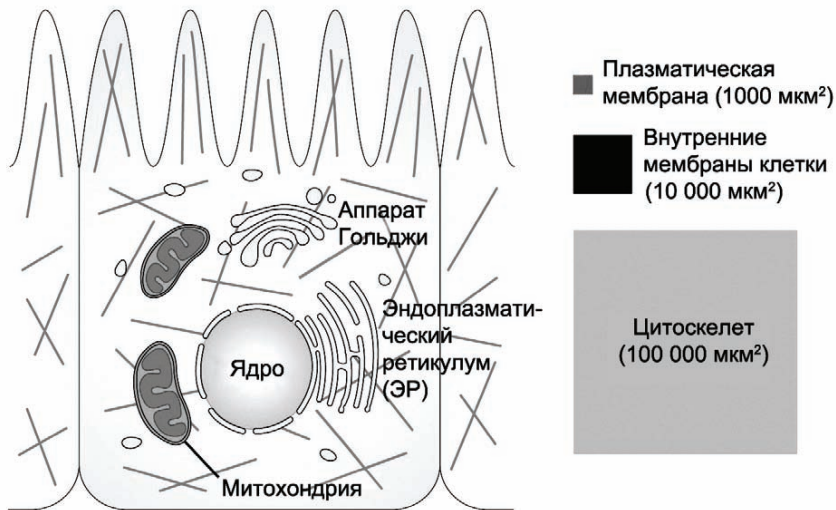


Рисунок 1 – Схема основных компонентов клеточной архитектуры

Кроме того, с мембранами связаны многие клеточные *ферменты*.

Некоторые из них катализируют *трансмембранные* реакции, когда реагенты находятся по разные стороны мембраны, или когда каталитический акт сопровождается транспортом молекул.

Имеются ферменты, которые, действуя на мембраносвязанные субстраты, участвуют тем самым в *биосинтезе мембран*.

С участием мембран в той или иной степени осуществляется большинство жизненно важных клеточных функций, например, протекают такие разные процессы, как репликация прокариотической ДНК, биосинтез белков и их секреция, биоэнергетические процессы и функционирование систем гормонального ответа.

Можно условно выделить следующие *шесть основных групп* функций, связанных с биомембранами (рисунок 2).

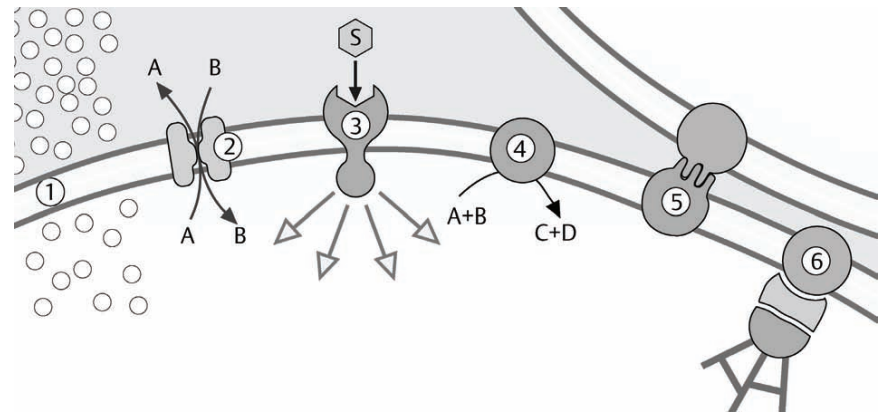


Рисунок 2 – Основные функции биомембран

1. *Ограничение и обособление клеток и органелл*. Обособление клеток от межклеточной среды обеспечивается плазматической мембраной, *защищающей* клетки от механического и химического воздействий. Плазматическая мембрана обеспечивает также *сохранение разности концентраций* метаболитов и неорганических ионов между внутриклеточной и внешней средой.

2. *Контролируемый транспорт метаболитов и ионов*. Эта функция обеспечивает поддержание необходимого состава внутриклеточной среды, что существенно для *гомеостаза*, то есть поддержания постоянной концентрации метаболитов и неорганических ионов и других физиологических параметров. Регулируемый и избирательный транспорт метаболитов и неорганических ионов через поры и посред-

ством переносчиков становится возможным благодаря обособлению клеток и органелл с помощью мембранных систем.

3. *Восприятие внеклеточных сигналов* и их передача внутрь клетки, а также инициация сигналов.

4. *Ферментативный катализ*. В мембранах на границе между липидной и водной фазами локализованы ферменты. Именно здесь происходят реакции с неполярными субстратами. Примерами служат биосинтез липидов и метаболизм неполярных ксенобиотиков. В мембранах локализованы наиболее важные реакции энергетического обмена, такие, как окислительное фосфорилирование (дыхательная цепь) и фотосинтез.

5. *Контактное взаимодействие* с межклеточным матриксом и взаимодействие с другими клетками при слиянии клеток и образовании тканей.

6. *Заякоривание цитоскелета*, обеспечивающее поддержание формы клеток и органелл и клеточной подвижности.

1.2. Жидкостно-мозаичная модель строения биомембран

Понимание того, что плазматическая мембрана представляет собой вполне определенную структуру, было достигнуто в середине XIX столетия. В конце XIX столетия Овертон обратил внимание на корреляцию между скоростью, с которой небольшие молекулы проникают в растительные клетки, и их коэффициентом распределения между маслом и водой; это привело его к мысли о липидной природе мембран.

В 1925 г. Гorter и Грендел предположили, что липиды в мембране эритроцитов образуют *бимолекулярный* слой (*липидный бислой*) (рисунок 3). Эта идея возникла на основе результатов простого эксперимента. Липиды эритроцитов экстрагировали ацетоном и затем в кювете Лэнгмюра получали из них тонкую пленку на поверхности воды. С помощью поплавка сжимали слой липидных молекул на границе раздела вода-воздух до тех пор, пока этот слой не начинал оказывать сопротивление дальнейшему сжатию; это явление было объяснено образованием плотноупакованной мономолекулярной липидной пленки.

Измерение площади, занимаемой липидами, и сравнение ее с площадью поверхности эритроцитов, из которых эти липиды были экстрагированы, дали соотношение 2:1. Отсюда был сделан вывод, что мембрана эритроцитов состоит из липидных молекул, *расположенных в два слоя*. В историческом плане эта работа имела большое значение, поскольку с тех пор *концепция липидного бислоя* как структурной основы биологических мембран стала доминирующей и на самом деле оказалась верной.

Эту гипотезу подтвердили в 1935 г. Коул и Кертис определив электрические параметры биологических мембран: высокое электрическое сопротивление $R \approx 10^7 \text{ Ом} \cdot \text{м}^2$ и большую удельную емкость $C_s \approx 0,5 \cdot 10^{-2} \text{ Ф/м}^2$.

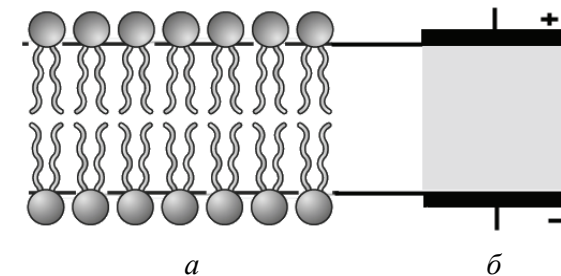


Рисунок 3 – Конденсаторная модель липидного бислоя: а – бимолекулярный слой липидов, б – мембрана как конденсатор

Биологическую мембрану можно рассматривать как *электрический конденсатор* (рисунок 3(б)), в котором пластинами являются электролиты наружного и внутреннего растворов (внеклеточного и цитоплазмы) с погруженными в них головками липидных молекул. Проводники разделены диэлектрическим слоем, образованным неполярной частью липидных молекул – двойным слоем их хвостов. Диэлектрическая проницаемость липидного слоя $\epsilon = 2$. Емкость плоского конденсатора

$$C = \frac{\epsilon \epsilon_0 S}{d},$$

где $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{12}$ Ф/м – электрическая постоянная, d – расстояние между пластинами конденсатора, S – площадь пластины.

Удельная емкость (емкость, приходящаяся на единицу площади) определяется как

$$C_S = \frac{\epsilon \epsilon_0}{d}.$$

Поэтому можно рассчитать расстояние между пластинами конденсатора, соответствующее в нашем случае толщине липидной части мембраны

$$d = \frac{\epsilon \epsilon_0}{C_S} = \frac{8,85 \cdot 10^{-12} \cdot 2}{0,5 \cdot 10^{-2}} \text{ м} = 3,5 \text{ нм}.$$

Это по порядку величины соответствует наблюдаемой толщине мембран.

Кроме липидов в состав мембраны входят белковые молекулы. Так, коэффициент поверхностного натяжения клеточных мембран значительно ближе к коэффициенту поверхностного натяжения на границе раздела белок-вода ($\sim 10^{-4}$ Н/м), чем на границе раздела липид-вода ($\sim 10^{-2}$ Н/м).

Концепция бимолекулярной липидной мембраны получила дальнейшее развитие в предложенной в 1935 г. модели Дэвсона-Даниелли, или модели "сэндвича" ("бутербродная" модель). Согласно этой модели мембрана состоит из трех слоев: два крайних слоя состоят из белковых молекул, а средний слой – липидный.

Сингер и Никольсон в 1972 г. на основе совокупности результатов, полученных физическими и химическими методами исследования такими, как рентгеноструктурный анализ и электронная микроскопия, предложили *жидкостно-мозаичную модель* строения биологических мембран, которая является общепринятой в настоящее время (рисунок 4).

В этой модели структурную основу биологической мембраны образует двойной слой фосфолипидов, в котором располагаются белковые молекулы. Липиды находятся при физиологических условиях в *жидком агрегатном состоянии*. Это позволяет сравнить мембрану с *фосфолипидным морем*, по которому плавают белковые "айсберги".

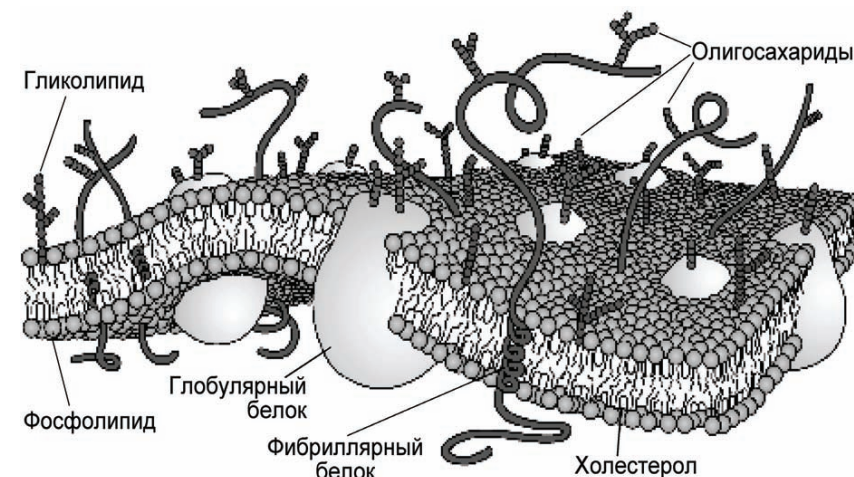


Рисунок 4 – Жидкостно-мозаичная модель плазматической мембраны

Углеводородные хвосты фосфолипидов обоих слоев бислоя образуют гидрофобную внутреннюю часть биомембраны толщиной 3–4 нм – *гидрофобный углеводородный слой* (рисунок 5).

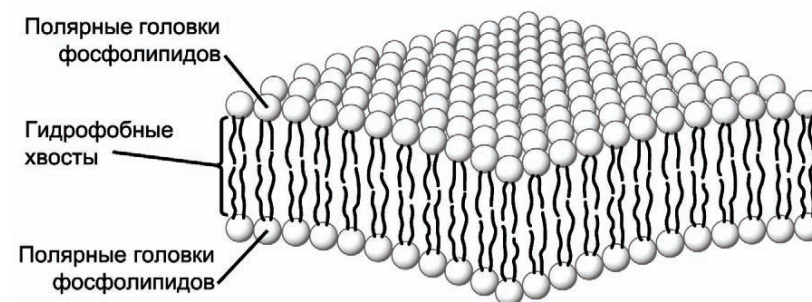


Рисунок 5 – Схема фосфолипидного бислоя

На электронных микрофотографиях сечение мембраны окрашенной молекулами тетрооксида осмия (которые присоединяются к полярным головкам фосфолипидов) выглядит как "железнодорожное полотно", два "рельса" которого соответствуют двум монослоям бислоя (рисунок 6).



Рисунок 6 – Электронная микрофотография среза клетки вблизи плазматической мембраны

Липидный бислой обладает *двумя* важными свойствами.

1. Гидрофобный углеводородный слой является непреодолимым *барьером*, через который невозможна самопроизвольная диффузия водорастворимых (*гидрофильных*) молекул и ионов. Важно, что этим *барьерным* свойством можно *управлять* с помощью мембранных белков, которые осуществляют транспорт (перенос, *транслокацию*) через мембрану тех веществ, для самопроизвольной диффузии которых биомембрана непроницаема.
2. Биомембрана является *стабильным* образованием. Бислойность биомембраны определяется гидрофобными и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями между липидами. И даже если состояние внешней среды (например, ионная сила или pH) изменится значительно

но, бислой имеет достаточный "запас прочности" для сохранения цельности и непроницаемости.

Природные мембраны различных клеток демонстрируют огромное *разнообразие*, которое определяется функциями клеток данного типа (рисунки 7, 8).

Гладкая гибкая поверхность плазматической мембраны эритроцитов позволяет этим клеткам "протискиваться" через капилляры кровеносной системы, диаметр которых вдвое меньше диаметра дискообразной клетки эритроцита.

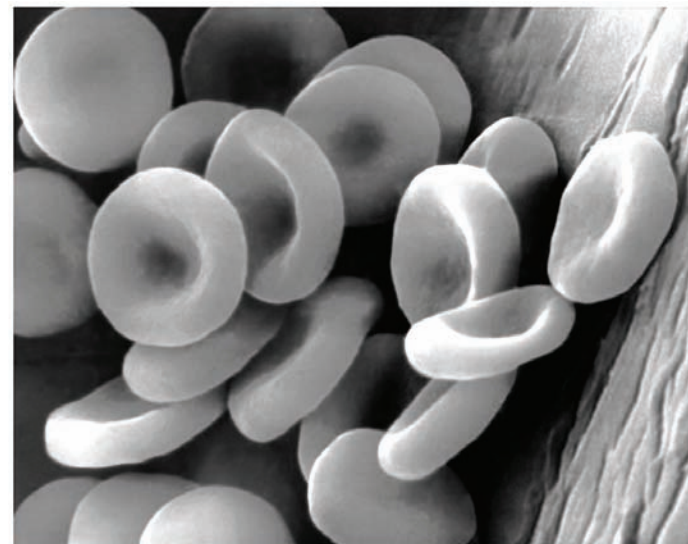


Рисунок 7 – Эритроциты имеют гладкую наружную мембрану

Некоторые клетки имеют длинные тонкие "отростки" плазматической мембраны – реснички и жгутики, которые совершают периодические волнообразные движения (рисунок 8).

Такое движение стимулирует течение окружающей жидкости по поверхности эпителия. Или, наоборот, как в случае спермиев, способствуют движению самих клеток в окружающей среде.

Аксоны многих нейронов "упакованы" в оболочку из множества слоев модифицированной плазматической мембраны, которая называется *миелиновой оболочкой* (рисунок 9). Эти мембраннообразные структуры вырабатываются окружающими глиальными клетками и обеспечивают передачу нервных импульсов на большие расстояния.

Несмотря на то, что в приведенных примерах биомембраны имеют различную форму и функции, структурно и эти, и все другие биомембраны устроены *одинаково* – все они являются липидными бислоями.

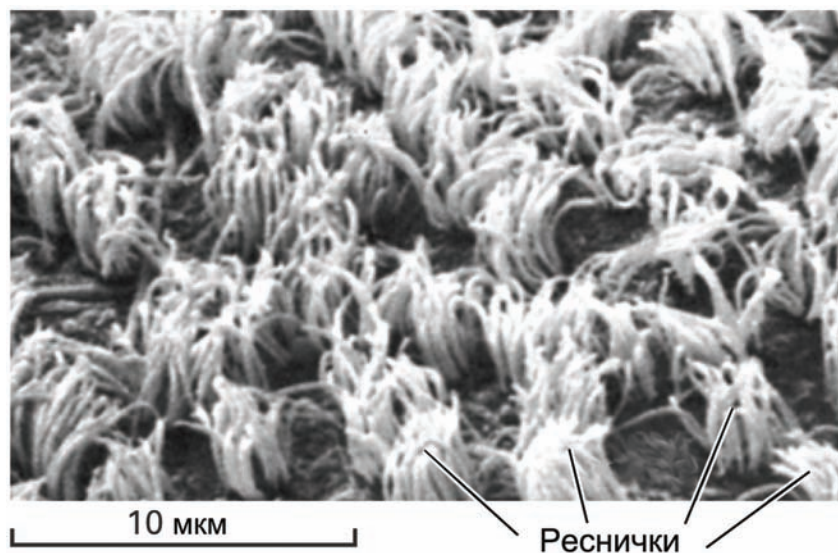


Рисунок 8 – Пучки ресничек на поверхности клеток эпендимного эпителия головного мозга защищают их от повреждений

Поскольку все клеточные мембраны *полностью* окружают всю клетку или весь внутренний компартмент, то у всех биомембран *одна* из поверхностей всегда ориентирована *внутри* компартмента – она называется *внутренняя поверхность* (или внутренний слой бислоя), а *другая* поверхность всегда экспонирована *наружу* – она называется *наружная поверхность* (или наружный слой бислоя). Часто также употребляют на-

звания *цитозольная сторона* и *экзоплазматическая сторона* биомембраны, соответственно.

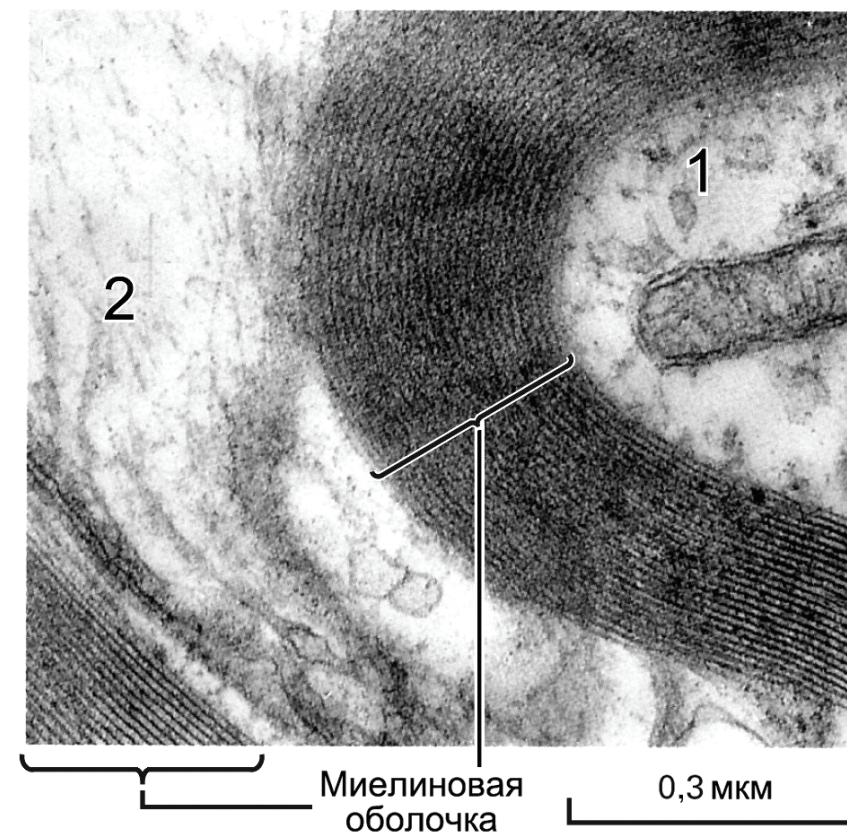


Рисунок 9 – Миелиновая оболочка аксонов (1) позвоночных формируется окружающими опорными глиальными (2) клетками

Такие названия удобны для обозначения *топологической эквивалентности* различных сторон различных мембран (рисунок 10).

Например, экзоплазматическая сторона плазматической мембраны ориентирована наружу от цитоплазмы в сторону внеклеточного пространства, и она является внешней границей клетки.

Но, в отличие от плазматической мембраны, для органелл и везикул, имеющих только одну мембрану, экзоплазматическая сторона этой мембраны ориентирована *внутри* органеллы, она находится в контакте с внутренним содержимым органеллы, которое в этом случае, по отношению к цитозолю клетки, эквивалентно внеклеточной жидкости.

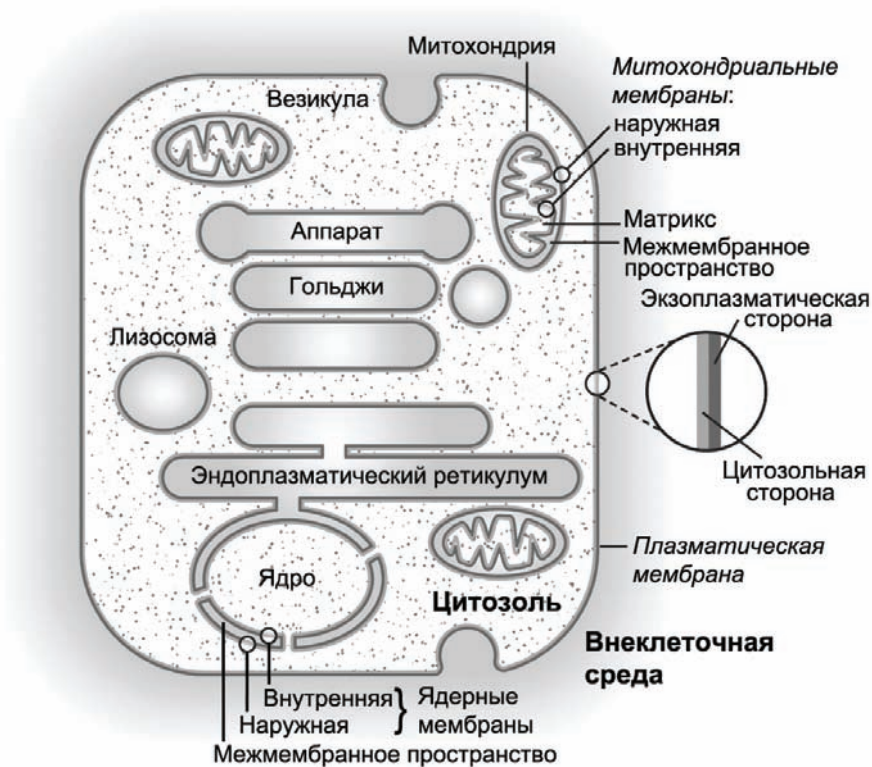


Рисунок 10 – Ориентация цитозольной и экзоплазматической сторон различных мембран клетки

Эта эквивалентность наиболее наглядно проявляется в случае эндоцитозных везикул, которые образуются при "впячивании" участка плазма-

тической мембраны, в результате чего внешняя сторона плазматической мембраны становится внутренней стороной мембраны везикулы.

Различие цитозольной и экзоплазматической сторон биомембраны имеет важное *функциональное значение*, поскольку при любых перемещениях в составе мембраны цитозольные домены мембранных белков всегда остаются в цитозоле, сохраняя тем самым заданную ориентацию белка относительно компартментов клетки.

Три типа клеточных органелл – ядро клетки, митохондрии и хлоропласты – окружены двумя мембранами. В этих органеллах экзоплазматическая сторона мембран ориентирована в сторону межмембранного пространства.

Модель строения биомембраны Сингера и Никольсона (жидкостно-мозаичная) в настоящее время общепринята. Однако, как всякая модель, она дает довольно *упрощенную* картину строения мембраны. В частности, обнаружено, что белковые "айсберги" не всегда свободно "плавают" в липидном море, а могут быть "заякорены" на внутренние (цитоплазматические) структуры клетки. Кроме того, не все липиды в мембране расположены по принципу бислоя. Липидная фаза мембран содержит также участки, в которых липидные молекулы не образуют двойной слой.

1.3. Плазматические мембраны

Все клетки имеют *внешнюю мембрану*, что обеспечивает постоянство внутриклеточного состава вне зависимости от изменений в окружающей среде.

У клеток тканей высших животных нет жесткой клеточной стенки, но во многих из них плазматическая мембрана окружена ещё и внешней оболочкой, или *гликокаликсом*, образованной из полисахаридов. *Плазматическая мембрана* состоит, в основном, из полярных липидов и белков и непроницаема для многих низкомолекулярных соединений, в том числе и для ионов.

Однако особые белки-переносчики, называемые *каналоформерами*, способны избирательно увеличивать проницаемость мембраны для веществ, необходимых организму (*облегчённая диффузия*). По каналам

вещества и ионы движутся через мембрану по градиенту концентраций. Помимо такого механизма существуют еще так называемые *насосы*, которые способны переносить вещества через мембрану против градиента концентраций, используя для переноса энергию гидролиза АТФ (*активный транспорт*).

В модельных системах через искусственные мембраны вещества переносятся по градиенту концентраций за счет диффузии до достижения термодинамического равновесия (*пассивный транспорт*).

В живой клетке через плазматическую мембрану постоянно осуществляется транспорт веществ, потребляемых в процессе синтеза основных компонентов клетки, что создает градиент концентрации этих веществ между внутренней и внешней средой.

Плазматическая мембрана *не только регулирует вход и выход* веществ через клеточную мембрану, но и осуществляет *обмен "информацией" и энергией* между внешней средой и клеткой. Биологические мембраны содержат множество рецепторов, активация которых приводит к повышению внутриклеточной концентрации вторичных сигнальных веществ, регулирующих клеточный метаболизм.

Биологические мембраны играют важную роль в *превращениях* осмотической и электрической *энергии*. Разность концентраций ионов во внешней и внутренней среде создает *электрохимический градиент*, энергия которого может *преобразовываться в другие виды энергии*: химическую (синтез АТФ), механическую (движение ресничек и жгутиков) и осмотическую.

Кроме этих универсальных функций плазматическая мембрана выполняет дополнительные важные функции в *многоклеточном* организме. Очень немногие из клеток многоклеточных растений и животных существуют как самостоятельные единицы. Как правило, группы родственных специализированных клеток объединяются и формируют *ткани*. В клетках животных специализированные области плазматической мембраны содержат определенные белки и гликолипиды, которые образуют специфические *контакты* между клетками, которые и *упрочняют* ткани, и *обеспечивают обмен* метаболитами между клетками.

Благодаря наличию специфических мест узнавания или изменению

формы мембран в специфических местах взаимодействия клеток внешняя поверхность плазматических мембран многоклеточных организмов играет важную роль в создании *межклеточных контактов*.

Определенные белки плазматической мембраны присоединяют клетку к компонентам внеклеточного матрикса, который представляет собой смесь фибриллярных белков и полисахаридов, образующих ту основу, на которой располагаются большинство клеточных эпителиев и небольших желёз.

Другие белки плазматической мембраны являются точками крепления многочисленных филаментов цитоскелета, которые, проходя через цитозоль, придают клетке необходимую форму и механическую прочность.

Плазматические мембраны многих типов эукариотических клеток содержат рецепторные белки, которые, связываясь с различными сигнальными молекулами (гормонами, факторами роста, нейротрансмиттерами и пр.), передают внешние сигналы внутрь клетки, управляя процессами развития и функционирования клетки.

И, наконец, периферические цитозольные белки, которые присоединяются к мембране, в дальнейшем функционируют в качестве либо ферментов, либо химических преобразователей сигналов, либо структурных белков, стабилизирующих мембрану.

Специфические мембраны, которые окружают каждую органеллу клетки, подобно плазматической мембране также содержат уникальные наборы белков, необходимые для правильного функционирования каждой специфической органеллы.

Многие мембраны, в силу ярко выраженной специализации клеток, обладают весьма *своеобразной структурой*. Например, *миелин*, представляющий собой изоляционную оболочку вокруг аксонов нервных клеток. Он состоит из уплощенных *шванновских* клеток, наложенных друг на друга. Миелин легко отделяется от других субклеточных структур, выделяемых из гомогената ткани при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы. Плазматические мембраны миелина лишены какой-либо ферментативной и рецепторной активности. Доминирующим белковым

компонентом этих мембран является структурный белок, называемый основным белком миелина.

Плазматические мембраны нервных и мышечных клеток – так называемые *возбудимые мембраны* – способны передавать электрический импульс благодаря наличию *каналов* проницаемости для ионов.

Мембранные каналы открываются при изменении потенциала на мембране. При передаче возбуждения от одного участка нервной клетки к другому сначала повышается проницаемость для ионов Na^+ , которые входят в клетку, а затем – для ионов K^+ , выходящих наружу. За счет такого движения ионов генерируется *потенциал действия*.

Таким образом, процессы, протекающие в клеточной мембране и определяющие ее функциональное назначение, имеют строго определенное направление (*векторность*), которое осуществляется благодаря сложной молекулярной структуре биомембран.

1.4. Эндоплазматический ретикулум

Со времен изобретения оптического микроскопа и открытия клеточной структуры биологических объектов с развитой эндоплазматической сетью различают два вида эндоплазматического ретикулума:

- 1) *гладкий* эндоплазматический ретикулум (ГЭР) с гладкой поверхностью,
- 2) *шероховатый* эндоплазматический ретикулум (ШЭР), к поверхности которого прикреплены нуклеопротеиновые частицы – рибосомы.

В клетке эндоплазматический ретикулум представляет собой уплощенные мешочки (цистерны), пузырьки и трубочки, сообщающиеся друг с другом (рисунок 11).

Шероховатый эндоплазматический ретикулум состоит из большого числа *цистерн*, расположенных параллельно друг другу и связанных друг с другом так, что в клетке создается *система коммуникаций*, по которой синтезируемые на мембранах эндоплазматического ретикулума

продукты могут транспортироваться либо в другие части клетки, либо наружу. В *рибосомах*, прикрепленных к мембранам эндоплазматического ретикулума, осуществляется *синтез белков* из аминокислот.

Одной из функций гладкого эндоплазматического ретикулума, называемого в мышечных клетках *саркоплазматическим ретикуломом*, является поглощение ионов кальция, которые затем выбрасываются в цитоплазму при сокращении мышечного волокна в ответ на стимуляцию. Поэтому саркоплазматический ретикулум часто называют "*депо кальция*".

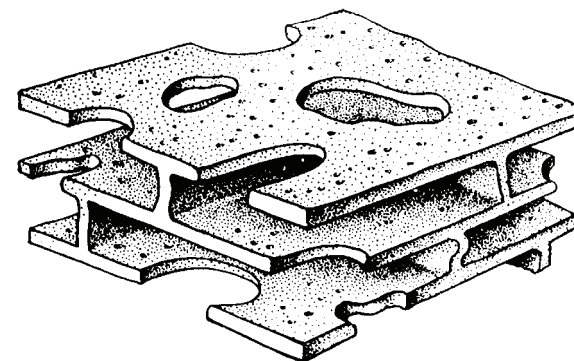


Рисунок 11 – Схема мембран эндоплазматического ретикулума

Гладкий эндоплазматический ретикулум сильно развит в тех клетках, которые транспортируют ионы, например в железистых клетках слизистой оболочки желудка.

1.5. Аппарат Гольджи

Наличие аппарата Гольджи в клетке установлено еще в XIX веке, но исследование его функций начато сравнительно недавно.

Аппарат Гольджи – система внутриклеточных мембран, состоящая из нескольких обособленных комплексов Гольджи (рисунок 12). Каждый из них представляет собой *ряды уплощенных цистерн*, расположенных параллельно друг другу на расстоянии 20–30 нм, и *секреторных пузырьков* размером 40–80 нм.

Пузырьки формируются на цистернах, отпочковываясь от них. Так как цистерны имеют изогнутую форму, то различают две поверхности аппарата Гольджи: вогнутую поверхность (так как называемый *секретирующий полюс*) и выпуклую (*формирующий полюс*).

Аппарат Гольджи принимает участие в (1) *упаковке и транспорте* из клетки определенных веществ, в частности белков и полисахаридов, а также в (2) *синтезе* различных веществ и в (3) *образовании* клеточной стенки в растительных клетках.

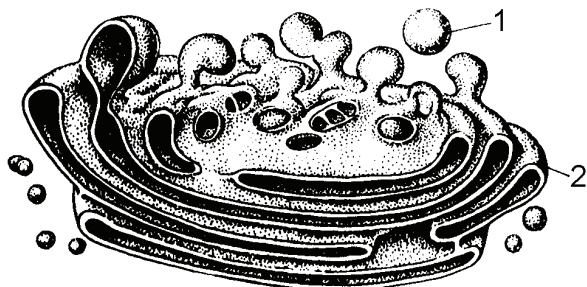


Рисунок 12 – Аппарат Гольджи: 1 – пузырьки Гольджи; 2 – цистерны (ламеллы) Гольджи

Некоторые пищеварительные ферменты после окончания синтеза на мембранах шероховатого эндоплазматического ретикулума переносятся в комплекс Гольджи со стороны формирующего полюса. Пройдя через слой мембран Гольджи, они собираются в пузырьках, которые отделяются от цистерн, транспортируются в виде секрета в секреторном пузырьке к плазматической мембране, затем сливаются с ней, а содержимое пузырька выливается наружу.

Таким образом, на выпуклой поверхности (формирующем полюсе) происходит *поглощение* веществ, а на вогнутой (секретирующем полюсе) – их *выделение*.

Комплекс Гольджи и мембраны эндоплазматического ретикулума функционально связаны между собой.

Выпуклая поверхность, обращенная *в сторону ядра*, вместе с эндоплазматическим ретикулумом является *местом синтеза белков и липидов*

и, функционально связана с пузырьками аппарата Гольджи, транспортирующими эти вещества.

На вогнутой поверхности аппарата Гольджи, которая обращена в сторону цитоплазмы, происходит образование не только гликопротеинов, необходимых для создания новых клеточных структур, но и образование лизосом и пероксисом, участвующих в разрушении клеточных элементов.

Образование липопротеинов в клетках печени, секреторных гранул в клетках поджелудочной железы, секреция грудного молока, регулируемая гормонами, – во всех этих хорошо изученных процессах участвует аппарат Гольджи. Однако его существование установлено *и в тех клетках*, где не происходят процессы секреции. Предполагают, что в этих случаях его функции заключаются в *синтезе, метаболизме и транспорте* синтезированных белков, углеводов, липидов и мукополисахаридов.

Значительная часть белков, синтезированных в рибосомах на мембранах шероховатого эндоплазматического ретикулума, поступив в аппарат Гольджи, *превращается в гликопротеины*, которые упаковываются в секреторные гранулы, а затем выделяются во внеклеточную среду. В аппарате Гольджи *накапливаются углеводы* в виде растворимых олигомеров и уронида, полимеры которых способны сильно набухать. Они *входят в состав слизи*, выделяемых аппаратом Гольджи.

В цистернах аппарата Гольджи протекает синтез муциновой части мукопротеинов, благодаря наличию таких ферментов, как галактозилтрансфераза и УДФ-М-ацетилглюкозаминилтрансфераза.

1.6. Ядро клетки

Ядро – наиболее крупная (диаметром около 10 мкм) видимая в оптический микроскоп органелла эукариотической клетки. Оно отделено от остальной клетки *оболочкой*, состоящей из *внутренней и внешней ядерных мембран* (рисунок 13).

Область между двумя ядерными мембранами называется *перинуклеарным (межмембранным) пространством*. Внешняя ядерная мембрана усыпана рибосомами и переходит в *шероховатый эндоплазматический ретикулум* (ШЭР). Внутренняя ядерная мембрана выстлана специальны-

ми белками (*ламином* и др.), которые служат для закрепления ядерных структур (ядерная пластинка).

В ядре расположена почти вся ДНК клетки. Эта ДНК является носителем генетической информации и главным местом ее *репликации* и *экспрессии*.

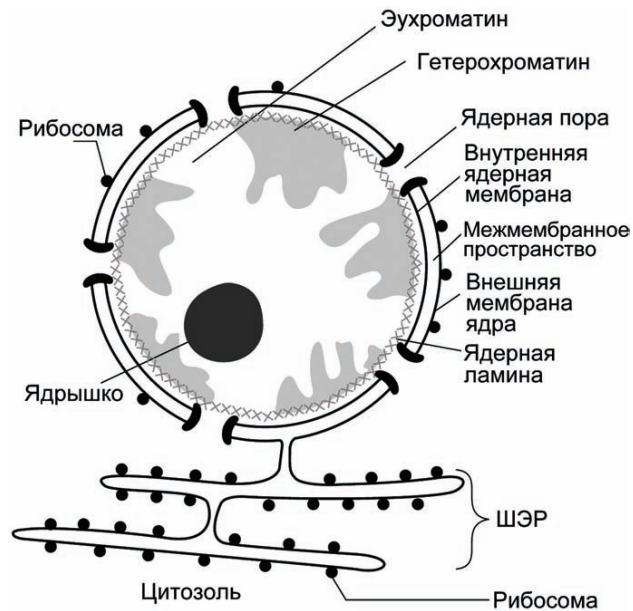


Рисунок 13 – Ядро клетки

В *интерфазе* (фазы между делениями клетки) большая часть ДНК в ядре присутствует в виде *гетерохроматина*, т.е. плотно упакованной ДНК, ассоциированной с РНК и белками.

Менее плотно упакованная ДНК называется *эухроматином*; это место активной *транскрипции* ДНК в РНК.

Ядро часто содержит *ядрышко*, а иногда и несколько ядрышек. Во время деления клеток структура ядра разрушается. Хроматин организуется в *хромосомы*, т. е. в высшей степени конденсированные формы молекул ДНК, видимые в оптический микроскоп.

Обмен макромолекул, таких, как белки и РНК, между ядром и цитоплазмой осуществляется через *ядерные поры* (диаметр примерно 7 нм), образованные белковым комплексом. Поры *регулируют транспорт* через ядерные мембраны. Пептиды и *небольшие* белки, например, гистоны способны легко проникать в ядро. *Более крупные* белки (свыше 40 кДа) могут пройти через ядерную мембрану, только если они несут специфическую *сигнальную последовательность*.

1.7. Лизосомы и зимогенные гранулы

В процессе фагоцитоза клетки способны захватывать частицы величиной более 1 мкм, а в процессе пиноцитоза – белки и другие высокомолекулярные вещества. Система, которая реализует процесс переваривания материалов, поступающих извне, реализована в *первичных лизосомах*.

В случае гибели клетки лизосомальная мембрана разрывается и начинается автолиз клетки: вышедшие наружу гидролазы расщепляют белки до аминокислот, нуклеиновые кислоты – до нуклеотидов, полисахара – до моносахаров. Нормально функционирующая клетка надежно защищена лизосомальной мембраной от действия гидролаз, содержащихся в лизосомах.

Первичные лизосомы могут сливаться друг с другом, а также с вакуолями клетки, фагосомами и окаймленными пузырьками, в результате чего образуются так называемые *вторичные лизосомы*, которые способны к фагоцитозу. Образующиеся в процессе *аутофагии* (самопереваривания) вторичные лизосомы, которые переваривают поступившие в них другие компоненты самой клетки, называются *аутолизосомами*. В отличие от них лизосомы, переваривающие чужеродные вещества, поступившие в клетку, называются *гетеролизосомами*.

Гидролитические ферменты в первые 10 минут после окончания синтеза находятся в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме, в последующие 10 минут в аппарате Гольджи, затем несколько десятков минут в первичных лизосомах, после чего происходит образование *зимогенных гранул* – плотных агрегатов молекул зимогена, окруженных мембраной, которые мигрируют к поверхности клетки и секретируются

наружу (экзоцитоз). Чтобы защитить эндокринную железу от местного действия секретируемого гормона, гормоны накапливаются в клетке в зимогенных гранулах в виде прогормонов-предшественников большей молекулярной массы за счет присоединенного "лишнего" фрагмента. Секреция такого гормона становится возможной после того, как произойдет отщепление "лишнего" фрагмента. Клетки желез внутренней секреции накапливают в зимогенных гранулах большие количества гормонов в неактивной форме в виде прогормонов. В ответ на стимуляцию гормон быстро выбрасывается в кровь, что приводит к резкому повышению его концентрации, и разносится кровотоком к клеткам-мишеням.

Нейромедиаторы (норадреналин, ацетилхолин, дофамин, глутаминовая кислота, олигопептиды) синтезируются в нервных клетках и хранятся в так называемых синаптических пузырьках.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Перечислите основные мембранные компоненты клетки.
2. В чем сходство и различие организации мембранных структур прокариот и эукариот?
3. Дайте определение цитоплазмы и цитозоля клетки и охарактеризуйте, каким образом соотносятся между собой эти элементы архитектуры клетки.
4. Во сколько раз площадь внутренних мембран эукариотической клетки превосходит площадь её плазматической мембраны? Каково функциональное значение такого отношения?
5. Какими двумя способами участвуют биомембраны во взаимодействиях между компартментами, которые они разделяют?
6. Перечислите и охарактеризуйте шесть основных групп функций, связанных с биомембранами.
7. Опишите эксперимент Гортера и Грендела.
8. Как определить толщину биомембраны, зная её удельную емкость и диэлектрическую проницаемость липидного слоя?
9. Назовите и охарактеризуйте два основных свойства липидного бислоя.

10. Охарактеризуйте модель биомембраны Сингера и Никольсона.
11. В чем сходство и различие цитозольной и эктоплазматической сторон мембраны?
12. В чем состоит функциональное значение различия цитозольной и эктоплазматической сторон биомембраны?
13. Какие клеточные органеллы окружены двумя мембранами?
14. Какие специфические функции выполняет плазматическая мембрана клетки?
15. Какие специфические функции выполняют мембраны эндоплазматического ретикула клетки?
16. Какие специфические функции выполняют мембраны аппарата Гольджи?
17. В чем состоит функциональное отличие секретирующего и формирующего полюсов аппарата Гольджи?
18. Какие особенности структуры и функций у ядерной мембраны?
19. Какие особенности структуры и функций у мембран лизосом клетки?

2. ЛИПИДНЫЙ СОСТАВ БИОМЕМБРАН. МОДЕЛЬНЫЕ ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ

2.1. Три класса липидов

Обычная мембрана состоит из фосфолипидов, сфинголипидов и стероидов. Эти три класса молекул липидов являются *амфифильными* и имеют полярную (гидрофильную) головку и гидрофобный (углеводородный) хвост.

Гидрофобный эффект и ван-дер-ваальсовы силы стимулируют процесс самосборки бислоя из липидных молекул так, чтобы углеводородные хвосты были спрятаны внутрь мембраны, а гидрофобные головки были погружены в окружающую водную среду (рисунок 4).

Но, хотя все мембранные липиды подобны по своей амфифильности, разные классы отличаются по химической структуре, распространенности и мембранным функциям.

2.1.1. Фосфолипиды

Фосфолипиды – наиболее распространенный класс липидов в большинстве мембран – являются производными глицерола-3-фосфата (рисунок 14).

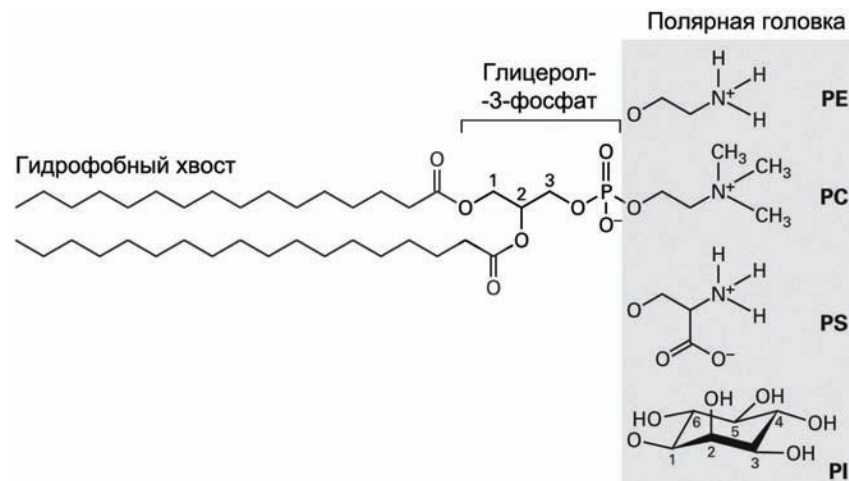


Рисунок 14 – Структура фосфолипидов

Типичная молекула фосфолипидов состоит из двух жирнокислотных цепей, присоединенных к гидроксильным группам глицерола-3-фосфата, и полярной головки, присоединенной к фосфатной группе.

Два жирнокислотных хвоста могут отличаться по числу звеньев в углеводородной цепочке (обычно 16 или 18 углеродов в цепи) и по степени ненасыщенности C–C связей (0, 1 или 2 ненасыщенные двойные C=C связи).

Фосфолипиды классифицируются по свойствам их полярных головок. В *фосфатидилхолинах* (*phosphatidylcholine*, обозначен PC на рисунке 14) – наиболее распространенных фосфолипидов в плазматических мембранах клеток – полярная головка состоит из *холина* – положительно заряженного спирта, присоединенного к отрицательно заряженному фосфату.

В других фосфолипидов к фосфату присоединены молекулы, либо содержащие гидроксильные группы, либо, как и холин, положительно заряженные. Наиболее часто в таком качестве используются этаноламин, серин и инозитол (рисунок 14). Соответствующие фосфолипиды называются *фосфатидилэтаноломин* (*phosphatidylethanolamine*, PE), *фосфатидилсерин* (*phosphatidylserine*, PS) и *фосфатидилинозитол* (*phosphatidylinositol*, PI). Полярные головки фосфолипидов с отрицательно заряженной фосфатной группой и положительно заряженными группами или гидроксильными группами интенсивно взаимодействуют с полярными молекулами воды.

Плазмалогены – это группа фосфолипидов, в которых одна из жирнокислотных цепей присоединена к глицеролу (так же как и в обычных фосфолипидов) сложной эфирной связью, а другая углеводородная цепочка присоединена простой эфирной связью (C–O–C). Эти молекулы составляют порядка 20% фосфолипидов в теле человека, причем особенно много их в клетках головного мозга и сердца. Возможно, повышенная химическая стабильность простой эфирной связи в плазмалогенах или небольшие отличия в их пространственной структуре по сравнению с другими фосфолипидов имеют определенное физиологическое значение, которое еще не установлено.

2.1.2. Сфинголипиды

Вторым классом мембранных липидов являются *сфинголипиды*. Все эти соединения являются производными *сфингозина* – аминок спирта с длинным жирнокислотным хвостом и содержат второй жирнокислотный хвост, который присоединен к аминогруппе сфингозина (рисунок 15).

В *сфингомиелине* (*sphingomyelin*, SM) – самом распространенном сфинголипиде – к гидроксильной группе сфингозина присоединен фосфохолин. Поэтому структура сфингомиелина аналогична структуре фосфатидилхолина, и сфингомиелин также можно отнести к фосфолипидов.

Другой тип сфинголипидов представляют *гликолипиды*, в которых функцию полярной головки выполняет либо моносахарид, либо разветвленный олигосахарид. Например, *глюкозилцереброзид* (*glucosylcerebroside*).

side, GlcCer), простейший гликосфинголипид, содержит моносахарид глюкоза, присоединенный к сфингозину.

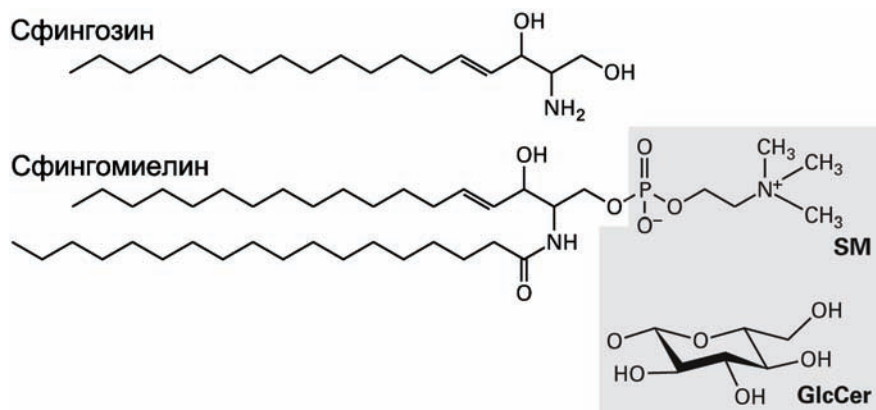


Рисунок 15 – Структура сфинголипидов

В сложных *гликосфинголипидах*, называемых *ганглиозидами*, к сфингозину присоединены один или два разветвленных олигосахарида, содержащих остатки N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты.

Гликолипиды составляют 2–10% общего количества липидов в плазматической мембране. Наибольшее их количество в тканях нервной системы.

2.1.3. Стероиды

Холестерол и его производные составляют третий класс мембранных липидов – *стероиды*. Основой стероидов является углеводородная структура, состоящая из четырех циклов. Холестерол – главный стероидный компонент животных клеток – имеет гидроксильную группу на конце одного из циклов (рисунок 16).

Особенно много холестерина в плазматических мембранах клеток млекопитающих, но он полностью отсутствует в большинстве прокариотических клеток. У растений до 30–50% липидов являются специфическими именно для растительных клеток стероидами.

При *нейтральном* pH фосфоглицериды (например, фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин) *не заряжены*, в то время как другие (например, фосфатидилинозитол и фосфатидилсерин) отрицательно заряжены. Несмотря на это, полярные головки всех фосфолипидов ориентируются так, что образуется липидный бислой.

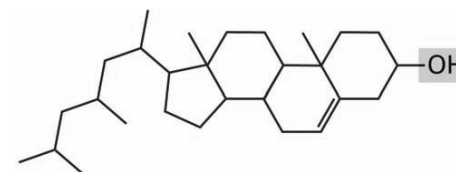


Рисунок 16 – Структура холестерина

Сфингомиелины подобны фосфоглицеридам по структуре и ассемблируются в смешанный бислой. Холестерол и другие стероиды слишком гидрофобны, чтобы формировать бислойную структуру самостоятельно, но в смеси с фосфолипидами они встраиваются в бислойные мембраны.

2.2. Латеральная мобильность мембранных компонентов

Тепловое движение липидных молекул сочетает в себе практически свободное *вращение* относительно оси молекулы и латеральную *диффузию* в плоскости мембраны. Гидрофобные жирнокислотные хвосты липидов при таких двух типах движения остаются погруженными в гидрофобный внутренний слой мембраны.

И в природных, и в искусственных модельных мембранах частота латеральных перескоков липидов при физиологической температуре 37°C порядка 10^7 с^{-1} и молекула пробегает за секунду расстояние порядка нескольких микрометров. Такая скорость латеральной диффузии свидетельствует о том, что вязкость биомембраны в 100 раз больше вязкости воды и приблизительно равна вязкости растительного масла. И, несмотря на то, что молекулы липидов диффундируют в биомембране медленнее, чем компоненты окружающего водного раствора, *любая* молекула мембранного липида пробегает расстояние, сравнимое с длиной *бактериальной*

клетки (~1 мкм) за 1 секунду, а расстояние порядка длины *животной* клетки за 20 секунд.

Абсолютные значения коэффициентов латеральной диффузии липидов и белков в биомембране можно определить методом *восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания* (*fluorescence recovery after photobleaching*, FRAP). Исследуемые мембранные объекты, например, белки определенного сорта, предварительно маркируют флуоресцентными метками (рисунок 17 (1)).

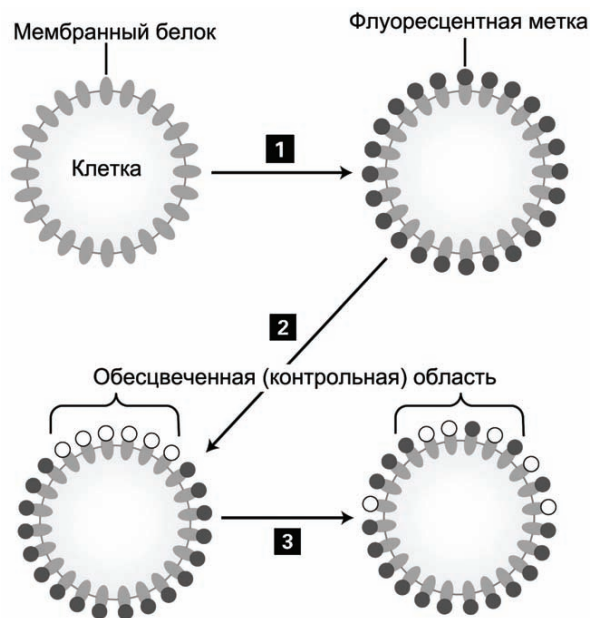


Рисунок 17 – Последовательность операций в методике FRAP

Затем лазерным лучом необратимо разрушают флуоресцентные метки в пределах определенной контрольной области, что приводит к резкому снижению интенсивности флуоресценции из этой области (рисунок 17(2)). С течением времени подвижные белки диффундируют за пределы этой области, а на их место приходят белки с необесцвеченными метками, что приводит к росту интенсивности флуоресценции от кон-

трольной области мембраны (рисунок 17(3)). Если часть данных белков неподвижно закреплена в мембране, то уровень флуоресценции после выхода кривой на насыщение будет ниже, чем до обесцвечивания, что позволяет определить относительные доли подвижных и неподвижных маркированных молекул. На рисунке 18 приведен пример такого рода кривой для случая, когда 50% меченых белков были неподвижными.

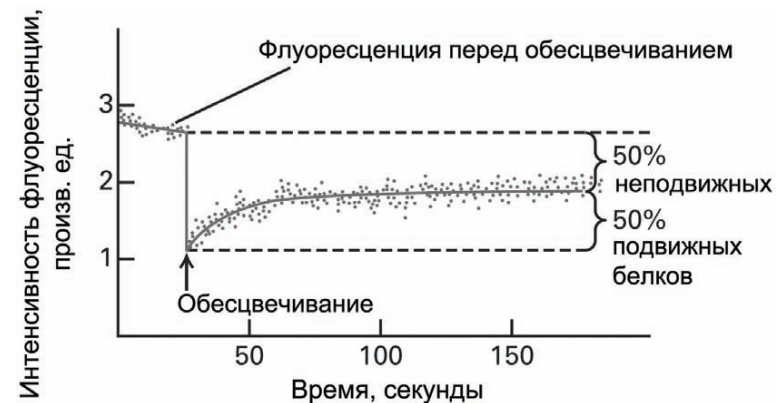


Рисунок 18 – Восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания

Из такой кинетической кривой может быть получено численное значение коэффициента диффузии маркированного белка в мембране.

В результате исследований методом FRAP было показано, что в плазматических мембранах фибробластов (основные клетки соединительной ткани позвоночных, синтезирующие коллаген) все фосфолипиды могут свободно перемещаться только на расстояние порядка 0,5 мкм, но не больше. По-видимому, *мембрана фибробласта* мозаично разбита на белковые и липидные "острова" размером порядка 1 мкм, и липиды могут свободно перемещаться только в пределах своего острова. Кроме того, оказалось, что коэффициент диффузии липидов в плазматической мембране в десять раз ниже, чем в "чистом" липидном бислое (10^{-8} см²/с и 10^{-7} см²/с, соответственно). На основании этих фактов можно сделать вывод, что липиды могут быть ассоциированы (обратимо связаны) с определенными мембранными белками.

2.3. Липидный состав мембран

Разные клеточные мембраны отличаются по липидному составу. Специфические функциональные и физические свойства разнообразных мембран эукариотической клетки определяются определенным белково-липидным составом каждой мембраны. Для примера в таблице 1 приведены примеры липидного состава различных мембран.

Таблица 1 – Липидный состав (%) некоторых биомембран. Обозначения липидов приведены выше.

