

**С.Н. Черенкевич,
Г.Г. Мартинович,
А.И. Хмельницкий**

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

**Рекомендовано
учебно-методическим объединением
высших учебных заведений
Республики Беларусь
по естественнонаучному образованию
в качестве пособия
для студентов высших учебных заведений
физических, биологических, биохимических,
биотехнологических специальностей**

**МИНСК
БГУ
2009**

УДК 577.35
ББК 28.05я73
Ч-46

Р е ц е н з е н т ы:
академик НАН Беларуси, доктор биологических наук,
профессор И. Д. Волотовский;
доктор физико-математических наук,
профессор В. В. Могильный

Черенкевич, С. Н.

Биологические мембраны : учеб. пособие для студентов физ., биол., биохим., биотехн. специальностей / С. Н. Черенкевич, Г. Г. Мартинович, А. И. Хмельницкий. – Минск : БГУ, 2009. – 184 с. : ил.
ISBN 978-985-518-151-5.

В пособии приведены современные представления о строении и функционировании биологических мембран. Детально рассмотрены физико-химические свойства липидов, структура и свойства мембранных белков и углеводного компонента мембран. Описаны механизмы рецепции и передачи информации с участием биологических мембран, механизмы транспорта веществ через биологические мембраны. Рассмотрены механизмы функционирования мембран митохондрий, аппарата Гольджи, ядра и эндоплазматического ретикулума.

Для студентов физических, биологических, биохимических, биотехнологических специальностей.

УДК 577.352.3(075.8)
ББК 28.05я73

ISBN 978-985-518-151-5

© Черенкевич С. Н.,
Мартинович Г. Г.,
Хмельницкий А. И., 2009
© БГУ, 2009

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ЛИПИДНЫЙ КОМПОНЕНТ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН	7
1.1. Классификация липидов	7
1.1.1. Простые липиды	8
1.1.2. Сложные липиды	10
1.1.3. Предшественники и производные липидов	12
1.2. Физико-химические свойства липидов	16
1.3. Ассоциаты липидных молекул	18
1.4. Термодинамика формирования и свойства липидных ассоциатов	21
1.4.1. Монослой мембранных фосфолипидов	22
1.4.2. Мицеллообразование	25
1.4.3. Липидный бислой	28
Глава 2. БЕЛКОВЫЙ КОМПОНЕНТ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН	35
2.1. Общая характеристика мембранных белков	35
2.1.1. Функции белков в мембранах	35
2.1.2. Классы мембранных белков	35
2.1.3. Геометрия расположения белковых молекул в бислой	38
2.1.4. Содержание белков в мембранах	39
2.2. Структура и свойства интегральных и периферических мембранных белков	39
2.2.1. Структура и свойства α -спиральных интегральных белков	42
2.2.2. Структура и свойства интегральных белков, содержащих β -нити	46
2.2.3. Периферические мембранные белки	47
2.3. Липид-заякоренные мембранные белки	50
2.3.1. Цитозольные липид-заякоренные белки	52
2.3.2. Эктоплазматические липид-заякоренные белки	54
2.4. Углеводы биологических мембран	55
Глава 3. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН	60
3.1. Липидная асимметрия клеточных мембран	60
3.2. Геометрические формы клеточных мембран	63
3.2.1. Мембранная кривизна	64
3.3. Гидрофобное соответствие между липидами и белками в бислой	68
3.4. Биологические мембраны как мягкие интерфейсы	70
3.5. Структура биологических мембран	73
3.5.1. Развитие представлений о структуре биологических мембран	73
3.5.2. Жидко-мозаичная доменно-рафтовая модель биологической мембраны	75
3.5.3. Динамическая твердо-каркасная жидко-мозаичная модель биологических мембран	78
Глава 4. РЕЦЕПТОРНЫЕ И СИГНАЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН	82
4.1. Роль биологических мембран в процессах рецепции и обработки информации	82
4.2. Рецепторы биологических мембран	83
4.3. Лиганд-рецепторное взаимодействие	87
4.4. Трансдукция сигналов через мембраны с участием G-белков	91
4.5. Трансдукция сигналов через мембраны с участием ионных каналов	97

4.6. Рецепторы с тирозинкиназной активностью.....	98
4.7. Трансмембранная передача сигнала при контактном взаимодействии ...	102
Глава 5. ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИЕ	
МЕМБРАНЫ	104
5.1. Классификация видов транспорта веществ через мембраны	104
5.2. Диффузия веществ через мембрану	108
5.2.1. Диффузия веществ в растворе.....	108
5.2.2. Диффузия вещества через мембрану	110
5.3. Облегченный транспорт веществ через мембраны	111
5.3.1. Облегченная диффузия	111
5.3.2. Переносчики глюкозы.....	112
5.4. Активный транспорт	115
5.4.1. Первичный активный транспорт.....	116
5.4.2. Вторичный активный транспорт.....	123
5.5. Электродиффузия. Ионные каналы	124
5.5.1. Электродиффузия веществ через мембраны.....	124
5.5.2. Классификация и структура ионных каналов.....	125
5.5.3. Потенциал-управляемые каналы	130
5.5.4. Лиганд-управляемые каналы.....	140
Глава 6. МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ МЕМБРАНЫ.....	143
6.1. Строение и функции митохондриальных мембран	143
6.2. Организация дыхательной цепи митохондрий	145
6.3. H^+ -АТФ-синтаза: строение и функции	153
6.4. Альтернативные функции дыхания в митохондриях.....	160
Глава 7. МЕМБРАНЫ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА,	
АППАРАТА ГОЛЬДЖИ И ДРУГИХ ОРГАНЕЛЛ	161
7.1. Основные функции мембраны гладкого эндоплазматического	
ретикулума.....	161
7.2. Основные функции мембраны гранулярного эндоплазматического	
ретикулума.....	163
7.3. Функции мембран аппарата Гольджи	168
7.4. Молекулярные механизмы везикулярного транспорта	171
7.5. Ядерная оболочка	176
7.6. Строение и функции лизосом.....	181
7.7. Строение и функции пероксисом	182
ЛИТЕРАТУРА	184

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозин-5'-трифосфат
АФК – активные формы кислорода
АГ – аппарат Гольджи (комплекс Гольджи)
ДАГ – диацилглицерол
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФ₃ – инозитол-1,4,5-трифосфат
НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид, окисленная форма
НАДН – никотинамидадениндинуклеотид, восстановленная форма
РНК – рибонуклеиновая кислота
СМ – сфингомиелин
ФАД – флавинадениндинуклеотид, окисленная форма
ФАДН₂ – флавинадениндинуклеотид, восстановленная форма
ФИ – фосфатидилинозитол
ФИФ – фосфатидилинозитолфосфат
ФИФ₂ – фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат
ФИФ₃ – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат
ФК – фосфатидовая кислота
ФЛС_β – фосфолипаза С_β
ФЛС_γ – фосфолипаза С_γ
ФС – фосфатидилсерин
ФХ – фосфатидилхолин
ФЭ – фосфатидилэтаноламин
цАМФ – циклический аденозин-5'-монофосфат
цГМФ – циклический гуанозин-5'-монофосфат
ЭР – эндоплазматический ретикулум

ВВЕДЕНИЕ

Клетка – высокоорганизованная структура, содержащая множество функциональных единиц, характеризуется наличием плазматической и внутренних мембран. Плазматическая мембрана представляет собой внешнюю мембрану клетки, а внутренние мембраны являются мембранами клеточных органелл. Площадь поверхности плазматической мембраны составляет примерно одну сотую часть суммарной площади поверхности всех мембран клетки.

Все мембраны имеют подобное строение – липидный бислой (структурная основа мембраны), белки, ассоциированные с липидным бислоем, и углеводы, связанные с белками и липидами. Различия в структуре и свойствах мембран определяются, в первую очередь, различием в составе и химическом строении мембранных компонентов.

Мембрана – не только структурный элемент, отделяющий содержимое клетки от окружения и обеспечивающий ее целостность. Это – сложная функциональная система. С участием мембран развивается множество биохимических и биофизических процессов и явлений в клетке, в том числе превращение энергии из одной формы в другую, связывание гормонов и антигенов, регуляция активности ферментов, синтез АТФ и других веществ, рецепция сигналов, клеточное узнавание, генерация электрических сигналов. Мембраны обеспечивают заякоривание филаментов цитоскелета или компонентов экстраклеточного матрикса. Кроме того, мембраны обеспечивают направление движения клеток или органелл в клетках.

Мембраны представляют собой полупроницаемый барьер, обеспечивающий селективность и специфичность транспорта ионов и молекул как внутрь клетки, так и наружу. Большинство веществ не могут свободно проникать через мембрану. Их движение контролируется интегральными мембранными белками, в том числе каналами, насосами и переносчиками. Контролируя функции транспортных систем, мембрана способствует оптимизации параметров внутренней среды и быстрым специфическим изменениям в этой среде при отклике на события за пределами клетки. Свойства мембран могут изменяться либо при изменении процессов внутреннего метаболизма, либо при действии внешних сигналов, например, гормонов.

ГЛАВА 1. ЛИПИДНЫЙ КОМПОНЕНТ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Липиды – класс органических соединений, широко распространенных в живых организмах. В живых системах липиды выполняют многочисленные функции. Они являются неотъемлемыми структурными компонентами биологических мембран, источником энергии, служат регуляторами функциональной активности белков, выполняют роль сигнальных молекул (первичные внеклеточные мессенджеры, вторичные внутриклеточные мессенджеры) в процессах клеточной сигнализации и т. д.

Общепринятого определения термина «липиды» нет. Обычно липиды характеризуются как соединения природного происхождения, общим физическим свойством которых является высокая растворимость в органических растворителях, таких как хлороформ, бензол, эфиры и спирты, и низкая растворимость в воде. Сказанное относится к широкому разнообразию природных продуктов, включающему жирные кислоты и их производные, стероиды, желчные кислоты, терпены, каротеноиды. Однако многие из веществ, которые рассматриваются как липиды, могут растворяться как в воде, так и в органических растворителях.

Часто термин «липиды» используется не только для обозначения жирных кислот и их производных (эфиров и амидов), но также и соединений, синтез которых в природе тесно связан с жирными кислотами. В соответствии с данным подходом можно встретить следующее определение: липиды – это жирные кислоты и их производные, а также вещества, связанные биосинтетически или функционально с этими соединениями. В рамках данного определения холестерин и растительные стерины можно рассматривать как липиды, а также отнести к липидам желчные кислоты, токоферолы и некоторые другие соединения. Ганглиозиды также можно классифицировать как липиды, хотя они лучше растворяются в воде, чем в органических растворителях. Однако под данное определение не попадают такие природные вещества, как стероидные гормоны, некоторые жирорастворимые витамины, каротеноиды и терпены.

Содержание липидов различается не только в разных тканях, но и в различных органеллах.

1.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ЛИПИДОВ

Существует несколько способов классификации липидов, основанных на химической структуре, физических свойствах, биологической роли и т. д.

В зависимости от биологической роли липиды можно разделить на три класса: запасаемые липиды – жирные кислоты, триацилглицериды, воска;

структурные липиды – глицерофосфолипиды, сфинголипиды и стерины; регуляторные липиды – стероидные гормоны, изопреноиды и эйкозаноиды.

С учетом механизмов взаимодействия со щелочью липиды делятся на две большие группы: омыляемые и неомыляемые. К группе омыляемых липидов относятся простые и сложные липиды, которые при взаимодействии со щелочами гидролизуются с образованием солей высокомолекулярных кислот, называемых «мылами». К неомыляемым липидам относятся соединения, не подвергающиеся щелочному гидролизу (стерины, жирорастворимые витамины, простые эфиры и т. д.).

Наиболее распространенной является классификация биологически важных липидов на основе их структурных особенностей, хотя и в данном подходе встречаются вариации, связанные с отсутствием единого определения липидов.

Основу строения липидов, подвергающихся гидролизу, составляют спирты – высшие алифатические одноатомные, трехатомный спирт глицерин и двухатомный аминоспирт сфингозин. Спирты ацилированы высшими жирными кислотами; один из спиртовых гидроксильных групп может быть этерифицирован фосфорной кислотой, связанной с остатками аминоспиртов или аминокислоты (серин).

В соответствии с данной классификацией липиды можно разделить на три обширных класса: простые липиды, сложные липиды и предшественники и производные липидов.

1.1.1. Простые липиды

Продуктами гидролиза простых липидов являются, как правило, спирты и карбоновые кислоты. К простым липидам относятся жиры (триглицериды), представляющие собой сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот, воски – сложные эфиры высших жирных кислот и высших одноатомных спиртов. К простым липидам можно отнести и липиды, не подвергающиеся гидролизу: стероиды и терпены.

Триглицериды (триацилглицериды) – самые распространенные из липидов, встречающихся в природе. Природные жиры представляют собой сложные смеси различных глицеридов. В их состав в основном входят триглицериды, но присутствуют ди- и моноглицериды.

Гидролиз триглицеридов происходит под влиянием кислот, щелочей, сульфокислот, а также при участии ферментов. При гидролизе образуются сначала ди-, затем моноглицериды и в конечном итоге жирные кислоты и глицерин.

Для указания положения жирнокислотных заместителей в молекуле

глицерина используют *sn*-систему стереоспецифической нумерации атомов углерода (*sn*- от англ. *stereo-specific numbering*) (рис. 1.1). Например, триглицерид, содержащий в первом положении (С-1) остаток стеариновой кислоты, во втором (С-2) – олеиновой, в третьем (С-3) – пальмитиновой, обозначается следующим образом: *sn*-глицерол-1-стеарат-2-олеат-3-пальмитат.

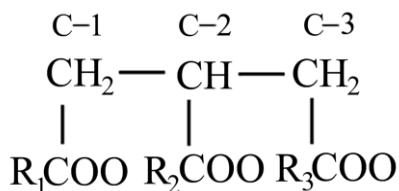


Рис. 1.1. *sn*-Нумерация атомов углерода глицеринового остова

В триглицеридах жирнокислотные заместители могут различаться как по длине цепи, так и по числу двойных связей. В пищевых жирах чаще всего содержатся пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и линолевая кислоты. Остатки ненасыщенных жирных кислот встречаются, как правило, в положении (С-2) глицерина.

Большинство природных восков представляет собой смесь эфиров одноатомных насыщенных карбоновых кислот и спиртов (R_1COOR_2).

Стероиды относятся к липидам животного происхождения. Основной частью структуры стероидов является циклопентанпергидрофенантрен. Их подразделяют на стерины, стериды (эфиры холестерина), желчные кислоты, половые гормоны, кортикостероиды. Основная масса стеринов в организме человека представлена холестерином – одноатомным циклическим спиртом (рис. 1.2). Холестерин содержится в желчи, плазме крови, клеточных мембранах, является компонентом липопротеинов.

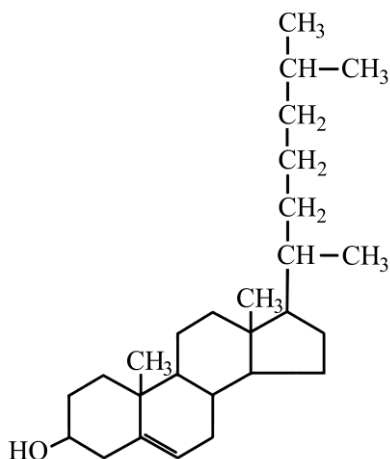


Рис. 1.2. Структурная формула холестерина

Терпены относятся к липидам растений и построены из двух, трех и более звеньев изопрена. Изопреноидные цепи входят в структуру многих биологически активных соединений, например некоторых жирорастворимых витаминов, стимуляторов роста растений, каротиноидов и т. д.

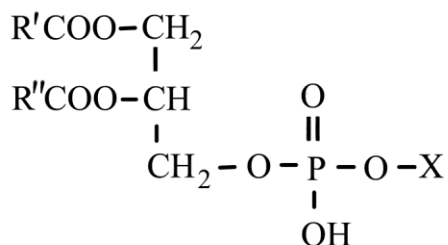
1.1.2. Сложные липиды

При гидролизе сложных липидов, как правило, образуются соединения трех и более видов.

В рамках данного класса можно выделить несколько групп липидов: фосфоглицериды, гликолипиды, другие сложные липиды (диольные липиды, сульфолипиды, аминолипиды, липопротеины и др.).

Фосфоглицериды – липиды, содержащие помимо жирных кислот и спирта остаток фосфорной кислоты, который образует сложноэфирную связь с атомом кислорода гидроксильной группы *sn*-С-3 глицерина. В их состав могут входить азотистые основания и другие компоненты.

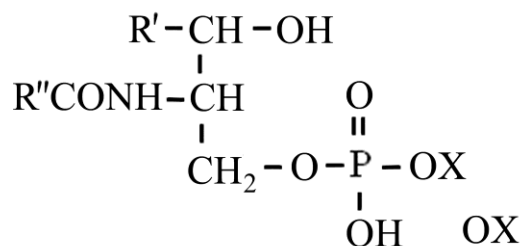
Фосфоглицериды разделяют на глицерофосфолипиды (спиртом является глицерин) (рис. 1.3) и сфингофосфолипиды (спиртом является сфингозин – ненасыщенный длинноцепочечный двухатомный спирт) (рис. 1.4).



X:

1. H – фосфатидовые кислоты (ФК)
2. $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$ – фосфатидилхолины (лецитины) (ФХ)
(1,2-диацил-*sn*-глицерол-3-фосфохолины)
3. $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ – фосфатидилэтаноламины (ФЭ)
4. CH_2CHNH_2 – фосфатидилсерины (ФС)
|
COOH
5. $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ – фосфатидилглицерины (ФГ)
6. $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5$ – фосфатидилинозитиды (ФИ)
(инозитил)
7. Фосфатидилглицерил – кардиолипины

Рис. 1.3. Глицерофосфолипиды



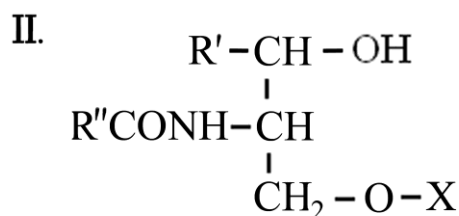
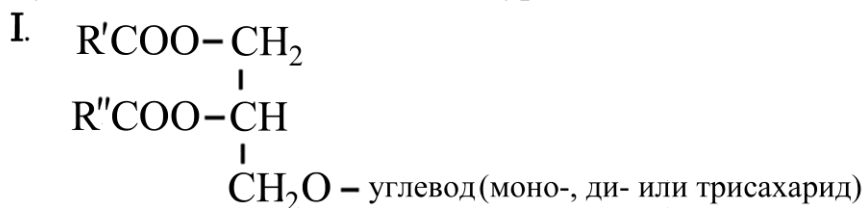
- X:
1. $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$ – сфингомиелины (СМ)
 2. Инозитилгликозид – фитосфинголипиды

Рис. 1.4. Сфингофосфолипиды

Наиболее простая форма фосфоглицеридов – фосфатидовые кислоты (фосфомоноэфиры диацилглицерина). Остаток фосфатидовой кислоты (фосфатидил) может образовывать сложноэфирную связь с кислородом гидроксильных групп аминоспиртов (холин, этаноламин или серин) или полиспиртов (миоинозит). При взаимодействии с глицерином двух остатков фосфатидовой кислоты образуется дифосфатидилглицерин (кардиолипид) – фосфолипид внутренних мембран митохондрий. Лизофосфолипиды образуются из фосфатидовой кислоты при отщеплении одного из ацильных остатков. Они присутствуют, например, в пчелином и змеином ядах.

Сфинголипиды в большом количестве присутствуют в мембранах клеток нервной ткани. Производные сфингозина, ацилированного по аминогруппе остатками жирных кислот, называются церамидами.

Гликолипиды (рис. 1.5) – липиды, содержащие жирные кислоты, глицерин или сфингозин и углеводный компонент. Чаще всего в гликолипидах присутствуют D-галактоза, D-глюкоза, уроновые кислоты.



- X:
1. Моносахарид – цереброзиды
 2. Олигосахарид – ганглиозиды

Рис. 1.5. Гликолипиды

Гликолипиды широко распространены в растениях, животных и микроорганизмах. Большое количество их находится в наружном липидном монослое плазматических мембран.

Гликолипиды (см. рис. 1.5) можно разделить на глицерингликолипиды (I) и сфингогликолипиды (цереброзиды и ганглиозиды) (II).

Цереброзиды содержатся в тканях человека, животных и высших растений. К наиболее простым представителям цереброзидов относятся галактозилцерамид и глюкозилцерамид.

Ганглиозиды широко распространены в тканях животных. Располагаются в основном в плазматических мембранах клеток, участвуют в процессах регуляции роста и адгезии клеток, межклеточных взаимодействиях, иммунных процессах.

К диольным липидам (эфирам диолов) относятся липофильные вещества, являющиеся производными этилен- и пропиленгликолей, а также родственных им диолов и имеющие общую структурную формулу:



Эфиры диолов присутствуют в составе липидов морских организмов, обнаружены в тканях млекопитающих, семенах растений и микроорганизмах. Диольные липиды в живых системах содержатся в малых количествах. При усиленной пролиферации клеток (регенерирующая печень, рак печени, созревающие семена растений и др.) содержание диольных липидов возрастает. К сложным липидам также относятся сульфолипиды и аминоклипиды. К категории сложных липидов относят и липопротеины.

1.1.3. Предшественники и производные липидов

К предшественникам и производным липидов относят жирные кислоты, оксипипиды, жирорастворимые витамины, гормоны, глицерин и другие спирты, альдегиды жирных кислот и др.

Жирные кислоты представляют собой алифатические монокарбоновые кислоты, содержащие в углеводородной цепи два и более атомов углерода. Жирные кислоты, молекулы которых содержат более 10 атомов углерода, называют высшими жирными кислотами.

Жирные кислоты, как правило, присутствуют в живых организмах в виде сложных эфиров с глицерином, сфингозином, холестерином. Свободные жирные кислоты в организме содержатся в небольших количествах.

Общая формула карбоновых кислот: $R-COOH$, где R – углеводородный заместитель. В зависимости от природы радикала, связанного с карбоксильной группой, жирные кислоты могут быть предельными (насыщенными) или непредельными (ненасыщенными). Углеводородная цепь

является насыщенной, если в ней присутствуют только одинарные С–С-связи, либо ненасыщенной, если имеется одна или более двойных С=С-связей. По степени ненасыщенности жирные кислоты подразделяют на насыщенные, мононенасыщенные (моноеновые) и полиненасыщенные (полиеновые). В зависимости от числа двойных связей различают моно-, ди-, три-, тетра-, пента-, гексаеновые жирные кислоты.

Названия и классификация жирных кислот основаны на учете числа атомов углерода в молекуле исходного углеводорода, производным которого является жирная кислота. Систематическое название жирных кислот образуется путем добавления к названию соответствующего углеводорода окончания «-овая». Названия насыщенных жирных кислот оканчиваются на «-ановая» (например, октановая), а ненасыщенных жирных кислот – на «-еновая» (например, октадеценовая).

В литературе вместо систематических названий широко используются тривиальные названия. Например, гексадекановая кислота, содержащая 16 атомов углерода, известна под названием «пальмитиновая», а октадекановая кислота – под названием «стеариновая».

Атомы углерода в молекулах жирных кислот нумеруются, начиная с атома углерода карбоксильной группы (–COOH) (рис. 1.6). Широко используется система краткого обозначения жирных кислот « $n : m$ », где n – число атомов углерода в молекуле жирной кислоты (включая углерод карбоксильной группы), а m – количество двойных связей. Например, обозначение пальмитиновой кислоты – 16 : 0, олеиновой кислоты – 18 : 1, арахидоновой кислоты – 20 : 4.

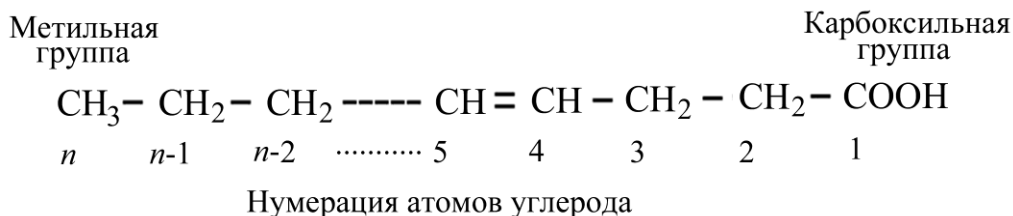


Рис. 1.6. Схема краткого обозначения жирных кислот

Для насыщенных жирных кислот краткая форма описывает структуру полностью. Для ненасыщенных жирных кислот требуется указание положения двойных связей и их конфигурации. Краткое обозначение жирных кислот с учетом положения двойных связей имеет вид « $n : m(\Delta a, b, c)$ » или « $n : m\Delta^{a, b, c}$ », где a, b, c – номер первого атома углерода, отсчитываемый от карбоксильной группы, для каждой двойной связи (см. рис. 1.6). Например, обозначения 18 : 2($\Delta 9, 12$) или 18 : 2 $\Delta^{9, 12}$ относятся к линолевой кислоте.

Применяется еще один способ краткого обозначения жирных кислот с учетом положения каждой двойной связи, использующий нумерацию

атомов углерода не от карбоксильной группы, а от противоположного конца – так называемое «омега-обозначение» (рис. 1.7).

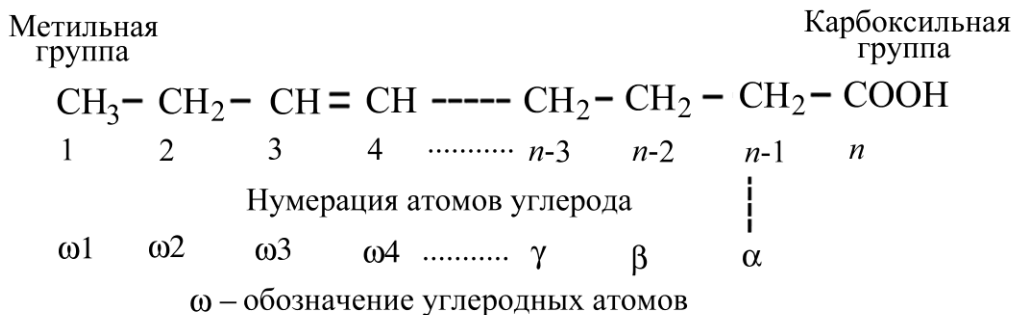


Рис. 1.7. Схема «омега-обозначения» жирных кислот

Углеродный атом карбоксильной группы не нумеруется. Первые несколько атомов углерода, начиная с атома углерода первой метиленовой группы со стороны кислотного остатка, обозначаются греческими буквами α , β , γ ,.... Атом углерода метильной группы обозначается как $\omega 1$ (или $\omega-1$), атом углерода первой метиленовой группы у «метильного» конца обозначается как $\omega 2$ (или $\omega-2$) и т. д. Таким образом, краткое обозначение жирной кислоты имеет вид « $n : m(\omega x)$ » или « $n : m(\omega-x)$ », где x – номер первого атома углерода двойной связи, отсчитанный от «метильного» конца жирной кислоты.

Например, $18 : 1(\omega-9)$ или $18 : 1\omega 9$ – обозначение олеиновой кислоты. Можно встретить краткую запись для системы «омега-обозначения», когда символ « ω » заменяется символом « n ». В этом случае краткое обозначение жирной кислоты будет иметь вид « $n:m(n-x)$ » (например, $18 : 1(n-9)$ или $18 : 1n-9$). При наличии в составе молекулы нескольких двойных связей указывается положение двойной связи, ближайшей к «метильному» концу жирной кислоты. Положение остальных двойных связей не указывается, так как они расположены последовательно друг за другом через две одинарные связи. Например, $18 : 3(n-3)$, или $18 : 3n-3$, или $18 : 3\omega 3$, или $18 : 3(\omega-3)$ – обозначения линоленовой кислоты.

Ненасыщенные жирные кислоты могут содержать двойные связи в *цис*- или *транс*-конфигурации. Практически все жирные кислоты содержат двойные связи только в *цис*-конфигурации. Только небольшое количество жирных кислот имеют *транс*-конфигурацию. При краткой записи жирной кислоты конфигурация, как правило, указывается приставками «*cis*» и «*trans*», либо первыми буквами «*c*» и «*t*». Например, для линолевой кислоты используется обозначение $18 : 2 \text{ cis}\Delta 9,12$, для элаидиновой – $18 : 1 \text{ trans}\Delta 9$.

Перечень наиболее распространенных жирных кислот представлен в табл. 1.1.

Таблица 1.1

Некоторые наиболее распространенные жирные кислоты

Название (тривиальное)	Название (систематическое)	Краткое обозначение	Молекулярная формула
Насыщенные жирные кислоты			
Масляная	бутановая	4 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
Капроновая	гексановая	6 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
Каприловая	октановая	8 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
Каприновая	декановая	10 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
Лауриновая	додекановая	12 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
Миристиновая	тетрадекановая	14 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Пальмитиновая	гексадекановая	16 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Стеариновая	октадекановая	18 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Арахидиновая	эйкозановая	20 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
Бегеновая	докозановая	22 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
Лигноцериновая	тетракозановая	24 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$
Церотовая	гексакозановая	26 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{COOH}$
Моноеновые жирные кислоты			
Пальмитолеиновая	<i>cis</i> -9-гексадеценовая	16 : 1 <i>cis</i> Δ 9 или 16 : 1ω7	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}-$ $(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Олеиновая	<i>cis</i> -9-октадеценовая	18 : 1 <i>cis</i> Δ9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}-$ $(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Вакценовая	<i>cis</i> -11-октадеценовая	18 : 1 <i>cis</i> Δ11	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-$ $(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
Полиеновые жирные кислоты			
Линолевая	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-октадекадиеновая	18 : 2 <i>cis</i> Δ9,12	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ $\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Линоленовая	<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15-октадекатриеновая	18 : 3 <i>cis</i> Δ9,12,15	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ $(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Арахидоновая	5,8,11,14-эйкозатетраеновая	20 : 4 Δ5,8,11,14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3-$ $\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$

Чаще всего в живых организмах встречаются длинноцепочечные жирные кислоты с четным числом атомов углерода.

Полиненасыщенные жирные кислоты не синтезируются в организме животных. Они относятся к незаменимым жирным кислотам и являются важными составляющими мембранных фосфолипидов и предшественниками оксипинов.

К оксипинам относят соединения, образующиеся при оксидации полиненасыщенных жирных кислот. Основными оксипинами являются эйкозаноиды. В зависимости от механизма образования выделяют простагландины, тромбоксаны, простациклины, окси- и пероксикислоты, лейкотриены, липоксины и др. Огромный интерес к эйкозаноидам связан

с их необычайно высокой биологической активностью, их прямым или опосредованным участием во многих физиологических процессах.

1.2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПИДОВ

Липиды в соответствии с особенностями строения могут быть разделены на неполярные и полярные. К неполярным липидам относятся триглицериды, воски, эфиры стерина и др. Они практически нерастворимы в воде.

Молекулы полярных липидов – амфипатические структуры, проявляющие как гидрофобные, так и гидрофильные свойства (рис. 1.8). Длинноцепочечные алифатические заместители («хвосты») обеспечивают неполярный характер части молекулы, а остальная часть («голова») является полярной или имеет электрический заряд.

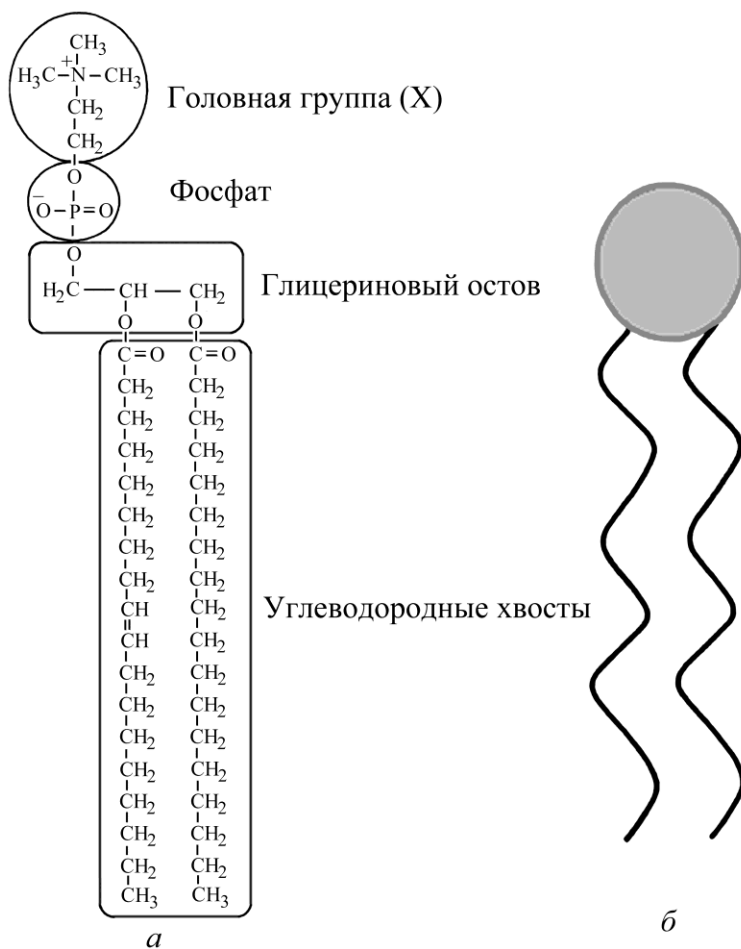


Рис. 1.8. Структура (*a*) и схематическое изображение (*б*) молекулы фосфатидилхолина

В табл. 1.2 приведены данные, характеризующие электрический заряд головной части некоторых мембранных липидов.

При физиологических условиях головные части липидных молекул являются либо отрицательно заряженными (фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, кардиолипин), либо электронейтральными (находятся в форме цвиттерионов – содержат отрицательный и положительный заряды) (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин).

Таблица 1.2

Электрический заряд головной части мембранных липидов

Головная группа (X)	Заряд головной группы	Заряд фосфатной группы	Суммарный заряд головной части молекулы
Холин	+	–	0
Этаноламин	+	–	0
Серин	+,–	–	–
Инозит	0	–	–
Глицерин	0	–	–

В фосфолипидах мембран число углеродных атомов в углеводородных хвостах варьирует от 14 до 24. Чаще всего один из хвостов содержит одну или более двойных связей. Как правило, замещение в положении *sn*-C-1 глицеринового остатка осуществляется насыщенными жирными кислотами, в то время как жирнокислотные цепи, имеющие ненасыщенные связи, присоединяются к центральному углеродному атому (позиция *sn*-C-2). Наличие двойной связи в *цис*-конфигурации приводит к излому углеводородной цепи. Чем длиннее углеводородные заместители, тем длиннее неполярная часть молекулы липида.

Как видно из рис. 1.8, фосфолипидные молекулы имеют вытянутую форму. При рассмотрении формы липидных молекул имеют в виду «эффективную молекулярную форму», которая определяется геометрической формой модельного тела. Молекула липида в зависимости от химического строения головной группы, заряда, количества и длины углеводородных хвостов, степени их ненасыщенности, конфигурации может быть смоделирована телами различной геометрической формы (рис. 1.9).

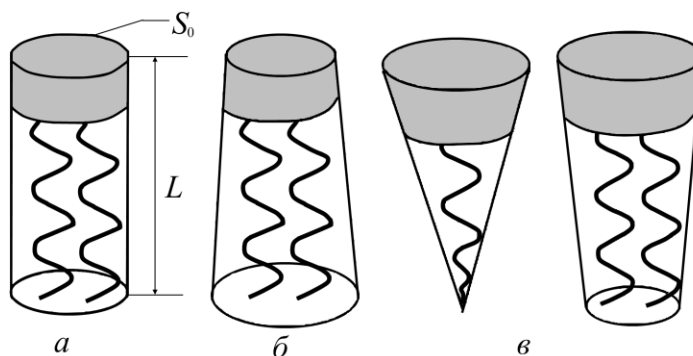


Рис. 1.9. Геометрическая форма липидных молекул:
а – цилиндр; б – усеченный конус; в – инвертированный конус

Количественный параметр P , характеризующий форму липидной молекулы, может быть определен следующим образом

$$P = \frac{V}{S_0 \cdot L}, \quad (1.1)$$

где V – объем молекулы, рассчитанный как объем модельного геометрического тела, S_0 – площадь поверхности, занимаемая полярной головой, L – длина молекулы.

Для молекулы цилиндрической формы (рис. 1.9, *а*) параметр формы $P = 1$ (например, молекула фосфатидилхолина). Если $P > 1$, то молекула характеризуется конической формой, причем площадь, занимаемая полярной головой, меньше площади поперечного сечения гидрофобной части (рис. 1.9, *б*) (например, молекула фосфатидилэтаноламина). Если $P < 1$, то молекула также характеризуется конической формой (рис. 1.9, *в*), но площадь, занимаемая полярной головой, больше площади поперечного сечения гидрофобной части (например, молекула лизофосфатидилхолина). Следует отметить, что величина эффективной площади, занимаемой головной частью молекулы, увеличивается при наличии в ней электрических зарядов.

Действие внешних факторов может привести к модификации геометрической формы молекулы. Например, повышение температуры приводит к увеличению площади поперечного сечения гидрофобной части без заметного изменения площади, занимаемой полярной головой.

1.3. АССОЦИАТЫ ЛИПИДНЫХ МОЛЕКУЛ

Полярные липиды в водной среде способны формировать надмолекулярные структуры: монослои, мицеллы, бислои, везикулы (рис. 1.10). Вклад во взаимодействие липидных молекул друг с другом и с молекулами воды вносят электростатические взаимодействия (при наличии заряда на липидной молекуле), взаимодействия Ван-дер-Ваальса и водородные связи. Учет стерических факторов (форма, размер липидных молекул) позволяет установить критерии формирования липидных ассоциатов различного типа.

Рассмотрим условия формирования надмолекулярных липидных ассоциатов определенного типа с учетом эффективной формы липидной молекулы (рис. 1.11).

Сферическая мицелла (рис. 1.11, *а*). Пусть мицелла состоит из N молекул липида. Радиус мицеллы R соответствует длине молекулы L . Следует отметить, что длина молекулы зависит от конфигурации углеводородных заместителей. В полностью вытянутом состоянии молекула будет

характеризоваться максимально возможной длиной $L_{\max}$.