Мембрана	PC	PE + PS	SM	Холестерол
Плазматическая мембрана (эритроцит человека)	21	29	21	26
Миелиновая мембрана (нейрон человека)	16	37	13	34
Плазматическая мембрана <i>E. coli</i>	0	85	0	0
Мембрана эндоплазматического ретикулула (крыса)	54	26	5	7
Мембрана аппарата Гольджи (крыса)	45	20	13	13
Внутренняя мембрана митохондрии (крыса)	45	45	2	7
Внешняя мембрана митохондрии (крыса)	34	46	2	11
Сторона преимущественной локализации (Э – эктоплазматическая, Ц – цитозольная, Э + Ц – обе)	Э	Ц	Э	Э + Ц

Из последней строки таблицы следует, что фосфолипиды и сфинголипиды асимметрично распределены между двумя монослоями липидного бислоя, а концентрация холестерина в обоих монослоях одинакова.

Существует множество факторов определяющих отличия в липидном составе различных мембран.

Например, различие в составе мембран эндоплазматического ретикулула и аппарата Гольджи, главным образом, обусловлено тем, что фосфолипиды синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме, а сфин-

голипиды синтезируются в аппарате Гольджи. В результате в мембранах аппарата Гольджи молекул сфингомиелина (SM) по отношению ко всем фосфорилированным липидам в шесть раз больше, чем в мембранах эндоплазматического ретикулума.

В других случаях транслокация мембран от одного клеточного компартмента к другому (в составе транспортных везикул) может селективно обогащать отдельные мембраны определенными липидами.

Различие в липидном составе может также определяться специальными функциями мембран. Например, плазматическая мембрана впитывающих эпителиальных клеток, выстилающих поверхность кишечника, имеет две существенно различные специфические области: *апикальную* поверхность, обращенную в сторону люмена кишечника и подвергающуюся действию значительно варьирующихся различных "внешних" факторов, и *базолатеральную* поверхность, которая контактирует с другими эпителиальными клетками и с внеклеточными структурами соединительной ткани, подстилающими эпителий (рисунок 19).

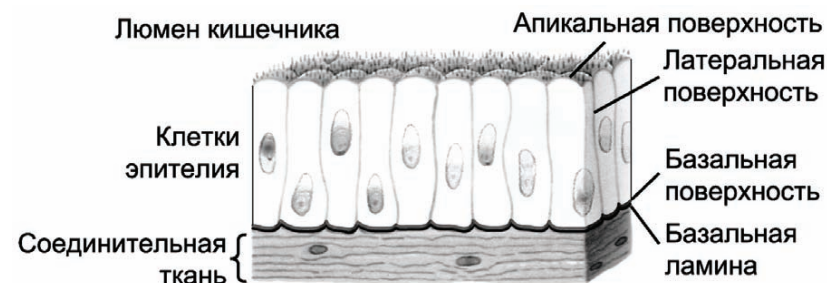


Рисунок 19 – Структура эпителия кишечника

В таких "полярных" клетках отношение сфинголипидов к фосфолипидам и к холестеролу в *базолатеральной* мембране составляет 0,5:1,5:1 – такое же соотношение в плазматических мембранах неполярных клеток, не подвергающихся значительным воздействиям.

А вот в *апикальной* мембране клеток кишечника, которая, наоборот, подвергается значительным воздействиям, это соотношение составляет 1:1:1. Такая относительно высокая концентрация сфинголипидов в этой

мембране увеличивает её прочность и стабильность за счёт образования *системы водородных связей* между гидроксильными группами (–ОН) в головках сфинголипидов.

2.4. Жидкокристаллическое состояние биомембран

Принципиальное отличие твердого тела от жидкости заключается в наличии или отсутствии дальнего порядка и в том, какое время молекулы вещества проводят вблизи положений равновесия между перескоками. Время оседлой жизни молекулы в жидкости много меньше, чем в твердом теле.

Липидные бислойные мембраны при физиологических условиях – жидкие, время оседлой жизни фосфолипидных молекул в мембране мало: $\tau \approx 10^{-7} - 10^{-8}$ с. Вместе с тем, молекулы в мембране размещены не беспорядочно, в их расположении наблюдается дальний порядок. Фосфолипидные молекулы находятся в двойном слое, а их гидрофобные хвосты приблизительно параллельны друг другу. Есть порядок и в ориентации полярных гидрофильных голов.

Физическое состояние, при котором *есть дальний порядок* во взаимной ориентации и расположении молекул, но *агрегатное состояние жидкое*, называется *жидкокристаллическим* состоянием.

Жидкие кристаллы могут образовываться не во всех веществах, а в веществах из "длинных молекул" (поперечные размеры которых меньше продольных) (рисунок 20).

Могут быть различные жидкокристаллические структуры:

- *нематическая* (нитевидная), когда длинные молекулы ориентированы параллельно друг другу (рисунок 20(б));
- *смектическая* (мылообразная) – молекулы параллельны друг другу и располагаются слоями (рисунок 20(в));
- *холестическая* – молекулы располагаются параллельно друг другу в одной плоскости, но в разных плоскостях ориентации молекул разные (повернуты на некоторый угол в одной плоскости относительно другой) (рисунок 20(г)).

Бислойная липидная фаза биологических мембран соответствует *смектическому* (рисунок 20(в)) жидкокристаллическому состоянию.

Жидкокристаллические структуры чувствительны к изменению температуры, давления, химического состава, к наличию электрического поля. Это определяет *динамичность* липидных бислойных мембран – изменение их структуры при различных, даже небольших изменениях внешних условий или химического состава.

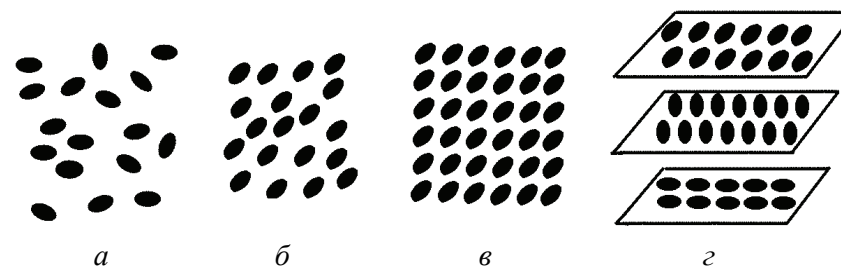


Рисунок 20 – Схема расположения молекул: а – в аморфной фазе, б – в нематическом состоянии, в – в смектическом состоянии, г – в холестерическом состоянии

Степень вязкости жидкокристаллической фазы мембраны и возможность её перехода в гелеобразное состояние зависят от липидного *состава* мембраны, *структуры* гидрофобных хвостов фосфолипидов и от *температуры*.

Гидрофобный эффект и ван-дер-ваальсовы взаимодействия вызывают агрегацию неполярных хвостов фосфолипидов. Причем для длинных хвостов с насыщенными С–С связями наблюдается максимальная агрегация, приводящая к образованию гелеобразных мембран. А фосфолипиды с более короткими жирнокислотными хвостами, у которых гораздо меньшая площадь взаимодействий с соседями, образуют более жидкие бислои.

Аналогично, и жесткие изгибы жирнокислотных хвостов (кинки) вследствие наличия ненасыщенных С=С связей приводят к ослаблению ван-дер-ваальсовых связей с соседями (по сравнению с насыщенными аналогами) и, следовательно, к "разжижению" бислоя.

Так, например, добавление ненасыщенной связи в 18-углеродный хвост стеариновой кислоты, температура плавления которой 69,6°C (рисунок 21(а)), приводит к образованию олеиновой кислоты, температура плавления которой 13,4°C (рисунок 21(б)). 18-Углеродная линолевая кислота, у которой две ненасыщенные связи в хвосте, имеет температуру плавления -9°C (рисунок 21(в)), а у линоленовой (рисунок 21(г)) и её изомера γ -линоленовой (рисунок 21(д)) кислоты с тремя кинками в хвосте температура плавления равна -17°C.

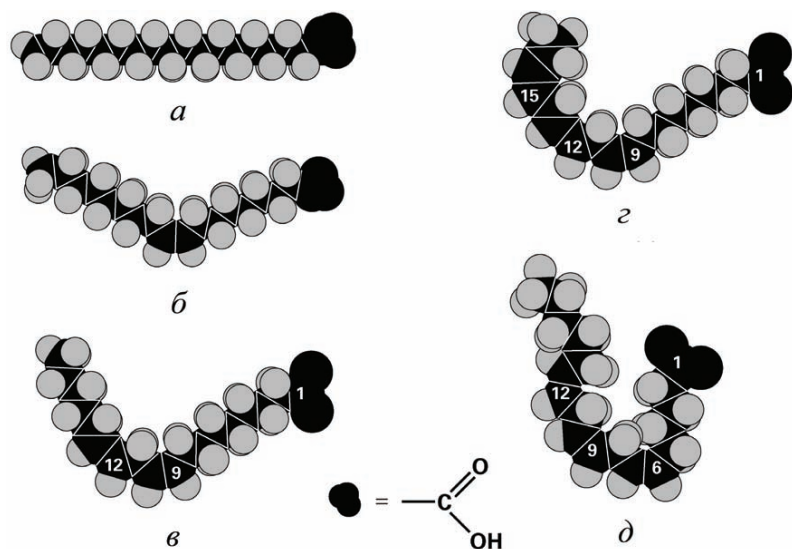


Рисунок 21 – 18-углеродные жирные кислоты: а – стеариновая, б – олеиновая, в – линолевая, г – линоленовая, д – γ -линоленовая

Нагрев высокоупорядоченного гелеобразного бислоя приводит к увеличению амплитуды движений в жирнокислотных хвостах липидов, что приводит к переходу в более жидкое, разупорядоченное состояние – фазовый переход *гель* → *жидкий кристалл* (рисунок 22).

При физиологических температурах внутренний гидрофобный слой природных мембран, как правило, имеет низкую вязкость и является *жидкостью*.

В *гель-состоянии* молекулы расположены еще более упорядочено, чем в жидкокристаллическом. Все гидрофобные углеводородные хвосты фосфолипидных молекул в *гель-фазе* полностью вытянуты строго параллельно друг другу (имеют полностью *транс*-конформацию).

В жидком кристалле за счет теплового движения возможны *транс-гаиш*-переходы, хвосты молекул изгибаются, их параллельность друг другу в отдельных местах нарушается, причем особенно сильно в середине мембраны. Это приводит к тому, что *толщина мембраны* в *гель-фазе* больше, чем в жидком кристалле.

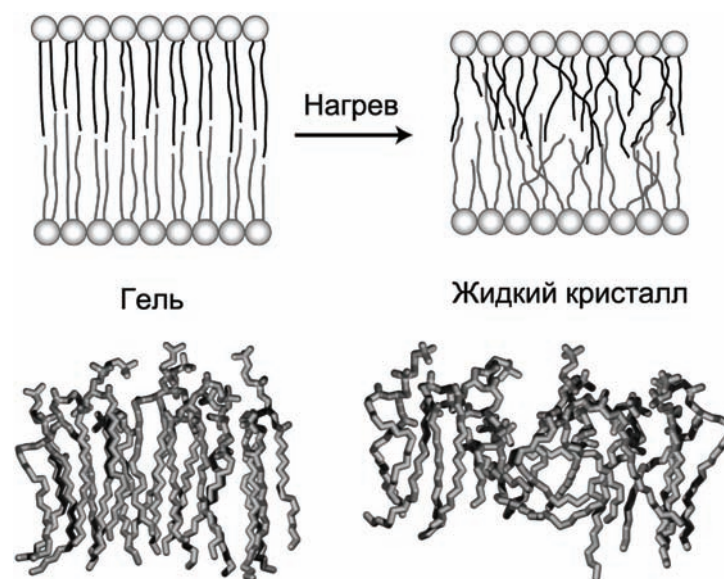


Рисунок 22 – Фазовый переход *гель-жидкий кристалл* при нагреве мембраны

При переходе из твердого в жидкокристаллическое состояние объем мембраны несколько увеличивается, поскольку значительно *увеличивается площадь* мембраны, приходящаяся на одну молекулу (от 0,48 нм² до 0,58 нм²). Для нормального функционирования мембрана должна быть в жидкокристаллическом состоянии.

Поэтому в живых системах при продолжительном понижении температуры окружающей среды наблюдается *адаптационное изменение* химического состава мембран, обеспечивающее понижение температуры фазового перехода. Температура фазового перехода понижается при увеличении числа *ненасыщенных* связей в жирно-кислотных хвостах. В хвосте молекулы может быть *до четырех* ненасыщенных связей. В зависимости от химического состава липидных мембран температура фазового перехода гель–жидкий кристалл может меняться от -20°C (для мембран из ненасыщенных липидов) до $+80^{\circ}\text{C}$ (для насыщенных липидов).

У микроорганизмов, растительных и животных клеток наблюдается увеличение числа ненасыщенных липидов в мембране при понижении температуры обитания.

Характерный пример *приспособления* клеточных мембран к температурным условиям – изменение температуры фазового перехода (за счет изменения химического состава мембранных липидов) ноги полярного оленя. Температура вдоль ноги полярного оленя от копыта до туловища может зимой меняться от -20°C до $+30^{\circ}\text{C}$. Клеточные мембраны у дистальной части ноги оленя содержат больше ненасыщенных фосфолипидов.

Предполагается, что *первичный механизм криоповреждений* (повреждений при охлаждениях) биологических мембран связан с фазовым переходом в гель-состояние. Поэтому биологические мембраны содержат большое количество холестерина, уменьшающего изменения в мембране, сопровождающие фазовый переход.

При фазовых переходах из гель- в жидкокристаллическое состояние и обратно в липидном бислое могут образовываться *сквозные каналы*, радиусом ~ 2 нм, по которым через мембрану могут переноситься ионы и низкомолекулярные вещества. Вследствие этого при температуре фазового перехода может *резко увеличиваться ионная проводимость* мембраны. Увеличение ионной проводимости мембран может спасти клетку от криоповреждений за счет увеличения выхода из клетки воды и солей, что препятствует кристаллизации воды внутри клетки.

У некоторых микроорганизмов биологические мембраны находятся при температурах, лишь немного превышающих температуру фазовых переходов липидов. Повышение ионной проводимости мембран при фазовом переходе, возможно, позволяет поддерживать метаболический обмен некоторых микроорганизмов. Большой интерес представляет этот эффект для объяснения термо- и хеморецепции.

Перенос ионов через мембрану лежит в основе формирования биопотенциалов, изменение ионной проводимости обуславливает нервный импульс. Не исключено, что нервный импульс, свидетельствующий о понижении или повышении температуры (*терморецепция*), образуется за счет изменения ионной проницаемости липидного бислоя при фазовом переходе мембранных липидов.

Некоторые виды *хеморецепции* также могут быть связаны с фазовым переходом мембранных липидов, поскольку фазовый переход может быть вызван не только изменением температуры, но и изменением химического состава окружающей среды. Например, при данной температуре фазовый переход из жидкокристаллического состояния в гель-состояние может быть вызван увеличением концентрации Ca^{2+} в физиологическом диапазоне от 1 до 10 ммоль/л в водном растворе, окружающем мембрану.

Для управления вязкостью мембран клетки используют прежде всего *холестерол*. Холестерол не может самостоятельно образовать бислой. При физиологических концентрациях холестерол *интеркалирует* (внедряется) между фосфолипидами. Холестерол ограничивает случайное движение полярных головок фосфолипидов на наружных сторонах мембраны, а его влияние на движение гидрофобных хвостов фосфолипидов зависит от концентрации.

При *обычных* концентрациях холестерина взаимодействие стероидных циклов с длинными гидрофобными хвостами фосфолипидов затрудняет их свободное движение, что увеличивает вязкость мембран.

При *снижении* концентрации холестерина стероидные кольца отсоединяются от липидных хвостов и даже расталкивают их, способствуя диспергированию липидной фазы, что приводит к снижению вязкости биомембран.

2.5. Влияние липидного состава на толщину и кривизну биомембран

Липидный состав данного участка бислоя непосредственно влияет на его *толщину*, что, в свою очередь, определяет, какие именно мембранные белки будут локализованы на этом участке мембраны. Экспериментально установлено, что сфингомиелин образует более гелеобразную и толстую мембрану, чем фосфолипиды (рисунок 23).

Аналогично, холестерол и другие молекулы, которые *увеличивают* вязкость мембраны, одновременно и *увеличивают* толщину мембраны.

Но в случае *сфингомиелина* его жирнокислотные хвосты и так *оптимально* стабилизированы, и добавление холестерола *не влияет* на толщину бислоя сфингомиелина.

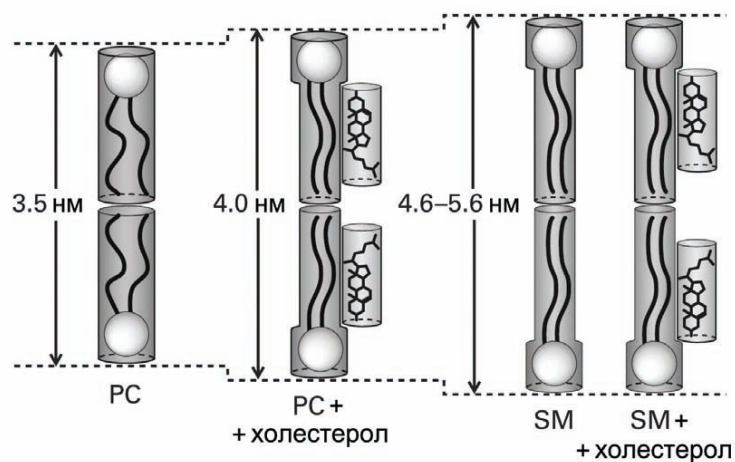


Рисунок 23 – Влияние липидного состава на толщину биомембраны

Другое свойство биомембраны, на которое существенным образом влияет локальный липидный состав – это *локальная кривизна мембраны*, которая зависит от относительных размеров полярной головки и неполярных хвостов тех фосфолипидов, которые входят в состав мембраны. Липиды с длинными хвостами и большими головками имеют цилиндри-

ческую форму, точнее, форму сплющенного цилиндра (например, PC), а с длинными хвостами и маленькими головками – коническую форму (например, PE) (рисунок 24(а)). Поэтому бислои, состоящие преимущественно из цилиндрических липидов, образуют относительно ровные участки мембраны, а там, где присутствует большое количество конических липидов, образуются изогнутые бислои с большой кривизной (рисунок 24(б)).

Такое влияние липидного состава мембраны на кривизну бислоя может иметь значение при образовании сильно изогнутых ямок и пузырьков на поверхности мембраны, внутриклеточных мембранных везикул и специализированных мембранных структур таких, как микроворсинки.

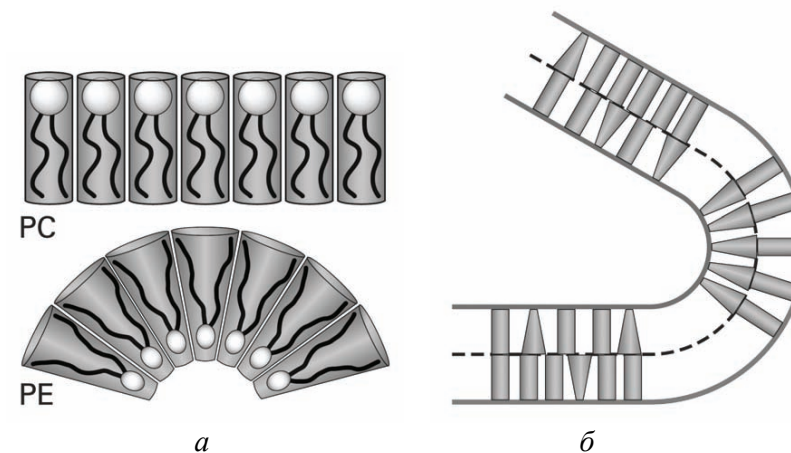


Рисунок 24 – Влияние формы молекулы липида: а – на локальную кривизну мембраны для случая фосфатидилхолина (PC) и фосфатидилэтаноламина (PE), б – на форму мембраны

2.6. Распределение липидов между цитозольной и экстраплазматической сторонами мембраны

Всем типам мембран присуща асимметрия в распределении липидов в пределах мембраны. Хотя большинство липидов присутствуют в обоих монослоях бислоя, их концентрация, как правило, в одном из монослоев

намного выше, чем в другом. Например, в плазматических мембранах эритроцитов человека практически все *сфингомиелины* и *фосфатидилхолины* (и те, и другие образуют относительно *менее* жидкие бислои) обнаружены только в пределах монослоя экзоплазматической стороны мембраны.

И, наоборот, *фосфатидилэтаноламин*, *фосфатидилсерин* и *фосфатидилинозитол* (которые образуют *более* жидкие бислои) преимущественно локализованы в цитозольном монослое мембраны.

Такое распределение липидов между монослоями бислоя может влиять на кривизну мембраны (рисунок 24).

Холестерол, в отличие от фосфолипидов, практически одинаково присутствует в обоих монослоях бислоя мембраны.

Относительное содержание определенных фосфолипидов может быть определено по результатам их гидролиза ферментами *фосфолипазами*, которые разрезают различные связи в гидрофильных головках фосфолипидов (рисунок 25).

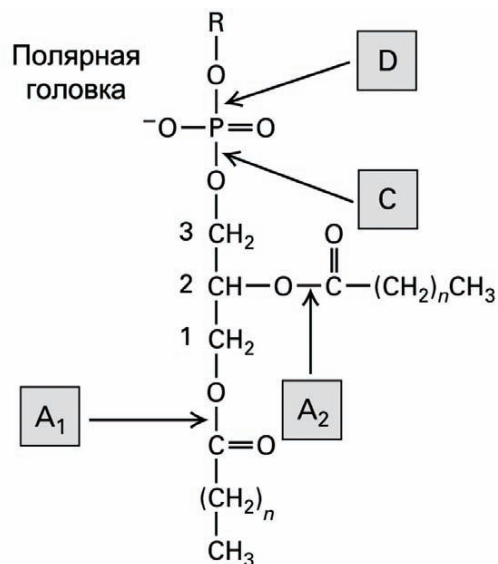


Рисунок 25 – Гидролиз фосфолипидов фосфолипазами. Цифрами отмечены атомы углерода глицерола

Каждый тип фосфолипаз разрезает определенную связь (показаны на рисунке 25 стрелками). Если фосфолипазы добавлять в межклеточное пространство, то они не могут гидролизовать фосфолипиды цитозольной стороны плазматической мембраны, поскольку эти фосфолипазы не способны преодолеть мембрану и попасть в цитозоль. Фосфолипаза C (PLC) (рисунок 25) является цитозольной, и она гидролизует фосфолипиды с цитозольной стороны плазматической мембраны.

В настоящее время пока ещё не ясно, каким образом возникает асимметричное распределение фосфолипидов в мембране. В чистых бислоях фосфолипиды не совершают самопроизвольный перескок (*флип-флон*) из одного монослоя в другой, поскольку такой переход предполагает перемещение полярной головки через гидрофобный слой мембраны, а этот процесс чрезвычайно *энергетически не выгоден*.

Возможно, асимметрия в распределении фосфолипидов определяется векторным синтезом липидов в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи. Сфингомиелин синтезируется на люминальной (экзоплазматической) стороне мембраны аппарата Гольджи, а фосфоглицериды, наоборот, синтезируются на цитозольной стороне мембраны эндоплазматического ретикулума, которая топологически эквивалентна цитозольной стороне плазматической мембраны. Но такое предположение не объясняет преимущественное расположение фосфатидилхолина на экзоплазматической стороне мембраны.

Перемещение этого и других типов липидов из одного монослоя мембраны в другой катализируется особыми АТФ-зависимыми транспортными белками, которые называются *флипазами*.

Избирательное расположение липидов на одной из сторон мембраны является физиологически *необходимым* для многих мембранных процессов.

Например, полярные головки всех *фосфорилированных* форм *фосфатидилинозитола* (PI) ориентированы в сторону цитозоля клетки. Некоторые из этих головок отделяются цитозольной *фосфолипазой C*, которая активизируется в результате действия на клетку многих гормонов.

Результатом такого действия фосфолипазы С является появление в цитозоле водорастворимого *фосфоинозитола* (IP), а в мембране липофильного *диацилглицерола* (DAG). Эти молекулы принимают участие в процессах внутриклеточной сигнализации.

Фосфатидилсерин тоже располагается преимущественно в цитозольном монослое плазматической мембраны. На первых стадиях стимуляции тромбоцитов сывороткой крови фосфатидилсерин на короткое время транслоцируется на эктоплазматическую сторону мембраны (повидимому, флипазой), где он активирует ферменты, обеспечивающие процесс сворачивания крови.

2.7. Модельные липидные мембраны

Биологические мембраны имеют, как правило, очень сложную структуру и отличаются сравнительно низкой устойчивостью к механическим, химическим и электрическим воздействиям. Поэтому для изучения основных физико-химических свойств клеточных мембран широко используются различные искусственные системы, которые моделируют процессы, протекающие в биомембранах.

Искусственные мембраны имеют довольно простую структуру и отличаются высокой устойчивостью, что позволяет широко варьировать условия проведения экспериментов и получать важную информацию о возможных механизмах функционирования биологических мембран.

Биологические мембраны можно назвать сложными мультиферментативными системами, информацию о структурной организации которых можно получить, используя метод реконструкции их на искусственных липидных мембранах.

Создание искусственных липидных мембран, являющихся физико-химическими аналогами природных биологических мембран, и составляет сущность модельного подхода в плане выяснения функциональной роли каждого отдельного компонента нативной биологической мембраны.

В качестве липидных моделей биологических мембран наиболее широкое применение нашли *три* типа:

- 1) *монослой* липидной природы на границе раздела фаз раствор электролита – воздух;
- 2) *плоские бислойные липидные мембраны*;
- 3) *липосомы*, замкнутые везикулярные образования, состоящие из одного или нескольких concentрических бислоев.

Каждая из этих моделей имеет свои достоинства и недостатки и применяется в зависимости от ее возможностей и цели исследования.

2.7.1. Мономолекулярные слои

Проще всего получить липидный монослой – для этого достаточно нанести на водную поверхность каплю органического растворителя с растворенным липидом и дать время растворителю испариться.

Если молекулы липида характеризуются *амфифильностью*, то есть имеют гидрофобные и гидрофильные участки, как, например, у фосфолипидов, то гидрофильная часть будет ориентироваться в водную фазу, а гидрофобная – в воздух.

Параметров, которые характеризуют *монослой*, немного: площадь, поверхностное натяжение, граничный скачок потенциала. Но, изучая эти величины, можно получить уникальную информацию об адсорбционных процессах, о белок-липидных взаимодействиях, фазовых переходах жирно-кислотных радикалов, геометрии и упаковке липидных молекул и другую. В некоторых случаях монослой оказался пригодным для изучения кинетики и механизма ферментативного катализа. Однако в силу того, что молекулярная пленка находится на границе раздела фаз, она не пригодна для изучения процессов переноса веществ через биологическую мембрану.

Для того, чтобы исследовать молекулярную организацию бислоев, зачастую необходимо уметь изготавливать мультислойные *ориентированные* мембраны. Одним из наиболее известных методов получения мультислоев является метод Ленгмюра-Блоджетта. В нём для получения мультислоя пластинка, на которую следует нанести мультислой, неодно-

кратно проводится через границу раздела фаз, на которую заранее нанесён монослой липида (рисунок 26).

Если пластинка *гидрофильна*, то полярные головки липидов будут направлены к поверхности пластинки. Поскольку при каждом цикле проводки часть липида удаляется с поверхности раздела фаз, необходимо стабилизировать монослой на желательном уровне путём уменьшения его площади на границе раздела фаз.

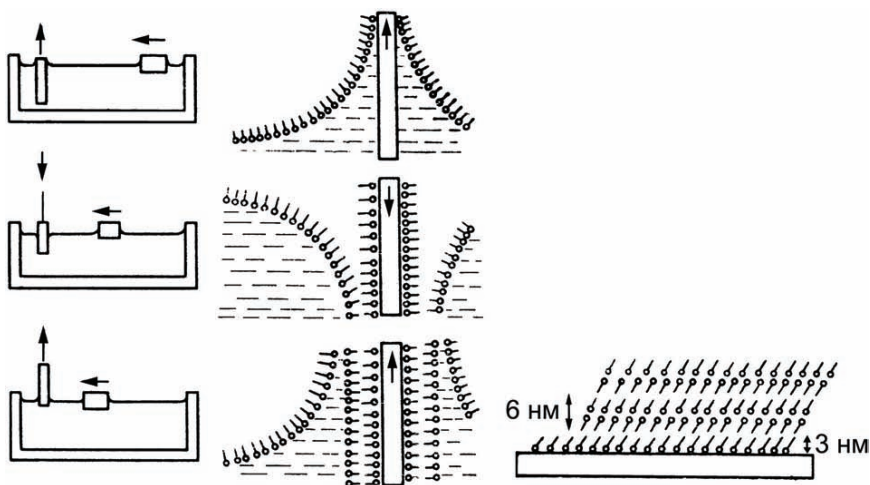


Рисунок 26 – Получение пленок Ленгмюра-Блоджетта на гидрофильной поверхности

При использовании пластинки с *гидрофобными* свойствами мультислой будут иметь обратную ориентацию молекул. Этот метод применяется также для получения монослоев с ориентированными трансмембранными белками.

2.7.2. Плоские бимолекулярные липидные мембраны

Плоские бимолекулярные липидные мембраны (БЛМ) формируются на отверстии в гидрофобном материале и разделяют два раствора электролита, состав которых можно целенаправленно изменять. Такие

мембраны, вероятно, представляют наиболее адекватную модель биологических мембран. Они взяты за основу при реконструкции различных функциональных мембранных комплексов, так как большинство современных данных говорит в пользу того, что все (за некоторым исключением) естественные мембраны содержат в своей основе липидный бислой, и самосборка мембран начинается именно с его образования, а затем уже происходит внедрение в липид белковых, полисахаридных и других компонентов, что и приводит к формированию мембранной системы.

В 1961 г. П. Мюллеру и сотрудникам удалось установить способность фосфолипидов, нанесенных в капле органического растворителя на отверстие в тефлоновой (фторопластовой) перегородке, самопроизвольно истончаться до толщины бислоя. Этот многостадийный процесс, в определенной степени моделирующий самосборку биомембраны, можно наблюдать при помощи микроскопа с осветителем. Мембраны по методу Мюллера получают на маленьких отверстиях диаметром около 1 мм в пластинке из пластика (например, фторопласта), погруженной в водную среду (рисунок 27).

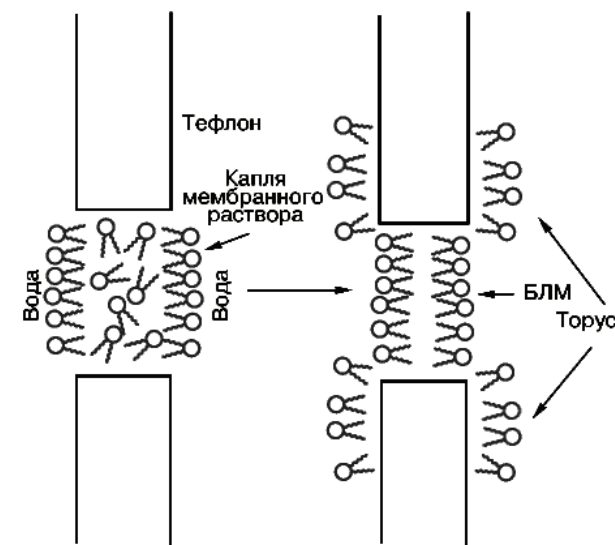


Рисунок 27 – Образование плоской бислоистой липидной мембраны (БЛМ)

На отверстие наносят *каплю* раствора липида (в спирте, хлороформе, гептане или других растворителях). Растворитель диффундирует из раствора в воду, и на отверстии остается пленка липида. Эта пленка самопроизвольно утончается до тех пор, пока не образуется бимолекулярный слой толщиной около 6 нм. Лишний липид собирается в виде *ободка-торуса* у краев отверстия.

При нанесении капли раствора фосфолипидов на отверстие в перегородке наблюдается так называемое *первичное почернение мембраны* – ее толщина значительно превышает длину волны видимого света. Затем мембрана истончается и дает интерференционную картину, так как толщина ее становится соизмеримой с длиной волны видимого света. Терминальная стадия процесса образования бислоя – *вторичное почернение* – наблюдается в результате уменьшения толщины мембраны до 5–6 нм. Истончение пленки обусловлено выталкиванием воды из густого внутреннего слоя мембраны в электролит и перемещением фосфолипидных молекул к краям отверстия.

В результате этих процессов на отверстии в гидрофобном материале формируется двойной фосфолипидный слой, причем полярные группы монослоев обращены в раствор, омывающий мембрану, а неполярные ориентированы внутрь структуры.

При помощи электродов, введенных в растворы электролита и подключенных к измерительному прибору, можно регистрировать сопротивление бислоя, его емкость и трансмембранную разность потенциалов (рисунок 28).

2.7.3. Липосомы

Не менее распространенной моделью биологических мембран являются липосомы. Они известны уже около 20 лет с тех пор как впервые было обнаружено, что при механическом воздействии на дисперсии фосфолипидов образуются сферические пузырьки. Эти образования, представляющие собой двойные монослои, в которых молекулы фосфолипида обращены неполярными частями друг к другу, а полярными частями в водный раствор, и были названы *липосомами*.

Обычно размер липосом колеблется от нескольких десятков нанометров для маленьких липосом (состоящих из одного двойного слоя, так называемых *мономеллярных* или однослойных, рисунок 29) до нескольких сотен нанометров или даже микрометра для крупных *мультиламеллярных* липосом (состоящих из многих двойных слоев).

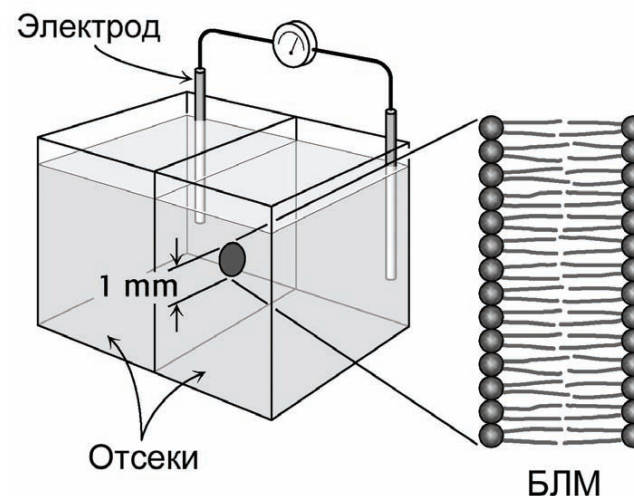


Рисунок 28 – Исследование плоской бислоистой липидной мембраны (БЛМ)

Бимолекулярные слои многослойной липосомы разделены водной средой. Толщина липидных слоев составляет, в зависимости от природы липидов, 6,5–7,5 нм, а расстояние между ними – 1,5–2 нм. Диаметр многослойных липосом колеблется в пределах от 60 нм до 400 нм и более.

Однослойные липосомы можно получить различными методами, например, из суспензии многослойных липосом, если обработать их ультразвуком. Диаметр однослойных липосом, полученных этим методом, составляет 25–30 нм. Разработаны и другие методы получения однослойных липосом, в том числе диаметром до 400 нм и более.

Липосомы служат *моделью* для исследований различных свойств клеточных биомембран, поскольку они представляют собой в некотором роде *прообраз* клетки. Они позволяют изучать многие свойства природ-

ных мембран, которые связаны в первую очередь с составом и состоянием фосфолипидной фазы. Биологические мембраны состоят из тех же фосфолипидных слоев, хотя и содержат в себе еще и многочисленные белковые молекулы.

Липосомы активно используют в медицине. Лекарственный препарат помещают внутрь липосомы и используют ее как фосфолипидную микрокапсулу для доставки лекарства в определенные органы и ткани. Липосомы не токсичны (при правильном подборе липидов), полностью усваиваются организмом, способны преодолевать некоторые биологические барьеры.

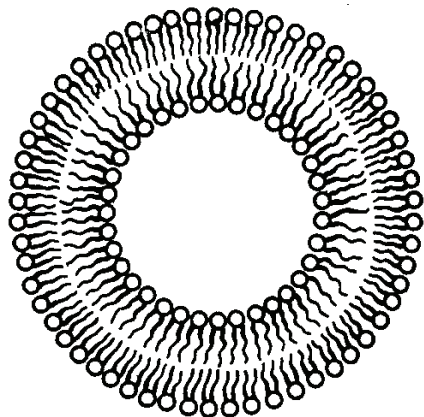


Рисунок 29 – Моноламеллярная липосома

Так, например, инсулин, заключенный в липосому, защищен от действия пищеварительных ферментов. В настоящее время выясняется возможность вводить этот препарат в липосомах перорально, что может избавить больных диабетом от необходимости систематических уколов.

В последние годы проводятся работы по разработке методов липосомальной терапии опухолей, ферментативной недостаточности, атеросклероза. Изучается возможность адресной доставки лекарственного препарата, заключенного в липосомах, к больному органу или даже к больному участку (в частности, к пораженному участку сердца). Для это-

го к липосоме присоединяется белковая молекула-антитело к соответствующему мембранному антигену органа-мишени. Липосомы с током крови разносятся по всему организму и задерживаются, оказавшись около органа-мишени.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Перечислите три основных класса липидов, из которых состоят биомембраны.
2. Каковы особенности строения молекул фосфоглицеридов? Какие фосфоглицериды наиболее распространены в природе?
3. Каковы особенности строения молекул сфинголипидов? Какие сфинголипиды наиболее распространены в природе?
4. Каковы особенности строения молекул стероидов? Какие стероиды наиболее распространены в природе?
5. Как определить коэффициент латеральной диффузии липидов методом FRAP?
6. Как методом FRAP было обнаружено существование липидных островов в биомембране?
7. Как распределены между монослоями бислоя фосфолипиды, сфинголипиды и холестерол?
8. Какова причина резкого превышения концентрации сфингомиелина в мембранах аппарата Гольджи по сравнению с мембранами эндоплазматического ретикулума?
9. Как различается отношение концентраций сфинголипидов к фосфоглицеридам и к холестеролу в апикальной и базолатеральной мембранах клеток эпителия кишечника? Какова причина такого отличия?
10. Какое состояние конденсированного вещества называется жидкокристаллическим? Перечислите различные возможные жидкокристаллические структуры.
11. Как влияет наличие и число ненасыщенных C=C связей в углеводородных хвостах липидов на их температуру плавления?

12. Охарактеризуйте фазовый переход биомембраны из жидкокристаллического в гель-состояние.
13. В чем заключается адаптационное изменение химического состава биомембран при продолжительном понижении температуры окружающей среды?
14. С чем связан первичный механизм криповреждений (повреждений при охлаждениях) биологических мембран?
15. Каким образом фазовый переход биомембраны из жидкокристаллического в гель-состояние может обеспечивать терморецепцию клеток?
16. Каким образом наличие молекул холестерина влияет на вязкость биомембраны?
17. В каких случаях добавление молекул холестерина увеличивает толщину мембраны, а в каких – нет?
18. Каким образом липидный состав влияет на кривизну биомембраны?
19. Какие модификации молекул липидов катализируют фосфолипазы?
20. Какое функциональное значение имеет асимметричное распределение фосфолипидов между цитозольной и экстраплазматической сторонами биомембраны?
21. Для чего используют модельные липидные мембраны?
22. Какие три типа модельных мембран нашли наиболее широкое применение?
23. Для чего используют мономолекулярные липидные слои?
24. Опишите метод Ленгмюра-Блоджетта получения мультислойных ориентированных мембран.
25. Опишите метод Мюллера получения плоской бислойной липидной мембраны?
26. Для чего используют плоские бислойные липидные мембраны?
27. В чем отличие мономеллярных и мультиламеллярных липосом?
28. Для чего используют липосомы?

3. МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В БИОМЕМБРАНАХ

3.1. Липидно-протеиновые кластеры в мембранах

Недавние исследования *опровергли* представление о том, что липидный монослой представляет собой смесь липидов, случайным образом распределенных в пределах монослоя. Сначала обнаружили, что после экстракции плазматических мембран детергентами в остатке присутствует повышенное количество холестерина и сфингомиелина. Поскольку эти два типа липидов образуют более упорядоченные и вязкие бислои, то было высказано предположение о том, что они образуют *микродомены*, которые назвали "*липидными плотами*" ("*lipid rafts*") или "*островками*", окруженными менее вязкими участками фосфолипидов, которые в первую очередь экстрагировались детергентами.

Эксперименты подтвердили это предположение. Например, с помощью флуоресцентной микроскопии была обнаружена агрегация липидов и белков в такие "острова" в мембранах.

На рисунке 30 показана схема эксперимента, в котором добавление флуоресцентно-меченых молекул токсина холеры (серые ромбы "1") и антител (Y-образные молекулы "2") позволило, используя флуоресцентный микроскоп, подтвердить, что *гликосфинголипиды* GM1 и липидзаякоренные мембранные *белки* PLAP – плацентарная щелочная фосфатаза (*placental alkaline phosphatase*) – объединяются в липидно-белковые "островки" в мембране.

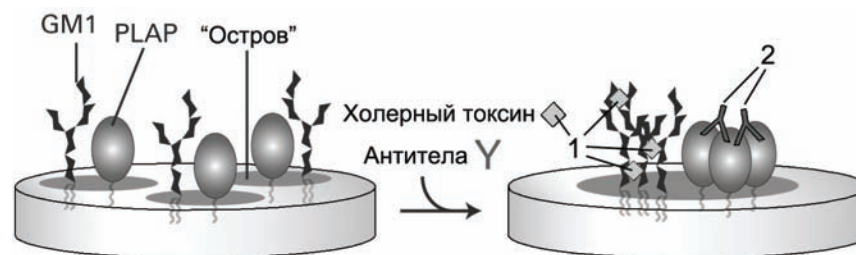


Рисунок 30 – Слияние мембранных островков в результате действия молекул холерного токсина (1) и антител к белкам PLAP (2)

Холерный токсин образует множественные кросс-линки с близко-расположенными молекулами GM1, а молекулы антител, специфических к PLAP, также способны присоединяться к двум расположенным рядом белкам, поэтому, после действия токсинов и антител образовывались бляшки ("патчи", *patches*) из гликолипидов и из белков PLAP.

Молекулы холерного токсина были помечены флуоресцентными маркерами *зеленого* цвета, а молекулы антител – *красного* цвета. Если бы GM1 и PLAP не были бы встроены в общие "островки", то "патчи", образовавшиеся в результате применения холерных токсинов и антител, были бы видны в микроскоп как, соответственно, зеленые или красные светящиеся пятнышки. Но в эксперименте были зарегистрированы преимущественно *желтые* пятна (желтый цвет образуется при смешивании красного и зеленого цветов). Следовательно, изначально GM1 и PLAP входили в состав липидно-белковых *кластеров-островков* и применение токсина и антител привело к объединению таких островков.

Иная картина наблюдалась для мембран, содержащих вместо белка PLAP трансмембранные белки рецепторов трансферрина TfR (*transferrin receptor*) (рисунок 31).

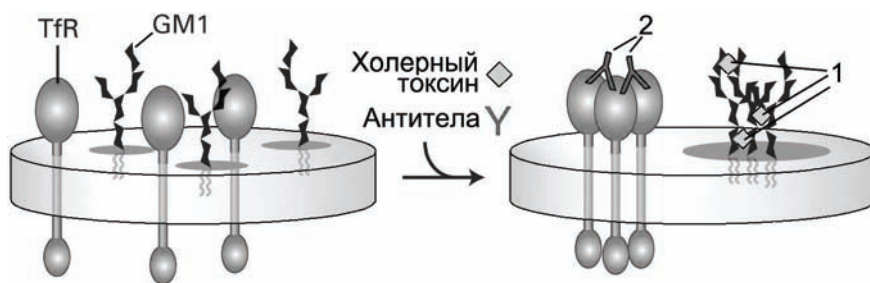


Рисунок 31 – Агрегация гликофинголипидов GM1 и трансферриновых рецепторов TfR в результате действия молекул холерного токсина (1) и антител к белкам PLAP (2), соответственно

Обработка такой мембраны теми же флуоресцентно мечеными молекулами холерного токсина (*зеленые*) и антителами к TfR (*красные*) привело к образованию преимущественно *зеленых* и *красных* пятен в поле

зрения флуоресцентного микроскопа. Следовательно, в этом случае молекулы гликофинголипидов GM1 под действием молекул холерного токсина образовывали свои (*зеленые*) бляшки, а белки TfR под действием антител – свои (*красные*) бляшки, что доказывало отсутствие белков TfR в липидно-протеиновых кластерах.

Липидно-протеиновые островки бывают различных размеров, но обычно они имеют диаметр ~50 нм. Они могут быть разрушены применением метил-β-циклодекстрина, который удаляет из мембраны холестерол, или использованием антибиотиков, таких как филипин (*filipine*), который связывает холестерол.

Это свидетельствует о важности холестерола в агрегации липидов и белков в острова-кластеры.

Помимо холестерола и сфинголипидов в состав островков входят многие клеточные мембранные белки-рецепторы, так же как и множество *сигнальных* белков, которые присоединяются к рецепторам и активируются ими. Эти липидно-протеиновые комплексы могут формироваться только в двумерной среде гидрофобного бислоя, и предполагается, что они способствуют *детектированию* внешних химических сигналов и *активации* соответствующих внутриклеточных откликов на эти сигналы.

В структурной стабилизации липидных островков важное место занимают так называемые липид-белковые и белок-белковые взаимодействия. Эти термины используют для обозначения широкого круга разнообразных, отличающихся по механизмам явлений, которые приводят к неравномерному распределению молекулярных компонентов в мембранах – *микрогетерогенности* мембран.

3.2. Липид-липидные взаимодействия

Термин липид-липидные взаимодействия обычно используют, чтобы выделить специфические взаимодействия, возникающие в мембранных системах вследствие неоднородности липидного состава.

Среди различных факторов, определяющих состояние липидов в мембранах, наибольшее значение имеют следующие межмолекулярные взаимодействия:

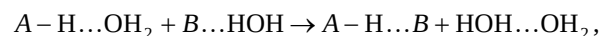
- 1) *электростатические силы* притяжения и отталкивания между заряженными полярными головками,
- 2) *стерические факторы*, учитывающие форму молекул липидов и характер расположения их головок и гидрофобных углеводородных хвостов,
- 3) *силы гидратации*,
- 4) *водородные связи* между головками липидов.

Гидратационные силы играют важную роль при взаимодействии фосфолипидных мембран между собой. Сохранение слоя воды толщиной 10–30 Å около наружной полярной поверхности мембраны препятствует сближению мембран и их непосредственному контакту. Для удаления такого слоя воды необходимо нарушить его состояние и затратить энергию, что собственно и лежит в основе проявления гидратационных сил.

Природа гидратационных сил отталкивания носит неэлектростатический характер, а проявляется *на фоне кулоновских* взаимодействий, резко возрастаая на коротких расстояниях.

Так, при сближении бислоев дигексадецилдиметиламиноацетата этот эффект становится определяющим на расстоянии ~ 11 Å между поверхностями. Однако добавление ионов кальция в систему может привести к их взаимодействиям с полярными группами, нарушению из-за этого гидратационного отталкивания и, как следствие, слипанию бислоев в структуру, не содержащую воды.

Гидратация липидов зависит от их *природы* и во многом определяет их физические свойства. Обычно меньшая гидратация наблюдается у липидов с донорными и акцепторными группами, принимающими участие в образовании *водородных* связей. Их пониженная гидратация объясняется участием групп полярных головок липидов в образовании водородных связей *между собой*, а не с окружающими молекулами воды. Для того чтобы это было возможно, необходимо разрушить водородные связи с водой липидных групп и образовать "свою" водородную связь:



где $A-H$ – водород-донорная, а B – водород-акцепторная группа двух липидных молекул. В качестве $A-H$ -групп выступают NH_3^+ , NH_2 , POH , COH , $COOH$, $HNC-O$, а B -группы включают PO^- , COO^- , $OC-O$, COC .

Такая реакция будет осуществляться, если при этом суммарная стабильность водородных образованных связей в правой части уравнения будет больше, чем у водородных связей с водой групп $A-H$ и B .

Освобождение с поверхности бислоя молекул воды, которое сопровождает этот процесс, вызывает увеличение энтропии системы, а это *компенсирует* энергетические затраты для разрыва водородных связей между липидами и водой.

Такого рода водородные связи легко разрываются и вновь возникают между другими липидами за времена $\sim 10^{-11}$ – 10^{-12} с. *Единая система лабильных водородных связей* способствует проявлению кооперативных свойств и, в частности, *повышает* температуру фазовых переходов гель – жидкий кристалл, блокируя дестабилизирующее действие электростатических сил отталкивания полярных головок, которое, наоборот, *снижает* температуру фазовых переходов.

Энергию взаимодействия системы, состоящей из двух липидных компонентов A и B , можно представить в виде парных потенциалов Φ_{AA} , Φ_{BB} и Φ_{AB} . Если разность

$$\Phi_{AB} - \frac{1}{2}(\Phi_{AA} + \Phi_{BB})$$

мала, то в системе будет наблюдаться равномерное распределение компонентов A и B .

Когда же потенциалы взаимодействия *сильно различаются*, становится возможным скомпенсировать уменьшение энтропии, которое происходит вследствие возрастания упорядоченности системы. В этом случае следует ожидать *неравномерного распределения* липидов и *расслоения* системы.

Поскольку основной вклад в энергию взаимодействия липидов в мембранах обусловлен дисперсионным взаимодействием углеводородных

цепей, эти эффекты наиболее явно проявляются в мембранах, сформированных из липидов, *резко различающихся* длиной углеводородных цепей (таблица 2).

Таблица 2 – Основные жирные кислоты фосфолипидов

Название кислот	Обозначение	Строение (химическая формула)
Насыщенные жирные кислоты		
Миристиновая	C14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Пальмитиновая	C16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Стеариновая	C18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Ненасыщенные жирные кислоты		
Олеиновая	C18:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Линолевая	C18:2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Арахидоновая	C20:4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$

Так, в мембранах из ДМФХ (димиристоилфосфатидилхолин, 14 углеродных атомов) и ДСФХ (дистеарилфосфатидилхолин, 18 углеродных атомов) при любом объемном соотношении компонентов (до 75% ДСФХ) наблюдаются *два отдельных фазовых перехода* (при 23 и 58°C, соответственно), амплитуда которых пропорциональна мольной доле компонентов в мембране. Это означает отсутствие смешивания компонентов в твердой фазе. При $23^\circ\text{C} < T < 58^\circ\text{C}$ система представляет собой *двумерный раствор* кристаллических доменов ДСФХ в жидкокристаллической матрице из ДМФХ. Ненасыщенные липиды обычно также плохо смешиваются в твердой фазе с насыщенными липидами.

Иную картину можно наблюдать, когда мембраны сформированы целиком из насыщенных липидов, слабо различающихся длиной углеводородных цепей. В таком случае при любом соотношении компонентов равномерное распределение обнаруживается как в "твердом", так и в "жидком" состоянии. Например, в мембранах из ДПФХ (дипальмитоилфосфатидилхолин, 16 углеродных атомов) и ДСФХ (18 углеродных атомов) регистрируется *один фазовый переход*, который постепенно

смещается от 41 до 58°C при изменении доли ДСФХ в смеси от 0 до 100%, соответственно.

3.3. Липид-белковые взаимодействия

В основе липид-белковых взаимодействий лежат межмолекулярные дисперсионные и электростатические силы, водородные связи или другие эффекты связывания.

Липид-белковые взаимодействия и обусловленные ими явления условно классифицируют следующим образом:

- 1) взаимодействия белок – липидный монослой;
- 2) взаимодействия белок – липидный бислой;
- 3) липид-белковые взаимодействия в мембранах, включающие липид-зависимые ферменты.

Взаимодействие белков с липидными монослоями обнаруживается при включении в монослой радиоактивно меченных белков (альбумин, цитохром *c*). Электростатические взаимодействия между белками и монослоем проявляются в виде резкого изменения сорбции белков на заряженных монослоях при отклонении от изоэлектрической точки белков.

В опытах с фосфолипазами показано, что электростатические взаимодействия определяют начальные этапы взаимодействия фермент – липидный монослой. Начальные этапы существенно облегчают последующую правильную стереохимическую ориентацию компонентов фермент-субстратного комплекса.

Взаимодействие белок – липидный бислой это высокоспецифичный и многостадийный процесс, характеризующийся наряду с поверхностной сорбцией внутримембранным встраиванием белков. Экспериментальным критерием встраивания белков в липидный бислой обычно служит изменение ионной проницаемости мембран.

В модельных экспериментах встраивание мембранных белков в искусственные бислои играет решающую роль в их успешной функциональной реконструкции.

Липид-белковое взаимодействие в мембранах проявляется при образовании внутри мембран *специфического липидного окружения* вокруг белковых молекул. Такие липиды называются связанными или *аннулярными* (от англ. *annular* – кольцеобразный).

С помощью метода ЭПР доказано *изменение* подвижности и характера упаковки углеводородных цепей под влиянием белков. Более того, методами ЭПР, ЯМР, флуоресценции и другими показано, что возмущающее действие различных интегральных и периферических белков (цитохром-с-оксидаза, цитохром *c*, полилизин, миелин, родопсин, белки тилакоидных мембран и др.) распространяется вплоть до *четвертого слоя* липидов, окружающих молекулу белка.

Функциональное значение аннулярных липидов обычно интерпретируют, исходя из экспериментальных наблюдений, согласно которым *большая активность* белков проявляется в *менее вязком* липидном окружении. Это показано, например, для *цитохром-с-оксидазы*, встроенной в искусственные липидные мембраны разного состава, или в случае АТФаз в мембранах ауксотрофных микроорганизмов.

В настоящее время описано несколько десятков мембранных ферментов, активность которых зависит от присутствия липидов, в таблице 3 перечислены некоторые из них. Некоторые из них, например митохондриальные электрон-транспортные белки, *слабо чувствительны* к липидному *составу*, но *эффективно активируются* суммарной липидной фракцией, содержащей некоторое количество ненасыщенных липидов.

Для достижения максимальной активности *других* ферментов требуются липиды *строго определенного* состава. Эти ферменты проявляют специфичность по отношению к полярным *головкам* липидов и слабо зависят от жирнокислотного состава. В противоположность этому функциональная активность, например, *родопсина* зависит от *длины* углеводородных цепей липидов.

Липидная зависимость активности мембранных ферментов может отчетливо проявляться в условиях селективной экстракции мембранных липидов и при последующем добавлении определенных липидов к делипидизированным мембранам. Так, мягкая эфир-бутанольная экстракция плазматических мембран печени приводит к снижению базальной адени-

латциклязной активности и гормон-стимулируемых ответов. Базальная активность полностью восстанавливается при добавлении к мембранам фосфатидилинозитола.

Таблица 3 – Необходимые липиды для реализации специфической ферментативной активности биомембран

Ферментативная активность (функция)	Необходимые липиды
Митохондриальный электронный транспорт	Общие липиды митохондрий
Na ⁺ /K ⁺ -АТФаза	Фосфатидилсерин, фосфатидилглицерол
Гликозо-6-фосфатаза, Ca ²⁺ -АТФаза	Фосфатидилэтаноламин, лизофосфатидилхолин, фосфатидилхолин, нейтральные детергенты
Комплекс переносчиков НАД-цитохром-с-редуктазы	Фосфатидилхолин / лизофосфатидилхолин (1:1)
Стеарил-коэнзим-А-дегидрогеназа	Фосфолипиды, триглицериды, жирные кислоты
β-Гидроксibuтиратдегидрогеназа	Фосфатидилхолин

Почти полное восстановление гормон-стимулируемой активности наблюдается при добавлении к мембранам фосфатидилсерина. Предполагают, что взаимодействие аденилатциклазы с определенными липидами мембран необходимо для проявления активности каталитического центра и образования активного гормон-рецепторного комплекса.

3.4. Белок-белковые взаимодействия

Белок-белковые взаимодействия проявляются в мембранах в виде *обратимой внутримембранной агрегации* мембранных белков, часто сопровождающейся изменением функциональной и ферментативной активности системы.