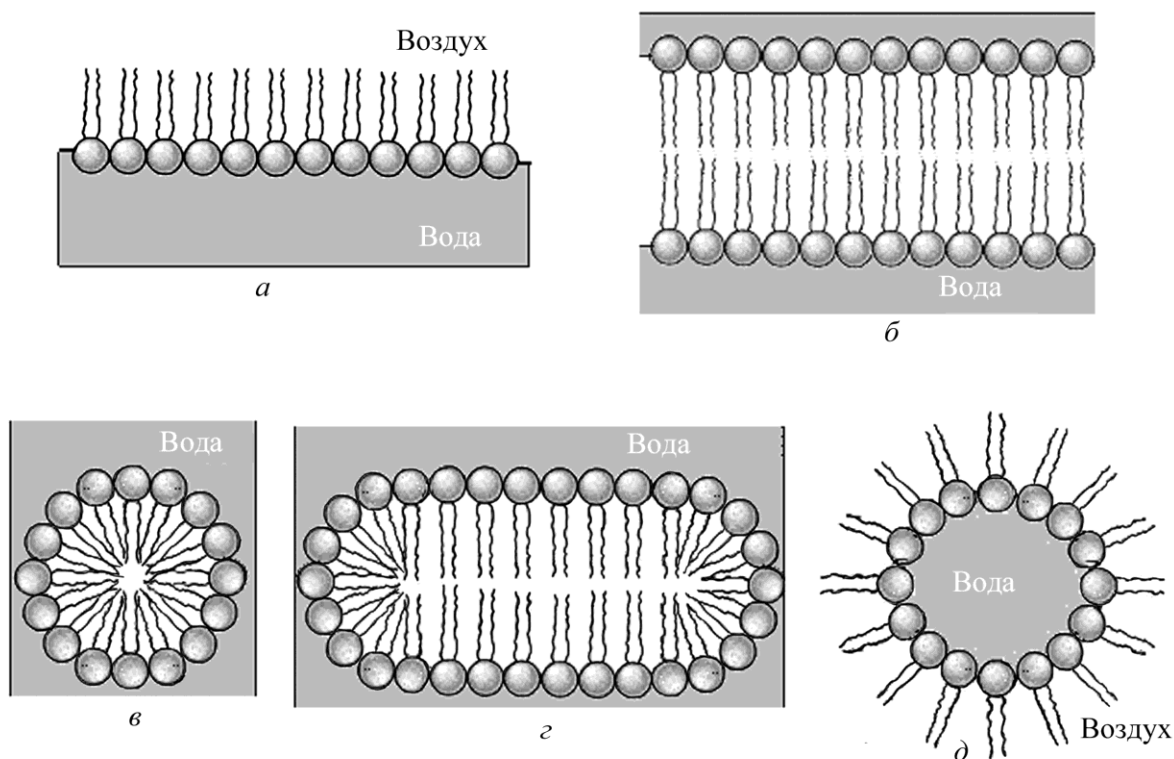


Рис. 1.10. Ассоциаты липидных молекул: монослой (а); бислой (б); сферическая мицелла (в); асимметричная мицелла (г); инвертированная мицелла (д)

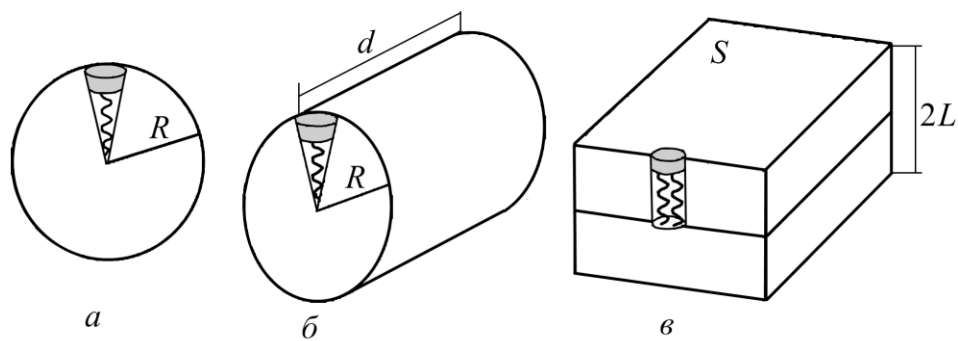


Рис. 1.11. Модели липидных ассоциатов: сферическая мицелла (а); цилиндрическая мицелла (б); плоский бислой (в)

Объем сферической мицеллы равен

$$\frac{4}{3}\pi R^3 = N \cdot V, \quad (1.2)$$

где V – объем молекулы, R – радиус мицеллы.

Площадь поверхности мицеллы равна

$$4\pi R^2 = N \cdot S_0, \quad (1.3)$$

где S_0 – площадь поверхности, занимаемая полярной головой липидной молекулы.

Отношение объема мицеллы к площади ее поверхности равно

$$\frac{R}{3} = \frac{V}{S_0}.$$

$$R = \frac{3V}{S_0} \leq L_{\max}. \quad (1.4)$$

Следовательно, условие формирования сферической мицеллы имеет вид

$$P = \frac{V}{L \cdot S_0} \leq \frac{1}{3}. \quad (1.5)$$

Цилиндрическая мицелла (рис. 1.11, б). Объем цилиндрической мицеллы равен

$$\pi R^2 \cdot d = N \cdot V, \quad (1.6)$$

где V – объем молекулы, R – радиус мицеллы, d – длина цилиндрической мицеллы.

Определим площадь боковой поверхности цилиндрической мицеллы

$$2\pi R \cdot d = N \cdot S_0. \quad (1.7)$$

Площадью оснований цилиндрической мицеллы можно пренебречь, т.к. она много меньше площади боковой поверхности.

Отношение объема мицеллы к площади ее поверхности равно

$$\frac{R}{2} = \frac{V}{S_0}.$$

$$R = \frac{2V}{S_0} \leq L_{\max}. \quad (1.8)$$

Условие формирования цилиндрической мицеллы имеет вид

$$\frac{1}{3} < P = \frac{V}{L \cdot S_0} \leq \frac{1}{2}. \quad (1.9)$$

Плоский бислой (рис. 1.11, в). Плоскую бислойную структуру образуют два монослоя липидных молекул, каждый из которых характеризуется площадью поверхности S и длиной молекул L .

Объем липидного бислоя равен

$$S \cdot 2L = N \cdot V, \quad (1.10)$$

где V – объем молекулы, S – площадь поверхности монослоя, L – длина липидной молекулы, N – количество липидных молекул, образующих бислой.

Площадь поверхности бислоя определяется как

$$2S = N \cdot S_0, \quad (1.11)$$

где S_0 – площадь поверхности, занимаемая полярной головой липидной молекулы.

Отношение объема бислоя (1.10) к площади его поверхности (1.11) равняется

$$L = \frac{V}{S_0} \leq L_{\max}. \quad (1.12)$$

Условие формирования бислоя имеет вид

$$\frac{1}{2} < P = \frac{V}{L \cdot S_0} \leq 1. \quad (1.13)$$

Наличие в бислое смесей липидных молекул с различной площадью и величиной заряда полярной головы, длиной углеводородных заместителей, степенью их ненасыщенности приводит к возникновению неоднородностей структуры бислоя.

1.4. ТЕРМОДИНАМИКА ФОРМИРОВАНИЯ И СВОЙСТВА ЛИПИДНЫХ АССОЦИАТОВ

Взаимодействие липидов с водой приводит к спонтанному формированию липидных ассоциатов. Формирование липидных ассоциатов определяется гидрофобным эффектом (с учетом стерических факторов). При постоянных давлении и температуре данный процесс характеризуется минимизацией свободной энергии системы.

Гидрофобный эффект приводит к минимизации области контакта углеводородных заместителей и максимизации области контакта полярных голов амфифильных молекул с водой. Энергия взаимодействия между молекулами воды больше, чем энергия взаимодействия молекул воды с жирнокислотными остатками липидных молекул. Поэтому углеводородные цепи «выталкиваются» из водной фазы, что приводит к понижению энтальпии системы. Кроме того, вклад в изменение свободной энергии системы вносит энтропийный член ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Вклад в изменение энтропии системы при переходе амфифильных молекул из водной среды

в липидный ассоциат вносят как амфифильные молекулы, так и вода.

Величину гидрофобного эффекта можно определить по различию химического потенциала неполярного вещества в водной и углеводородной фазах

$$\mu_{HC} - \mu_w = RT \ln X_w, \quad (1.14)$$

где μ_{HC} – химический потенциал неполярного вещества в углеводородной фазе, μ_w – химический потенциал неполярного вещества в водной фазе, X_w – критическая концентрация неполярного вещества в водной фазе, выраженная в мольных долях.

При определении изменения свободной энергии в процессе формирования молекулярных ассоциатов молекул, содержащих ионизированные группы, следует учитывать электростатическое взаимодействие заряженных частей молекул.

1.4.1. Монослои мембранных фосфолипидов

Мономолекулярный слой (монослой) – это слой вещества толщиной в одну молекулу на поверхности раздела фаз. Монослой, образованный поверхностно-активными веществами, возникает на поверхности жидкости в процессе адсорбции.

Величина адсорбции Γ определяется отношением количества адсорбированного вещества n , выраженного в молях, к площади поверхности s . Количественное соотношение между величиной адсорбции Γ и изменением поверхностного натяжения при изменении концентрации раствора определяется уравнением Гиббса

$$\Gamma = -\frac{C}{RT} \left(\frac{\partial \sigma}{\partial C} \right)_T, \quad (1.15)$$

где C – молярная концентрация растворенного вещества, σ – поверхностное натяжение раствора, T – температура, R – газовая постоянная.

Поскольку поверхностное натяжение может быть выражено как сила, направленная вдоль поверхности и приходящаяся на единицу длины контура, ограничивающего поверхность, то $\Delta\sigma$ представляет величину давления в поверхностном слое π

$$\sigma_0 - \sigma = \Delta\sigma = \pi, \quad (1.16)$$

где σ_0 – поверхностное натяжение чистого растворителя.

Если концентрация вещества в поверхностном слое C мала (рис. 1.12, а), то

$$\pi s = nRT, \quad (1.17)$$

где n – число молей адсорбированного вещества в монослое, s – площадь монослоя.

Уравнение (1.17) – двумерный аналог уравнения состояния идеального газа. То есть, при очень низких концентрациях расстояние между молекулами столь велико, что взаимодействием между ними можно пренебречь, и молекулы адсорбированного вещества находятся в слое в «газообразном» состоянии.

Если учесть, что молекулы адсорбированного вещества в поверхностном слое занимают площадь s_0 , и между ними существует взаимодействие, приводящее к изменению поверхностного давления на величину $\frac{a}{s^2}$,

то выражение примет вид

$$\pi = \frac{nRT}{s - s_0} - \frac{a}{s^2}; \text{ или } \left(\pi + \frac{a}{s^2} \right) (s - s_0) = nRT \quad (1.18)$$

– уравнение состояния адсорбционного слоя (уравнение Фрумкина).

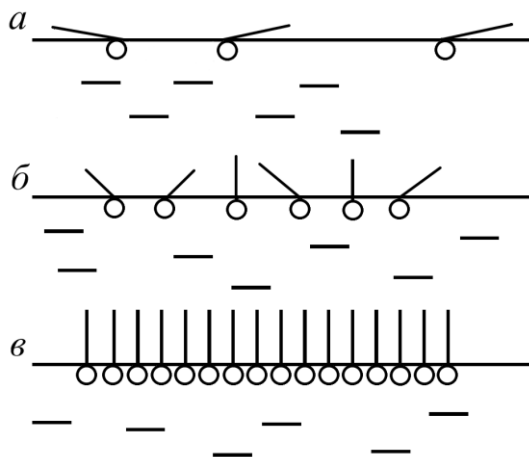


Рис. 1.12. Схематическое изображение расположения молекул поверхностно-активных веществ на границе раздела «вода – воздух»:

a – «газообразное» состояние; b – конденсация молекул в слое;

v – состояние предельной адсорбции

При увеличении концентрации усиливающееся взаимодействие между адсорбированными молекулами вынуждает их располагаться в слое определенным образом (полярная голова в сторону полярной фазы, а неполярные хвосты в противоположную сторону) (рис. 1.12, б). При насыщении формируется монослойная структура из адсорбированных молекул, расположенных практически перпендикулярно плоскости слоя (рис. 1.12, в). Если вся площадь поверхности занята молекулами адсорбированного вещества, то величина адсорбции достигает своего предельного (максимального) значения ($\Gamma_{\max}$). То есть, образование мономолекулярных слоев можно рассматривать как случай предельной адсорбции.

Зависимость поверхностного натяжения от концентрации жирных кислот в водных растворах может быть выражена эмпирическим уравнением Шишковского

$$\Delta\sigma = b \ln \left(\frac{C}{k} + 1 \right), \quad (1.19)$$

где b и k – эмпирические постоянные.

Постоянная b одинакова по величине для всего гомологического ряда жирных кислот, в то время как постоянная k изменяется (уменьшается) в 3–3,5 раза при изменении длины углеводородной цепи на CH_2 -группу.

В случае предельной адсорбции можно рассчитать площадь S_0 , приходящуюся на 1 молекулу жирной кислоты в мономолекулярном слое (определяется площадью полярной головы). Площадь полярной головы для всех членов гомологического ряда жирных кислот одинакова, что и объясняет постоянство константы b в уравнении Шишковского

$$S_0 = \frac{n}{N_0 \Gamma_{\max}}, \quad (1.20)$$

где n – число молей, N_0 – число Авогадро.

Минимальная площадь, приходящаяся на одну молекулу жирной кислоты, $S_0 = 21 \text{ \AA}^2$.

Измерение зависимости площади монослоя адсорбированных молекул от величины поверхностного давления является одним из важнейших методов исследования состояния молекул в монослоях. Измерение поверхностного давления при уменьшении площади поверхности в условиях постоянства температуры позволяет получить π – s -изотермы (рис. 1.13).

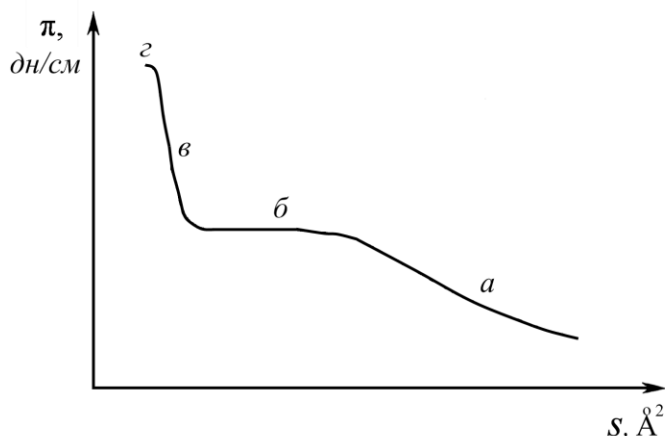


Рис. 1.13. Общий вид π – s -изотермы

На участке a молекулы адсорбированного вещества находятся в «газообразном» состоянии. На данном участке зависимость гиперболическая

$$\left(\pi = \frac{nRT}{s} \right).$$

Участок *б* характеризуется постоянством поверхностного давления при уменьшении площади поверхности ($\pi = \text{const}$). Уменьшение площади поверхности приводит к сближению адсорбированных молекул и взаимодействием между ними уже нельзя пренебречь. Взаимодействие инициирует образование агрегатов адсорбированных молекул в поверхностном слое.

При дальнейшем сжатии молекулярные агрегаты сближаются, и образуется непрерывный мономолекулярный слой вещества на поверхности. В данном слое молекулы ориентированы перпендикулярно поверхности и максимально сближены (участок *в*). На каждую молекулу в слое приходится минимальная площадь S_0 .

Участок *г* характеризует нарушение однородности монослоя (коллапс слоя).

Мономолекулярные слои могут находиться в различном агрегатном состоянии, которое определяется силами, действующими между молекулами в слое. Монослой может быть в жидкокристаллическом (жидком) или твердом (гелевом) состоянии. При изменении фазового состояния монослоя (например, при переходе «гель – жидкий кристалл») в области *в* изотермы адсорбции могут наблюдаться дополнительные участки с изменением хода кривой π – s .

Температура фазового перехода монослоя из жидкого в гелевое состояние зависит от химического состава липидов. Увеличение степени ненасыщенности углеводородных заместителей в молекулах липидов приводит к «разжижению» монослоя.

1.4.2. Мицеллообразование

Мицеллообразование представляет процесс самопроизвольной ассоциации молекул поверхностно-активных веществ в растворе. В результате мицеллообразования возникают мицеллы, состоящие из десятков молекул. Мицелла (от лат. *mīsa* – крошка, крупинка) – отдельная частица дисперсной системы.

При малой концентрации липиды, являющиеся поверхностно-активными веществами, образуют в воде истинные растворы. Увеличение концентрации растворенных молекул возможно до определенной концентрации, при которой в растворе уже образуются молекулярные ассоциаты малого размера (предассоциаты), содержащие 3–5 молекул липидов. Дальнейшее увеличение концентрации растворенных молекул приводит к росту размеров ассоциатов (увеличивается число молекул в ассоциате). Рост ассо-

циатов происходит в достаточно узкой области концентраций. Затем при достижении определенной концентрации (критической концентрации мицеллообразования) увеличение размеров ассоциатов прекращается (данные ассоциаты и представляют собой мицеллы) и дальнейшее увеличение концентрации растворенных молекул приводит лишь к увеличению количества мицелл (рис. 1.14). Считается, что после достижения критической концентрации мицеллообразования ($C_{\text{ккм}}$) концентрация неассоциированных липидных молекул в системе практически не меняется, а дальнейшее увеличение концентрации вещества в системе приводит к увеличению концентрации мицелл.

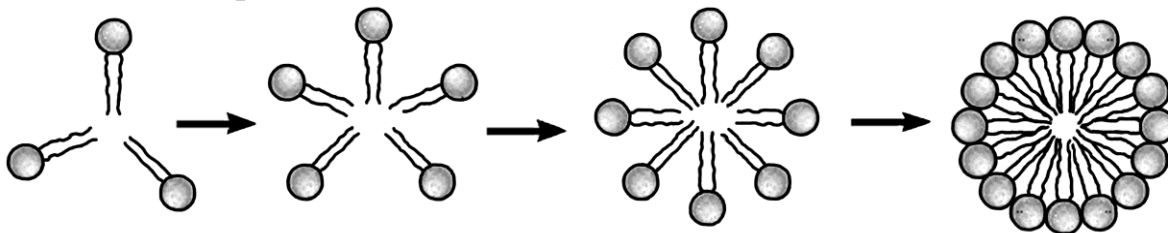


Рис. 1.14. Схема формирования мицелл

Экспериментально критическую концентрацию мицеллообразования определяют по излому кривой зависимости свойства раствора поверхностно-активного вещества (например, поверхностного натяжения, электропроводности, вязкости, светорассеяния и др.) от концентрации вещества. Для мембранных фосфолипидов критическая концентрация мицеллообразования характеризуется очень низким значением (порядка 10^{-10} моль/л), для одноцепочечных липидов (лизофосфолипиды) – 10^{-7} – 10^{-6} моль/л.

Концентрацию мицелл в системе можно рассчитать следующим образом

$$C_m = (C - C_{\text{ккм}}) / n, \quad (1.21)$$

где C – концентрация поверхностно-активного вещества в системе, $C_{\text{ккм}}$ – критическая концентрация мицеллообразования (молярная), n – количество молекул поверхностно-активного вещества в мицелле.

Вблизи критической концентрации мицеллообразования в водных растворах образуются, как правило, сферические мицеллы, содержащие 50–100 молекул поверхностно-активного вещества. При высоких концентрациях образуются цилиндрические и пластинчатые мицеллы. При очень большом содержании поверхностно-активного вещества в системе могут образоваться жидкокристаллические структуры.

При концентрациях липида в растворе, превышающих критическую концентрацию мицеллообразования, мицеллы находятся в термодинамическом равновесии с растворенными липидными молекулами. Между мицеллами и раствором происходит постоянный обмен молекулами липида.

При описании процесса мицеллообразования обычно используют два подхода: кинетический и термодинамический. В рамках первого подхода процесс мицеллообразования рассматривается как обратимая химическая реакция, в которой мономерные молекулы (AB) образуют полимолекулярную (многомолекулярную) структуру (по аналогии с образованием полимера)



где n – число агрегации (количество молекул поверхностно-активного вещества в мицелле).

К данной реакции может быть применен закон действующих масс. В такой квазихимической модели предполагается, что все мицеллы идентичны, т. е. содержат определенное постоянное число молекул независимо от концентрации раствора и температуры. Модель позволяет получить зависимость количества мицелл и неассоциированных молекул от концентрации поверхностно-активного вещества в системе.

Кинетические характеристики процесса мицеллообразования изучены экспериментально. Времена релаксации 10^{-6} – 10^{-9} с характеризуют переходы «неассоциированная молекула–мицелла» (быстрая релаксация), а времена релаксации от секунды до 10^{-3} с (медленная релаксация) связаны с изменением числа агрегации. Определение времен быстрой и медленной релаксации позволяет определять числа агрегации при мицеллообразовании.

В рамках термодинамического подхода мицеллы рассматриваются как новая фаза, а процесс мицеллообразования как фазовый переход – аналог конденсации. При определенной концентрации растворенных молекул (вблизи критической концентрации мицеллообразования) образуются предассоциаты, которые служат центрами конденсации для формирования мицелл. Увеличение размеров мицелл приводит к упорядоченному расположению молекул, образованию гидратной оболочки вокруг мицелл и к стабилизации системы.

Уравнение мицеллообразования в рамках термодинамического подхода имеет вид

$$X_m = nX_1^n \exp(-n\Delta G_m^0 / RT), \quad (1.23)$$

где ΔG_m^0 – стандартная свободная энергия переноса одного моля молекул из неассоциированного состояния в состав ассоциата (мицеллы); X_1 – концентрация (молярная доля) неассоциированных молекул в равновесной мицеллярной системе; X_m – концентрация (молярная доля) мицелл с числом агрегации n в равновесной мицеллярной системе; T – температура; R – газовая постоянная.

При рассмотрении мицеллообразования как фазового перехода изменение стандартной свободной энергии при переходе амфифильных молекул из водного раствора (одна фаза) в мицеллы (вторая фаза) определяется критической концентрацией мицеллообразования

$$\Delta G_m^0 = \mu_m^0 - \mu_w^0 = RT \ln X_{\text{ККМ}}, \quad (1.24)$$

где μ_m^0 – стандартный химический потенциал амфифильного вещества в мицелле, μ_w^0 – стандартный химический потенциал амфифильного вещества в водной фазе, $X_{\text{ККМ}}$ – критическая концентрация мицеллообразования амфифильного вещества в водной фазе, выраженная в мольных долях.

Критическая концентрация мицеллообразования зависит от природы полярной головы и длины углеводородной цепи амфифильной молекулы. При неизменности полярной части амфифильной молекулы критическая концентрация мицеллообразования снижается при удлинении углеводородной цепи. Например, для жирных кислот с числом атомов углерода в линейных углеводородных радикалах $n_c = 12$ $C_{\text{ККМ}} = 10^{-2}$ моль/л, а с $n_c = 16$ $C_{\text{ККМ}} = 10^{-5}$ моль/л.

С термодинамических позиций в качестве основного критерия влияния структуры молекул поверхностно-активного вещества на критическую концентрацию мицеллообразования можно рассматривать величину работы по переносу соответствующих фрагментов амфифильной молекулы из водной фазы в мицеллу с учетом электрического взаимодействия полярных частей молекул на поверхности мицелл.

1.4.3. Липидный бислой

Структура липидного бислоя. Широко распространенной формой молекулярных липидных ассоциатов в водной среде являются бислойные структуры. Липидный бислой – основа молекулярной организации биологических мембран. Липидный бислой представляет собой термодинамически устойчивую структуру, образованную липидными молекулами в водной среде и состоящую из двух монослоев липидных молекул, ориентированных углеводородными цепями друг к другу, а полярными головками – в сторону водной фазы (рис. 1.10, б).

В результате такой ориентации молекул липидный бислой характеризуется наличием двух гидрофильных поверхностей и гидрофобной области в центральной части бислоя (рис. 1.15). Формируется бислой либо липидами, у которых различия между площадями поперечного сечения головных частей молекул и углеводородных цепей невелики, либо смесью липидов, соотношение которых с учетом геометрических характеристик отдельных компонентов оптимизировано для формирования плоских ин-

терфейсов ($P = 1$). Углеводородные цепи расположены приблизительно под прямым углом к поверхности бислоя.

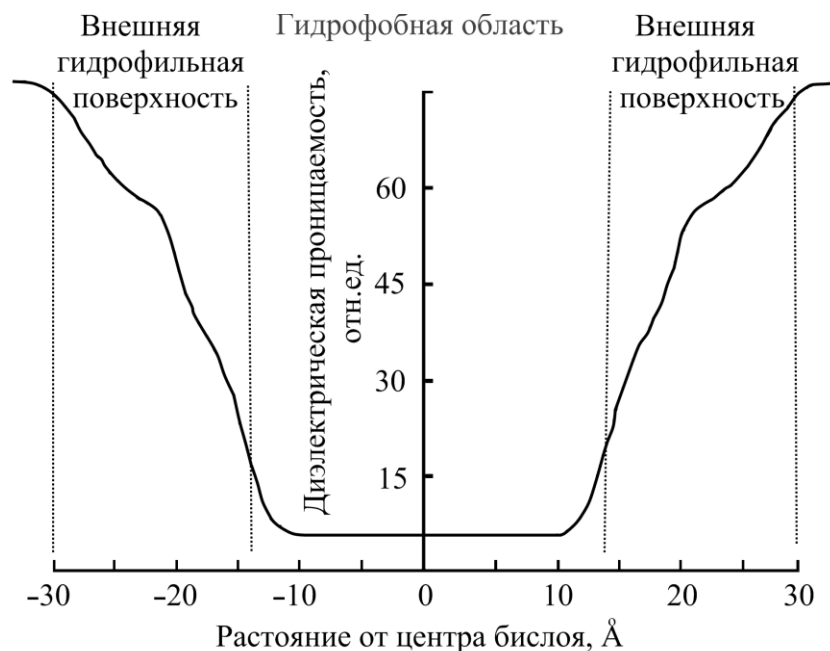


Рис. 1.15. Профиль диэлектрической проницаемости бислоя, образованного диолеилфосфатидилхолином

Толщина липидного бислоя обычно находится в пределах 4–6 нм. Внешние гидрофильные области липидного бислоя, контактирующие с водой, имеют толщину порядка 0,7–1,4 нм (рис. 1.16).

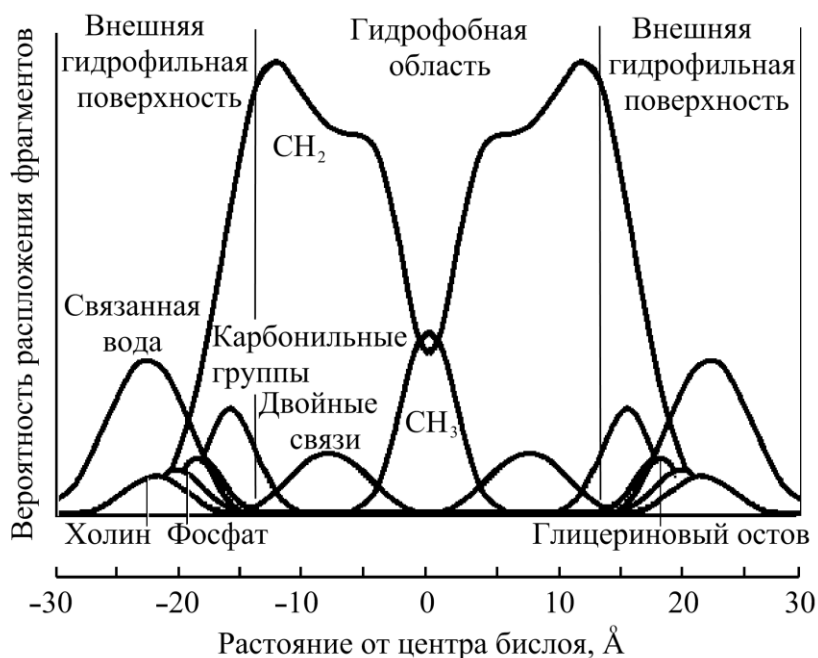


Рис. 1.16. Распределение структурных фрагментов молекул в бислое, образованном диолеилфосфатидилхолином

Толщина углеводородной области составляет 2,6–3,2 нм для бислоев, образованных липидами, входящими в состав биологических мембран. С использованием метода малоуглового рассеяния рентгеновских лучей установлено, что такая толщина гидрофобной области является типичной для биологических мембран. Граница между гидрофобной и полярной частями бислоя приходится на область расположения карбонильных групп фосфолипидных молекул. Фосфатные группы фосфолипидов располагаются в области размером примерно 0,5 нм с внешней стороны от границы с гидрофобной областью и гидратируются.

Толщина липидного бислоя зависит от длины и степени ненасыщенности углеводородных цепей липидных молекул. Чем больше длина и меньше степень ненасыщенности жирнокислотных заместителей, тем толще бислой. Толщина липидного бислоя возрастает примерно на 0,1 нм при увеличении длины углеводородной цепи липидной молекулы на одну метиленовую группу. Присутствие в цепях *цис*-двойных связей понижает плотность упаковки молекул и приводит к уменьшению толщины бислоя.

К изменению толщины бислоя также может приводить гидратация липидных молекул. Увеличение степени гидратации липидных молекул приводит к увеличению площади поверхности, приходящейся на полярную голову, что, в свою очередь, приводит к уменьшению плотности упаковки углеводородных хвостов и уменьшению толщины мембраны.

Важным детерминантом толщины липидного бислоя является холестерин. Холестерин оказывает конденсирующий (упорядочивающий) эффект на липидные бислои. Взаимодействие холестерина с фосфолипидными молекулами приводит, как правило, к ограничению подвижности и упорядочиванию углеводородных цепей и, как следствие, к утолщению бислоя. Например, повышение содержания холестерина от 0 до 30 % в бислой из фосфатидилхолина приводит к увеличению толщины на 15–20 % (рис. 1.17). Однако холестерин практически не оказывает влияния на толщину бислоя из сфингомиелина.

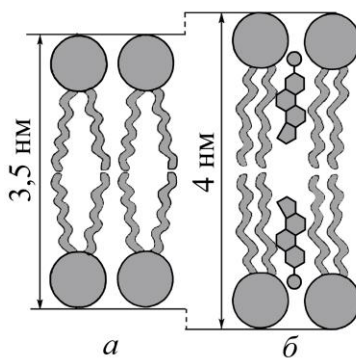


Рис. 1.17. Влияние холестерина на толщину липидного бислоя:

а – бислой из фосфатидилхолина;

б – бислой из смеси фосфатидилхолина и холестерина

Толщина липидного бислоя зависит от температуры. С увеличением температуры толщина бислоя уменьшается. При определенных условиях липидный бислой подвергается так называемому главному фазовому переходу, при котором толщина бислоя изменяется скачкообразно (рис. 1.18).

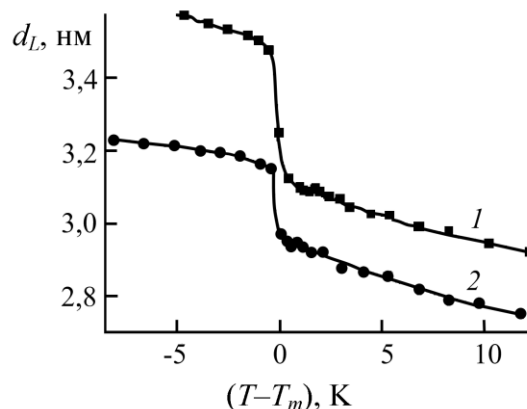


Рис. 1.18. Зависимость гидрофобной толщины d_L бислоев, образованных дипальмитоилфосфатидилхолином (1) и димиристоилфосфатидилхолином (2) от температуры.
 T_m — температура главного фазового перехода

Профиль латерального давления в бислое. Формирование бислоя в водной среде обусловлено взаимодействием липидных молекул с водой и между собой. В результате взаимодействия между молекулами в плоскости бислоя возникают силы, стабилизирующие бислой. По глубине бислоя силы распределены неравномерно. Однако в состоянии равновесия равнодействующая сил равна нулю. Анализ динамической структуры бислоя позволяет построить так называемый профиль латерального давления (профиль латерального стресса) бислоя.

Как видно на рис. 1.19, величина латерального давления при движении через бислой меняется сложным образом.

Такой вид профиля латерального давления — следствие, по крайней мере, трех различных явлений, характерных для бислойной структуры. Во-первых, между головными группами липидных молекул существуют силы отталкивания, которые стремятся увеличить площадь поверхности бислоя (давление имеет положительную величину). Во-вторых, на границах раздела «полярная область — гидрофобная область» в бислое действуют силы поверхностного натяжения, стремящиеся минимизировать площадь границ раздела (давление имеет отрицательную величину). В-третьих, колебания углеводородных хвостов приводят к отталкиванию липидных молекул (давление имеет положительную величину).

Конкретный профиль латерального давления зависит от типа липида. При изменении химической структуры липидных молекул профиль лате-

рального давления может существенно изменяться. Например, следствием увеличения числа углеводородных цепей в молекулах липидов является увеличение отталкивания в гидрофобной области. Варьирование формы, размеров, полярности, степени гидратации, количества образованных головными группами водородных связей приводит к изменению сил отталкивания в полярной области.

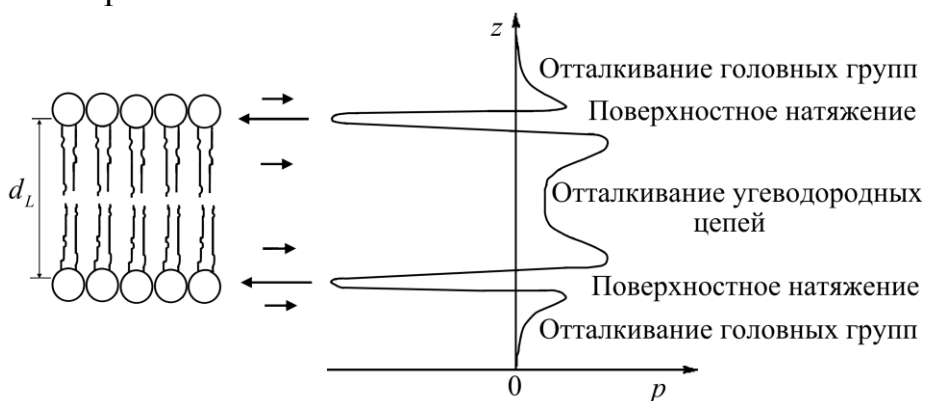


Рис. 1.19. Профиль латерального давления p в липидном бислое

Величина поверхностного натяжения σ для липидных систем составляет порядка 50 мН/м. Расстояние между границами раздела «полярная область – гидрофобная область» (гидрофобная толщина бислоя d_L) составляет примерно 3 нм. Поверхностное натяжение, возникающее на двух границах бислоя, должно быть уравновешено давлением гидрофобной части бислоя. Таким образом, плотность латерального давления (сила на единицу площади) бислоя равна $2\sigma/d_L$, что численно составляет более 300 атм.

Изменение латеральных сил в монослое может вызывать изменение конформации встроенных в бислой белков, что, в свою очередь, может привести к неспецифической модификации их функций. Например, предполагается, что латеральные силы управляют функционированием механочувствительных ионных каналов.

Подвижность молекул в бислое. Молекулы липидов в бислое обладают высокой подвижностью. Динамические свойства бислоя определяются положением липидных молекул (трансляционный порядок), их ориентацией (вращательный порядок) и конфигурацией химических связей в каждой молекуле липида (конфигурационный или конформационный порядок). Трансляционный порядок характеризуется частотой перескоков молекул из одного положения в соседнее в единицу времени. Обычно вращательный порядок определяется угловой скоростью вращательного движения молекулы вокруг длинной оси, перпендикулярной плоскости бислоя.

Очевидно, что характер молекулярной подвижности определяется анизотропной структурой липидного бислоя и межмолекулярными взаимодействиями в нем. Обычно, выделяют следующие основные типы молекулярного движения в мембране: латеральное, вращательное и «флип-флоп» (рис. 1.20).

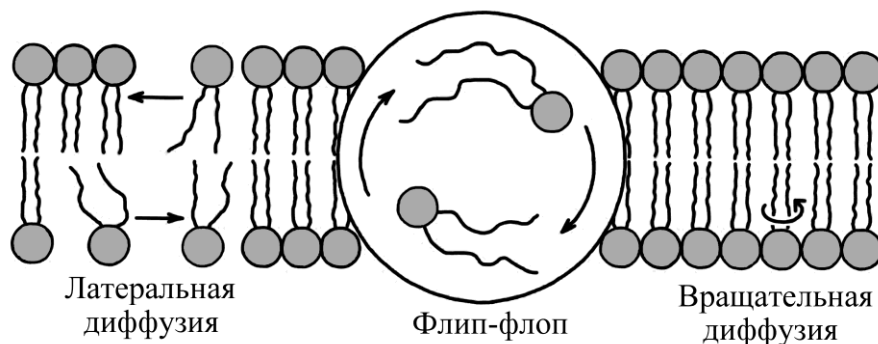


Рис. 1.20. Виды молекулярного движения в мембране

Под латеральной диффузией понимают хаотическое тепловое перемещение молекул липидов в плоскости бислоя (частота 10^8 – 10^4 с⁻¹). Скорость латеральной диффузии зависит от липидного состава мембран и температуры. Понижение температуры и увеличение содержания холестерина приводят к уменьшению скорости латеральной диффузии.

В бислое молекулы липидов интенсивно вращаются вокруг своей длинной оси (частота 10^{10} – 10^7 с⁻¹). Движение «флип-флоп», по существу, представляет собой специальный случай вращательной динамики и характеризует переход молекулы липида из одного монослоя мембраны в другой (частота 10^{-2} – 10^{-6} с⁻¹). В качестве примера молекулярных движений липидов в бислое, определяющих конфигурационный порядок, можно привести колебания СН₂-групп (частота $\sim 10^{14}$ с⁻¹) и *транс-гош*-изомеризацию углеводородных цепей (частота 10^{11} – 10^8 с⁻¹).

Количественной характеристикой степени упорядоченности липидных цепей в бислое является параметр порядка S . Параметр порядка можно определить экспериментально с применением ЯМР-спектроскопии или анизотропии поляризации флуоресценции. Параметр порядка определяется как

$$S = \frac{1}{2}(3\langle \cos^2 \varphi \rangle - 1), \quad (1.25)$$

где φ – угол между длинной осью молекулы и нормалью к бислою. Угловые скобки означают усреднение по всем молекулам. Для идеально упорядоченного образца (параллельная ориентация молекул и нормали) параметр порядка $S = 1$, тогда как для изотропного образца $S = 0$. Параметр порядка липидного бислоя характеризуется величиной от 0,3 до 0,8 в зависимости от типа головных групп молекул липидов, длины и степени

ненасыщенности ацильных цепей, температуры.

Структурные состояния липидного бислоя. Структурное состояние липидов в бислое определяется как ламеллярная липидная бислойная фаза. С точки зрения динамического состояния липидный бислой может находиться в различном агрегатном состоянии: твердом (конденсированном, гелевом) L_β или жидкокристаллическом (жидком) L_α (рис. 1.21). Жидкая ламеллярная фаза L_α является базовым типом бислойной структуры биологических мембран.

Ламеллярная фаза L_β характеризуется высокой степенью упорядоченности (коэффициент латеральной диффузии молекул составляет $\sim 10^{-11}$ см² с⁻¹; малое количество *гош*-изомеров по сравнению с количеством *транс*-изомеров в углеводородных цепях). Для ламеллярной фазы L_α характерны высокая подвижность молекул (коэффициент латеральной диффузии $\sim 10^{-8}$ см² с⁻¹) и гораздо большее количество *гош*-изомеров в ацильных цепях, чем для фазы L_β .

В соответствии со степенью упорядоченности ламеллярную фазу L_α иногда разделяют на жидко-упорядоченную фазу (L_o) и жидко-неупорядоченную фазу (L_d). Например, введение в жидкую липидную фазу холестерина приводит к повышению упорядоченности липидных цепей (рис. 1.17). Фаза L_o имеет несколько более высокую упорядоченность по сравнению со свободной от холестерина фазой L_α (коэффициент латеральной диффузии примерно в два раза ниже) и отношение количества *гош*-изомеров к количеству *транс*-изомеров в ацильных цепях, сравнимое по величине с таковым для фазы L_β .

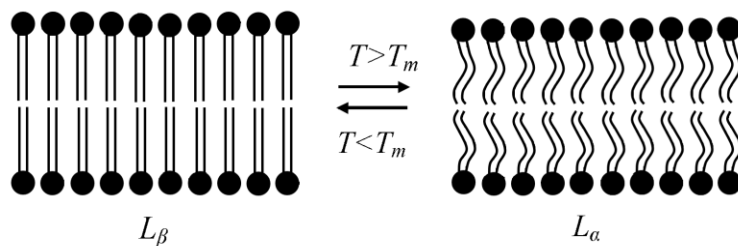


Рис. 1.21. Схематическое изображение ламеллярной фазы липидного бислоя.

T_m – температура главного фазового перехода

Переход из твердого (конденсированного) состояния L_β в жидкокристаллическое L_α (так называемый переход гель-жидкий кристалл или главный фазовый переход в бислое) может осуществляться при изменении температуры (рис. 1.21). Температура главного фазового перехода T_m

зависит от химического строения и состава липидов бислоя.

В липидных бислоях ламеллярная фаза часто имеет тенденцию фрагментироваться в малые домены (иногда состоящие только из нескольких тысяч или даже сотен молекул). Неравномерное распределение молекул, приводящее к образованию липидных доменов (кластеров) в бислое, реализуется вследствие наличия смеси различных липидов, различий липидных молекул по структуре полярных голов, по степени ненасыщенности и длине углеводородных цепей. В бислоях с липидным составом, моделирующим внешний монослой плазматической мембраны, при физиологических температурах установлено присутствие доменов размером ~3–40 нм. То есть, даже в отсутствие макроскопического фазового разделения бислоя, температурные флуктуации могут приводить к формированию липидных доменов со значительным временем жизни. Если гетерогенная популяция мембранных липидов разделена в домены, то в результате различия липидной упаковки между доменами возникает граница. Возникновение структурных различий внутри и вне домена приводит к различию физико-химических свойств, например, к различию доменов по высоте.

ГЛАВА 2. БЕЛКОВЫЙ КОМПОНЕНТ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

2.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

2.1.1. Функции белков в мембранах

Белки мембран вовлечены практически во все процессы в клетках. Список функций мембранных белков велик: транспорт ионов, метаболитов и макромолекул через мембраны, рецепция и передача сигналов, перенос электронов, прикрепление к внеклеточному матриксу, регулирование внутриклеточного везикулярного транспорта, контроль липидного состава мембран и т. д.

Мембранные белки имеют общее свойство – часть их структуры встраивается в липидный бислой. Часть мембранных белков погружена в липидный бислой, остальные белки ассоциированы с экзоплазматическим или цитозольным монослоями бислоя. Многие из этих белков имеют ряд общих черт в строении и могут быть сгруппированы в суперсемейства.

2.1.2. Классы мембранных белков

Имеется большое количество прямых доказательств внедрения белков в липидный бислой в биомембранах. К ним относятся данные, полученные с применением электронной микроскопии, при изучении растворимо-

сти белков в различных растворителях, липид-зависимой активности ферментов биомембран, ковалентного сшивания белков с липидами в мембранах и т.д. Мембранные белки можно разделить на три большие категории в зависимости от механизмов взаимодействия с липидным бислоем: интегральные (трансмембранные), периферические (белок-прикрепленные) и липид-закоренные. Большинство биологических мембран содержит все типы мембранных белков (рис. 2.1).

Интегральные белки составляют 70–80 % от числа всех мембранных белков. К этим белкам относятся антигены, рецепторы, транспортные белки и т. д.

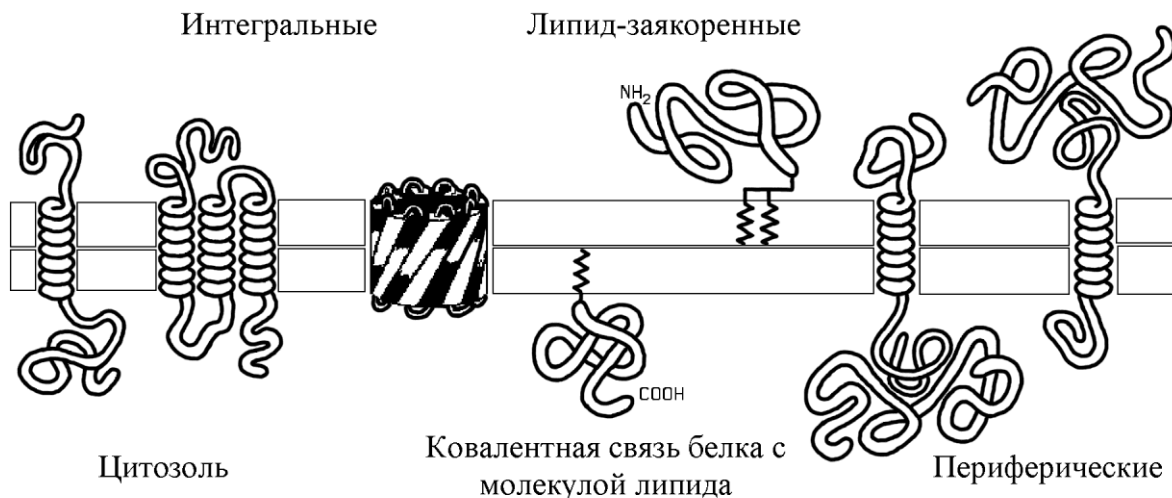


Рис. 2.1. Расположение белков в мембранах

Интегральные мембранные белки пересекают липидный бислой, а периферические мембранные белки ассоциированы с внутренней и внешней сторонами бислоя. Трансмембранные сегменты интегральных мембранных белков взаимодействуют с углеводородными цепями липидного бислоя и имеют небольшое число гидрофильных остатков, экспонированных на их трансмембранных поверхностях.

Периферические мембранные белки подобно другим водорастворимым белкам имеют гидрофильные остатки, экспонированные на их поверхностях, и сердцевину из гидрофобных остатков. Периферические и интегральные белки можно экстрагировать с использованием различных растворителей. Щелочные растворители растворяют большинство периферических белков, расположенных за пределами бислоя. Детергенты, которые взаимодействуют с гидрофобными трансмембранными сегментами, растворяют интегральные мембранные белки.

Трансмембранные сегменты интегральных мембранных белков, которые пересекают бислой, сворачиваются в α -спирали или в β -нити. Амидные и карбонильные группы полипептидного остова в пределах бислоя

связаны водородными связями, что минимизирует энергию, требуемую для погружения остова в гидрофобную часть липидного бислоя.

Интегральные мембранные белки имеют один или более сегментов, которые внедрены в фосфолипидный бислой. Эти белки заякорены в липидном бислое через полипептидную цепь. Большинство интегральных белков содержат аминокислоты с гидрофобными боковыми цепями, которые взаимодействуют с ацильными группами жирных кислот мембранных фосфолипидов. Эти трансмембранные белки содержат один или более доменов, пересекающих мембрану, а также петли длиной от четырех до нескольких сотен аминокислотных остатков, погруженных в водную среду по обе стороны бислоя.

Трансмембранная α -спираль – основная структурная единица белков мембран эукариотов и белков внутренних мембран прокариотов. Одиночные или упакованные в пучки трансмембранные α -спирали характеризуются широким набором функций и особенностей строения. α -Спирали найдены в бактериородопсине, в семействе родственных семиспиральных рецепторов, насосах, переносчиках, ионных каналах, цитохромоксидазе и фотосинтетическом реакционном центре. Белки с α -спиральными трансмембранными сегментами являются более многочисленными и функционально более разнообразными, чем белки с β -нитеями.

Белки с пучками α -спиралей найдены во всех клеточных мембранах. Белки с пучками β -нитей, найденные во внешних мембранах грамотрицательных бактерий, митохондриях и хлоропластах, формируют жесткие поры, известные как β -баррели (пассивные, но субстратспецифические диффузионные поры для малых молекул). Белки порины состоят из β -нитей, формирующих баррели, с гидрофобной внешней поверхностью и каналом внутри. β -Баррельные белки, экспонированные на поверхности бактериальных клеток, используются как начальные места прикрепления бактериофагов и бактериальных токсинов.

Многие трансмембранные белки содержат большое число субъединиц, ассоциированных в плоскости бислоя. Число β -нитей, как и число α -спиралей, может быть очень большим (рис. 2.2).

Бактериальные и митохондриальные порины имеют три идентичные субъединицы. Многие ионные каналы формируются из четырех одинаковых или идентичных субъединиц. Рецепторы ацетилхолина являются пентамерами из идентичных или родственных субъединиц. Вместе они формируют катионный канал, который открывается, если ацетилхолин связывается с двумя α -субъединицами. Бактериальная цитохромоксидаза является ансамблем из четырех различных субъединиц с общими 22 трансмембранными спиралями. Фотосинтетический реакционный центр хлоропласта содержит три спиральные субъединицы.

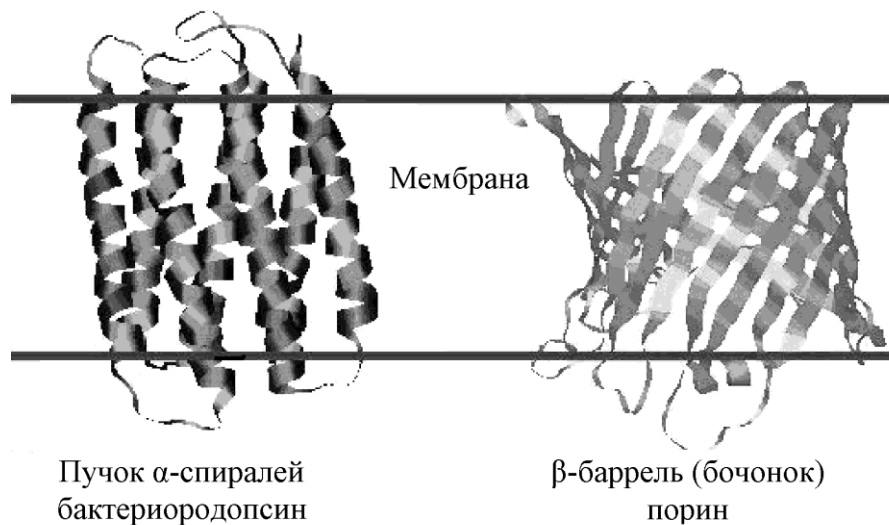


Рис. 2.2. Два класса интегральных мембранных белков

Периферические мембранные белки взаимодействуют с экспонированными участками интегральных мембранных белков или с полярными головными группами липидов. Обычно связывание со специфическим местом на мембране приводит к активации белка. Примерами периферических белков, локализованных на цитозольной (внутренней) стороне плазматической мембраны, служат белки цитоскелета эритроцитов – спектрин и актин, а также фермент протеинкиназа С. На внешней (экзоплазматической) стороне мембраны локализованы некоторые белки внеклеточного матрикса. Периферические белки связываются с обеими поверхностями мембраны не ковалентными связями.

Ряд мембранных белков не удаляются из мембраны при мягкой обработке детергентами. Эти белки ковалентно связаны с жирными кислотами, заякоренными в один из монослоев мембраны. Но полипептидная цепь белка в фосфолипидный бислой не внедряется.

2.1.3. Геометрия расположения белковых молекул в бислое

В зависимости от способа пересечения бислоя интегральные белки делятся на монотопические, битопические и политопические.

Монотопические белки внедрены только в один из монослоев бислоя, то есть экспонированы с одной стороны мембраны. У битопических белков (многие рецепторы) один сегмент пересекает мембрану. Трансмембранный домен (сегмент), как правило, составляет примерно 5–10 % массы всего белка. Внеклеточный домен может нести углеводные цепи, которые могут быть N-связанными (при связывании с аспарагином) или О-связанными (при связывании с серином, треонином или гидроксизином). Такие домены играют роль маркеров клеточной

поверхности, факторов адгезии (например, интегрин) или рецепторов. Цитоплазматические домены играют роль в клеточной сигнализации (например, рецепторная тирозинкиназа) или могут связываться с цитоскелетом.

Полипептидная цепь полипептических белков пересекает мембрану более одного раза (каналы, некоторые рецепторы, бактериальный фотосинтетический реакционный центр). Возможны различные комбинации расположения N- и С-окончаний по обе стороны мембраны. Однако при четном числе трансмембранных сегментов оба типа окончаний будут располагаться только с одной стороны мембраны (цитоплазматической или экзоплазматической), при нечетном числе трансмембранных сегментов оба типа окончаний – с разных сторон. Масса встроенных в мембрану сегментов для некоторых белков может превышать 60 % от общей массы белка.

2.1.4. Содержание белков в мембранах

Во всех биологических мембранах присутствуют белки. Их содержание в мембранах колеблется от 20 % до 75 % в зависимости от типа клеток и типа организма.

Мембранные белки составляют треть протеома клетки. Набор белков в мембране зависит от типа мембраны и типа клеток. Число белков данного типа в клетках варьирует от нескольких сотен до нескольких миллионов копий. Примеры идентифицированных мембранных белков в эритроцитах человека приведены в табл. 2.1.

Таблица 2.1

Экспрессия мембранных белков в эритроцитах человека

Интегральный мембранный белок	Число молекул в клетке (мембране)
Белок полосы 3	1000000
Гликофорин А	1000000
Белок полосы 7	300000
Транспортер глюкозы 1	300000
Аквапорин-1	200000
Гликофорин С	50000
Транспортер мочевины	14000
Кальцийтранспортирующая АТФаза 1	4000
Натрий/калиевая АТФаза	400

2.2. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ИНТЕГРАЛЬНЫХ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

По структуре мембранные белки проще и менее вариабельны, чем водорастворимые белки. Во всем наборе мембранных белков до сих пор от-

крыты только две основные архитектурные особенности: α -спирали (и их пучки) и β -нити (β -баррели). Общим для этих двух основных структурных форм интегральных мембранных белков является образование максимально возможного числа водородных связей группами атомов пептидных связей, когда полипептидная цепь находится в гидрофобном окружении. При отсутствии рядом молекул воды водородные связи могут образовываться только в пределах самой полипептидной цепи, и имеются только два возможных способа такой реализации для погруженных в мембрану частей полипептидных цепей – формировать или α -спирали, или β -нити.

Хотя боковые группы аминокислотных остатков могут быть гидрофобными, заряды на атомах пептидной связи перераспределены (рис. 2.3) и, следовательно, имеют тенденцию к формированию водородных связей.

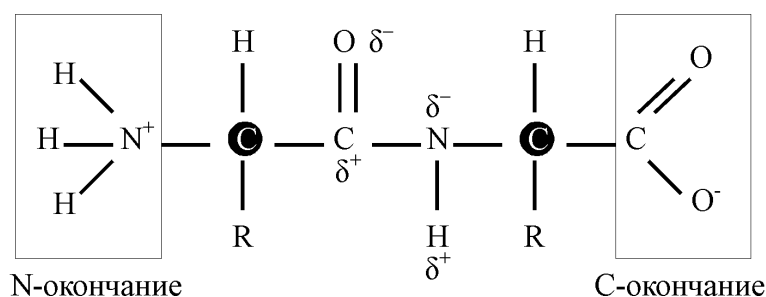


Рис. 2.3. Распределение зарядов на атомах пептидной связи

В то же время в середине липидного бислоя нет доноров или акцепторов водородной связи. Дипольный момент пептидной связи равен 3,5 Д. Если трансмембранный сегмент представляет собой α -спиральную конформацию, то все гидрофильные группы формируют водородные связи друг с другом, в то время как гидрофобные боковые заместители выступают на поверхности спирали в сторону углеводородных хвостов липидных молекул. Атомы каждой пептидной связи участвуют в образовании водородных связей с атомами других пептидных связей (рис. 2.4).

В каждом сегменте, пересекающем бислой, содержание заряженных или полярных групп, контактирующих с липидами, должно быть минимизировано. Чтобы избежать контакта с липидами, полярные амиды и атомы карбониллов пептидной связи погружены внутрь α -спирали или β -слоя. Во многих трансмембранных сегментах остатки ароматических аминокислот локализованы, как правило, в глицерольной области липидного бислоя. α -Спираль в бислое содержит от 22 до 25 остатков аминокислот, а β -нить – 10 остатков. Если толщина гидрофобной сердцевины бислоя равна 33 Å, то минимальное число аминокислот в α -спирали будет равно ~22 (длина участка полипептидной цепи, приходящаяся на одну аминокислоту, рав-

на 1,5 Å).

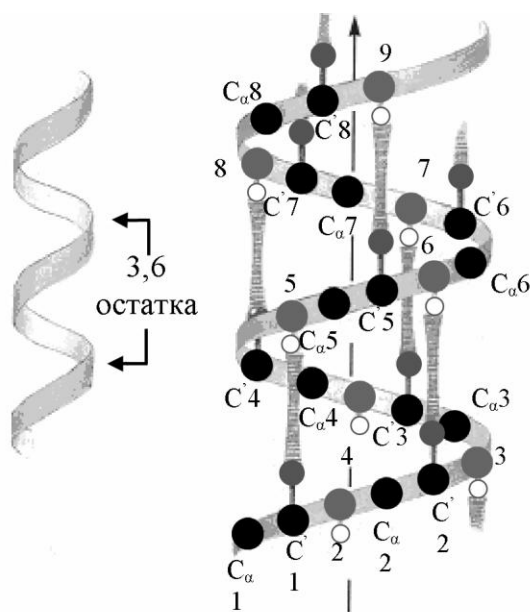


Рис. 2.4. Структура α -спирали

Трансmemбранные последовательности аминокислотных остатков в интегральных мембранных белках обычно идентифицируются как гидрофобные последовательности. Индекс гидрофобности для отдельной аминокислоты рассчитывается как величина энергии, необходимой для переноса аминокислоты из органического растворителя в воду. Стабильность трансmemбранной спирали характеризуется величиной изменения свободной энергии при переносе спирали из водной фазы в бислой.

Подобный анализ применим для белков, типа гликофорина, у которого единственная трансmemбранная спираль имеет наиболее неполярные боковые заместители, окруженные углеводородными цепями липидов. Если белок имеет несколько трансmemбранных спиралей, оценка гидрофобных параметров может не соответствовать действительности, потому что спирали могут группироваться вместе, чтобы окружать гидрофильный канал, выстланный зарядами и боковыми полярными заместителями.

Тем не менее индекс гидрофобности широко используется для определения наличия α -спиралей в мембране. Рассмотрим для примера трансmemбранный белок, у которого имеются четыре α -спирали (рис. 2.5, б). Для этого белка зависимость свободной энергии переноса аминокислот из мембраны в воду от положения (номера) аминокислотного остатка в полипептидной цепи имеет вид, представленный на рис. 2.5, а. Наличие четырех положительных пиков на графике свидетельствует о присутствии в структуре белка четырех α -спиралей.

2.2.1. Структура и свойства α -спиральных интегральных белков

α -Спирали формируются, главным образом, из аминокислот с неполярными боковыми группами. Первым охарактеризованным интегральным белком был гликофорин мембран эритроцитов (рис. 2.6). В ЯМР-экспериментах установлено, что единственный трансмембранный сегмент гликофорина является α -спиралью.

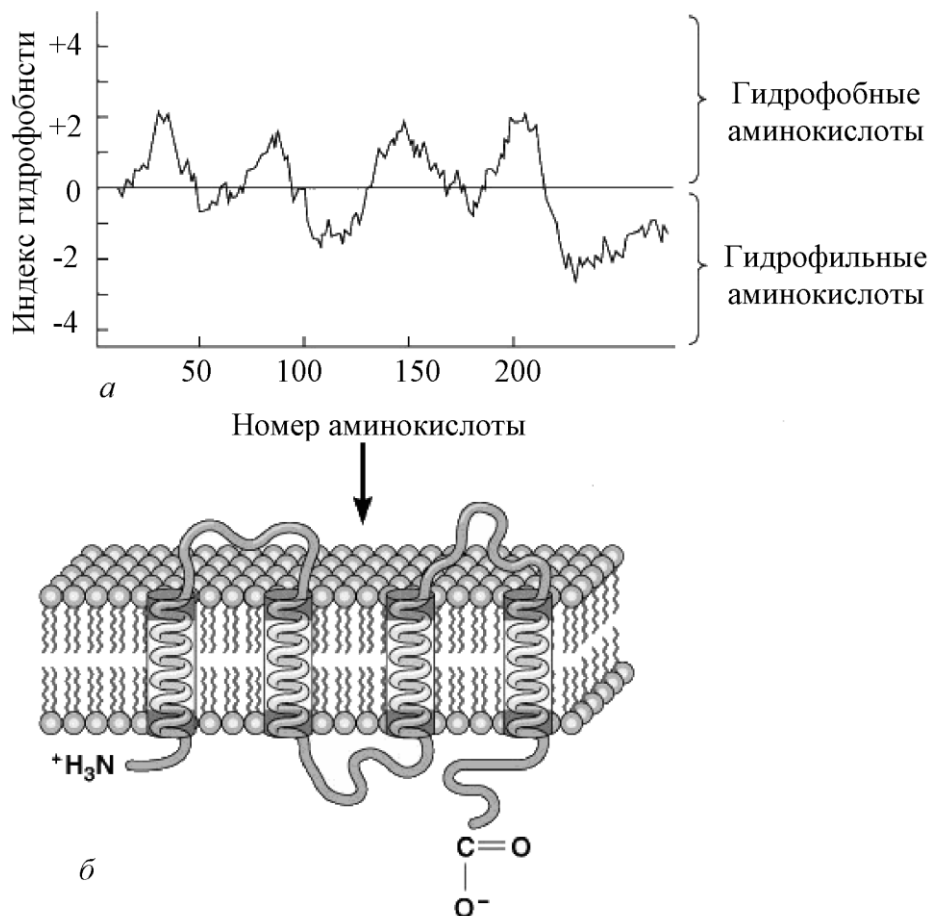


Рис. 2.5. Индекс гидрофобности (а) для интегрального белка типа (б)

Белки типа гликофорина содержат три домена – один гидрофобный (в виде α -спирали) и два гидрофильных (по обе стороны мембраны). Спираль взаимодействует с ацильными цепями липидов. Имеются доказательства, подтверждающие, что бислой пересекает одиночный сегмент. Например, протеолитические ферменты могут расщеплять трансмембранный полипептидный сегмент в предсказываемых местах. Потенциальные места гликозилирования белка локализованы снаружи клетки. Химические метки или мечение антителами позволяют идентифицировать части белков внутри или снаружи клеток.

По аналогии с гликофорином принимается, что одиночные гидрофоб-

ные сегменты длиной примерно в 25 аминокислотных остатков в других трансмембранных белках также свернуты в α -спирали. Белки с пучками α -спиралей имеют разнообразные размеры и формы: от белков только с единственной трансмембранной α -спиралью, соединяющей часто довольно большие водорастворимые домены на противоположных сторонах мембраны, до белков с 20 или большим числом трансмембранных спиралей, формирующих плотно упакованные пучки в мембранах.

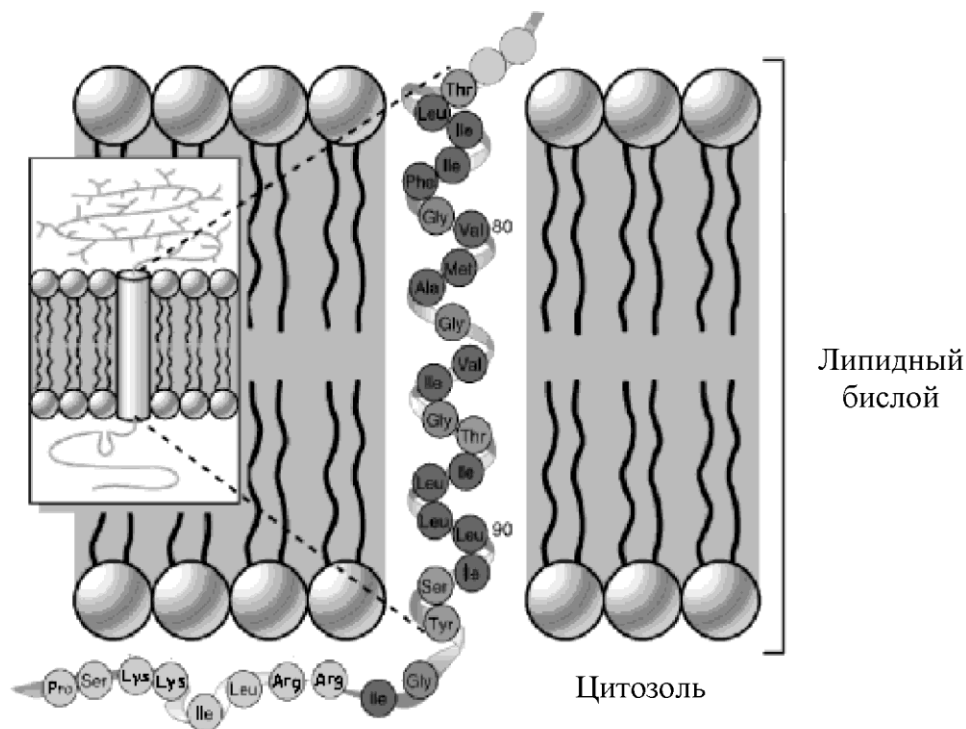


Рис. 2.6. α -Спираль гликофорина в бислое

Из взаимодействующих субъединиц могут быть сформированы большие ансамбли трансмембранных спиралей, например, цитохромоксидаза митохондрий быка имеет 28 трансмембранных α -спиралей, распределенных среди 13 субъединиц.

Трехмерные структуры мембранных белков имеют ряд общих черт. Так, трансмембранные спирали построены, главным образом, из неполярных аминокислот, таких как лейцин, изолейцин, аланин, валин и фенилаланин. Эти остатки особенно часто встречаются на поверхностях молекул белка, экспонируемых к липидам. Разбросанные среди неполярных остатков полярные и даже заряженные остатки часто избираются по важным функциональным причинам и имеют тенденцию располагаться внутри спирального пучка, а не экспонироваться к окружающим молекулам липидов. Края трансмембранных спиралей (те части спиралей, которые располагаются в областях головных групп липидов), как правило, обогащены триптофаном и тирозином. Молекула белка ориентируется в мембране та-

ким образом, что его гидрофобная часть (слой) выстраивается вдоль неполярных липидных хвостов.

Важная особенность трансмембранных спиралей состоит в том, что части белка, экспонированные в цитоплазму, обогащены положительно заряженными аминокислотными остатками – лизином и аргинином, а части белка, выступающие во внеклеточное пространство, содержат малое количество этих аминокислот. Такое асимметричное распределение часто обозначается, как «положительный заряд внутри» – правило расположения положительных зарядов с внутренней стороны мембраны, действительное почти для всех мембранных белков со спиральными пучками независимо от организма и типа мембранных систем (ЭР, аппарат Гольджи, плазматическая мембрана, внутренняя мембрана митохондрий, тилакоидные мембраны).

Термин «топология мембранных белков» объединяет все способы пересечения мембраны полипептидной цепью в обоих направлениях, а в топологической модели мембраны показана приблизительная локализация трансмембранных спиралей в белковой цепи и их ориентация внутрь/наружу через мембрану (рис. 2.7). Правило расположения положительных зарядов указывает на то, что места в топологической модели с высоким содержанием остатков лизина и аргинина обращены к цитозолю (или к соответствующему компартменту в митохондриях и хлоропластах).

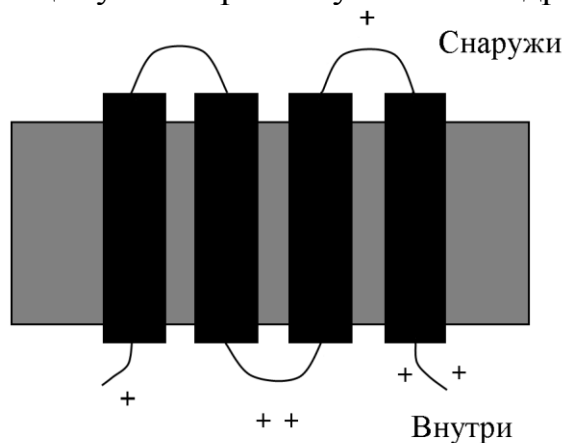


Рис. 2.7. Топологическая модель мембранного белка

Части мембраны, занимаемые головными группами липидов (слои с внешней стороны каждого монослоя толщиной примерно $15 \text{ \AA}$), являются сложно организованными – головные группы липидов участвуют в нескольких типах взаимодействий, включая электростатические и ван-дер-ваальсовы взаимодействия, а также образование водородных связей.

Водорастворимые белки, в целом, имеют архитектуру, подобную архитектуре спиральных мембранных белков. Однако трансмембранные спиральи мембранных белков упакованы, в среднем, более плотно, чем спира-

ли в растворимых белках. В соответствии с этим, небольшие по размерам аминокислотные остатки (глицин, аланин) и слабо полярные аминокислотные остатки (серин, треонин и цистеин) гораздо чаще встречаются в спиральных мембранных белков.

Мембранные белки плотно упакованы, тем не менее они содержат многочисленные полости и карманы. Эти дефекты упаковки обеспечивают пространство для связывания лигандов, простетических групп, липидов и молекул воды. Многочисленные дефекты упаковки найдены и у водорастворимых белков.

Политопическую архитектуру некоторых мембранных белков модулируют не- α -спиральные элементы. Часто такими компонентами являются 3_{10} -спирали (компактные повороты), π -спирали (широкие повороты) и внутриспиральные кинки (изломы). 3_{10} -Спирали характеризуются водородными связями между i и $i + 3$ аминокислотными остатками, а π -спирали – между i и $i + 5$ аминокислотными остатками. Количество атомов в цикле ($O^{\cdots}H-N-C'-C^{\alpha}-N-C'$), замыкаемом водородной связью в 3_{10} -спирали, равно десяти. В α -спирали водородные связи образуются между i и $i + 4$ аминокислотными остатками.

α -Спирали (и их пучки) расположены в бислое не перпендикулярно латеральной плоскости, а под некоторым углом наклона η (рис. 2.8). Анализ распределений углов наклона α -спиралей большого числа битопических трансмембранных белков показывает, что предпочтительные углы наклона равны $\sim 20^\circ$ и $\sim 160^\circ$. В пучках углы наклона α -спиралей могут отличаться от указанных величин.

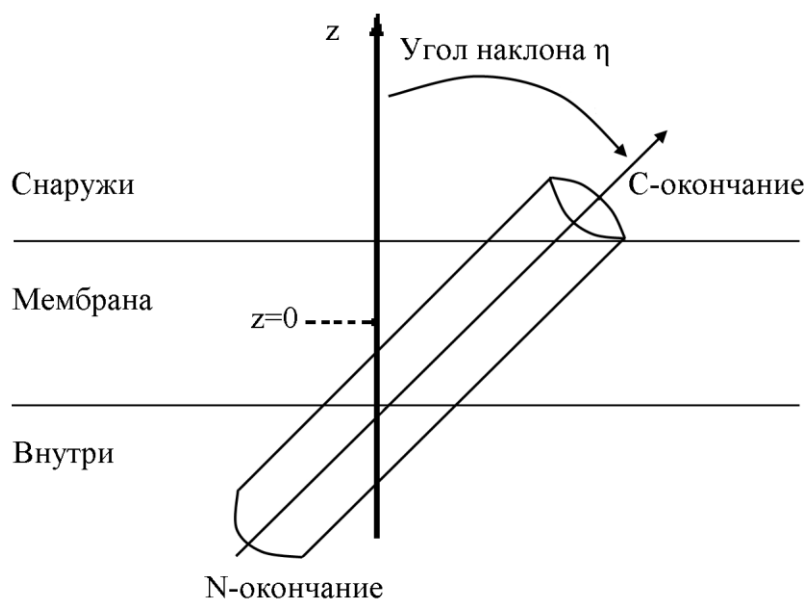


Рис. 2.8. Наклон α -спирали в липидном бислое

Аминокислотная последовательность типичной спирали, пересекающей мембрану, должна быть гидрофобной, главным образом, для того, чтобы устойчиво локализоваться в бислое, а также быть структурой, свойства которой позволяют ей специфически ассоциировать с соседними спиралями в свернутой структуре. Сравнение последовательностей аминокислот в спиральных участках мембранных и растворимых белков показывает, что типы аминокислот, обеспечивающих взаимодействие спиралей в мембранных белках, намного разнообразнее, чем в растворимых белках.

Спираль-спиральному взаимодействию в мембранных белках благоприятствует ряд факторов: 1) наличие в белках мотивов GxxxG (глициновые застёжки) – часто встречающихся последовательностей аминокислотных остатков (например – димер гликофорина); 2) водородные связи типа $C^{\alpha}-H \cdots O$ между остовами полипептидных цепей.

2.2.2. Структура и свойства интегральных белков, содержащих β -нити

Структуру интегральных мембранных белков, содержащих β -нити, рассмотрим на примере широко распространенного класса белков, называемых поринами. Порины найдены во внешних мембранах митохондрий, грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli*, и хлоропластов. Внешние мембраны защищают кишечные бактерии от опасных для них агентов (например, антибиотиков, желчных солей и протеаз) и обеспечивают поглощение и удаление малых гидрофильных молекул, включая питательные вещества. Порины в *E. coli* формируют каналы для прохождения дисахаридов и других малых молекул, включая фосфат.

Образование водородных связей в интегральных мембранных белках с β -нитеями иллюстрируется на рис. 2.9.

Трансмембранным структурным элементом в β -барреле является двухнитевая β -складчатая лента с антипараллельными β -нитеями. Лента стабилизируется водородными связями между β -нитеями. Планарность пептидной связи обеспечивает складчатую форму для β -ленты. Боковые заместители аминокислот (на рис. 2.9 обозначены буквой R) выступают выше и ниже плоскости ленты. На рис. 2.9, в показана также модель структуры молекулы главного комплекса гистосовместимости класса I. β -Нити в этой молекуле (как и во всех других белках с β -нитеями) направлены антипараллельно. β -Нити связаны водородными связями. В молекуле этого белка восемь β -нитей формируют углубление, в котором расположены две α -спирали.

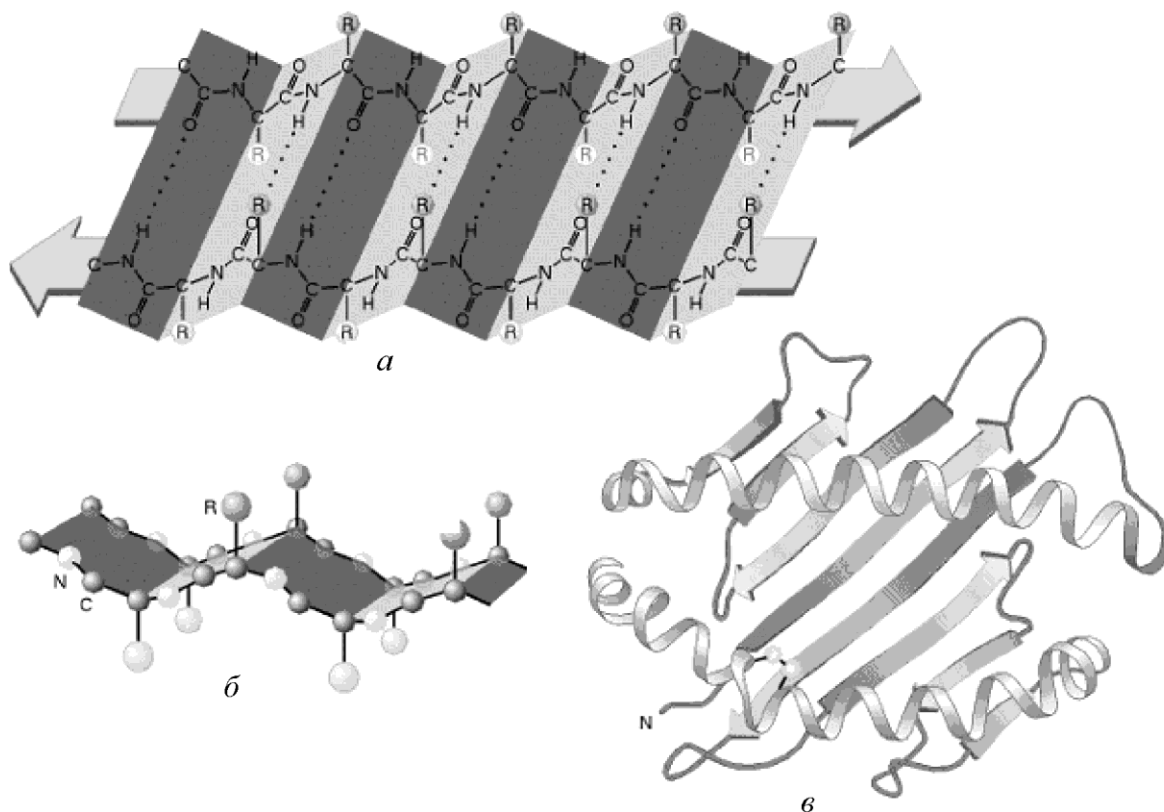


Рис. 2.9. Структура β -нитей в интегральных белках:
 а – простая двухнитевая β -складчатая лента с антипараллельными β -
 нитями, б – вид β -ленты сбоку, в – модель структуры молекулы глав-
 ного комплекса гистосовместимости класса I

2.2.3. Периферические мембранные белки

Установлены три способа связывания периферических белков с поверхностями мембраны: взаимодействие периферических белков с интегральными белками, взаимодействие периферических белков с липидами мембран и частичное встраивание периферического белка в липидный бислой. Периферические белки локализованы как на цитозольной, так и на экстраплазматической поверхностях мембраны и связаны с гидрофильными группами липидов и/или других белков не ковалентно. Периферические белки на внешней поверхности плазматической мембраны и экстраплазматические домены интегральных мембранных белков часто прикрепляются в экстраклеточному матриксу или клеточной стенке, окружающим бактериальные и растительные клетки, соответственно. Примерами периферических белков и их комплексов являются спектрин и альдолаза мембраны эритроцитов, рибосомы гранулярного ЭР и другие.