Так, в мембранах эритроцитов равномерно распределены белковые внутримембранные частицы, обратимо агрегирующие при значениях pH ниже 5,5. Агрегация чувствительна к составу водной фазы; при возрастании концентрации электролитов и низких значениях pH агрегация приостанавливается. Эта внутримембранная агрегация белковых частиц в эритроцитах коррелирует с изменением распределения поверхностных рецепторов.

К настоящему времени выявлено, что *циклы агрегации-деагрегации* белков в клеточных мембранах – широко распространенное явление, проявляющееся в следующих клеточных процессах:

- 1) пиноцитоз,
- 2) на ряде стадий клеточного цикла,
- 3) при взаимодействии и слиянии мембран.

Полагают, что в основе агрегационных взаимодействий могут лежать следующие явления

- а) силы электростатического характера,
- б) более сложный характер межмолекулярного взаимодействия, определяемый особенностями липидного окружения белков,
- в) локальная кристаллизация липидов в мембранах.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Опишите эксперимент, в котором было доказано существование липидно-протеиновых кластеров-островков.
2. Что называется микрогетерогенностью биомембраны?
3. Какие четыре вида межмолекулярных взаимодействий определяют состояние липидов в биомембранах?
4. Какую роль играют гидратационные силы при взаимодействии фосфолипидных мембран между собой?
5. Каким образом лабильная система водородных связей между молекулами липидов блокирует дестабилизирующее действие электростатических сил отталкивания полярных головок липидов?

6. Каким образом различие в длине углеводородных хвостов в молекулах фосфолипидов связано с числом фазовых переходов, которые наблюдаются в мембране, состоящей из этих фосфолипидов?
7. Какие три вида липид-белковых взаимодействий существуют в биомембранах?
8. Как взаимодействие белков с липидными монослоями влияет на функционирование белков? Приведите примеры.
9. Что такое аннулярные липиды, и как они влияют на функционирование мембранных белков?
10. Активность каких мембранных ферментов зависит от присутствия липидного окружения?
11. Как экспериментально регистрируется липидная зависимость активности мембранных ферментов?
12. В каких клеточных процессах проявляются белок-белковые взаимодействия в виде циклов агрегации-деагрегации белков?
13. Какие три типа явлений могут лежать в основе агрегационных белок-белковых взаимодействий в биомембранах?

4. МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ

Белки называют *мембранными*, если они интегрированы в фосфолипидный бислой или расположены на поверхности этого бислоя. Именно мембранные белки *определяют* специфическую активность определенной мембраны или определенного участка данной мембраны.

В зависимости от типа клеток и от положения мембраны в клетке плотность белков в мембране и их состав могут *значительно различаться*. Например, внутренняя мембрана митохондрии на 78% состоит из белков, а миелиновая мембрана – только на 18%. Именно высокое содержание фосфолипидов в миелиновой мембране обеспечивает электрическую изоляцию нервных клеток от окружения.

Важность мембранных белков подчеркивает тот факт, что порядка *трети* дрожжевых генов кодируют именно мембранные белки. А в многоклеточных организмах наблюдается ещё большее относительное

преобладание по количеству мембранных белков, поскольку они необходимы ещё и для обеспечения межклеточных контактов.

Липидный бислой представляет собой уникальную двумерную гидрофобную среду для мембранных белков. Некоторые белки погружены в этот слой. Другие белки присоединены к одной из внешних сторон – эктоплазматической или цитозольной – мембраны.

Те *домены* мембранных белков, которые расположены с *эктоплазматической* стороны, обычно связываются с другими молекулами, такими, как внеклеточные сигнальные белки, ионы и малые метаболиты (например, глюкоза, жирные кислоты), или соединяются с адгезивными молекулами других клеток или с внеклеточными структурами.

Домены внутри плазматической мембраны (*трансмембранные*), в частности те, которые формируют каналы и поры, способствуют перемещению молекул внутрь и наружу из клетки.

А те домены, которые расположены с *цитозольной* стороны мембраны, имеют широкий спектр функций, начиная от заякоривания цитоскелета и до инициации систем внутриклеточной сигнализации.

Во многих случаях и функцию новых мембранных белков, и топологию пространственного расположения их полипептидных цепей можно предсказать на основе их гомологического подобия с другими, уже хорошо исследованными белками.

4.1. Способы взаимодействия белков с мембранами

Мембранные белки по характеру белково-мембранного взаимодействия могут быть отнесены к одному из *трех* типов белков (рисунок 32):

- 1) интегральные (трансмембранные) белки,
- 2) белки, присоединенные к липидам (липид-связанные),
- 3) периферические белки.

Интегральные мембранные белки, которые также называют *трансмембранными* белками, проходят мембрану насквозь и состоят из трех частей – цитозольной, трансмембранной и эктоплазматической.

Цитозольные и эктоплазматические домены имеют гидрофильную поверхность, которая взаимодействует с водным окружением с цитозольной и эктоплазматической стороны мембраны, соответственно. Эти домены подобны другим водорастворимым белкам по аминокислотному составу и пространственной структуре. В отличие от них трансмембранная часть белковой молекулы содержит на поверхности большое число гидрофобных аминокислот, которые взаимодействуют с внутренней углеводородной частью фосфолипидного бислоя.

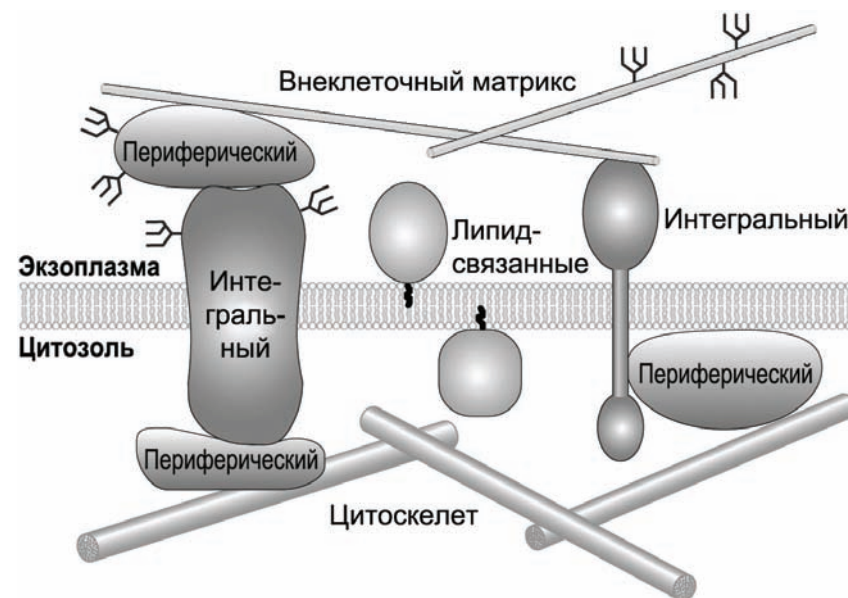


Рисунок 32 – Три типа мембранных белков

Во *всех* известных на сегодняшний день *интегральных* белках трансмембранный домен содержит одну или более α -спиралей или множество β -структур.

Кроме того, большинство трансмембранных белков гликозилировано сложными и разветвленными олигосахаридами, которые присоединены к одной или нескольким аминокислотам белка. Во всех случаях такие углеводные цепи располагаются с эктоплазматической стороны.

Липид-связанные мембранные белки ковалентно связаны с одной или более липидными молекулами. Гидрофобная углеводородная цепь этого липида встроена в один из монослоёв мембраны и выполняет функцию якоря для липид-связанного (заякоренного) белка. Сама же полипептидная цепь белка не проникает в фосфолипидный бислой.

Периферические мембранные белки не взаимодействуют с гидрофобным слоем фосфолипидной мембраны. Как правило, они связываются с мембраной либо непосредственно с полярными головками липидов, либо опосредованно – с интегральными мембранными белками.

Периферические белки располагаются и с цитоплазматической, и с цитозольной стороны плазматической мембраны.

Кроме этих трех типов белков, которые достаточно прочно и определенно присоединяются к мембране, с цитозольной стороны с мембраной *ассоциируются*, как правило, посредством периферических (адаптерных) белков, ещё и белки *филаментов* цитоскелета (рисунок 32).

Такое ассоциирование с цитоскелетом обеспечивает *механическую опору* для различных клеточных мембран и *распространение информации* (передачу сигналов) через мембраны.

Наконец, периферические белки внешней стороны плазматической мембраны и экзоплазматические домены интегральных мембранных белков часто присоединяются к компонентам *внеклеточного матрикса* или к *клеточным стенкам* соседних бактериальных или растительных клеток.

4.2. Строение трансмембранных доменов

Трансмембранные α -спирали. У водорастворимых белков обнаружены сотни определенных белковых мотивов (или повторов). В отличие от них количество "стандартных" мотивов в интегральных мембранных белках достаточно невелико. Чаше других встречается трансмембранная α -спираль.

Интегральные белки, содержащие трансмембранные α -спиральные домены, удерживаются в мембране благодаря гидрофобному взаимодей-

ствию со специфическими липидами, а также, возможно, ионному взаимодействию с полярными головками фосфолипидов.

Наглядным примером такого рода белков является *гликопротеин А*, основной белок плазматической мембраны эритроцитов. Его трансмембранным доменом является одна α -спираль (рисунок 33).

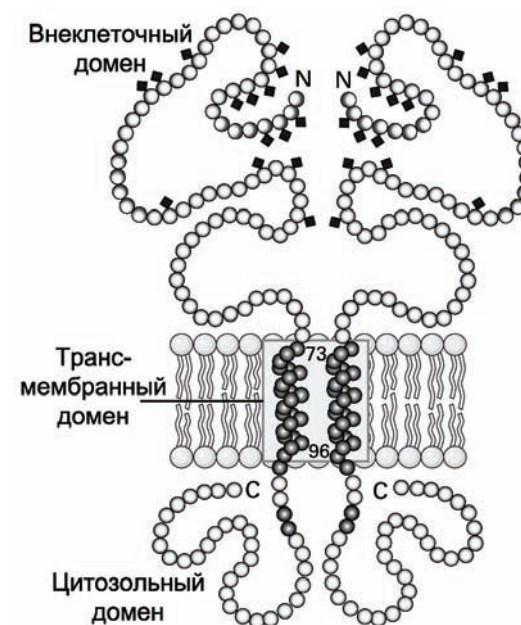


Рисунок 33 – Схема димера гликопротеина А

Обычно трансмембранная α -спираль состоит из 20-25 гидрофобных аминокислот. У гликопротеина А трансмембранная α -спираль состоит из 23 аминокислот. Длина такой спирали составляет порядка 3,75 нм, что хорошо согласуется с данными о толщине липидного бислоя.

В α -спирали гидрофобные аминокислотные радикалы ориентированы *наружу* и взаимодействуют с гидрофобным липидным окружением, а карбонильные (C=O) и имино- (NH) группы, которые формируют внутри-спиральные водородные связи, расположены *внутри* α -спирали и экрани-

рованы от липидной среды аминокислотными остатками. Энергетически выгодно двум гликопротеинам А образовать *димер* за счет формирования мотива "скрученная спираль" (*coiled-coil*) трансмембранными спиральями.

Такая димеризация белков за счет формирования скрученных спиралей является распространенным явлением. Например, многие мембранные рецепторы активируются только после димеризации.

Существует обширное "семейство" (более 150) интегральных мембранных белков, характеризующихся наличием *семи* трансмембранных α -спиралей. К таким "семиспиральным" многопроходным белкам относятся G-протеин-связанные рецепторы, играющие ключевую роль в клеточной сигнализации.

Общие принципы построения белков этого семейства иллюстрирует структура *бактериородопсина* (рисунок 34), который выполняет функцию фоторецептора в определенных бактериях.

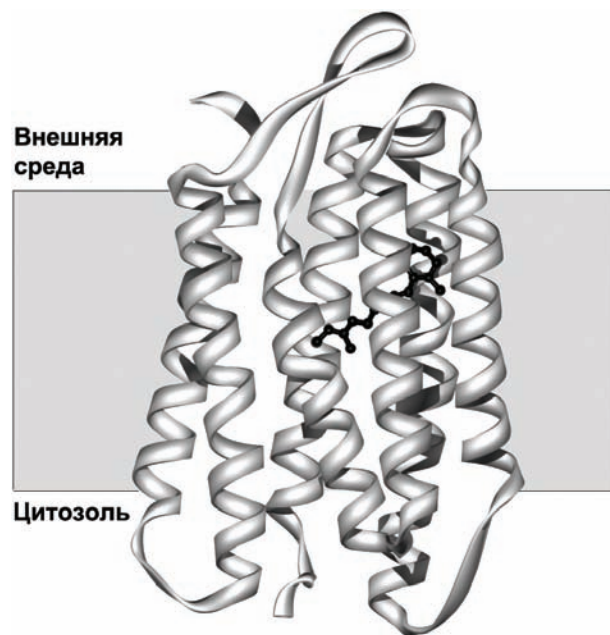


Рисунок 34 – Схема бактериородопсина. Молекула ретиналя изображена черным цветом

К одной из трансмембранных α -спиралей ковалентно присоединена молекула *ретиналя*. В результате *поглощения* кванта света молекула ретиналя изменяет *конформацию* (рисунок 35), что стимулирует конформационный переход в белковой молекуле, в результате чего происходит *транслокация* одного протона из цитозоля через мембрану во внеклеточное пространство.

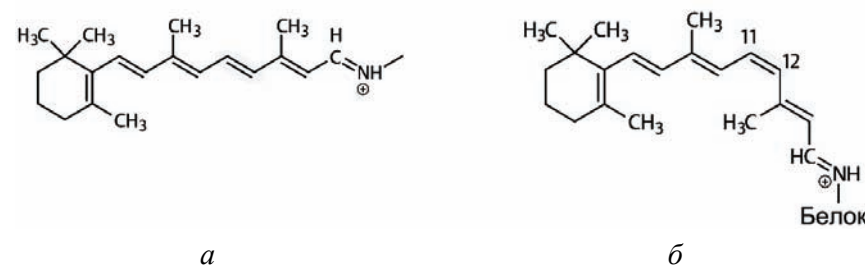


Рисунок 35 – Конформации молекулы ретиналя: а – полностью-транс-ретиналь, б – 11-цис-ретиналь

Бактериородопсин работает как протонный насос, создавая за счет энергии света градиент концентрации протонов на мембране. Этот протонный градиент используется затем для синтеза АТФ мембранными F_0F_1 -комплексам (АТФ-синтазами). Экспериментальное определение атомной структуры трансмембранного домена показало, что, действительно, практически все аминокислоты на периферии трансмембранного домена бактериородопсина являются гидрофобными и взаимодействуют с углеводородной внутренней частью липидного бислоя.

Другим важным классом интегральных мембранных белков являются *ионные каналы*, структура и функции которых будут подробно рассмотрены во втором разделе курса. Ионные каналы являются преимущественно *тетрамерными* белками. Каждая из четырех субъединиц имеет как минимум две трансмембранные α -спирали, а все вместе α -спирали всех субъединиц формируют селективный водный канал, который пропускает только ионы данного типа. Аминокислоты, которые "выстилают" этот канал являются полярными и гидрофильными, а

периферические аминокислоты трансмембранного домена ионного канала, так же как и в случае бактериородопсина, являются гидрофобными.

Во многих ионных каналах воздействие внешних факторов, таких как связывание с лигандом, изменение мембранного потенциала, механическое воздействие, приводит к изменению взаимного расположения α -спиралей, что используется для регулировки потока ионов через мембрану.

Трансмембранные β -структуры. Класс интегральных белков *порины* радикальным образом отличается от рассмотренных выше трансмембранных белков. Несколько типов поринов обнаружены как в наружной клеточной стенке грамм-отрицательных бактерий, таких как *E. coli*, так и во внешних мембранах митохондрий и хлоропластов. Клеточная стенка защищает кишечные бактерии от опасных внешних факторов (например, от антибиотиков, солей желчных кислот, протеаз), но она проницаема для малых водорастворимых молекул: пропускает внутрь питательные вещества, а наружу – продукты жизнедеятельности бактерии. Порины в клеточной стенке *E. coli* (рисунок 36) пропускают внутрь дисахариды и фосфаты.

Полипептидные последовательности поринов состоят преимущественно из *полярных* аминокислот и *не содержат* сплошных гидрофобных сегментов, которые характерны для интегральных белков с трансмембранными α -спиралями.

Порины являются *тримерными* белками, состоящими из трех идентичных субъединиц. Каждая из субъединиц образована шестнадцатью β -структурами, которые формируют цилиндрическую конструкцию с каналом по центру (рисунок 36).

В отличие от обычных водорастворимых глобулярных белков у порина *гидрофобная поверхность* и *гидрофильная внутренняя часть*, в этом смысле порины представляют собой "вывернутые наизнанку" глобулярные белки. В мономере порина в каждой из β -структур наружу ориентированы гидрофобные аминокислотные остатки, которые все вместе образуют гидрофобный пояс, опоясывающий белковый мономер по периметру.

Аминокислотные остатки, которые ориентированы *внутрь* канала являются преимущественно *гидрофильными*, они выстилают пору, через которую малые водорастворимые молекулы могут проходить через мембрану. Две цепочки ароматических (содержащих углеродные циклы) аминокислот, показанных на рисунке 36, и алифатические (нециклические) аминокислоты в составе β -структур помогают правильно ориентировать порин в мембране.

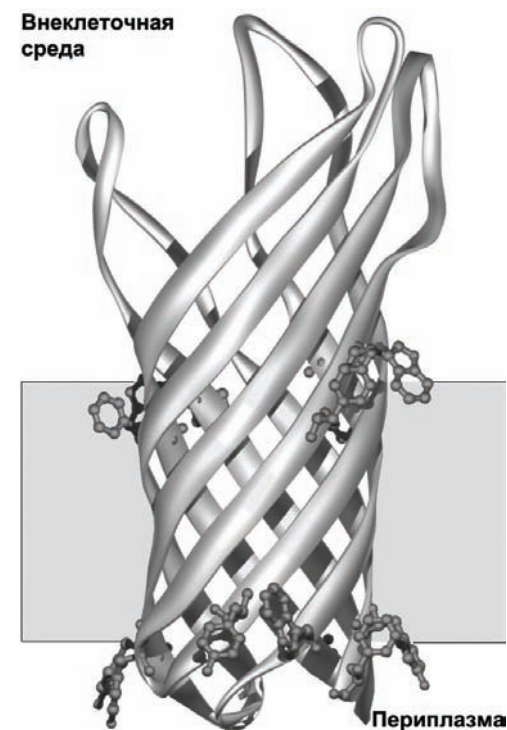


Рисунок 36 – Схема субъединицы порина OmpX клеточной стенки *E. coli*

На рисунке 37 представлена схема ещё одного *бактериального порина*, находящегося в наружной мембране бактерии *Rhodospseudomonas blastica*. Этот порин построен из *шестнадцати* β -форм вторичных структурных сегментов полипептидной белковой цепи, которые образуют

цилиндрическую пору – пассивный канал во внешней мембране бактерии. Пору проходит по оси такого цилиндра.

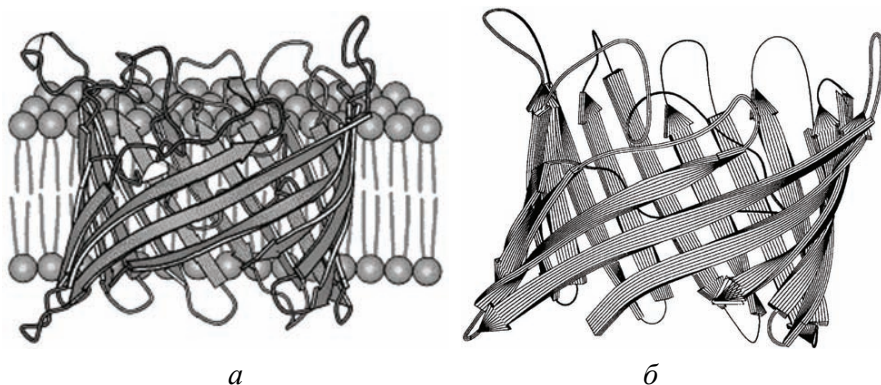


Рисунок 37 – Структура бактериального порина *Rhodopseudomonas blastica*: *a* – интегрированный в биомембрану порин, *б* – пространственное расположение шестнадцати β -форм вторичных структурных сегментов белковой цепи порина

Плазматические мембраны животных клеток содержат водные каналы, которые называются *аквапорины*. Подобно большинству интегральных мембранных белков аквапорины имеют множественные трансмембранные α -спирали. Поэтому, несмотря на свое название, аквапорины *отличаются* от поринов как по структуре, так и функционально – они пропускают через себя только молекулы воды.

4.3. Взаимодействие белков с мембраной и цитоскелетом

Липид-связанные белки и углеводородные якоря. В эукариотических клетках определенные ковалентно присоединенные липиды фиксируют ("ставят на якорь" (*anchor*), "заякоривают") некоторые белки на одной из поверхностей плазматической мембраны или на определенных внутриклеточных мембранах. У таких белков, которые поставлены на *липофильный якорь*, липидная углеводородная цепь погружена в липидный бислой, но сам белок не погружается в мембрану.

Мембранными якорями являются жирные кислоты (ацильные остатки *пальмитиновой* (C_{16}) или *миристиновой* (C_{14}) кислоты) или изопреноиды (пренильные остатки *фарнезол* (C_{15}) или *геранилгераниол* (C_{20})). Кроме того, используется *гликозилированный фосфатидилинозитол* (glycosylphosphatidylinositol, GPI) (рисунок 38).

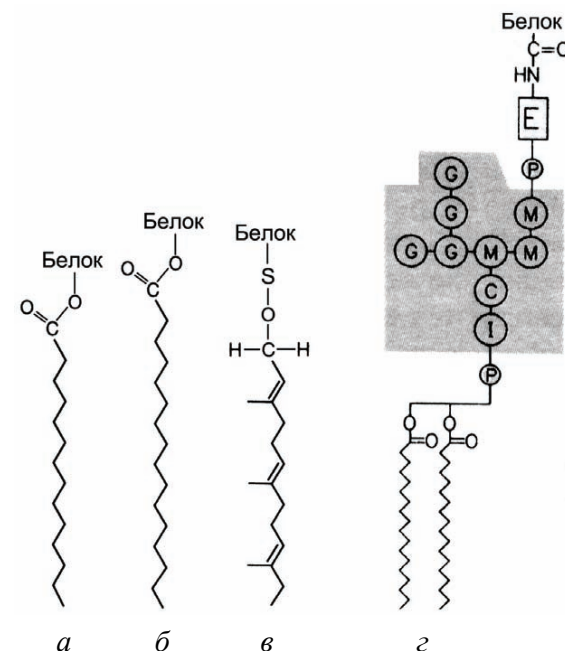


Рисунок 38 – Липофильные якоря: *a* – миристиновый, *б* – пальмитиновый, *в* – фарнезольный, *г* – GPI-якорь. Серыми кружками обозначены: I – инозит, M – манноза, C – N-ацетилглюкозамин, G – галактоза, E – этаноламин

По типу используемых липофильных якорей липид-связанные белки разделяют на *три группы*.

1. Цитозольные белки первой группы присоединяют к глицину (Gly) на *N-конце* белковой цепи жирнокислотную *ацильную* группу (например, мириститат или пальмитат), которая и погружается в липидный монослой на *цитозольной* стороне плазматической мембраны (рисунок 39, *ацилирование*).

Связывание белков первой группы может играть важную роль в функционировании данного белка. Например, белок v-Src, мутантная форма тирозин-киназы, становится онкогеном и может трансформировать клетку, только если у него миристилирован (ацилирован) N-конец.

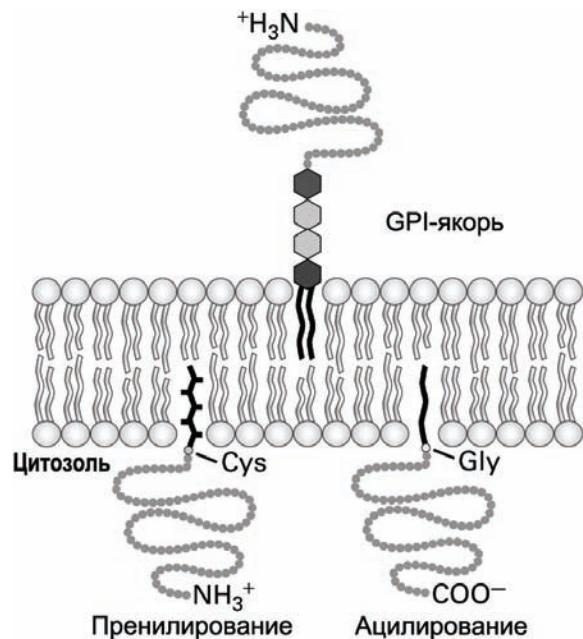


Рисунок 39 – Связывание белков на мембране с помощью липидных якорей

2. Цитозольные белки *второй* группы фиксируются на *цитозольной* стороне мембраны с помощью *ненасыщенной* жирнокислотной ацильной группы (изопреноидной цепи), которая присоединена к цистеину (Cys) белка на (или вблизи) *С-конца* (рисунок 39, *пренилирование*).

В этих белках *фарнезол* (C₁₅) или *геранилгераниол* (C₂₀) связываются *тиоэфирной* связью с *тиольной* (–SH) группой цистеина. Эти *пренильные* якоря синтезируются из *изопрена*.

В некоторых случаях, для того, чтобы упрочнить связь белка с мембраной, к соседнему цистеину белка присоединяется вторая геранилгеранильная или пальмитатная группа. Таким двойным якорем, например,

удерживается на цитозольной стороне плазматической мембраны сигнальный ГТФазный белок Ras. Другой пример использования двойного якоря – связывание на цитозольной стороне мембран внутриклеточных везикул ГТФазного белка Rab, который участвует в процессе слияния мембран.

3. Некоторые поверхностные белки клетки и сильно гликозилированные протеоглики внеклеточного матрикса связываются с *экзоплазматической* стороной плазматической мембраны липофильным якорем *третьего* типа – *гликофосфатидилинозитолом* (GPI-якорь) (рисунок 39). Точная структура GPI-якоря варьируется в широких пределах в клетках разного типа, но в нем обязательно есть фосфатидилинозитол (PI), чьи два жирнокислотных хвоста и встраиваются в мембрану, фосфоэтаноламин, который ковалентно присоединяет якорь к *С-концу* белка и несколько сахарных остатков. Один из примеров организации GPI-якоря приведен на рисунке 38.

В целом ряде экспериментов было доказано, что наличие GPI-якоря является *необходимым и достаточным* условием для связывания белка с мембраной. Например, фермент *фосфолипаза С* разрезает связь фосфат–глицерол и в фосфолипидах, и в GPI-якорях (рисунок 25). Обработка клеток фосфолипазой С приводит к отделению с поверхности клеток таких GPI-заякоренных белков, как Thy-1 и PLAP (рисунок 30).

Как отмечалось выше, PLAP концентрируется на более упорядоченных мембранных *островковых микродоменах*, обогащенных сфинголипидами и холестерином (рисунок 30). Хотя PLAP и другие GPI-заякоренные белки расположены по другую сторону мембраны от ацил-заякоренных белков, оба типа мембранных белков концентрируются в липидных островках. В отличие от них пренилированные белки в липидных островках не обнаружены.

Асимметрия интегральных белков и гликолипидов. Липид-заякоренные белки являются одним из примеров мембранных белков, которые асимметрично локализованы по отношению к двум сторонам (цитозольной и экзоплазматической) клеточной мембраны.

Каждый класс *трансмембранных белков* также имеет особую ориентацию по отношению сторонам мембраны – есть части белковой молекулы, которые *всегда* ориентированы в *цитозоль*, и есть – которые *всегда* ориентированы в *экзоплазматическое* пространство. Такая асимметрия в ориентации относительно мембраны определяет отличие в свойствах мембранного белка по разные стороны от мембраны.

До сих пор *не зарегистрирован* ни один случай флип-флопа интегральных белков. Поэтому такая асимметрия мембранного белка, которая возникает сразу после его синтеза на мембранах эндоплазматического ретикулума, *сохраняется* на протяжении всей жизни этого белка.

Многие белки содержат *углеводные цепочки*, ковалентно связанные с серинами, треонинами или аспаргинами белка. Такие *гликопротеины* ориентированы так, что углеводные цепи *всегда* расположены с *экзоплазматической* стороны (рисунки 32 и 33).

Аналогично и *гликолипиды*, в которых углеводные цепи, присоединенные к глицероловому или сфингозиновому основаниям, *всегда* расположены с *экзоплазматической* стороны мембраны, а углеводные цепочки торчат наружу от мембраны.

Особенно много *гликопротеинов* и *гликолипидов* на плазматической мембране эукариотических клеток. Но их *нет* на внутренней мембране митохондрии, на ламеллах хлоропластов, и на некоторых других внутриклеточных мембранах.

Поскольку углеводородные цепи гликопротеинов и гликолипидов плазматической мембраны расположены в экзоплазматическом пространстве, с ними могут *взаимодействовать* компоненты внеклеточного матрикса, лектины (фитоагглютинины), факторы роста, антитела и другие внеклеточные образования.

Взаимодействие с цитоскелетом. Экспериментально было показано (см. например, рисунок 18), что многие интегральные и липид-связанные белки активно участвуют в быстрой *латеральной* диффузии вдоль мембраны. В зависимости от типа клетки от 30% до 90% всех интегральных белков свободно диффундируют в плазматической мембране.

Скорость латеральной диффузии белков в *чистом липидном бислое* сравнима со скоростью диффузии липидов. Однако скорость диффузии белков в плазматической мембране живой клетки обычно в 10–30 раз *ниже*, чем скорость диффузии тех же белков в составе *искусственной* липосомы.

Такое снижение скорости диффузии мембранных белков в живой клетке объясняется их *взаимодействием* с неподвижным подмембранным цитоскелетом. Некоторые белки *постоянно* связаны с этой цитоскелетной сетью – эти белки совершенно неподвижны в мембране. Что же касается мобильных мембранных белков, то они *тормозятся* вследствие постоянного процесса разрыва и восстановления слабых нековалентных связей с подстилающим мембрану цитоскелетом в ходе диффузии белков вдоль мембраны.

4.4. Липид-связывающие мотивы

Периферические белки связываются с мембраной как посредством ассоциации с интегральными белками, так и непосредственно, связываясь с липидами бислоя (рисунок 32).

Сравнение генов различных периферических белков выявило наличие в их структуре нескольких характерных липид-связывающих мотивов, некоторые из которых перечислены в таблице 4.

Таблица 4 – Липид-связывающие мотивы

Мотив	Лиганд	Белки
PH	PIP ₂ , PIP ₃	Фосфолипаза C _γ 1, протеин-киназа B, плекстрин (<i>pleckstrin</i>)
C2	Кислотные фосфолипиды	Протеин-киназа C, PI-3-киназа, фосфолипаза, PTEN-фосфолипаза
Анкериновый повтор	PS	Анкерин (<i>ankyrin</i>)
FERM	PIP ₂	Белок полосы 4,1, эзрин (<i>ezrin</i>), радиксин (<i>radixin</i>), моэзин (<i>moesin</i> , ERM)

В таблице производные фосфатидилинозитола обозначены PIP_2 и PIP_3 (рисунок 40), PI-3 обозначает фермент фосфатидилинозитол-3-киназа, PS – фосфатидилсерин, а PH – плекстриновую гомологию.

Так, например, *плекстриновый гомологический* (PH) домен, который связывает два типа фосфорилированных фосфатидилинозитолов (PIP_2 и PIP_3), является одиннадцатым из наиболее часто встречающихся белковых доменов в геноме человека. Этот домен был первоначально обнаружен в *плекстрине* – белке тромбоцитов.

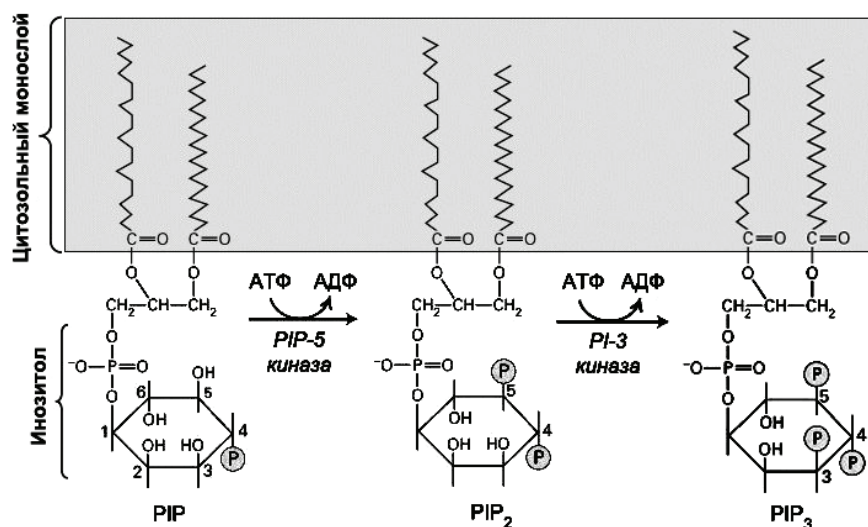


Рисунок 40 – Фосфорилированные производные фосфатидилинозитола (PI): PIP – фосфатидилинозитол-4-фосфат, PIP_2 – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат, PIP_3 – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат

Высокая частота, с которой этот мотив встречается в геноме человека, указывает на то, что локализованные вблизи мембраны белки выполняют много важных функций.

Другие характерные липид-связывающие мотивы: домен C2, домен анкерного повтора и FERM-домен.

Домен C2, который первоначально был обнаружен в составе протеин-киназы C, является мембран-связывающим доменом у многих киназ, фосфатаз и фосфолипаз.

Фосфолипазы являются примером водорастворимых ферментов, которые активизируются в результате соединения с полярными головками мембранных фосфолипидов. Фосфолипазы гидролизуют различные меж-атомные связи в полярной головке (рисунок 25). Эти ферменты играют важную роль в процессах деградации поврежденных или ненужных клеточных мембран и являются активным веществом во многих змеиных ядах.

Механизм действия фосфолипазы A_2 (рисунок 41) иллюстрирует процесс обратимого связывания водорастворимого фермента с мембраной и катализа реакций на границе между водным раствором и липидной фазой.

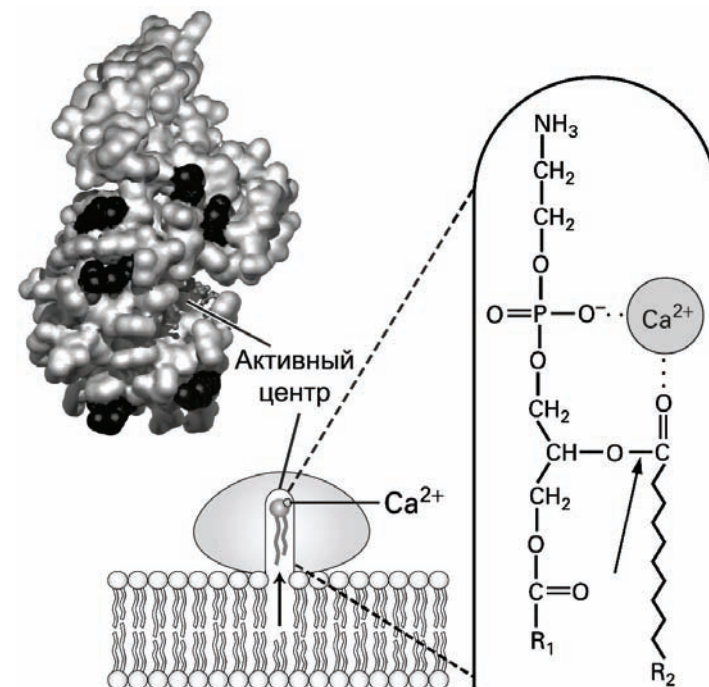


Рисунок 41 – Схема фосфолипазы A_2 . Стрелкой указана гидролизуемая связь

Находясь в водном растворе, активный центр фосфолипазы A_2 , содержащий ион Ca^{2+} , находится в глубине белкового каталитического канала в теле фермента, поверхность которого образована гидрофобными аминокислотами. Фермент имеет наибольшее сродство к бислою, состоящему из отрицательно заряженных фосфолипидов, например, из фосфотидилэтаноламинов. Такое сродство обеспечивают положительно заряженные лизины и аргинины, которые окружают вход в каталитический канал фосфолипазы A_2 (обозначены черным цветом на рисунке 41).

Электростатическое связывание фосфолипазы A_2 с мембраной индуцирует конформационное изменение в белковой глобуле, которое фиксирует фермент на головках фосфолипидов и открывает гидрофобный канал.

В результате тепловой диффузии фосфолипид заходит из бислоя в канал, где он, благодаря электростатическому взаимодействию отрицательно заряженных групп головки фосфолипида с ионом Ca^{2+} , связывается в активном центре фермента и правильно ориентирует атакуемую связь (показана стрелкой на рисунке) относительно каталитически активных аминокислот фосфолипазы A_2 .

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какие белки называют мембранными?
2. Какие выделяют три типа мембранных белков?
3. Из каких структурных частей состоят интегральные мембранные белки?
4. Какие элементы вторичной структуры содержат трансмембранные домены интегральных белков?
5. Как присоединяются к мембране липид-связанные мембранные белки?
6. Как связываются с мембраной периферические мембранные белки?
7. Какие особенности строения трансмембранных α -спиралей интегральных мембранных белков?

8. В чем состоит преимущество димеризации трансмембранных α -спиралей двух молекул гликопротеина А?
9. Как строение трансмембранного домена бактериородопсина определяет функциональные свойства этого белка?
10. Какова роль трансмембранных α -спиралей в функционировании ионных каналов?
11. В чем отличие строения трансмембранных доменов интегральных мембранных белков поринов от других мембранных белков?
12. Какие функциональные группы называют липофильными якорями?
13. На какие три группы разделяют липид-связанные белки по типу используемых липофильных якорей?
14. В чем заключается асимметрия интегральных белков и гликолипидов?
15. В чем причина низкой скорости диффузии мембранных белков по сравнению со скоростью диффузии молекул липидов в биомембранах?
16. Какова функция липид-связывающих мотивов в структуре периферических мембранных белков?
17. Каким образом биомембраны активизируют водорастворимые ферменты фосфолипазы?

5. ПАССИВНЫЙ ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ТРАНСПОРТ

Плазматическая мембрана клетки является особым барьером с селективной проницаемостью между клеткой и внеклеточной средой. Особая, селективная, проницаемость мембран обеспечивает:

- 1) проход в клетку таких необходимых для жизнедеятельности веществ, как ионы, глюкоза, аминокислоты и липиды;
- 2) сохранение в клетке необходимых промежуточных метаболитов;
- 3) удаление из клетки продуктов жизнедеятельности.

Именно селективная проницаемость плазматической мембраны позволяет клетке поддерживать стационарную концентрацию веществ внутри клетки. Перемещение практически всех молекул и ионов через клеточную мембрану обеспечивается *специализированными* селективными мембранными транспортными белками, расположенными в фосфолипидном бислое мембраны.

Поскольку клетки *различных типов* нуждаются в *различном содержании* низкомолекулярных соединений, то плазматические мембраны клеток разных типов *содержат различные наборы* транспортных белков, характерные именно для данных клеток, которые пропускают через мембрану только необходимые ионы и молекулы. Аналогично, и клеточные органеллы также часто имеют внутреннее содержание, отличающееся от окружающего их цитозоля, и, соответственно, мембраны органелл содержат специфический для данной органеллы набор транспортных белков, который и обеспечивает специфическую среду внутри органеллы.

5.1. Виды пассивного транспорта

Термодинамическое описание процессов транспорта веществ через биомембрану базируется на использовании понятия *электрохимического потенциала*.

Химическим потенциалом данного вещества μ_k называется величина, численно равная энергии Гиббса, приходящаяся на один моль этого вещества. В конденсированных средах термодинамические потенциалы *энергия Гиббса* и *свободная энергия Гельмгольца* считаются неразличимыми, их называют свободной энергией и обозначают G . Математически химический потенциал определяется как частная производная от свободной энергии G по количеству k -го вещества, при постоянстве температуры T , давления p и количеств всех других веществ $m_l (l \neq k)$:

$$\mu_k = \left(\frac{\partial G}{\partial m_k} \right)_{p, T, m_{l \neq k}}.$$

Для разбавленного раствора вещества концентрации c

$$\mu = \mu_0 + RT \ln c,$$

где μ_0 – стандартный химический потенциал, численно равный химическому потенциалу данного вещества при его концентрации 1 моль/л в растворе.

Электрохимический потенциал $\tilde{\mu}$ – величина, численно равная свободной энергии одного моля данного вещества, размещенного в электрическом поле. Для разбавленных растворов

$$\tilde{\mu} = \mu_0 + RT \ln c + zF\phi,$$

где $F = 96500$ Кл/моль – число Фарадея, z – заряд иона электролита (в элементарных единицах заряда), ϕ – потенциал электрического поля, T – температура.

Транспорт веществ через биологические мембраны можно разделить на два основных типа: пассивный и активный.

Пассивный транспорт – это перенос вещества из мест с большим значением электрохимического потенциала к местам с его меньшим значением $\tilde{\mu}_1 > \tilde{\mu}_2$ (рисунок 42).

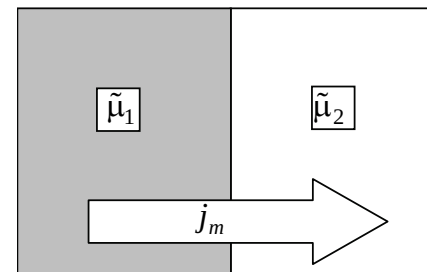


Рисунок 42 – Схема пассивного транспорта

Пассивный транспорт идет с уменьшением энергии Гиббса, и поэтому этот процесс является самопроизвольным. На рисунке 43 представлены основные виды пассивного транспорта через мембрану.

Плотность потока вещества j_m при пассивном транспорте описывается уравнением Теорелла

$$j_m = -Uc \frac{d\tilde{\mu}}{dx},$$

где U – подвижность частиц, c – концентрация. Знак минус показывает, что перенос происходит в сторону убывания $\tilde{\mu}$. Плотность потока вещества j_m – это величина, численно равная количеству вещества, перенесенного за единицу времени через единицу площади поверхности, перпендикулярной направлению переноса

$$j_m = \frac{m}{S \cdot t} \left[\frac{\text{моль}}{\text{м}^2 \cdot \text{с}} \right].$$

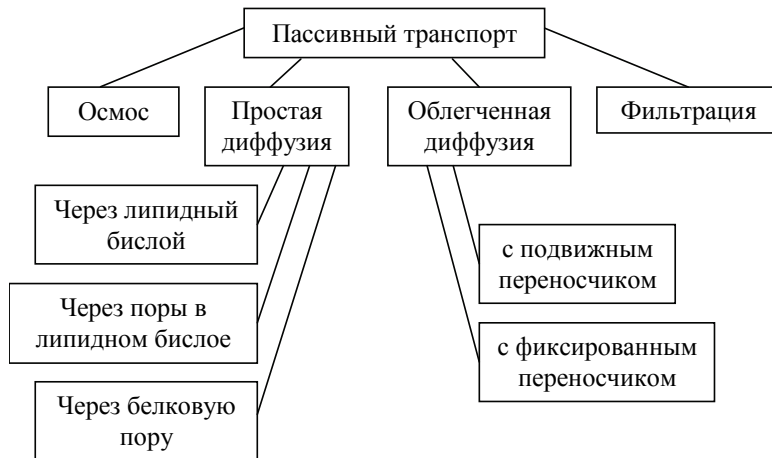


Рисунок 43 – Классификация видов пассивного транспорта

Подставим в последнее соотношение выражение для электрохимического потенциала. Полученное уравнение (для разбавленных растворов

при $\mu_0 = \text{const}$) называется уравнением Нернста-Планка

$$j_m = -URT \frac{dc}{dx} - UczF \frac{d\phi}{dx},$$

которое определяет две причины переноса вещества при пассивном транспорте

- 1) градиент концентрации $\left(\frac{dc}{dx} \right)$,
- 2) градиент электрического потенциала $\left(\frac{d\phi}{dx} \right)$.

Знаки минусов перед градиентами показывают, что градиент концентрации вызывает перенос вещества от мест с большей концентрацией к местам с его меньшей концентрацией; а градиент электрического потенциала вызывает перенос положительных зарядов от мест с большим к местам с меньшим потенциалом.

В отдельных случаях, вследствие сопряжения этих двух причин, может происходить пассивный перенос вещества от мест с меньшей концентрацией к местам с большей концентрацией, если второй член уравнения Нернста-Планка по модулю больше первого.

Аналогично может происходить перенос вещества от мест с меньшим потенциалом к местам с большим потенциалом, если первый член уравнения Нернста-Планка по модулю больше второго.

В случае неэлектролитов ($z=0$) или отсутствия электрического поля ($\frac{d\phi}{dx} = 0$) уравнение Теорелла переходит в уравнение

$$j_m = -URT \frac{dc}{dx}.$$

Сравнивая уравнение Теорелла с законом Фика $j_m = -D \frac{dc}{dx}$, получаем выражение для коэффициента диффузии $D = URT$.

На рисунке 44 представлены основные разновидности простой диффузии через мембрану.

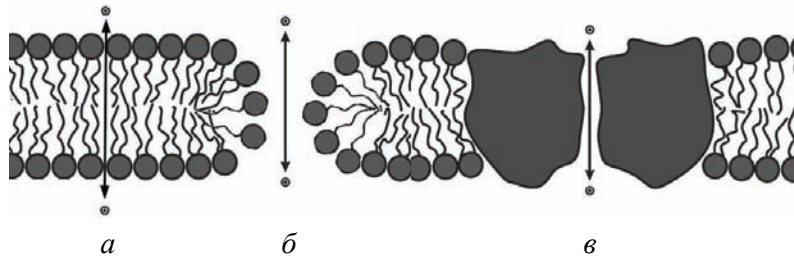


Рисунок 44 – Основные разновидности простой диффузии через мембрану: а – через липидный бислой, б – через пору в липидном бислое, в – через белковую пору

5.2. Пассивная диффузия через мембрану

Диффузия – самопроизвольное перемещение вещества из мест с большей концентрацией в места с меньшей концентрацией вещества вследствие хаотического теплового движения молекул. Диффузия вещества через липидный бислой (рисунок 44(а)) вызывается градиентом концентрации в мембране. По закону Фика

$$j_m = -D \text{grad} c \approx -D \frac{c_2^M - c_1^M}{l} = D \frac{c_1^M - c_2^M}{l},$$

где c_1^M – концентрация вещества в мембране около одной ее поверхности и c_2^M – около другой, l – толщина мембраны. Считаем, что градиент концентрации приблизительно равен $\frac{c_2^M - c_1^M}{l}$.

Так как измерить концентрации c_1^M и c_2^M трудно, на практике пользуются формулой, связывающей плотность потока вещества через мембрану с концентрациями этого вещества не внутри мембраны, а снаружи в растворах около поверхностей мембраны, c_1 и c_2 (рисунок 45):

$$j_m = P(c_1 - c_2)$$

где P – коэффициент проницаемости мембраны. Размерность коэффициента проницаемости – м/с.

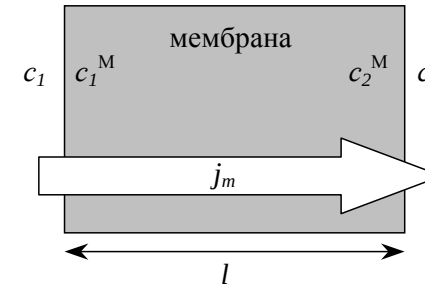


Рисунок 45 – Схема простой диффузии через липидный бислой мембраны

Коэффициент проницаемости мембраны зависит от свойств мембраны и переносимых веществ. Если считать концентрации вещества у поверхности в мембране прямо пропорциональными концентрациям у поверхности вне мембраны, $c_1^M = kc_1$, $c_2^M = kc_2$, то

$$j_m = \frac{Dk}{l}(c_1 - c_2).$$

Величина k носит название *коэффициента распределения*, который показывает соотношение концентрации вещества вне мембраны и внутри мембраны, т.е. насколько хорошо вещество растворяется в мембране.

Коэффициент проницаемости

$$P = \frac{Dk}{l}$$

тем больше, чем больше коэффициент диффузии (чем меньше вязкость мембраны), чем тоньше мембрана и чем лучше вещество растворяется в мембране (чем больше k).

Атмосферные газы, такие, как O_2 и CO_2 , и малые незаряженные молекулы, такие, как мочевина и этанол, вследствие пассивной (обычной) диффузии легко проходят сквозь *искусственные* мембраны, асsembledные из фосфолипидов или из смеси фосфолипидов с холестерином (рисунок 46).

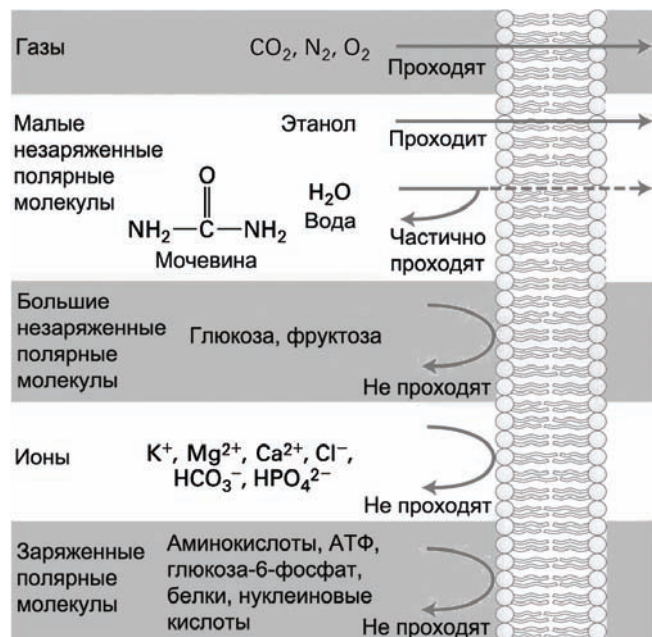


Рисунок 46 – Относительная проницаемость фосфолипидной мембраны для различных молекул

Такие молекулы также могут диффундировать через *клеточные* мембраны без помощи специализированных транспортных белков. Такой транспорт не нуждается во внешнем источнике энергии, поскольку его движущей силой является градиент концентрации по обе стороны мембраны.

Относительная скорость диффузии любого вещества через фосфолипидный бислой пропорциональна разности концентраций (градиенту) этого вещества по обе стороны мембраны, зависит от гидрофобности и

размера молекул вещества. На диффузию заряженных молекул оказывает влияние также электрический мембранный потенциал.

5.3. Диффузия полярных молекул воды через мембрану

В фосфолипидной фазе мембраны хорошо растворимы неполярные вещества, например органические жирные кислоты, эфиры. Эти вещества хорошо проникают через липидную фазу мембраны. Плохо проходят через липидный бислой полярные, водорастворимые вещества: соли, основания, сахара, аминокислоты, спирты.

На этом фоне представляется необъяснимым аномально большое значение коэффициента проницаемости липидной мембраны для воды. В последнее время проникновение через липидные бислои мембраны мелких полярных молекул связывают с *образованием* между жирнокислотными хвостами фосфолипидных молекул при их тепловом движении небольших свободных полостей – *кинков* (от англ. *kink* – петля), образованных *гош-транс-гош-конфигурацией* липидных молекул (рисунок 47).

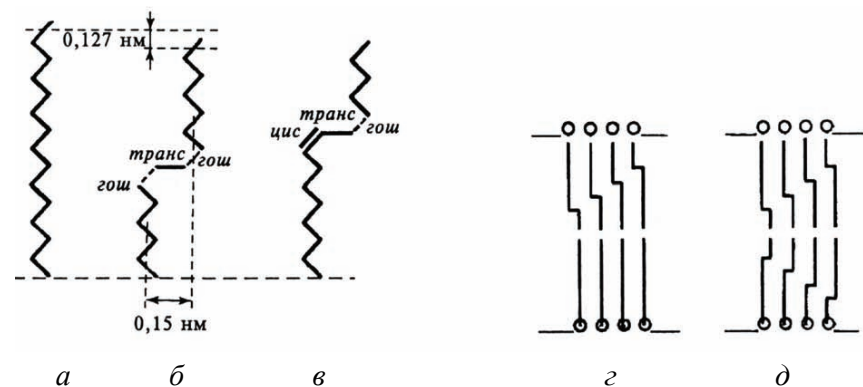


Рисунок 47 – Схема углеводородных цепей: а – в полностью *транс*-конфигурации; б – в *гош-транс-гош*-конфигурации; в – в *цис-транс-гош*-конфигурации; кинк-блоки в углеводородных цепях мембран: г – в одном полуслое, д – в двух слоях липидного бислоя

Гош-конформации (*гош* (+) и *гош* (–), поворот на $\pm 120^\circ$ относительно *транс*-конформации) сравнительно мало превышают по энергии

транс-конформацию (на 2–3 кДж/моль), но эти состояния разделяет энергетический барьер высотой 12–17 кДж/моль. Если углеводородные цепи в полностью *транс*-конфигурации представляют собой линейные структуры, то появление одиночной *гаиш*-конформации в цепи приводит к искривлению пространственной конфигурации цепи на угол $\sim 120^\circ$.

В плотно упакованных мембранных системах с полностью *транс*-конформацией углеводородных цепей это искривление порождает серьезные *стерические* затруднения, делающие невозможным появление одиночных *гаиш*-конформаций.

Уменьшение стерических затруднений при плавлении углеводородных цепей в мембранах достигается при *синхронном* появлении в цепи сразу *двух гаиш*-конфигураций (*гаиш* (+) и *гаиш* (–)), разделенных С–С связью в *транс*-конформации.

Хотя энергия такого состояния вдвое выше одиночной *гаиш*-конформации, возникающее ротационное состояние цепи не вызывает сильного расширения решетки, так как при последовательном повороте цепи на $+120$ и -120° пространственная конфигурация цепи в целом сохраняется прямолинейной (рисунок 29). Участок цепи, находящийся в *гаиш*(+)*–транс*-*гаиш*(–)-конформации, формирует уступ или петлю в углеводородной цепи – *кинк*. Образование кинка сопровождается уменьшением эффективной длины цепи на $\sim 0,127$ нм. При этом часть цепи отодвигается на $\sim 0,15$ нм, образуя свободный объем, а занимаемый молекулой липида общий объем увеличивается на $0,025\text{--}0,050$ нм³ (рисунок 47).

Хотя появления одного кинка в углеводородной цепи недостаточно для ее плавления, однако одиночные кинки *облегчают* возникновение кинков в соседних углеводородных цепях, формируя чередующиеся *кинк-блоки* (рисунок 47). Такие блоки могут возникать либо в одном полуслое мембраны, либо в двух противоположно расположенных углеводородных цепях. При увеличении числа кинков в углеводородных цепях *разупорядоченность* углеводородной зоны мембран резко *нарастает*.

Вследствие теплового движения хвостов кинки могут перемещаться через мембрану и *переносить* попавшие в них мелкие молекулы, в первую очередь, молекулы воды. Двойные (*цис*-) связи в жирнокислотных

ненасыщенных цепях (рисунок 47(в)) мембран могут играть *роль инициаторов* образования кинков в соседних насыщенных цепях. В этом случае для образования кинка в ненасыщенной цепи необходимо появление *лишь одной гаиш*-конформации при искривлении цепи на 80° .

При этом устраняются стерические затруднения, возникающие при размещении *ненасыщенной* цепи в углеводородной зоне мембран из *насыщенных* липидов, что хорошо согласуется с экспериментально наблюдаемым резким снижением температуры фазового $T_{\text{ФП}}$ перехода мембран из насыщенных липидов при добавлении к ним небольших количеств ненасыщенных жирнокислотных цепей.

Таким образом, низкую вязкость углеводородной зоны мембран в жидкокристаллическом состоянии (при $T > T_{\text{ФП}}$) связывают с

- 1) *возрастанием амплитуды крутильных осцилляций* вокруг С–С связей,
- 2) появлением *гаиш*-конформаций (кинки),
- 3) их быстрой *изомеризацией* в соседние положения.

Для оценки эффективности этих процессов сравним частоту крутильных колебаний вокруг С–С связей $6 \div 8 \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}$ с частотой возникновения *гаиш*-конформаций при комнатной температуре.