Взаимодействие периферических белков с липидами. Часть периферических белков связывается электростатически с мембранными липи-

дами. У мембранного интерфейса положительные заряды основных аминокислотных остатков белка взаимодействуют с отрицательными зарядами головных групп фосфолипидов бислоя.

Механизмы взаимодействий белок–липид еще полностью не исследованы. Но уже известно, например, что аннексины – семейство кальций-связывающих белков, принимающих участие в реакциях мембранного слияния, тесно связываются с ФС. Моторный белок миозин-1 также связывается с ФС. Связывание водорастворимых ферментов (например, фосфолипаз, киназ или фосфатаз) с поверхностью мембраны в ряде случаев приводит к их активации.

Анализ геномной последовательности выявил несколько широко распространенных липид-связывающих доменов в белках (табл. 2.2).

Таблица 2.2

Распространенные липид-связывающие домены в белках

Домен	Лиганд	Распространенные белки с данным доменом
RH	ФИФ ₂ , ФИФ ₃	Фосфолипаза C _γ 1, протеинкиназа B, плекстрин
C2	Кислые фосфолипиды	Протеинкиназа C, ФИ-3 киназа, фосфолипаза, PTEN фосфатаза
Анкириновый повтор	ФС	Анкирин
FERM	ФИФ ₂	Белок полосы 4.1, эзрин, радиксин, моезин (белки, играющие роль в связывании актинового цитоскелета с плазматической мембраной)

Например, домен плекстриновой гомологии (RH), который связывает два типа фосфорилированных фосфатидилинозитолов, является одиннадцатым из числа наиболее распространенных доменов протеинов, кодируемых в геноме человека. Этот домен был первоначально найден в плекстрине – белке тромбоцитов. Высокая частота встречаемости доменов RH указывает на то, что белки, локализованные у поверхности мембраны, выполняют многие важные функции. Другие распространенные липид-связывающие домены – это C2 и FERM. Первоначально открытый в протеинкиназе C домен C2 служит мишенью для различных киназ, фосфатаз и фосфолипаз.

Известно, что фосфолипазы гидролизуют ковалентные связи в головных группах фосфолипидов. Эти ферменты играют важную роль в трансдукции сигналов в клетках, в деградации мембран поврежденных или старых клеток и являются активными молекулами многих змеиных ядов. Механизм действия фосфолипазы A₂ иллюстрирует, как водорастворимые ферменты могут обратимо взаимодействовать с мембранами и катализировать реакции у интерфейса водная фаза – поверхность бислоя (рис. 2.10).

Когда этот фермент находится в водном растворе, его Ca^{2+} -связывающий активный центр погружен в канал, выстланный гидрофобными аминокислотами. Фосфолипаза A_2 связывается с наибольшим сродством с бислоями, сформированными из отрицательно заряженных фосфолипидов (например, ФЭ). На структурной модели фермента показана поверхность взаимодействия фермента с мембраной. Эта поверхность связывания содержит положительно заряженные остатки аргинина и лизина, окружающие полость каталитического активного центра, в которой связывается субстрат (липид).

При посадке фермента на мембрану положительно заряженные аминокислотные остатки взаимодействуют с отрицательно заряженными полярными группами липидов на поверхности мембраны. Связывание фермента инициирует его конформационное изменение с открытием полости, выстланной гидрофобными аминокислотами. Как только фосфолипид перемещается в полость, ассоциированные с ферментом ионы Ca^{2+} связываются с фосфатом головной группы, позиционируя эфирную связь, которая затем расщепляется в активном центре.

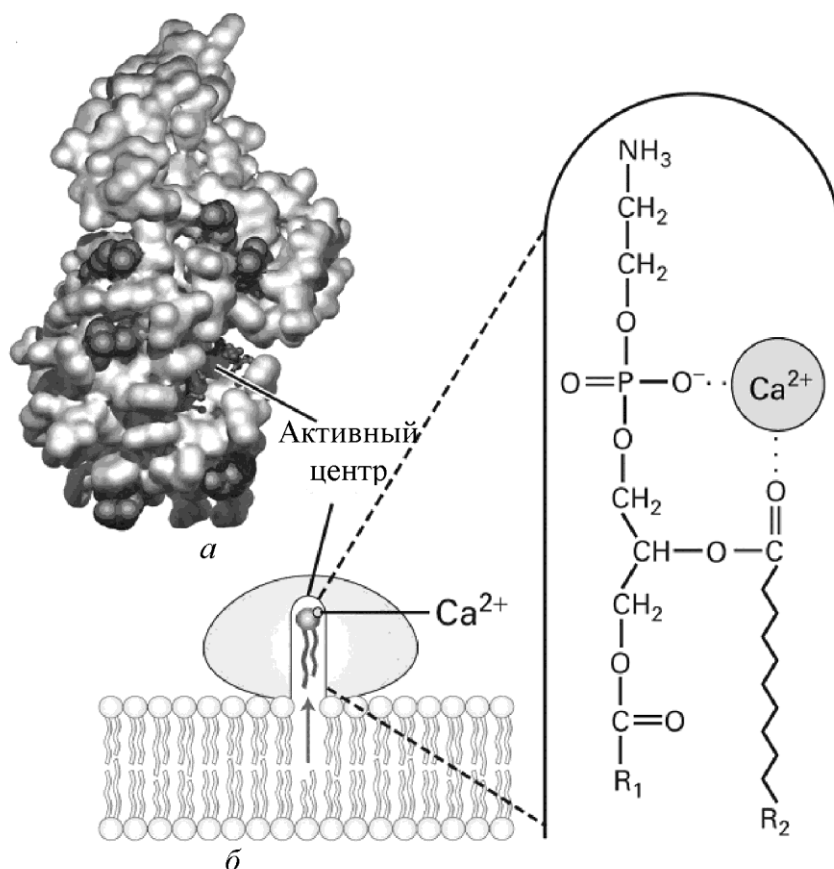


Рис. 2.10. Схема действия фосфолипазы A_2 .
 а – модель фосфолипазы A_2 , б – схема катализа фосфолипазой A_2

Частичное проникновение в липидный бислой. В течение многих лет считалось, что белки либо пересекают мембрану (один или более раз), либо связаны с поверхностью мембраны. Однако некоторые пептидные яды, такие как меллитин, встраиваются в монослой липидного бислоя, то есть частично проникают в липидный бислой. Гидрофобные α -спирали простагландин- H_2 -синтазы заякоривают фермент в мембранах, также частично проникая в липидный бислой.

Ассоциация периферических белков с интегральными белками. Многие периферические белки связаны прямо или косвенно с интегральными мембранными белками. Например, периферические белки связываются цитоплазматическими доменами интегральных мембранных белков, таких как катенин-связывающие трансмембранные адгезионные белки (кадгерины). Эти белок-белковые взаимодействия могут обеспечивать высокую специфичность и более высокое сродство, чем взаимодействие периферических белков с мембранными липидами. Белок-белковые взаимодействия также обеспечивают пути передачи информации через мембрану. Связывание лиганда экстраклеточным доменом трансмембранного рецептора может изменять конформацию его цитоплазматического домена, обеспечивая взаимодействие с цитоплазматическими, трансдуцирующими сигнал белками.

Периферические белки и мембранный цитоскелет. Мембранный скелет на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны эритроцитов иллюстрирует взаимодействие периферических и интегральных белков.

Два типа интегральных белков – анионный переносчик, белок полосы 3, и гликофорин – заякоривают двумерную сеть белков на мембрану. Главный компонент этой сети – спектрин – длинный, подвижный, тетрамерный, актин-связывающий белок. Другой связывающий белок, называемый анкирином, связывается с обоими белками: полосой 3 и спектрином. Всю эластичную спектриновую сеть связывают около 35000 узлов, соединяющих короткие актиновые филаменты и ассоциированные белки. Этот мембранный скелет укрепляет бислой, позволяет клетке эластично восстанавливать форму, после того как она деформируется при прохождении через узкие кровеносные капилляры.

2.3. ЛИПИД-ЗАЯКОРЕННЫЕ МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ

Липид-заякоренные белки являются растворимыми глобулярными белками, ковалентно связанными с жирными ацильными, полипренильными или гликозированными фосфатидилинозитольными группами (GPI), кото-

[illegible]

a – белок Thy-1 и некоторые гидролитические ферменты заякориваются гликозилфосфатидилинозитолом (GPI) с эктоплазматической стороны мембраны; *б* – некоторые цитозольные белки, вовлеченные в клеточную сигнализацию, например Ras, заякориваются с цитозольной стороны через фарнезилные и пальмитоильные группы; *в* – ряд цитозольных белков ассоциируется с мембраной через миристан или другие жирные кислоты, прикрепляемые к N-терминальному остатку глицина

51

2.3.1. Цитозольные липид-заякоренные белки

Некоторые белки заякорены с цитозольной стороны мембран углеводородными остатками, ковалентно прикрепленными к цистеину вблизи С-окончания: ацильная группа жирной кислоты, например, миристата или пальмитата, связывается амидной связью с N-терминальным остатком глицина. В этих белках N-терминальный якорь необходим для удерживания белка у мембраны и может играть важную роль в обеспечении функций мембран. Например, v-Src, мутантная форма внутриклеточной тирозинкиназы, онкогенна и может трансформировать клетки, только когда она содержит миристоилированное N-окончание.

Ацилирование является ковалентным прикреплением жирных кислот к белкам (рис. 2.12). В соответствии с типом связывания и типом жирных кислот, вовлеченных в ацилирование, разделяют два типа ацилирования: N-терминальное миристоилирование (N-ацилирование) и пальмитоилирование (S-ацилирование).

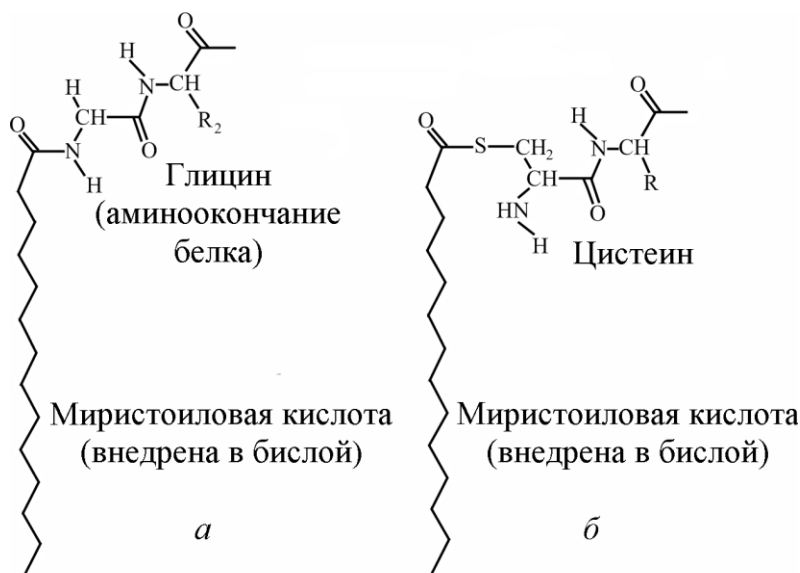


Рис. 2.12. Иллюстрация связывания миристоиловой кислоты с глицином (а) или цистеином (б) белка

Миристоилирование – реакция прикрепления миристата, остатка миристиновой кислоты, к аминогруппе глицина у N-окончания эукариотических и вирусных белков. Миристат добавляется к аминогруппе N-терминального глицина в процессе биосинтеза этих белков. N-терминальное миристоилирование – необратимый процесс. Миристоилирование происходит при наличии глицина у N-окончания, однако не все белки, имеющие глицин в таком положении, ацилируются. Миристоилирование также зависит от последовательности аминокислот в белке.

Предпочтительными субстратами являются белки с серином или треонином в шестом положении и основными аминокислотами в седьмом положении.

Внедрение одиночной ацильной цепи жирной кислоты в липидный бислой не обеспечивает достаточной устойчивости, поэтому только при дополнительном вкладе электростатического взаимодействия между основными боковыми цепями белков и головными группами фосфолипидов белок прикрепляется к мембране. При фосфорилировании некоторые миристоилированные белки могут отщепляться от мембран из-за изменения характера электростатических взаимодействий. Миристоилированные белки найдены в внутриклеточных компартментах, таких как ядро, эндоплазматический ретикулум, а также в плазматических мембранах. Миристоилированные белки участвуют в трансдукции сигнала. Наглядными примерами служат цАМФ-зависимая протеинкиназа А и некоторые киназы семейства Src, фосфатаза кальцинейрин и большинство α -субъединиц гетеротримерных G-белков.

Пальмитоилирование происходит при посттрансляционном прикреплении длинноцепочечных жирных кислот через тиоэфирную связь к цистеиновым остаткам белка (поэтому процесс обозначается как S-ацилирование).

По крайней мере, в нескольких белках пальмитоилирование обратимо, что обеспечивает регуляцию локализации белка в клетке и его функций. В S-ацилированных белках преобладающей жирной кислотой часто является пальмитиновая, но встречаются и другие жирные кислоты, такие как миристиновая, стеариновая, олеиновая и даже арахидоновая. Пальмитоилированные белки чаще всего присутствуют на клеточной поверхности, а также на органеллах секреторного или эндоцитарного путей. Таким же образом заякорены в липидный бислой рецепторы, сопряженные с G-белками. Небольшое число пальмитоилированных белков было обнаружено в других органеллах, например, митохондриях.

В отличие от ацилирования, при котором аминокислоты белка связываются напрямую с жирными кислотами, имеются и гидрофобные модификации белка, при которых жирные кислоты соединяются с белком через изопреноиды, холестерин или гликолипидный якорь.

Большую группу липид-заякоренных цитозольных белков составляют пренилированные белки, якорями у которых являются фарнезильные, геранилгеранильные и пренильные группы (рис. 2.13). Эти пренильные якоря построены из изопреновых мономеров.

Пренилированные белки формируются из изопреноидных единиц — фарнезила (содержит 15 атомов углерода) или геранилгеранила (20 атомов углерода) — через тиоэфирные связи с цистеином у C-окончания или

вблизи него. Эти белки подвергаются химической модификации в несколько этапов. Сначала якорный остаток формирует тиоэфирную связь с тиоловой группой цистеина, который является четвертым аминокислотным остатком от С-окончания белка. Модифицированный белок подвергается затем протеолизу и метилированию; в этих реакциях удаляются три терминальные аминокислотные остатка и добавляется метиловая группа к новому С-окончанию. В некоторых случаях ацильные группы пальмитата формируют тиоэфирные связи с ближайшими цистеиновыми остатками, которые повышают устойчивость прикрепления белка к мембране, обеспечивая дополнительные якоря.

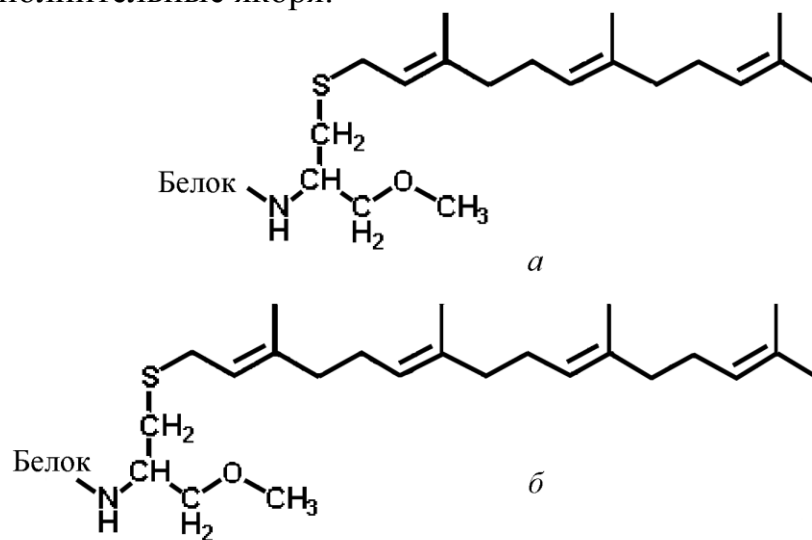


Рис. 2.13. Структура пренилированных белков:
а – S-фарнезил, б – S-геранилгеранил

Изопреноидный (фарнезильный) хвост добавляется посттрансляционно к боковой цепи остатка цистеина вблизи С-окончания многих белков, например, контролирующих трансдукцию сигнала, клеточную пролиферацию, адгезию, апоптоз и другие процессы в клетках. Белки семейства Rho обычно содержат геранилгеранил. Пренилированные белки распространены в клетках млекопитающих, где их число составляет примерно 2% от общего числа белков, а также в растениях и микроорганизмах.

2.3.2. Экзоплазматические липид-заякоренные белки

Некоторые белки у клеточной поверхности и тяжелые гликозилированные гликаны внеклеточного матрикса связываются с третьим типом липид-заякоренных белков. Эти белки заякорены с экзоплазматической стороны плазматической мембраны сложным гликозилированным липидом, который связывается с С-окончанием белка. Общим примером такого типа якоря служит гликозилфосфатидилинозитол (GPI). Структура GPI-якорей варьирует от клетки к клетке. Экзоплазматические липид-

заякоренные белки содержат обычно две ацильные группы, N-ацетилглюкозамин, маннозу и инозитол (рис. 2.11, *a*). Карбоксильная группа C-терминальной аминокислоты соединяется через амидную связь с ФЭ, который прикрепляется к олигосахариду, состоящему из остатков маннозы и одного остатка глюкозамина. Олигосахарид, в свою очередь, прикрепляется к ФИ, внедренному в мембрану. GPI-якоря обнаружены в клетках тканей животных. К этому классу белков относятся несколько ферментов, включая щелочную фосфатазу и ацетилхолинэстеразу, а также адгезионные белки и антигены клеточной поверхности (Thy-1). В опытах установлено, что наличие фосфолипидного якоря необходимо и достаточно для связывания этих белков с мембраной. Например, обработка клеток фосфолипазой C высвобождает гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки, включая белок Thy-1 и щелочную фосфатазу, с клеточной поверхности.

Хотя GPI-заякоренные белки и ацил-заякоренные белки расположены с противоположных сторон мембраны, оба типа белков концентрируется в липидных рафтах. Напротив, пренилированные белки в липидных рафтах не обнаружены.

2.4. УГЛЕВОДЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Углеводы – большой класс органических соединений, включающий моносахариды, олигосахариды и полисахариды. Мембранные углеводы составляют примерно 3 % веса клеточных мембран. Входящие в состав мембран углеводы ковалентно связаны либо с липидами, либо с белками. При ковалентном связывании углеводов с липидами образуются гликолипиды, а при связывании с белками – гликопротеины. Функции гликопротеинов и гликолипидов состоят в изменении механических свойств поверхности клеточной мембраны, заякоривании клетки в определенном положении, участии в локомоции, функционировании в качестве рецепторов при связывании специфических экстраклеточных соединений (лигандов) и т. д. Кроме того, углеводы участвуют в процессах узнавания нормальных и трансформированных клеток, вовлеченных в иммунный отклик, например, группа крови (A, B, AB или O) определяется присутствием или отсутствием мембранных гликолипидов у эритроцитов. Антигены ABO групп крови человека являются олигосахаридами. На поверхности мембран эритроцитов обнаружено свыше десятка различных олигосахаридов, ковалентно связанных как с белками, так и липидами мембран, характеризующих антигенные детерминанты групп крови. Олигосахариды могут содержать от 2 до 26 (иногда и больше) моносахаридных остатков различного химического строения. В природе встречается свыше 120 моносахаридов, однако в состав структурных единиц клеточных мембран (глико-

протеинов и гликолипидов) входят 9 моносахаридов.

Шесть из них – простые сахара: глюкоза (Glc), галактоза (Gal), манноза (Man), фукоза (Fuc), арабиноза (Ara), ксилоза (Xyl). В углеводные компоненты мембран входят также сахара, содержащие ацетиламиногруппы: N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и N-ацетилгалактозамин (GalNAc), а также сиаловые кислоты и фосфомоносахариды (например, манноза-6-фосфат).

Простые сахара, входящие в состав компонентов клеточных мембран, – это циклические структуры с 5 или 6 атомами в кольце, одним из которых является кислород. Сиаловые кислоты – производные нейраминной кислоты. В мембранах среди сиаловых кислот преобладает N-ацетилнейраминная кислота (NANA).

Для молекул каждого из моносахаридов характерна определенная структурная форма. Например, у глюкозы предпочтительной является шестичленная циклическая пиранозная форма (рис. 2.14). В растворе молекулы каждого вещества принимают наиболее устойчивую для них конформацию. В физиологическом растворе молекулы глюкозы имеют конформацию кресла (рис. 2.14, в), которая наиболее предпочтительна для всех названных циклических моносахаридов, находящихся в физиологическом растворе в пиранозной форме.

Моносахариды различаются по длине углеродной цепи, по числу гидроксильных групп и их расположению относительно плоскости кольца молекулы, наличию аминогруппы. На примере молекулы глюкозы показана общепринятая схема нумерации атомов углерода в молекулах циклических моносахаридов (рис. 2.14, а).

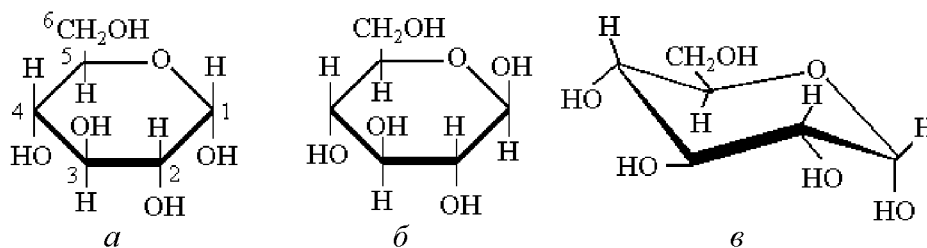


Рис. 2.14. Структурные формулы глюкозы:
а – α-глюкоза; б – β-глюкоза; в – α-глюкоза в конформации кресла

Если представить, что кольцо молекулы глюкозы перпендикулярно плоскости листа бумаги и ближе к нам находятся атомы углерода во втором и третьем положении (атомы С-2 и С-3), а группа атомов ОН у атома углерода С-1 располагается ниже плоскости кольца, то такую форму молекулы глюкозы называют α-формой (α-глюкоза). При расположении ОН-группы у атома С-1 выше плоскости молекулы имеем дело с β-формой молекулы глюкозы (β-глюкоза).

Циклические моносахариды при ковалентном связывании друг с другом образуют олигосахаридные цепи. Например, дисахарид образуется

при реакции гидроксильной группы при атоме углерода С-1 одного моносахарида с любой другой гидроксильной группой (кроме той, которая находится при С-1) второго моносахарида. Реакция сопровождается образованием молекулы воды. В реакцию может вовлекаться любое число моносахаридов.

Используемые обозначения связей в олигосахаридах рассмотрим на примере одного из типов дисахарида, обозначаемого как Glc α 1–2Gal. В этом случае к гидроксильной группе при атоме углерода С-2 остатка галактозы присоединяется α -гликозидной связью остаток глюкозы у атома углерода С-1.

Размеры углеводной цепи в гликоконъюгатах колеблются от дисахаридного звена до очень сложных структур, содержащих 26 или более моносахаридов. Длинные углеводные цепи называются также полисахаридами или гликанами. Молекулы некоторых белков (коллагена, белков секрета подчелюстной железы) содержат по два моносахарида (дисахаридные звенья). В составе целлюлозы содержится только один моносахарид – глюкоза, в составе других природных, так называемых «истинных» полисахаридов имеется также один или, в крайнем случае, несколько моносахаридов.

Гликопротеинами называют белки, содержащие олигосахаридные цепи, ковалентно присоединенные к определенным аминокислотным остаткам. Число различающихся по структуре гликопротеинов очень велико. Гликопротеины классифицируют с учетом природы связей между полипептидными цепями белков и олигосахаридными цепями (рис. 2.15). Наиболее часто встречаются два класса: 1) гликопротеины, содержащие связь «серин (или треонин) – N-ацетилгалактозамин» (принятое сокращенное обозначение Ser (или Thr)-GalNAc); 2) гликопротеины, содержащие связь «аспарагин – N-ацетилглюкозамин» (Asn-GlcNAc).

Связь между углеводной и белковой частями в молекуле гликопротеина первого класса называется О-гликозидной, так как она образуется с участием гидроксильной группы боковой цепи аминокислот серина или треонина и остатком сахара. Поэтому гликопротеины первого класса относятся к О-связанным гликопротеинам, а углеводные цепи этого класса гликопротеинов называются О-гликанами. О-связанные гликопротеины присутствуют в мембранах клеток крови.

Второй класс гликопротеинов характеризуется N-гликозидной связью, так как связь образуется между амидной группой аспарагина и сахаром. Гликопротеины класса 2 называются N-связанными гликопротеинами, а их олигосахариды – N-гликанами. Число олигосахаридных цепей, присутствующее каждому типу гликопротеинов, варьирует от 1 до 36, а в каждой углеводной цепи может быть от 2 до 26 моносахаридных остатка.

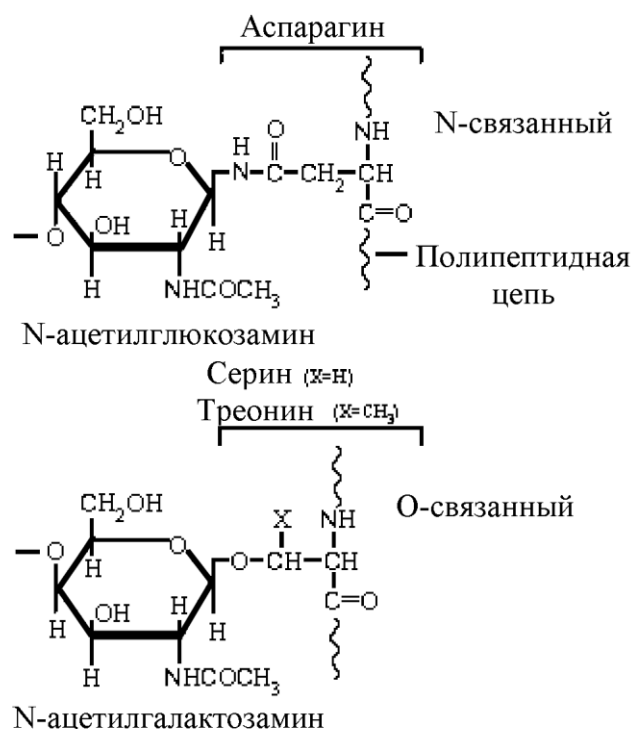


Рис. 2.15. Структура N-связанного (а) и O-связанного (б) гликопротеинов

Структура олигосахаридов N-связанных гликопротеинов сложнее, чем олигосахаридов O-связанных гликопротеинов. N-связанные гликопротеины можно разделить на три большие группы: сложные, гибридные и богатые маннозой. Они содержат общий пентасахарид, что объясняется совпадением начальных этапов биосинтеза всех трех групп гликопротеинов. Большинство олигосахаридов N-связанных гликопротеинов содержат от 2 до 5 ветвей, которые называют антеннами. В научной литературе имеются сведения о ди-, три-, тетра- и пентаантенных структурах. Гликопротеины из группы сложных обычно содержат концевые остатки сиаловой кислоты (NeuAc) и предшествующие им остатки галактозы (Gal) и N-ацетилглюкозамина (GlcNAc). На концах олигосахаридов других групп N-связанных гликопротеинов могут быть фукоза (Fuc) и галактоза.

Многие гликопротеины содержат как N-, так и O-гликозидные связи. Имеются гликопротеины и других классов, встречающихся относительно редко, например, гликопротеины класса 3, содержащие связь серин – ксилоза (Ser-Xyl) и коллагены (класс 4), содержащие связь гидроксилизин – галактоза (Hyl-Gal) и относящиеся к O-связанным гликопротеинам. На рис. 2.16 приведен пример пространственной структуры углеводного компонента гликопротеина.

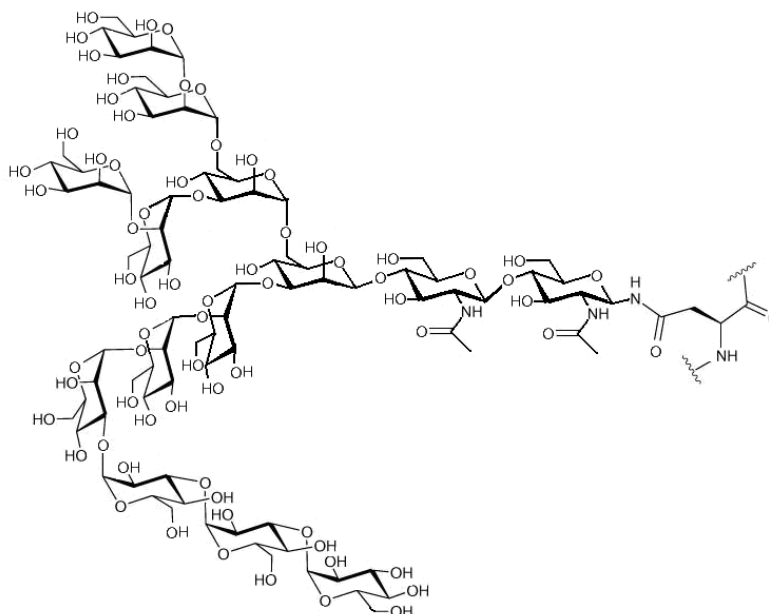


Рис. 2.16. Пространственная структура углеводного компонента гликопротеина

В углеводных структурах гликоконъюгатов в отличие от двух других биополимеров – белков и нуклеиновых кислот имеются точки ветвления, при образовании которых присоединение каждого последующего мономера идет в линейной последовательности. Проиллюстрируем вариабельность структуры сложных углеводов. Из двух различных аминокислот можно построить только один дипептид, а из двух различных моносахаридов (шестиуглеродных) могут образовываться одиннадцать различных дисахаридов. Из четырех разных нуклеотидов можно получить 256 тетра-нуклеотида, а из четырех разных моносахаридов возможно построение 35560 тетрасахаридов.

Если учесть, что в образовании углеводной части гликоконъюгатов могут принимать участие до 7–9 различных по молекулярной природе моносахаридов, а также возможность образования ветвлений в различных местах олигосахаридов, то можно говорить о потенциальном структурном многообразии углеводов. Олигосахариды, таким образом, могут быть эффективными носителями информации: на единицу массы углеводы могут содержать больше информации, чем нуклеиновые кислоты или белки. Отметим одну весьма важную особенность записи и сохранения информации при посредстве углеводных «слов»: строчки, составленные из таких слов и несущие информацию, раздваиваются, причем такое раздвоение (ветвление строчек) может иметь место в достаточно большом числе точек.

Декодирование информации, содержащейся в олигосахаридных структурах, происходит благодаря молекулярному узнаванию этих углеводов другими молекулами. Углеводы гликоконъюгатов клеточных мембран связываются белками, называемыми лектинами. Еще недавно считалось,

что способностью специфически связывать сахара обладают только лектины растительного происхождения. В последние годы обнаружены десятки лектинов и у животных, насекомых, бактерий и т. д. (например, маннозосвязывающие белки крови и печени теплокровных животных, лектины мозга крыс).

Лектины животных разделены на 4 группы:

- 1) лектины С-типа, включая селектины,
- 2) лектины S-типа или галектины,
- 3) лектины Р-типа,
- 4) другие лектины.

Названия классам лектинов были даны с учетом характеристик их связывания с углеводами. Например, С-лектины получили свое название потому, что для их связывания с соответствующими сахарами требовалось участие ионов кальция (от английского calcium). Минимальная полипептидная структура, требуемая для связывания углеводного лиганда (для лектинов С-типа она содержит примерно 135 аминокислот, для галектинов – около 130 аминокислот), называется углеводузнающим доменом (УУД). В лектинах может присутствовать один или несколько УУД.

ГЛАВА 3. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

3.1. ЛИПИДНАЯ АСИММЕТРИЯ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Биологические мембраны состоят, в основном, из липидов и белков, а также небольших количеств асимметрично распределенных углеводов. Относительное количество белков, липидов и углеводов в мембранах варьирует (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Химический состав мембран

Мембрана	Весовое содержание, %		
	Белок	Липид	Углевод
Миелин	18	79	3
Плазматическая мембрана эритроцитов человека	49	43	8
Плазматическая мембрана гепатоцитов крысы	44	52	4
Внутренняя мембрана митохондрий гепатоцитов крысы	76	24	0

В среднем в плазматической мембране (ПМ) содержится приблизительно 50 % белков и 50 % липидов. Точное соотношение мембранных компонентов и их расположение определяется типом и специализацией

мембран.

Липидный состав плазматических мембран разных клеток и мембран клеточных органелл различается. Например, липидная фракция мембран гепатоцитов крыс содержит 24 % холестерина, 31 % ФХ, 8,5 % сфингомиелина, 15 % ФЭ, 2,2 % ФИ, 7 % ФС, 0,1 % ФК и 3 % гликолипидов. Клеточные мембраны содержат большое количество фосфоглицеридов. В плазматических мембранах встречается сфингомиелин – фосфолипид, у которого вместо глицерольного остова содержится сфингозин – аминоксирт с ненасыщенной углеводородной цепью.

Холестерин присутствует в плазматических мембранах клеток животных, составляя примерно четверть от общего количества липидов. Напротив, мембраны клеточных органелл содержат холестерин в небольших количествах: митохондриальные мембраны меньше, чем 5 %, мембраны комплекса Гольджи – около 8 %, а мембраны ЭР – примерно 10 %. В мембранах прокариотов стеринны вообще отсутствуют.

Количество заряженных липидов составляет приблизительно 10 % от общего количества липидов плазматических мембран. В биомембранах встречаются, преимущественно, отрицательно заряженные липиды.

Углеводы, как правило, располагаются на внешней стороне плазматической мембраны. Липидный состав биомембран дан в табл. 3.2.

Таблица 3.2

Главные липидные компоненты мембран

Тип мембраны	Доля от общего количества липидов в мембране, %			
	ФХ	ФЭ+ФС	СМ	ХС
Плазматическая мембрана (эритроциты человека)	21	29	21	26
Миелиновая мембрана (нейроны человека)	16	37	13	34
Плазматическая мембрана (<i>E. coli</i>)	0	85	0	0
Мембраны ЭР (крыса)	54	26	5	7
Мембрана комплекса Гольджи (крыса)	45	20	13	13
Внутренняя мембрана митохондрий (крыса)	45	45	2	7
Внешняя мембрана митохондрий (крыса)	34	46	2	11
Монослой основной локализации	Экзоплазматический	Цитозольный	Экзоплазматический	Оба

Биологические мембраны характеризуются асимметричным строением. В плазматической мембране содержание липидов во внутреннем монослое отличается от содержания липидов во внешнем монослое. Внеш-

ний монослой обогащен фосфатидилхолином, сфингомиелином, холестерин и гликолипидами, внутренний монослой – фосфатидилэтаноламином, фосфатидилсерином, фосфатидилинозитолом (рис. 3.1). Холестерин составляет большую фракцию как внутреннего, так и внешнего монослоя, но содержание его выше во внешнем монослое.

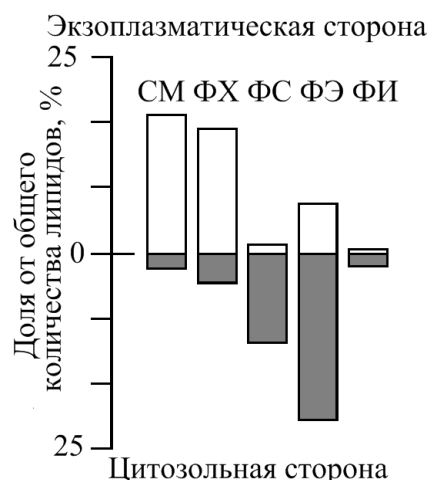


Рис.3.1. Соотношение липидов во внутреннем и внешнем монослоях мембраны

Асимметрия мембран не является жестко определенной. Распределение липидов в мембранных монослоях может изменяться, например, при изменении функциональной активности клеток или их органелл. Спонтанная миграция молекул липидов из монослоя в монослой энергетически невыгодна, так как полярным головам липидов приходится пересекать гидрофобную сердцевину бислоя, и, кроме этого, молекула липида должна повернуться на 180° , то есть совершить переход «флип-флоп».

В мембране липидная асимметрия во внешнем и внутреннем монослоях обеспечивается флипазами, транслоказами и другими ферментами. Трансмембранная асимметрия продуцируется первоначально в *транс*-сети Гольджи, а также в плазматической мембране несколькими белками в процессах переноса, сопряженных с гидролизом АТФ. АТФ-связывающие транспортеры (ABC транспортеры) перемещают фосфолипиды с внутреннего монослоя во внешний. Аминофосфолипидные транслоказы контролируют перемещение липидов во внутренний монослой. Существуют другие ферменты с подобными функциями – флипазы с характерной специфичностью для различных липидов. Например, АТФаза Drs2p транслоцирует только фосфатидилсерин.

Очевидно, что в мембранах существуют механизмы, приводящие к потере трансбислойной асимметрии липидов. В мембранах присутствуют ферменты – скрамблазы, которые при активации переносят липиды из монослоя с большим содержанием липидов, в монослой, где липидов

данного типа меньше. Скрамблазы обычно активируются при увеличении внутриклеточного уровня свободных ионов Ca^{2+} , и процесс трансбислойного переноса липидов не требует АТФ. Потеря трансбислойной асимметрии при увеличении содержания фосфатидилсерина во внешнем монослое является, как правило, признаком повреждения мембран.

Обнаружены физические механизмы липидного скрамблинга. При изгибании мембраны, один монослой расширяется, а другой – сжимается. Это приводит к тому, что площадь поверхности, приходящаяся на молекулу липида во внешнем слое (в случае выпячивания), увеличивается, а во внутреннем – уменьшается.

Рассмотрим случай, когда внутренний монослой состоит из ФС, внешний – из ФХ (рис. 3.2).