Полагая, что величина барьера, отделяющего *транс*- от *гаиш*-конформаций, равна 12 кДж/моль, находим $v = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta E}{RT}\right) \approx 10^{10} \text{ с}^{-1}$.

Отсюда следует, что *гаиш*-конформации при комнатных температурах возникают с высокой частотой вследствие крутильных осцилляций.

В условиях высокой текучести гидрофобной зоны мембран кинк может *изомеризоваться*, смещаясь вдоль углеводородной цепи за счет синхронного поворота на 120° соответствующей последовательности С–С связей. При смещении в соседнее положение кинк передвигается на ~ 13 нм. Такое *перемещение* кинка вдоль углеводородной цепи можно рассматривать как своеобразную *одномерную диффузию*, которую можно охарактеризовать коэффициентом диффузии $D_K = 0,5v_K(\Delta L)^2$,

где v_K – частота скачка кинка, ΔL – шаг одного скачка. Полагая, что частота скачка кинка по порядку величины соответствует частоте появления *gauche*-конформаций, находим $D_K \approx 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$. Полученное значение практически совпадает с известными коэффициентами проницаемости липидных мембран для кислорода, воды и небольших молекул неэлектролитов. Это совпадение, а также геометрическое соответствие размеров таких молекул и свободного объема, возникающего при образовании кинка, позволяет утверждать, что трансмембранный перенос малых молекул осуществляется внутри свободного объема, образуемого кинком.

5.4. Транспорт веществ через мембрану с помощью белков-транспортёров

Только немногие вещества могут диффундировать через липидный бислой самостоятельно (рисунок 46).

Перенос молекул большинства веществ через мембрану осуществляется *специализированными транспортными мембранными белками*. Водорастворимые метаболиты переносятся через мембрану внутри трансмембранных доменов этих белков, которые изолируют метаболиты от контакта с гидрофобной частью биомембраны.

Формально разделяют:

- *АТФ-насосы* (рисунок 48(а)),
- *ионные каналы* (рисунок 48(б)),
- *транспортёры* или *переносчики* (рисунок 49).

АТФ-насосы, или просто *насосы*, являются АТФазами, в которых энергия гидролиза АТФ используется для переноса ионов или малых молекул через мембрану (рисунок 48(а)).

Направление переноса определяется структурой АТФ-насоса и *не связано* с направлением градиента концентрации метаболита по обе стороны мембраны. Поэтому насосы являются активными транспортёрами и используются клетками для *создания концентрационного градиента*, перенося ионы из клеточного компартмента с низкой концентрацией в ком-

партмент с высокой концентрацией данного иона. Транспорт такого типа называется *активным транспортом*, а образующийся градиент концентрации ионов (электрохимический градиент) формирует электрический *мембранный потенциал* биомембраны.

Хорошо изучены три типа *ионных насосов*:

- 1) Ca^{2+} -АТФаза,
- 2) Na^+ - K^+ -АТФаза и
- 3) протонная помпа.

Характерная величина скорости переноса ионов через мембрану ионным насосом составляет 1–1000 ионов в секунду.

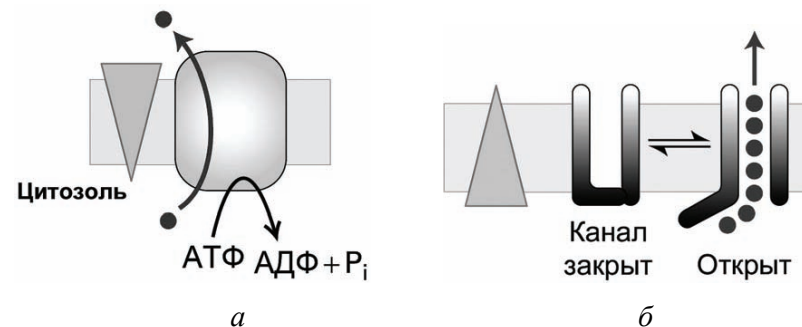


Рисунок 48 – Транспорт веществ через биомембрану: а – АТФ-насос, б – ионный канал. Треугольниками обозначены градиенты концентрации

Канальные белки (рисунок 48(б)) обеспечивают *пассивный транспорт* молекул и ионов через биомембрану за счет трансмембранного градиента концентрации. Иногда такой процесс диффузии вещества через мембрану, обеспечиваемый канальными белками, называют *облегчённой диффузией* с фиксированным переносчиком.

Молекулы и ионы проходят через гидрофильный канал в теле белка со скоростью 10^7 – 10^8 ионов в секунду. Некоторые ионные каналы всегда открыты, другие имеют так называемые белковые "ворота" – подвижные домены, которые в ответ на внешнее воздействие закрывают канал.

Трансмембранный транспорт с помощью *переносчиков* или *транспортёров* подразделяют на схемы *унипорта*, *симпорта* и *антипорта* (рисунок 49).

Унипорты переносят единственный тип молекул по направлению градиента за счет облегчённой диффузии. Глюкоза и аминокислоты транспортируются через плазматическую мембрану клетки через такие унипорты. Поэтому перенос веществ унипортами относят к *облегчённой диффузии* при пассивном транспорте через мембрану.

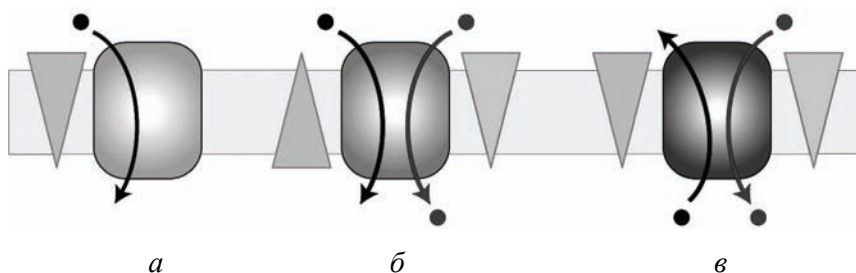


Рисунок 49 – Схемы вторичного активного транспорта: *а* – унипорт, *б* – симпорт, *в* – антипорт. Треугольниками обозначены градиенты концентрации или электрического потенциала на биомембране

В *антипортах* или *симпортах*, в отличие от унипортов, эндергоническое перемещение молекул или иона данного типа против его градиента концентрации энергетически сопряжено с экзергоническим перемещением одного или нескольких типов других молекул или ионов по их электрохимическому градиенту концентрации. Оба этих типа транспортёров иногда называют общим названием *котранспортёры* (или *копереносчики*), подчеркивая их особенность переносить два вида молекул одновременно.

В отличие от АТФ-насосов, в которых источником энергии для транспорта вещества является гидролиз АТФ, котранспортёры используют энергию, *запасенную в электрохимическом градиенте*. В этом смысле такой вид транспорта тоже носит название *активный*, но, поскольку необходимый электрохимический потенциал, должен быть *предварительно* создан (чаще всего работой именно ионных насосов), то такой вид транс-

порта носит название *вторичный активный* транспорт. Характерная скорость работы *вторичного активного транспортёра* составляет 10^2 – 10^4 молекул в секунду.

Цикл работы и АТФ-насосов и вторичных транспортёров представляет собой серию конформационных изменений этих транспортных белков, в ходе которой транспортируемые вещества присоединяются к белку с одной стороны мембраны, а после конформационных переходов, оказавшись по другую сторону мембраны, отсоединяются от белка. Поскольку в ходе такого цикла переносится через мембрану от одной до трех молекул, то скорость транспорта *АТФ-насосами* и *транспортёрами* относительно мала (1–10000 молекул в секунду).

Ионные каналы также конформационно переключаются между закрытым и открытым состояниями, но когда канал открыт, скорость потока ионов через него гораздо выше, достигая значения 10^8 ионов в секунду.

5.5. Облегчённая диффузия

Облегчённая диффузия в биологических мембранах происходит при участии *молекул переносчиков*. Разделяют облегчённую диффузию с помощью подвижных молекул переносчиков и с помощью неподвижных молекул-переносчиков, фиксированных определенным образом поперек мембраны.

Примером подвижной молекулы-переносчика является – *валиномицин* [L-лактат – L-валин – D-окси-изовалериановая кислота – D-валин]₃ – подвижный переносчик ионов калия. Молекула валиномицина имеет форму манжетки, устланной внутри полярными группами, а снаружи – неполярными (рисунок 50).

В силу особенности своего химического строения валиномицин, во-первых, способен образовывать комплекс с ионами калия, попадающими внутрь молекулы-манжетки (ион калия фиксируется в центре за счет ион-дипольного взаимодействия с участием карбонильных групп пептида), и, во-вторых, валиномицин растворим в липидной фазе мембраны, так как снаружи его молекула неполярна. Молекулы валиномицина, оказавшиеся у поверхности мембраны, могут захватывать из окружающего раствора

ионы калия. Диффундируя в мембране, молекулы переносят калий через мембрану, и некоторые из них отдают ионы в раствор по другую сторону мембраны.

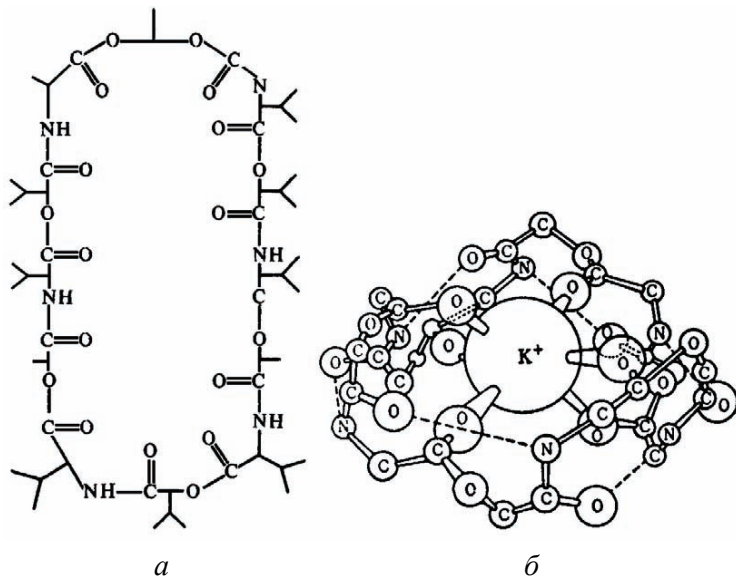


Рисунок 50 – Строение молекулы валиномицина: *a* – химическая формула, *б* – ван-дер-ваальсовая модель комплекса валиномицина с ионом калия

Перенос калия валиномицином может происходить через мембрану в обе стороны. Поэтому, если концентрации калия по обе стороны мембраны одинаковы, поток калия в одну сторону будет такой же, что и в другую, и в результате переноса калия через мембрану не будет.

Но если с одной стороны концентрация калия больше, чем с другой, то поток калия в сторону уменьшения концентрации будет больше, чем в противоположную.

Облегчённая диффузия, таким образом, происходит от мест с большей концентрацией переносимого вещества к местам с меньшей концентрацией.

Облегчённой диффузией объясняется также перенос через биологические мембраны аминокислот, сахаров и других биологически важных веществ.

Выделяют *четыре* отличия облегчённой диффузии от простой.

1. Перенос вещества с участием переносчика происходит *значительно быстрее*.
2. Облегчённая диффузия обладает *свойством насыщения* (рисунок 51) – при увеличении концентрации с одной стороны мембраны плотность потока вещества возрастает лишь до некоторого предела, когда все молекулы переносчика уже заняты.
3. При облегчённой диффузии наблюдается *конкуренция переносимых веществ* в тех случаях, когда переносчиком переносятся разные вещества; при этом одни вещества переносятся лучше, чем другие, и *добавление одних веществ затрудняет транспорт других*; так, из сахаров глюкоза переносится лучше, чем фруктоза, фруктоза лучше, чем ксилоза, а ксилоза лучше, чем арабиноза, и т.д..
4. Есть вещества, *блокирующие* облегчённую диффузию – они образуют *прочный комплекс* с молекулами переносчика, например, флоридзин подавляет транспорт сахаров через биологическую мембрану.

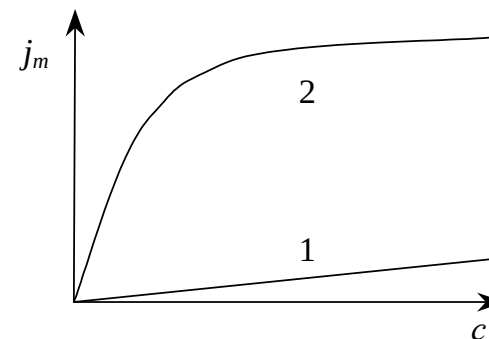


Рисунок 51 – Зависимость плотности потока j_m веществ через биологическую мембрану в клетку в зависимости от концентраций C этих веществ во внеклеточной среде при простой (1) и облегчённой (2) диффузии

Если транспорт какого-либо вещества через биологическую мембрану обладает этими особенностями, можно предположить, что имеет место облегчённая диффузия.

Разновидностью облегчённой диффузии является транспорт с помощью неподвижных молекул-переносчиков, фиксированных определённым образом поперек мембраны.

Трансмембранный транспорт глюкозы. Облегчённая диффузия глюкозы и других малых гидрофильных молекул через мембрану обеспечивается белками-унипортерами. Один из наиболее изученных унипортеров это белок-транспортёр глюкозы GLUT1 (рисунок 52). Белки GLUT1 были выделены из мембран эритроцитов. Большинство клеток млекопитающих используют белки GLUT1 для доставки в цитозоль растворенной в крови глюкозы, экспрессируя соответствующий ген *GLUT1*.

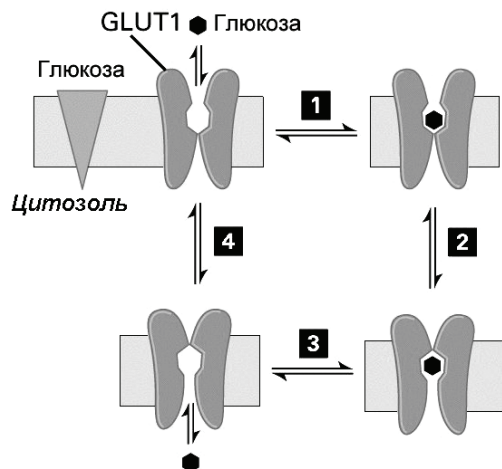


Рисунок 52 – Цикл работы унипорта-транспортёра глюкозы. Треугольником обозначен градиент концентрации глюкозы

Как и другие унипортеры, GLUT1 может принимать *два* конформационных состояния: в *одном* состоянии центр связывания глюкозы экспонирован наружу с эктоплазматической стороны мембраны, во *втором*

состоянии центр связывания глюкозы экспонирован внутрь клетки с цитозольной стороны мембраны. На рисунке 52 представлен цикл работы такого глюкозного унипорта.

Унипорт GLUT1 может также осуществлять транспорт глюкозы из цитозоля, если концентрация глюкозы в цитозоле выше, чем во внеклеточном пространстве.

В геноме человека обнаружено двенадцать генов, кодирующих гомологичные унипорты GLUT1– GLUT12, трансмембранные домены которых чрезвычайно подобны, и все они сформированы подобным образом из двенадцати трансмембранных α -спиралей, состоящих преимущественно из гидрофобных аминокислот. Однако некоторые α -спирали содержат в своём составе серин, аспарагин, треонин и глутамин, которые, участвуя в формировании водородных связей с гидроксильными группами глюкозы, формируют центры связывания глюкозы в унипортах.

Гены глюкозных унипортов экспрессируются в различных клетках различных тканей, и синтезированные унипорты отличаются эффективностью трансмембранного переноса глюкозы.

Так, например, GLUT2 экспрессируется в клетках печени (гепатоцитах) и в секретирующих инсулин β -клетках поджелудочной железы, и эффективность переноса глюкозы унипортом GLUT2 в два раза выше, чем унипортом GLUT1 (который работает в мембранах эритроцитов). В гепатоцитах эта "избыточная" глюкоза преобразуется в гликоген, а в β -клетках избыток глюкозы запускает механизм секреции в кровь гормона *инсулина*, который еще более снижает концентрацию глюкозы в крови, стимулируя механизмы транспорта глюкозы в цитозоль клеток мускулатуры и ингибируя синтез глюкозы в печени.

Другая изоформа глюкозного унипорта – белок GLUT4 экспрессируется только в клетках жировой ткани и в мышечных клетках, а унипорт GLUT5 переносит фруктозу вместо глюкозы.

Функционирование транспортных белков возможно исследовать только в составе мембраны. Большинство клеточных мембран содержат слишком много различных интегральных белков, чтобы можно было изу-

чать работу только одного из них. Для исследования белков-транспортёров используют *два метода*.

1. Методами генной инженерии значительно *повышают уровень экспрессии* данного белка-транспортёра и затем сравнивают скорость трансмембранного переноса соответствующего метаболита в исходной и в генетически модифицированной системах.
2. Экстрагируют и очищают исследуемый белок, а затем *интегрируют* его в чистый липидный бислой, например, в мембрану липосомы (рисунок 53).

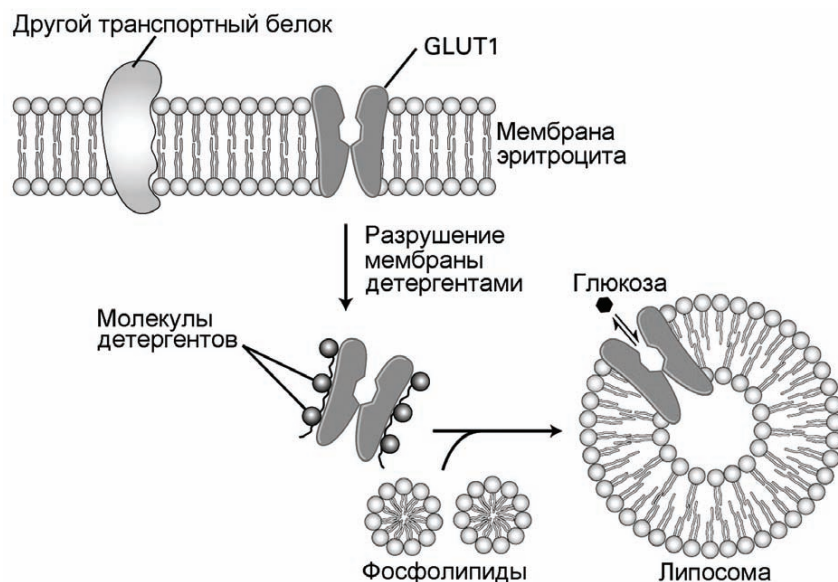


Рисунок 53 – Перенос транспортного белка GLUT1 из биомембраны в липосому

5.6. Поры в липидном бислое

Бимолекулярный слой фосфолипидов составляет основу любой клеточной мембраны. *Непрерывность* его определяет *барьерные* и *механиче-*

ские свойства клетки. В процессе жизнедеятельности *непрерывность бислоя может нарушаться* с образованием структурных дефектов типа сквозных гидрофильных пор. Вполне естественно ожидать при этом *изменения всех функций* клеточной мембраны, включая проницаемость и стабильность. Ранее эти проблемы обсуждались отдельно, однако создание модели липидной поры позволяет рассмотреть их с единых позиций. Важен тот факт, что липидные поры, помимо проницаемости, оказались причастными к *стрессовым воздействиям* внешних сил на уровне клеточных мембран.

Как в любом реальном кристалле, в пленке из фосфолипидов могут быть *дефекты*, в месте которых и развиваются основные события структурных перестроек. Виды дефектов многообразны, но и наиболее естественным для бислоя является дефект типа *сквозной гидрофильной поры* (рисунок 54).

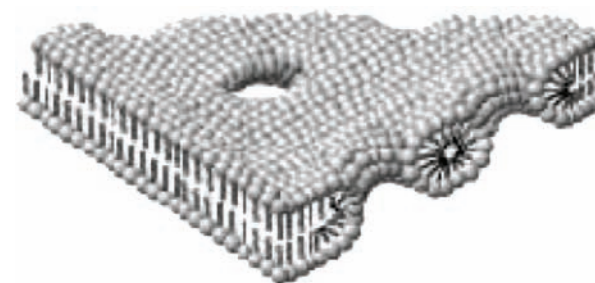


Рисунок 54 – Бислойная липидная мембрана с липидными порами

Очевидное внешнее сходство любой шаровидной клетки с мыльным пузырем оказывается на самом деле более глубоким. В том и другом случае речь идет о важной роли пограничной бимолекулярной липидной пленки, свойства которой определяют стабильность и проницаемость частиц.

Различие заключается лишь в том, что мыльная пленка образуется на границе раздела с воздухом, а липидный бислой – в воде. Именно поэтому липидные везикулы – липосомы – широко используются с целью моделирования мембранных свойств живой клетки.

Механическая прочность живой клетки наряду с липидным бислоем обеспечивается системой белковых каналов и сетью мембранных белков. Однако это не умаляет роли самих липидных пор и связанного с ними механизма дестабилизации мембран, особенно в тех случаях, когда система микрофиламентов отсутствует или не развита. В липидной бимолекулярной пленке клеточной мембраны поры появляются (если исключить чисто механические повреждения) в результате

- 1) тепловых флуктуации поверхности бислоя,
- 2) электрического пробоя,
- 3) замораживания пленки,
- 4) действия поверхностно-активных веществ,
- 5) осмотического давления,
- 6) перекисного окисления липидов.

Один из наиболее типичных и хорошо изученных примеров дестабилизации биологических мембран – *гемолиз эритроцитов*. Это явление включает на начальном этапе набухание клеток в гипотонической среде в результате действия сил осмотического давления. Во время набухания клетки мембрана растягивается, что обуславливает рост мембранного натяжения.

При определенном *пороговом уровне* натяжения появляются гидрофильные липидные поры. Размеры пор достаточны для выхода молекул гемоглобина и низкомолекулярных веществ. Это приводит к снижению разности осмотического давления, что в свою очередь вызывает уменьшение натяжения мембраны и поры заживают. Белки цитоскелета позволяют эритроциту сохранить форму, при этом образуется так называемая *тень эритроцита*. Тень сохраняет осмотическую активность, и таким образом процесс дестабилизации приобретает *циклический характер*. Полного механического разрушения клетки подобного мыльному пузырю в этом случае не происходит.

При отсутствии цитоскелета или при его недостаточном развитии механическая прочность клетки целиком определяется судьбой липидных пор. Если пора имеет размер меньше критического, то она заживает.

В противном случае неограниченный рост поры приводит к разрушению мембраны.

Рассмотрим модель липидной поры (рисунок 55). Будем считать, что боковая поверхность поры имеет форму кругового цилиндра. Предположим, что боковая поверхность цилиндра изогнута и имеет радиус кривизны $h/2$. Радиус поры равен r . Липидный бислой в целом является плоским, а пора имеет два радиуса кривизны $h/2$ и r .

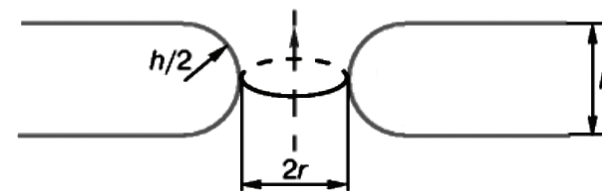


Рисунок 55 – Строение гидрофильной липидной поры: h – толщина липидного бислоя; $h/2$ – радиус кривизны стенки; r – радиус поры

Искривление поверхности на границе раздела липид-вода сопровождается появлением *дополнительного давления*, называемого лапласовым и равного

$$\Delta p = \frac{2\sigma}{r},$$

где σ – межфазное (поверхностное) натяжение внутри поры, r – радиус кривизны.

В рассматриваемой модели таких радиусов два ($h/2$ и r) и, следовательно, *два давления*. Одно из них $p(h/2)$ способствует расширению, а другое $p(r)$ – сжатию поры. Дальнейшая судьба поры зависит от соотношения этих двух давлений. Если $p(h/2) > p(r)$, пора будет расширяться, а если $p(h/2)$ меньше $p(r)$, то пора будет затекать.

Таким образом, на границе поры действуют *две противоположные силы*, одна из которых – *краевое линейное натяжение периметра поры* –

способствует росту поры, а вторая сила – *поверхностное натяжение бислоя* – вызывает сжатие поры.

Энергия кромки поры пропорциональна первой степени радиуса и увеличивает суммарную энергию, энергия поверхностного натяжения пропорциональна квадрату радиуса и снижает суммарную энергию. В результате суммарная энергия $E(r)$ равна

$$E(r) = 2\pi r\gamma - \pi r^2\sigma,$$

где первый член определяется энергией кромки поры с линейным натяжением γ , а второй – энергией поверхностного натяжения σ . Вид кривой на рисунке 56 указывает на существование неустойчивого равновесия в точке максимума с критическими значениями энергии (E^*) и радиуса (r^*).

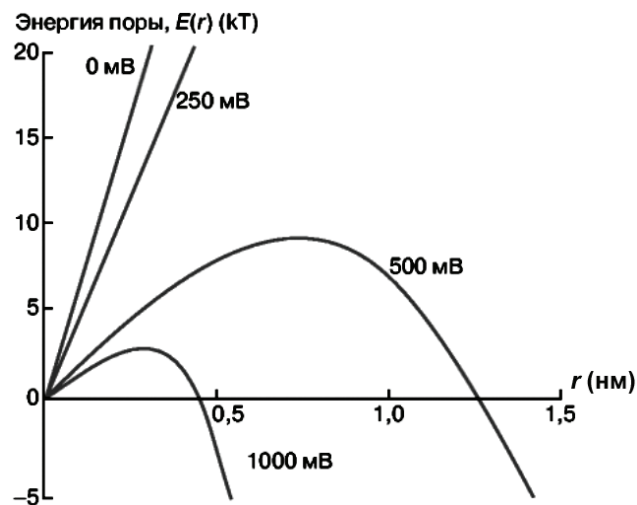


Рисунок 56 – Энергия поры как функция радиуса поры при различных значениях мембранного потенциала

В точке равновесия (экстремум функции) $\frac{dE}{dr} = 0$ и уравнение превращается в тождество: $0 = 2\pi\gamma - 2\pi\sigma r^*$, откуда можно определить *крити-*

ческий радиус поры

$$r^* = \frac{\gamma}{\sigma}.$$

Высота энергетического барьера после подстановки r^* в уравнение $E(r) = 2\pi r\gamma - \pi r^2\sigma$ будет равна

$$E^* = \frac{\pi\gamma^2}{\sigma}.$$

С учетом неустойчивости равновесия можно утверждать, что появление пор с $r > r^*$ будет сопровождаться разрывом мембраны в результате неограниченного роста поры. Напротив, при $r < r^*$ пора будет затекать, и стабильность мембраны сохранится. Таков *количественный критерий* стабильности липидной бислошной мембраны.

Липидные поры при стрессовых воздействиях. Биологические мембраны находятся под действием *электрического поля* большой напряженности, создаваемого диффузией ионов через мембрану и электрогенными ионными насосами. Поскольку разность потенциалов между цитоплазмой и внеклеточной средой достигает порядка 0,1 В, а толщина мембраны не превышает 10 нм, то напряженность поля равна 10^7 В/м. Интересно, что мембрана является более совершенным электрическим изолятором, чем многие жидкие изоляторы, применяемые в технике. В некоторых случаях мембранный потенциал в живой клетке может быть выше и достигать 0,2 В (пресноводные водоросли, бактерии, энергизированные митохондрии).

В возбудимых нервных и мышечных клетках происходит *кратковременная реполяризация* мембраны с ростом амплитуды потенциала. Однако пробой клеточной мембраны собственным мембранным потенциалом маловероятен.

В то же время рост мембранного потенциала в результате *воздействия* *внешним электрическим полем* может достигать величины, превы-

шающей пороговую для электрического пробоя. При этом появляются структурные дефекты типа сквозных липидных пор.

Разработанная *методика электрического пробоя* клеточных мембран получила название *электропорации* и широко применяется в биотехнологии. В физике под электрическим пробоем понимают резкое увеличение силы электрического тока в первоначально слабопроводящей среде. В живой клетке такой средой служит бимолекулярный слой липида.

В этом случае формула должна быть изменена путем введения дополнительного члена, отражающего вклад электрического поля,

$$E(r) = 2\pi r\gamma - \pi r^2 \left(\sigma + \frac{C\varphi^2}{2} \right),$$

где $C = \left(\frac{\varepsilon_{\text{воды}}}{\varepsilon_{\text{мембраны}}} - 1 \right) \cdot C_0$; $\varepsilon_{\text{воды}}$ и $\varepsilon_{\text{мембраны}}$ – диэлектрические проницаемости воды и мембраны соответственно; φ – мембранный потенциал; C_0 – емкость единицы площади мембраны, не содержащей дефектов.

Зависимость энергии поры от ее радиуса для этого случая приведена на рисунке 56. Показано семейство кривых, полученных по уравнению

$$E(r) = 2\pi r\gamma - \pi r^2 \left(\sigma + \frac{C\varphi^2}{2} \right) \text{ для различных значений мембранного потенциала.}$$

Чем больше мембранный потенциал, тем (1) меньше значение энергии поры и тем (2) больше смещается максимум кривой к началу координат.

Анализ кривых показывает, что с увеличением радиуса энергия поры должна расти, поскольку увеличивается периметр поры, и одновременно энергия должна уменьшаться пропорционально росту поверхностного натяжения мембраны и мембранного потенциала. В результате (рисунок 56), появляется кривая с максимумом, что позволяет количественно оценить критические параметры мембраны: критический радиус поры и высоту энергетического барьера по формулам, приведенным выше.

Высота энергетического барьера с учетом поля равна

$$E^* = \frac{\pi\gamma^2}{\left(\sigma + \frac{C\varphi^2}{2} \right)}.$$

Можно видеть, что с ростом мембранного потенциала и поверхностного натяжения высота барьера снижается.

Критический радиус поры может быть рассчитан по формуле

$$r^* = \frac{\gamma}{\left(\sigma + \frac{C\varphi^2}{2} \right)}.$$

Величина критического радиуса также уменьшается с ростом σ и φ . Из формулы следует, что зависимость критической поры от мембранного потенциала становится заметной *лишь при значительном превышении* электрической составляющей над величиной поверхностного натяжения.

Расчеты показывают, что для липидного бислоя в жидкокристаллическом состоянии критическая величина мембранного потенциала не может быть меньше 0,23 В.

Стабильность бислойных мембран определяется вероятностью появления пор критического радиуса. Очевидно, что *любой фактор*, снижающий высоту энергетического барьера, будет увеличивать эту вероятность. К таким факторам следует отнести

- 1) снижение краевой энергии поры,
- 2) рост поверхностного натяжения,
- 3) рост мембранного потенциала.

Как видно из рисунка 56, рост пробойного напряжения до 1 В сопровождается смещением критического радиуса к значениям меньшим 0,5 нм, что близко радиусам природных ионных каналов клеточной мембраны. Отсюда следует, что электрический пробой сопровождается появ-

лением широкого спектра липидных пор различного радиуса, включая поры с радиусом ионоселективных белковых каналов.

В настоящее время метод воздействия внешним электрическим полем является одним из основных в современной *биотехнологии*. Известно его применение с целью увеличения пористости мембран (*электропорация*), введения ДНК (*электротрансфекция*), освобождение клеток от крупных молекул (*электропермеабиллизация*), слияния клеток (*электрослияние*).

Температурная обработка бислойных липидных мембран существенно влияет на энергетику порообразования, поскольку фазовый переход сопровождается существенным изменением поверхностного натяжения. Так, например, для гидрированного яичного лецитина при замораживании поверхностное натяжение σ возрастало от $1,1 \cdot 10^{-3}$ до $5,6 \cdot 10^{-3}$ Н/м. С учетом этого по формуле $E(r) = 2\pi r\gamma - \pi r^2\sigma$ была рассчитана зависимость энергии поры от ее радиуса в жидкой и твердой мембране (рисунок 57).

Как следует из рисунка 57, критический радиус поры в гелевом состоянии значительно меньше по сравнению с жидкокристаллическим состоянием и по абсолютной величине не превышает 2 нм. Сохранение длительной устойчивости липидного бислоя в гелевом состоянии свидетельствует о том, что существующие поры и поры, возникающие при фазовом переходе жидкокристаллическое состояние – гелевое состояние, имеют размеры меньше 2 нм.

Сравнение рисунков 56 и 57 демонстрирует *высокую эффективность* метода *температурной обработки* бислойных липидных мембран с целью получения популяции липидных пор, сравнительно с электрическим пробоем.

Действительно, замораживание мембранных липидов в ходе фазового перехода (который для многих насыщенных липидов происходит при комнатной температуре) *эквивалентно* электрическому пробое мембраны внешним электрическим полем напряжением 0,5 В. В то же время очевидно, что электрические воздействия *более удобны* с точки зрения калибровки силы воздействия и его длительности.

С точки зрения проницаемости липидные поры *принципиально отличаются* от белковых каналов своим происхождением и исключительной динамичностью.

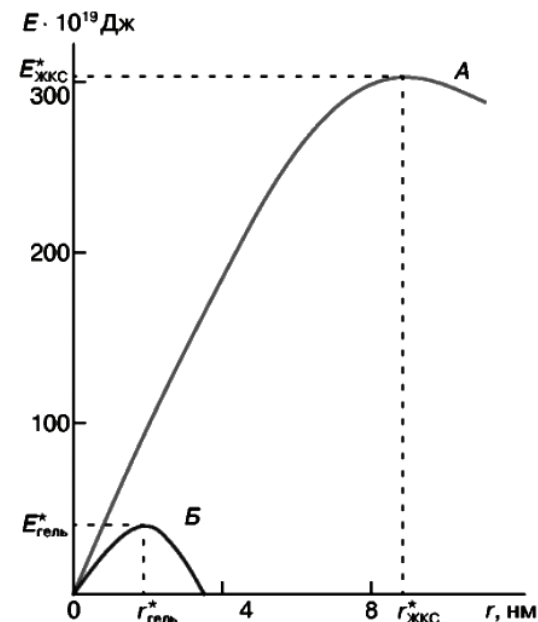


Рисунок 57 – Энергия поры как функция радиуса поры в жидкокристаллическом состоянии (А) и гелевом состоянии (Б) мембранных липидов

В то время как белковые каналы имеют строго определенные размеры, сохраняющиеся в течение всей жизни клетки, размеры липидных пор в процессе затекания варьируют в широких пределах. Однако эта изменчивость имеет предел. Если радиус поры меньше критического, то пора в процессе затекания должна пройти все промежуточные радиусы и достигнуть минимального размера.

Вопрос о возможности *полного затекания* липидных пор остается открытым. Предполагается, что полному затягиванию поры *препятствуют* мощные силы *гидратации*, проявляющиеся при сближении стенок гидрофильных пор.

Липидные поры в отличие от белковых ионных каналов не обладают выраженной избирательностью, что коррелирует с их сравнительно большими исходными размерами.

Ясно, однако, что в процессе затекания липидные поры могут достигать *сколь угодно малых* размеров, в том числе сравнимых с размерами белковых ионных каналов, что может приводить к перераспределению ионных токов в мембране, например, при возбуждении.

Известно далее, что *после выключения* стрессового воздействия бислойная липидная мембрана может *вернуться в состояние* с низкой проводимостью, что подразумевает достижение порами размера, недостаточного для прохождения гидратированных ионов.

Таким образом, гидрофильные липидные поры *универсальны* в том отношении, что могут быть использованы клеткой для транспорта высокомолекулярных веществ, ионов и молекул воды.

Исследования проницаемости липидных пор развиваются в настоящее время в *двух* направлениях: в *первом* исследуются максимально большие поры, во *втором*, наоборот, – липидные поры минимального радиуса.

В первом случае речь идет об *электротрансфекции* – способе введения в живые клетки или липосомы молекул ДНК с целью переноса и внутриклеточного введения чужеродного генетического материала. Оказалось, что внешнее электрическое поле высокой напряженности способствует проникновению гигантской молекулы ДНК внутрь мембранной оболочки.

Максимальный размер критической поры соответствует жидкокристаллическому состоянию бислоя липидов в отсутствие внешнего электрического поля и равен 9 нм. Наложение внешнего электрического поля напряженностью 100 кВ/м понижает критический радиус поры до 1 нм за время 0,2 с. Поскольку при этом мембраны не разрушаются, то размер липидных пор в них не превышает, очевидно, этого нижнего предела.

Парадокс состоит в том, что эффективный диаметр статистического клубка ДНК, которая должна попасть внутрь частицы, достигает 2000 нм. Поэтому очевидно, что молекула ДНК должна проникать через мембрану в виде расплетенной одиночной нити. Известно, что конец нити имеет

диаметр 2 нм и может войти в пору. Однако свободная диффузия нити ДНК в пору при этом вряд ли возможна. В настоящее время механизм этого процесса до конца не ясен.

Предполагается, в частности, что:

- 1) молекула ДНК способна *расширить пору* и таким образом проскользнуть через мембрану,
- 2) проникновению ДНК могут способствовать *дополнительные силы* электрофореза и электроосмоса с учетом суммарного отрицательного заряда молекулы ДНК,
- 3) не исключено, также, что поры с фиксированными в них концами молекулы ДНК играют роль якоря, удерживающего молекулу в определенном месте у везикулы на поверхности мембраны, а сам процесс переноса является *разновидностью пиноцитоза*.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Протекание каких трех видов процессов обеспечивается селективной проницаемостью биомембран?
2. В чём состоит отличие электрохимического потенциала от химического потенциала?
3. Запишите уравнения Теорелла и Нернста-Планка.
4. Перечислите виды пассивного трансмембранного транспорта.
5. Какие вещества могут диффундировать через липидный бислой вследствие пассивной (обычной) диффузии?
6. Каким образом мелкие полярные молекулы (например, молекулы воды) диффундируют через биомембрану?
7. Каким образом кинки переносят молекулы воды через мембрану?
8. Какие выделяют виды мембранных белков-транспортёров?
9. Какие существуют три вида ионных насосов?
10. Какова характерная скорость переноса ионов через мембрану ионным насосом?
11. Какова характерная скорость переноса молекул и ионов через мембрану белковым каналом?

12. Какие существуют три схемы трансмембранного транспорта с помощью переносчиков-транспортёров?
13. Какие мембранные транспортёры называют котранспортёрами?
14. В чём отличие в работе активных транспортёров (ионных насосов) от вторичных активных транспортёров?
15. Какова характерная скорость переноса молекул через мембрану вторичными активными транспортёрами?
16. В чём сходство и различие простой диффузии и облегченной диффузии?
17. Какие существуют две разновидности облегченной диффузии?
18. Перечислите основные отличия облегченной диффузии от простой.
19. Приведите примеры белков-транспортёров глюкозы семейства GLUT.
20. Какие два основных метода используются для исследования функционирования белков-транспортёров?
21. Каким образом наличие липидных пор влияет на стабильность биомембран?
22. В результате каких внешних воздействий в мембране могут образовываться липидные поры?
23. Какова роль липидных пор в гемолизе эритроцитов?
24. Перечислите основные параметры модели гидрофильной липидной поры.
25. Каков количественный критерий существования критической поры?
26. Запишите выражение для высоты энергетического барьера липидной поры.
27. Запишите выражение для критического радиуса поры.
28. При каких стрессовых воздействиях размеры липидных пор могут превысить критическое значение?
29. Что называется электропорацией биомембраны?
30. Как изменяется величина критического радиуса поры при переходе из жидкокристаллического в гель-состояние?

31. В чём состоит принципиальное отличие липидных пор от белковых каналов с точки зрения проницаемости?
32. Что называется электротрансфекцией биомембраны?
33. Какие выделяют три разновидности механизма трансфекции ДНК через биомембрану?

6. АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ

Активный транспорт – это перенос вещества из мест с меньшим значением электрохимического потенциала $\tilde{\mu}_2$ в места с его большим значением $\tilde{\mu}_1$ ($\tilde{\mu}_1 > \tilde{\mu}_2$) (рисунок 58).

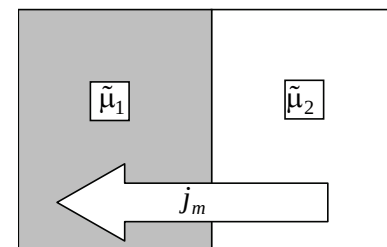


Рисунок 58 – Схема активного транспорта

Активный транспорт в биомембране сопровождается повышением энергии Гиббса, *он не может идти самопроизвольно*. Активный транспорт возможен *только в сопряжении* с процессом гидролиза молекулы АТФ, то есть за счет затраты энергии, запасенной в макроэргических связях АТФ.

Роль активного транспорта веществ через биологические мембраны состоит в том, что за счет активного транспорта в организме *создаются* градиенты концентраций, градиенты электрических потенциалов, градиенты давления и т. д., поддерживающие жизненные процессы, то есть с точки зрения термодинамики активный перенос веществ *удерживает* организм в *неравновесном состоянии*, поддерживает жизнь.

6.1. АТФ-насосы

Все АТФ-насосы являются трансмембранными белками с одним или несколькими центрами связывания АТФ, расположенными с цитозольной стороны мембраны. Хотя эти белки обычно называют АТФазами, однако они обычно не катализируют реакцию гидролиза АТФ на АДФ и неорганический фосфор P_i до тех пор, пока ионы или другие транспортируемые молекулы не свяжутся с белком, при этом одновременно с гидролизом АТФ происходит и транспорт молекул (или ионов) через мембрану.

Из-за такого сопряжения гидролиза АТФ и транспорта вещества энергия, выделяющаяся при гидролизе, не рассеивается, а расходуется на совершение работы по перемещению ионов или других молекул через мембрану, причем, как правило, такое перемещение совершается против электрохимического градиента.

Четыре различных типа АТФ-насосов изображены схематически на рисунках 59 и 60.

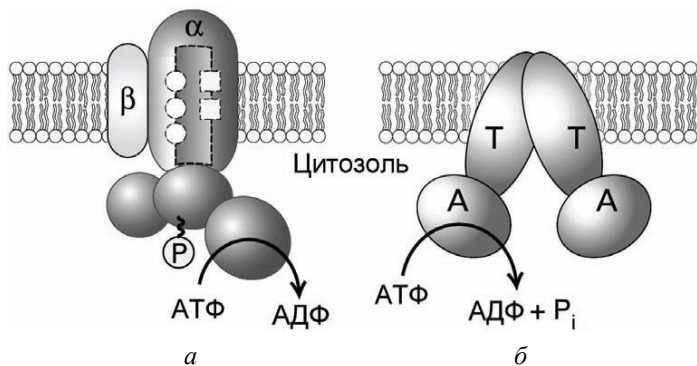


Рисунок 59 – Схема АТФ-насосов: а – Р-класса, б – ABC-семейства

К АТФ-насосам **Р-класса** относятся: **протонные помпы** плазматических мембран клеток растений, грибов и бактерий; **Na^+/K^+ -насосы** плазматических мембран эукариот; **H^+/K^+ -насосы** верхних (апикальных) мембран клеток кишечника млекопитающих; **Ca^{2+} -насосы** плазматиче-

ских мембран эукариот; **Ca^{2+} -насосы** мембран саркоплазматического ретикула мышечных клеток.

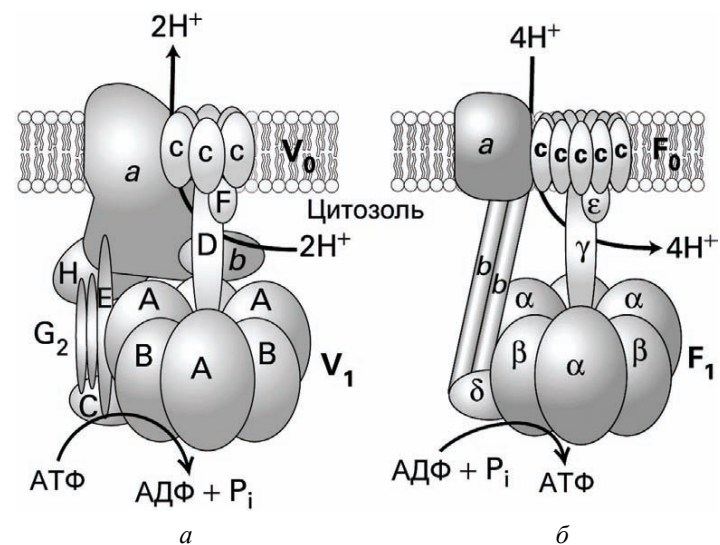


Рисунок 60 – Схема АТФ-насосов: а – V-класса, б – F-класса

Обязательным компонентом насосов Р-класса является каталитическая α -субъединица, фосфорилирование которой стимулирует перенос метаболитов через мембрану. Символ "Р" в названии класса использован, поскольку активация насосов Р-класса осуществляется именно присоединением фосфора – фосфорилированием. β -Субъединица, которая входит в состав некоторых насосов Р-класса, регулирует транспортную активность насоса. В состав некоторых насосов входит несколько $\alpha\beta$ -пар субъединиц, но транспортно активной является только та из них, которая фосфорилирована в данный момент.

АТФ-насосы **ABC-семейства** (рисунок 59(б)) расположены, например, на плазматических мембранах *бактерий* (переносят аминокислоты, сахара и пептиды) и *млекопитающих* (транспортёры фосфолипидов, холестерина, различных малых, в том числе липофильных, молекул). Название класса является аббревиатурой словосочетания **ATP-binding cassette**.

Все белки большого семейства АВС-транспортёров состоят из двух трансмембранных доменов (Т) и двух цитозольных АТФ-связывающих доменов (А), которые сопрягают гидролиз АТФ с переносом метаболитов через мембрану. В одних АВС-транспортёрах (преимущественно в бактериях) эти четыре домена являются независимыми субъединицами, в других – они объединены в единую полипептидную цепь. В отличие от остальных (Р-, F- и V-) классов насосов, которые переносят через мембрану *только ионы*, АВС-транспортёры переносят, *главным образом*, малые молекулы и даже небольшие белки.

АТФ-насосы **V-класса** (рисунок 60(а)) расположены на вакуолярных мембранах растений, дрожжей и грибов; на эндосомальных и лизосомальных мембранах клеток животных; на плазматических мембранах остеокластов (костных клеток) и некоторых клеток почечных канальцев.

АТФ-насосы **F-класса** (рисунок 60(б)) расположены на плазматической мембране бактерий, на внутренней мембране митохондрий и на тилакоидной мембране хлоропластов.

Насосы F- и V-классов переносят через мембрану только протоны (протонные помпы). Структурно эти два класса насосов подобны. Насосы V-класса используют энергию гидролиза АТФ для переноса протонов через мембрану, а насосы F-класса, наоборот, обычно используют энергию трансмембранного тока протонов для синтеза АТФ.

Именно ионные насосы обеспечивают физиологическое значение концентрации ионов в цитозоле клетки. Так, для среднестатистической клетки рН цитозоля равен 7,2 независимо от кислотности вне клетки; концентрация ионов K^+ в 20–30 раз выше в цитозоле клеток крови, чем собственно в крови, а Na^+ , наоборот, в 8–12 раз ниже, чем в крови. Концентрация ионов Ca^{2+} в тысячи раз ниже в этих клетках, чем в крови. Именно ионные насосы обеспечивают такой градиент концентраций ионов на мембранах, расходуя на это значительное количество синтезируемых в клетках молекул АТФ. Так, например, для поддержания физиологических значений концентраций ионов около 25% АТФ, синтезированных в нейронах, расходуется ионными Na^+/K^+ -насосами, а в эритроцитах человека эти же насосы расходуют до 50% АТФ.

6.2. Механизм действия Ca^{2+} -АТФазы

Рассмотрим основные принципы работы ионных насосов на примере Ca^{2+} -АТФазы *саркоплазматического ретикулума* (SR) клеток мышц (SR Ca^{2+} -АТФаза) (рисунок 61).

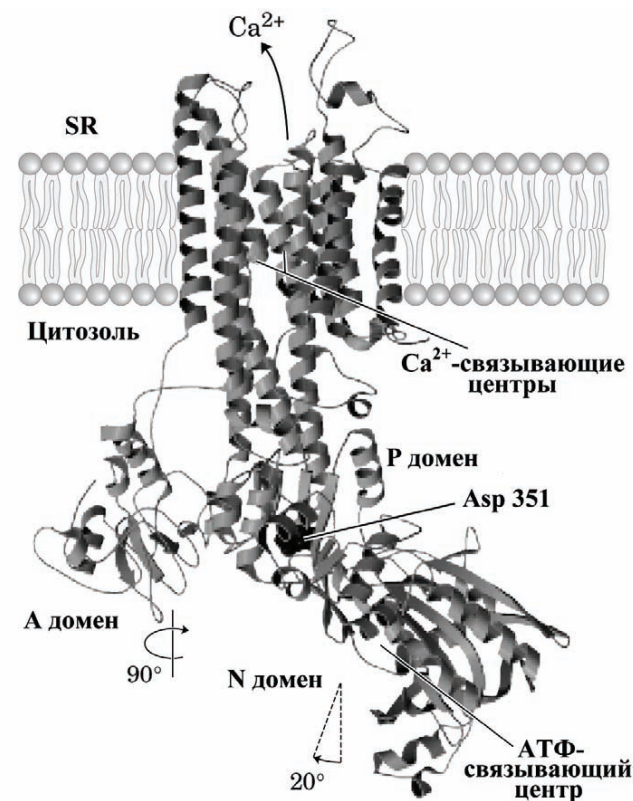


Рисунок 61 – Структура SR Ca^{2+} -АТФазы

Этот фермент составляет 80% белков саркоплазматического ретикулума и играет ключевую роль в реализации сокращения клеток мышц, которое стимулируется ростом концентрации ионов кальция в цитозоле. А релаксация мышц происходит вследствие уменьшения концентрации кальция в цитозоле и переносом его в саркоплазматический ретикулум

(специализированный "отсек" гладкого эндоплазматического ретикула для хранения ионов кальция), который осуществляется SR Ca^{2+} -АТФазой.

Концентрация ионов Ca^{2+} в цитозоле клеток мускулатуры изменяется от значений 10^{-7} М (в расслабленном состоянии) до более чем 10^{-6} М (при сокращении), а в саркоплазматическом ретикулуме концентрация Ca^{2+} может достигать 10^{-2} М.

Ca^{2+} -АТФаза – это 110 кДа полипептид, трансмембранный домен которого состоит из десяти α -спиралей. (1 Дальтон (Да) = 1 а.е.м. = $1,66 \cdot 10^{-24}$ г). Большая цитоплазматическая часть SR Ca^{2+} -АТФазы составляет приблизительно половину молекулярной массы белка и состоит из трех доменов (рисунок 61).

Три цитоплазматических домена SR Ca^{2+} -АТФазы имеют различные функции. Нуклеотид-связывающий домен N связывает АТФ, фосфорилируемый домен Р принимает фосфатную группу на аспарат Asp 351, активаторный (управляющий) домен А активизирует домен N.

Десять трансмембранных α -спиралей формируют канал для прохождения Ca^{2+} через мембрану. Две из этих спиралей доходят только до середины мембраны и те места, в которых белковая нить становится спиралью, являются центрами связывания ионов кальция.

Пространственное положение домена А управляет сродством ионов Ca^{2+} к этим связывающим центрам и последующим выходом ионов кальция из цитозоля наружу из клетки или в саркоплазматический ретикулум клетки.

В исходном состоянии между центром фосфорилирования и центрами связывания Ca^{2+} -ионов достаточно большое расстояние. В процессе одного транспортного цикла домен N наклоняется на 20° влево (рисунок 61), перемещая АТФ-центр к аспартату Asp 351 (аспарагиновая кислота), и домен А поворачивается на 90° вокруг нормали к мембране.

Такие изменения конформации молекулы приводят к перемещению Ca^{2+} -связывающих центров сначала на одну сторону мембраны, а затем на другую, изменяя при этом сродство этих центров к ионам Ca^{2+} от высокого на цитоплазматической стороне мембраны до низкого на саркоплазматической стороне мембраны.

Общим для работы всех насосов является

- (1) фосфорилирование специфического аспартата – Asp 351 в случае SR Ca^{2+} -АТФазы,
- (2) существование как минимум двух различных конформаций, которые мы обозначим E_1 и E_2 .

С учетом фосфорилирования, следовательно, существует минимум четыре конформационных состояния E_1 , E_1 -P, E_2 -P, E_2 , на основе которых можно построить общую схему работы насосов (рисунок 62).

Реакционный цикл работы насоса состоит из шести этапов.

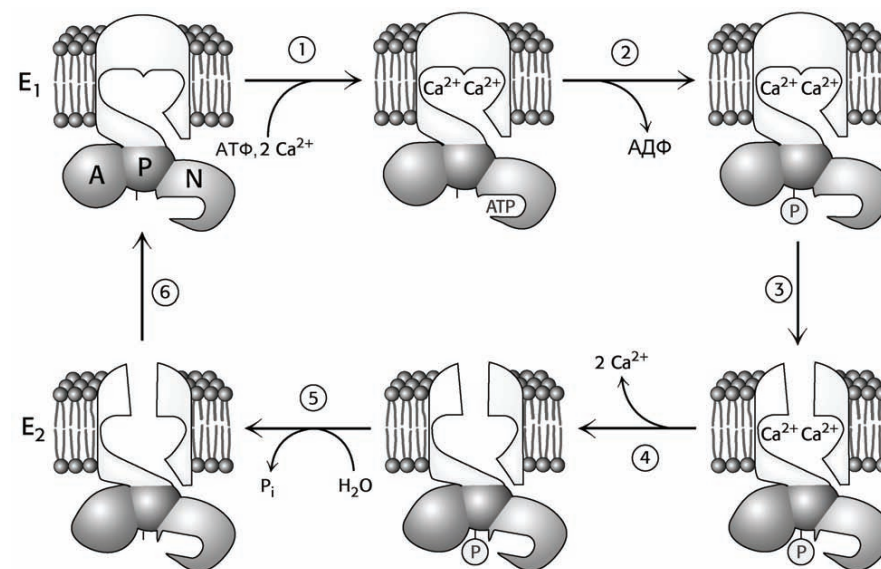


Рисунок 62 – Схема механизма действия SR Ca^{2+} -АТФазы: связывание Ca^{2+} (1) и фосфорилирование АТФазы (2) приводит к переносу (3) центров связывания с цитозольной на внешнюю сторону мембраны и высвобождению Ca^{2+} (4); гидролиз фосфоаспартата (5) и конформационный переход, переносающий центры связывания обратно на внутреннюю сторону мембраны (6), возвращает АТФазу в исходное состояние

1. Цикл начинается со связывания АТФ и двух ионов Ca^{2+} с конформацией E_1 АТФазы.
2. АТФаза переносит фосфатную группу к целевому аспартату. Кальций уже должен быть связан ферментом, чтобы могло проходить фосфорилирование. Фосфорилирование смещает конформационное равновесие АТФазы в сторону E_2 -конформации.
3. Переход от E_1 к E_2 конформации приводит к "выворачиванию" через мембрану ион-связывающих центров так, что диссоциация ионов кальция будет происходить уже на наружной стороне мембраны.
4. В E_2 -Р конформации АТФаза имеет низкое сродство к ионам Ca^{2+} , что приводит к их высвобождению.
5. Высвобождение ионов Ca^{2+} стимулирует гидролиз фосфоаспартата (дефосфорилирование) и диссоциацию фосфатной группы.
6. АТФаза, лишённая ковалентно связанной фосфатной группы, конформационно нестабильна в E_2 состоянии. Она "выворачивается обратно" в E_1 -конформацию, завершая реакционный цикл.

Все ионные насосы Р-класса независимо от того, какие ионы они перекачивают через мембрану, имеют *подобное строение*. Во всех таких насосах происходит фосфорилирование аспартата, трансмембранные α -домены всех насосов Р-класса имеют приблизительно одинаковый молекулярный вес и одинаковую "конструкцию" из α -спиралей. Всё это говорит о происхождении всех Р-насосов *от общего предка*, хотя и с течением времени эти насосы эволюционно приспособились транспортировать различные ионы.