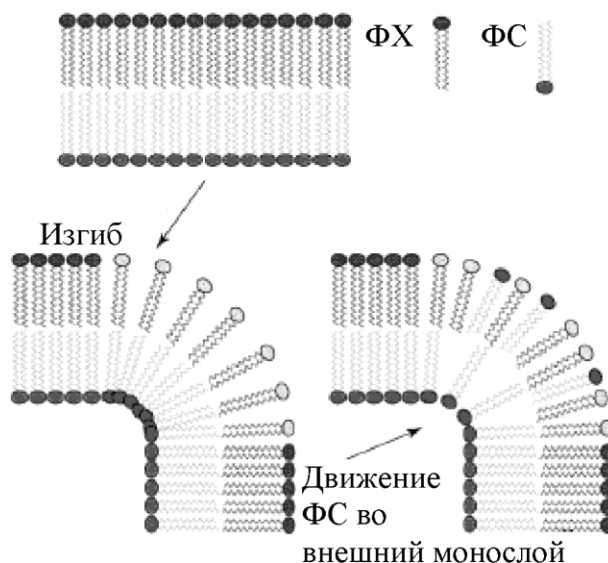


Рис. 3.2. Механическая модель трансмембранного скрамблинга липидов

Сжатие внутреннего монослоя, обогащенного ФС, и расширение внешнего монослоя понижает энергию активации спонтанной транслокации молекул ФС (а в реальных мембранах еще и молекул ФЭ) во внешний монослой. Этот пример показывает, что увеличение свободной энергии мембраны при растягивании одного монослоя и сжатии другого ведет к селективному перемещению молекул липидов из одного монослоя в другой, при этом происходит выравнивание латерального натяжения по бислою без активации каких-либо специфических белков (или их комплексов), обеспечивающих транслокацию липидов.

3.2. ГЕОМЕТРИЧЕСКИЕ ФОРМЫ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Поверхность клетки или клеточной органеллы формируется биологической мембраной. Следовательно, форма клеток и клеточных органелл

определяется формой мембран и для выяснения механизмов, контролирующих клеточную форму, необходимо использование геометрических и физических методов мембранной биофизики.

Биологические мембраны проявляют различные формы. Каждая форма развивается вследствие специфических физиологических причин. Механизмы, в соответствии с которыми эти формы создаются, до конца не установлены. Физические принципы, лежащие в основе процессов создания и контроля формы, должны быть универсальными для всех клеток. Можно выделить ряд факторов, принимающих участие в создании конкретной формы мембраны: липидный состав мембраны, форма липидных молекул, асимметрия распределения липидных молекул между монослоями, присутствие белковых молекул и т.п.

Клетки без внутренних мембран, такие как прокариоты и эритроциты, принимают набор форм в соответствии с их функциональными задачами. Например, двояковогнутая дисковидная форма мембран эритроцитов гарантирует оптимальное отношение поверхность – объем, необходимое для быстрого газообмена между гемоглобином и окружающей средой. Более сложные формы проявляются в эндотелиальных клетках, плазматические мембраны которых содержат внутренние трубки, которые пронизывают клеточный объем.

Внутриклеточные мембраны более динамичны и разнообразны по форме, чем плазматические мембраны. Например, ЭР и аппарат Гольджи – сложные системы соединенных между собой канальцев, цилиндров и дисков, и при обеспечении внутриклеточного транспорта веществ образуют структуры с широким набором форм: от малых сфер (диаметр ~50 нм) и узких трубочек до канальцев. Такие формы характеризуются максимальной площадью поверхности с сохранением малого внутреннего объема, что позволяет обеспечивать эффективное и быстрое перемещение белков как наружу, так и внутрь этих органелл.

Сложные формы клеток и клеточных органелл формируются физическими силами, прикладываемыми к различным участкам мембран (как к поверхности, так и в пределах бислоя), что приводит к возникновению определенной кривизны мембраны. Кривизна мембраны является результатом сложного набора взаимодействий между мембранными белками и липидами, а также взаимодействий мембраны с окружающей водно-солевой средой. Для поддержания определенной формы клетки должны иметь сенсоры, осуществляющие контроль кривизны мембран.

3.2.1. Мембранная кривизна

Биологическая мембрана обычно рассматривается как двумерная поверхность. Описание формы мембран проводят с использованием понятия

кривизны c ($c = 1/R$, где R – радиус кривизны). Кривизна c считается малой, если соответствующий радиус кривизны R много больше, чем толщина мембраны, $R \gg d$ (то есть абсолютное значение кривизны $|c|$ должно удовлетворять условию $|c| \cdot d \ll 1$). Если радиус кривизны близок по величине к толщине мембраны ($R \approx d$, то есть, $|c| \cdot d \approx 1$), кривизна мембраны рассматривается как большая. Например, характеристический радиус кривизны R для мембран внутриклеточных везикулярных переносчиков составляет несколько десятков нанометров и, следовательно, только в несколько раз больше толщины бислоя, так как $d \approx 4$ нм.

Для описания формы мембран, как правило, используются две кривизны, c_1 и c_2 , называемые главными. Если пересечь мембранную поверхность в выбранной точке двумя ортогональными плоскостями, перпендикулярными к поверхности (рис. 3.3), то главной кривизной является кривизна для каждой из двух линий пересечения плоскостей с мембранной поверхностью, имеющих практически круговую форму в окрестности выбранной точки.

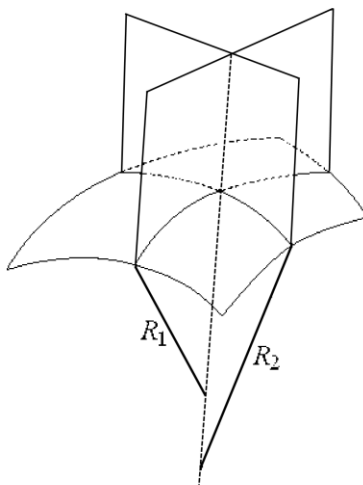


Рис. 3.3. Определение кривизны мембран

Радиусы этих двух круговых фрагментов, R_1 и R_2 , называются главными радиусами кривизны, а их обратные значения, $c_1 = 1/R_1$ и $c_2 = 1/R_2$, обозначаются как две главные кривизны.

Кривизна может быть положительной или отрицательной. Чтобы определить знак кривизны мембраны, нужно охарактеризовать две стороны ее поверхности. Для липидного монослоя одна поверхность покрыта полярными головными группами фосфолипидов, а другая – является гидрофобной. Условились считать, что изгибание монослоя, которое формирует выступающую гидрофильную поверхность, характеризуется положительной кривизной, в то время как изгибание в противоположном направлении приводит к отрицательной кривизне. Для клеточной мембраны различия между сторонами мембран определяется их ориентацией по отно-

шению к объему, который ограничивается мембраной. Положительная кривизна соответствует выпячиванию мембраны во внешнюю среду.

Липидные молекулы цилиндрической формы (рис. 1.9, *а*), такие как ФХ и СМ, формируют предпочтительно плоские бислойные структуры. Липидные молекулы, которые имеют коническую форму (рис. 1.9, *б*), такие как ДАГ или ФЭ, с малым гидрофильным поперечным сечением, формируют структуры с отрицательной кривизной, такие как инвертированная гексагональная фаза трубочек с головными группами внутри и гидрофобными хвостами снаружи. Молекулы, которые имеют инвертированную коническую форму (рис. 1.9, *в*), такие как молекулы детергентов, лизофосфолипиды и полифосфоинозитиды, формируют структуры с положительной кривизной, например, мицеллы.

Для описания мембран обычно используются две комбинации главной кривизны: общая кривизна J ($J = c_1 + c_2$) и гауссова кривизна K ($K = c_1 \cdot c_2$).

Можно выделить четыре типа мембранных форм, которые характеризуются различными комбинациями значений главной кривизны: плоская, цилиндрическая, седлоподобная и сферическая (рис. 3.4).

1. Для плоской формы $c_1 = 0$ и $c_2 = 0$, следовательно, общая кривизна $J = 0$ и гауссова кривизна $K = 0$ (рис. 3.4, *а*). Примерами служат неокаймленные плазматические мембраны.

2. Цилиндрическая форма характеризуется одной положительной главной кривизной ($c_1 > 0$), а вторая главная кривизна равна нулю ($c_2 = 0$). Результатом является не нулевая общая кривизна ($J = c_1 \neq 0$) и равная нулю гауссова кривизна ($K = 0$) (рис. 3.4, *б*). Цилиндрическую форму имеют мембраны везикулярных переносчиков, которые функционируют между ЭР и комплексом Гольджи и плазматической мембраной, а также мембранные тубулы, например, сформированные системой динамин-GTP- γ S24.

3. Для седлоподобной формы главные кривизны одинаковы по абсолютному значению, но имеют разные знаки ($c_1 = -c_2$). Таким образом, общая кривизна равна нулю ($J = 0$), в то время как гауссова кривизна отрицательна ($K = -c_1^2 < 0$). Мембранные перешейки, которые связывают почкообразные транспортные везикулы и исходные мембраны на стадиях перед полным отделением везикулы, характеризуются седлоподобной формой (рис. 3.4, *в*). Кроме того, сегменты мембран седлоподобной формы распределены на поверхности цистерн Гольджи и мембранных соединений между тремя и более цилиндрическими мембранными частями ЭР.

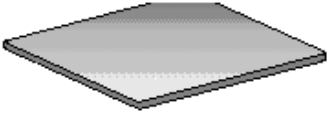
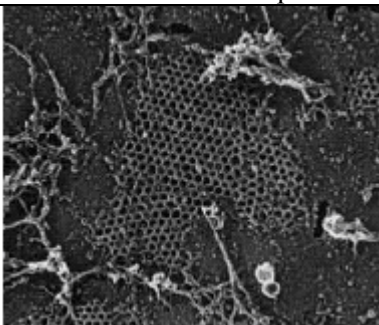
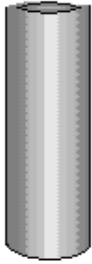
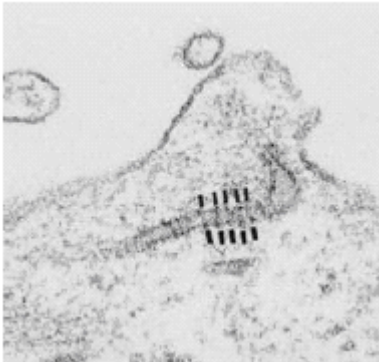
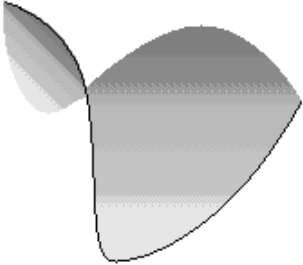
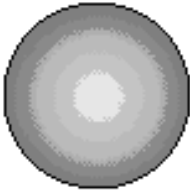
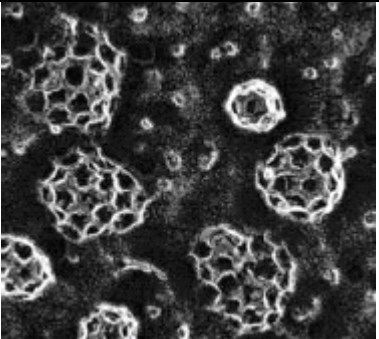
Схематическое изображение	Значение кривизны	Геометрическая форма биологических мембран
<i>a</i>  Плоскость	$c_1 = 0$ $c_2 = 0$ $J = 0$ $K = 0$	
<i>б</i>  Цилиндр	$c_1 > 0$ $c_2 = 0$ $J > 0$ $K = 0$	
<i>в</i>  Седло	$c_1 > 0$ $c_2 < 0$ $J = 0$ $K < 0$	
<i>г</i>  Сфера	$c_1 = c_2 > 0$ $J > 0$ $K > 0$	

Рис. 3.4. Схематическое изображение и примеры геометрических форм биологических мембран:

a – мембранный фрагмент плоской клатриновой решетки, *б* – мембранная трубочка под оболочкой из белка динамина, *в* – перешеек мембранной «почки», *г* – мембрана с каркасом из ассоциированного *in vitro* клатрина

4. Часто встречающаяся сферическая форма (рис. 3.4, *г*) характеризуется двумя равными основными кривизнами ($c_1 = c_2$). В этом случае соот-

ношение между общей и гауссовой кривизной определяется уравнением $K = J^2 / 4$. Эндоцитарные везикулы и везикулы, которые функционируют в системе «ЭР-комплекс Гольджи», имеют практически сферическую форму.

В мембранах внутриклеточных везикулярных переносчиков встречаются все названные геометрические формы.

Форма мембран может радикальным образом изменяться в процессе выполнения ими физиологических функций или при изменении внешних условий. Например, эритроциты изменяют форму в гидродинамическом потоке, что позволяет им перемещаться в кровеносных сосудах. Плазматические мембраны клеток подвергаются трансформациям формы при установлении межклеточных контактов или при распластывании на субстрате.

Для создания определенной формы мембраны должны подвергаться деформациям. Работа, необходимая для выполнения деформации мембраны, определяется структурой и эластичностью мембраны. Мембранная структура, не подвергнутая деформации, обозначается как «спонтанная форма». Эта форма характеризуется спонтанной кривизной мембранного бислоя J_s^B и зависит от спонтанной кривизны внутреннего и наружного монослоев мембраны, J_s^{in} и J_s^{out} .

Эластичность мембраны определяет силы, которые должны быть приложены для создания отклонений от спонтанной формы, а также величину энергии, которая аккумулируется в мембране в результате таких отклонений. Эластичность мембраны характеризуется набором модулей, таких как модули изгиба мембранного монослоя κ_m и бислоя κ_B , модули гауссовой кривизны монослоя $\bar{\kappa}_m$ и бислоя $\bar{\kappa}_B$, модуль сжимаемости поверхности K_C и модуль наклона углеводородных цепей по отношению к мембранной плоскости.

3.3. ГИДРОФОБНОЕ СООТВЕТСТВИЕ МЕЖДУ ЛИПИДАМИ И БЕЛКАМИ В БИСЛОЕ

Несмотря на переменный химический состав основной структурной единицей биомембран является фосфолипидный бислой. Бислой типичной эукариотической клетки имеет толщину примерно в 5 нм. Мембранные белки, отличающиеся высокой переменностью формы, весьма существенно модифицируют структурную организацию мембран. Например, эктодомены АТФазы F1 покрывают площадь поверхности мембраны в четыре раза большую, чем площадь сечения трансмембранных частей этого белка. Некоторые белки, наоборот, покрывают лишь небольшие площади поверхности бислоя.

Варьирование формы и межмолекулярных взаимодействий мембранных компонентов приводит к различиям в толщине мембран. Плазматическая мембрана обычно толще, а мембраны ядра и гранулярного ЭР обычно тоньше, все другие мембраны имеют промежуточную толщину. Мембрана может быть структурно определена в соответствии с расположением ее компонентов в плоскости мембраны.

В рамках жидко-мозаичной модели мембран считается, что мембрана образована за счет взаимодействия мембранных липидов и белков с водой, при этом взаимодействие между компонентами мембраны, обусловленное их гидрофобными и гидрофильными свойствами, таково, что свободная энергия системы «мембрана – водное окружение» минимальна. Фундаментальный принцип взаимодействия трансмембранных белков с липидными бислоями базируется на соответствии толщины гидрофобного ядра липидного бислоя и длины гидрофобной части белковой молекулы, которая пересекает липидный бислой (принцип гидрофобного соответствия).

Гидрофобное соответствие играет существенную роль в организации и функционировании мембран. В биологических мембранах гидрофобное несоответствие приводит к модификации микроскопической и макроскопической структуры мембраны и, следовательно, биологических функций. Имеется ряд экспериментальных доказательств, что белки с гидрофобным несоответствием вызывают деформацию бислоя в окрестности белок-липидного интерфейса, создавая, таким образом, гетерогенные структуры в плоскости мембраны.

На рис. 3.5 схематически представлены примеры гидрофобного несоответствия между мембранным белком и длиной гидрофобной части липидного бислоя. Как видно из рисунка, могут наблюдаться два случая: 1) невозмущенная гидрофобная толщина липидного бислоя d_L больше длины гидрофобной части белковой молекулы d_p (рис. 3.5, а), 2) невозмущенная гидрофобная толщина липидного бислоя d_L меньше длины гидрофобной части белковой молекулы d_p . Влияние белка, приводящее к изменению толщины мембраны, распространяется на определенное расстояние в латеральной плоскости, за пределами которого бислой восстанавливает свою толщину d_L .

Латеральные гетерогенности в мембране могут возникать как следствие липидной сортировки: в присутствии различных типов липидов молекулы белков будут окружены молекулами тех типов липидов, которые более соответствуют его длине гидрофобной части белка. К эффектам, связанным с гидрофобным несоответствием, относятся наклоны и/или искривление всей молекулы белка или частей полипептидной цепи при адаптации молекулы белка к липидному бислою, а также наклоны от-

дельных спиралей в белке. Например, для ионных каналов, родопсина и некоторых других белков экспериментально показано, что изменение угла наклона отдельных трансмембранных спиралей сопровождается изменением активности белка.

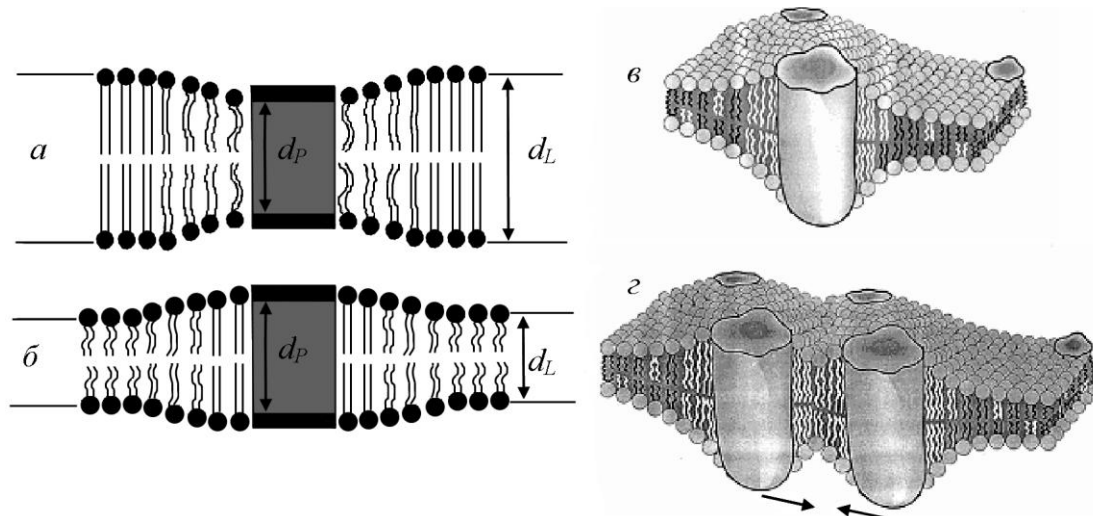


Рис. 3.5. Схематическое (а, б) и модельное (в, z) представление гидрофобного несоответствия между мембранным белком и липидами в бислое. в – интегральный белок в тонкой мембране; z – притяжение между двумя «гидрофобно несоответствующими» интегральными белками

Таким образом, гидрофобное несоответствие может вести к утолщению или сжатию бислоя в окрестности молекул белков или к наклонам трансбислойных спиралей белков.

3.4. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ КАК МЯГКИЕ ИНТЕРФЕЙСЫ

Рассмотрение биологических мембран с позиции физики конденсированных сред позволяет отнести их к так называемым «мягким конденсированным материалам». В отличие от традиционных твердых конденсированных материалов мягкие материалы характеризуются как высокой структурированностью, так и высокой деформационной способностью (мягкостью). К мягким материалам, помимо мембран, относятся полимеры, эмульсии, жидкие кристаллы и др. Несмотря на то, что все эти системы существуют в конденсированной фазе, ни одну из них нельзя описать однозначно как жидкость или твердое тело.

Мягкие материалы, как правило, анизотропны и иерархично структурированы, причем размеры структур на различных уровнях организации могут различаться на несколько порядков. Свойства мягких материалов определяются в большинстве случаев свойствами динамических поверхностей (интерфейсов), определяющих их структурированность.

Биологические мембраны – мягкие материалы, так как их можно рассматривать как структурированные жидкости, состоящие из молекул с высокой конформационной сложностью. В то же время они обладают высокой прочностью и жесткостью по сравнению с изотропными жидкостями.

Жидкие поверхности имеют поверхностное натяжение σ

$$\sigma = \left(\frac{\partial G_s}{\partial S} \right)_T,$$

где G_s – избыточная поверхностная свободная энергия Гиббса, T – температура и S – площадь поверхности. Поверхностное натяжение приводит к минимизации площади поверхности и придает ей определенную жесткость.

Биологические мембраны, по сути дела, могут быть представлены как набор мягких интерфейсов, причем интерфейсы могут быть двух типов: жидкие и укрепленные. У жидких интерфейсов отсутствует фиксированная (жесткая) связь между соседними молекулами. Для таких интерфейсов характерно практически нулевое сопротивление силам сдвига. Примером жидкого интерфейса может служить липидный бислой (липосомальная мембрана) (рис. 3.6, *а*).

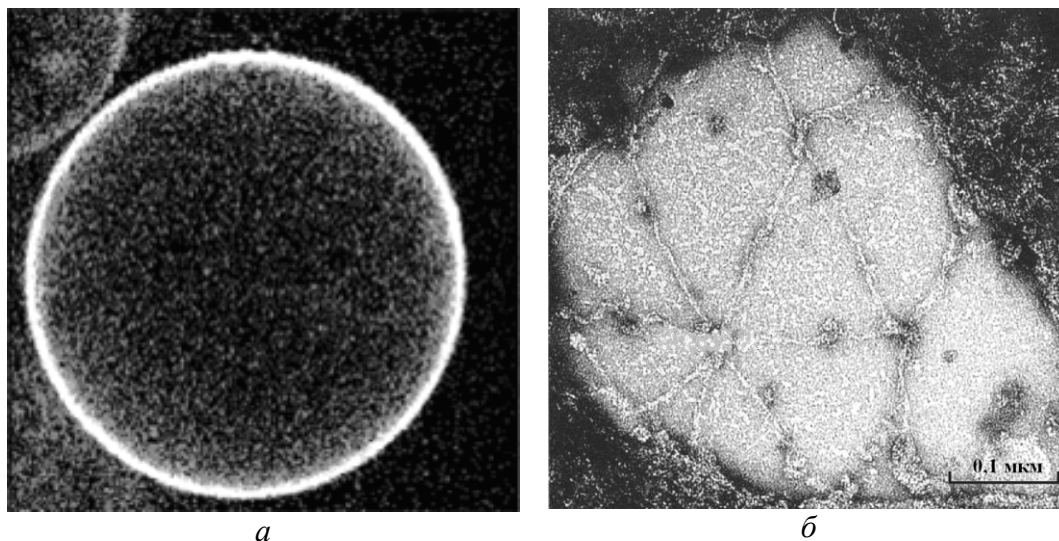


Рис. 3.6. Мембраны, характеризующиеся мягкими интерфейсами:
а - жидкие интерфейсы (липидные везикулы), *б* – укрепленные интерфейсы
 (спектрин-актиновая сеть эритроцитарных мембран)

В то же время существуют так называемые укрепленные интерфейсы, в которых имеются фиксированные связи между соседними молекулами и, следовательно, такие интерфейсы обнаруживают сопротивление сдвигу. Пример укрепленного интерфейса – спектрин-актиновая сеть эритроцитарных мембран, определяющая форму этих клеток (рис. 3.6, *б*). Моле-

кулы спектрина и актина связываются друг с другом, формируя в плоскости мембраны двумерную сеть. В каждой узловой точке сети осуществляется связь белковой молекулы с определенным числом соседей и образуется связанная поверхность. Энергия взаимодействия молекул в сети намного больше, чем энергия теплового движения образующих ее молекул. Хотя данная структура характеризуется определенной подвижностью, она проявляет сопротивление сдвиговым воздействиям. Механические, конформационные и статистические свойства укрепленных интерфейсов существенно отличаются от таковых для жидких интерфейсов.

Интерфейс может деформироваться несколькими способами: при изгибе (рис. 3.7, *а*), растяжении или сжатии (рис. 3.7, *б*), сдвиге (рис. 3.7, *в*).

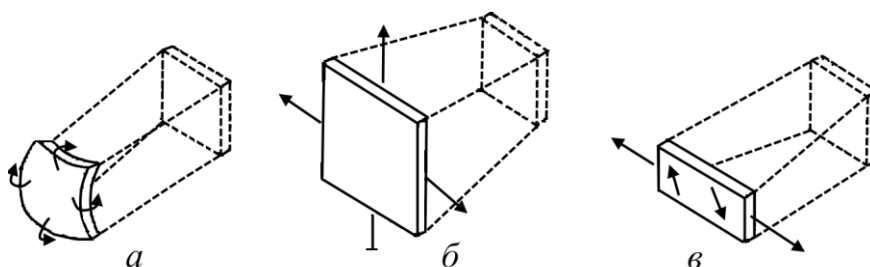


Рис. 3.7. Виды деформации мембраны.
а – изгиб, *б* – растяжение (сжатие), *в* – сдвиг

В случае жидкого интерфейса сопротивлением сдвига можно пренебречь. Два других случая деформирования интерфейса характеризуются модулем изгиба κ_B и модулем сжимаемости поверхности K_C , соответственно. Модуль сжимаемости поверхности определяется как энергия E_C , приходящаяся на единицу площади поверхности и расходуемая на изменение площади поверхности S на величину ΔS при равномерном растяжении поверхности. В соответствии с законом Гука для эластичной пружины E_C определяется как

$$E_C = \frac{1}{2} K_C \left(\frac{\Delta S}{S} \right)^2.$$

Жесткость мембраны при изгибе определяется, в первую очередь, природой липидов и их пространственным распределением в бислое. Количественно жесткость при изгибе плоской мембраны может быть охарактеризована двумя модулями, определяемыми для двух ортогональных направлений изгиба (рис. 3.7). Модуль изгиба для гладкой поверхности определяется через энергию E_B , приходящуюся на единицу площади поверхности и требующуюся для создания средней кривизны H интерфейса, в соответствии с уравнением

$$E_B = 2\kappa_B H^2,$$

где средняя кривизна H выражается через два главных радиуса кривизны R_1 и R_2 (рис. 3.3)

$$H = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right).$$

При определении энергии изгиба E_K предполагается, что интерфейс не обладает внутренней структурой и что нет ограничений, налагаемых границами.

Поскольку в процессе изгиба происходит растяжение и сжатие монослоев в мембране, то очевидно, что модули изгиба κ_B и сжимаемости поверхности K_C могут быть связаны. Связь может быть выражена простым соотношением $\kappa_B = d_L^2 K_C$, где d_L – гидрофобная толщина бислоя.

Для характеристики размеров области мембраны, в пределах которой она остается плоской и гладкой, вводится понятие персистентной длины (длины устойчивости) ξ . Персистентная длина ξ связана с модулем изгиба κ_B соотношением

$$\xi \sim \exp \left(\frac{A \kappa_B}{k_B T} \right),$$

где A – константа, k_B – постоянная Больцмана, T – температура. В соответствии с этим уравнением ξ зависит экспоненциально от величины отношения модуля изгиба к величине тепловой энергии.

Липосомальные мембраны в силу высокой мягкости характеризуются малыми значениями κ_B . Введение в мембрану холестерина приводит к увеличению ее жесткости (модуль изгиба κ_B возрастает). Плазматические мембраны клеток имеют обычно модуль изгиба значительно больше, чем величина тепловой энергии ($\kappa_B \gg k_B T$), так что, как правило, персистентная длина для мембраны больше, чем размер объекта.

3.5. СТРУКТУРА БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

3.5.1. Развитие представлений о структуре биологических мембран

Представления о структуре мембран значительно эволюционировали с момента появления первой модели в 1925 году (Е. Гортер и Ф. Грендел). Гортер и Грендел провели эксперименты, на основании которых оказалось возможным предположить, что биологическая мембрана является

структурой, состоящей из двойного слоя липидных молекул.

Затем в 1935 г. Д. Даниэлли и Г. Давсон разработали первую модель, в которой было учтено присутствие в мембранах белков – предполагалось, что белки расположены слоем на каждой стороне липидного бислоя. Эти представления сохранялись до 1972 г., когда С. Зингер и Г. Николсон сформулировали «жидко-мозаичную» модель, на которой базируются современные представления о структуре биомембран.

Жидко-мозаичная модель описывает биологическую мембрану как жидкий бислой, состоящий из смеси различных липидов, в который встроены белки. Молекулы могут свободно перемещаться в плоскости бислоя, что обеспечивает текучесть мембраны. Из-за большого разнообразия липидных и белковых молекул, формирующих мембрану, она выглядит подобно мозаике.

В рамках данной модели мембрана рассматривается как сложная, гетерогенная, динамическая, высоко кооперативная система. Схематически жидко-мозаичная модель мембраны представлена на рис. 3.8. Молекулярная организация мембраны может изменяться под действием физических факторов и химических агентов, что, в свою очередь, может влиять на функционирование клетки.

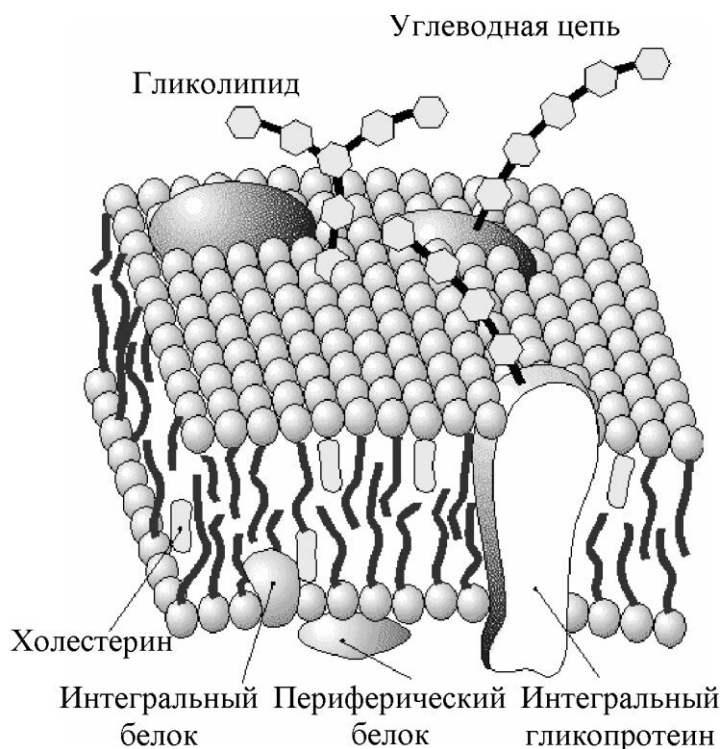


Рис. 3.8. Жидко-мозаичная модель биологической мембраны

Последующие уточнения жидко-мозаичной модели предложены на основе результатов экспериментальных и теоретических исследований, сфокусированных на некоторых специфических аспектах мембранной

структуры. Так, Я. Израелашвили предположил, что белки и липиды должны «подстраиваться» друг к другу, Э. Сакман обратил внимание на значимость в структуре мембраны цитоскелета и гликокаликса и т.д.

Экспериментальные данные о пространственной организации и динамическом поведении белков и липидов в плазматической мембране, полученные в последние годы с помощью биофизических и биохимических методов, позволяют предложить дальнейшее уточнение модели структурно-динамической организации мембраны.

3.5.2. Жидко-мозаичная доменно-рафтовая модель биологической мембраны

Жидко-мозаичная модель представляет собой попытку создать картину двухмерной организации белков и липидов в мембране и описывает плазматическую мембрану как мультикомпонентную среду функционально активных белков, распределенных в липидном бислое мембраны.

Однако данная модель не учитывает функционального значения физической гетерогенности в липидной организации мембран. Латеральная гетерогенность липидного бислоя определяется динамической неоднородностью распределения липидных молекул. В плоскости мембраны вследствие теплового движения возникают ансамбли липидных молекул, формирующих в результате взаимодействия доменную структуру липидного монослоя. Липидные домены характеризуются определенными размерами и временем жизни молекул в домене. Домены могут перемещаться в плоскости мембраны как целое. Физические свойства доменов во многом определяются липидным составом.

Динамическая картина образования мембранных микродоменов была постулирована Сакманом еще в 1970-х гг. Некоторые из доменов, содержащих высокую концентрацию холестерина и сфинголипидов и имеющих высокую устойчивость в мембране, были названы «липидными рафтами» (англ. raft – плот). Немецкий ученый К. Зимонс в 1997 г. выдвинул теорию «липидных рафтов», в рамках которой липидная мембрана рассматривается как динамичная, быстро изменяющаяся структура. Отдельные области мембраны организованы в домены, обогащенные холестерином, и имеют большую плотность, чем остальная часть мембраны. Липидные домены (рафты) способны свободно дрейфовать в мембране. С липидными доменами связаны некоторые белки (рис. 3.9).

Гипотеза липидных рафтов подкрепляется тем, что липиды в плазматической мембране имеют физически обоснованную тенденцию к кластеризации (минимизация свободной энергии системы), что приводит к латеральной гетерогенности плазматической мембраны, возникающей, например, из-за более плотной упаковки холестерина с насыщенными и мо-

ноненасыщенными фосфолипидами, чем с полиненасыщенными фосфолипидами.

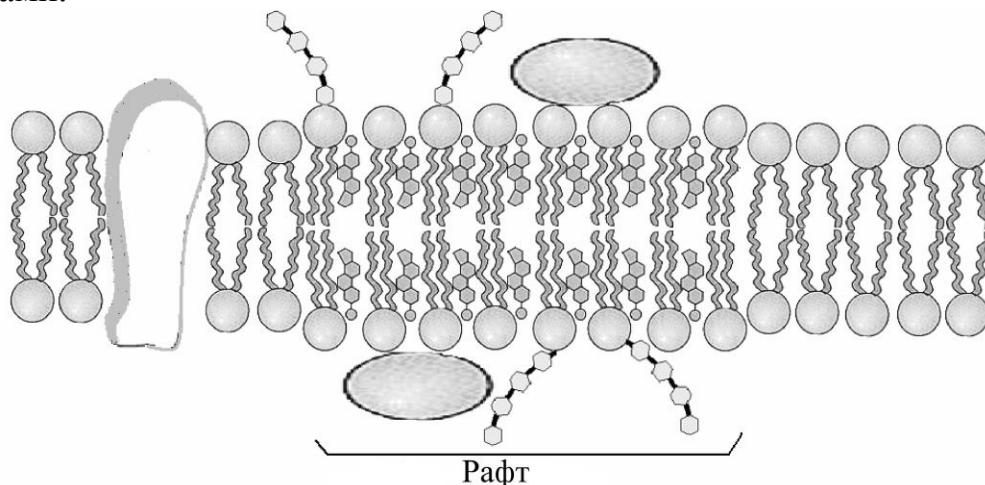


Рис. 3.9. Схематическое изображение липидного домена (рафта)

В последние годы наблюдается резкое увеличение интереса к липидным рафтам. Это обусловлено тем, что гипотеза липидных рафтов связывает функциональные свойства мембран с латеральной гетерогенностью мембраны и может объяснить многие процессы, протекающие в клетке. Предполагается, что липидные рафты играют важную роль в различных физиологических процессах, включая клеточную адгезию, внедрение патогенных вирусов и бактерий, запуск клеточного отклика (от активации клеточного деления до апоптоза).

Развитие новых методов исследования архитектуры мембран позволило обнаружить липидные домены в клеточных мембранах. Установлено, что липидные рафты имеют малые размеры (менее 50 нм). Липиды в мембранных доменах упакованы более плотно, чем в окружающей не рафтовой фазе. Толщина рафтовых участков мембран, как правило, больше, чем толщина бислоя в жидкой фазе.

Кроме холестерина и сфинголипидов липидные рафты обогащены многими рецепторными белками клеточной поверхности, а также многими сигнальными белками, которые связываются рецепторами и активируются ими.

Установлено, что ряд компонентов плазматической мембраны не растворяется при низких температурах (+4 °C) в неионных детергентах, таких как тритон X-100. Детергент-устойчивые фракции клеточных мембран обогащены холестерином и сфингомиелином и содержат ряд липидзаякоренных белков, включая гликозилфосфатидилинозитол(GPI)-заякоренные белки.

Последние представления о разделении липидных фаз на жидкоупорядоченные L_o и жидко-неупорядоченные L_d позволяют предположить,

что такие структурные образования имеют место в плазматической мембране. Показано, что в зависимости от типа клеток значительная часть плазматической мембраны (до 70 %) может находиться в жидко-упорядоченном L_o состоянии. Эксперименты с модельными липидными мембранами продемонстрировали, что фаза L_o , характеризующаяся высоким содержанием холестерина, также устойчива к растворению охлажденными не ионными детергентами. Таким образом, плазматическая мембрана, по всей видимости, организована в домены, липидная фаза в которых подобна жидко-упорядоченной липидной фазе L_o модельных мембран. В свою очередь, домены распределены в жидко-неупорядоченной фазе липидов (L_d). Например, белок Thy-1 (GPI-заякоренный белок) и ганглиозид GM1 (сфинголипид) в модельных мембранах, характеризующихся сосуществованием разделенных фаз L_o и L_d , распределяются предпочтительно в фазу L_o , в то время как липиды с короткими или ненасыщенными ацильными цепями и большинство трансмембранных белков, наоборот, исключаются из этой фазы.

С точки зрения термодинамики фаза всегда является макроскопической системой, состоящей из большого числа молекул. Если предположить, что размер домена составляет 8–10 нм, то в нем содержится ~30–40 молекул липидов и ~6–10 белковых молекул. Таким образом, каждый отдельный домен не имеет достаточного числа молекул для термодинамического определения фазы. Поэтому можно считать, что жидко-упорядоченная фаза в мембране включает все домены. Оставшаяся часть мембраны, окружающая рафты, может рассматриваться как гомогенная жидко-неупорядоченная фаза. В ЭПР-экспериментах со спиновыми метками определено, что липидные рафты характеризуются короткими временами жизни. Молекулы диффундируют в рафт или из него за времена порядка десятков миллисекунд или даже меньше (рис. 3.10).

Коэффициент диффузии молекул липидов в клеточных мембранах (в зависимости от типа клеток и типа мембран) в 5–50 раз ниже, чем в искусственных липидных мембранах (липосомах). При концентрировании белков в доменах коэффициент диффузии молекул липидов уменьшается.

Взаимодействие отдельных доменов может приводить к образованию агрегатов доменов, в результате чего создаются условия для взаимодействия белков, связанных с рафтами, а, следовательно, и обеспечения определенных функциональных свойств мембраны. Были проведены эксперименты по изучению изменения функциональных свойств мембран при истощении по холестерину, что позволило установить факты вовлечения липидных рафтов в различные клеточные процессы.