Изменение цитозольной концентрации ионов Ca^{2+} играет ключевую роль в механизмах клеточной сигнализации. Для того, чтобы быстро реагировать на сигнал, о котором внутриклеточные системы узнают из скачкообразного роста концентрации кальция в цитозоле, необходимо постоянно (в промежутках между сигналами) поддерживать низкую концентрацию ионов Ca^{2+} в цитозоле (ниже 0,1–0,2 мкМ).

Ионы Ca^{2+} удаляют из цитозоля Ca^{2+} -АТФазы плазматической мембраны клетки, строение которых подобно SR Ca^{2+} -АТФазе. Активность

Ca^{2+} -АТФаз плазматической мембраны регулируется кальций-связывающими цитозольными белками кальмодулинами.

При высокой концентрации кальция в цитозоле кальмодулины, вследствие связывания с ионами кальция, изменяют конформацию и "обхватывают" Ca^{2+} -АТФазы, что, в свою очередь, индуцирует аллостерическую активацию АТФаз, в результате чего насосы быстро выкачивают ионы из цитозоля.

6.3. Механизм действия Na^+/K^+ -АТФазы

К классу Р-насосов относятся и Na^+/K^+ -АТФазы, которые расположены на плазматических мембранах всех животных клеток. Na^+/K^+ -АТФаза представляет собой тетрамер $\alpha_2\beta_2$. Небольшой гликозилированный полипептид β помогает правильному фолдингу α -субъединицы, но сам не участвует в транспорте ионов. Общая структура α -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы подобна структуре Ca^{2+} -АТФазы.

За *один цикл* работы насоса одна α -субъединица перекачивает *три иона натрия* из цитозоля наружу и *два иона калия* навстречу – из внеклеточного пространства в цитозоль, расходуя на совершение этого цикла энергию гидролиза *одной молекулы АТФ*.

Механизм работы Na^+/K^+ -АТФазы, представленный на рисунке 63 для одной из субъединиц α , в общих чертах подобен механизму функционирования Ca^{2+} -АТФазы, с учётом того, что, в отличие от Ca^{2+} -АТФазы, в случае Na^+/K^+ -АТФазы перенос ионов через мембрану происходит в *обоих направлениях*.

В E_1 -конформации Na^+/K^+ -АТФаза открыта *в цитозоль* и имеет высокое сродство к Na^+ в трёх натрий-связывающих центрах и низкое сродство к K^+ в двух калий-связывающих центрах. В результате происходит связывание трех ионов Na^+ с насосом.

Параллельно происходит связывание АТФ с нуклеотид-связывающим доменом (этап 1 на рисунке 63), фосфорилирование аспартата (этап 2) и конформационный переход из E_1 в E_2 -конформацию (этап 3), в результате которого закрывается канал, соединявший центры связывания ионов с цитозолем, сами эти центры становятся доступными с эктоплаз-

матической стороны мембраны, и сродство натрий-связывающих центров к ионам натрия резко снижается, а сродство калий-связывающих центров к ионам K^+ , наоборот, резко повышается.

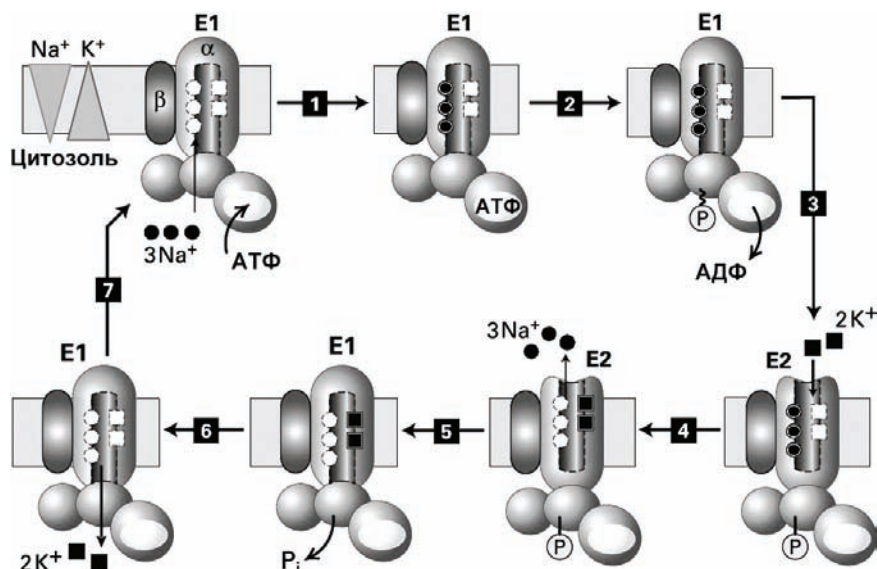


Рисунок 63 – Схема механизма действия Na^+/K^+ -АТФазы

В результате два иона K^+ связываются с Na^+/K^+ -АТФазой, а три иона Na^+ диссоциируют во внеклеточное пространство (этап 4). Последующее дефосфорилирование стимулирует обратный конформационный переход из E_2 в E_1 -конформацию (этап 5), сродство калий-связывающих центров резко снижается, ионы калия диссоциируют в цитозоль (этап 6), и Na^+/K^+ -АТФаза возвращается в исходное состояние (этап 7 на рисунке 63).

6.4. Протонные насосы F-класса

Насосы F-класса, использующие ток протонов для синтеза АТФ, называются АТФ-синтазами или комплексами F_0F_1 .

Комплекс F_0F_1 или АТФ-синтаза состоит из двух главных компонентов F_0 и F_1 (рисунок 64), которые ещё называют мембранным и цитозольным моторами.

Мембранный компонент F_0 состоит из трех типов интегральных мембранных белков, которые обозначаются **a**, **b** и **c**. В клетках бактерий и дрожжей часть F_0 состоит из одной субъединицы **a**, двух субъединиц **b** и десяти субъединиц **c**, поэтому состав компонента F_0 записывают как $a_1b_2c_{10}$.

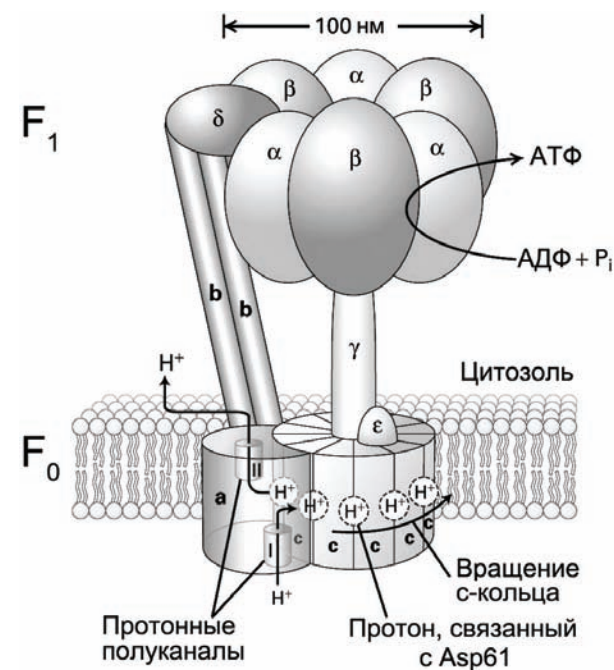


Рисунок 64 – Схема АТФ-синтазы в плазматической мембране бактерий

Компонент F_0 митохондрий клеток животных содержит 12 субъединиц **c**, а хлоропластов растений – 14 субъединиц **c**. Субъединицы **c** образуют кольцо в плоскости мембраны. Субъединицы **a** и **b** прочно связаны между собой, но не связаны с кольцом субъединиц **c**.

Цитозольный компонент F_1 является водорастворимым комплексом пяти различных полипептидов и имеет структуру $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. В нижней части F_1 находится субъединица ϵ , которая прочно присоединена как к субъединице γ , так и к нескольким субъединицам c компонента F_0 .

Субъединицы α и β компонента F_1 соединены друг с другом поочередно и формируют *кольцевой гексамер* $\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$ или $(\alpha\beta)_3$, который расположен наверху субъединицы γ . Субъединица δ прикрепляет этот гексамер к субъединицам b компонента F_0 . В результате a и b субъединицы компонента F_0 и δ и $(\alpha\beta)_3$ гексамер компонента F_1 образуют *прочную* связанную структуру, которая закорена в мембране – своеобразный *статор*, который не участвует в механическом движении, и относительно которого вращается *ротор*, состоящий из субъединиц c мотора F_0 и субъединиц γ и ϵ мотора F_1 .

Синтез АТФ. Протон через *протонный полуканал I* в субъединице **a** доходит до субъединицы **c** и связывается с аспартатом Asp61 этой субъединицы. После поворота c-кольца этот протон достигает *полуканала II*, который позволяет протону диссоциировать с аспартата и выйти в цитозоль.

Создаваемое таким потоком протонов вращение субъединицы γ относительно неподвижных субъединиц α и β циклически стимулирует конформационные переходы в каталитических субъединицах β компонента F_1 (рисунок 65).

Каждая каталитическая субъединица β *поочередно* принимает *три* конформации.

1. О-конформация (*open*), которая слабо связывает АДФ и P_i , и не связывает АТФ,
2. L-конформация (*low*), которая сильнее связывает АДФ и P_i ,
3. Т-конформация (*tight*), в которой АДФ и P_i связываются так сильно, что спонтанно формируют АТФ.

Дальнейшее вращение субъединицы γ возвращает каталитическую субъединицу в исходную О-конформацию, в которой образованная молекула АТФ отсоединяется, и цикл начинается снова.

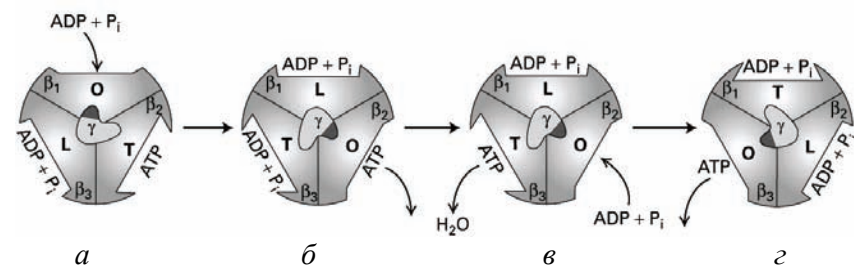


Рисунок 65 – Каталитический цикл АТФ-синтазы

Допустим АДФ и P_i связываются с субъединицей β_1 , находящейся в О-конформации (рисунок 65(а)). Ток протонов проворачивает ротор АТФ-синтазы (и γ -субъединицу) на 120° относительно неподвижных субъединиц β (рисунок 65 (а)→(б)). В результате такого поворота способность субъединицы β_1 к связыванию АДФ и P_i возрастает с О до L, соответственно, у субъединицы β_3 возрастает с L до Т, а у субъединицы β_2 снижается с Т до О, что приводит к выходу образованной молекулы АТФ из субъединицы β_2 .

На следующем этапе (рисунок 65 (б)→(в)) АДФ и P_i внутри субъединицы β_3 , которая теперь имеет Т-конформацию, сливаются в молекулу АТФ, а к субъединице β_2 (в конформации О) присоединяются АДФ и P_i . В результате (рисунок 65(в)) образуется такой же комплекс F_1 с метаболитами, как и вначале (рисунок 65(а)), но повернутый на 120° .

На следующем этапе (рисунок 65 (в)→(г)) происходит поворот ещё на 120° γ -субъединицы, который снова стимулирует $O \rightarrow L \rightarrow T \rightarrow O$ конформационные изменения субъединиц β , описанные выше. Повторение этапов (а)→(б) и (б)→(в) приводит к образованию трех молекул АТФ на каждый "полный оборот" γ -субъединицы на 360° .

Молекулы АТФ или АДФ также связываются с регуляторными (или аллостерическими) центрами на трех α -субъединицах. Такое связывание обеспечивает *изменение скорости* синтеза АТФ по мере изменения концентрации АТФ в матриксе, но не влияет непосредственно на синтез АТФ из АДФ и P_i .

Работа компонента F_1 *обратима*. Вращение ротора так стимулирует каталитические субъединицы, что они катализируют синтез АТФ. В этом случае АТФ-синтаза работает как *генератор* АТФ. И наоборот, диссоциация АТФ стимулирует вращение ротора.

На рисунке 66 показаны конформационные изменения в компоненте F_1 при вращении ротора. Изображена только одна каталитическая субъединица, а остальная часть мотора F_1 показана контуром.

В верхних частях β -субъединицы совместно формируют структуру, функционально подобную *подшипнику*, в которой закреплен конец ротора. Эти верхние части не изменяются при конформациях β -субъединиц, сохраняя "подшипник". В нижней части рисунка 66 показаны два положения ротора. При вращении ротора изменяется конформация только нижней части каждой β -субъединицы по отношению к верхней, неподвижной части. При этом *стимулируется* (прижимаются друг к другу) *объединение* АДФ и фосфата, и при дальнейшем повороте ротора готовая АТФ *вытесняется* из центра связывания.

Отметим, что мотор F_1 не "запитывается" напрямую диссоциацией АТФ. Диссоциация АТФ обеспечивает *необратимость* процесса вращения на каждом этапе цикла АТФ-синтазы.

Когда АТФ-синтаза работает в качестве мотора, АТФ легко связаться с каталитическими субъединицами, но сложно высвободиться, а АДФ, наоборот, сложно связаться, но легко высвободиться. АТФ, легко связавшись с АТФ-синтазой, гидролизуются и в виде АДФ легко покидает АТФ-синтазу.

При работе АТФ-синтазы в качестве генератора АТФ внешняя механическая энергия используется *для реализации двух* энергозатратных *этапов*: стимуляции связывания АДФ и стимуляции высвобождения АТФ.

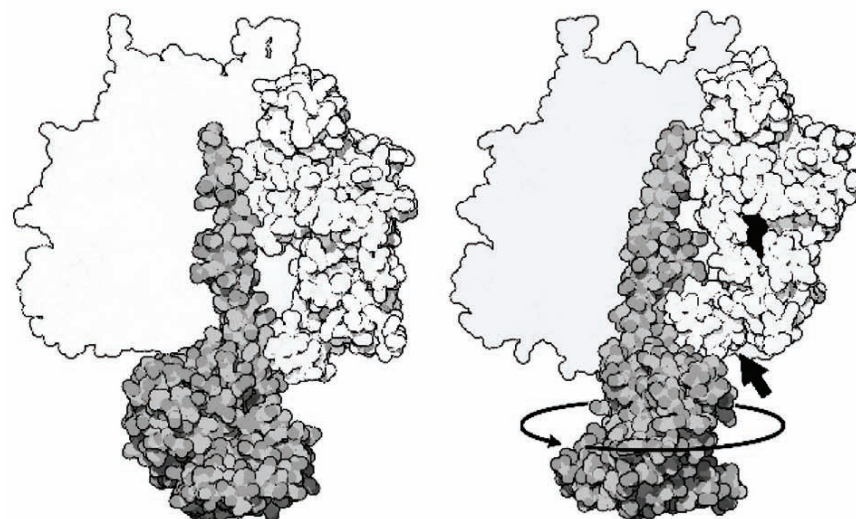
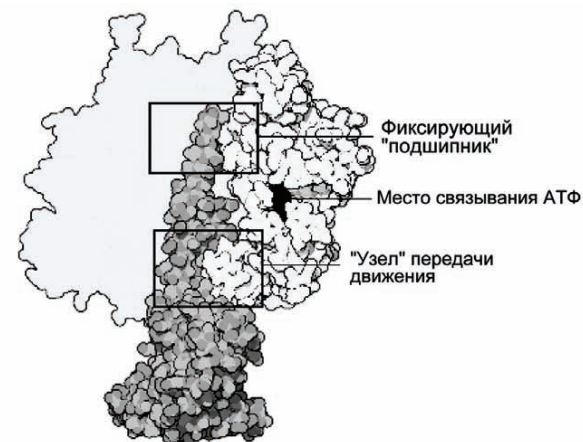


Рисунок 66 – Конформационные изменения в F_1 моторе АТФ-синтазы.

Вращение ротора АТФ-синтазы. Принцип работы мотора F_0 , который в настоящее время считается наиболее обоснованным из множества выдвинутых гипотез и реализующий процесс *вращательной диффузии*, показан на рисунке 67.

Цилиндрический трансмембранный ротор АТФ-синтазы имеет отрицательно заряженные *центры связывания* протонов (радикалы аспаргиновой кислоты Asp61). Поскольку ротор погружен в мембрану, он может вращаться, только если эти центры нейтрализованы протонами.

Протоны достигают ротора через один *полуканал* в статоре (на рисунке 67 схематически показан статорный домен, примыкающий справа к ротору) и, совершив круг вместе с ротором, выходят через другой *полуканал* в теле статора с противоположной стороны мембраны.

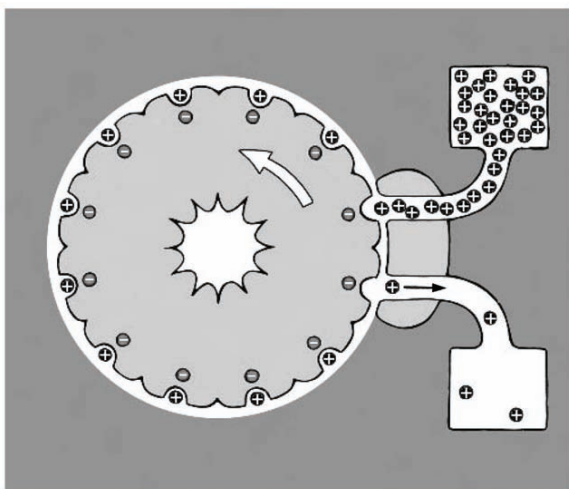


Рисунок 67 – Принцип работы мотора F_0

В настоящее время подробно исследованы два варианта мотора F_0 , которые приводятся в движение потоками *протонов* или *ионов натрия*.

В принципе цилиндрический ротор мотора F_0 может совершать *произвольные* скачки в *обоих* направлениях, стимулированные тепловым движением. Для обеспечения *однонаправленного* вращения необходимо *разрешать* повороты в *нужном* направлении и *блокировать* повороты ротора в *обратном* направлении. Другими словами, мотор из произвольных случайных тепловых движений должен "отбирать" только "благоприят-

ные" события или выполнять функцию "броуновского решета" (или "броуновского храповика").

Отрицательно заряженные радикалы аспаргиновой кислоты в центрах связывания протонов ротора *не позволяют* ротору свободно вращаться в мембране.

Через полуканал в статоре (верхний полуканал на рисунке 67) протоны из области с повышенной концентрацией протонов проходят к ротору. В области, закрытой от мембраны статором, аспартаты ротора могут протонироваться, нейтрализуя тем самым свой отрицательный заряд.

Нейтрализованные домены ротора могут затем вращаться (против часовой стрелки, как показано на рисунке) внутри мембраны. После завершения оборота протонированный аспартат снова попадает в экранированную от мембраны статором область. Здесь находится второй полуканал, выходящий на противоположную сторону мембраны, где концентрация протонов ниже.

Протон диссоциирует с аспартата и выходит через полуканал, а оставшийся заряженный аспартат *не позволяет* ротору вращаться в обратном направлении (своеобразный молекулярный храповик, выполняющий функцию броуновского решета).

Весь этот процесс *обратим*.

Самопроизвольно мотор F_0 будет захватывать протоны из полуканала, где их концентрация высока, и высвобождать их в полуканал, где концентрация протонов низка.

Однако *если приложить* к ротору постоянный *вращательный момент* в противоположном направлении, то ротор не сможет вращаться (теперь уже по часовой стрелке в направлении, противоположном указанному на рисунке 67 стрелкой) до тех пор, пока он не захватит протон из полуканала с низкой концентрацией протонов.

Завершив оборот, ротор высвободит протон в полуканал с высокой концентрацией протонов. В этом случае под действием внешней силы мотор будет работать как *протонная помпа*, перекачивающая протоны через мембрану.

6.5. Протонные насосы V-класса

Все АТФазы V-класса переносят через мембрану только протоны (ионы H^+). Функционирование эти протонных помп, расположенных на мембранах лизосом, эндосом и вакуолей растений, обеспечивает повышенную кислотность в люмене этих органелл, которая может в сотни раз (значения $pH \approx 4,5-5,0$) превышать кислотность цитоплазмы ($pH \approx 7,0$).

АТФазы V-класса структурно подобны насосам F-класса (рисунок 60(a)), они состоят из двух доменов: цитозольного гидрофильного домена V_1 и трансмембранного домена V_0 , каждый из которых состоит из множества субъединиц.

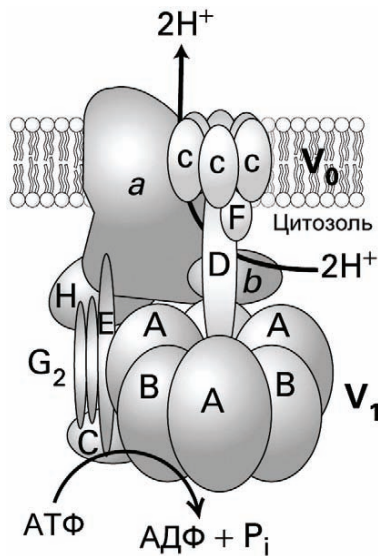


Рисунок 68 – Схема АТФ-насоса V-класса

Связывание и гидролиз АТФ на субъединице В домена V_1 обеспечивает энергией процесс перекачки протонов через канал, образуемый субъединицами а и с в мембранном домене V_0 (рисунок 68).

В отличие от Р-насосов, насосы класса V не фосфорилируются в процессе функционирования. А в отличие от F-насосов, насосы класса V

не используются для синтеза АТФ, а всегда переносят протоны из цитозоля в люмен органеллы. Для существенного изменения кислотности оказывается достаточным транспортировать относительно немного протонов через мембрану. Действительно, для сферической лизосомы диаметром 0,2 мкм (соответственно, объемом $4,18 \cdot 10^{-15} \text{ см}^3$) кислотность $pH = 4$ обеспечивается всего лишь 252 протонами на всю лизосому.

Самостоятельно АТФазы V-класса не способны значительно повысить кислотность люмена органеллы, поскольку они являются *электрогенными насосами*, которые осуществляют процесс разделения зарядов на мембране. Действительно, закачанные ионы H^+ в люмен органеллы продолжают электростатически взаимодействовать с "оставшимися" в цитозоле анионами (например, OH^- или Cl^-), что приводит к тому, что разделенные мембраной заряды концентрируются на этой же мембране (рисунок 69(a)). В результате на мембране создается электрический (мембранный) потенциал, а в люмене органеллы не оказывается избыточных протонов, и кислотность люмена остается нейтральной.

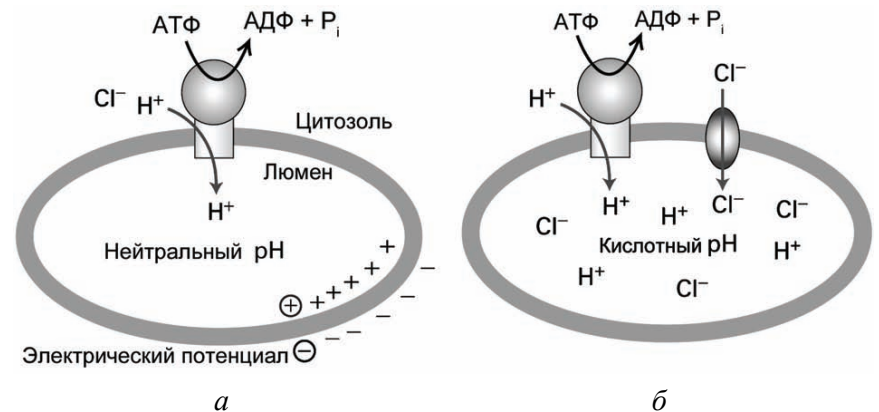


Рисунок 69 – Функционирование АТФаз V-класса: а – создание мембранного потенциала, б – повышение кислотности люмена органеллы

По мере увеличения мембранного потенциала возрастает электростатическое противодействие перемещению протонов через мембрану,

которое в конце концов *останавливает* перенос протонов V-насосами задолго до того, как кислотность люмена органеллы заметно увеличится.

Именно таким способом протонные помпы Р-класса на плазматических мембранах клеток растений и дрожжей создают отрицательный потенциал цитозоля этих клеток.

Для того чтобы повысить кислотность люмена органеллы или внеклеточного пространства (например, люмена кишечника), перемещение протонов через мембрану должно сопровождаться либо (1) синхронным перемещением в том же направлении эквивалентного количества анионов (например, Cl^-), либо (2) синхронным перемещением каких-либо других катионов навстречу току протонов, сохраняя тем самым неизменным объёмный электрический заряд компартмента.

Процесс *первого* типа осуществляется в *лизосомах* и *вакуолях* растений, чьи мембраны наряду с АТФазами V-класса содержат также анионные каналы, по которым синхронно (и самопроизвольно) перемещаются ионы Cl^- внутрь люмена органеллы (рисунок 69(б)).

Процесс *второго* типа осуществляется на апикальных поверхностях плазматических мембран клеток слизистой оболочки *кишечника* (рисунок 19), которые содержат Р-насосы H^+/K^+ АТФазы, которые работают по схеме антипорта и не являются электрогенными, поскольку за один цикл переносят через мембрану клетки один протон из цитозоля наружу в люмен кишечника и один ион калия K^+ из люмена кишечника внутрь клетки.

6.6. АВС-транспортёры

Как отмечалось выше, все белки большого суперсемейства АВС-транспортёров (**ATP-binding cassette**) состоят из двух трансмембранных (Т) и двух цитозольных АТФ-связывающих (А) доменов (рисунок 59(б)).

Каждый домен Т состоит из шести трансмембранных α -спиралей. Два домена Т формируют проход в мембране, через который транспортируемый метаболит (который часто называют субстратом) проходит сквозь мембрану и который определяет субстратную специфичность каждого АВС-транспортёра.

Строение доменов А на 30–40% аналогично во всех АВС-транспортёрах, что указывает на их общее эволюционное происхождение. Некоторые АВС-белки содержат также дополнительные экзоплазматические субстрат-связывающие или регуляторные субъединицы.

Плазматическая мембрана многих *бактерий* содержит многочисленные белки *пермеазы*, которые являются членами АВС-суперсемейства. Пермеазы используют энергию гидролиза АТФ для переноса специфических аминокислот, сахаров, витаминов и даже пептидов через мембрану в цитозоль клетки. Поскольку бактерии часто существуют в почве или водоёмах с низкой концентрацией питательных веществ, то АВС-транспортёры обеспечивают снабжение клетки даже против градиента концентрации.

Бактериальные *пермеазы* обычно являются индуцируемыми.

По определению *индуцируемыми* или *адаптивными* ферментами называются ферменты, скорость синтеза которых *изменяется* в зависимости от условий существования организма. Регуляция синтеза индуцируемых ферментов происходит на генетическом уровне под действием индукторов, которыми могут быть соответствующие субстраты и метаболиты, а также гормоны. Механизм индукции заключается в депрессировании генов, контролирующих синтез.

Типичным примером индуцируемого фермента является β -галактозидаза (катализирует гидролитическое расщепление лактозы на составляющие моносахариды: галактозу и глюкозу), биосинтез которой в некоторых микроорганизмах происходит лишь тогда, когда единственным источником углерода в питательной среде является лактоза или её аналоги.

Те же ферменты, которые постоянно синтезируются организмом *независимо* от условий существования или наличия соответствующих субстратов, называются *конститутивными* ферментами.

Поскольку бактериальные пермеазы являются индуцируемыми белками, то их количество в плазматической мембране бактерии регулируется и концентрацией питательных веществ в окружающей среде, и метаболическими потребностями клетки.

У гистидиновой пермеазы *E. coli*, типичного бактериального ABC-транспортёра, все четыре домена – два трансмембранных и два цитозольных АТФ-связывающих – являются *отдельными* субъединицами.

У грамотрицательных бактерий, таких, как *E. coli*, наружная клеточная стенка содержит белковые поры – *порины* (рисунок 36), которые обеспечивают свободный вход малых молекул в периплазматическое пространство. Водорастворимые *гистидин-связывающие* белки, которые находятся в этом периплазматическом пространстве, *связываются* с прошедшим через порины гистидином, после чего такой комплекс может быть перемещён через плазматическую мембрану в цитозоль клетки субъединицами Т пермеазы, используя энергию гидролиза АТФ.

Мутантные штаммы *E. coli*, которые являются дефектными по любому из генов, кодирующих субъединицы пермеазы, не способны транспортировать гистидин в цитозоль клетки, но они сохраняют способность транспорта других аминокислот, который осуществляется другими транспортными белками.

В настоящее время обнаружено более 50 ABC-транспортёров в клетках *млекопитающих*, переносящих малые молекулы через мембраны.

Первый ABC-насос был обнаружен при исследовании явления *лекарственной резистентности* опухолевых клеток к некоторым лекарственным препаратам с различной химической структурой.

Именно эти клетки демонстрировали высокий уровень экспрессии транспортных белков MDR1, обеспечивающих *мультилекарственную резистентность* (*multidrug-resistance, MDR*). Эти транспортёры за счёт энергии гидролиза АТФ выкачивают различные лекарственные препараты из цитозоля клетки в эктоплазматическое пространство. Ген *Mdr1* значительно активизирован в клетках, обладающих мультилекарственной резистентностью, что приводит к гиперпродукции белков MDR1.

Большинство молекул лекарственных препаратов, которые выкачивает из цитозоля MDR1-транспортёр, являются малыми гидрофобными молекулами, действие которых заключается в блокировке различных клеточных функций, и которые попадают в цитозоль благодаря простой диффузии сквозь плазматическую мембрану без помощи специализированных транспортёров.

Два примера таких лекарственных препаратов: колхицин и винбластин, которые блокируют ассемблирование микротрубочек. Стимулированное гидролизом АТФ удаление этих лекарственных препаратов MDR1-транспортёрами значительно снижает их концентрацию в цитозоле. В результате для уничтожения опухолевых клеток, которые экспрессируют белки MDR1, требуется намного большая концентрация лекарственных препаратов во внеклеточной среде, чем в случае отсутствия такой экспрессии. Факт принадлежности белков MDR1 к АТФазным насосам был доказан с использованием липосом, содержащих очищенный белок (рисунок 53). АТФазная активность этих липосом усиливалась пропорционально концентрации лекарственных препаратов, которые могли транспортировать белки MDR1.

Более 50 обнаруженных в клетках *млекопитающих* ABC-транспортёров экспрессируются преимущественно в клетках печени, кишечника и почек – там, где протекают *интенсивные* процессы выведения из организма токсических веществ и продуктов жизнедеятельности. Субстратами этих ABC-белков являются сахара, аминокислоты, холестерол, пептиды, белки, токсины и ксенобиотики.

Именно в этих органах белки MDR1 естественным образом осуществляют *вывод* различных токсинов, как чужеродных, так и образующихся в метаболических процессах, в желчь, мочу, или в люмен кишечника. В ходе эволюции MDR1 приобрели способность выводить молекулы лекарственных препаратов, чья структура подобна этим эндогенным токсинам. Те опухоли, которые образовались из таких видов MDR1-экспрессирующих клеток, такие как, например, гепатомы (рак печени), зачастую *резистентны* практически ко всем химиотерапевтическим агентам и, следовательно, трудно поддаются терапии, преимущественно потому, что в опухолевых клетках происходит гиперэкспрессия MDR1 и родственного ему белка MDR2.

Субстратами белка MDR1 являются преимущественно плоские отрицательно заряженные жирорастворимые молекулы, несущие один или более негативных зарядов. Поскольку наблюдается конкуренция между такими субстратами, то, видимо, все они присоединяются к одному и тому же центру связывания MDR1.

В отличие от бактериальных ABC-транспортёров все домены белка MDR1 являются частями одной полипептидной цепи с молекулярной массой 170 кДа.

Исследование трехмерной структуры гомологичного ABC-транспортёра липидов *E. coli* показало, что молекула транспортёра имеет V-образную форму с вершиной, погруженной в мембрану, и расположенными в цитозоле центрами связывания АТФ (рисунок 70).

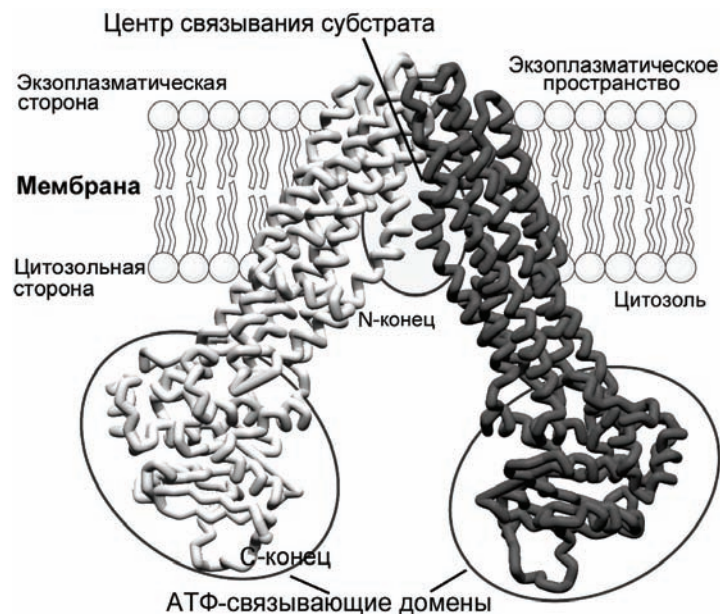


Рисунок 70 – Схема липидной флоппазы – ABC-транспортёра *E. coli*

Хотя детальный механизм работы белка MDR1 и аналогичных ABC-транспортёров еще не установлен, вероятнее всего, они функционируют по *флоппазному* механизму, представленному на рисунке 71.

В соответствии с этим механизмом транспортёр MDR1 перебрасывает ("flop") заряженную молекулу субстрата с цитозольной на эндоплазматическую сторону мембраны. Этот эндергонический процесс происходит за счет энергии гидролиза АТФ, благодаря АТФазной актив-

ности белка. Свидетельства в пользу этой модели дали исследования гомологичного белка MDR2, который располагается на плазматической мембране клеток печени выстилающих желчные протоки. MDR2 переносит фосфолипиды с цитозольной стороны мембраны на эктоплазматическую сторону по флип-флоп механизму, создавая тем самым избыток фосфолипидов в липидном монослое с эктоплазматической стороны мембраны. Эти липиды затем отделяются от мембраны и формируют значительную фракцию в составе желчи.

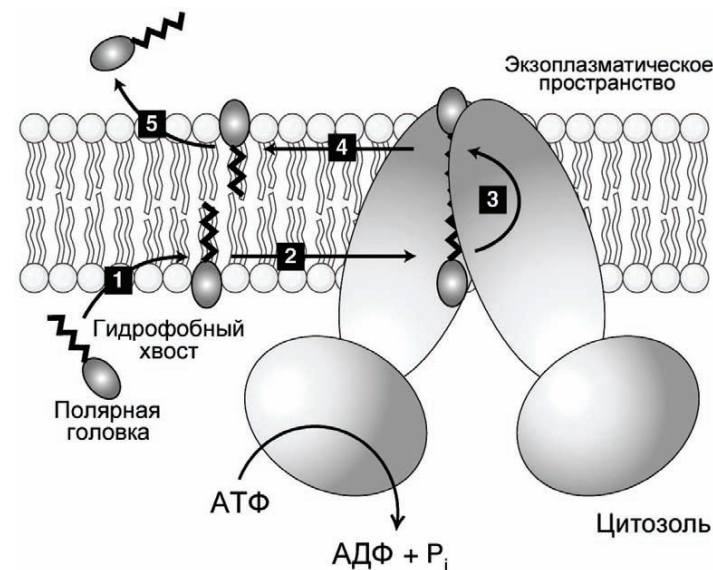


Рисунок 71 – Схема флоппазного механизма работы ABC-транспортёров

Весь процесс перемещения субстратов из цитозоля в эктоплазму ABC-транспортёрами типа MDR1 можно представить в виде *пяти* этапов (рисунок 71).

1. Гидрофобная часть субстрата (изображена черной зигзагообразной линией на рисунке 71) под действием гидрофобных сил самопроизвольно *встраивается* в цитозольный липидный монослой мембраны, а заряженная часть субстрата остаётся в контакте с цитозолем.

2. Субстрат *диффундирует* вдоль мембраны к белку MDR1 и связывается с ним.
3. Транспортёр за счёт энергии гидролиза АТФ *перебрасывает* заряженный субстрат на эктоплазматическую сторону мембраны.
4. На эктоплазматической стороне субстрат свободно *диффундирует* по липидному монослою.
5. В финале субстрат *уходит* в эктоплазматическое пространство.

Сам же механизм флип-флопа белка проиллюстрируем на примере бактериального BtuCD-транспортёра, который переносит витамин В₁₂ через мембрану (рисунок 72).

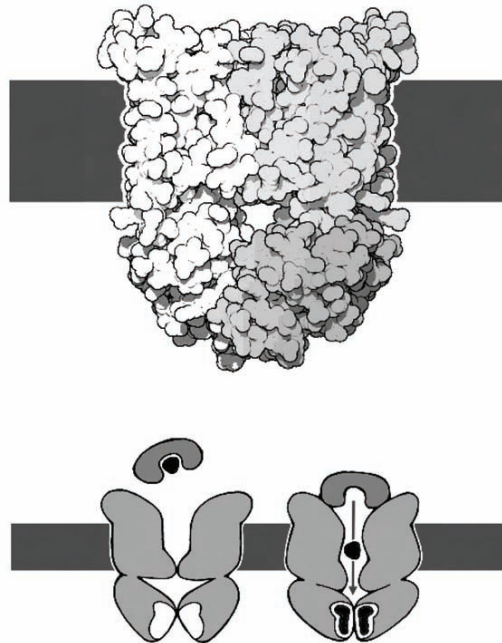


Рисунок 72– Схема работа бактериального BtuCD-транспортёра

Транспортёр имеет большой карман, который обычно открыт *наружу* клетки. Молекула витамина доставляется к транспортёру с помощью малого переносчика. Связывание АТФ с доменами транспортёра

внутри клетки приводит к изменению конформации транспортёра, при котором открывается *дно* кармана, и молекула витамина может войти в клетку.

АВС-транспортёры имеют, образно говоря, форму бельевой прищепки, проходящей сквозь мембрану. АТФ-связывающие домены находятся в "ручках прищепки", а в транспортный механизм входит специальный карман на "зажимах прищепки". Этот карман имеет два входа с обеих сторон мембраны.

При *флип-флопе* зажим "прищепки" попеременно открывается и закрывается. В одном состоянии открыт вход в карман со стороны зажима, а противоположный вход со стороны "ручек" закрыт. В другом состоянии, наоборот, закрыт вход со стороны зажима, а открывается вход со стороны ручек "прищепки". Переход между двумя состояниями стимулируется гидролизом АТФ. Аналогичным образом различные АВС-транспортёры осуществляют трансмембранную транслокацию множества различных молекул таких, как аминокислоты, ионы, сахара, витамины, токсины и т. д.

В завершение необходимо отметить одну терминологическую особенность. В литературе часто различают *флиппазы* и *флоппазы*. При этом отмечается, что *флиппазами* (*flippases*, от английского *flip*, "перевёртывать") называют мембранные ферменты, переносящие молекулы фосфолипидов с внешнего (для плазматической мембраны) и люминального (в случае внутриклеточных органелл) слоя мембраны на цитозольный слой мембраны. А *флоппазы* переносят фосфолипиды, наоборот, с цитозольного слоя на внешний. В соответствии с этой терминологией АВС-переносчики являются флоппазами, а бактериальный BtuCD-транспортёр является флиппазой.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Что называется активным транспортом вещества через биомембрану?
2. Перечислите четыре типа АТФ-насосов биомембран.
3. Какие белки-насосы относятся к АТФазам Р-типа?

4. Охарактеризуйте шесть этапов переноса ионов, сопряженных с гидролизом АТФ, в Ca^{2+} -АТФазе.
5. Охарактеризуйте этапы переноса ионов, сопряженных с гидролизом АТФ, в Na^+/K^+ -АТФазе.
6. Какова биологическая функция мультибелкового комплекса F_0F_1 ?
7. Какие субъединицы входят в состав мембранного компонента F_0 ?
8. Какие субъединицы входят в состав цитозольного компонента F_1 ?
9. Каким образом трансмембранный ток протонов через мотор F_0 приводит к синтезу АТФ в комплексе F_1 ?
10. Какие три конформации поочередно принимает каждая каталитическая субъединица β цитозольного мотора F_1 ?
11. Как фазы вращения ротора АТФ-синтазы связаны с каталитическим циклом синтеза АТФ?
12. Каким образом в мембранном моторе АТФ-синтазы реализуется процесс вращательной диффузии?
13. В люмене каких органелл обеспечивается повышенная кислотность вследствие работы АТФаз V-класса?
14. Какие два типа процессов должны сопровождать работу мембранных насосов V-класса для того, чтобы значительно повысить кислотность люмена данной органеллы?
15. Из каких доменов состоят АВС-транспортёры?
16. Какие ферменты называются индуцируемыми?
17. Какие ферменты называются конститутивными?
18. Какой АВС-транспортёр обеспечивает явление мультилекарственной резистентности раковых клеток?
19. В каких органах млекопитающих происходит преимущественная экспрессия АВС-транспортёров?
20. Охарактеризуйте этапы переноса субстратов АВС-транспортёрами, работающими по флоппазному механизму.
21. В чём сходство и различие функционирования флиппаз и флоппаз?

7. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ БЕЛКОВ

7.1. Три основных механизма белкового транспорта

Мембранные структуры клетки активно участвуют во внутриклеточном транспорте белков. После синтеза белков на рибосомах в цитозоле эукариотических клеток эти белки должны быть доставлены для их работы в необходимые органеллы (или за пределы клетки).

Существует *три основных механизма*, с помощью которых клетка решает эту задачу (рисунок 73).

1. Белок после синтеза и фолдинга в неизменном виде доставляется в нужную органеллу через специализированные поры в мембранах. Такой вид доставки называется *управляемый транспорт (gated transport)*.
2. *Трансмембранная транслокация (transmembrane translocation)* белков в ходе которой полипептид сначала денатурируется, затем полипептидная цепочка протягивается через одну или несколько мембран, а затем снова происходит фолдинг функционального белка.
3. *Везикулярное движение (vesicular trafficking)* белков, в ходе которого от мембраны отпочковывается везикула, в состав которой входят транспортируемые белки.

С помощью *управляемого транспорта*, например, в ядро клетки через ядерные поры доставляются все белки. *Трансмембранная транслокация* обеспечивает доставку синтезированных в цитозоле белков в пероксисомы, митохондрии и хлоропласты. *Везикулярное движение* обеспечивает доставку белков в лизосомы и секрецию белков из клетки.

Адресация белков обеспечивается наличием в их структуре специальных *сортировочных сигналов (sorting signals)*. Сразу после окончания синтеза белка рибосомой в цитозоле, когда он является просто полипептидом, сортировочными сигналами являются последовательности аминокислот на концах белковой цепи, которые называют *нацеливающими последовательностями (targeting sequences или localization sequences)*.

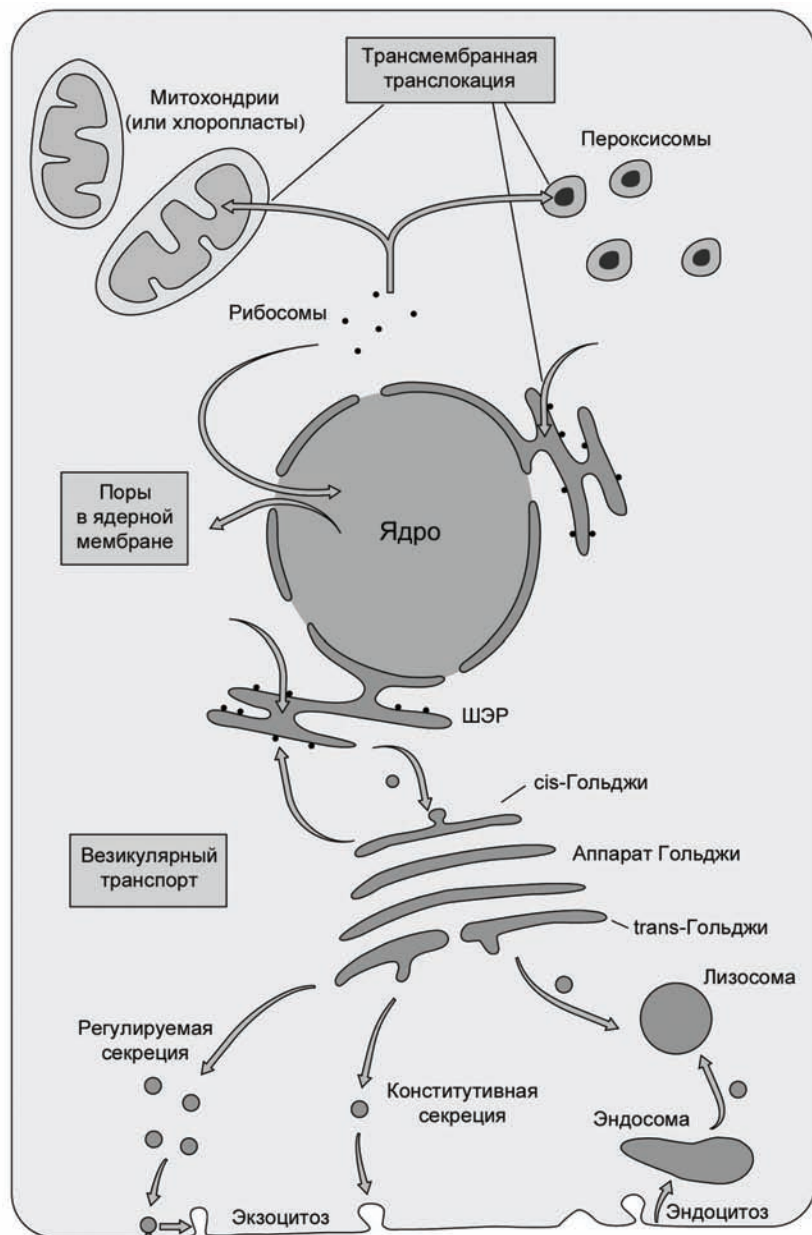


Рисунок 73– Механизмы внутриклеточного транспорта белков

Для белков, которые синтезируются на мембранах шероховатого эндоплазматического ретикулума, *дополнительные* сортировочные сигналы (*sorting signals*) (такие, как сахара или фосфатные группы) могут быть добавлены с помощью специализированных ферментов в цистернах аппарата Гольджи в ходе посттрансляционной модификации белков.

Такие сигналы обычно представляют собой *специфические лиганды*, которые распознаются рецепторными белками, а эти рецепторные белки с присоединенными к ним транспортируемыми белками, в свою очередь, присоединяются к мембранным транслокационным комплексам соответствующего компартмента.

Нацеливающие последовательности белка, которые представляют собой цепочку из 3–80 аминокислот, тоже распознаются специализированными рецепторами, которые доставляют данный белок к соответствующим транслокационным комплексам. После доставки в нужный компартмент нацеливающие последовательности обычно *отрезаются* от белковой цепи специализированными ферментами.

Одними из наиболее изученных нацеливающих последовательностей являются *сигнальные пептиды* (или *сигнальные последовательности*, *signal sequences*) – цепочки из 5–15 преимущественно гидрофобных аминокислот. Наличие такой сигнальной последовательности в синтезируемом белке вынуждает рибосому присоединиться к эндоплазматическому ретикулуму, и синтезируемая белковая цепь направляется не в цитозоль, а в люмен ретикулума.

Другой пример нацеливающей последовательности – *сигнал импортирования* (*import signal*) для белков, которые должны быть перемещены из цитозоля в *матрикс митохондрии*. Этот сигнал представляет собой цепочку из 20–80 аминокислот, формирующих *амфипатическую* полярную α -спираль, у которой положительно заряженные аминокислоты выстроены с одной стороны спирали, а гидрофобные аминокислоты – с другой.

Для нацеливания белков в *ядро* клетки определена последовательность из *пяти* положительно заряженных аминокислот.

Для переноса белков в *пероксисому* служит пероксимальная нацеливающая последовательность Ser-Lys-Lys-COOH – С-конечный трипептид.

Существуют также сортировочные сигналы, которые не способствуют перемещению белка, а наоборот, служат сигналом о том, что белок уже доставлен к месту назначения и никуда далее его не следует перемещать. Например, белки с так называемой KDEL-последовательностью Lys-Asp-Glu-Leu-COOH на С-конце остаются в эндоплазматическом ретикулуме и не должны удаляться из него везикулярным транспортом.

Иллюстрацией вышесказанного может быть кальций-связывающий белок гладкого эндоплазматического ретикулума *калретикулин* (*calcium-binding protein of the endoplasmatic reticulum – calreticulin*), чья первичная структура изображена на рисунке 74.

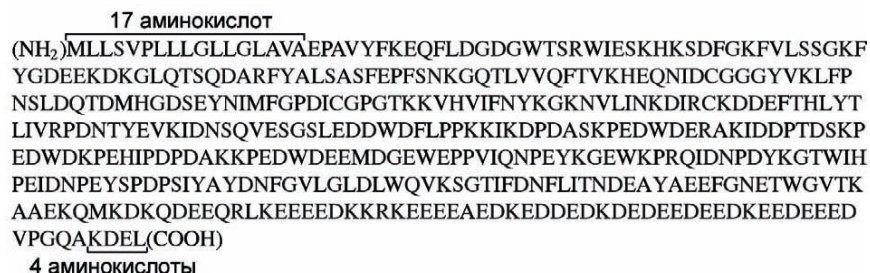


Рисунок 74– Аминокислотная последовательность калретикулина

Первые 17 аминокислот на N-конце калретикулина являются сигнальной последовательностью, которая инициирует *транслокацию* белка в люмен эндоплазматического ретикулума, а последние 4 аминокислоты – последовательность KDEL – *не позволяет* белку уйти из ретикулума. Между этими сортировочными сигналами располагается первичная структура функционального белка.

7.2. Перенос белков в ядро и из ядра клетки

Ядро – наиболее крупная (диаметром около 10 мкм) видимая в оптический микроскоп органелла эукариотической клетки. Оно отделено от остальной клетки *оболочкой*, состоящей из *внутренней* и *внешней* ядерных мембран (рисунок 75). Область между двумя ядерными мембранами называется *перинуклеарным пространством*. Внешняя ядерная мембрана

усыпана рибосомами и переходит в *шероховатый эндоплазматический ретикулум*.

Внутренняя ядерная мембрана выстлана специальными белками, которые служат для закрепления ядерных структур (ядерная ламина). В ядре расположена почти вся ДНК клетки, и здесь происходит её репликация и экспрессия.

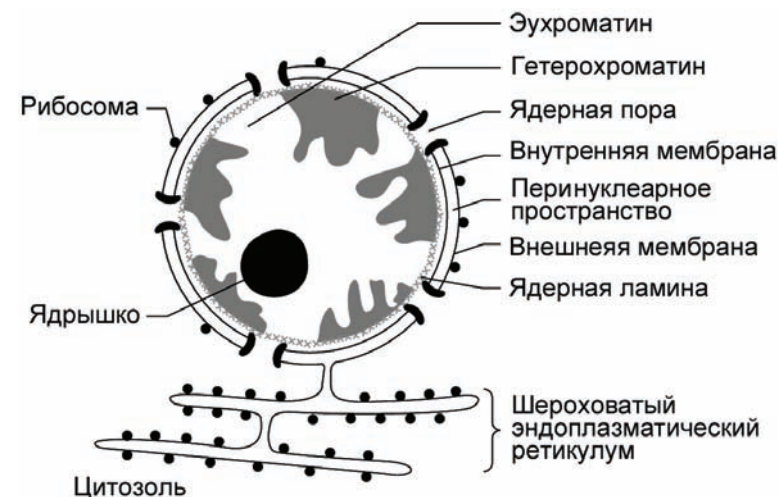


Рисунок 75 – Ядро эукариотической клетки

Эти процессы обслуживаются множеством белковых факторов, которые, как и все белки, синтезируются в цитозоле клетки, а затем доставляются в ядро. А матричная РНК – продукт транскрипции ДНК – после процессинга выходит из ядра в цитозоль, равно как и рибосомальные субъединицы после синтеза в ядрышке доставляются из ядра в цитозоль клетки.

Этот интенсивный обмен веществ между цитозолем и нуклеоплазмой осуществляется и управляется *ядерными порами* – сложными мультибелковыми комплексами, в которые входит более чем 50 белков, которые называют нуклеопоринами, и которые формируют круг из восьми идентичных субъединиц (рисунок 76).

На схеме бокового разреза (рисунок 75(б)) видно, что белки в ядерной поре располагаются в виде стопки из трёх колец белков и крепятся в ядерной мембране с помощью трансмембранных белков. От внутреннего кольца к центру канала поры отходят радиальные "спицы". В центре поры располагается центральный белок-транспортёр, который называется *клапан* (*plug*) или *пробка*, и который выполняет функцию ворот (*gate*), закрывающих проход через пору.

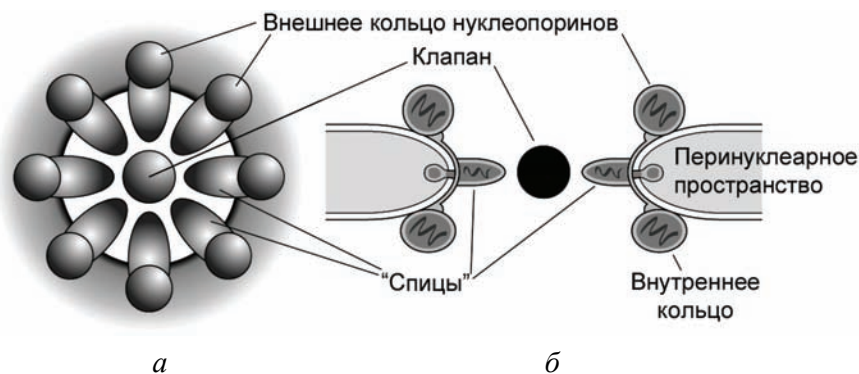


Рисунок 76 – Схема строения ядерной поры: а – фронтальный вид, б – боковой разрез

Определяющую роль в осуществлении управляемого транспорта через ядерную пору играет ГТФаза Rap. Белок Rap, как и все ГТФазные переключающие белки, *существует в двух формах* (рисунок 77):

- (1) *активная* ("вкл") форма с присоединенной молекулой ГТФ,
- (2) *неактивная* ("выкл") форма со связанной молекулой ГДФ.

ГТФазная активность таких белков-переключателей приводит к медленному гидролизу ГТФ в ГДФ, "выключая" белок. Последующая замена ГДФ на ГТФ, восстанавливающая активную форму, происходит еще более медленно. Процессы переключения ГТФазы между двумя конформациями управляются вспомогательными белками: белком Rap-GAP (*GTPase-accelerating protein*), ускоряющим гидролиз ГТФ, и белком Rap-

GEF (*guanine nucleotide-exchange factors*), стимулирующим замену ГДФ на ГТФ.

В случае транспорта через ядерную пору белки Rap-GEF сконцентрированы в ядре, а белки Rap-GAP – в цитозоле, поэтому в нуклеоплазме ГТФаза Rap находится преимущественно в активном (Rap:ГТФ)-состоянии, а в цитозоле – в неактивном (Rap:ГДФ)-состоянии.

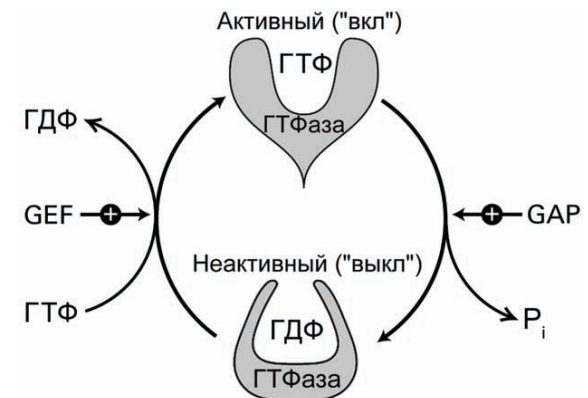


Рисунок 77 – Циклирование белка ГТФаза Rap между активным и неактивным состояниями

Схема *импорта* белков в ядро, регулируемая белками Rap представлена на рисунке 78. Белок-транспортёр распознает и присоединяет к себе нацеливающую последовательность (ядерную импортную последовательность) белка-груза.