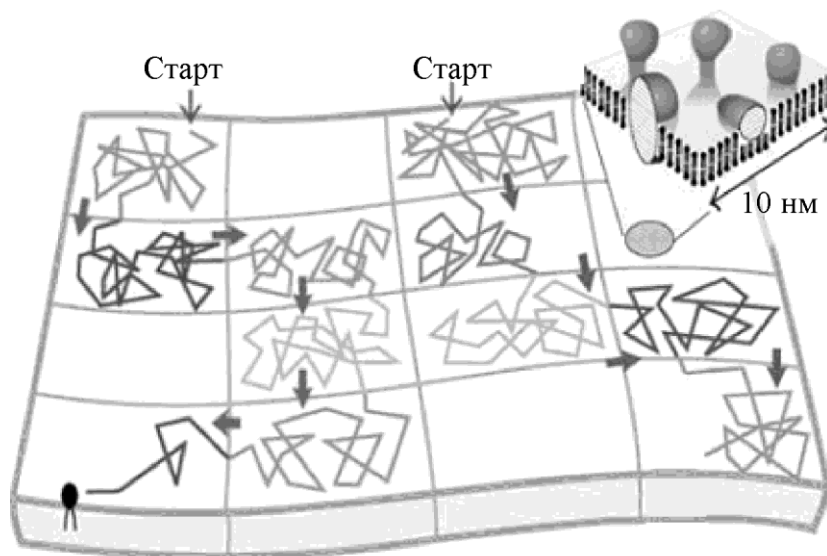


Рис. 3.10. Схематическое изображение траектории последовательных перемещений молекул липидов из домена в домен в монослое

При использовании комбинации методов с высоким разрешением изображений, флуоресцентных методов анализа и математического моделирования установлено, что белковые молекулы как в рафтах, так и остальной части мембраны распределены неравномерно. Полученные данные свидетельствуют о пространственной гетерогенности белков в обоих монослоях и о кластеризации как рафтовых, так и не рафтовых белков.

Часть (20–40 % от общего числа) GPI-заякоренных белков формирует домены высокой плотности с радиусом 4–5 нм. То есть в подобном домене на поверхности клеток содержится несколько молекул GPI-заякоренных белков. В частности, размер белковых доменов в плазматической мембране клеток СНО варьирует в области 5÷20 нм. Различные изоформы белков Ras формируют во внутреннем монослое плазматической мембраны клеток СНО домены радиусом от 6 до 11 нм с числом молекул белка от 6 до 8 в каждом.

Таким образом, поверхность клеточной мембраны можно представить в виде жидкой мозаики со структурами типа доменов и рафтов (жидкомозаичная доменно-рафтовая модель биологической мембраны (рис. 3.11)).

3.5.3. Динамическая твердо-каркасная жидко-мозаичная модель биологических мембран

Исследование клеточных мембран позволили установить, что для многих плазматических мембран характерным является наличие белкового

цитоскелета. В результате, как правило, не ковалентных белок-белковых взаимодействий в мембране формируется непрерывная мембранная белковая сеть, во многом определяющая структурные и функциональные свойства мембраны. Например, у эритроцитарной мембраны непрерывный белковый каркас состоит из спектрин-актиновой сети, не ковалентно связанной с интегральными белками (белок полосы 3). Известна определяющая роль каркаса в поддержании формы, осмотической устойчивости и механической деформируемости эритроцитов.

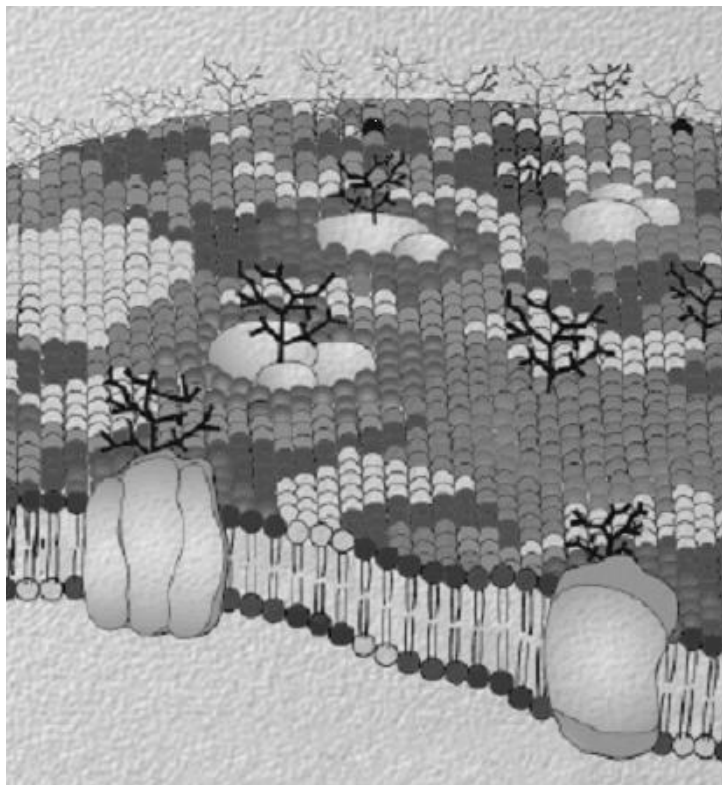


Рис. 3.11. Жидко-мозаичная доменно-рафтовая модель биологической мембраны

Согласно С. В. Коневу, «мембрана описывается в виде непрерывного твердо-упругого белкового каркаса, ячейки которого заполнены липидным бислоем. Белковый каркас представляет собой единую энергетическую систему относительно слабых ионных, водородных, ван-дер-ваальсовых сил межпротомерного и внутрипротомерного взаимодействия, а часть интегральных белков не входит в состав каркаса и находится в трансляционно-свободном состоянии».

Плазматическая мембрана разбивается цитоскелетом на компартменты размером от 30 до 500 нм в зависимости от типа клеток. В компартменте молекулы совершают ограниченные границы движения в латеральной плоскости, при этом латеральная подвижность достаточно высока, так как липидная фаза является жидко-неупорядоченной L_d . Молекулы диффундируют в пределах компартмента, затем перемещаются в другой компар-

тмент и так далее. Перемещение молекул из компартмента в компартмент происходит за время, гораздо большее, чем время нахождения в компартменте, и носят характер прыжковой диффузии (длительность процесса перескока молекулы между компартментами гораздо больше времени нахождения молекулы в пределах каждого компартмента) (рис.3.12).

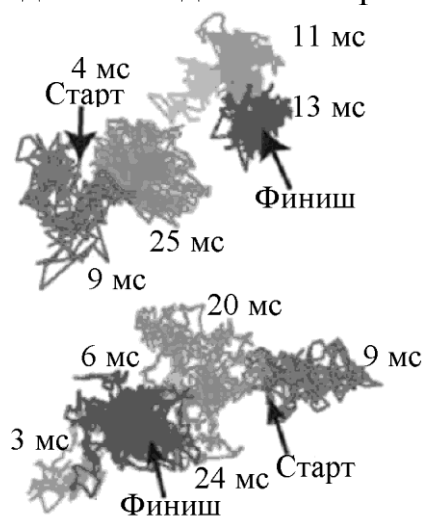


Рис. 3.12. Траектории движения двух различных молекул липидов в плазматической мембране, установленные экспериментально (цифрами указано время нахождения молекулы липида в каждом компартменте)

Таким образом, наличие мембранного цитоскелета и учет жидко-мозаичных свойств компартментов приводит к динамической твердо-каркасной жидко-мозаичной модели биомембраны (рис. 3.13).

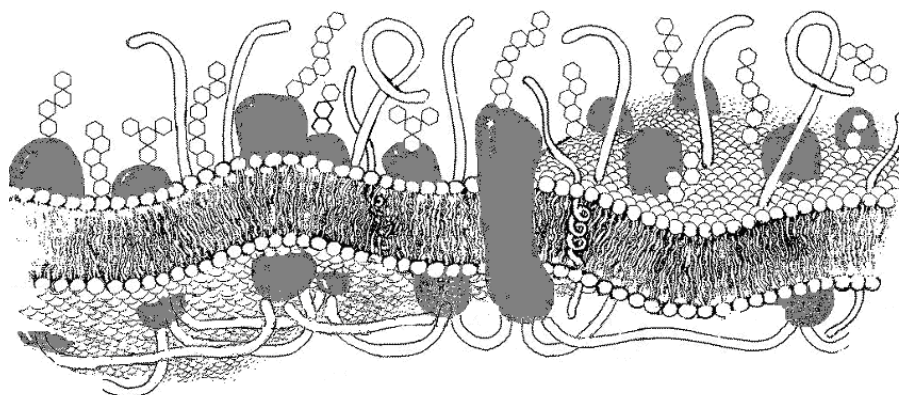


Рис. 3.13. Твердо-каркасная жидко-мозаичная модель биологической мембраны

Однако в данном представлении модель не учитывает латеральную гетерогенность липидного бислоя. При рассмотрении модели с учетом молекулярной гетерогенности компартментов можно заключить, что латеральная диффузия индивидуальных мембранных молекул и малых моле-

кулярных кластеров в пределах компартмента различается весьма незначительно, так как в соответствии с гидродинамической теорией в данном случае коэффициент диффузии слабо зависит от размера. В силу этого молекулы, находящиеся в не рафтовой фазе, и молекулы, включенные в малые рафты, в пределах компартмента будут в плоскости мембраны двигаться подобным образом.

Однако присутствие белкового цитоскелета, взаимодействие его с другими интегральными белками, возможность формирования в пределах компартмента крупных доменов требуют уточнения модели описания динамических свойств мембраны.

Белковый цитоскелет формирует мембранную сеть практически неподвижных (по сравнению с липидными молекулами в фазе L_d) «якорей», образующих структуру, напоминающую динамический «белковый забор», который резко ограничивают латеральную подвижность компонентов мембраны. Отдельные молекулы или малые кластеры могут «просачиваться» через динамические щели между «штaketинами» (молекулами белков), связанных с «забором» (мембранным скелетом), в то время как большие кластеры будут испытывать существенное сопротивление перемещению (рис. 3.14).

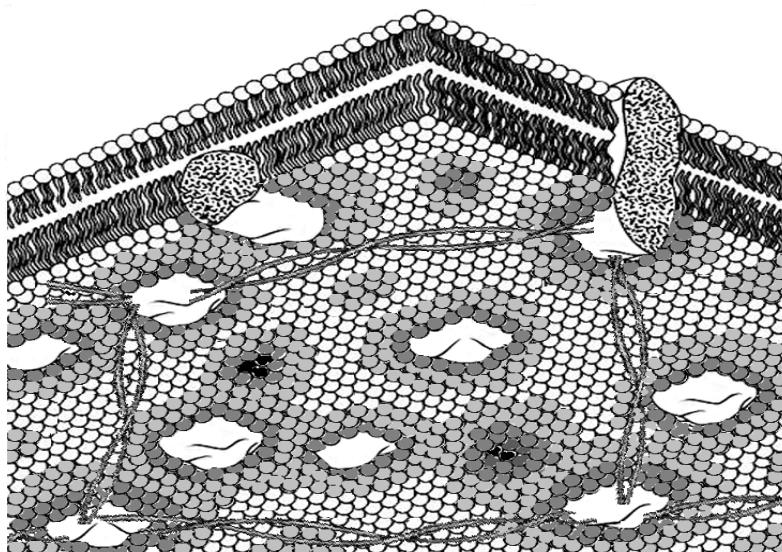


Рис. 3.14. Динамическая твердо-каркасная жидко-мозаичная доменно-рафтовая модель биологической мембраны

Установлено, что размер щели между «штaketинами» в «заборе» для различных типов клеток в среднем составляет порядка 2–9 нм. Изучена трансляционная диффузия предполагаемых рафтовых и не рафтовых молекул и установлено, что определяющими факторами ограничения скорости латеральной диффузии мембранных компонентов являются структуры

типа трансмембранных якорей.

Таким образом, модель мембраны в зависимости от того, учитывается или не учитывается молекулярная гетерогенность в компартментах, может быть представлена либо как твердо-каркасная жидко-мозаичная модель, либо как твердо-каркасная жидко-мозаичная доменно-рафтовая модель.

ГЛАВА 4. РЕЦЕПТОРНЫЕ И СИГНАЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

4.1. РОЛЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН В ПРОЦЕССАХ РЕЦЕПЦИИ И ОБРАБОТКИ ИНФОРМАЦИИ

Одним из основных свойств живых систем является их способность принимать, обрабатывать и передавать информацию. Процессы рецепции и обработки информации протекают как в одноклеточных, так и в многоклеточных организмах. В многоклеточных организмах в процессе эволюции произошла специализация функций различных типов клеток. При этом клетки приобрели способность реагировать изменением функциональной активности и метаболизма не только на факторы окружающей среды (как в одноклеточных), но и на изменения, происходящие в других клетках.

Системы рецепции и обработки информации, функционирующие в животных и растительных клетках, основаны на единых принципах. Ключевую роль в процессах приема, обработки и передачи информации играют биологические мембраны. Передача сигналов между клетками осуществляется с помощью первичных мессенджеров (посредников). В качестве первичных мессенджеров выступают различные химические соединения (факторы роста, гормоны, нейротрансмиттеры и др.) и физические факторы (свет, электрическое поле и др.). Рецепция первичной информации осуществляется, в основном, различными компонентами плазматической мембраны. Однако возможна рецепция информации клеткой без участия компонентов плазматической мембраны. Например, гидрофобные стероидные и тиреоидные гормоны способны диффундировать через липидный бислой и взаимодействовать со специальными белками-рецепторами уже внутри клетки. Следует также отметить, что рецепция первичной информации может осуществляться компонентами мембран внутриклеточных органелл. Например, взаимодействие квантов света с молекулами родопсина происходит в мембране дисков фоторецепторных клеток. Активация рианодин-чувствительных рецепторов эндоплазматического и саркоплазматического ретикулума может осуществляться незаряженными низкомолекулярными неорганическими соединениями, способными диффундиро-

вать через липидный бислой плазматической мембраны, такими как пероксид водорода или оксид азота.

После рецепции первичных мессенджеров компоненты биологической мембраны осуществляют обработку и усиление полученного сигнала, передача которого на внутриклеточные мишени происходит с помощью вторичных мессенджеров. В качестве вторичных мессенджеров выступают химические соединения, обладающие относительно небольшой по сравнению с биополимерами молекулярной массой. Основными вторичными мессенджерами в клетках являются циклический аденозин-5'-монофосфат (цАМФ), циклический гуанозин-5'-монофосфат (цГМФ), ионы кальция (Ca^{2+}), диацилглицерол (ДАГ), фосфатидилинозитол-1,4,5-трифосфат (ФИФ₃), арахидоновая кислота, оксид азота (NO) и пероксид водорода (H_2O_2). Поскольку группа вторичных мессенджеров (в отличие от первичных) немногочисленна, кодирование специфической информации осуществляется путем регуляции их внутриклеточной концентрации. После образования вторичный мессенджер быстро (по сравнению со временем передачи сигнала) метаболизируется. Основную роль в регуляции концентрации вторичных мессенджеров выполняют компоненты плазматической мембраны (а в случае Ca^{2+} – также компоненты митохондриальной мембраны, мембраны эндоплазматического и саркоплазматического ретикулума). Рассмотрим более подробно принципы и механизмы функционирования мембранных систем получения и обработки информации.

4.2. РЕЦЕПТОРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

В плазматических мембранах про- и эукариотических клеток локализованы специализированные рецепторные системы, обеспечивающие узнавание первичного сигнала и активацию мембранных систем усиления и передачи сигнала. В настоящее время обнаружено более 20 суперсемейств рецепторных белков со сходной структурой, взаимодействующих с определенным типом химических или физических стимулов. Примеры стимулов и их рецепторов представлены в табл. 4.1.

В зависимости от функциональной активности рецепторы плазматической мембраны можно разделить на несколько групп:

- Рецепторы, сопряженные с G-белками;
- Рецепторы-ионные каналы;
- Рецепторы с собственной ферментативной активностью.

Рассмотрим эти типы рецепторов. Рецепторы, сопряженные с G-белками (сокращенное обозначение – GPCRs от G-protein coupled receptors), передают сигнал от первичных мессенджеров к внутриклеточным мишеням с помощью белков, обладающих ГТФазной активностью.

Первичные мессенджеры и их рецепторы

Тип активатора рецептора	Примеры клеточного ответа
Потенциал-управляемые ионные каналы	
Электрическое поле	Изменение мембранного потенциала
Электрическое поле	Изменение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+}
Лиганд-управляемые ионные каналы	
Ацетилхолин	Изменение мембранного потенциала
γ -аминомасляная кислота	Изменение мембранного потенциала
N-метил-D-аспартат	Изменение мембранного потенциала
Глицин	Изменение мембранного потенциала
Серотонин	Изменение мембранного потенциала
Рецепторы, сопряженные с G-белками	
Адреналин	Активация гликогенолиза, ингибирование синтеза гликогена
Адренокортикотропин	Стимуляция биосинтеза и секреции стероидных гормонов
Ангиотензин II	Стимуляция секреции альдостерона, сокращение гладкой мускулатуры
Брадикинин	Стимуляция кишечной секреции
Вазопрессин	Изменение проницаемости почечных канальцев для воды
Глюкагон	Активация гликогенолиза, ингибирование синтеза гликогена, стимуляция кишечной секреции
Интерлейкин 8	Хемотаксис лейкоцитов
Кальцитонин	Ингибирование ресорбции кальция из костной ткани
Мет-энкефалин	Снижение болевых ощущений
Серотонин	Стимуляция кишечной секреции
Соматостатин	Ингибирование секреции гормонов роста, инсулина и глюкагона
Тромбин	Активация тромбоцитов
Фотоны	Генерация потенциала действия в фоторецепторных клетках
Рецепторы с тирозинкиназной активностью	
Интерлейкин-2	Стимуляция роста лимфоцитов
Интерлейкин-3	Стимуляция роста гемопоэтических стволовых клеток
Интерферон γ	Экспрессия генов в макрофагах и лимфоцитах
Инсулин	Регуляция транспорта глюкозы в клетку, стимуляции катаболизма углеводов
Нейрональный фактор роста	Дифференцировка и рост нейронов
Пролактин	Стимуляция синтеза белков молока
Эпидермальный фактор роста	Пролиферация и дифференцировка эпителиальных клеток

Первичные мессенджеры и их рецепторы

Тип активатора рецептора	Примеры клеточного ответа
Интегрины	
Фибронектин	Регуляция клеточной подвижности и экспрессии генов
Селектины	
Муцины	Регуляция клеточной адгезии
Кадгерины	
Кадгерины	Контактное ингибирование пролиферации клеток
Мембранные рецепторы гуанилатциклазы	
Предсердный натрийуретический фактор	Дилатация сосудов
Рецепторы серин/треониновых киназ	
Активин	Развитие мезодермы
Трансформирующий фактор роста- β	Задержка роста клеток, развитие внеклеточного матрикса

Первичными сигналами для GPCRs служат самые разнообразные молекулы, среди которых низкомолекулярные гормоны и нейротрансмиттеры (например, адреналин, норадреналин, ацетилхолин, серотонин, гистамин), опиоиды, гормоны пептидной и белковой природы (адренокортикотропин, соматостатин, вазопрессин, гонадотропин), а также многочисленные химические соединения, активирующие обонятельные и вкусовые сенсорные клетки. Рецепция квантов света осуществляется пигментом фоторецепторных клеток родопсином, также относящимся к рецепторам этой группы.

Следует учесть, что один и тот же первичный сигнал может инициировать передачу сигнала через несколько (иногда более 10) разных типов GPCRs. И если число различных типов внешних сигналов для GPCRs составляет несколько десятков, то самих таких рецепторов известно более 200. При всем разнообразии GPCRs представляют собой мономерные интегральные мембранные белки, полипептидная цепь которых семь раз пересекает клеточную мембрану. Во всех случаях участок рецептора, ответственный за взаимодействие с первичным сигналом, локализован с внешней стороны мембраны, а участок, контактирующий с G-белком, – на ее цитоплазматической стороне.

Рецепторы-ионные каналы – это интегральные мембранные белки, состоящие из нескольких субъединиц, полипептидная цепь которых несколько раз пересекает клеточную мембрану. Они действуют одновременно и как ионные каналы и как рецепторы, которые специфически связывают первичные мессенджеры, изменяющие их ионную (катионную или анионную – в зависимости от типа рецептора) проводимость. Рецеп-

торы данного типа используют в качестве первичных сигналов некоторые нейротрансмиттеры, отвечающие за синаптическую передачу в электрически возбудимых клетках. Некоторые внутриклеточные органеллы также содержат рецепторы-ионные каналы и активация этих рецепторов осуществляется вторичными мессенджерами.

Четвертичная структура рецепторов, ассоциированных с ферментативной активностью, весьма разнообразна. За некоторыми исключениями они представляют собой либо момеры, которые при связывании с ними первичного мессенджера димеризуются, либо олигомеры, образованные несколькими субъединицами различных типов. Практически у всех этих рецепторов полипептидная цепь их мономерных субъединиц пересекает клеточную мембрану один раз. Участок для связывания первичного мессенджера локализован на рецепторе со стороны, обращенной во внеклеточное пространство. По механизму взаимодействия с цитоплазматическими мишенями рецепторы данного типа разделяются на две группы.

Первая группа включает рецепторы-ферменты, с цитоплазматической стороны которых находится каталитический участок, активируемый при действии на рецептор внешнего сигнала. К этой группе рецепторов относится обширное семейство рецепторных тирозинкиназ, способных аутофосфорилироваться, то есть фосфорилировать самих себя по тирозиновым остаткам и фосфорилировать тирозиновые остатки белков-мишеней. Первая группа также включает рецепторы, обладающие тирозинфосфатазной активностью, которые дефосфорилируют фосфотирозиновые остатки белков-мишеней. Рецепторные тирозинкиназы и тирозинфосфатазы вовлекаются в регуляцию таких важнейших событий, как клеточное деление, дифференцировка и развитие иммунного ответа. Следует также указать рецепторные гуанилатциклазы, которые катализируют синтез вторичного мессенджера цГМФ из ГТФ. Рецепторы данного типа участвуют в регуляции водно-солевого обмена и тонуса сосудов.

Вторая группа рассматриваемых рецепторов собственной ферментативной активностью не обладает. Однако при действии внешнего сигнала они приобретают способность связывать цитоплазматические (не рецепторные) тирозинкиназы, которые в свободном состоянии неактивны, но в комплексе с рецептором активируются и фосфорилируют рецептор. Включение фосфатных остатков в такой рецептор создает условия для связывания с ним других белков-мишеней, которые также фосфорилируются и участвуют в передаче и усилении внутриклеточного сигнала. В эту группу входят рецепторы, участвующие в развитии иммунного ответа, а именно: рецепторы антигенов и рецепторы цитокинов.

4.3. ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

Каждый первичный мессенджер связывается со своим специфическим рецептором. Взаимодействие лиганда с рецептором является высокоспецифичным процессом, поскольку типичные первичные мессенджеры вызывают физиологические эффекты уже при концентрациях в 10^{-10} моль/л ($6 \cdot 10^{13}$ молекул на литр). Если принять, что типичная клетка имеет диаметр около 12 мкм и занимает объем 10^{-12} л, то в этом объеме при указанной концентрации может находиться 60 молекул (для сравнения укажем, что число ионов в таком же объеме равно $1,8 \cdot 10^{11}$, число молекул АТФ в таком же объеме может достигать 10^{10} , а число молекул вторичного мессенджера цАМФ при передаче информации от плазматической мембраны к клеточным эффекторам может достигать 10^6).

Рецепторы обладают высоким сродством к лиганду, т.е. характеризуется большой константой сродства, которая определяется следующим образом. При образовании лиганд-рецепторного комплекса (LR) связывание лиганда (L) с рецептором (R) всегда обратимо и описывается уравнением (4.1):



В состоянии равновесия, согласно закону действующих масс:

$$k_{+1}[L]([R_0] - [LR]) = k_{-1}[LR], \quad (4.2)$$

где k_{+1} и k_{-1} – константы скоростей ассоциации и диссоциации лиганд-рецепторного комплекса, $[R_0]$ – общее число рецепторов, $[L]$ – концентрация лиганда, $[LR]$ – концентрация лиганд-рецепторного комплекса.

Константа сродства (она же константа ассоциации или связывания) характеризует соотношение между занятыми и свободными от лиганда рецепторами в условиях равновесия:

$$k_c = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{[LR]}{[L]([R_0] - [LR])}. \quad (4.3)$$

Отсюда видно, что концентрация лиганд-рецепторного комплекса будет равна

$$[LR] = k_c [L]([R_0] - [LR]), \quad (4.4)$$

или

$$\frac{[LR]}{[R_0]} = k_c [L] \left(1 - \frac{[LR]}{[R_0]} \right). \quad (4.5)$$

Разделив обе части уравнения (4.5) на $\frac{[LR]}{[R_0]}$, получаем

$$\frac{[R_0]}{[LR]} k_c [L] = k_c [L] + 1 \quad (4.6)$$

или

$$\frac{[LR]}{[R_0]} = \frac{k_c [L]}{1 + k_c [L]}. \quad (4.7)$$

Используя вместо константы сродства обратную ей константу диссоциации $k_d = k_{-1}/k_{+1}$, получаем

$$\frac{[LR]}{[R_0]} = \frac{[L]}{k_d + [L]}. \quad (4.8)$$

Это уравнение аналогично классическому уравнению Михаэлиса – Ментен, предложенного для описания кинетики взаимодействия субстрата с ферментом:

$$\frac{[ES]}{[E_0]} = \frac{[S]}{k_s + [S]}, \quad (4.9)$$

где $[ES]$ – концентрация фермент-субстратного комплекса, $[E_0]$ – общая концентрация фермента, $[S]$ – концентрация субстрата, k_s – константа диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Из уравнения (4.8) видно, что при $k_d = [L]$ число лиганд-рецепторных комплексов равно половине числа всех доступных для связывания рецепторов. Таким образом, константа диссоциации равна концентрации лиганда, при которой происходит связывание лигандов половиной рецепторов.

Для нахождения константы диссоциации k_d или обратной ей константы сродства k_c , как и в случае ферментативной реакции, можно прибегнуть к координатам Лайнуивера – Берка. В этих координатах $(1/[LR] - 1/[L])$ гиперболическая зависимость (4.8) примет вид линейной зависимости (рис. 4.1, а):

$$\frac{1}{[LR]} = \frac{k_d}{[R_0]} \cdot \frac{1}{[L]} + \frac{1}{[R_0]}. \quad (4.10)$$

График функции (4.10) отсекает на оси абсцисс $-1/k_d = -k_c$, а на оси ординат $-1/[R_0]$. Однако зависимость концентрации лиганд-рецепторного комплекса от концентрации лиганда чаще всего анализируется с помощью графика Скэтчарда. Из уравнения (4.5) получаем

$$\frac{[LR]}{[L]} = k_c[R_0] \left(1 - \frac{[LR]}{[R_0]} \right) = -\frac{1}{k_d} \cdot [LR] + \frac{[R_0]}{k_d}. \quad (4.11)$$

Это уравнение характеризует линейную зависимость между величиной отношения количеств связавшихся и свободных молекул лиганда и концентрацией лиганд-рецепторного комплекса (рис. 4.1, б). График этой линии представляет собой прямую линию с наклоном $-1/k_d = -k_c$, которая отсекает на оси ординат величину $[R_0]/k_d$, а на оси абсцисс $-[R_0]$.

Максимальная действующая концентрация первичного мессенджера, как правило, не превышает 10^{-8} моль/л. В этом случае константа диссоциации будет иметь порядок 10^{-7} моль/л, а константа связывания – соответственно 10^7 (моль/л) $^{-1}$. Это и имеют в виду, когда говорят о большом сродстве лиганда с рецепторами. Для большинства рецепторов значение константы сродства находится в диапазоне от 10^8 – 10^{11} (моль/л) $^{-1}$.

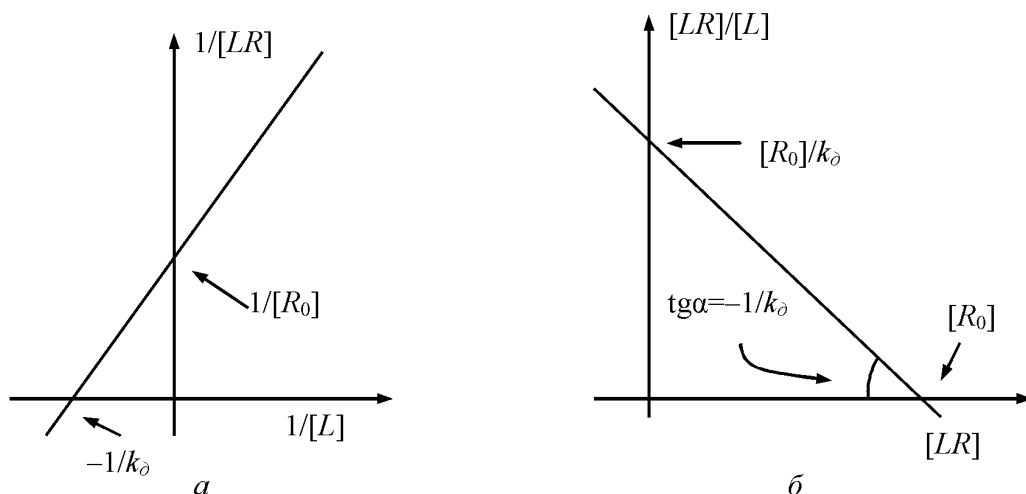


Рис. 4.1. Определение константы диссоциации и общего числа рецепторов методом Лайнуивера-Берка (а) и методом Скэтчарда (б)

Взаимодействие лигандов с рецепторами осуществляется в центрах связывания лигандов. Наиболее часто центры связывания образованы за счет тех же функциональных групп аминокислот, что и связывающие центры ферментов, то есть карбоксильными группами, аминогруппами, гидроксильными группами, тиоловыми группами, имидазольным ядром гистидина и индольной группой триптофана. Однако следует отметить, что рецепторы отличаются более высокой степенью сродства к лигандам, чем ферменты к субстратам.

В большинстве случаев максимальный клеточный ответ наблюдается при связывании лигандов с менее, чем 100 % всех рецепторов, расположенных на клеточной мембране. Например, типичная эритроидная клетка-предшественник содержит около 1000 рецепторов для эритропоэтина.

Тем не менее, для стимуляции пролиферации и дифференцировки эритроидных клеток-предшественников необходимо связывание молекул эритропоэтина только со 100 рецепторами на поверхности клетки.

Рассмотрим, как изменяется число лигандов, необходимое для активации пролиферации эритроидных клеток-предшественников в зависимости количества рецепторов. Константа диссоциации для связывания эритропоэтина к его рецептору составляет 10^{-10} моль/л. Концентрацию лиганда, необходимую для активации клеток, можно определить из уравнения (4.8), т. е.

$$[L] = \frac{k_d}{\frac{[R_0]}{[LR]} - 1}. \quad (4.12)$$

Если число рецепторов составляет 1000, то для активации клетки необходим эритропоэтин в концентрации $1,1 \cdot 10^{-11}$ моль/л. При уменьшении числа рецепторов в 8 раз (125 рецепторов на 1 клетку) для достижения максимального клеточного ответа необходимо увеличить концентрацию лиганда до концентрации $4 \cdot 10^{-10}$ моль/л (в 36 раз). Таким образом, количество лигандов, необходимых для активации клеточного ответа, определяется количеством рецепторов на клеточной мембране. Данный этап трансдукции сигнала может регулироваться изменением концентрации лигандов и рецепторов.

Изменение концентрации лиганда происходит в результате процессов синтеза и деградации лиганда специфическими ферментами. Деградация лигандов может осуществляться как ферментами, расположенными в плазматической мембране или во внеклеточной среде, так и внутриклеточными ферментами. В последнем случае транспорт лигандов в клетку осуществляется специфическими белками-переносчиками или в процессе пиноцитоза.

Концентрация рецепторов и лиганд-рецепторных комплексов изменяется в процессе интернализации. Интернализацией называется погружение рецепторных кластеров в клетку путем эндоцитоза. Образующиеся при этом замкнутые мембранные пузырьки называются рецепторосомами. Характерной особенностью данного процесса является возможность интернализации как свободных рецепторов, так и лиганд-рецепторных комплексов. Деградация рецепторов происходит после слияния рецепторосомы с лизосомой, содержащей протеолитические ферменты. Увеличение концентрации рецепторов в плазматической мембране осуществляется путем слияния мембранных пузырьков, содержащих синтезированные в эндоплазматическом ретикулуме рецепторы.

4.4. ТРАНСДУКЦИЯ СИГНАЛОВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ С УЧАСТИЕМ G-БЕЛКОВ

В основу классификации клеточных сигнальных систем положены названия вторичных мессенджеров и ферментов, регулирующих концентрацию вторичных мессенджеров. К числу основных сигнальных систем относятся: аденилатциклазная, фосфоинозитидная, липоксигеназная, НАДФН-оксидазная (супероксид-синтазная) и NO-синтазная. В большинстве из них в формирование промежуточных звеньев вовлекаются так называемые G-белки. Установлено, что 80% всех известных гормонов, нейромодуляторов, нейротрансмиттеров и других первичных мессенджеров взаимодействует со специфическими рецепторами, которые связаны с эффекторами через G-белки.

G-белки – это семейство гетеротримерных белков, обладающих ГТФ-азной активностью. Найдено около 20 различных G-белков, которые включают активирующий аденилатциклазу G_s -белок, ингибирующий аденилатциклазу G_i -белок, активирующий фосфолипазу C G_q -белок, G_{12} -белок фоторецепторных клеток, известный также как трансдуцин и др. G-белки состоят из субъединиц 3-х типов: α , β и γ . α -субъединица уникальна для каждого G-белка и определяет специфичность связывания G-белка с рецептором и эффектором. Важнейшая характеристика G-белков – присутствие в их α -субъединице центра связывания гуаниновых нуклеотидов: ГДФ и ГТФ.

G-белки являются своеобразными «переключателями» в процессе передачи сигнала в клетку. Функционирование этих переключателей основывается на циклических переходах между связыванием и гидролизом ГТФ, что переводит их из активного в неактивное состояние и обратно (рис. 4.2). Если с G-белком связан ГТФ, то это соответствует его активированному состоянию или, иначе, G-белок находится в положении «включено». Если в нуклеотид-связывающем центре присутствует ГДФ, то эта форма соответствует состоянию «выключено». Центральное событие при передаче сигнала от рецептора, на который подействовал первичный сигнал, к G-белку состоит в том, что активированный рецептор катализирует обмен ГДФ, связанного с G-белком, на присутствующий в среде ГТФ.

Обмен ГДФ на ГТФ облегчен не только формированием «комплекс-рецептор», но и тем, что концентрация ГТФ в клетке в 10 раз больше концентрации ГДФ (концентрация ГТФ в клетке 10^{-4} моль/л). ГДФ/ГТФ-обмен в нуклеотид-связывающем центре α -субъединицы сопровождается диссоциацией тримерной молекулы G-белка на две функциональные субъединицы: α -субъединицу, содержащую ГТФ, и $\beta\gamma$ -комплекс. Далее одна из этих функциональных субъединиц, какая именно – зависит от ти-

па сигнальной системы, взаимодействует с эффекторным белком, представленным ферментом или катионным каналом. Как следствие, каталитическая активность или ионная проводимость эффектора изменяется, что, в свою очередь, приводит к изменению цитоплазматической концентрации вторичного мессенджера и, в конечном счете, инициирует тот или иной клеточный ответ. G-белок находится в активном состоянии в течение короткого периода времени, после чего происходит гидролиз ГТФ. α -Субъединица, связанная с ГДФ, отсоединяется от эффекторного белка, который при этом теряет каталитическую активность. Далее α -субъединица связывается с $\beta\gamma$ -комплексом, образуя неактивный G-белок.

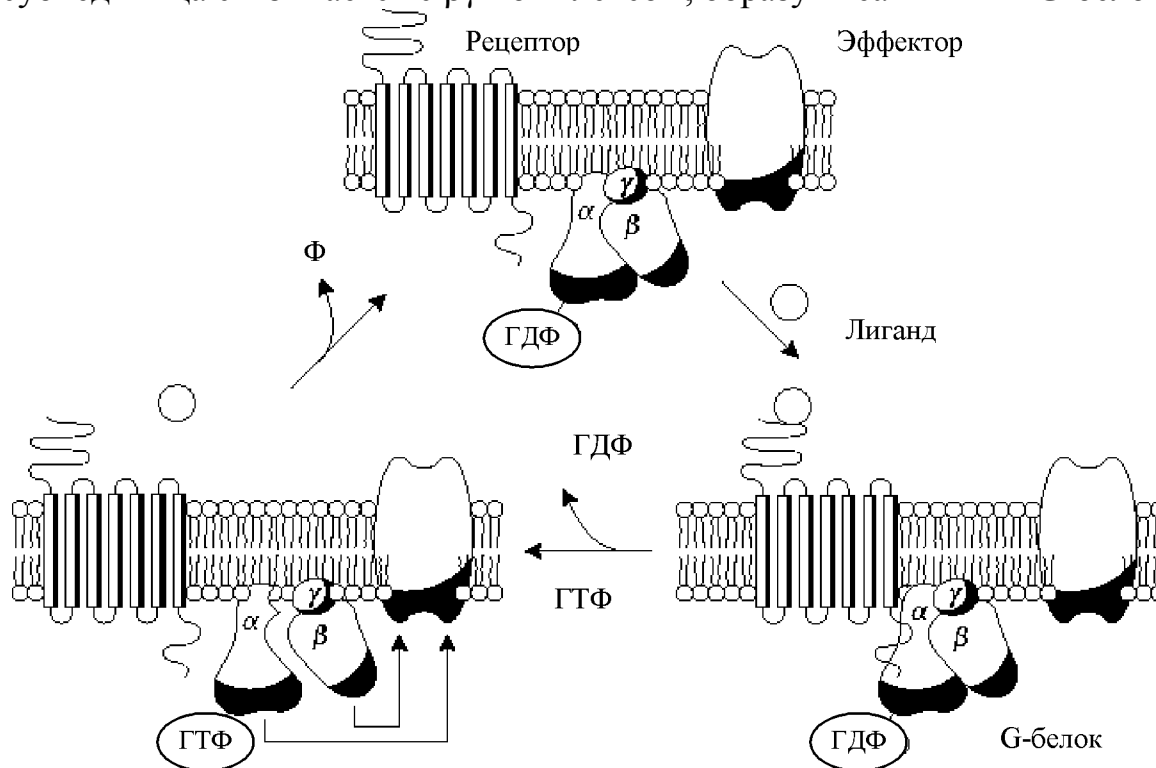


Рис.4.2. Активация и инактивация G-белков

Эффекторные системы, связанные с G-белками, включают аденилатциклазу, цГМФ-специфическую фосфодиэстеразу, фосфолипазу C, фосфолипазу A_2 и несколько типов ионных каналов. Рассмотрим два основных пути передачи сигнала с участием G-белков, имеющих во всех клетках животных и растений: аденилатциклазный и фосфоинозитидный. Схема аденилатциклазного пути передачи информации представлена на рис. 4.3. Первичный мессенджер взаимодействует с соответствующим рецептором, что приводит к изменению конформации белка. Это повышает вероятность взаимодействия активированного рецептора с преобразователем сигнала, роль которого выполняют G-белки. Активированный в результате взаимодействия с рецептором G-белок передает сигнал на специ-

альный фермент-усилитель. В аденилатцикляном пути усиление сигнала осуществляется с помощью фермента аденилатциклазы, который катализирует образование цАМФ из АТФ. Взаимодействие G-белка с ферментом-услителем сигнала приводит к изменению свойств фермента и соответственно к изменению его активности. При передаче стимулирующего сигнала через мембрану α -субъединица G_s -белка активирует аденилатциклазу. При активации рецептора, передающего ингибирующий сигнал, активируется G_i -белок, α -субъединица которого ингибирует аденилатциклазу. В результате активации аденилатциклазы увеличивается концентрация вторичного мессенджера цАМФ.