Такой комплекс двух белков диффундирует через ядерную пору в нуклеоплазму, где много активных ГТФаз Rap. Активная ГТФаза замещает белок-груз, и сама связывается с белком-транспортёром. Груз оказывается в ядре.

Комплекс белка-транспортёра с активной ГТФазой диффундирует через ядерную пору наружу в цитоплазму, где находятся белки Rap-GAP. Белок Rap-GAP "выключает" ГТФазу, и она отсоединяется от транспортного белка, который теперь готов снова "загружаться" и транспортировать белки в ядро.

Неактивная ГТФаза диффундирует в ядро, где её активизирует (заменяет ГДФ на ГТФ) белок Ran-GEF.

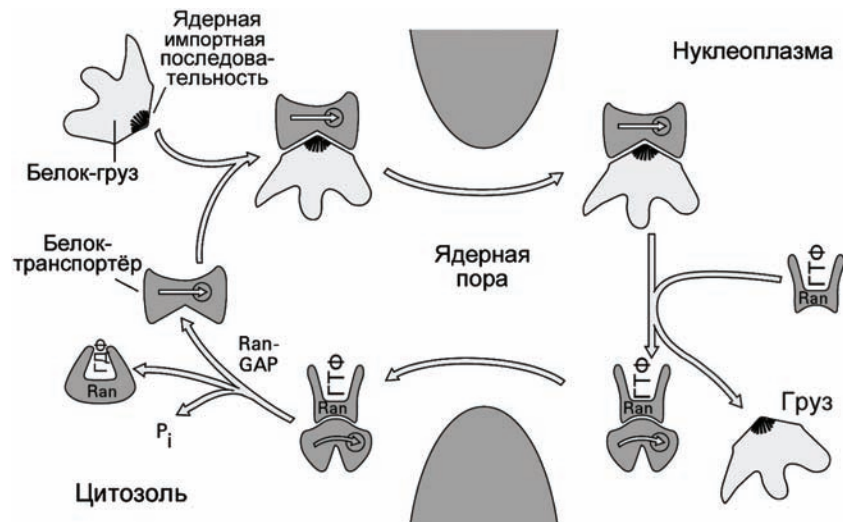


Рисунок 78 – Импорт белков в ядро

Аналогично проходит процесс *экспорта* белков (рисунок 79), с тем только отличием, что белок-транспортёр сможет распознать нацеливающую последовательность в белке-грузе только, если сам белок-транспортёр предварительно образует двойной комплекс с АТФазой. Через пору наружу может выйти только тройной комплекс (АТФаза:Транспортёр:Груз). В цитозоле вспомогательный белок Ran-GAP стимулирует гидролиз ГТФ, АТФаза "выключается", тройной комплекс распадается, и белок-груз оказывается в цитозоле.

Затем белок-транспортёр и неактивный (Ran:ГДФ) диффундируют в нуклеоплазму, белок Ran-GEF активизирует АТФазу, и процесс может начаться снова.

Хотя белок Ran управляет как импортом, так и экспортом белков в ядро, в каждом случае только активная форма (Ran:ГТФ) связывается с транспортёром. Форма (Ran:ГДФ) является неактивной и не может связаться с белком-транспортёром.

Некоторые белки могут перемещаться между цитозолем и нуклеоплазмой, экспонируя и маскируя свою нацеливающую последовательность.

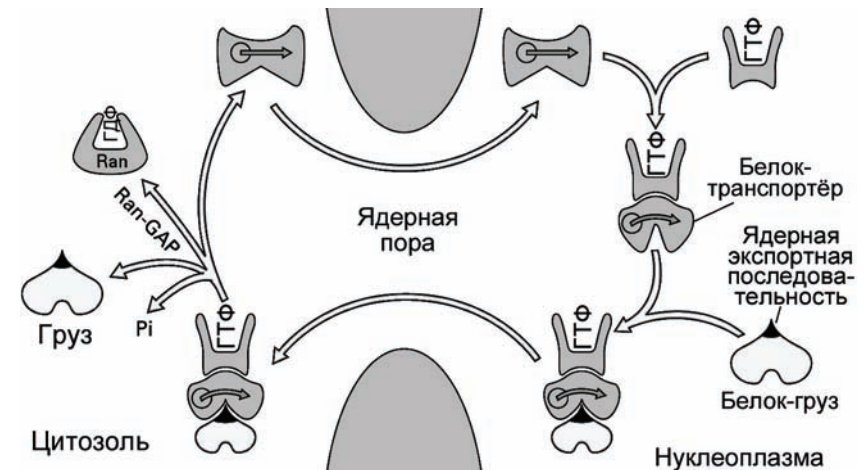


Рисунок 79 – Экспорт белков из ядра

7.3. Трансмембранная транслокация

Транспорт белков в митохондрию. Митохондрия содержит собственную ДНК и синтезирует некоторые из необходимых для её функционирования белков, однако большинство митохондриальных белков кодируются ядерным геномом клетки. Такие белки синтезируются на рибосомах в цитозоле, а затем транспортируются в митохондрию. Как было отмечено выше, те белки, которые предназначены для матрикса митохондрии содержат на своём N-конце специфическую *нацеливающую* последовательность. Митохондриальные рецепторные белки распознают такую последовательность и соединяются с транслокационным комплексом, который разворачивает глобулу белка и пропускает полипептидную нить через обе мембраны митохондрии. После транслокации нацеливающая последовательность удаляется, и происходит фолдинг в нативную функциональную глобулу.

В процессах разворачивания белковой глобулы перед транслокацией и вторичном фолдинге активно участвуют вспомогательные белки *шапероны*, которые предохраняют белковую нить от неспецифической агрегации.

Транспорт в пероксисомы. В большинство органелл, которые ограничены единственной мембраной, белки доставляются с помощью везикулярного транспорта (рисунок 73). Пероксисомы являются исключением из этого правила.

Белки пероксисом синтезируются в цитозоле, а затем транспортируются в пероксисомы. Пероксисомальные нацеливающие последовательности аминокислот в структуре этих белков связываются с белками-рецепторами импорта в пероксисомы ещё в цитозоле, и затем эти комплексы транспортируемых белков с рецепторами присоединяются к мембране пероксисомы, пересекают мембрану, в люмене пероксисомы транспортируемый белок высвобождается, а рецепторы переносятся обратно в цитозоль.

Синтез белка в шероховатом эндоплазматическом ретикуле. Наличие рибосом на мембранах шероховатого эндоплазматического ретикула однозначно показывает, что это *место синтеза белков*. Однако в большинстве случаев на рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикула синтезируются белки, не участвующие ни в каких процессах внутри данной клетки, "ненужные" ей, а иногда даже вредные для клетки.

Например, на рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикула клеток молочной железы в большом количестве синтезируется казеин молока, который совсем не нужен клеткам молочной железы, а на рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикула клеток пищеварительных желез синтезируются гидролитические ферменты, попадание которых в цитозоль неминуемо должно привести к самоперевариванию клетки и ее гибели.

Однако этого не происходит, потому что синтезируемые белки переносятся через мембрану шероховатого эндоплазматического ретикула

ма в его полость и тем самым сразу же *изолируются* от цитозоля и цитоплазматических структур.

Таким образом, роль шероховатого эндоплазматического ретикула заключается не просто в синтезе белков на рибосомах его мембран, но и в *изоляции* этих белков от остальных функционирующих белков клетки.

Обобщенная схема биосинтеза белка представлена на рисунке 80.

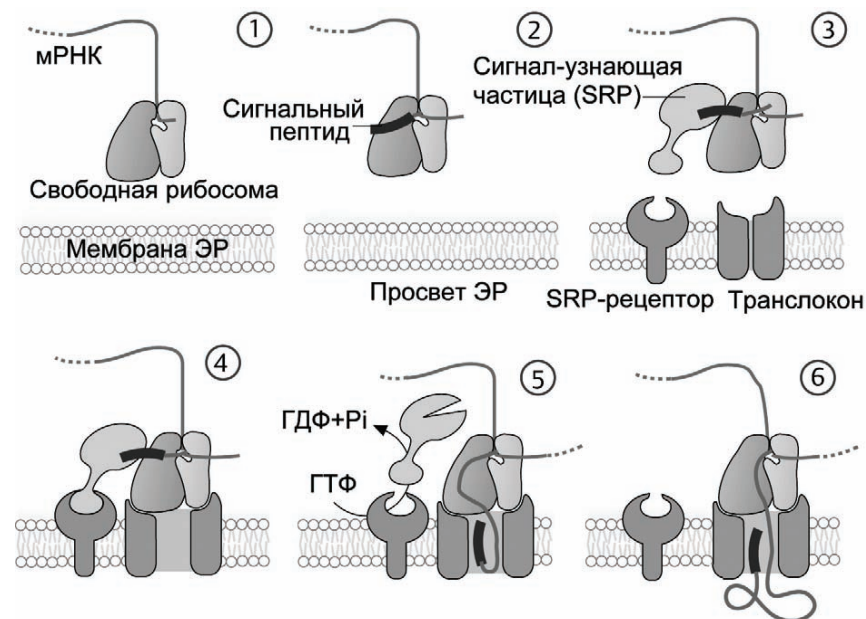


Рисунок 80 – Синтез белка в шероховатом эндоплазматическом ретикуле

Биосинтез белка (трансляция мРНК) всегда *начинается в цитоплазме* (рисунок 80 (1)). Определенная последовательность из 15-60 аминокислот в начале цепи, обозначаемая как *сигнальный пептид*, указывает место синтеза. Если образующийся на рибосоме белок начинается с сигнального пептида (рисунок 80 (2)), ориентирующего белок на шероховатый эндоплазматический ретикулум, с ним связывается РНК-содержащая *сигнал-узнающая частица*, SRP (*signal-recognition particle*), и трансляция временно прерывается (рисунок 80 (3)).

SRP связывает рибосому посредством *SRP-рецептора* с мембраной шероховатого эндоплазматического ретикулума (рисунок 80 (4)). Как только рибосома закрепится на мембране, SRP-частица диссоциирует от сигнального пептида и от SRP-рецептора (при этом гидролизуетсЯ ГТФ), и на рибосоме вновь начинается процесс трансляции (рисунок 80 (5)).

Белковая цепь на рибосоме растёт и, ещё не свернувшись, проходит через мембрану по каналу, называемому *транслоконом*, в просвет шероховатого эндоплазматического ретикулума (рисунок 80 (6)).

После окончания трансляции *сигнальный пептид* секреторного белка отрезается специальным ферментом *лидер-пептидазой*, и белок уже не может покинуть полость шероховатого эндоплазматического ретикулума. Таким способом осуществляется *направленное выведение (vectorial discharge)* белков.

Прохождение растущего полипептида через мембрану может быть прервано соответствующим *стоп-сигналом*. В этом случае полипептид остаётся погружённым в мембрану и даёт начало *интегральному мембранному белку*. В ходе белкового синтеза возможно многократное прохождение растущей цепи через мембрану и возобновление синтеза вновь при посредстве сигнального пептида. Образующийся по такому механизму мембранный белок будет иметь *множество* трансмембранных участков.

Большинство белков, синтезированных на мембранах шероховатого эндоплазматического ретикулума, *представляют собой гликопротеины*, тогда как растворимые белки цитозоля не гликозилированы. *Гликозилирование* – это ещё одна из основных биосинтетических функций эндоплазматического ретикулума. Это гликозилирование оказывает влияние на дальнейшую судьбу белков.

7.4. Вакуолярный транспорт

Гликопротеины, переносимые из шероховатого эндоплазматического ретикулума в другие места, "упаковываются" в мелкие *транспортные пузырьки* (везикулы), которые отщепляются от промежуточной части эндоплазматического ретикулума. Стенка этих пузырьков состоит из липи-

дов и белков мембраны эндоплазматического ретикулума, а сами пузырьки содержат растворимые гликопротеины, захваченные из полости эндоплазматического ретикулума. Большинство из этих пузырьков сливается, образуя плоские цистерны на ближней к ядру стороне аппарата Гольджи, с так называемой *формирующейся*, или *цис-стороной (формирующий полюс)*.

В цистернах аппарата Гольджи происходит дальнейшее "созревание" синтезированных в шероховатом эндоплазматическом ретикуле и перешедших в аппарат Гольджи белков.

"Созревание" белков включает различные ковалентные модификации, в результате которых белки *приобретают свою функционально-активную структуру*. Кроме того, очень сильно модифицируются связанные с остатком аспарагина олигосахариды, присоединившиеся ранее к белкам в эндоплазматическом ретикуле – некоторые остатки сахаров избирательно отщепляются, а некоторые новые добавляются.

Процессинг олигосахаридов осуществляется с помощью нескольких различных чрезвычайно сложных и точно "запрограммированных" ферментных механизмов. Выбор "программы" модификации определяется каким-то (пока неизвестным) свойством каждой индивидуальной полипептидной цепи.

Ферменты, осуществляющие модификацию белков, как и сами модифицирующиеся белки, тоже, вероятно, попадают в аппарат Гольджи из эндоплазматического ретикулума. В настоящее время считается, что после процессинга присоединённый к белку олигосахарид становится "*адресом*", по которому должен быть доставлен данный белок.

"Созревшие" белки снова "упаковываются" в транспортные пузырьки, но уже на *зрелой*, или *транс-стороне (секретирующий полюс)*.

Обобщённая схема везикулярного транспорта представлена на рисунке 81.

Белки, синтезированные в шероховатом ЭР (рисунок 81(1)) упаковываются в транспортные везикулы (рисунок 81(2)), которые отсоединяются от ШЭР и *сливаются вместе, образуя новую цистерну цис-Гольджи сети (cis-Golgi network, CGN)*.

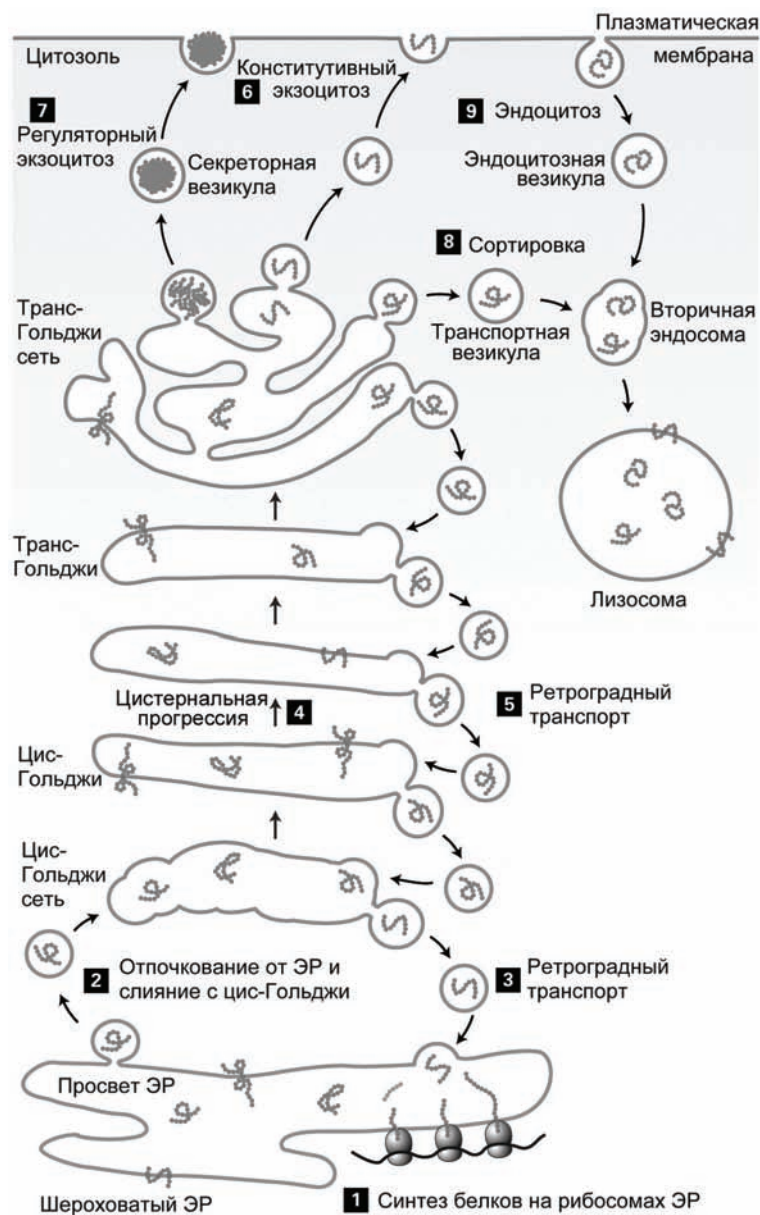


Рисунок 81 – Обобщенная схема везикулярного транспорта

Ферменты и белки эндоплазматического ретикулума, которые попали в такой пузырек, а также мембранные белки, которые обеспечивают формирование везикул, *возвращаются* в шероховатый эндоплазматический ретикулум для "повторного" использования (рисунок 81(3)) в пузырьках, которые отъединяются от цис-стороны аппарата Гольджи и сливаются с мембраной шероховатого эндоплазматического ретикулума.

Каждая цистерна Гольджи из цис-области физически *перемещается* через промежуточную область в транс-область аппарата Гольджи посредством неvesикулярного процесса, который называется *цистернальная прогрессия* (cisternal progression) (рисунок 81(4)).

"Возврат" специфических для каждой области аппарата Гольджи белков осуществляется везикулярным механизмом (рисунок 81(5)). Во всех клетках определенные белки постоянно перемещаются к поверхности в везикулах, отъединившихся от транс-стороны аппарата Гольджи, обеспечивая постоянную секрецию (рисунок 81(6)) белков за пределы клетки (*конститутивный* экзоцитоз). В некоторых типах клеток определенные белки "запасаются" в секреторных везикулах (рисунок 81(7)) и секретируются только после получения клеткой внешнего нейро- или гормонального сигнала (*регуляторный* экзоцитоз)

Белки и липиды, которые предназначены для лизосом (рисунок 81(8)), отсоединяются от транс-стороны аппарата Гольджи и присоединяются к *вторичным эндосомам*, которые затем сливаются с лизосомой. Белки из внеклеточного пространства и мембранные белки плазматической мембраны клетки, которые в процессе эндоцитоза (рисунок 81(9)) формируют эндоцитозные везикулы (отъединяющиеся от плазматической мембраны внутри клетки), также перемещаются внутрь лизосом через эндосомы.

Большинство транспортных пузырьков-везикул представляют особый класс внутриклеточных пузырьков, которые на микрофотографиях выглядят окруженными со стороны цитоплазмы *щетинобразной каймой*, и потому называются *окаймленными пузырьками*. Диаметр окаймленных пузырьков варьирует от 50 до 250 нм.

Окаймление образуют *три типа белков*:

- 1) СОРІІ-белок покрывает везикулы, транспортирующие белки из шероховатого эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи,
- 2) СОРІ-белок покрывает везикулы, осуществляющие "возвратный" транспорт белков между цистернами Гольджи и в шероховатый эндоплазматический ретикулум,
- 3) *клатрин* окаймляет везикулы, которые транспортируют белки от плазматической мембраны и от транс-Гольджи сети к вторичным эндосомам (рисунок 82).

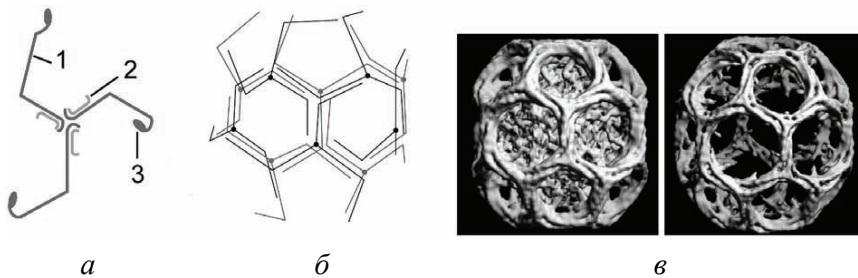


Рисунок 82 – Структура клатринового покрытия: *а* – трискелион, *б* – упаковка трискелионов в клатриновую оболочку, *в* – клатриновые корзинки, образованные спонтанной агрегацией трискелионов *in vitro*. 1 – клатрин; 2 – малый полипептид; 3 – узел связывания клатринов при агрегации

Клатрин (180 кДа) вместе с меньшим полипептидом (35 кДа) образует характерный многогранный чехол на поверхности окаймленных пузырьков.

Основным структурным элементом чехла служит белковый комплекс *трискелион*, состоящий из трех полипептидных цепей клатрина и трех малых (35 кДа) полипептидов. Трискелионы образуют на поверхности окаймленных пузырьков *корзиноподобные сетки* из шестиугольников и пятиугольников. Обособленные трискелионы при соответствующих условиях способны к спонтанной агрегации. При этом даже в отсутствие

пузырьков формируются типичные многогранные корзинки (рисунок 82(в)).

В мембраны везикул интегрированы множество *вспомогательных белков*. Эти белки, *во-первых*, в процессе формирования пузырька "вылавливают" из цистерн аппарата Гольджи белки с одинаковыми олигосахаридными "адресами", и, *во-вторых*, узнают компоненты мембраны, с которой должен слиться данный пузырек (рисунок 83).

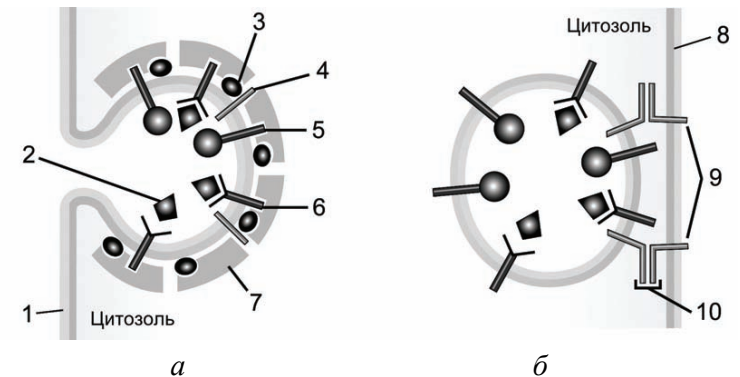


Рисунок 83 – Схема везикулярных процессов: *а* – формирование окаймленного пузырька из донорной мембраны, *б* – слияние везикулы с мембраной-целью. 1 – донорная мембрана; 2 – водорастворимый транспортируемый белок; 3 – ГТФ-связывающий белок; 4 – v-SNARE-белок; 5 – интегрированный в мембрану транспортируемый белок; 6 – мембранный рецептор водорастворимых транспортируемых белков; 7 – окаймляющие белки; 8 – мембрана-цель; 9 – t-SNARE-белки; 10 – t-SNARE-комплекс

Известно, что содержимое каждого транспортного пузырька доставляется точно по правильному "адресу" к определенной внутриклеточной мембране, поэтому должны существовать различные субпопуляции транспортных пузырьков, имеющих на своей поверхности уникальные вспомогательные белки, так называемые *маркеры стыковки* (v-SNARE белки) (рисунки 83 и 84), которые опознаются *комплементарными акцепторами* (t-SNARE белки) на мембранах мишеней и формируют SNARE-комплекс.

Рисунок 84 – Везикулярный транспорт белков между эндоплазматическим ретикулумом и цис-Гольджи-областью



Диссоциация COPII-белков с поверхности везикулы освобождает v-SNARE-белки. Спаривание v-SNARE с t-SNARE-белками на поверхности цис-Гольджи сети образует SNARE-комплексы, в результате чего становится возможным слияние мембран.

Транспортные пузырьки, сливающиеся с плазматической мембраной и высвобождающие свое содержимое в межклеточное пространство, называются *секреторными*, или *экзоцитозными* пузырьками. Наряду с окаймленными пузырьками в клетке образуются и *окаймленные ямки*, т.е. эндоцитозные пузырьки, отпочковывающиеся внутрь клетки от окаймленных участков плазматической мембраны.

Эти пузырьки быстро *теряют свою кайму* и сливаются с другими пузырьками, образуя более крупные пузырьки, называемые *эндосомами*. Содержимое эндосом может использоваться клеткой. Хорошо изученный пример использования адсорбционного эндоцитоза – это поглощение животными клетками холестерина из внеклеточной среды.

161

первичными лизосомами. Гликопротеины, которыми загружены эти пузырьки, имеют олигосахарид с фосфорилированным остатком маннозы (рисунок 85). Этот маннозо-6-фосфатный маркер и определяет судьбу таких пузырьков. После отщепления маннозо-6-фосфатного маркера гликопротеины первичных лизосом становятся активными гидролитическими ферментами (т.е. расщепляющими ферментами, осуществляющими перенос функциональных групп на молекулу воды).

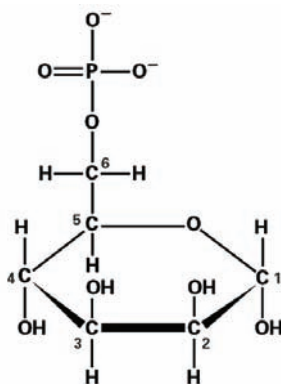


Рисунок 85 – Манноза-6-фосфат

Лизосомы расщепляют до мономерных компонентов макромолекулы, захваченные клеткой в процессе эндоцитоза, или отдельные участки цитоплазмы и органоиды, утратившие свое значение в результате старения или использующиеся как материал для поддержания жизнедеятельности клетки в неблагоприятных экстремальных условиях.

В первом случае первичная лизосома сливается с эндоцитозным пузырьком. Во втором случае подлежащий "перевариванию" участок цитоплазмы или органоид сначала окружается мембраной, а затем получившийся пузырек сливается с первичной лизосомой.

Первичная лизосома, сливаясь с пузырьком, содержащим субстрат для расщепления, называется уже вторичной лизосомой. Мономерные продукты расщепления транспортируются из лизосомы в цитоплазму и могут использоваться клеткой.

Сейчас известно около 60 гидролитических ферментов, содержащихся в лизосомах, которые способны разрушать практически все природные полимерные органические соединения. Все они обладают наибольшей активностью при $pH \approx 5$. Именно такое значение pH поддерживается внутри лизосомы встроенными в их мембрану протонными АТФазами (протонными помпами), использующими энергию АТФ для накачивания ионов H^+ в полость этих органелл. Хотя в нормальных условиях мембрана лизосомы непроницаема для гидролитических ферментов, необходимость кислой среды для их активной работы защищает цитоплазму клетки от разрушения при возможной "утечке" ферментов.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Охарактеризуйте три основных механизма внутриклеточного транспорта белков.
2. Что собой представляют сортировочные сигналы?
3. Какие последовательности называются нацеливающими?
4. Что такое сигнальный пептид, и какой клеточный мембранный процесс инициирует сигнальный пептид?
5. Какой клеточный процесс блокируется, если на С-конце белка присутствует KDEL-последовательность?
6. Какие компоненты входят в состав ядерной поры?
7. В каких состояниях может находиться ГТФаза?
8. Какие вспомогательные белки управляют активностью ГТФаз?
9. Охарактеризуйте этапы импорта белков в ядро через ядерную пору, управляемого ГТФазами Rap.
10. Охарактеризуйте этапы экспорта белков из ядра через ядерную пору, управляемого ГТФазами Rap.
11. Охарактеризуйте особенности транспорта белков в митохондрию.
12. Охарактеризуйте этапы экспорта белков в пероксисомы.
13. Охарактеризуйте этапы синтеза белков в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме.

14. Какую функцию в везикулярном транспорте выполняют окаймляющие белки?
15. Перечислите три типа окаймляющих белков.
16. Для чего нужны SNARE-белковые комплексы?
17. В какие органеллы направляются гликопротеины с маннозо-6-фосфотным маркером?

8. АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОМЕМБРАН

8.1. Электронная микроскопия

Одним из наиболее важных методов с высокой разрешающей способностью является электронная микроскопия. Именно благодаря микроскопу исследователи увидели мембрану. Высокое разрешение в электронном микроскопе достигается благодаря использованию в качестве источника "освещения" потока электронов. Электронам свойственны волновые процессы, определяемые отношением Де Бройля $\lambda = \frac{h}{mv}$, где m – масса электрона, v – скорость электрона, h – постоянная Планка. Исходя из этой формулы при тех скоростях электронов, которые обычно применяются в электронных микроскопах, длина волны оказывается примерно на пять порядков меньше длины волны света.

Теоретически, электронная микроскопия должна бы "видеть" и субатомную структуру, однако *практические ограничения* – неидеальность магнитной оптики и те искажения, которые возникают при приготовлении образцов, обеспечении контрастности снимков и вследствие радиационных повреждений – ограничивают разрешение визуализации биомолекул методом электронной микроскопии размерами *порядка 1 нм*. Этого достаточно, чтобы определить общую морфологию биомолекул и биомолекулярных комплексов, но недостаточно, чтобы зафиксировать индивидуальные атомы. В настоящее время разрешающая способность электронных микроскопов для серийных приборов достигает 0,5–1,0 нм, для уникальных моделей микроскопов – менее 0,5 нм, а полезное увеличение, получаемое на лучших моделях микроскопов, приближается к мил-

лиону. Это позволяет перейти к изучению структуры мембран на молекулярном уровне.

Для определения структуры природных биомолекулярных структур используются данные как *просвечивающей* (или *трансмиссионной*) электронной микроскопии (*transmission electron microscopy*, TEM), так и *сканирующей* электронной микроскопии (*scanning electron microscopy*, SEM).

Просвечивающая электронная микроскопия. Принцип просвечивающей электронной микроскопии аналогичен обычной оптической микроскопии – пучок электронов облучает тонкий образец, и микроскоп определяет *относительную проницаемость* различных участков образца. На рисунке 86 представлена схема трансмиссионного электронного микроскопа.

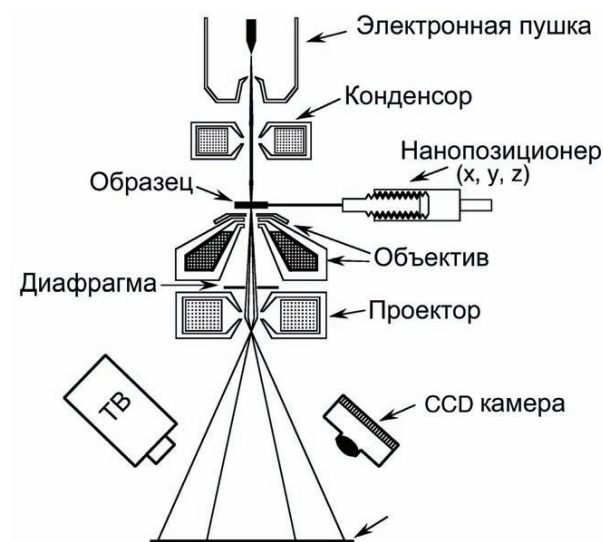


Рисунок 86 – Схема просвечивающего электронного микроскопа

Электроны, вылетающие из электронной пушки, проходят через конденсорные линзы, которые фокусируют электроны на объекте. Пучок электронов проходит через образец. Линзы объектива и линзы проектора увеличивают прошедший луч и проецируют его на люминесцентный эк-

ран. Попадание высокоэнергетичных электронов возбуждает молекулы люминофора в экране, в результате чего создается видимое увеличенное изображение образца. Изображение регистрируется различными детекторами, такими, например, как камера прибора с зарядовой связью (*charge coupled device, CCD*).

Практически все электроны, идущие сквозь объект, имеют одинаковую скорость, зависящую от общего ускоряющего напряжения и, следовательно, одинаковую длину волны. Поэтому различные участки объекта отличаются исключительно по степени рассеивания электронов. В формировании конечного увеличенного изображения участвуют электроны, прошедшие сквозь объект. Электроны, отклонившиеся при встрече с молекулами объекта на достаточно большой угол или потерявшие скорость, в формировании изображения не участвуют. Соответствующие участки изображения на экране детектора остаются темными.

Таким образом, различия в электронной плотности отдельных участков объекта, или разница в контрасте этих участков, зависят от *плотности* вещества и *толщины* объекта. Наиболее сильное влияние оказывают вещества, имеющие большую атомную массу, а разность контрастов при этом будет зависеть от различия атомных масс соседствующих в объекте веществ. Последнее обстоятельство объясняет факт малого контраста у биологических объектов, так как большая часть атомов в клетке обладает низкой атомной массой и рассеивает электроны в одинаковой степени.

Контраст биологических объектов можно повысить, используя тяжелые металлы или их соли. Одним из широко распространенных методов *контрастирования* мембран является оттенение металлами. В специальных вакуумных установках производится термическое испарение металла – платины, палладия, их сплавов, урана – и напыление тонких металлических слоёв на исследуемые объекты. Контуров объекта при этом покрываются слоем металлических частиц. Метод дает очень контрастные изображения, но самые тонкие детали получаются размытыми.

При *негативном* контрастировании объектов растворами солей тяжелых металлов применяют молибдат аммония, уранил-ацетат, фосфорно-вольфрамовую кислоту. Суспензированные мембраны смешивают с водными растворами таких веществ, наносят на сетки-подложки и высу-

шивают. Такая обработка создает вокруг них тонкий слой аморфного вещества высокой электронной плотности. В электронном микроскопе они выглядят как светлые объекты на темном фоне (как фотонегатив). Растворенные соли могут проникать в глубь объекта и выявлять дополнительно его детали. Соли тяжелых металлов ясно обозначают контуры мембранных фрагментов и пузырьков. Эта методика более удобна и требует меньше времени, чем позитивное контрастирование, но не дает представления о тонкой структуре мембранной системы. Изучение субмикроскопии клеток в электронном микроскопе затрудняется также их значительной толщиной, и для исследования необходимо изготавливать ультратонкие срезы очень малой толщины (20–200 нм).

Перед приготовлением срезов необходимо провести *фиксацию* тканей за счёт создания новых межмолекулярных связей для сохранения строения структур клетки. В качестве фиксаторов при электронномикроскопических исследованиях используют растворы *глутарового альдегида* и *четырёхокси осмия* в буферах с физиологическими значениями pH. Чаще всего применяется двойная фиксация. Объекты сначала погружаются в глутаровый альдегид, а затем в четырехокись осмия, который как тяжелый металл еще и контрастирует мембраны клеток.

Альдегиды и оксид осмия (VIII) стимулируют образование поперечных связей между молекулами белков. При этом альдегиды вступают в соединения с различными функциональными группами белков (в частности, с аминоклупами), во многих случаях образуя между ними связи типа мостиков. В отличие от белков, ненасыщенные липидные компоненты, по-видимому, не стабилизируются альдегидами. Фиксация этих компонентов осуществляется при помощи *оксида осмия* (VIII), который взаимодействует с липидами по месту двойных связей, образуя эфиры осмиевой кислоты, которые в дальнейшем легко восстанавливаются (рисунок 87).

Белки оксидом осмия (VIII) связываются менее эффективно, чем альдегидами. После фиксации объекты обезвоживают, пропитывают акриловыми смолами. В настоящее время используют аралдит, вестопал, этон и другие, благодаря которым повреждения, связанные со сморщиванием, полимеризацией или возгонкой под воздействием пучка электронов, выражены в меньшей степени.

При электронно-микроскопических исследованиях применяют водорастворимые пластмассы. При полимеризации пластмасс пропитанный ими объект оказывается заключенным в твердый блок, из которого можно приготовить тонкие срезы. Изготавливаются эти срезы при помощи ультрамикротомов, снабженных стеклянными или алмазными ножами. Полученные срезы монтируются на сетках с пластинкой-подложкой и подвергаются дополнительному контрастированию с помощью солей тяжелых металлов. Как правило, с этой целью используют соли свинца (например, нитрат свинца) и урана (уранил-ацетат). Мембранные структуры клетки обнаруживают высокую и постоянную осmioфилию.

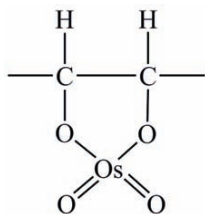


Рисунок 87 – Взаимодействие оксида осмия с липидами

В последние годы нашел распространение метод приготовления ультратонких срезов без фиксации и заливки тканей в пластмассы. Для этой цели используют *криоультрамикротомы*, в которых ткань быстро замораживается до температуры жидкого азота (-196°C).

Для исследования структуры мембран, находящихся непосредственно в клетке, во фракции изолированных плазматических мембран, а также при исследовании липидных или липидно-белковых искусственных мембран широко используется *метод замораживания-травления*, предложенный в 1957 г. М.Л.Стиром. Сущность этого метода заключается в том, что объект сначала быстро замораживают жидким азотом, а затем при этой же температуре переносят в вакуумную установку. Там замороженный объект скалывают охлажденным ножом.

В вакууме происходит возгонка замороженной воды. Этот процесс называется травлением. Затем на поверхность скола напыляют углерод, а затем – металл. Таким образом, получается реплика со скола заморожен-

ного объекта. Сам объект удаляют обработкой кислотами, а в электронном микроскопе изучают оставшуюся реплику.

В отличие от обычных методов разобщения тканей на срезы, которые дают возможность видеть поперечные сечения мембраны, реплики с замороженных образцов обнажают большие площадки мембран.

Оказалось, что плоскости при скалывании мембран расщепляются вдоль срединного неполярного слоя липидов.

Плазмалеммы бактерий и плазматические мембраны дрожжей всегда раскалываются по центру их гидрофобной области, в то время как область расщепления плазматических мембран дрожжевых клеток может, по-видимому, проходить как по центру гидрофобной области, так и по гидрофильным поверхностным областям этих мембран.

Раскалывание мембран по центру гидрофобной области позволяет изучить рельеф внутренней поверхности мембран, что недостижимо при использовании других методов.

Этот метод показал, что как на поверхности, так и в толще клеточных мембран располагаются многочисленные глобулы (до $3000 \text{ на } 1 \text{ мкм}^2$), их распределение зависит от физиологической активности клетки и условий внешней среды. (Они почти полностью отсутствуют в метаболически инертных мембранах, таких как миелин.) Диаметр этих частиц около 10 нм . По всей вероятности, они имеют белковую природу.

Криоскалывание не разрушает кристаллической структуры липидов, что проверено данными рентгеноструктурного анализа. Криоскалывание позволяет также выявлять изменения физического состояния липидов и обнаруживать участки гидрофобных взаимодействий между липидами и другими молекулярными компонентами мембран, в частности, белками.

Применение методов сверхвысоковольтной микроскопии с ускоряющим напряжением $1\text{--}3 \text{ МВ}$ (мегавольт) позволяет получить более высокое разрешение при просмотривании более толстых объектов, что дает возможность получить информацию о трехмерной организации внутриклеточных структур.

8.2. Атомно-силовая микроскопия

Атомно-силовая микроскопия, АСМ (*atomic force microscopy*, АФМ) появилась только в восьмидесятих годах XX века. Она имитирует скорее осязание, чем зрение. Острый шип зонда, закрепленный на конце тонкого монокристаллического рычага (*кантилевера*), сканирует поверхность образца, подобно тому, как игла звукоснимателя проигрывателя воспроизводит структуру дорожки грампластины (рисунок 88).

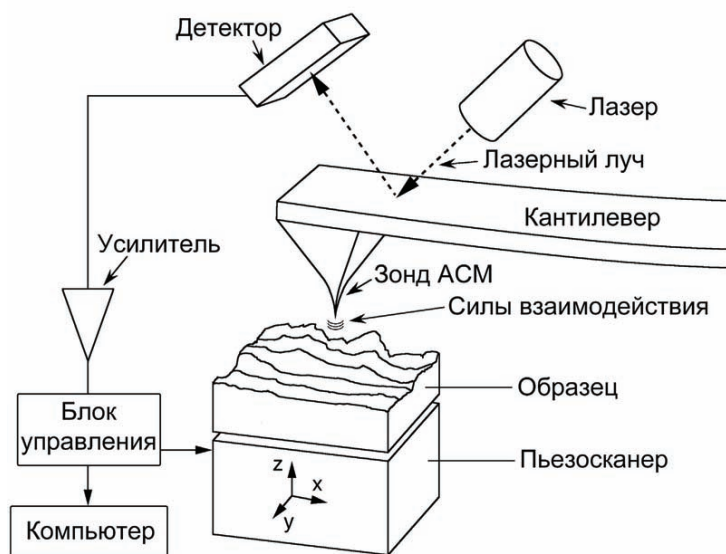


Рисунок 88 – Схема атомно-силового микроскопа (АСМ)

Фактически зонд измеряет слабые силы взаимодействия, возникающие между острием и поверхностью образца. Лазерный луч отражается от зеркальца на конце *кантилевера* и попадает на фотодетектор, который фиксирует вертикальное отклонение кантилевера в каждой точке и восстанавливает, тем самым, топографическую карту поверхности (рисунк 88). Из всех перечисленных методов этот обеспечивает *наиболее непосредственную* связь между нашим макромиром и миром биомолекул.

Когда миниатюрное острое зонда приближается близко к поверхности образца на расстояние нескольких ангстрем, оно испытывает влияние ван-дер-ваальсовых сил притяжения (рисунок 89).

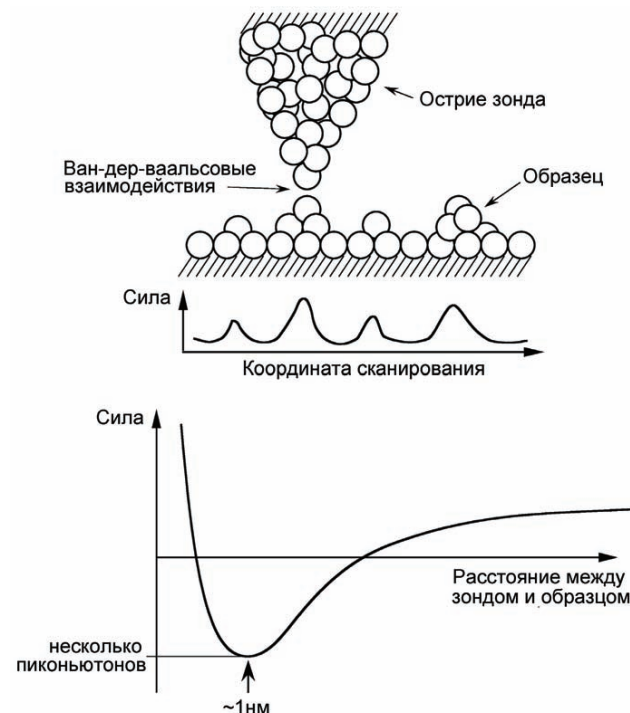


Рисунок 89 – Взаимодействие зонда кантилевера с образцом

На более коротких расстояниях начинают доминировать силы паулевского отталкивания. Когда зонд АСМ заряжен, основную роль играют кулоновские силы, и с помощью атомно-силового микроскопа можно проводить эффективное картирование электростатических потенциалов на поверхности биообъектов.

Очевидно, для эффективности регистрации рельефа поверхности с атомным разрешением, зонд должен иметь прочный и максимально остро заточенный наконечник. Обычно диаметр окончаний коммерческих наконечников составляет 10–20 нм. Если же в качестве зонда использовать уг-

леродную нанотрубку, то диаметр острия можно уменьшить до 1 нм. Силы взаимодействия образца с острием зонда обычно составляют всего лишь несколько пико- или наноньютонов. Поэтому кантилевер должен иметь очень малую массу, а несущие части корпуса микроскопа должны быть жесткими и оборудованы специальными устройствами гашения (демпфирования) вибраций.

Для того чтобы отсканировать поверхность, образец перемещают под шипом *растроподобным* образом, а сам образец поднимают или опускают в вертикальном направлении (в соответствии с формой поверхности), чтобы сила взаимодействия шипа с поверхностью была постоянной. Оба движения – латеральное (в горизонтальной плоскости) сканирование и вертикальное перемещение – осуществляются пьезосканерами, а сила, с которой поверхность воздействует на шип кантилевера, детектируется по отклонению лазерного луча, отраженного от кантилевера.

Применяются два режима сканирования.

- (1) Образец можно сканировать, обеспечивая *постоянный контакт* шипа с поверхностью образца – *контактный режим* (рисунок 90(а)). Это позволяет осуществлять очень детальное сканирование, но при этом деформации сдвига, которые создает сам шип, могут исказить (исцарапать) исследуемую поверхность. Такие нарушения особенно сильны в случае биологических молекул, которые, как правило, слабо связаны с поверхностью – возникает опасность, что в ходе сканирования шип сорвет биообъект и утащит его за собой.
- (2) Для того чтобы избежать таких искажений используют другой вид сканирования, *динамический режим* (рисунок 90(б)) или "режим постукивания" (*tapping mode*). Кантилевер осциллирует так, что конец шипа только касается поверхности в ходе сканирования. Поскольку такие контакты очень короткие, то проблемы связанные со сдвиговыми силами, минимизируются.

Разрешение метода атомно-силовой микроскопии зависит от остроты шипа и составляет обычно 5–10 нм.

Технология АСМ была успешно использована для картирования электростатического потенциала молекулы трансмембранного канала – порина OmpF. Атомно-силовая микроскопия выявила слияние пор в апикальной цитоплазматической мембране живых панкреатических клеток.

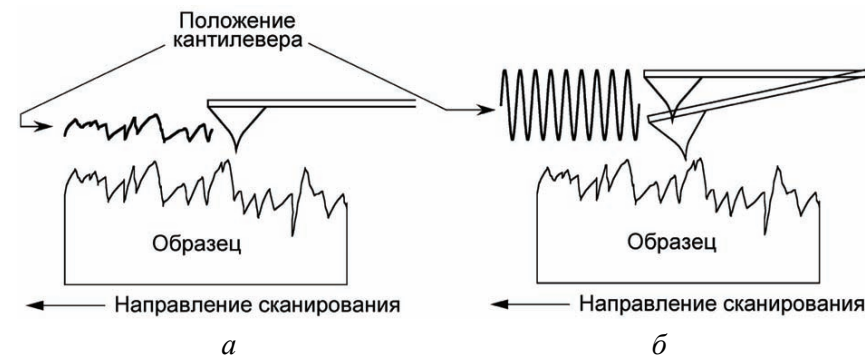


Рисунок 90 – Два режима сканирования: а – контактный, б – динамический

С помощью метода АСМ показано, что сердечные и скелетные мышцы проявляют различную вязкость и эластичность. Атомно-силовая микроскопия позволяет визуализировать структуру биомолекул при физиологических условиях и получать топографические изображения при нанометровом разрешении. Примером может служить изучение сложного нативного комплекса шаперона из *Sulfolobus solfataricus*. Атомно-силовая микроскопия является также превосходной техникой для изучения начальных событий при взаимной адгезии клеток. На атомно-силовых изображениях мономолекулярных пленок белка – бычьего сывороточного альбумина (БСА), адсорбированного на поверхности раздела масло-вода, можно различить отдельные мономеры и димеры (рисунок 91).

Атомно-силовая микроскопия стала действительно мощным методом исследования биообъектов, когда в нем стали использовать *образцы, погруженные в водную среду*. Дело в том, что даже высушенные биообъекты на подложке все равно имеют тонкий слой воды, толщиной в несколько молекул, на поверхности. Капиллярные силы, которые возникают при погружении шипа кантилевера в этот слой воды, соизмеримы с сила-

ми взаимодействия самого шипа с исследуемыми биообъектами, что "маскирует" исследуемые эффекты и резко снижает чувствительность метода. Динамический режим "постукивания" несколько улучшает ситуацию, но при этом требуется создавать *большую амплитуду осцилляций*, чтобы шип каждый раз отрывался от слоя воды, преодолевая капиллярные силы. Решением всех этих проблем стало просто погружение и образца, и кантилевера в водный раствор. Капиллярные силы исчезли, и взаимодействие шипа с образцом отображает только форму молекулы.

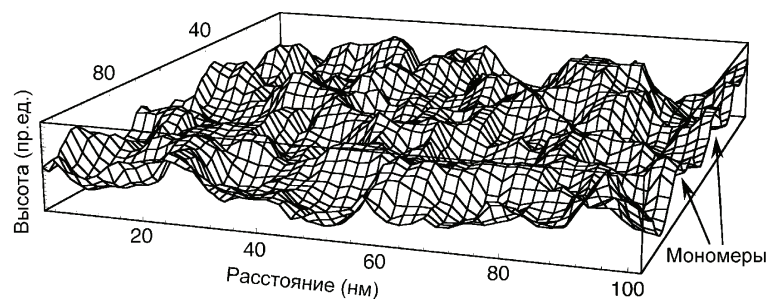


Рисунок 91 – Топографическое изображение мономолекулярной пленки белковых молекул бычьего сывороточного альбумина

Атомно-силовая микроскопия прекрасно проявила себя при визуализации молекулярных биообъектов. Многочисленные системы, начиная от отдельных цепей ДНК до целых хромосом, были исследованы на атомном уровне. Преимуществом этого метода, по сравнению с вышеизложенными методами, является то, что *объекты исследуются в условиях, подобных условиям в живой клетке*, и они имеют конформации, соответствующие их природному функционированию.

Атомно-силовые микроскопы оказались также очень удобными для манипулирования отдельными биомолекулами: механическим касанием молекулу белка можно было адсорбировать на острие зонда, приподнять и перенести на другое место (рисунок 92).

Метод АСМ также был особенно полезен в приложениях, где не требовалось создавать изображение поверхности. В этом случае микроскоп использовался для *измерения сил* притяжения между молекулами

или сил, возникающих при растягивании (разворачивании) глобул биомолекул. При "насилованном" расплетании глобулы атомно-силовой микроскоп обеспечивает чувствительный, в диапазоне пиконьютонов, метод измерения сил вдоль "координаты расплетания" (или траектории разворачивания) или разъединения (*trajectory of stretching or separation*) биомолекул, а это дает информацию, необходимую для понимания процессов белкового фолдинга, конформационной динамики ДНК и специфичности ферментов.

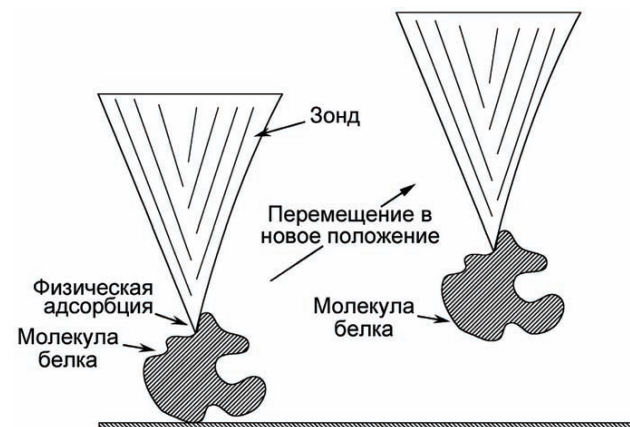


Рисунок 92 – Манипуляции с молекулой белка с помощью атомно-силового микроскопа

8.3. Поляризационная микроскопия

Поляризация света. При действии света на вещество основное значение имеет электрическая составляющая электромагнитного поля световой волны, поскольку именно она оказывает основное действие на электроны в атомах вещества. Поэтому для описания закономерностей поляризации будем рассматривать только *световой вектор* – вектор напряженности $\vec{E}$ электрического поля.

Свет представляет собой суммарное электромагнитное излучение множества независимо излучающих атомов. Поэтому все ориентации век-

тора $\vec{E}$ будут равновероятны. Такой свет называется *естественным* (рисунок 93(а)).

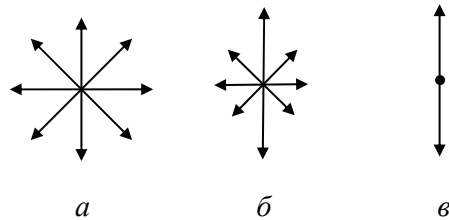


Рисунок 93 – Схемы поляризации света: *а* – естественный свет, *б* – частично поляризованный свет, *в* – плоскополяризованный свет

Поляризованным светом называется свет, в котором направления колебания вектора $\vec{E}$ каким-либо образом упорядочены.

Частично поляризованный свет (рисунок 93(б)) – свет с преимущественным направлением колебаний вектора $\vec{E}$.

Плоскополяризованный свет – свет, в котором вектор $\vec{E}$ колеблется только в одной, проходящей через луч плоскости (рисунок 93(в) и рисунок 93(а) и (б)). Эта плоскость называется *плоскостью поляризации*.

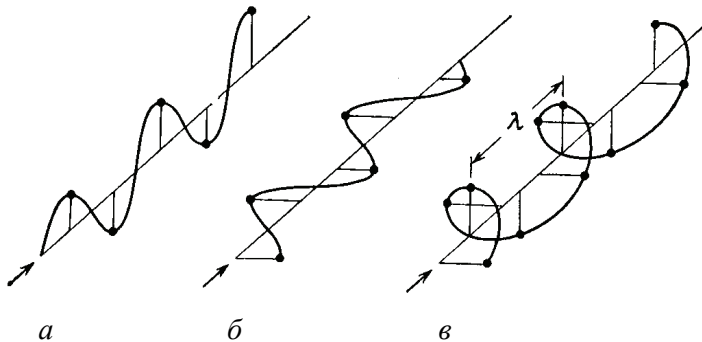


Рисунок 94 – Схемы образования циркулярно поляризованного света в результате сложения двух линейно поляризованных волн: *а* – первая плоскополяризованная волна, *б* – вторая плоскополяризованная волна, *в* – циркулярно поляризованный свет

Если концы вектора $\vec{E}$ с течением времени описывают в плоскости, перпендикулярной лучу, *окружность* или *эллипс* (рисунок 94(в)), то свет называется *циркулярно* или *эллиптически поляризованным*.

Степенью поляризации называется величина P

$$P = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}},$$

где $I_{\max}$ и $I_{\min}$ – соответственно, максимальная и минимальная интенсивности частично поляризованного света. Для естественного света $I_{\max} = I_{\min}$ и $P = 0$, для плоскополяризованного $I_{\min} = 0$ и $P = 1$.

Естественный свет можно преобразовать в плоскополяризованный, используя так называемые *поляризаторы*, пропускающие колебания только определенного направления. В качестве поляризаторов используются среды, анизотропные в отношении колебаний $\vec{E}$.

Закон Малюса. Пропустим естественный свет с интенсивностью $I_{\text{ест}}$ через поляризатор T_1 . Колебание амплитуды A , совершающееся в плоскости, образующей с плоскостью поляризатора угол φ , можно разложить на два колебания с амплитудами $A_{\parallel} = A \cos \varphi$ и $A_{\perp} = A \sin \varphi$ (рисунок 95(а)).

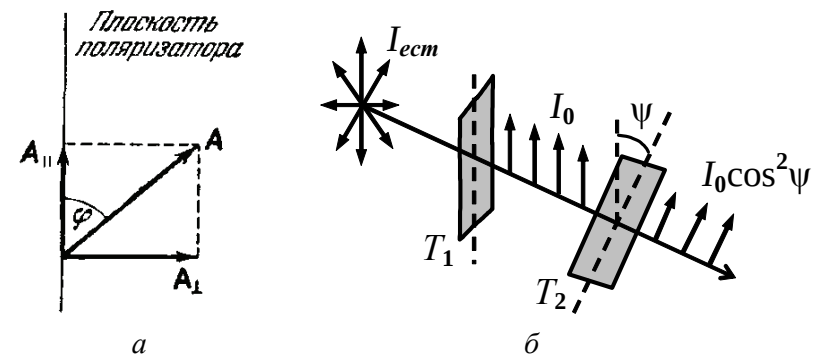


Рисунок 95 – Схемы, иллюстрирующие закон Малюса

Интенсивность прошедшей волны пропорциональна $A_{\parallel}^2 = A^2 \cos^2 \varphi$. В естественном свете все значения φ равновероятны, поэтому доля света, прошедшего через поляризатор, будет равна среднему значению $\langle \cos^2 \varphi \rangle = 1/2$, а интенсивность плоскополяризованного света, прошедшего через первый поляризатор T_1 равна

$$I_0 = \frac{I_{ест}}{2}.$$

Поставим на пути плоскополяризованного света второй поляризатор T_2 (анализатор) под углом ψ к первому. Интенсивность I света, прошедшего через анализатор, меняется в зависимости от угла ψ по закону Малюса

$$I = I_0 \cos^2 \psi.$$

Следовательно, интенсивность света, прошедшего через два поляризатора

$$I = \frac{1}{2} I_{ест} \cos^2 \psi.$$

Поэтому $I_{\max} = \frac{1}{2} I_{ест}$, когда поляризаторы параллельны и $I_{\min} = 0$, когда поляризаторы скрещены.