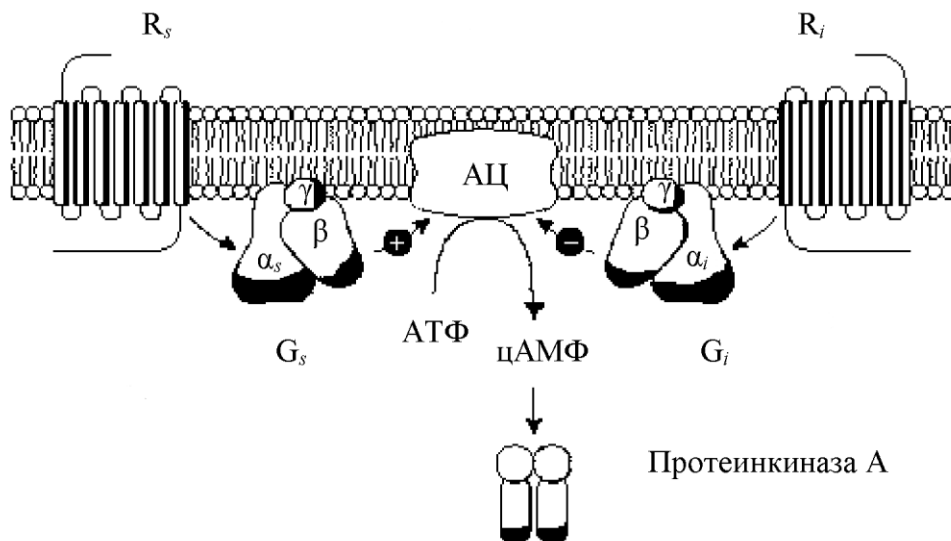


Рис. 4.3. Трансмембранная передача информации с участием аденилатциклазы (АЦ) и ГТФ-связывающих белков:
 G_s – стимулирующий и G_i – ингибирующий ГТФ-связывающие белки; R_s и R_i – соответствующие рецепторы для G_s и G_i

Конечные стадии передачи сигнала осуществляются с участием цАМФ-зависимой протеинкиназы (протеинкиназы А). В неактивном состоянии протеинкиназа представляет собой димер, состоящий из каталитической и регуляторной субъединиц. Активация протеинкиназы обеспечивается связыванием цАМФ с регуляторной субъединицей, что вызывает диссоциацию и активацию каталитической субъединицы. Каталитическая субъединица в свободном состоянии может фосфорилировать определенный белок, активация или инактивация которого и обуславливает ответ на воздействие внешнего сигнала. Например, в клетках печени протеинкиназа А путем фосфорилирования инактивирует фермент гликогенсинтазу и вследствие этого останавливает синтез гликогена. С другой стороны, в клетках печени протеинкиназа А активирует – также путем фосфорилирования – другую протеинкиназу, киназу фосфорилазы. Активная киназа фосфорилазы фосфорилирует гликогенфосфорилазу. Это приводит к вы-

свобождению из гликогена глюкозо-1-фосфата, который после превращения в глюкозо-6-фосфат включается в гликолиз.

Рассмотренный механизм обеспечивает проведение и усиление внеклеточного сигнала. Одна молекула рецептора, находящегося в активном состоянии, может взаимодействовать с $10\text{--}100$ G-белками. Одна активная молекула аденилатциклазы способна катализировать образование 100 молекул цАМФ. Следовательно, рецепторный сигнал усиливается в $10^3\text{--}10^4$ раз. цАМФ не является конечной мишенью действия рецепторного сигнала и активирует ферменты, которые, в свою очередь, также могут активировать ряд ферментов. В процессе передачи сигнала на внутриклеточные эффекторы с помощью таких ферментативных каскадов коэффициент усиления может достигать $10^4\text{--}10^8$. Теоретически показано, что коэффициент усиления сигнала ферментативными системами в клетке может достигать астрономических величин: $10^{12}\text{--}10^{40}$. Однако внутри одной клетки запасы субстратов весьма ограничены, поэтому реальная концентрация вторичных мессенджеров или конечных продуктов ферментативной реакции не превышает 10^{-2} моль/л. Если учесть, что концентрация лиганд-рецепторных комплексов обычно составляет $10^{-12}\text{--}10^{-9}$ моль/л, то внутри клеток рецепторный сигнал увеличивается в среднем не более чем в $10^7\text{--}10^{10}$ раз.

Принципиально важной особенностью функционирования сигнальных систем клеток является необходимость инактивации развивающегося во времени концентрационного изменения, запускаемого лиганд-рецепторным взаимодействием. «Выключение» усилительного каскада передачи сигнала осуществляется различными способами, которые включают инактивацию рецепторов путем фосфорилирования протеинкиназами, выключение активированных ферментов путем дефосфорилирования фосфатазами, выключение G-белков путем гидролиза ГТФ, восстановление исходного уровня вторичного мессенджера в цитоплазме путем расщепления цАМФ фосфодиэстеразой.

Фосфоинозитидный путь передачи информации изображен на рис. 4.4. В этом механизме передачи сигнала активное участие принимают мембранные фосфолипиды, в частности, фосфатидилинозитол. Внешний сигнал после взаимодействия с рецептором через G_q -белок активирует фермент фосфолипазу C_β (ФЛС $_\beta$). Активация фосфолипазы C_β приводит к гидролизу мембранного фосфолипида фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата (ФИФ $_2$) на два соединения, служащие внутриклеточными мессенджерами: водорастворимый инозитол-1,4,5-трифосфат (ИФ $_3$) и липидорастворимый диацилглицерол (ДАГ).

Гидрофильный инозитолтрифосфат диффундирует в цитоплазму и в результате взаимодействия с ИФ $_3$ -рецепторами на мембране внутрикле-

точных депо (эндоплазматический ретикулум, митохондрии) вызывает освобождение ионов кальция. Выход ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо активирует так называемый депозависимый, или «емкостной», вход Ca^{2+} через каналы плазматической мембраны. «Емкостная» модель входа Ca^{2+} в клетки основывается на гипотезе, согласно которой вход Ca^{2+} из наружной среды регулируется степенью заполнения $\text{I}\Phi_3$ -чувствительных Ca^{2+} -депо таким образом, что опустошение депо активирует вход Ca^{2+} . По аналогии с конденсатором в электрической цепи Ca^{2+} -депо препятствуют входу Ca^{2+} , когда они заполнены («заряжены»), но активируют вход Ca^{2+} в клетку при их опустошении («разрядке»).

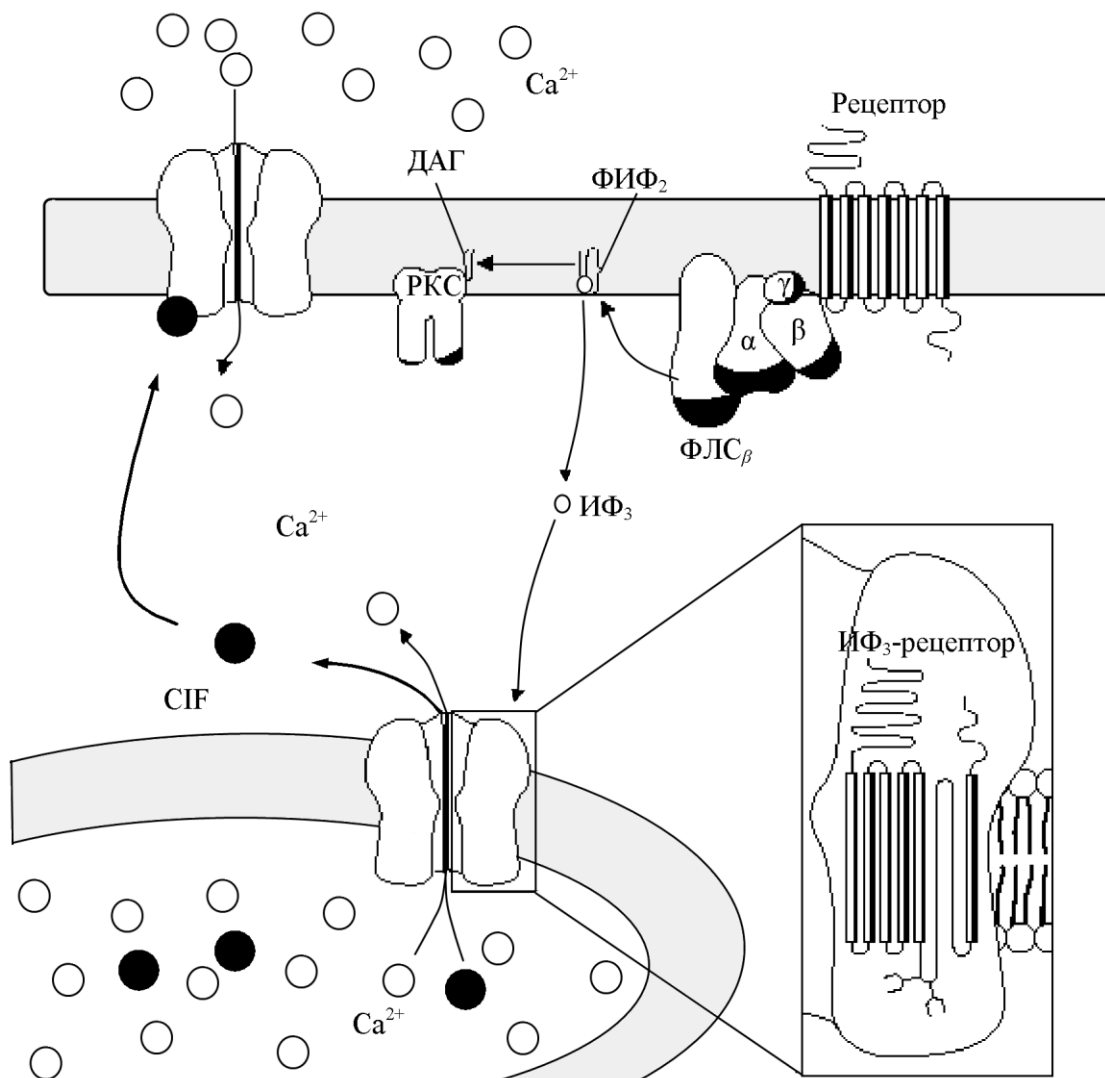


Рис. 4.4. Фосфоинозитидный путь передачи сигнала

Депозависимый вход Ca^{2+} является, по-видимому, универсальным механизмом регулируемого входа Ca^{2+} в клетки. Емкостной вход Ca^{2+} стимулируется различными агентами, общими свойствами которых является способность высвобождать Ca^{2+} из депо. В то же время механизм переда-

чи информации об опустошении Ca^{2+} -депо к Ca^{2+} -каналам в плазматической мембраны остается неясным. Согласно одной из моделей депозависимого входа Ca^{2+} в клетки при опустошении депо в цитоплазму освобождается водорастворимый вторичный мессенджер, который и активирует Ca^{2+} -каналы в плазматической мембране. Такой вторичный мессенджер получил название фактора входа Ca^{2+} (CIF – calcium influx factor). Согласно другой модели вход ионов Ca^{2+} регулируется белок-белковыми взаимодействиями между FI_3 -рецепторами Ca^{2+} -депо и Ca^{2+} -каналами плазматической мембраны.

При повышении внутриклеточной концентрации свободного кальция активируются многие кальций-зависимые процессы. Например, ионы Ca^{2+} образуют комплекс с белком кальмодулином. Этот комплекс активирует кальмодулин-зависимую протеинкиназу, катализирующую фосфорилирование неактивного белка, что обуславливает дальнейшее развитие клеточного ответа.

Внутриклеточная концентрация инозитолтрифосфата понижается в результате поэтапного гидролиза до инозитола. Далее инозитол включается в состав фосфатидинозитола, и только в мембране фосфорилируется до фосфатидинозитол-4,5-дифосфата, который может быть снова использован в данном пути передачи сигнала. Следует отметить, что фосфатидинозитол-4,5-дифосфат – важный модулятор взаимодействия мембран с цитоскелетом. Так, повышение его содержания в мембранах инициирует сборку актиновых филаментов, а снижение – разборку цитоскелета. Жирорастворимый диацилглицерол активирует протеинкиназу С (PKC). Протеинкиназа С в присутствии фосфатидилсерина и ионов кальция катализирует присоединение фосфата к неактивному белку, запуская ответную реакцию клетки. Диацилглицерол подвергается дальнейшим превращениям. В присутствии АТФ фермент диацилглицеролкиназа фосфорилирует ДАГ с образованием фосфатидной кислоты. Предполагается, что фосфатидная кислота может выполнять функцию кальциевого ионофора и транспортировать Ca^{2+} через плазматическую мембрану.

Кроме того, под действием диацилглицероллипазы из диацилглицерола образуется арахидоновая кислота, представляющая собой исходный материал для синтеза биологически активных соединений (первичных мессенджеров) – простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов. Также следует отметить, что одним из механизмов образования арахидоновой кислоты является ее высвобождение из фосфолипидов фосфолипазой A_2 , которая катализирует гидролиз сложноэфирной связи. Во многих случаях арахидоновая кислота выполняет роль вторичного мессенджера, модулируя активность фосфолипазы С, аденилатциклазы, гуанилатциклазы и протеинкиназы С.

4.5. ТРАНСДУКЦИЯ СИГНАЛОВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ С УЧАСТИЕМ ИОННЫХ КАНАЛОВ

Передача сигнала через мембрану не всегда сопряжена с включением G-белков. Ряд рецепторов, как уже отмечалось, являются ионными каналами. Эти рецепторы объединяются в класс рецепторов быстрого ответа и осуществляют ответ на сигнал в течение нескольких миллисекунд. В результате действия внешнего сигнала изменяется проводимость каналов, что индуцирует изменение мембранного потенциала.

Лиганд-управляемые каналы представляют собой ионные каналы, проводимость которых изменяется при связывании с специфическими лигандами. При связывании внешнего лиганда с рецептором данного типа происходит изменение конформации последнего, приводящее к открытию ион-селективной поры внутри белка. Через эту пору начинают двигаться ионы, что в конечном итоге приводит к изменению мембранного потенциала. Сдвиг мембранного потенциала, в свою очередь, вызывает изменение проводимости потенциал-зависимых K^+ -каналов, Na^+ -каналов и Ca^{2+} -каналов. Изменение проводимости Na^+ -каналов приводит к деполяризации мембраны, а изменение проводимости K^+ -каналов – к гиперполяризации мембраны. В электровозбудимых клетках деполяризация мембраны приводит к формированию потенциалов действия, которые распространяются по мембране клетки. Этот процесс основан на том, что локальное обращение мембранного потенциала стимулирует открывание соседних потенциал-управляемых ионных каналов. В результате возбуждение распространяется в виде деполяризационной волны по всей клетке.

Электровозбудимые клетки содержат также потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы, увеличение проводимости которых наблюдается при деполяризации мембраны. Вход ионов кальция в клетки приводит к активации специальных эффекторных белков, что инициирует дальнейшее развитие клеточного ответа.

Согласно имеющимся данным, величина и пространственное распределение кальциевого сигнала – ключевой момент в процессе кодировки внешней информации. В нейронах, например, распространение потенциалов действия может приводить к появлению колебаний внутриклеточной концентрации ионов кальция. Частота этих колебаний изменяется при изменении частоты следования потенциалов действия. В свою очередь, определяемая электрической активностью частота кальциевых колебаний регулирует экспрессию генов. Отличия в экспрессии генов при различных паттернах изменения внутриклеточной концентрации свободного кальция обусловлены тем, что активность факторов транскрипции регулируется в результате процессов их кальций-зависимого фосфорилирования-дефосфорилирования. Так, фосфорилирование фактора транскрипции

CREB (cAMP response element binding protein), приводящее к активации белка, осуществляется кальмодулин-зависимой протеинкиназой II, а дефосфорилирование, инактивирующее белок, – фосфатазой кальциневрином. Активность кальмодулин-зависимой протеинкиназы II и кальциневрина регулируется ионами кальция, однако у этих белков константы связывания кальция различаются. В результате время нахождения фактора транскрипции в активном, фосфорированном состоянии зависит от амплитуды и частоты кальциевых колебаний.

Среди лиганд-управляемых каналов следует также указать лиганд-управляемые Ca^{2+} -каналы внутриклеточных депо. Эти системы преимущественно участвуют в передаче и усилении внутриклеточного сигнала. Среди лиганд-управляемых Ca^{2+} -каналов внутриклеточных депо наиболее изучены ИФ₃-рецепторы и рианодиновые рецепторы.

ИФ₃-рецепторы – основные рецепторы Ca^{2+} -депо в большинстве типов клеток за исключением нейронов и мышечных клеток. ИФ₃-рецептор имеет массу около 313 кДа и состоит из четырех нековалентно связанных субъединиц. Активация канала происходит при конформационной перестройке рецептора в результате связывания ИФ₃.

Свое название рианодиновые рецепторы получили из-за способности специфически связывать растительный алкалоид рианодин. Алкалоид рианодин в концентрациях 5–50 нмоль/л индуцирует открытие Ca^{2+} -каналов, а в микромолярных концентрациях блокирует каналы.

Рианодиновый рецептор является гомотетрамером с молекулярной массой около 550 кДа, структура которого напоминает четырехлепестковый лист клевера. Наиболее изучен рианодиновый рецептор из скелетных мышц кролика. Каждая из четырех субъединиц этого белка состоит из 5037 аминокислотных остатков, из которых только около 500 гидрофобны и входят в состав мембранного сегмента. В скелетных мышцах информация от плазматической мембраны к саркоплазматическому ретикулуму передается по механизму, описываемому моделью конформационного связывания. Согласно этой модели, большой гидрофильный участок рианодинового рецептора непосредственно взаимодействует с цитоплазматическими доменами потенциал-управляемых Ca^{2+} -каналов L-типа плазматической мембраны, обеспечивая таким образом электромеханическое сопряжение мембран. В других типах клеток информация от плазматической мембраны к рианодиновому рецептору передается с помощью вторичных мессенжеров.

4.6. РЕЦЕПТОРЫ С ТИРОЗИНКИНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Фосфорилирование белков, осуществляемое протеинкиназами, является наиболее общим механизмом внутриклеточной сигнализации во всех

типах клеток. Присоединение фосфата осуществляется в результате образования эфирной связи с гидроксильными группами аминокислотных остатков серина, треонина и тирозина. Селективное введение фосфатных групп в сериновые, треониновые и тирозиновые остатки белковых молекул существенно изменяет заряд и конформацию макромолекулы и приводит к изменениям ферментативной активности белков и метаболизма клетки в целом. Выделяют два типа фосфорилирования: 1) фосфорилирование по сериновым и треониновым аминокислотным остаткам, 2) фосфорилирование по тирозину. Протеинкиназы также подразделяются на серин/треониновые и тирозиновые. Фосфорилирование тирозина играет ключевую роль в пролиферации и дифференцировке клеток и отсутствует у одноклеточных эукариот. Таким образом, данный тип фосфорилирования служит показателем передачи сигналов у многоклеточных организмов. Тирозинкиназы бывают двух типов: рецепторные и цитоплазматические. Цитоплазматические тирозинкиназы участвуют во внутриклеточной сигнализации, включая передачу сигналов в ядро. Рецепторные тирозинкиназы осуществляют трансмембранную передачу сигналов. Типичные рецепторные тирозинкиназы – это рецепторы инсулина, эпидермального фактора роста (ЭФР), тромбоцитарного фактора роста.

Тирозинкиназные рецепторы содержат четыре основных домена: внеклеточный, цитоплазматический, трансмембранный и регуляторный. Внеклеточный домен рецептора участвует в связывании лиганда. Связывание лиганда вызывает конформационные изменения, которые активируют тирозинкиназный цитоплазматический домен. Этот домен участвует в дальнейшей передаче сигнала внутрь клетки путем фосфорилирования соответствующих мишеней по тирозиновым остаткам. Тирозинкиназные рецепторы содержат также один или несколько внутриклеточных регуляторных доменов. На регуляторных фрагментах расположены множественные участки аутофосфорилирования рецепторов. Внеклеточный и внутриклеточный домены связываются трансмембранным доменом, который пронизывает плазматическую мембрану клетки один раз.

На основании сходства структурных элементов в настоящее время выделяют 14 различных семейств рецепторных тирозинкиназ. Различия между семействами рецепторов наиболее полно проявляются в структуре их внеклеточных доменов. Так, представители семейства рецепторов инсулина и инсулинподобного фактора роста во внеклеточном домене содержат один участок, богатый цистеином. Представители семейства рецепторов эпидермального фактора роста во внеклеточной области содержат 2-3 богатых цистеином участка. Для других семейств рецепторных тирозинкиназ характерно наличие иммуноглобулиновых доменов во внеклеточной области. Семейство рецепторов фактора роста нервов содержат 2, семей-

ство рецепторов фактора роста фибробластов – 3, а семейство рецепторов тромбоцитарного фактора роста – 5 иммуноглобулиновых доменов во внеклеточной области.

Активация рецепторных тирозинкиназ при связывании лигандов осуществляется путем димеризации рецепторов. Образовавшийся димер запускает процессы аутофосфорилирования, в результате которых происходит активация рецептора. Наличие фосфорилированных остатков тирозина является сигналом для связывания адаптерных белков и дальнейшей передачи сигнала в клетку.

Рассмотрим трансмембранную передачу сигналов с участием рецепторных тирозинкиназ на примере работы рецептора эпидермального фактора роста (рис. 4.5).

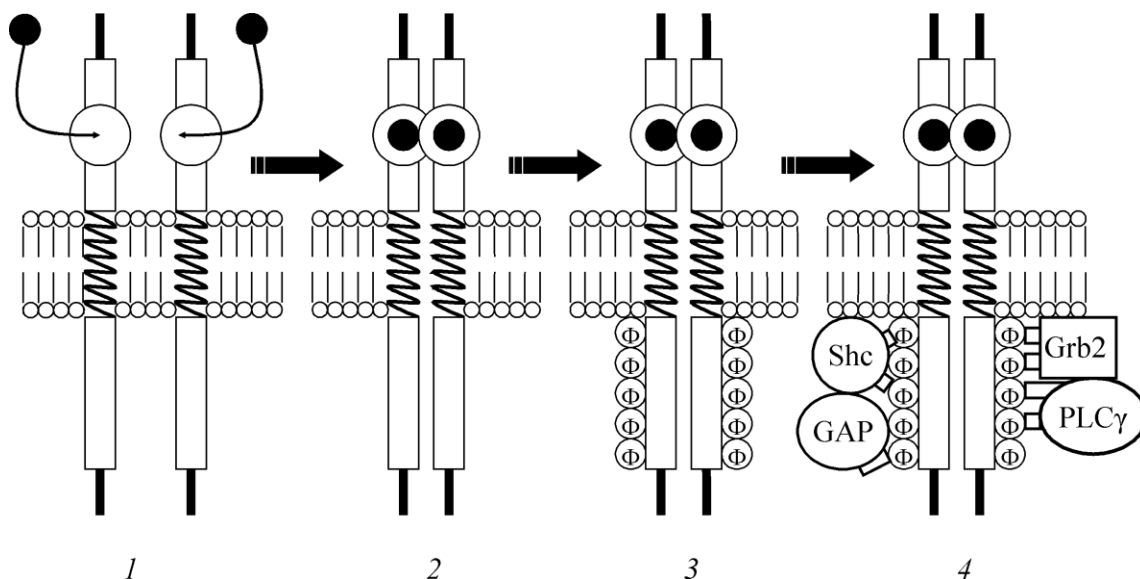


Рис. 4.5. Стадии формирования лиганд-рецепторного сигнального комплекса: 1 – связывание лиганда с рецептором; 2 – димеризация рецепторов; 3 – аутофосфорилирование рецепторов; 4 – связывание ферментов и адаптерных белков с фосфотирозинowymi остатками рецептора

Регуляторный С-концевой домен рецептора ЭФР содержит 5 остатков тирозина, которые подвергаются аутофосфорилированию при димеризации белка. Фосфотирозиновые остатки рецептора обеспечивают места связывания для адаптерного белка Grb2 (growth-factor-receptor-binding protein 2), промежуточных факторов Shc (адаптерного белка гомологичного Src 2 (SH2)), фосфолипазы C_γ (ФЛС $_\gamma$) и белка GAP (GTPase-activating protein), регулирующего активность ГТФаз. Белок Shc также может подвергаться фосфорилированию по тирозину после рецепторной активации и затем способен связывать Grb2. Активация рецептора ЭФР увеличивает активность ФЛС $_\gamma$, которая, как и ФЛС $_\beta$, в результате гидролиза ФИФ $_2$ приводит к увеличению внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} и за-

пуску кальций-зависимых процессов. Адаптерный белок Grb2 связывает фактор обмена ГДФ/ГТФ Sos, который активирует обладающий ГТФазной активностью белок Ras. Активная форма Ras-ГТФ, в свою очередь, при связывании с соответствующими эффекторами запускает ферментативный путь усиления и передачи сигнала к ядру клетки, основными участниками которого являются члены семейства митоген-активируемых протеинкиназ MAPK (mitogen-activating protein kinase) (рис. 4.6).

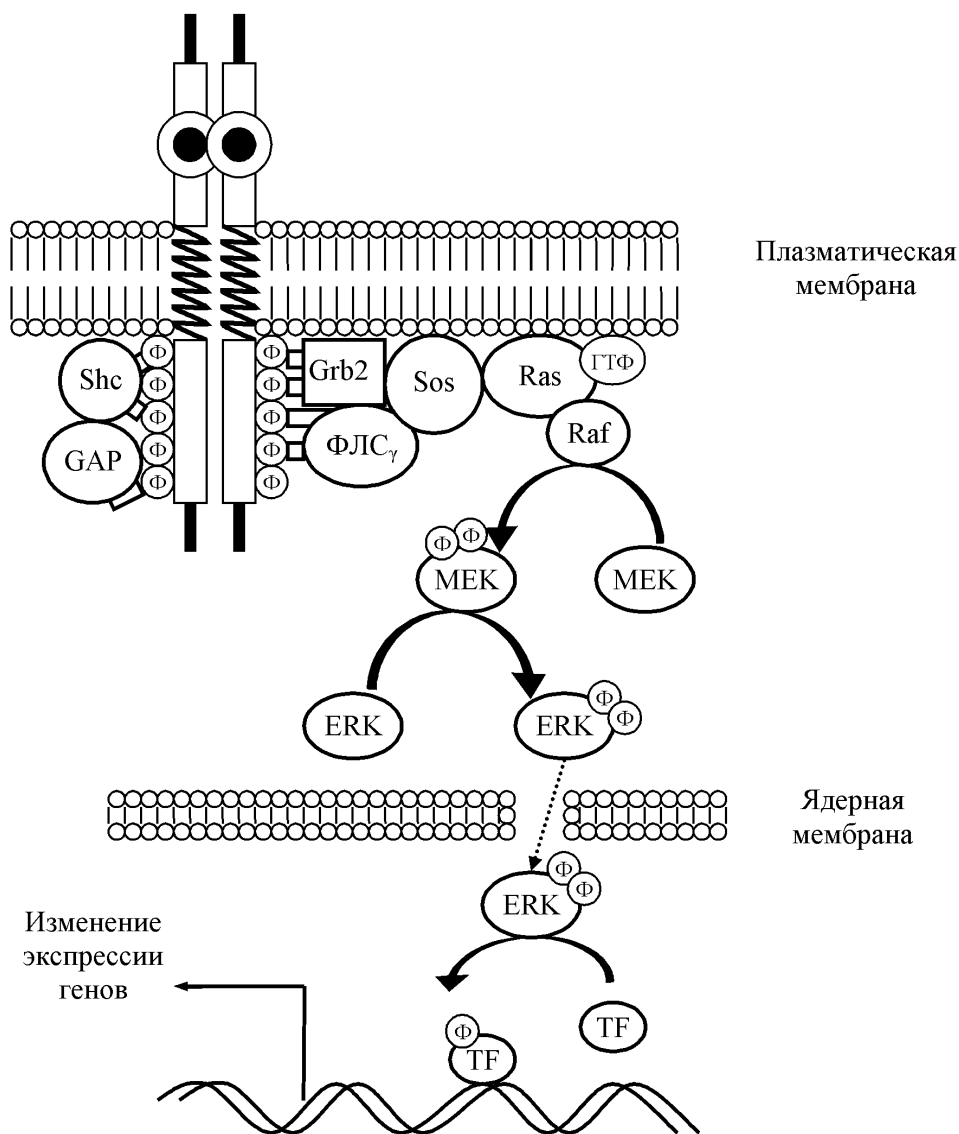


Рис. 4.6. Активация MAPK-каскада

Наиболее полно описан сигнальный путь, который включает взаимодействие Ras с белками семейства Raf. Активация белка семейства Raf способствует его транслокации к клеточной мембране, где он в результате серин/треонинового фосфорилирования активирует белок MEK (MAP kinase/ERK – activating kinase). MEK фосфорилирует как тирозиновые, так

и треониновые остатки митоген-активируемой киназы ERK (extracellular signal-regulated kinase). Двойное фосфорилирование активирует MAPK, которая, в свою очередь, фосфорилирует ряд субстратов как в цитозоле, так и в ядре (куда она перемещаются после активации). Мишенью действия MAPK в ядре являются факторы транскрипции (TF), регулирующие экспрессию генов.

Наряду с трансмембранными рецепторными тирозинкиназами существует также группа рецепторов, передающая информацию внутрь клеток с участием цитоплазматических тирозинкиназ. Эти рецепторы не имеют собственного каталитического тирозинкиназного домена, но при активации связываются с цитоплазматическими тирозинкиназами и образуют единый сигнальный комплекс. К этой части рецепторов, которые часто называют бимолекулярными рецепторными тирозинкиназами, относятся рецепторы цитокинов и антигенов. В качестве сигнальных субъединиц для этих рецепторов выступают цитоплазматические тирозинкиназы семейств Src и Jak.

Передача внутриклеточного сигнала посредством фосфорилирования определяется активностью как тирозинкиназ, так тирозинфосфатаз. Без активации рецепторов активность тирозинфосфатаз на 2-3 порядка выше, чем активность тирозинкиназ. Поэтому для того, чтобы сигнализация с участием тирозинкиназ была эффективной, активность тирозинфосфатаз также должна регулироваться. Выделяют два типа тирозинфосфатаз: рецепторные и цитоплазматические. Регуляция рецепторных тирозинфосфатаз осуществляется первичными мессенджерами, а активность цитоплазматических тирозинфосфатаз – вторичными мессенджерами.

Степень и продолжительность фосфорилирования, опосредованного рецепторными тирозинкиназами, могут быть значительно увеличены в результате ингибирования активности тирозинфосфатаз. Поэтому запуск сигнальных систем с участием рецепторных тирозинкиназ сопровождается также активацией супероксид-синтазной системы вторичных мессенджеров. Тирозинкиназные рецепторы с помощью белка Ras активируют фермент НАДФН-оксидазу, которая катализирует перенос электронов от НАДФН к кислороду с образованием супероксидного анион-радикала. Супероксидный анион-радикал и образующийся в результате супероксидной дисмутации пероксид водорода приводят к инактивации тирозинфосфатаз.

4.7. ТРАНСМЕМБРАННАЯ ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА ПРИ КОНТАКТНОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ

Трансмембранная передача информации происходит не только при взаимодействии первичных мессенджеров с рецепторами, но и при взаи-

модействии клеток с молекулами внеклеточного матрикса или молекулами на поверхности соседних клеток. Процесс прикрепления клеток к субстрату называется адгезией и происходит с участием специальных белков. Эти белки называются молекулами клеточной адгезии. Молекулы клеточной адгезии являются рецепторами, лигандами для которых служат или сами молекулы клеточной адгезии, расположенные на поверхности контактирующих клеток, или молекулы внеклеточного матрикса. Запускаемые адгезией сигнальные пути регулируют пролиферацию и рост клеток на разных стадиях развития многоклеточных организмов. Среди молекул клеточной адгезии выделяют интегрины, селектины и кадгерины. Селектины и кадгерины вызывают адгезию через механизм, в котором клеточное связывание вызывается взаимодействием одинаковых молекулярных единиц на контактирующих поверхностях взаимодействующих клеток. Интегрины способны связываться с другими молекулами клеточной адгезии или молекулами внеклеточного матрикса, такими как ламинин, фибронектин, тенаскин, тромбоспондин. Рассмотрим на примере интегринов процесс активации внутриклеточных сигнальных путей с участием молекул клеточной адгезии. При активации интегринов одним из клеточных ответов является перестройка цитоскелета клетки. Взаимодействие актиновых филаментов с интегринными осуществляется с участием мультимолекулярных комплексов, содержащих ряд белков, включая такие белки, связывающие актин, как винкулин, талин, α -актинин, паксиллин, тензин, а также киназу фокальной адгезии (КФА), которая является нерецепторной тирозинкиназой, фосфорилирующей паксиллин, тензин и другие компоненты мультимолекулярного комплекса. Образование интегриновых кластеров вызывает связывание белка тензина и КФА с мембраной. Когда лиганды интегриновых рецепторов связываются с молекулами внеклеточного матрикса, то в дополнение к тензину и КФА наблюдается аккумуляция различных актин-связывающих белков, таких как талин, α -актинин и винкулин. Фосфорилирование тирозина, в свою очередь, вызывает также дополнительную аккумуляцию, по крайней мере, 19 типов сигнальных молекул, среди которых ФЛС_γ, фосфатидилинозитол-3-киназа, RhoA, Rac1, Sos, Grb2, Ras, Raf1, MEK1, ERK1/2, JNK (с-Jun N-терминальная киназа), и которые, возможно, участвуют в дальнейшей передаче сигнала к ядру. Если имеет место агрегация интегринов, связывание их с молекулами внеклеточного матрикса и фосфорилирование тирозина, то к указанным выше белкам добавляются паксиллин, филамин и F-актин.

ГЛАВА 5. ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

5.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ВИДОВ ТРАНСПОРТА ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ

Содержание понятия «мембранный транспорт» формировалось вместе с развитием представлений о мембранных структурах, обеспечивающих транспорт веществ. К настоящему времени установлена структура многих белков, участвующих в транспорте веществ через мембраны, идентифицировано большое число механизмов транспорта в клетках, разработаны теоретические модели мембранного транспорта.

Плазматическая мембрана клеток представляет собой селективнопроницаемый (полупроницаемый) барьер между клеткой и внеклеточной средой. Селективная проницаемость плазматической мембраны позволяет клетке сохранять постоянной внутреннюю среду. Транспорт веществ через мембраны является избирательным. Скорость переноса различных веществ не одинакова: одни вещества практически не проникают, другие проникают через мембрану довольно легко. Таким образом, мембраны обеспечивают сохранение концентрационных градиентов для всех веществ во всех компартментах клетки.

Через мембраны клеток в обоих направлениях с участием всех возможных механизмов осуществляется перенос многих веществ, в том числе: 1) ионов (например, одновалентных Na^+ , K^+ , Cl^- , H^+ , HCO_3^- , двухвалентных – Ca^{2+} и других типов ионов). Такой тип транспорта часто называют ионным транспортом; 2) малых нейтральных и полярных неорганических молекул (например, H_2O , CO_2); 3) малых неполярных органических молекул (например, бензола); 4) больших неполярных органических молекул; 5) незаряженных органических молекул (например, глюкозы, сахарозы); 6) органических ионов; 7) биополимеров (например, белков, РНК). Перенос веществ в процессах 2–7 иногда называют молекулярным транспортом.

Транспорт массивных структур или массоперенос осуществляется в процессах: 1) переноса захваченных объемов жидкости (процесс называется пиноцитозом), 2) транспорта макромолекул в клетки и из клеток, обеспечиваемый специально формируемыми везикулами (процессы называются соответственно эндоцитозом и экзоцитозом), 3) захвата бактерий, вирусов и ряда других чужеродных структур в специально формируемые везикулы и их перенос в клетки (процесс называется фагоцитозом).

Среди переносимых через мембрану веществ присутствуют необходимые для клеток питательные вещества, регуляторные и сигнальные молекулы и ионы, продукты метаболизма в клетках. В клетках эукариот имеет

место также транспорт веществ, например белков, мРНК, Ca^{2+} , АТФ внутрь и наружу в мембранах внутриклеточных компартментов, таких как ядро, эндоплазматический ретикулум, митохондрии.

Самая общая классификация транспортных процессов – это разделение их на две группы – белок-независимое и белок-зависимое движение молекул через биологические мембраны. Независимый от белков транспорт веществ через мембраны обеспечивается физическим процессом – диффузией молекул.

Белки обеспечивают контроль транспорта растворенных веществ через мембраны клеток, что существенно для многих физиологических процессов. Интегральные белки, контролирующие мембранную проницаемость, разделяют на три класса – каналы, насосы и транспортеры.

Каналы – мембранные белки (или олигомерные кластеры), обеспечивающие специфический транспорт ионов или незаряженных молекул в направлении, противоположном направлению градиента химического или электрохимического потенциала переносимых веществ. К каналам относятся также аквапорины – белки, через поры которых переносятся молекулы воды.

Насосы являются ферментами (АТФазами), утилизирующими энергию АТФ, света и, изредка, энергию из других источников для перемещения ионов (чаще катионов) и других растворенных веществ через мембраны с относительно небольшими скоростями в направлении градиентов химических или электрохимических потенциалов. Они устанавливают концентрационные градиенты между мембраносвязанными компартментами. Это процесс, обозначаемый как активный транспорт, – пример сопряженного процесса. Процесс в целом – гидролиз АТФ и движение ионов в области с более высокой их концентрацией – энергетически выгоден. Насосы обеспечивают поддержание низких концентраций ионов Na^+ и Ca^{2+} в практически всех клетках тканей животных, генерируют низкие значения рН в лизосомах клеток животных и в вакуолях растительных клеток и т. д. Транспорт веществ, обеспечиваемый различными экзергоническими химическими или фотохимическими реакциями, называется также первичным активным транспортом.