Поляризация света при отражении и преломлении. Если естественный свет падает на границу раздела двух диэлектриков, то отраженный и преломленный лучи являются *частично поляризованными*.

В отраженном луче преобладают колебания перпендикулярные плоскости падения, а в преломленном – колебания, лежащие в плоскости падения (рисунок 96(а)).

Если угол падения равен *углу Брюстера*, который определяется соотношением $\operatorname{tg} i_B = n_{21}$, то *отраженный луч является плоскополяризованным*. Преломленный луч в этом случае поляризуется максимально, но не полностью. При этом отраженный и преломленный лучи *взаимно перпен-*

дикулярны: $\operatorname{tg} i_B = \frac{\sin i_B}{\cos i_B} = n_{21}$ и $\frac{\sin i_B}{\sin i_2} = n_{21}$, следовательно $\cos i_B = \sin i_2$

или $i_B + i_2 = \frac{\pi}{2}$, но $i'_B = i_B$, поэтому $i'_B + i_2 = \frac{\pi}{2}$ (рисунок 96(б)).

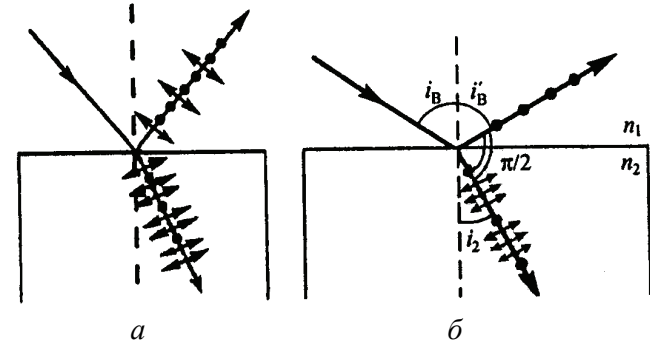


Рисунок 96 – Поляризация света при отражении и преломлении: а – частичная поляризация отраженного и преломленного лучей, б – падение луча под углом Брюстера

Двойное лучепреломление. *Двойное лучепреломление* – это способность прозрачных кристаллов (кроме оптически изотропных кристаллов кубической системы) *раздваивать* каждый падающий на них световой пучок (рисунок 97(а)).

Это явление объясняется особенностями распространения света в *анизотропных* средах и непосредственно вытекает из уравнений Максвелла. Если на кристалл направить узкий пучок света, то из кристалла выйдут *два пространственно разделенных луча параллельных друг друга и падающему лучу*. Даже в том случае, когда пучок падает на кристалл нормально, преломленный пучок разделяется на два: один из них является продолжением первичного (называется *обыкновенным (о)*), а второй отклоняется (называется *необыкновенным (е)*).

Направление в *оптически анизотропном кристалле*, по которому луч света распространяется, *не испытывая* двойного лучепреломления, называется *оптической осью кристалла*. Плоскость, проходящая через

направление луча света и оптическую ось кристалла, называется *главной плоскостью кристалла*.

о- и *е*-лучи плоскополяризованы во взаимно перпендикулярных плоскостях: колебания светового вектора в *о*-луче происходят перпендикулярно главной плоскости, в *е*-луче – в главной плоскости. *о*-Луч распространяется по всем направлениям кристалла с одинаковой скоростью $v_o = c/n_o$ – показатель преломления n_o для него есть величина постоянная. *е*-Лучи распространяются по различным направлениям с разными скоростями $v_e = c/n_e$ – показатель преломления n_e необыкновенного луча является переменной величиной, зависящей от направления луча.

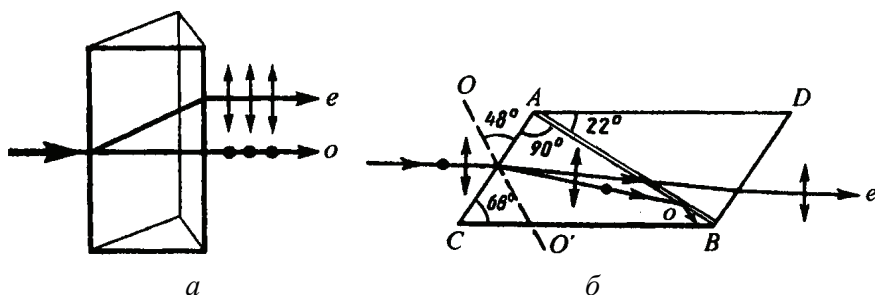


Рисунок 97 – Поляризация при преломлении: *а* – двойное лучепреломление, *б* – ход лучей в призме Николя

Поляризационные призмы и поляроиды. Явление двойного лучепреломления используется при изготовлении *поляризационных приспособлений* – поляризационных призм и поляроидов. Например, в *призме Николя* – двойной призме из исландского шпата, склеенной вдоль *AB* канадским бальзамом ($n = 1,55$) – обыкновенный луч ($n_o = 1,66$) испытывает *полное отражение* (так как канадский бальзам для него среда оптически менее плотная), а плоскополяризованный *необыкновенный* луч ($n_e = 1,51$) выходит из призмы (рисунок 97(б)). (Оптическая ось призмы OO' составляет с входной гранью угол 48°).

Двоякопреломляющие кристаллы обладают свойством *дихроизма* – *различного поглощения света* в зависимости от ориентации электрического вектора световой волны. *Дихроичные кристаллы* используются при

производстве *поляроидов* – тонких пластиковых пленок, в которые вкраплены кристаллики веществ с сильно выраженным *дихроизмом* (например, герпатит) – такие пленки уже при толщине $\sim 0,1$ мм *полностью поглощают* обыкновенные лучи видимой области спектра, являясь в таком тонком слое *совершенным поляризатором*.

Искусственная оптическая анизотропия. В оптически изотропных веществах возможно индуцировать *искусственную оптическую анизотропию* под воздействием: 1) одностороннего сжатия или растяжения; 2) электрического поля (*эффект Керра*); 3) магнитного поля (*эффект Коттона-Муттона*). При этом индуцированная оптическая ось совпадает с направлением деформации, электрического или магнитного полей.

Эффект Керра – оптическая анизотропия веществ под действием электрического поля – объясняется различной поляризуемостью молекул вещества по разным направлениям. Если приложить разность потенциалов к *ячейке Керра* – кювете с исследуемой жидкостью, которая размещена между скрещенными поляризатором *P* и анализатором *A*, и в которую помещены пластины конденсатора – то жидкость становится двоякопреломляющей и свет проходит через анализатор (рисунок 98).

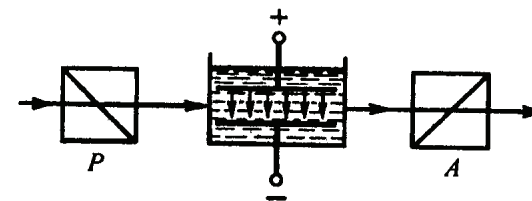


Рисунок 98 – Ячейка Керра

Разность показателей преломления обыкновенного и необыкновенного лучей: $n_e - n_o = B\lambda_0 E^2$, где λ_0 – длина волны света в вакууме, E – напряженность электрического поля, B – постоянная Керра, которая зависит от температуры, длины волны света и природы вещества.

Эффект Коттона-Муттона – магнитный аналог эффекта Керра – возникновение оптической анизотропии у некоторых изотропных веществ

при помещении их в сильное внешнее магнитное поле. При этом $n_e - n_0 = C\lambda_0 H^2$, где H – величина напряженности внешнего магнитного поля, C – постоянная Коттона-Муттона, которая зависит от температуры, длины волны света и природы вещества.

Вращение плоскости поляризации. Некоторые вещества (например, кварц, сахар, скипидар), называемые *оптически активными*, обладают способностью вращать плоскость поляризации. Угол поворота плоскости поляризации $\varphi = \alpha \cdot d$, где d – толщина слоя вещества, α – удельное вращение – угол поворота плоскости поляризации слоем оптически активного вещества единичной толщины. При этом $\alpha \sim \lambda_0^{-2}$ – закон Био (λ_0 – длина волны света в вакууме). Для растворов угол φ зависит еще и от концентрации c раствора

$$\varphi = \alpha \cdot c \cdot d.$$

Если между скрещенными поляризатором P и анализатором A поместить оптически активное вещество (рисунок 99), то поле зрения анализатора просветляется.



Рисунок 99 – Вращение плоскости поляризации оптически активными веществами

Поворачивая анализатор можно определить угол φ , при котором поле зрения вновь становится темным – угол поворота плоскости поляризации оптически активным веществом. В зависимости от направления вращения, оптически активные вещества разделяются на *право-* и *лево-вращающие*. В первом случае плоскость поляризации, если смотреть навстречу лучу, смещается *по часовой стрелке*, во втором – *против*. Оптическая активность обуславливается: 1) строением молекул вещества

(их асимметрией); 2) особенностями расположения частиц в кристаллической решетке.

Эффект Фарадея – вращение плоскости поляризации в оптически неактивных телах помещенных во внешнее магнитное поле. Угол поворота плоскости поляризации $\varphi = VHd$, где H – напряженность внешнего магнитного поля, d – толщина образца, V – *постоянная Верде*, зависящая от природы вещества и длины волны света.

С помощью поляризационной оптики *ультраструктура миелиновых оболочек* и других объектов была выявлена задолго до того, как она была изучена в электронном микроскопе. Микроскопические исследования в поляризованном свете производятся с целью изучения оптической анизотропии объектов. Этим методом определяется ориентировка частиц, направление деформаций, величина двойного лучепреломления.

С помощью поляризационного микроскопа (рисунок 99) можно наблюдать *ориентацию молекул липидов* и измерять их относительное содержание. При исследовании обладающего дихроизмом образца из поляризационного микроскопа удаляют анализатор и компенсатор (объект сам выступает в роли анализатора). Вращая образец, находят угол, соответствующий наиболее точному изображению. Так можно определить ориентацию молекул в образце.

Микровязкость мембраны можно оценить по изменениям спектров флуоресценции, а также по степени поляризации P флуоресцентного излучения при освещении мембраны *поляризованным светом*. Связь степени поляризации P и микровязкости мембраны η выражается *формулой Перрена и Яблонского*

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \cdot \left(1 + \frac{RT}{V\eta} \tau \right),$$

где P_0 – степень поляризации света на неподвижных молекулах, $R = 8,31 \text{ Дж/(К·моль)}$ – универсальная газовая постоянная, T [К] – температура, V – молярный объем флуоресцирующих молекул, τ – время жизни возбужденного состояния.

8.4. Флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентный анализ дает возможность исследовать подвижность фосфолипидных молекул в мембране, оценить вязкость липидной фазы мембраны (так называемую микровязкость мембран).

Молекулы вещества поглощают кванты света, энергия которых E определяется по формуле Планка

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda},$$

где ν – частота света, λ – длина волны светового кванта, c – скорость света в вакууме, h – постоянная Планка.

Поглощенные кванты возбуждают электроны молекул и переводят их из основного, невозбужденного уровня S_0 на более высокие, возбужденные уровни $S_1^*, S_2^*, \dots$, в зависимости от энергии кванта (рисунок 100).

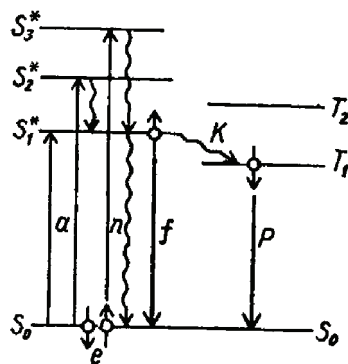


Рисунок 100 – Диаграмма уровней энергии: S – синглетный уровень, T – триплетный уровень, a – абсорбция, f – флуоресценция, P – фосфоресценция, n – безызлучательные переходы, K – интеркомбинационная конверсия, e – электрон

Возбужденное состояние молекулы является неравновесным, и молекула переходит из него разными путями. Эти пути на схеме показаны разными стрелками вниз. Один из путей – это безызлучательная диссипа-

ция энергии в виде тепловых колебаний (волнистые стрелки). Другой путь сопровождается излучением квантов света.

Испускание кванта света при переходе электрона между синглетными уровнями $S_1^* \rightarrow S_2^*$ называется флуоресценцией (значение спинового квантового числа электрона не изменяется). Время жизни возбужденного синглетного состояния составляет $10^{-8} - 10^{-9}$ с.

Вследствие взаимодействия возбужденных молекул с соседними молекулами возможна переориентация спина, и возбужденный электрон переходит на триплетный уровень T . Триплетное состояние является метастабильным с временем жизни от 10^{-7} с до нескольких часов.

Переход возбужденного электрона из триплетного состояния ($T_1 \rightarrow S_0$) сопровождается испусканием фосфоресценции, что наиболее хорошо наблюдается в замороженных растворах.

Спектром флуоресценции называется зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны испускаемого света $I_f = f(\lambda_f)$. Спектром возбуждения флуоресценции называется зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны возбуждающего света $I_f = f(\lambda_a)$.

Согласно закону Стокса, спектр флуоресценции вещества всегда расположен в более длинноволновой области, чем спектр поглощения.

Квантовый выход флуоресценции ϕ – отношение количества испускаемых квантов n_f к количеству поглощенных квантов n_a

$$\phi = \frac{n_f}{n_a}.$$

Для определения относительного квантового выхода вещества используется метод Паркера и Риса.

Для этого измеряется на одном и том же спектрофлуориметре, в одинаковых условиях спектр флуоресценции неизвестного вещества и вещества-эталоны с известным квантовым выходом ϕ_0 .

Квантовый выход флуоресценции исследуемого вещества определяется по формуле

$$\varphi = \varphi_0 \frac{S}{S_0} \frac{D_0}{D},$$

где S и S_0 – площади под спектрами флуоресценции вещества и эталона, соответственно, D и D_0 – оптические плотности вещества и эталона на длине волны возбуждения флуоресценции. В качестве стандарта используются раствор *хинина бисульфата* в 1 М H_2SO_4 с $\varphi_0 = 0,55$ или *флуоресцина* в 0,1 М NaOH с $\varphi_0 = 0,92$.

Интенсивность флуоресценции вещества пропорциональна интенсивности падающего света. В флуоресцентном микроскопе обязательно должен быть фильтр, пропускающий свет с длиной волны, соответствующей флуоресценции, но не возбуждающей свет. Этот фильтр помещается между объективом и глазом исследователя. Если флуоресценции нет, поле наблюдения будет темным.

В естественном состоянии мембрана не флуоресцирует. Для проведения исследования мембраны флуоресцентным методом необходимо искусственным путем ввести в мембрану молекулы или молекулярные группы, способные к флуоресценции. В качестве *флуоресцентных зондов* используются, например, АНС – 1-анилин-нафталин-8-сульфонат, или 1-диметиламино-5-нафталиносulьфохлорид (DANS) (рисунок 101).

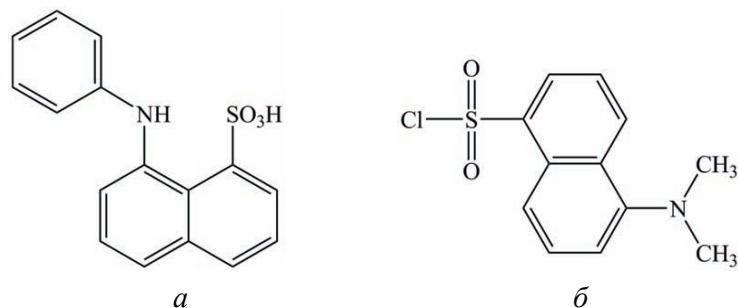


Рисунок 101 – Флуоресцентные зонды: *a* – АНС, *б* – DANS

АНС был первым зондом, который использовал Д.Лоуренс в 1952г. для исследования мембранных структур. Этот зонд является классиче-

ским примером флуоресцентного зонда, распределяющегося между водой и мембранной фазами в измеримой пропорции. АНС флуоресцирует практически только в связанном с мембраной состоянии, причем флуоресценция связанного с мембраной красителя заметно отличается по своим характеристикам от его флуоресценции в водной фазе, что позволяет делать заключение о характере микроокружения хромофорных групп молекул зонда.

DANS способен ковалентно присоединяться к свободным аминогруппам и является хромофором многих флуоресцентных зондов. Например, структурная формула DANS-глицина представлена на рисунке 102.

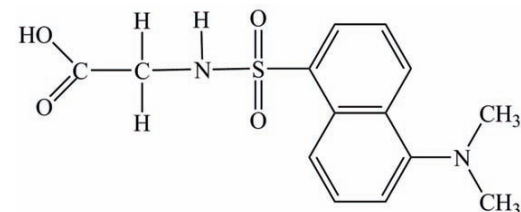


Рисунок 102 – DANS-глицин

Аминогруппа DANS-глицина, с одной стороны, сопряжена с π -электронной системой нафталина, а с другой – взаимодействует с растворителями, полностью изменяя как спектр поглощения нафталина, так и его флуоресцентные свойства. При возбуждении молекулы аминогруппа поворачивается в одну плоскость с кольцами нафталина, при этом дипольный момент молекулы увеличивается. Появляется большой Stokes сдвиг спектра флуоресценции, сильно зависящий от полярности растворителя.

Другой метод флуоресцентного мечения мембранных компонентов основан на использовании антител. Прибавляя к исследуемому объекту антитела, ковалентно связанные с флуоресцирующим красителем, например флуоресцеином, можно локализовать соответствующие данному антителу мембранные структуры плазматических мембран в отдельных клетках.

8.5. Центрифугирование

Выделение мембран и разделение на составные компоненты.

Установление химического состава и молекулярной архитектуры мембранных структур, структурных формул их компонентов невозможно без выделения их в чистом виде. Для этого требуется разрушить клетку так, чтобы структурная и функциональная организация мембран не нарушались. При разрушении клеток исследователи стараются применять такие материалы и вещества, которые активно не взаимодействуют с мембранными структурами. Если же такого взаимодействия избежать нельзя, то необходимо учитывать последствия его.

В настоящее время выделение биологических мембран в виде отдельных фракций – процесс не очень сложный. Для этого используется множество различных типов *ультрацентрифуг*. (Первая ультрацентрифуга была построена Сведбергом в 1923 г. и в 1925 г. предложена для определения скорости седиментации).

В процессе ультрацентрифугирования фрагменты (или везикулы) мембран движутся под действием центробежной силы и распределяются по длине центрифужной пробирки. Если такое распределение не меняется во времени, считается, что фрагменты мембран достигли своего седиментационного равновесия, по которому можно судить о массе и плотности фракций.

Центробежная сила, действующая на частицу, равна

$$F_{Ц} = m\omega^2 r,$$

а выталкивающая

$$F_{В} = m\omega^2 r\bar{V}\rho,$$

где m – масса частицы; r – расстояние до центра вращения; ω – угловая скорость вращения ротора; $\bar{V}$ – парциальный удельный объем частицы (равный увеличению объема, вызываемого прибавлением единицы массы растворимого вещества к раствору); ρ – плотность растворителя.

Кроме того, скорость движения частиц v зависит от трения частицы о молекулы растворителя. Поэтому

$$v = \frac{F_{Ц} - F_{В}}{f} = \frac{\omega^2 r m (1 - \bar{V}\rho)}{f},$$

где f – коэффициент трения. Из уравнения видно, что скорость движения частицы (v) пропорциональна величине поля центробежной силы ($\omega^2 r$), отношение которых дает коэффициент седиментации

$$S = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m(1 - \bar{V}\rho)}{f}.$$

Таким образом, чтобы определить массу частицы, необходимо знать коэффициенты седиментации и трения. Коэффициент седиментации определяют из выражения $S = \frac{v}{\omega^2 r}$. А прямое определение коэффициента трения представляет собой трудоемкую задачу. Если трение в процессе ультрацентрифугирования довольно большое, можно использовать выражение

$$D = \frac{kT}{f},$$

где D – коэффициент диффузии; k – константа Больцмана; T – абсолютная температура. Тогда уравнение $v = \frac{\omega^2 r m (1 - \bar{V}\rho)}{f}$ можно записать в виде

$$m = \frac{v k T}{\omega^2 r (1 - \bar{V}\rho) D} = \frac{k T S}{D (1 - \bar{V}\rho)},$$

а заменив константу Больцмана на универсальную газовую постоянную,

$$M = \frac{R T S}{D (1 - \bar{V}\rho)}.$$

Зная D и S , из этого уравнения можно рассчитать массу частицы.

Установить массу частицы можно и без определения коэффициента диффузии. Для этого используется *метод седиментационного равновесия*. Центрифугирование проводится при такой (низкой) скорости, когда седиментация частицы уравнивается диффузией. Хотя концентрации вещества вверху пробирки и на дне разные, но значения их всегда постоянны. Используя *уравнение Больцмана*

$$\frac{C_1}{C_2} = \exp\left(-\frac{E_1 - E_2}{kT}\right),$$

где C_1 и C_2 – концентрации растворенного вещества на расстояниях r_1 и r_2 от оси вращения; E_1 и E_2 – потенциальные энергии молекул в точках r_1 и r_2 , получаем уравнение для расчета молекулярной массы

$$M = \frac{2RT}{\omega^2 r(1 - \bar{V}\rho)} \cdot \ln\left(\frac{C(r)}{C(a)} \cdot \frac{1}{r^2 - a^2}\right),$$

где $C(a)$ и $C(r)$ – концентрации растворенного вещества в области мениска и на расстоянии r от оси вращения.

Из графика зависимости $\ln C(r)$ от r^2 , представляющего собой прямую линию, определяют молекулярную массу частиц. Этот метод достаточно точный, но требует много времени (равновесие достигается иногда через 24 ч).

В связи с этим часто используют быстрый, но менее точный *метод Арчибальда*, в котором измерения концентрации вещества проводятся очень близко к мениску и дну ячейки (что и снижает точность метода).

А затем с помощью математических уравнений, используя уменьшение концентрации вещества у мениска и увеличение ее у дна ячейки, определяют молекулярную массу.

Существуют и другие методы определения молекулярной массы, но они редко используются при изучении мембранных систем.

Следует отметить, что коэффициент седиментации зависит от нескольких факторов: концентрации раствора, скорости движения частиц, заряда, формы и массы частиц и др.

1. С увеличением концентрации вещества вязкость растворителя вблизи частиц увеличивается. В результате этого скорость движения частицы при ультрацентрифугировании уменьшается.
2. С увеличением скорости движения увеличивается агрегация частиц, что приводит к понижению их эффективной концентрации.
3. Фрагменты и пузырьки мембран, как и их компоненты, в большинстве имеют определенный заряд. Так как коэффициент седиментации для частиц значительно превышает S для противоионов, например Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , то частица движется ко дну центрифужной пробирки быстрее, чем противоионы. Это приводит к возникновению противоположного по направлению седиментации градиента потенциала (он часто называется потенциалом седиментации). Чем больше градиент потенциала, тем меньше величина S . Если подобные явления нежелательны, их можно избежать увеличением ионной силы раствора, т. е. увеличением концентрации противоионов.
4. Коэффициент седиментации также зависит от формы частицы. Если мы представим себе две фракции мембран: пузырьки и незамкнутые "серповидные" фрагменты, то ясно, что в процессе ультрацентрифугирования пузырьки будут двигаться быстрее. А их константа седиментации будет больше S незамкнутых фрагментов.
5. Как видно из уравнения $S = m \frac{(1 - \bar{V}\rho)}{f}$, константа седиментации пропорциональна массе частицы только в том случае, если парциальный удельный объем и коэффициент трения не изменяются.

Таким образом, учитывая кратко изложенные зависимости коэффициента седиментации и то, что эксперименты часто проводятся при разных температурах и различных системах раствор-растворитель, сравнить величины S , полученные в разных опытах, трудно. В уравнении

$S = m \frac{(1 - \bar{V}\rho)}{f}$ температура не вводится, но необходимо учитывать, что изменение температуры системы изменяет вязкость и плотность раствора, т. е. изменяет члены $(1 - \bar{V}\rho)$ и f уравнения. В связи с этим введено понятие стандартного значения константы седиментации, определяемое в системе, имеющей вязкость и плотность воды при $+20^\circ\text{C}$, которая обозначается как S_{20}^0 .

Виды ультрацентрифуг. Все ультрацентрифуги можно разделить на два типа: *аналитические* и *препаративные*. Аналитические центрифуги позволяют анализировать распределение вещества в пробирке в течение всего времени. Препаративные, как правило, используются для получения и очистки клеточных органелл и макромолекул, т. е. для получения чистых фракций, препаратов. Для непрерывного наблюдения аналитические центрифуги снабжены оптической системой. При работе на препаративных центрифугах применяют фракционирование содержимого центрифужной пробирки с тем, чтобы в каждой фракции измерить концентрацию вещества. Таким образом, при необходимости аналитическую центрифугу можно заменить препаративной и наоборот. Поэтому термины "аналитическая" и "препаративная" центрифуга не столько определяют принадлежность прибора к той или иной группе, сколько указывают на наличие или отсутствие специальной оптической системы в нем.

Современные ультрацентрифуги работают при ускорениях $\sim 400000\text{ g}$, а температура контролируется с точностью до $0,1^\circ\text{C}$.

Главным рабочим органом ультрацентрифуги является ротор. На рисунке 103 показаны роторы ультрацентрифуги УЦП-65.

Угловой ротор предназначен для получения плотного осадка на дне центрифужной пробирки. При вращении ротора вещество быстро перемещается к стенке пробирки (расстояние до стенки значительно меньше расстояния до ее дна) и сползает по стенке на дно. После остановки вращения ротора пробирки вынимают и, сливая супернатант, получают осадок исследуемого вещества или фракции. Ротор с подвесными стаканами

также можно использовать для получения плотного осадка. Однако он чаще используется при центрифугировании в аналитических целях.

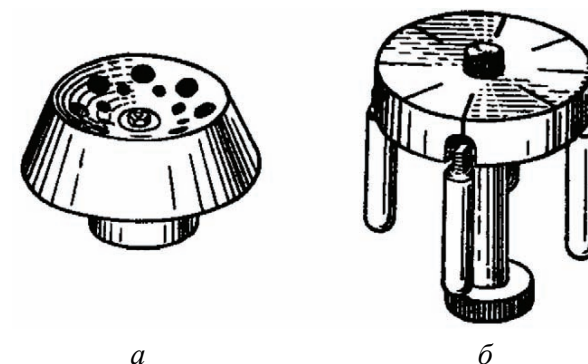


Рисунок 103 – Роторы центрифуги: а – угловой, б – с подвесными стаканами

Для измерения концентрации центрифугируемых компонентов (*аналитическое центрифугирование*) используются *три* оптические системы.

1. *Шлиреновская* – луч света отклоняется только в случае прохождения через участок с изменяющейся концентрацией. Показатель преломления света зависит от концентрации раствора. Эта система используется при концентрациях не ниже десятых долей микрограмма в 1 мл.

2. В связи с недостаточной чувствительностью шлиреновской оптической системы для определения малых изменений концентраций (сотые доли микрограмма в 1 мл) разработана *интерференционная* система. При прохождении света через оба сектора ячейки (один заполнен растворителем, другой – раствором) получается интерференционная картина. Каждая интерференционная полоса – это кривая зависимости показателя преломления света по длине ячейки.

3. *Адсорбционная* система. Через центрифужную пробирку пропускается свет (обычно ультрафиолетовый), который и преобразуется с помощью сканирующего устройства. В результате можно получить зависимость концентрации вещества от расстояния.

Зональное центрифугирование. Если необходимо отцентрифугировать раствор, в котором молекулы растворенного вещества имеют любое, но одно значение S , то раствор просто наливают в центрифужную пробирку и центрифугируют. Но если компонентов с разными величинами S два и больше, то таким способом мы не достигнем выделения чистых компонентов. Загрязнения *быстро осаждающегося* компонента *медленно осаждающимся* будет оттого, что частицы первого движутся через раствор второго. Тогда необходимо применять зональное центрифугирование в градиенте плотности. Исследуемый раствор наносят на предварительно приготовленный в центрифужной пробирке градиент плотности и центрифугируют. Нужно обязательно запомнить, что плотность верхнего слоя градиента должна быть всегда выше плотности исследуемого раствора. В противном случае исследуемый раствор будет "проваливаться" в градиент.

Если в исследуемом растворе было несколько компонентов, то в ходе седиментации они будут разделяться в виде серии зон (каждый в своей зоне плотности), то есть седиментация каждого компонента происходит только через растворитель. Важно также и то, что созданный градиент плотности предотвращает перемешивание в результате механических воздействий – система стремится к положению, при котором область с низкой плотностью расположена над областью с высшей плотностью.

Для градиента плотности необходимо выбирать такие вещества, которые доступны в чистом состоянии и не взаимодействуют с веществами и реагентами исследуемых растворов и суспензий. На практике часто используют сахарозу, фиколл и глицерин.

В отдельных исследованиях, когда необходимо определить коэффициент седиментации, используют изокINETические градиенты, в которых молекулы движутся с одной и той же скоростью в любой части пробирки. Таким свойством, например, обладают 5–20 %-е растворы сахарозы. Так, как изотонические свойства градиента зависят от изменения концентрации как функции расстояния вдоль пробирки, для центрифужных пробирок различной длины изокINETические градиенты подбираются индивидуально.

8.6. Хроматография

Это один из наиболее эффективных методов разделения и идентификации химических веществ. В настоящее время существует много видов и способов применения хроматографии.

8.6.1. Распределительная хроматография

Система, в которую помещается вещество, имеет подвижную (растворитель) и неподвижную (сорбент) фазу. Разделение веществ в такой системе происходит за счет различий в распределении между этими двумя фазами. Коэффициент распределения – это соотношение концентраций вещества в обеих фазах.

Распределительная хроматография применяется в виде хроматографии на бумаге, тонкослойной, колоночной и газожидкостной хроматографии.

Хроматография на бумаге. Небольшое количество исследуемой смеси наносят на лист бумаги, высушивают (образуется стартовое пятно), помещают лист в герметическую камеру и один конец погружают, например, в воду. Вода движется к противоположному краю листа бумаги и увлекает за собой компоненты стартового пятна. Затем лист высушивают и отмечают положение пятен, которые обнаруживаются по цвету, флуоресценции, радиоактивности. Идентифицируют пятна путем сравнения с образцом, а затем элюируют. В данном приеме распределительной хроматографии носителем служит целлюлоза, сорбентом – связанная целлюлозой вода, а растворителем – чаще тоже вода.

Тонкослойная хроматография сохраняет все положительные черты хроматографии на бумаге, но позволяет разделять и неполярные вещества. Слой сорбента (до 0,5 мм толщиной) готовится из разнообразных материалов (диаметр частиц до 0,1 мм) – силикагеля, окиси алюминия, силиката магния, целлюлозы, полиамидов, полиэтилена (порошка) и других. Большую разрешающую способность этого метода (в 50–100 раз чувствительнее бумажной хроматографии) обеспечивает низкое отношение

Колоночная хроматография. В трубку вносится носитель (цилит, силикагель, порошок целлюлозы, сефадексы), на котором адсорбируется (либо удерживается капиллярными силами) соответствующий сорбент: гидрофобные растворители для разделения неполярных и гидрофильные растворители – для полярных соединений. Подвижными фазами служат соответственно спирты (или амиды) и вода. Разрешающая способность этого метода значительно ниже тонкослойной хроматографии хотя бы потому, что отношение массы растворенных веществ к массе сорбента равно 1/50, т. е. на 7 порядков ниже.

8.6.2. Адсорбционная и ионообменная хроматография

Адсорбционная хроматография. Если смесь веществ, для молекул которых характерны неодинаковые адсорбционные свойства, нанесена на поверхность неподвижной фазы, через которую пропускается растворитель, то большая часть молекул будет двигаться вместе с растворителем. По мере движения вещества будут связываться (адсорбироваться), т. е. разделяться. В этом методе носители используются разные: силикагель, окись алюминия, активированный уголь и т. д. Приемы применения адсорбционной хроматографии аналогичны приемам распределительной.

The diagram illustrates the loading of a sample into a column and the subsequent elution of a gradient of salts. It consists of seven parts labeled *a* through *g*.

- Part a:** Shows a column with a sample (represented by black dots) loaded on top of a buffer (represented by open circles). The sample is labeled "1" and the buffer is labeled "2".
- Part б:** Shows the sample (1) and buffer (2) moving down the column.
- Part в:** Shows the sample (1) and buffer (2) moving down the column.
- Part г:** Shows the sample (1) and buffer (2) moving down the column.
- Part д:** Shows the sample (1) and buffer (2) moving down the column.
- Part е:** Shows the sample (1) and buffer (2) moving down the column.
- Part г:** Shows a schematic of a particle (represented by a shaded circle) with various chemical groups (represented by different shapes like triangles, squares, and circles) attached to its surface. The particle is labeled "3".

The columns are labeled *a*, *б*, *в*, *г*, *д*, *е*, and *ж* (which corresponds to *g* in the original image).

Рисунок 104 – Схема ионообменной хроматографии: *a*–*в* – загрузка колонки, *г*–*е* – элюция колонки, *ж* – взаимодействие молекул образца с ионами, присоединенными к сорбенту. 1 – образец, 2 – сорбент, 3 – гранула в колонке

При загрузке колонки (рисунок 104(а)–(в)) подвижные анионы (или катионы) удерживаются около катионов (или анионов), которые ковалентно присоединены к сорбенту (неподвижная фаза, рисунок 104(ж)). Затем колонки элюируют солевым градиентом (рисунок 104(г)–(е)). Ионы соли ослабляют электростатическое взаимодействие между ионами

образца и ионами сорбента. Молекулы образца с различными электростатическими свойствами элюируются при различных концентрациях соли.

Существует два типа ионообменников: катиониты (несут отрицательные заряды, например SO_3^- или карбоксильные группы) и аниониты (заряд положительный, например, аминогруппа, алифатические или ароматические аминогруппы). На рисунке 105 приведены схемы катионита карбоксиметил (КМ) и анионита диэтиламиноэтил (ДЭАЭ).

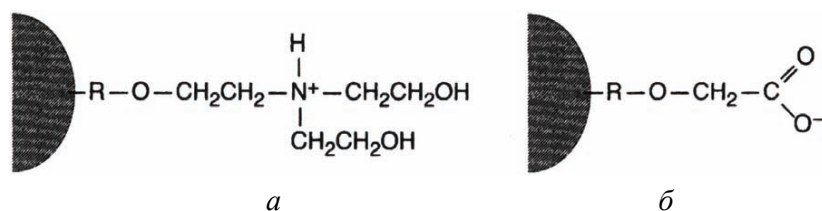


Рисунок 105 – Ионообменники: *a* – диэтиламиноэтил (ДЭАЭ), *б* – карбоксиметил (КМ)

Матрицы бывают: декстрановые, целлюлозные, акрильные, фенольные, используются смолы "дауэкс" и др. Мембранные белки (как и полисахариды) лучше разделяются на ионообменниках на основе целлюлозы, декстрана и полиакриламида.

Необходимо точно знать общую емкость ионообменника (миллиэквиваленты обменивающихся групп на 1 мг сухого сорбента), так как при перегрузке колонки ионы исследуемого образца не будут связываться. Реальная емкость зависит от условий эксперимента – pH, ионной силы, пористости матрицы, размеров частиц ионообменника. В связи с этим необходимо тщательно выбирать ионообменник и подбирать условия эксперимента.

Например, для макромолекул, нестабильных при низкой ионной силе, лучше использовать ионообменники типа сефадекса и биогеля. В этих материалах благодаря наличию поперечных связей можно в несколько раз (по сравнению с целлюлозой) увеличить плотность заряда, то есть увеличить сродство. А это означает, что связывание можно осуществлять при более высокой ионной силе.

Выбор размера частиц ионообменника – ситового размера – представляет непростую задачу. Это связано с тем, что малый размер частиц улучшает разделение, но замедляет скорость тока, а это вследствие диффузионных явлений вызывает "размазывание" зон.

При исследовании методом ионной хроматографии необходимо катионные буферы использовать с анионитами, а анионные – с катионитами. Ионная сила по возможности не должна быть высокой, а для элюирования необходимо подбирать определенную ионную силу, достаточную для элюирования образца.

8.6.3. Гель-фильтрация

Другие названия этого метода: *молекулярно-ситовая* хроматография, *гель-проникающая* хроматография или хроматография на *молекулярных системах*.

Хроматография на молекулярных системах позволяет разделять вещества в широких диапазонах pH, температуры, ионной силы и состава буфера. Незначительная адсорбция делает метод особенно ценным при разделении лабильных биологических макромолекул (например, ферментов). Благодаря только этим достоинствам хроматография на молекулярных ситах в основном служит для разделения и очистки в первую очередь белков (в том числе и ферментов), а также других составляющих мембраны компонентов. Кроме того, гель-фильтрация с успехом применяется и в аналитических целях.

Суть метода заключается в том, что если пропускать раствор веществ через мелкие пористые частицы инертного материала, то большие молекулы будут двигаться между частицами, а маленькие (диаметр которых меньше или равен диаметру пор в частицах) диффундировать в частицы (рисунок 106).

Чем молекулы меньше, тем легче они проникают внутрь гранул геля (рисунок 106(д)) и поэтому дольше задерживаются там, время прохождения их через колонку будет большим, чем у более крупных молекул. Крупные молекулы, которые не могут проникать в поры геля, не задержи-

ваются в гранулах, а протекают между ними, и их время прохождения через колонку гораздо меньше, чем у малых молекул (рисунок 106(в), (г)).

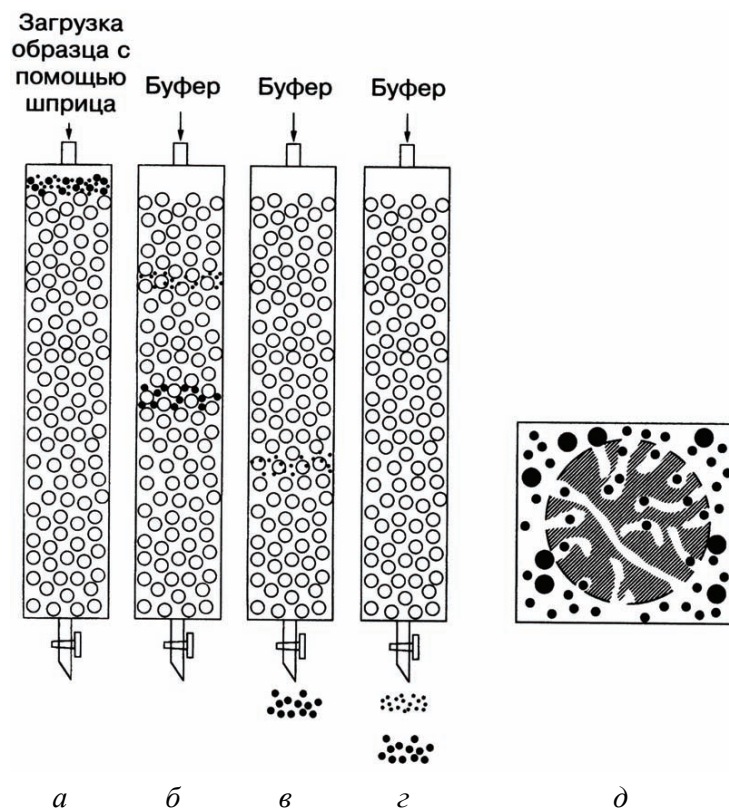


Рисунок 106 – Гель-фильтрационная хроматография

В качестве молекулярных сит используются гели, которые не взаимодействуют с исследуемыми веществами. Чаще всего применяются декстрановые (сефадексы G-10, G-25, G-75, G-200), агарозные (сефарозы 2B и 4B, биогели А-0,5 М, А-15 М, А-150 М) и полиакриламидные гели (био-гели Р-2, Р-6, Р-150, Р-300) для водных растворов, полистирольные – для неполярных органических растворителей, а оксипропильное производное декстрана – как для полярных, так и для неполярных растворителей.

Декстрановые гели фракционируют вещества, молекулярная масса которых варьирует от 1000 до 800 000 Да, полиакриламидные – от 200 до 400 000, а агарозные – от 2 000 000 до 150 000 000 Да.

8.6.4. Аффинная хроматография

Этот метод особенно часто используется в исследованиях мембран. Суть метода заключается в следующем. С нерастворимой матрицей ковалентно связывается лиганд – небольшая молекула, у которой высокая аффинность к молекулам того вещества, которое необходимо выделить. Например, выделить специфические антитела из раствора можно с помощью гранул носителя, к которым присоединены антигены к данному антителу (рисунок 107).

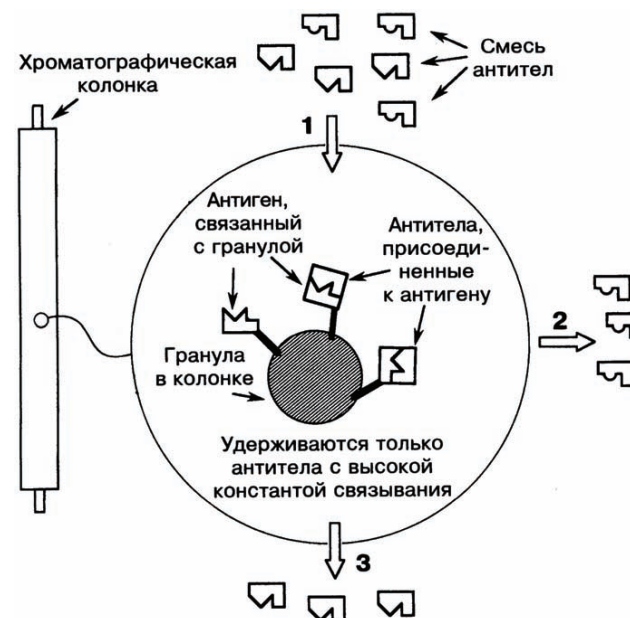


Рисунок 107 – Очистка антител с помощью аффинной хроматографии: 1 – загрузка образца; 2 – не связанные антитела вымываются буферным раствором; 3 – антитела с высокой аффинностью элюируются буферным раствором с высокой концентрацией соли

Чаще всего в аффинной хроматографии используются сефарозы, к которым "пришиваются" реагенты, связывающие мембранные белки, в том числе транспортные (лиганд – транспортируемые вещества), белки-ферменты (лиганд – ингибитор или кофактор соответствующего фермента), гликопротеины (лиганд – конканавалин А), мембраны (лиганд – гормоны), антитела (лиганд – бромциан), целые клетки некоторых опухолей (лиганд – часто конканавалин А). Также в качестве лиганда используется белок кальмодулин. Если конканавалин А – белок только растений (связывается с группами α -маннозы на поверхности клетки и вызывает агглютинацию), то кальмодулин – это кальциопроtein, который встречается во всех клетках эукариот и, возможно, содержится в клетках прокариот.

Кальмодулин активен только в комплексе с кальцием. Он играет существенную роль в различных биологических явлениях: клеточном делении, секреции, делении хромосом, энергетических превращениях, работе гормонов, мембранных кальциевых насосов и т. п. В последнем случае особый интерес представляет использование кальмодулина в качестве лиганда мембранно-связанных АТФаз, зависящих от ионов кальция.

8.7. Электрофорез

Под электрофорезом понимают движение заряженных частиц в растворе под влиянием электрического поля. Так как многие компоненты мембран несут электрические заряды, их можно разделить по скорости в электрическом поле. По скорости именно потому, что последняя зависит от величины заряда, молекулярной массы, формы молекул (при постоянных условиях электрофореза). Таким образом, сила, заставляющая частицу двигаться, пропорциональна ее заряду и электрическому полю, а противодействующая сила пропорциональна скорости движения частицы, вязкости среды и ионной атмосфере частицы, экранирующей ее от действия поля.

Большинство существующих методов можно разделить на три типа.

1. Зональный электрофорез. При этом образец наносится на материал (носитель) в виде пятна (либо в виде линии) и помещается в элек-

трическое поле. Следует помнить, что носитель иногда может оказывать хроматографический эффект, который необходимо тщательно учитывать.

Очень часто зональный электрофорез проводят на бумаге (*целлюлоза*), предварительно пропитанной соответствующим буфером. После окончания разделения в высоко- или низковольтном электрическом поле бумагу высушивают, обнаруживают вещество (после окрашивания красителями, по флуоресценции, радиоактивности и т. п.), элюируют и определяют концентрацию на спектрофотометре.

В препаративных целях вещество добавляют на бумагу непрерывно. Лист бумаги расположен вертикально, и движение вещества в направлении сверху вниз определяется током растворителя. Электрическое поле ориентируют горизонтально (перпендикулярно движению растворителя). По всей длине нижнего края бумаги вещество собирается в отдельные пробы.

Если электрофорез на бумаге не дает желаемых результатов, можно после окончания электрофоретического разделения провести хроматографию под прямым углом к направлению электрофореза.

Часто бывает, что разделяемые вещества адсорбируются целлюлозой. Это ухудшает разделение, поэтому вместо бумаги в качестве носителя используют *ацетат целлюлозы* (гидроксильные группы целлюлозы заменены ацетатными). Отсутствие адсорбции, возможность прямого определения количества вещества на спектрофотометре (мембрана из ацетата целлюлозы прозрачна), хорошая растворимость во многих растворителях дают возможность повысить степень разделения.

Еще большего разделения можно достичь, используя в качестве носителя гели полиакриламида и агарозы.

Полиакриламидный гель (ПААГ) – наиболее эффективный носитель для электрофореза белков, в том числе и мембранных. Большинство периодической литературы по белковому составу мембран посвящено электрофоретическому разделению последнего именно в ПААГ. Как правило, электрофорез в ПААГ проводят или в колонке, или на пластинках геля.

Для мембранных белков хорошие результаты определения молекулярной массы получены с использованием SDS–ПААГ-электрофореза. *Додецилсульфат натрия* SDS (ДСН) связывается белками, что является

причиной их диссоциации. Если же SDS действует на белки в среде, где присутствует реагент, разрывающий дисульфидные связи (меркаптоэтанол, *n*-этилмалеимид, *n*-хлормеркурибензоат и др.), то образуются однотипные "беспорядочные" структуры комплексов SDS–белок. В таких комплексах заряд определяется в основном додецилсульфатом, поскольку количество связываемого белком SDS почти не зависит от типа белка и является величиной постоянной: 1,4–1,5 г SDS на 1 г белка. Таким образом, подвижность белков в комплексе с SDS будет определяться только молекулярной массой.

Получаемые полосы можно идентифицировать окрашиванием (с последующим отмыванием несвязанного красителя), а количественные измерения проводят с помощью определения оптической плотности, радиоактивности и др. Имея в исследуемой смеси несколько (минимум два) белков с известной молекулярной массой, можно сравнительно легко определить молекулярную массу исследуемых белков, так как зависимость $\lg M$ от пройденного расстояния является линейной.

2. Диск-электрофорез. Максимальное разделение достигается при использовании диск-электрофореза в ПААГ. (Название "диск" – от дискретного напряжения электрического поля, что обеспечивается прерывистым градиентом pH в системе.) Суть метода заключается в следующем. В стеклянной вертикальной трубке полимеризуют гель неодинаковой концентрации. Верхняя часть (область образца до 100 мкм толщиной) и средняя (прокладка) имеют меньшую концентрацию, чем нижняя часть – разделяющий гель. Образец наносят на верхнюю часть геля. (Иногда верхний гель не используется. Тогда образец наносят в плотном растворе сахарозы на гель-прокладку под буфера). Большой размер пор верхних слоев геля и большой градиент электрического поля (последнее обусловлено низкой ионной силой и градиентом pH) обеспечивают более быстрое движение образца, чем в разделяющем геле, и накопление вещества на верхней границе разделяющего геля. В последнем геле в зависимости от подвижности образуются различные зоны. Затем гель из трубки удаляют и идентифицируют зоны белков. Следует помнить, что чем больше белков в исследуемом образце, тем больше необходимо наносить белка. На прак-

тике при исследовании мембранных белков навеска образца составляет в среднем 100 мкг – 1,0 мг.

3. Электрофорез с достижением изоэлектрической точки. Градиент pH используется не только в диск-электрофорезе, но и при электрофорезе с достижением изоэлектрической точки. (Изоэлектрическая точка – значение pH, при котором амфолит (молекулы, содержащие катионные и анионные группы, например, белок) теряет заряд и в электрическом поле не движется.) Если смесь белков разделять электрофоретически в градиенте pH, то каждый белок будет двигаться до достижения своей изоэлектрической точки. В результате отдельные белки как бы "сфокусированы" в отдельных зонах. Поэтому этот метод еще носит название *изоэлектрической фокусировки*. Он используется не только в аналитических, но и в препаративных целях. Особенно часто он применяется на первых этапах очистки белков, так как позволяет быстро и с высоким разрешением фракционировать довольно большие (граммы) количества образца.

8.8. Спектроскопия в видимой и ультрафиолетовой областях спектра

Современные представления о структуре и функциях биологических мембран были сформулированы благодаря широкому применению ряда физических методов исследования. Большинство этих методов вначале было использовано для изучения различных изолированных компонентов биомембран, а также для контроля очистки субклеточных фракций. В последние годы физические методы, главным образом некоторые виды спектроскопии, с успехом применяются в работах, направленных на изучение структурной организации мембран и выяснение механизмов функционирования этих систем.

Исходя из того, что различные вещества могут поглощать и испускать свет, вращать и поглощать плоскополяризованный свет, поглощать и отражать рентгеновские лучи, а также исходя из явлений ядерного и электронного магнитного резонансов (ЯМР и ЭПР), использование оптических методов дает возможность изучать структурную и функциональную

организацию мембран и их компонентов. С помощью этих методов можно идентифицировать вещество и определить его концентрацию, параметры и ориентацию макромолекул, а также конформационные перестройки в них, локализацию отдельных аминокислот в молекуле белка, комплексообразование, денатурацию, свойства активного центра фермента и роль, например, кофактора в связывании субстрата ферментом, взаимодействие макромолекулы с растворителем, межмолекулярные расстояния и коэффициент вращательной диффузии макромолекул и др.

Спектры поглощения в видимой и ультрафиолетовой областях спектра. Как известно, свет представляет собой электромагнитную волну, состоящую из взаимно перпендикулярно осциллирующих (по синусоиде) электрического (E) и магнитного (H) полей. При поглощении кванта света с энергией

$$E = h\nu,$$

где h – постоянная Планка, ν – частота электромагнитных колебаний, молекула переходит в возбужденное состояние. Такие молекулы или их части называются *хромофорами*.

Наибольшая вероятность поглощения энергии наблюдается тогда, когда количество поглощенной энергии соответствует разности энергий различных энергетических уровней электронов. Зависимость величины поглощенной энергии от длины волны называется *спектром поглощения*.

Для большинства биологических молекул длины волн, соответствующие энергии перехода между основным состоянием молекулы и колебательными уровнями возбужденного состояния, лежат в ультрафиолетовой и видимой частях спектра. А поглощение поглощения излучения инфракрасной области, как правило, приводит только к переходам лишь между колебательными уровнями одного электронного состояния молекулы.

Если мы измеряем *поглощение* образца, концентрация (C) которого выражена в грамм-молях на литр, а путь прохождения света (d) в сантиметрах, то оптическая плотность (D) будет равна

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon d C,$$

где I_0 и I – интенсивность падающего на образец и прошедшего через него света, соответственно; ε – молярный коэффициент экстинкции, или вероятность осуществления электронного типа перехода при данной длине волны.

Интенсивность прошедшего через образец света подчиняется *закону Ламберта-Бера*

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon d C}.$$

На рисунке 108 представлена схема простейшей установки для измерения поглощения.

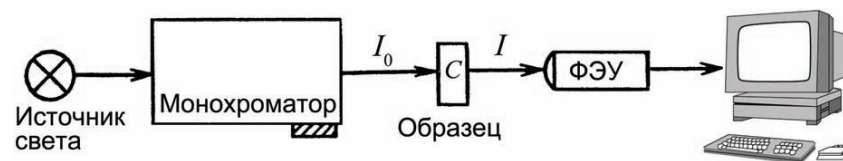


Рисунок 108 – Схема однолучевой установки для измерения поглощения

Под действием электромагнитного излучения в УФ- и видимой областях спектра происходят изменения энергии валентных электронов одинарных и кратных связей (σ - и π -электронов), а также электронов неподеленных электронных пар гетероатомов (n -электроны), входящих в состав образца. Измерение зависимости величины поглощения света от длины волны электромагнитного излучения дает возможность получить спектр поглощения исследуемого образца в ультрафиолетовой (180–400 нм) и видимой (400–600 нм) областях.

Основные компоненты биологических мембран – белки и фосфолипиды – обладают сильным поглощением в УФ-области спектра. Поглощение белков обусловлено двумя основными процессами – переходом с несвязывающей на разрыхляющую орбиталь в пептидных группах, а также переходами со связывающей на разрыхляющую орбиталь в ароматиче-

ских аминокислотах. УФ-спектры липидов наблюдаются из-за поглощения сопряженных диеновых и енольных групп, а также кетонов. Поэтому изменения в спектрах поглощения липидов дают информацию, например, о ходе реакций перекисного окисления липидов. Весьма характерными являются спектры поглощения входящих в состав мембранных структур коферментов, пигментов и некоторых гормонов, многие из которых поглощают как в УФ-, так и в видимой области.

Спектроскопия в видимой области спектра широко используется для изучения процессов генерации разности потенциалов внутри фотосинтетической мембраны. Так, было установлено, что в электрическом поле происходит характерное изменение поглощения некоторых пигментов (в частности, каротиноидов), величина которого пропорциональна напряженности электрического поля. Этот феномен получил название электрохромного эффекта. Благодаря ему оценивают градиент потенциала, возникающего внутри фотосинтетической мембраны при светоиндуцированном разделении зарядов между реакционными центрами и первичными акцепторами электронов.,

Флуоресценция. Молекула, находящаяся в основном энергетическом состоянии, поглощая квант света, может перейти в состояние, характеризующееся более высокой энергией. Установлено, что энергия возбуждения может расходоваться тремя различными путями. Один из них сопровождается процессами внутренней конверсии энергии. При этом молекула не испускает поглощенную ею световую энергию (см. рисунок 100). Может происходить фосфоресценция, когда моменты возбуждения и испускания энергии разделены сравнительно большим временным интервалом (от 10^{-7} с до нескольких часов).

Наконец, одним из путей расходования поглощенной энергии является флуоресценция – высвечивание кванта света с энергией, меньшей энергии поглощенного кванта, а длиной волны фотона, соответственно, большей, чем длина волны возбуждающего света.

Эффективность флуоресценции описывается квантовым выходом – отношением числа квантов флуоресценции к числу квантов поглощаемого света. Уменьшение квантового выхода называется тушением флуоресцен-

ции, которое является следствием безызлучательной потери энергии вследствие столкновения молекул с обменом энергией, миграции энергии по типу резонанса. Все эти факторы зависят (как и при поглощении света) от температуры, pH среды и концентрации флуоресцирующих молекул.

Схема установки, позволяющей регистрировать спектры флуоресценции, представлена на рисунке 109.

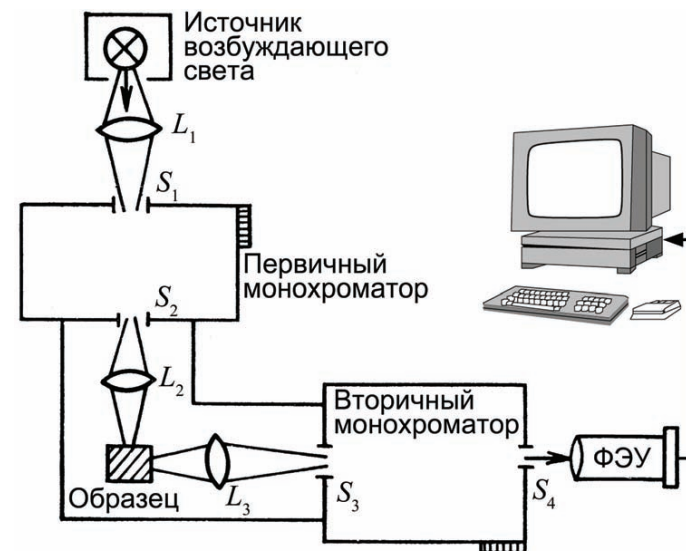


Рисунок 109 – Схема установки для измерения спектров флуоресценции и возбуждения: L – фокусирующие линзы, S – щели монохроматоров

Флуоресценция мембранных систем наблюдается, главным образом, потому, что один из их основных компонентов – белок, как правило, обладает собственной флуоресценцией. Это обусловлено наличием в белковых молекулах ароматических аминокислот – *триптофана*, *тирозина* и *фенилаланина*. Основной вклад во флуоресценцию вносит триптофан. Весьма существенно, что интенсивность флуоресценции триптофана и положение ее максимума зависят от гидрофобности окружения этой аминокислоты и от свойств растворителя.

Изучение спектра флуоресценции мембран показало, что он аналогичен спектру флуоресценции входящих в них белков. Однако в спектрах наблюдаются определенные различия, обусловленные, в частности, взаимодействием белков с липидами, а также конформационными перестройками в системе. Необходимо отметить, что в состав мембранных систем, кроме белков, содержащих ароматические аминокислоты, могут входить также различные компоненты, обладающие собственной флуоресценцией – НАД, флавины, ретинол, филлохиноны (витамины А и К₁), а также хлорофиллы и другие пигменты, участвующие в процессах трансформации энергии в мембранах. Поэтому флуоресцентные методы широко используются для изучения структуры и функций сопрягающих и рецепторных мембран.

Как отмечалось выше, область использования флуоресцентных методов в изучении мембранных систем значительно расширена благодаря применению флуоресцентных меток – соединений, обладающих высоким уровнем собственной флуоресценции и могущих связываться с белками. Используются два основных типа меток, одни из которых ковалентно связываются с белком (например, флуоресцеинизотиоцианат, диазосульфанилат, формилметионилсульфометилфосфат), а другие адсорбируются на нем (арсанилинохлорметоксиакридин, пирен-3-сульфонат). Такие флуоресцентные метки используются для исследования конформационных переходов в белках, а также для изучения транспорта веществ через мембраны.

Так, изучая флуоресценцию некоторых меток, зависящую от pH среды (умбеллиферон, ретинол), можно определить некоторые параметры процессов переноса зарядов через фотосинтетические, митохондриальные и бактериальные мембраны. Было также установлено, что изменения флуоресценции 1-анилинонафталин-8-сульфоната (АНС, рисунок 101, введенного, например, в суспензию митохондрий, связаны с потенциалом, возникающим на их сопрягающих мембранах. Измерения флуоресценции АНС дают информацию об образовании трансмембранных электрических полей в различных системах, моделирующих биологические мембраны и протекающие в них процессы. Если направление электрического поля на мембране таково, что матрикс митохондрий, люмен субмитохондриаль-

ных частиц или липосом заряжен негативно, то флуоресценция АНС уменьшается. Перезарядка мембраны приводит к увеличению флуоресценции АНС. Эти изменения обусловлены перераспределением ионов АНС⁻ между внутренним пространством частиц и омывающим их электролитом.

Значительный вклад во флуоресценцию белков вносит триптофан, который, как и другие хромофоры, имеет строго определенный максимум спектра флуоресценции с длиной волны $\lambda_{\max}$. Последняя смещается при изменении полярности раствора. Если замечено, что $\lambda_{\max}$ смещена (относительно $\lambda_{\max}$ свободной аминокислоты в воде) в сторону более коротких длин волн без изменения полярности окружающего белок раствора, это свидетельствует, что триптофан (а также соседние остатки аминокислот) находится в неполярном окружении или переходит в него в результате конформационных изменений молекулы белка. Вывод о конформационных перестройках молекулы белка делается и тогда, когда квантовый выход флуоресценции падает под влиянием вещества, не являющегося тушителем последней. Действие веществ-тушителей флуоресценции также дает картину локализации триптофана. Если, например, Cs⁺ не тушит флуоресценцию, то делается вывод, что триптофан находится либо внутри молекулы, либо в области, имеющей достаточный для отталкивания иона цезия положительный заряд. Такая двусмысленность вывода устраняется при использовании нейтрального тушителя флуоресценции, например, акрил амида.

Структура белковой молекулы изменяется с повышением температуры, при этом квантовый выход флуоресценции уменьшается. Это означает, что остаток триптофана (как и других хромофоров) мембранного белка находится в полярном окружении, так как в неполярном окружении квантовый выход при повышении T изменяется незначительно. Что же касается увеличения квантового выхода флуоресценции при повышении температуры среды, то это результат разворачивания молекулы белка (увеличение числа остатков триптофана, доступных полярному растворителю). По тушению флуоресценции хромофоров можно также исследовать процессы связывания молекулы белка с другими молекулами и т. п.

Меньшую, но все же ценную, информацию удастся получить при анализе спектров поглощения структурных компонентов мембран.

Ввиду того, что большинство веществ имеют характерные спектры поглощения, их можно идентифицировать и определить концентрацию с помощью адсорбционной спектроскопии. Контролируя поглощение веществ при повышении температуры, можно наблюдать переход спираль – клубок. Это объясняется тем, что по мере уменьшения полярности окружения хромофоров $\lambda_{\max}$ и ϵ возрастают. Эти же параметры возрастают, когда титруемые группы аминокислотных остатков белка заряжены. Следует учитывать, что мембранные белки являются труднорастворимыми в полярных растворителях. Это важно при использовании метода пертурбации растворителем – определение спектров поглощения белка в полярном и неполярном растворителях. Обычно используют растворители-пертурбанты, состоящие из 80 % воды и 20 % вещества с пониженной полярностью.

При взаимодействии белковой молекулы с молекулами других веществ следует иметь в виду возможность перекрытия спектра поглощения последних со спектром флуоресценции хромофора. Если расстояние между ними невелико, произойдет тушение флуоресценции, что свидетельствует о локализации хромофора в области связывания. Связывание белковых молекул между собой также приводит к изменению спектров поглощения. Это может быть следствием попадания хромофоров в участки связывания либо следствием конформационных перестроек, в результате которых доступность хромофора изменилась. Часто по спектрам поглощения судят о химических реакциях и их кинетических характеристиках.

Хемилюминесценция. Способность живых организмов излучать свет известна с прошлого столетия. Однако в исследовании структуры и функции мембран эти явления используются не так широко, как другие оптические методы.

Хемилюминесценция – это свечение в видимой и ультрафиолетовой областях спектра в результате определенных экзотермических реакций. Эти реакции в первую очередь принадлежат к процессам окисления мно-

гих органических веществ – аминокислот, углеводов, спиртов и др. В настоящее время хемилюминесценцию начали использовать не только для качественного, но и для количественного анализа структурных компонентов мембран и веществ, подверженных трансмембранному движению.

8.9. Рентгеноструктурный анализ

Кристаллические тела, у которых межатомные расстояния соизмеримы с длиной волны рентгеновского излучения, т. е. составляют $\sim 0,1$ нм, являются для этих лучей трехмерной дифракционной решеткой. Поэтому при прохождении излучения через кристаллический объект рентгеновские лучи образуют интерференционную картину, которая может быть зафиксирована детектором. Характер этой картины определяется размерами элементарных ячеек кристалла, их упорядоченностью и распределением электронной плотности в ячейках.

В основе дифракционных методов лежит явление интерференции волн отраженных от структур расположенных периодически в пространстве. Кристаллы, являясь трехмерными пространственными образованиями с постоянной решетки порядка 10^{-10} м, могут быть использованы для наблюдения дифракции рентгеновского излучения ($\lambda \approx 10^{-12} \div 10^{-8}$ м).

Представим кристалл в виде параллельных кристаллографических плоскостей, отстоящих друг от друга на расстоянии d (рисунок 110).

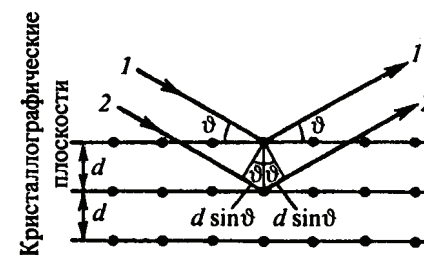


Рисунок 110 – Дифракция на кристаллической решетке

Пучок параллельных монохроматических лучей (1 и 2) падает под углом скольжения θ (угол между направлением падающих лучей и

кристаллографической плоскостью) и возбуждает атомы кристаллической решетки, которые становятся источниками когерентных вторичных волн (1' и 2''), интерферирующих между собой.

Максимумы интенсивности будут наблюдаться в тех направлениях, в которых все отраженные атомными плоскостями волны будут находиться в одинаковой фазе (формула Вульфа–Брэггов)

$$2d \sin \vartheta = m\lambda \quad (m=1,2,3,\dots).$$

Эта формула используется в рентгеноструктурном анализе (РСА) – если известна длина волны λ рентгеновского излучения, то, наблюдая дифракцию на кристаллической структуре неизвестного строения и измеряя ϑ и m , можно найти d , т.е. определить структуру вещества. Она также используется в рентгеновской спектроскопии – если известно расстояние d , то измеряя ϑ и m , можно найти длину волны λ падающего рентгеновского излучения.

Определение структуры биомолекул, хотя и имеет большую историю, все еще является дорогостоящей процедурой в смысле необходимых инструментальных и человеческих ресурсов. Метод РСА дает наиболее детальную информацию об атомной структуре молекул. Сначала из раствора, содержащего исследуемую молекулу, выращивается кристалл. Затем этот кристалл облучают рентгеновским пучком.

Установка для исследования биологических образцов методом РСА представлена на рисунке 111.

В данной установке кристалл охлаждается струей азота через сопло криогенной системы. Охлаждение кристалла снижает деградацию кристалла из-за воздействия рентгеновских лучей, но оно же и слегка изменяет межмолекулярные расстояния. Дифракционную картину (рисунок 112(б)) регистрирует детектор. Дифракционная картина, которая представляет собой сложное, но специфическое для каждого образца распределение пятен, после компьютерной обработки превращается в диаграмму распределения электронной плотности (рисунок 112(в)), которая отражает пространственное положение и форму компонентов молекулы. На рисунке 112(в) представлена часть такой диаграммы кристалла молекулы ДНК.

Области внутри контуров имеют повышенную электронную плотность. На диаграмме видно $C \equiv G$ пару и ион кальция, окруженный молекулами воды.

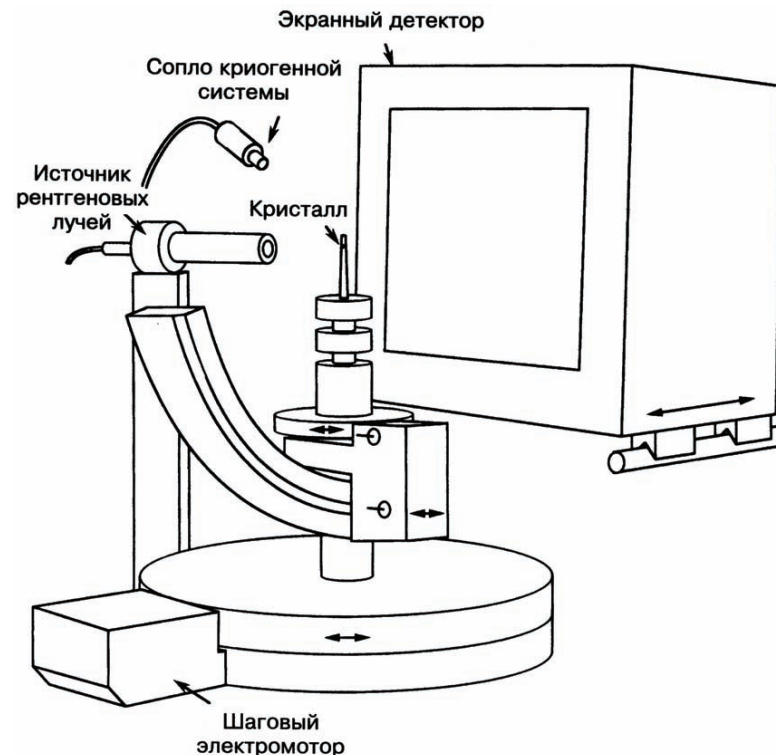


Рисунок 111 – Дифракция на кристаллической решетке

Оборудование, которое необходимо для выращивания кристаллов, источник рентгеновских лучей и суперкомпьютеры для обработки полученных рентгенограмм, как правило, сосредоточены в специализированных международных центрах, имеющих достаточный бюджет для проведения таких исследований. В результате кристаллографического анализа исследователи получают *трехмерную "карту"* распределения электронной плотности в молекуле. Разрешение такой карты – расстояние

между точками, на котором изменение электронной плотности может быть замечено – определяется качеством выращенного кристалла. *Самые лучшие кристаллы* из биомолекул обеспечивают данные с очень высоким разрешением и особенности молекулярной структуры, отстоящие друг от друга на 0,1 нм (1 Ангстрем, 1 Å) могут быть легко распознаны на таких картах.

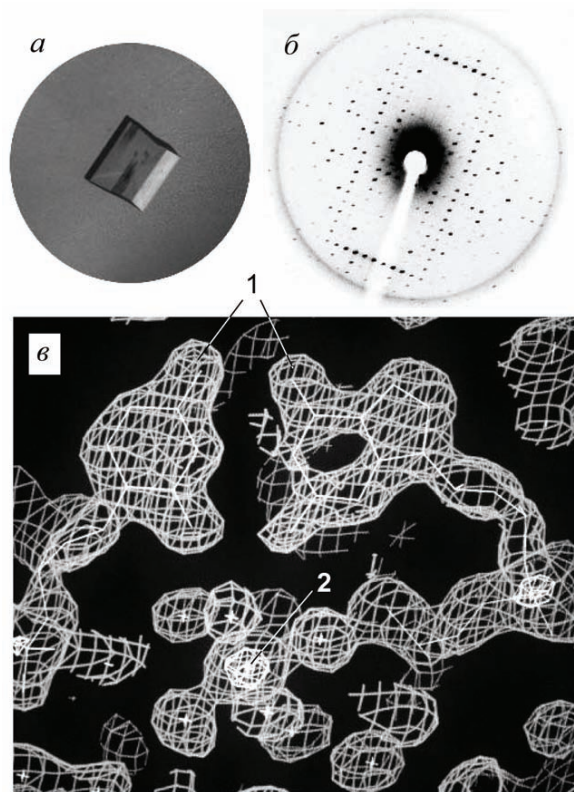


Рисунок 112 – Рентгеновская кристаллография: *a* – кристалл из биомолекул, *б* – рассеяние пучка рентгеновских лучей, *в* – распределение плотности, восстановленное компьютером. 1 – цитозин-гуаниновая пара оснований в ДНК; 2 – ион кальция

Обычно белки исследуются с худшим разрешением в диапазоне 1,5–3,0 Å. При разрешении 1,5 Å легко различимы отдельные атомы,

однако при разрешении 3,0 Å, уже надо предварительно знать структуру ковалентных связей, чтобы расшифровать такую карту. Трехмерная схема распределения электронной плотности затем интерпретируется в терминах атомной структуры. Данные, полученные с высоким разрешением, достаточно легко интерпретируются и могут быть уверенно использованы. Если же разрешение было 3,0 Å и ниже, то следует осторожно делать выводы об атомной структуре молекулы. Подвижные звенья молекулярной цепи и участки на поверхности могут быть не разрешены на карте электронной плотности, поэтому атомная интерпретация может не быть однозначной и достоверной.

Так называемые *B-факторы* (температурные факторы) представляют собой количественный параметр – *степень разупорядоченности* в данной точке молекулы, – отражающий точность определения позиции того или иного атома. Моделируемые атомы обычно представляются как гауссово распределение вокруг центра атома. B-фактор пропорционален ширине такого распределения. Атомы с четко определенными позициями имеют B-факторы около 10. Если же величина B-фактора 30 и более, то это означает сильное разупорядочение и трактовка атомной структуры должна проводиться особо аккуратно.

Главным недостатком метода PCA является необходимость выращивания кристалла. Однако молекулы в кристалле могут не соответствовать точно свободным молекулам в растворе, точнее молекулы в кристалле соответствуют какой-либо *одной*, замороженной, *конформации* свободной молекулы. Для большинства растворимых белков, к счастью, эти различия незначительны. Однако, функциональные особенности, связанные с подвижностью компонентов биомолекулы, должны исследоваться на большом числе кристаллов, выращенных в различных условиях.

Метод PCA используется для установления пространственной структуры искусственных и биологических мембран, позволяет определить их толщину, а также распределение белков и липидов в системе. Методом PCA была измерена толщина белкового и липидного слоев, установлено несимметричное распределение некоторых липидов в двух фосфолипидных слоях, образующих бислойную структуру. Очень ценную информацию дает этот метод при изучении влияния ряда факторов

(температуры, природы растворителя) на конформацию пептидных и углеводородных цепей в мембране.

Однако РСА может использоваться только для исследования крупных монокристаллов или совокупности мелких кристаллов (кристаллитов), что существенно сужает область применения этого метода.

8.10. Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм

Методы дисперсии оптического вращения (ДОВ) и кругового дихроизма (КД) представляют собой два различных способа изучения одного и того же явления – взаимодействия монохроматического линейно поляризованного света с оптически активными молекулами.

При использовании метода ДОВ изучается зависимость величины угла поворота плоскости поляризации световой волны поляризованного излучения в диапазоне от 180 до 240 нм.

В основе метода КД лежит различная способность оптически активных молекул поглощать право- и левополяризованный свет. Зависимость параметра эллиптичности (пропорционального разности между поглощением образцом право- и левополяризованного света) от длины волны называется спектром КД. Его, как правило, также получают в диапазоне длин волн от 180 до 240 нм.

На рисунке 113 приведена схема спектрополяриметра типа Jasco, который используют для измерения КД различных биообъектов. Луч света от источника 2 формируется сферическим зеркалом 3 на входную щель 4. Часть оптической системы от входной щели 4 до промежуточной щели 8 представляет собой первый монохроматор, другая часть оптической системы от щели 8 до выходной щели 13 – второй монохроматор.

Первый и второй монохроматоры идентичны и совместно образуют двойной монохроматор с целью уменьшения интенсивности рассеянного света, который может приводить к различным артефактам при измерении вращения плоскости поляризации в области сильного поглощения света в оптически активном веществе. С помощью системы сферических зеркал луч света попадает на кристаллические призмы 6 (с горизонтальной осью) и 10 (с вертикальной осью). В результате, проходя призмы монохромато-

ров, луч света становится монохроматическим и линейно поляризованным в горизонтальной плоскости. Пьезомодулятор переменного напряжения 16 преобразует линейно поляризованный свет в эллиптически поляризованный с заданной частотой модуляции.

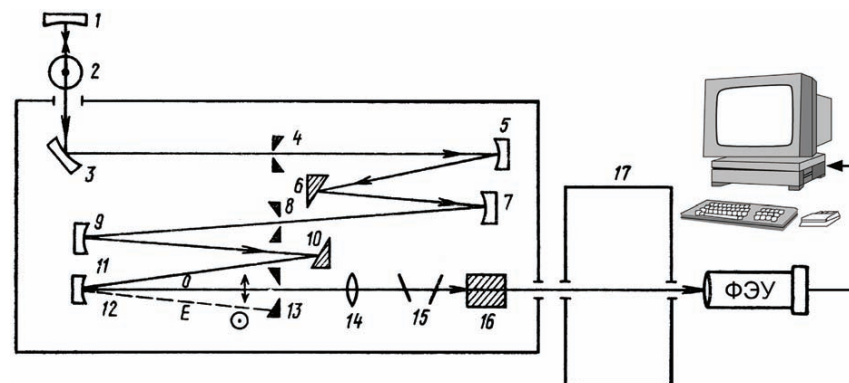


Рисунок 113 – Схема спектрополяриметра для измерения КД: 1,3,5,7,11 – сферические зеркала; 2 – источник света; 4 – входная щель; 6 – первая призма; 8 – промежуточная щель; 10 – вторая призма; 12 – обыкновенный (O) и необыкновенный (E) лучи; 13 – выходная щель; 14 – фокусирующая линза; 15 – фильтр; 16 – пьезомодулятор; 17 – камера с объектом

В большинстве молекул биополимеров, например, в белках и нуклеиновых кислотах, а также в ряде кофакторов и пигментов содержатся оптически активные центры. Поэтому спектры ДОВ и КД дают важную информацию о пространственной ориентации и взаимодействиях различных компонентов биомембран. Так, методы ДОВ и КД позволяют оценить долю α -спиральных и других участков полипептидных цепей в белковых молекулах, находящихся в растворе или введенных в мембранную структуру.

Однако следует учитывать, что при интерпретации результатов, полученных методами ДОВ и КД на мембранных системах, возникают определенные трудности, которые обусловлены, в частности, некоторой гетерогенностью мембранных суспензий.

8.11. Инфракрасная спектроскопия

При поглощении света с длинами волн от 1000 до 10000 нм происходят переходы между колебательными уровнями основного состояния молекул исследуемого вещества. Каждый колебательный уровень обусловлен различными движениями функциональных групп, входящих в состав молекулы. Эти движения представляют собой растягивания химических связей, изменения величин углов между ними и более сложные типы внутримолекулярных перестроек. Изучение зависимости величины поглощения от длины волны инфракрасного света (ИК-спектр) различных объектов с известной химической структурой позволило отнести ряд полос в спектре к определенным функциональным группам – амидной, карбонильной и т. д. В частности, полосы поглощения, которые определяются колебаниями амидных групп, позволяют получить данные о наличии в белках α -спиральных участков и складчатых β -структур, а также об изменениях конформации белка в мембранах в различных условиях.

Схема ИК-спектрометра представлена на рисунке 114.

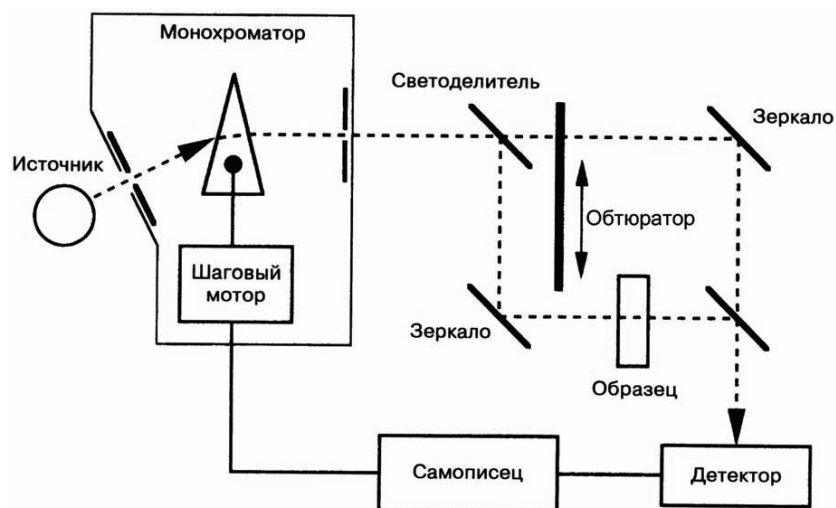


Рисунок 114 – Схема ИК-спектрометра

Излучение от источника, например, от теплового, работающего при 1000°C, проходит через монохроматор, который сканирует длину волны возбуждающего света. Монохроматический луч расщепляется на два, один из которых направляется на образец. В каждый момент времени оптический затвор (обтюратор) преграждает путь одному из этих лучей. Интенсивности обоих лучей попеременно регистрируются ИК-детектором, например, пирозлектрическим, и сравниваются. Оптическая плотность образца вычисляется как логарифм отношения двух измеренных интенсивностей.

К сожалению, в инфракрасной области спектра сильно поглощает вода. Это маскирует характерные полосы поглощения большинства групп биополимеров. Поэтому из образцов обычно удаляют воду и изучают поглощение высушенных пленок. Иногда вместо обычной воды используют тяжелую воду, которая наиболее интенсивно поглощает в иной области спектра, или растворяют образцы в органических растворителях.

При интерпретации результатов, полученных методом ИК-спектроскопии, следует учитывать, что удаление воды или ее замена органическим растворителем может существенно повлиять на конформацию белково-липидных комплексов в мембране, структура которой в значительной мере определяется физико-химическими свойствами воды.

8.12. Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса

Входящие в состав атомов электроны обладают спином, или, иначе говоря, собственным магнитным моментом. Как правило, на атомных орбитах находятся только спаренные электроны с антипараллельными спинами, и общий магнитный момент таких электронных пар равен нулю. Однако если в образце имеются неспаренные электроны, то во внешнем магнитном поле они будут ориентироваться параллельно или антипараллельно ему в зависимости от собственного спина. Переориентация спина неспаренного электрона сопровождается поглощением микроволнового излучения в области длин волн ~ 1 см. Это явление получило название электронный парамагнитный резонанс (ЭПР). Измеряя величину поглощения электромагнитного излучения с определенной длиной волны,

можно определить концентрацию неспаренных электронов в исследуемом образце.

Наличие *спина* у электрона $\left(S = \frac{1}{2}, m_S = \pm \frac{1}{2}\right)$ приводит к тому,

что во внешнем магнитном поле B , вследствие двух возможных ориентаций спина электрона по отношению к этому полю, энергия электрона может принимать одно из двух значений

$$E_{m_S} = 2\mu_B m_S B,$$

где $\mu_B = \frac{e\hbar}{2m_e}$ – магнетон Бора, m_e – масса электрона. Поэтому, при усилении приложенного магнитного поля энергия электронов со спином $m_S = +\frac{1}{2}$ повышается $E_{+1/2} = \mu_B B$, а энергия электронов со спином $m_S = -\frac{1}{2}$ понижается $E_{-1/2} = -\mu_B B$, причем разность энергий этих двух спиновых состояний будет равна

$$\Delta E = E_{+1/2} - E_{-1/2} = 2\mu_B B.$$

Если облучать образец полем с частотой ν , то при достижении магнитным полем такой величины, что

$$h\nu = 2\mu_B B$$

резко возрастает поглощение – наблюдается *электронный парамагнитный резонанс* системы двух уровней с окружающим излучением (рисунок 115).

Парамагнитным резонанс называется потому, что он возможен только для системы с неспаренными спинами ($m_S \neq 0$), т. е. для парамагнитных веществ.

В действительности, вследствие взаимодействия спина электрона с локальным магнитным полем, создаваемым ядрами и электронами

молекулы, коэффициент в формуле отличается от 2, его называют *g-фактор*, условие резонанса записывают

$$h\nu = g\mu_B B.$$

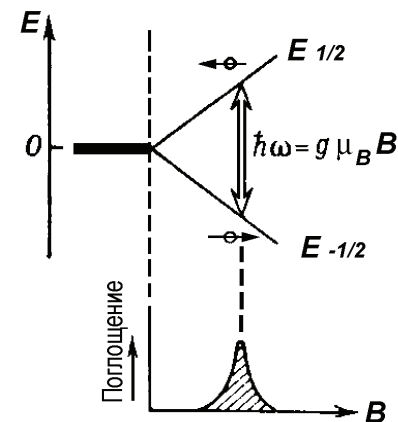


Рисунок 115 – Схема энергетического сдвига уровней в магнитном поле и формирования линии в спектре ЭПР

Например, g -факторы равны: 2,00226 для атома водорода, 1,999 для NO_2 , 2,01 для CO_2 . Измерение g -фактора используют для идентификации частиц, находящихся в резонаторе.

Для атомов и молекул со спином $m_S > \frac{1}{2}$ во внешнем магнитном поле возникает не два, а $2m_S + 1$ уровней, отличающихся значением спинового магнитного числа, и соответственно в спектре ЭПР не одна, а несколько близлежащих полос – так называемая *тонкая структура* спектра ЭПР, связанная с мультиплетностью уровня.

Если к тому же ядерный спин I отличен от нуля, то у ядра существует *собственное магнитное поле*, в котором каждая линия тонкой структуры спектра ЭПР расщепляется на $2I + 1$ компонент – *сверхтонкая структура спектра* (рисунок 116).

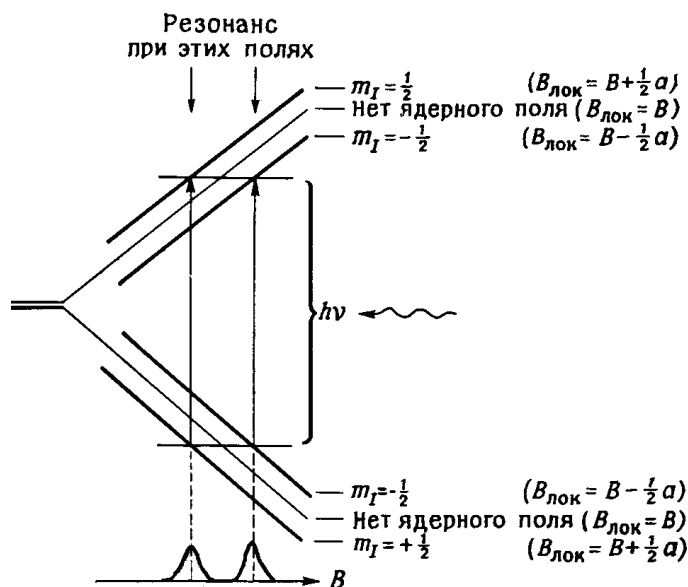


Рисунок 116 – Схема энергетического сдвига уровней в магнитном поле и формирования линии в спектре ЭПР

Так, например, для одного протона со спином $I = \frac{1}{2}$, $m_I = \pm \frac{1}{2}$, общее *локальное магнитное поле*, в котором находится электрон

$$B_{\text{лок}} = B + am_I,$$

где a – некоторая константа, называемая *константой сверхтонкого взаимодействия*. Поэтому условия резонанса будут иметь вид

$$h\nu = 2\mu_B \left(B + \frac{1}{2}a \right)$$

и

$$h\nu = 2\mu_B \left(B - \frac{1}{2}a \right),$$

и вместо одной линии в спектре будут наблюдаться две линии, находящиеся друг от друга на расстоянии a по магнитному полю.

Из спектра ЭПР и особенностей его тонкой и сверхтонкой структуры можно получить важные сведения об электронной конфигурации атомов и ионов, о свойствах атомных ядер.

Метод ЭПР – один из наиболее чувствительных методов обнаружения и идентификации *свободных радикалов*, установления их электронной конфигурации и геометрии. Метод ЭПР применяется для исследования комплексных соединений, в частности, соединений переходных и редкоземельных металлов. При этом величина g -фактора и его зависимость от направления определяются силой и симметрией поля, создаваемого лигандами.

Сверхтонкое расщепление в спектре позволяет определить заселенность s - и p -орбиталей атома с магнитным ядром в радикале, а отсюда – электронное распределение и в известных случаях – валентные углы в молекулах, т. е. построить *карту молекулярных орбиталей*, которые занимает неспаренный электрон.

Метод ЭПР был с успехом использован для изучения динамики светопроиндуцированных процессов образования неспаренных электронов (свободных радикалов) в молекулах пигментов, локализованных в мембранах хлоропластов. При этом был установлен многостадийный механизм первичных стадий трансформации энергии света в фотосинтетических мембранах.

ЭПР-спектроскопия широко применяется для исследования объектов, в которых практически нет собственных неспаренных электронов.

Спектром ЭПР называется зависимость мощности поглощения P электромагнитной волны от величины магнитной индукции B . Спектры ЭПР тем шире, чем сильнее взаимодействие между атомами и молекулами образца. И наоборот, чем слабее взаимодействие между частицами (больше подвижность молекул), тем спектры ЭПР уже. Следовательно, по ширине спектров ЭПР можно судить о подвижности молекул вещества.

Поскольку молекулы фосфолипидов диамагнитны, для исследования биомембран методом электронного парамагнитного резонанса используются *спиновые зонды* и *спиновые метки* – молекулы или молекулярные группы с неспаренными электронами, которые содержат

неспаренные электроны. В молекулах меток содержится атом азота с неспаренным электроном на $2p\pi$ -орбитали.

Формула одного из таких соединений, часто используемого при исследовании мембран, представлена на рисунке 117.

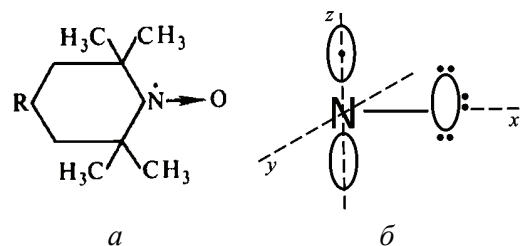


Рисунок 117 – Спиновые зонды: *a* – формула спинового зонда ТЕМПО (2,2,6,6-тетрамилпиперидин-1-оксин); *б* – схема электронного строения парамагнитного фрагмента нитроксильного радикала

Методом ЭПР было показано, что микровязкость биомембраны у концов липидных хвостов меньше, чем около полярных головок. Спиновые метки присоединялись к разным местам фосфолипидной молекулы (рисунок 118).

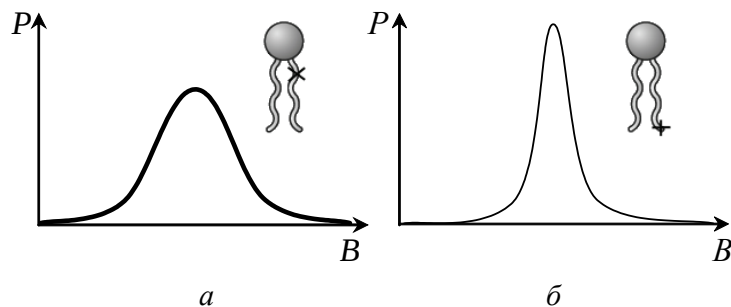


Рисунок 118 – Два способа прикрепления спиновой метки к фосфолипидной молекуле и различие спектров ЭПР для этих двух случаев (схематичное изображение)

Как показано на рисунке 118(б), положению спиновой метки на конце жирнокислотного хвоста липидов соответствует более узкий спектр

ЭПР, а, следовательно, подвижность конца липидного хвоста фосфолипидной молекулы больше, чем в случае, показанном на рисунке 118(а), когда спиновая метка была прикреплена вблизи полярной головки липидной молекулы. Поэтому в середине мембраны упорядоченность во взаимном расположении хвостов фосфолипидных молекул меньше, чем на краях мембраны, и вязкость, соответственно, меньше. Именно высокая подвижность липидных молекул обуславливает латеральную (боковую) диффузию липидов вдоль мембраны.

Изучая спектры ЭПР, полученные в микроволновом диапазоне частот электромагнитных волн, можно судить о переносе меток через мембрану, получать информацию о характере вращения молекул и изучать фазовые переходы в мембранных системах под действием различных факторов. Однако при интерпретации результатов, полученных методом ЭПР-спектроскопии, следует учитывать возможные изменения свойств объекта, которые могут произойти при введении в него метки.

8.13. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

В основе метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР) лежит поглощение электромагнитных волн в радиочастотном диапазоне ядрами, обладающими механическим моментом или спином, а следовательно, магнитным моментом. К их числу относятся ядра, которые имеют четное массовое число и нечетный атомный номер, а также ядра с нечетным массовым числом и четным или нечетным атомным номером.

Под действием электромагнитного излучения с определенной частотой в таких системах могут происходить различные переориентации ядерных спинов, которые сопровождаются поглощением или излучением энергии. В результате изучения зависимости величины поглощения от частоты излучения можно получить спектр ЯМР.

Основные принципы ЯМР такие же, как для ЭПР, а главное отличие состоит в том, что в эксперименте контролируется обращение магнитных моментов ядер. Ядра с четным числом протонов и нейтронов имеют спин $I = 0$ и, следовательно, не магнитны. Каждое ядро со спином $I \neq 0$ обладает магнитным моментом и энергия ядра в магнитном поле равна

$$E_{m_I} = -g_N \mu_N m_I B,$$

где g_N – ядерный g -фактор, $\mu_N = \frac{e\hbar}{2m_p}$ – ядерный магнетон, m_p – масса протона, знак "минус" отражает различие в заряде электрона и протона.

Для протонов $I = \frac{1}{2}$, $m_N = \pm \frac{1}{2}$, $g_N = 2,7927$. Масса протона почти в 2000 раз больше массы электрона, соответственно ядерный магнетон в 2000 раз меньше магнетона Бора, поэтому ядерные моменты почти в 2000 раз слабее, чем электронный момент и ЯМР наблюдается в радиочастотном диапазоне спектра.

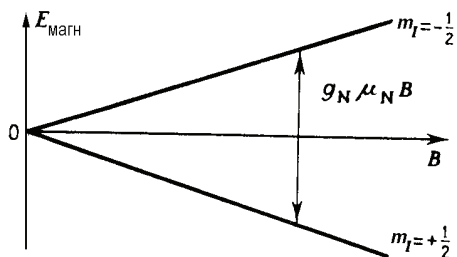


Рисунок 119 – Схема энергетического ЯМР-сдвига уровней в магнитном поле

При наложении слабого радиочастотного поля, перпендикулярного внешнему статическому магнитному, происходит *резонансное поглощение* (рисунок 119), приводящее к переориентации спинов при частоте, определяемой *условием резонанса*

$$h\nu = \frac{1}{2} g_N \mu_N B - \left(-\frac{1}{2} g_N \mu_N B \right) = g_N \mu_N B.$$

Как и в случае ЭПР, резонирующий магнитный момент взаимодействует с *локальным* магнитным полем, которое отличается от приложенного внешнего поля, вследствие влияния магнитных полей, образуемых электронами. В ЯМР локальное поле принято записывать в форме

$$B_{\text{лок}} = (1 - \sigma)B,$$

где σ – *постоянная экранирования* ядра электронами. Дополнительное поле σB называется химическим сдвигом группы протонов. Протоны химически отличающихся групп имеют различное электронное окружение, а, следовательно, и различные постоянные экранирования. Поэтому *условие резонанса*

$$h\nu = g_N \mu_N (1 - \sigma)B$$

выполняется при различных значениях внешнего поля B для протонов в разном химическом окружении.

Величина химического сдвига зависит от электроотрицательности атома, с которым связан протон, а интенсивности резонансных полос протонов для групп CH , CH_2 , CH_3 относятся как 1:2:3, что позволяет использовать метод ЯМР при изучении строения и состава органических соединений. Спектры ЯМР на ядрах P^{31} и F^{19} используются при исследованиях структуры биомолекул, кофакторов и простетических групп.

Спектры ЯМР дают информацию о структуре биополимеров, взаимодействиях между молекулами и молекулярном движении. Метод ЯМР позволяет установить расположение отдельных атомов в небольших молекулах с молекулярной массой до 500, а иногда и до 1000 Да. Использование ЯМР-спектроскопии позволяет также получать информацию о подвижности белков и липидов в мембранных системах.

8.14. Калориметрия и дилатометрия

Эти методы дают возможность изучать структурные изменения в мембранах. В калориметрических экспериментах исследуемый объект, как правило, нагревают, а затем регистрируют его температуру по мере самопроизвольного охлаждения. В диапазоне температур, в котором отсутствуют фазовые переходы, температура объекта плавно уменьшается, однако вблизи точки фазового перехода наблюдается резкое изменение теплосодержания системы. По формам кривых, полученных в разных ус-

ловиях, можно сделать определенные заключения о плавлении липидов, фазовых переходах в мембране и о влиянии на них различных факторов.

Результаты, полученные калориметрическими методами, как правило, хорошо дополняются dilatометрическими измерениями. Dilатометр – это прибор, который используется для измерения объема, позволяет сопоставить изменения объема, например, суспензии липосом, с соответствующими изменениями объема чистого растворителя.

8.15. Использование радиоактивных изотопов

При исследовании мембран часто необходимо измерять мембранные компоненты и вещества, проникающие через мембраны или адсорбирующиеся и связывающиеся ими, в количествах 10^{-8} – 10^{-12} М. Для этих целей наиболее пригодными являются методы измерения радиоактивности. Чаще всего используются радиоактивные изотопы, испускающие β - и γ -лучи. Количество атомов такого, вещества в любой период времени равно

$$N = N_0 \exp(-\lambda t),$$

где N и N_0 – число атомов радиоактивного вещества в момент времени t и при $t = 0$, соответственно; λ – постоянная распада.

Измерение β -активности проводится различными приборами, построенными на основе ионизации газа или явления флуоресценции. В первом случае β -частица ионизирует один (или несколько) атомов газа (гелий, неон, аргон), ионы движутся к катоду и аноду, что и регистрируется в виде импульса тока. Такие приборы весьма надежны, однако эффективность измерения радиоактивности у них ограничена. Причина этого – не все β -частицы обладают энергией, достаточной для ионизации (возбуждение атомов газа не приводит к появлению импульса тока или заряда). Кроме того, образец в таких приборах всегда остается за пределами детектора и не все излучаемые β -частицы регистрируются.

Последнюю причину можно преодолеть путем помещения образца внутрь детектора β -частиц. Образец растворяется, например, в толуоле с

небольшим количеством флуоресцирующего красителя. Излучаемая образцом β -частица, взаимодействуя с молекулами толуола, переводит их в возбужденное состояние. Возбужденная молекула растворителя флуоресцирует (см. рисунок 100), фотоны поглощаются молекулами флуоресцента, который, в свою очередь, испускает фотоны большей длины волны, которые регистрируются фотоумножителями. Таким образом, регистрируются все β -частицы, кроме тех, которые поглощаются самим образцом. Этот принцип лежит в основе измерения β -частиц жидкостным сцинтилляционным методом, преимуществом которого является и то, что им можно определить количественное соотношение двух изотопов одного образца. Это можно осуществить и с помощью других типов счетчиков, в том числе для регистрации γ -излучения, если счетчик снабжен анализатором амплитуды импульсов.

Сцинтилляционный детектор применяется и для регистрации γ -лучей. В одном из методов образец помещается внутрь активированного таллием монокристалла йодида натрия. γ -Лучи, выходя из образца, выбивают из атомов монокристалла электроны. Выбитые электроны, в свою очередь, возбуждают близлежащие атомы кристалла, что и является причиной флуоресценции. Как и в предыдущем случае, этим методом по анализу амплитуды электрических импульсов можно одновременно определить два различных изотопа.

При использовании радиоизотопов существенным является приготовление образца. В случае измерения радиоактивности счетчиком Гейгера-Мюллера важным является снижение процента самопоглощения β -частиц, т. е. уменьшение толщины образца. Если используется сцинтилляционный счетчик, образец должен быть полностью растворен. Учитывая то, что в качестве растворителей используются толуол, ксилол, диоксан, мембранные компоненты – липиды, белки и липопротеиды – хорошо растворяются. Хуже обстоит дело с исследованием углеводов и гликопротеинов. Плохая растворимость приводит к образованию агрегатов и, следовательно, к увеличению самопоглощения β -частиц, а также к снижению энергии прошедших через образец. Для уменьшения размеров агрегатов используют поверхностно-активные вещества. В ряде случаев

образец сорбируют на соответствующих фильтрах (стекловолокне, бумаге, нитроцеллюлозе и др.).

С помощью изотопных методов решается много проблем мембранологии: обмен, подвижность компонентов мембран и их самосборка, трансмембранное движение веществ, обменные реакции с участием различных типов мембран клетки, липосомальная терапия и взаимодействие искусственных и биологических мембран, идентификация активных центров мембранно-связанных ферментов, взаимодействие с мембранами гормонов, простагландинов, медиаторов, токсинов, лекарственных и других веществ и т. п. Особое внимание в настоящее время уделяется радиоиммунологическому и иммунорадиометрическому анализам, позволяющим определять малые количества вещества с использованием радиоактивного антигена. Эти методы используются при изучении поверхностей клеток, идентификации бактерий и вирусов, определении отдельных веществ в биологических жидкостях, классификации опухолевых клеток и др.

Авторадиография. Существенным в использовании изотопов в исследовании мембран является авторадиография. Принцип метода заключается в том, что образец, меченный подобранным изотопом, вводится в непосредственный контакт со слоем специальной фотографической эмульсии. Радиоактивные лучи, испускаемые образцом, "засвечивают" фотоплёнку. По интенсивности изображения получают информацию о количественном распределении изотопа или меченого вещества. Авторадиография дает возможность локализовать изотоп или меченое вещество в конкретной мембранной структуре клетки, в определенном ее монослое.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. Какие существуют виды электронной микроскопии?
2. Каким образом производится контрастирование мембран в электронной микроскопии?
3. В чем состоит особенность криоскалывания биологических проб по сравнению с обычным ультрамикротомированием?

4. Какие два режима сканирования применяются в атомно-силовой микроскопии?
5. Как определяют микровязкость мембраны по методу Перрена-Яблонского?
6. Перечислите флуоресцентные зонды, используемые в биомембранологии.
7. Какие виды центрифугирования используются при исследовании биомембран?
8. Охарактеризуйте виды распределительной хроматографии.
9. Какие типы ионообменников используются в ионообменной хроматографии?
10. Какой вид аффинной хроматографии часто используют при исследовании биомембран?
11. Охарактеризуйте три типа электрофореза.
12. Каким образом по спектрам поглощения липидов можно изучать состав биомембран и электрохромный эффект?
13. Вследствие чего спектры флуоресценции биомембран содержат информацию о липид-белковых взаимодействиях?
14. Какие достоинства и недостатки имеет метод рентгеноструктурный анализ?
15. Как используют методы кругового дихроизма и дисперсии оптического вращения при исследовании биомембран?
16. Что такое спиновые метки, и как их используют при исследовании биомембран?
17. Как методом ЭПР определяют микровязкость биомембран?
18. Какую информацию о мембранных компонентах можно получить с помощью метода ЯМР?
19. Какую информацию о мембранных процессах получают с помощью калориметрии и дилатометрии?
20. Как используют при исследовании биомембран радиоизотопы?
21. Какую информацию о мембранных процессах получают с помощью авторадиографии?

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

ОСНОВНАЯ

1. Огурцов А.Н. Введение в биофизику. Физические основы биотехнологии / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2008. – 320 с.
2. Генис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции / Р. Генис. – М. : Мир, 1997. – 624 с.
3. Введение в биомембранологию / Под. ред. А.А.Болдырева. – М. : Изд-во МГУ, 1990. – 208 с.
4. Огурцов А.Н. Механизмы мембранных процессов / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2006. – 139 с.
5. Огурцов А.Н. Молекулярная биология клетки. Основы клеточной организации / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2006. – 169 с.
6. Огурцов А.Н. Молекулярная биоэнергетика клетки / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2009. – 112 с.
7. Огурцов О.М. Молекулярна біофізика ферментів / О.М. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2009. – 192 с.
8. Кагава Ясуо. Биомембраны / Кагава Ясуо. – М. : Высшая школа, 1985. – 303 с.
9. Рыбальченко В.К. Структура и функции мембран / В.К. Рыбальченко, М.М. Коганов. – К. : Выща шк., 1988. – 312 с.
10. Нолтинг Б. Новейшие методы исследования биосистем / Б. Нолтинг. – М. : Техносфера, 2005. – 256 с.
11. Современные методы биофизических исследований / Под. ред. А.Б. Рубина. – М. : Высш. шк., 1988. – 359 с.
12. Arrondo J.L.R. Advanced Techniques in Biophysics / J.L.R. Arrondo, A. Alonso. – Berlin : Springer-Verlag, 2006. – 280 p.
13. Protein Data Bank. – Интернет-ресурс. – <http://www.pdb.org/>
14. Біофізика / За ред. П.Г. Костюка. – К. : Обереги, 2001. – 544 с.

15. Биофизика / Под ред. проф. В.Ф. Антонова. – М. : Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 1999. – 288 с.
16. Волькенштейн М.В. Биофизика / М.В. Волькенштейн. – М. : Наука, 1988. – 592 с.
17. Рубин А.Б. Биофизика / А.Б. Рубин. – М. : Высш. шк., 1999. – Т.1, 440 с. – Т.2, 464с.
18. Маршелл Э. Биофизическая химия / Э. Маршелл. – М. : Мир, 1981. – 806 с.
19. Кольман Я. Наглядная биохимия / Я Кольман, К.Г. Рем. – М. : Мир, 2000. – 469 с.
20. Lodish H. Molecular Cell Biology / H. Lodish, A. Berk, L.S. Zipursky et al. – New York : W.H. Freeman and Company, 2003. – 572 p.
21. Berg J.M. Biochemistry / J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, N.D. Clarke. – New York : W.H. Freeman and Company, 2002. – 572 p.
22. Bolsover S.R. Cell biology. A short course / S.R. Bolsover, J.S. Hyams, E.A. Shephard et al. – Hoboken : Wiley, 2004. – 531 p.
23. Соросовский образовательный журнал. – Интернет-ресурс. – <http://journal.issep.rssi.ru/>
24. Protein Data Bank. – Интернет-ресурс. – <http://www.pdb.org/>
25. Goodsell D.S. Bionanotechnology: Lessons from nature / D.S. Goodsell. – New Jersey : Wiley-Liss Inc., 2004. – 337 p.
26. Мусил Я. Современная биохимия в схемах / Я. Мусил, О.Новикова, К. Кунц. – М. : Мир, 1984. – 215 с.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ

27. Огурцов А.Н. Механизмы ферментативных реакций / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2004. – 75 с.
28. Огурцов А.Н. Молекулярная биология клетки. Основные молекулярные генетические механизмы / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2007. – 120 с.
29. Огурцов А.Н. Молекулярная биология клетки. Молекулярные основы генных технологий / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2008. – 104 с.

30. Огурцов А.Н. Кинетика ферментативных реакций / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2007. – 146 с.
31. Огурцов А.Н. Структурные принципы бионанотехнологии / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2008. – 140 с.
32. Огурцов А.Н. Функциональные принципы бионанотехнологии / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2009. – 146 с.
33. Огурцов А.Н. Введение в молекулярную биотехнологию / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2008. – 152 с.
34. Огурцов А.Н. Молекулярная биотехнология клетки / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2009. – 120 с.
35. Огурцов А.Н. Основы научных исследований / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2008. – 178 с.
36. Leninger A. Principles of Biochemistry / A. Leninger. – New York : Freeman and C°, 2004. – 1120 p.
37. Damjanovich S. Biophysical Aspects of Transmembrane Signaling / S. Damjanovich. – Berlin : Springer-Verlag, 2005. – 321 p.
38. Уильямс В. Физическая химия для биологов / В. Уильямс, Х. Уильямс. – М. : Мир, 1976. – 600 с.
39. Patabhi V. Biophysics / V. Patabhi, N. Gautham. – New York : Kluwer Academic Publishers, 2002. – 253 p.
40. Cotterill R. Biophysics / R. Cotterill. – New York : Wiley, 2002. – 395 p.
41. Glazer G. Biophysics / G. Glazer. – Berlin : Springer, 2001. – 361 p.
42. Kato M. Electromagnetics in Biology / M. Kato. – Tokyo : Springer, 2006. – 324 p.
43. Nölting B. Methods in Modern Biophysics / B. Nölting. – Berlin : Springer-Verlag, 2005. – 257 p.
44. Sneppen K., Giovanni Z. Physics in Molecular Biology / K. Sneppen, Z. Giovanni. – Cambridge : University Press, 2005. – 311 p.
45. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
46. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика / А.Н. Ремизов, А.Г. Максина, А.Я. Потапенко. – М. : Дрофа, 2005. – 558 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Вступление	3
1. Мембранные структуры клетки	4
1.1. Основные компоненты архитектуры клетки	4
1.2. Жидкостно-мозаичная модель строения биомембран	8
1.3. Плазматические мембраны	17
1.4. Эндоплазматический ретикулум	20
1.5. Аппарат Гольджи	21
1.6. Ядро клетки	23
1.7. Лизосомы и зимогенные гранулы	25
2. Липидный состав биомембран. Модельные липидные мембраны	27
2.1. Три класса липидов	27
2.1.1. Фосфолипиды	28
2.1.2. Сфинголипиды	29
2.1.3. Стероиды	30
2.2. Латеральная мобильность мембранных компонентов	31
2.3. Липидный состав мембран	34
2.4. Жидкокристаллическое состояние биомембран	36
2.5. Влияние липидного состава на толщину и кривизну биомембран	42
2.6. Распределение липидов между цитозольной и экзоплазматической сторонами мембраны	43
2.7. Модельные липидные мембраны	46
2.7.1. Мономолекулярные слои	47
2.7.2. Плоские бимолекулярные липидные мембраны	48
2.7.3. Липосомы	50

3. Межмолекулярные взаимодействия в биомембранах	55
3.1. Липидно-протеиновые кластеры в мембранах	55
3.2. Липид-липидные взаимодействия	57
3.3. Липид-белковые взаимодействия	61
3.4. Белок-белковые взаимодействия	63
4. Мембранные белки	65
4.1. Способы взаимодействия белков с мембранами	66
4.2. Строение трансмембранных доменов	68
4.3. Взаимодействие белков с мембраной и цитоскелетом	74
4.4. Липид-связывающие мотивы	79
5. Пассивный трансмембранный транспорт	83
5.1. Виды пассивного транспорта	84
5.2. Пассивная диффузия через мембрану	88
5.3. Диффузия полярных молекул воды через мембрану	91
5.4. Транспорт веществ через мембрану с помощью белков-транспортёров	94
5.5. Облегчённая диффузия	97
5.6. Поры в липидном бислое	102
6. Активный транспорт	115
6.1. АТФ-насосы	116
6.2. Механизм действия Ca^{2+} -АТФазы	119
6.3. Механизм действия $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -АТФазы	123
6.4. Протонные насосы F-класса	124
6.5. Протонные насосы V-класса	132
6.6. АВС-транспортёры	134
7. Внутриклеточный транспорт белков	143
7.1. Три основных механизма белкового транспорта	143
7.2. Перенос белков в ядро и из ядра клетки	146
7.3. Трансмембранная транслокация	151
7.4. Вакуолярный транспорт	154
8. Аналитические методы исследования биомембран	164
8.1. Электронная микроскопия	164
8.2. Атомно-силовая микроскопия	170

8.3. Поляризационная микроскопия	175
8.4. Флуоресцентная микроскопия	184
8.5. Центрифугирование	188
8.6. Хроматография	195
8.6.1. Распределительная хроматография	195
8.6.2. Адсорбционная и ионообменная хроматография	196
8.6.3. Гель-фильтрация	199
8.6.4. Аффинная хроматография	201
8.7. Электрофорез	202
8.8. Спектроскопия в видимой и ультрафиолетовой областях спектра	205
8.9. Рентгеноструктурный анализ	213
8.10. Дисперсия оптического вращения и круговой дихроизм	218
8.11. Инфракрасная спектроскопия	220
8.12. Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса	221
8.13. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса	227
8.14. Калориметрия и дилатометрия	229
8.15. Использование радиоактивных изотопов	230
Список рекомендуемой литературы	234

Навчальне видання

ОГУРЦОВ Олександр Миколайович
МАСАЛІТІНА Наталія Юріївна

**СТРУКТУРА, ФУНКЦІЇ ТА АНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ
ДОСЛІДЖЕННЯ БІОМЕМБРАН**

Навчальний посібник
по курсу «Методи аналізу біологічних систем»

для студентів напряму підготовки 051401 «Біотехнологія»,
в тому числі для іноземних студентів

Російською мовою

Відповідальний за випуск *М.Ф. Клецев*
Роботу до видання рекомендувала *М.Г. Зінченко*
В авторській редакції

План 2010 р., поз. 34 / 8 - 10.

Підп. до друку 18.01.2010 р. Формат 60×84 1/16. Папір офісний. Riso-друк.
Гарнітура Таймс. Ум. друк. арк. 13,9. Наклад 300 прим.
Зам. № 23. Ціна договірна

Видавничий центр НТУ «ХПІ».
Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 3657 від 24.12.2009 р.
61002, Харків, вул. Фрунзе, 21

Друкарня НТУ «ХПІ». 61002, Харків, вул. Фрунзе, 21

Учебное пособие включает основные понятия теории биологических мембран, рассмотрены их функции и свойства, липидный и белковый состав, изложены основные аналитические методы исследования биомембран.

Предназначено для студентов специальностей биотехнологического профиля всех форм обучения.

ISBN 978-966-593-785-2



9 789665 937852

Друкарня НТУ «ХПІ»