Транспортеры – белки, которые обеспечивают пассивные пути прохождения молекул растворенных веществ через мембраны из областей с высокой концентрацией в области с низкой концентрацией. При каждом изменении конформации белок-транспортер транслоцирует через мембрану определенное число молекул растворенного вещества. Транспортеры могут функционировать либо без использования энергии, большей по величине энергии теплового движения (облегченная или опосредованная диффузия), либо обеспечиваются градиентами электрохимического по-

тенциала ионов H^+ и Na^+ .

Переносчики могут также обеспечивать пути для перемещения субстратов в направлении градиента концентрации, если этот перенос идет одновременно с переносом другого субстрата в направлении, противоположном направлению его электрохимического градиента. Такие процессы часто называют вторичным активным транспортом. Глюкоза – пример субстрата, который может переноситься в направлении областей как с большей, так и с меньшей концентрациями. Например, транспортер GLUT1 обеспечивает перенос глюкозы из плазмы в эритроциты, в которых концентрация глюкозы ниже. С другой стороны, транспортер SGLT1 использует градиент ионов Na^+ , устанавливаемый АТФазами, для переноса глюкозы в направлении градиента ее концентрации.

Модели унипорта, симпорта и антипорта строятся подобным образом. Унипортеры (переносчики) имеют одно место связывания, а симпортеры (котранспортеры) и антипортеры (обменники) – несколько мест связывания, которые экспонированы к внеклеточной или внутриклеточной средам.

Небольшое число транспортеров характеризуется более сложными функциями, чем это указано в классификации. Пример – транспортер нейротрансмиттеров, обеспечивающий одновременно как антипорт, так и симпорт Na^+ и Cl^- в одном направлении и нейротрансмиттера – в другом.

Все три класса транспортеров используют подобные механизмы для переноса субстратов через мембраны. Транспортеры функционируют подобно ферментам: сначала связывают субстраты с одной стороны мембраны, подвергаются конформационным изменениям, которые переориентируют место связывания и высвобождают субстрат на противоположной стороне мембраны. Концентрации субстратов по обеим сторонам мембраны определяют направление потоков веществ через мембраны. В зависимости от того, является ли транспортер унипортером, антипортером или симпортером, меняется только число мест связывания субстрата и постоянная равновесия для различных типов транспортеров, переориентирующихся через мембрану. Реальная скорость транспорта зависит от концентрации субстратов.

Сравнительный анализ скоростей транспорта ионов различными транспортными системами представлен на рис. 5.1. Существует целый ряд транспортных механизмов, которые можно разделить на следующие основные категории: простая диффузия, облегченная диффузия, электродиффузия и активный транспорт.

В табл. 5.1 приведены сравнительные характеристики различных процессов транспорта веществ через мембраны. Облегченная диффузия в отличие от простой диффузии характеризуется химической специфич-

ностью и насыщаемостью.

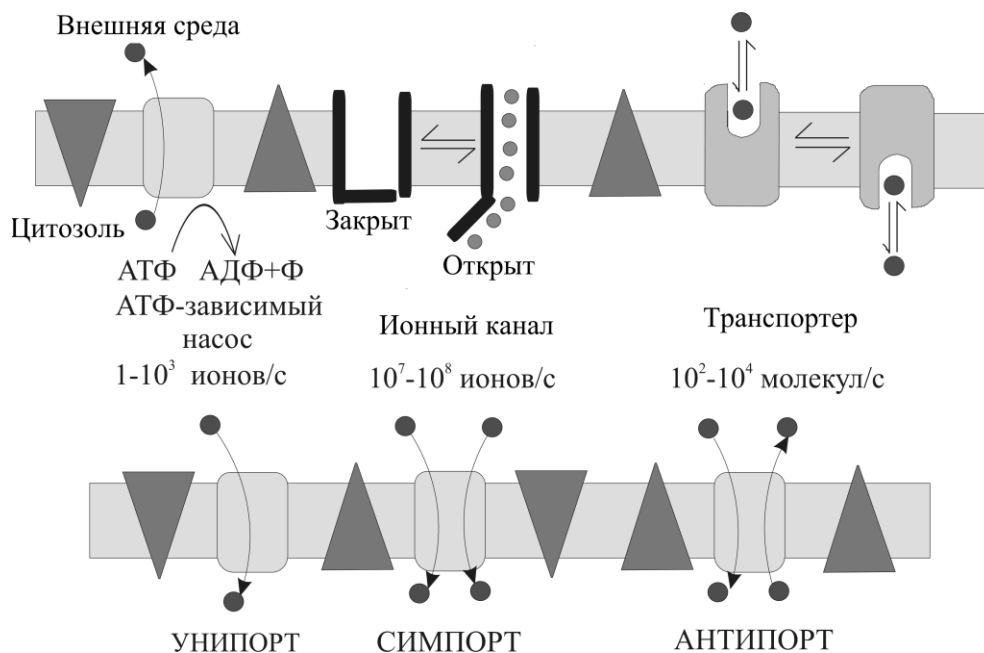


Рис. 5.1. Скорость переноса ионов через мембрану транспортными белками (вверху) и механизмы транспорта (внизу)

Таблица 5.1

Сравнительная характеристика механизмов транспорта ионов и малых молекул через мембраны

Тип транспорта	Диффузия	Облегченная диффузия	Электро-диффузия	Первичный активный транспорт	Вторичный активный транспорт
Направление потока вещества	От высоких концентраций к низким	От высоких концентраций к низким	От высоких концентраций к низким	От низких концентраций к высоким	От низких концентраций к высоким
Транспортные системы	Нет	Переносчики	Каналы	Насосы	Обменники, котранспортеры
Насыщаемость	Нет	Да	Нет	Да	Да
Использование энергии АТФ	Нет	Нет	Нет	Да	Нет
Примеры веществ	O ₂ , CO ₂ , жирные кислоты	Глюкоза, аминокислоты	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ , вода	H ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , липиды	Ионы и сахара, глюкоза и аминокислоты

5.2. ДИФФУЗИЯ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

5.2.1. Диффузия веществ в растворе

Фундаментальным признаком всех организмов является эффективный транспорт растворенных веществ и растворителя. Такой транспорт необходим для обеспечения клеточного метаболизма, генерации энергии, трансдукции сигнала и т.п.

Многие вещества пересекают мембрану пассивно, т. е. движутся в направлении, которое определяется набором физических условий, характеризующих внутреннюю и внешнюю среду клетки, таких как концентрация, гидростатическое давление, электрический потенциал и др. Пассивный транспорт будет иметь место в любой системе, в которой распределение вещества отличается от распределения при термодинамическом равновесии (например, между внутри- и внеклеточными фазами).

Диффузия обеспечивает перенос веществ в направлении, противоположном направлению градиента концентрации, т. е. из областей с высокой концентрацией в области с низкой концентрацией растворенных веществ. Экспериментальные наблюдения показывают, что необходимым условием существования диффузии является неоднородное распределение молекул в растворе (наличие областей с разной концентрацией молекул). Следовательно, при диффузии можно говорить о потоках вещества из одной области раствора в другую. Если концентрация вещества по всему объему одинакова, то направленного перемещения вещества не происходит. Молекулы совершают случайные блуждания, однако число молекул, движущихся в разных направлениях, одинаково, и суммарный поток вещества равен нулю.

Количественной характеристикой движения вещества служит величина, называемая диффузионным потоком. Диффузионный поток $J(x, t)$ равен числу молекул вещества, проходящих за единицу времени через единичную площадку, перпендикулярную направлению потока.

Связь между потоком и концентрацией вещества в растворе устанавливается первым законом Фика (применим только для разбавленных растворов):

$$J(x, t) = -D \frac{\partial C(x, t)}{\partial x}, \quad (5.1)$$

где D – коэффициент диффузии молекул в растворе, величина $\frac{\partial C(x)}{\partial x}$ – концентрационный градиент вещества в направлении оси x . Отрицательный знак в уравнении означает, что поток всегда направлен в сторону уменьшения концентрации вещества.

Для разбавленных растворов коэффициент диффузии D не зависит от концентрации растворенного вещества. В то же время коэффициент диффузии зависит от температуры, давления, формы и размеров диффундирующих молекул, а также от молекулярных свойств среды, в которой имеет место диффузия (например, вязкость).

Установлено, что для относительно больших молекул при постоянной температуре имеет место соотношение

$$D\sqrt[3]{M} = \text{const}, \text{ или } D = \frac{\text{const}}{\sqrt[3]{M}}, \quad (5.2)$$

где M – молекулярная масса.

При перемещении через мембраны молекулы веществ переходят из водной среды в липидную фазу, а затем из липидного бислоя – опять в водную среду. Физико-химические свойства окружения молекул в этих средах различаются. Важнейшей характеристикой при анализе механизмов движения молекул в таких системах является растворимость молекул в различных фазах.

При равновесии частицы вещества распределены между липидной и водной фазами. Если обозначить через C_1 и C_2 концентрации частиц в первой и второй фазах, то коэффициент распределения k частиц любой формы между первой и второй фазами будет равен:

$$k = \frac{C_2}{C_1} = e^{-\frac{\Delta G}{RT}} = e^{-\frac{A(\sigma_1 - \sigma_2)}{RT}}, \quad (5.3)$$

где A – площадь поверхности частицы; σ_1, σ_2 – величины поверхностного натяжения на границах разделов частица – фаза 1 и частица – фаза 2 соответственно. Величина k – функция температуры и величины ΔG , которая определяет работу, совершаемую при переносе частиц из одной фазы в другую.

Экспериментально определить коэффициент распределения вещества между липидной и водной фазами можно следующим образом. В сосуд помещают масло, воду и вещество i , затем смесь тщательно перемешивают и ожидают некоторое время для установления равновесия. С течением времени в сосуде формируется межфазная граница масло – вода. Вещество оказывается распределенным в двух фазах. Определив концентрацию растворенного вещества в воде и в масле, можно найти коэффициент распределения. Если концентрации растворенного вещества обозначить в слое масла как $C_i^{\text{масло}}$, а в слое воды – $C_i^{\text{вода}}$, то коэффициент распределения k_i вещества i определяется по формуле

$$k_i = \frac{C_i^{\text{масло}}}{C_i^{\text{вода}}} . \quad (5.4)$$

Если вещество хорошо растворимо в масле, тогда $k \gg 1$, при слабой растворимости вещества в масле $k \ll 1$.

5.2.2. Диффузия вещества через мембрану

Процесс диффузии веществ через мембрану, например в клетку, может быть разделен на несколько стадий: растворение вещества в мембране, диффузия через нее, вход вещества в клетку и накопление в клетке. Такая модель диффузии описывается теорией «растворения – диффузии», согласно которой молекулы растворенного вещества сначала растворяются в мембране, а затем диффундируют через нее.

В рамках данной модели предполагается, что при стационарных условиях поток J_i одинаков по всей толщине мембраны и равен

$$J_i(t) = P_i \left(C_i^B(t) - C_i^C(t) \right), \quad (5.5)$$

где $C_i^B(t)$ – концентрация вещества i внутри клетки, $C_i^C(t)$ – концентрация вещества i снаружи клетки, а величина P_i , равная

$$P_i = \frac{D_i k_i}{d}, \quad (5.6)$$

называется коэффициентом проницаемости или просто проницаемостью. D_i – коэффициент диффузии молекул вещества i в растворе, d – толщина мембраны, k_i – коэффициент распределения вещества i .

Выражение (5.5) называется первым законом Фика для мембран и характеризует стационарный поток вещества через мембрану на макроскопическом уровне. Таким образом, транспорт вещества через мембрану по диффузионному механизму идет в направлении, противоположном направлению градиента концентрации вещества. Такой тип транспорта через мембраны называется пассивной диффузией. Если P_i велико, то мембрана характеризуется высокой проницаемостью для растворенного вещества i . Если $P_i = 0$, то мембрана непроницаема для растворенного вещества i .

Водорастворимые молекулы характеризуются очень низким коэффициентом распределения в углеводородном интерьере липидных мембран. Например, для глюкозы $k_{\text{глю}} = 5 \cdot 10^{-10}$. Коэффициент диффузии глюкозы в мембране $D_{\text{глю}}$ примерно в 100 раз меньше, чем в воде, и равен $0,67 \cdot 10^{-7}$ см²/с. Таким образом, проницаемость глюкозы через липидный бислой (для углеводородного слоя мембраны, толщиной 3 нм) будет равна:

$$P_{\text{глю}} = (5 \cdot 10^{-10}) \cdot (0,67 \cdot 10^{-7} \text{ см}^2 / \text{с}) / (3 \cdot 10^{-7} \text{ см}) \approx 10^{-10} \text{ см} / \text{с}.$$

Отсюда следует, что если в цитозоле клетки, для мембраны которой характерно такое же значение проницаемости, глюкоза отсутствует, а снаружи присутствует, то одинаковая концентрация глюкозы по обе стороны мембраны установится примерно через 100 дней. В отличие от водорастворимых веществ молекулы веществ, для которых характерна высокая растворимость в липидном бислое, имеют высокое значение коэффициента проницаемости через мембраны. Например, дыхательные газы кислород и углекислый газ имеют коэффициент распределения больше 1, поэтому их проницаемость примерно в 10^{10} раз больше, чем глюкозы. Следовательно, наличие мембраны для входа этих веществ в клетку или для выхода из нее практически значения не имеет.

5.3. ОБЛЕГЧЕННЫЙ ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ

5.3.1. Облегченная диффузия

Облегченная диффузия (облегченный транспорт) – тип пассивного транспорта, также как и активный транспорт и транспорт ионов, происходит с обязательным участием белков.

Транспорт через клеточные мембраны многих веществ (например, моносахаридов, мононуклеотидов, аминокислот, фосфатов, мочевой кислоты) обеспечивается белками-переносчиками. Переносчик связывает молекулы растворенного вещества с одной стороны мембраны, затем транспортирует через мембрану на другую сторону, где они высвобождаются.

При облегченной диффузии каждая молекула белка-переносчика транслирует одну молекулу переносимого вещества.

Транспорт, осуществляемый переносчиками, имеет ряд отличительных черт:

1. Зависимость потока растворенного вещества от его концентрации выходит на насыщение. Транспорт осуществляется ограниченным числом молекул переносчика. Следовательно, существует максимальное значение скорости транспорта V_{max} , которое достигается, когда концентрационный градиент через мембрану очень велик и каждый переносчик функционирует с максимальной скоростью.

2. Скорость транспорта вещества переносчиком в мембране выше, чем скорости растворения и диффузии в мембране растворенного вещества.

3. Облегченный транспорт обеспечивает перенос растворенного вещества против градиента его концентрации.

4. Облегченный транспорт – субстратоспецифичен. Скорости переноса

даже близких по структуре веществ через мембраны могут сильно различаться. Каждый унипортер транспортирует только определенный тип молекул.

5. За места связывания с молекулами транспортера могут конкурировать несколько типов переносимых молекул. Например, два типа моносахаридов – глюкоза и сорбоза конкурируют за связывание с белком-транспортером сахаров.

6. Облегченным транспортом можно управлять, например, используя фармакологические (например, цитохалазин В) и гормональные вещества (например, инсулин).

5.3.2. Переносчики глюкозы

Классические эксперименты по изучению транспорта D-глюкозы выполнены в 1950-х гг. с плазматическими мембранами эритроцитов. Эритроциты крови человека удобно использовать, так как их мембраны содержат высокие концентрации переносчиков GLUT1. Временная зависимость аккумуляции глюкозы в эритроцитах показана на рис. 5.2 (кривая 1).

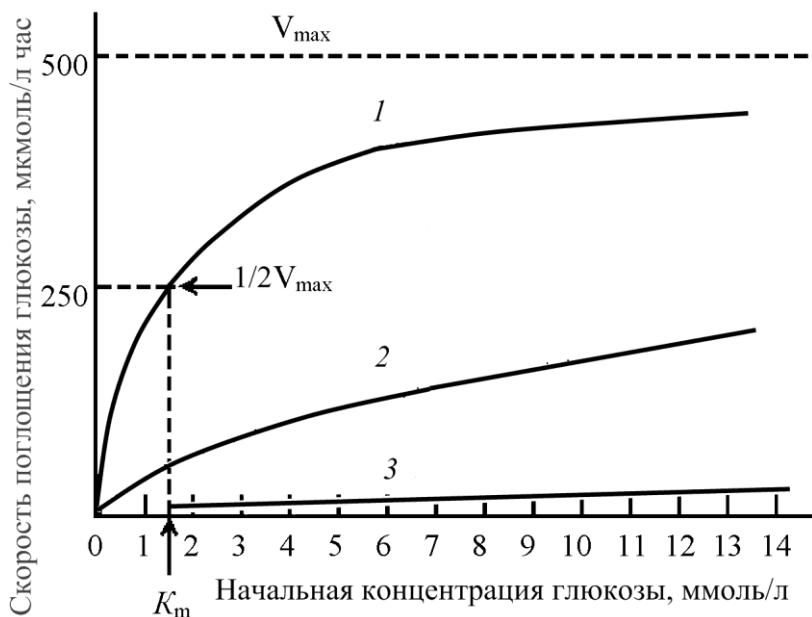


Рис. 5.2. Зависимость начальной скорости поглощения D-глюкозы клетками при различных значениях внешней концентрации углевода: 1- эритроцитами с участием GLUT1, 2 - клетками печени с участием GLUT2, 3 - рассчитанная зависимость для пассивной диффузии через фосфолипидный бислой

На этом же рисунке представлена зависимость накопления глюкозы в клетках печени, в мембранах которых экспрессирован транспортер GLUT2 (кривая 2). В этих экспериментах начальная концентрация глюко-

зы в клетках была равна нулю, таким образом, концентрационный градиент через мембраны клеток был равен величине концентрации глюкозы вне клеток. На рис. 5.2 (кривая 3) приведена также кривая накопления глюкозы в клетке, рассчитанная для пассивной диффузии через липидный бислой с учетом растворимости глюкозы в липидном бислое. Транспортёры глюкозы значительно увеличивают скорость ее транспорта через мембраны по сравнению со скоростью пассивной диффузии.

Последовательность событий при однонаправленном транспорте глюкозы унипортером GLUT1 из внешней для эритроцитов среды в цитозоль проиллюстрирована на рис. 5.3. Молекула переносчика может находиться в одной из двух конформаций: в одной конформации (1, 2 и 5) место связывания молекулы глюкозы находится с внешней стороны мембраны, в другой (3, 4) – место связывания глюкозы открывается к цитозолю. Связывание глюкозы снаружи (состояния 1 и 2) индуцирует конформационное изменение молекулы переносчика (состояния 2 и 3), затем происходит перемещение молекулы глюкозы через переносчик (состояние 4). При освобождении молекулы глюкозы происходит возврат молекулы переносчика в исходное конформационное состояние (4→5). Молекула переносчика может участвовать в новом цикле переноса глюкозы в клетку. Если концентрация глюкозы в клетке выше, чем снаружи, перенос глюкозы будет идти в противоположном направлении (цикл 4→1).

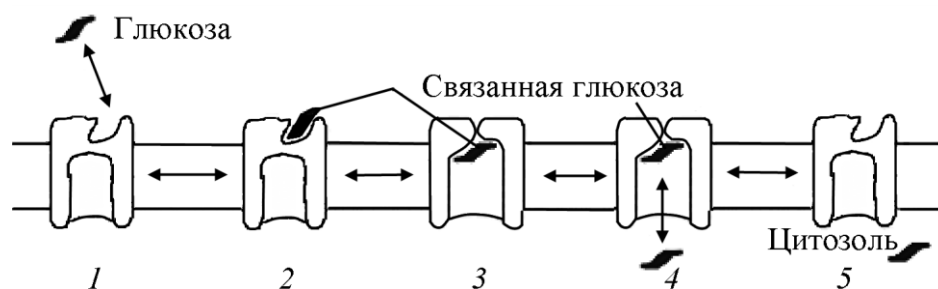


Рис. 5.3. Схема транспорта глюкозы

Кинетические уравнения связывания транспортером молекул переносимого вещества аналогичны уравнениям связывания субстрата ферментом. Обозначим переносчик символом GLUT1, а переносимое растворенное вещество – C . Возьмем в качестве переносимого вещества глюкозу. Процесс переноса соответствует четырем стадиям транспорта вещества по механизму облеченной диффузии: связывание у одной поверхности молекулы глюкозы молекулой переносчика, транслокация (транспорт) образовавшегося комплекса переносчик – глюкоза к другой поверхности мембраны, диссоциация молекулы глюкозы из комплекса (выход в раствор), конформационное изменение молекулы переносчика (в исходное состояние).

Будем считать, что первоначально глюкоза присутствует только снаружи клетки и ее концентрация равна C_c . В этом случае можно записать реакцию переносчик-субстрат, например с GLUT1, в виде:



где C_v – концентрация глюкозы в клетках. Константу образования комплекса переносчик – субстрат обозначим, как K_m . Тогда в соответствии с уравнением Михаэлиса-Ментен для скорости транспорта будем иметь выражение

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + K_m / C_c}, \quad (5.7)$$

где $V_{\max}$ – максимальная скорость транспорта субстрата в клетки. Мерой сродства транспортера к его субстрату является K_m – концентрация субстрата, при которой скорость транспорта субстрата равна половине максимальной скорости. Чем меньше значение K_m , тем прочнее связывается субстрат с переносчиком и тем больше скорость транспорта субстрата.

K_m для GLUT1, транспортирующего глюкозу в эритроцитах, равна 1,5 ммоль/л. При такой концентрации глюкозы примерно половина молекул переносчика, для которых места связывания глюкозы находятся снаружи клеток, будут находиться в связанном с глюкозой состоянии. Концентрация глюкозы в крови обычно равна 5 ммоль/л, или 0,9 г/литр. При этой концентрации около 77 % молекул переносчика глюкозы от их общего числа в эритроцитах будут функционировать с максимальной скоростью $V_{\max}$.

Результирующий транспорт требует концентрационного градиента, и так как конформационное изменение, которое переориентирует места связывания субстрата, является обратимым, то субстрат может двигаться в любом направлении. Скорость движения субстрата зависит от скоростей образования комплекса субстрат – переносчик на обеих сторонах мембраны. Скорости этих реакций прямо зависят от концентраций субстрата. Таким образом, места связывания переносчика более заняты на стороне с большей концентрацией и результирующий поток субстрата будет направлен, следовательно, к другой стороне мембраны. Если концентрации субстрата становятся одинаковыми по обеим сторонам мембраны, обмен продолжается без результирующего потока, потому что переносчик одинаково насыщается по обе стороны мембраны. После переноса в эритроциты глюкоза быстро фосфорилируется с образованием глюкозо-6-фосфата, который через мембрану не проникает и остается в клетках. Следовательно, сохраняются как градиент концентрации глюкозы через мембрану, так и скорость переноса глюкозы в клетки.

Таким образом, насыщение потока глюкозы с ростом ее концентрации в среде определяется конечным числом молекул переносчика в мембране. При малых концентрациях переносимого вещества (вдали от насыщения) его транспорт можно описывать первым законом Фика для мембраны. Величина потока вещества, переносимого через мембрану, рассчитанная на основе симметричной модели с четырьмя состояниями молекулы переносчика, хорошо согласуется с экспериментальными данными.

В организме человека содержится 12 белков – переносчиков глюкозы (GLUT1–GLUT12), последовательность аминокислот в которых высоко гомологична. Все белки содержат порядка 500 аминокислот и 12 пересекающих мембрану α -спиралей. Аминокислоты, расположенные в α -спиралях, преимущественно гидрофобны, однако несколько спиралей содержат аминокислотные остатки (например, серин, треонин, аспарагин и глутамин), боковые заместители которых формируют водородные связи с гидроксильными группами глюкозы. Эти остатки формируют места связывания глюкозы переносчиком у поверхности мембраны. GLUT1 – интегральный белок с молекулярным весом 45 кД. Он составляет 2 % от общего количества белков мембран эритроцитов.

5.4. АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ

Большое число веществ транспортируется через мембраны по механизмам активного транспорта. Этот тип транспорта обеспечивается специализированными белковыми молекулами, или транспортными белками, которые предназначены для транспорта одного, часто двух или даже трех типов веществ одновременно, например ионов Na^+ , K^+ и т. д. При активном транспорте молекулы переносятся из среды, где их концентрация ниже, в среду с более высокой концентрацией, то есть в направлении, противоположном тому, которое имеет место при спонтанном выравнивании концентрации вещества в растворе. Требуемая для активного транспорта энергия извлекается в метаболических процессах, протекающих в клетке, например, при утилизации соединений типа АТФ. Активный транспорт играет важную роль в регуляции качественного и количественного состава веществ в клетке.

В связи с тем, что энергия, высвобождаемая при гидролизе АТФ, используется либо непосредственно транспортером, либо для создания градиента вещества через мембрану, выделяют две основные категории активного транспорта – первичный (другое название – прямой активный транспорт) и вторичный (непрямой активный транспорт). Первичный активный транспорт протекает при использовании энергии самими трансмембранными белками (насосами) для индуцирования конформационных изменений, результатом которых является транспорт молекул через мем-

брану.

Белковые насосы транспортируют ионы и другие растворенные вещества через мембраны в направлении концентрационного градиента, обеспечивая различия в концентрациях в 100000 раз. Помимо наиболее часто используемого гидролиза АТФ, в клетках могут использоваться и другие источники энергии для активного транспорта, в том числе свет, окислительно-восстановительные реакции и др. Энергия преобразуется в форму трансмембранных электрических или химических градиентов транспортируемых ионов. Большинство известных биологических насосов транспортируют катионы.

5.4.1. Первичный активный транспорт

Первичный активный транспорт через мембраны осуществляется ионными насосами (другие названия – ион-транспортирующие АТФазы и АТФазные насосы). Все ионные насосы можно разделить на четыре группы (семейства): АТФазы Р-типа, АТФазы F-типа, АТФазы V-типа и ABC-транспортеры.

АТФазы всех типов обеспечивают сохранение градиентов концентрации ионов Na^+ , K^+ , H^+ и Ca^{2+} через плазматические и внутриклеточные мембраны. Активный транспорт ионов через мембраны в клетках требует больших затрат энергии. Например, в нейронах и клетках печени на транспорт ионов расходуется свыше 25 % АТФ, продуцируемого в клетках, а в эритроцитах – до 50 %.

Перекачка катионов через мембраны АТФазами Р-типа осуществляется во всех живых организмах (табл. 5.2).

Таблица 5.2

Семейство АТФаз Р-типа

Название	Число субъединиц	Локализация	Число переносимых ионов	Функции
Na^+/K^+ -АТФаза	2	Плазматическая мембрана	3 Na^+ и 2 K^+	Генерация градиентов Na^+ , K^+
H^+/K^+ -АТФаза	2	Плазматическая мембрана желудка и почек	1 H^+ и 1 K^+	Желудочная и почечная секреция H^+
SERCA Ca-АТФаза	1	Саркоплазматический ретикулум, эндоплазматический ретикулум	2 Ca^{2+} и 2 H^+	Снижение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле
PMCA Ca-АТФаза	1	Плазматическая мембрана	1 Ca^{2+} и 1 H^+	Снижение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле

АТФазами Р-типа утилизируются высокоэнергетические ковалентно связанные интермедиаты β -аспартилфосфата. АТФазы Р-типа также называются E_1E_2 -АТФазами из-за способа описания механизма их действия – считается, что при транспорте ионов через мембраны белки могут находиться в одном из двух конформационных состояний – E_1 или E_2 . Конформация трех наиболее известных насосов данного типа – Na^+/K^+ -АТФазы, H^+/K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы при транспорте ионов изменяется в результате их фосфорилирования за счет энергии АТФ.

Катионные насосы Р-типа состоят из одной или двух α -субъединиц и одной или двух β -субъединиц. Многие из этих насосов являются тетрамерами, содержащими две α -субъединицы и две меньшие по размерам β -субъединицы. Транспорт ионов обеспечивают α -субъединицы, при этом, по крайней мере, одна из α -субъединиц фосфорилируется. β -Субъединицы участвуют только в регуляции транспорта ионов. Эукариотические АТФазы Р-типа, такие как Na^+/K^+ - и Ca^{2+} -АТФазы, имеют по 10 трансмембранных спиралей.

Тетрамером типа $\alpha_2\beta_2$ является Na^+/K^+ -АТФаза (Na^+/K^+ -насос), присутствующая в плазматических мембранах всех клеток тканей животных (рис. 5.4). β -Полипептид не участвует прямо в перекачке ионов, а участвует в фолдинге при внедрении в мембрану вновь синтезируемых α -субъединиц. α -Субъединицы представляют собой негликозилированные полипептиды весом в 120 кДа и имеют аминокислотную последовательность и структуру, очень подобные на мышечную Ca^{2+} -АТФазу. Na^+/K^+ -АТФаза имеет перешеек на цитозольной стороне, который соединяет домены, содержащие места связывания АТФ и фосфорилированный аспарат, с внедренным в мембрану доменом. Все классы АТФаз Р-типа имеют одно или более мест связывания АТФ на цитоплазматической стороне мембраны.

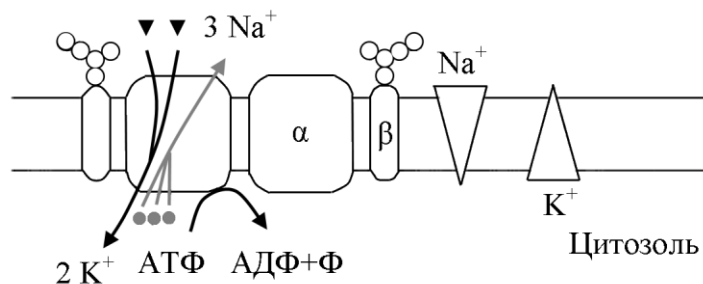


Рис. 5.4. Схема строения Na^+/K^+ -АТФазы

Na^+/K^+ -насос обеспечивает транспорт типа антипорта. Насос транспортирует одновременно три иона Na^+ наружу и два иона K^+ внутрь клетки. Концентрация ионов калия в цитозоле клеток животных в 20 раз выше, чем во внеклеточной жидкости, а концентрация ионов натрия внутри кле-

ток, наоборот, в 10 раз меньше, чем снаружи. Такие концентрационные градиенты через мембрану клеток устанавливаются благодаря активному транспорту ионов обоих типов. В результате транспорта ионов калия и натрия создается асимметрия распределения заряда внутри и снаружи клетки. Возникающий при этом трансмембранный потенциал играет важную роль в возникновении потенциала действия в клетках нервной и мышечной тканей. О важной роли Na^+/K^+ -АТФаз свидетельствует тот факт, что примерно третья часть запасаемой в клетках энергии благодаря синтезу в митохондриях АТФ идет на обеспечение работы Na^+/K^+ -АТФаз.

Механизм действия Na^+/K^+ -АТФазы иллюстрируется рисунком 5.5. В конформации E1 на цитозольной стороне Na^+/K^+ -АТФазы с высоким сродством связываются ионы Na^+ . Константа связывания ионов Na^+ на цитозольных местах связывания равна 0,6 ммоль/л, что значительно ниже концентрации Na^+ в цитозоле, равной примерно 12 ммоль/л.

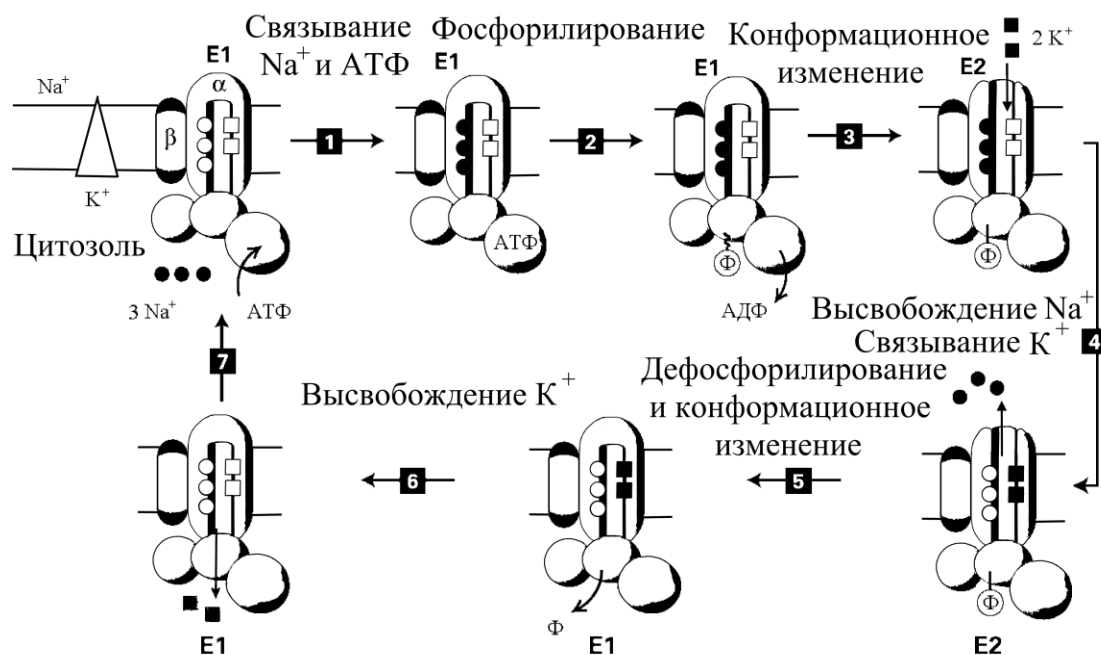


Рис. 5.5. Схема транспорта ионов Na^+ , K^+ -АТФазой

В результате ионы Na^+ обычно полностью заполняют места связывания. Напротив, сродство ионов K^+ к местам связывания с цитозольной стороны белка очень низкое, поэтому эти ионы, транспортируемые через белок в клетки, диссоциируют из белка в конформации E1 в цитозоль, несмотря на высокую концентрацию ионов K^+ в цитоплазме. Одновременное связывание трех ионов Na^+ и молекулы АТФ приводит к фосфорилированию аспартата, что сопровождается изменением конформации белка. При конформационном переходе $\text{E1} \rightarrow \text{E2}$ три связанных иона Na^+ движутся через белок наружу. Переход в конформацию E2 генерирует также

два места с высоким сродством связывания для ионов K^+ и три места с низким сродством связывания для ионов Na^+ на эктоплазматической стороне мембраны. Так как константа связывания ионов K^+ , равная 0,2 ммоль/л, значительно ниже, чем внутриклеточная концентрация ионов K^+ (4 ммоль/л), эти места связывания быстро заполняются ионами K^+ . Три иона Na^+ , транспортируемые через белок наружу клетки, будут диссоциировать во внеклеточное пространство из мест связывания, характеризующихся низким сродством связывания на эктоплазматической поверхности, несмотря на высокую внеклеточную концентрацию ионов Na^+ . Высвобождение ионов Na^+ и связывание ионов K^+ сопровождается гидролизом аспартилфосфата (дефосфорилированием белка) и изменением конформации белка. При конформационном переходе $E2 \rightarrow E1$ два связанных иона K^+ транспортируются внутрь клетки. Механизм действия Ca^{2+} -АТФазы аналогичен механизму функционирования Na^+/K^+ -АТФазы.

АТФазы F-типа (или F_0F_1 -АТФазы) и АТФазы V-типа (V_0V_1 -АТФазы) (табл. 5.3) имеют подобную структуру. Их называют также насосами F- и V-класса соответственно. Названные насосы содержат, по крайней мере, три типа трансмембранных субъединиц и пять типов полипептидов, которые формируют цитозольный домен. Все известные F- и V-насосы транспортируют протоны. АТФазы V-типа обычно поддерживают низкие значения pH в растительных вакуолях, в лизосомах и других закисленных везикулах в клетках животных, используя энергию, высвобождаемую при гидролизе АТФ, для перекачки протонов из эктоплазматической стороны мембраны в цитозоль. Насосы V-типа также присутствуют в плазматических мембранах клеток, специализированных для секреции протонов, таких как остеокласты, макрофаги.

Таблица 5.3

Семейства АТФаз F-типа и АТФаз V-типа

Насос	Субъединицы	Локализация	Субстрат	Функции
F_0F_1	8 или больше	Митохондрии, хлоропласты, эубактерии, плазматические мембраны	H^+ (редко Na^+)	Синтез АТФ или АТФ-управляемый перенос H^+
V_0V_1	8 или больше	Эндоплазматические мембраны эукариотов	H^+ (редко, Na^+)	АТФ-управляемый перенос H^+ (редко, Na^+)

Насосы V-типа выполняют две функции. Во-первых, они закисляют все упомянутые выше компартменты. Кислые значения pH обеспечивают диссоциацию лиганда из комплекса с рецептором в эндосомах и активируют лизосомальные гидролазы, а также другие ферменты. Во-вторых, протонные градиенты через мембрану являются источником энергии для сопряженного с H^+ транспорта других веществ.

Как показано на рис. 5.6, АТФазы V-типа содержат два дискретных

домена: расположенный с цитозольной стороны мембраны гидрофильный домен V_1 , состоящий из пяти различных полипептидов, и трансмембранный домен V_0 , содержащий от 9 до 12 копий протеолипида c , одну субъединицу белка b и одну субъединицу белка a .

Цитозольный домен белка V_1 содержит ряд субъединиц, которые на рис. 5.6 обозначены как А, В, С, Е, G_2 и Н. Субъединицы А и В содержат места, где происходит связывание и гидролиз АТФ. Трансмембранные субъединицы c и a вместе формируют протон-проводящий канал. В отличие от АТФаз Р-типа АТФазы V-типа в процессе протонного транспорта не фосфорилируются.

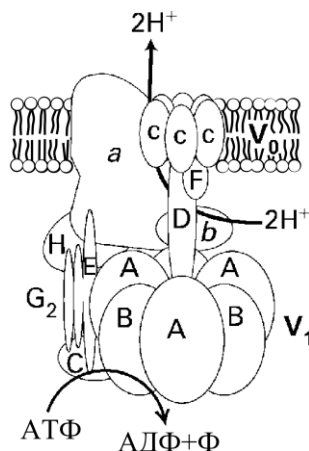


Рис. 5.6. Структура АТФазы V-типа

Хотя насосы V-типа подобны по архитектуре F_0F_1 -АТФазе, имеются функциональные различия. Во-первых, эукариотические насосы V-типа являются исключительно протонными насосами. Во-вторых, изолированный комплекс V_1 не имеет АТФазной активности. Механизм действия АТФазы F-типа подробно рассмотрен в гл. 6.

АВС транспортеры формируют наибольшее по числу (свыше 100 различных транспортных белков) и наиболее разнообразное по структуре семейство АТФ-зависимых насосов (табл. 5.4). АВС – это аббревиатура термина «АТР-binding cassette» (АТФ-связывающая кассета), относящегося к АТФ-связывающей области транспортера. MRP (multidrug resistance-associated protein) – белок множественной лекарственной резистентности, играющий роль в выведении токсичных веществ, а также лекарств из клеток, в том числе определяющий устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим лекарствам. Транспортеры ТАР (transporters associated with antigen presentation) – класс АВС транспортеров, необходимых для инициирования иммунного отклика на чужеродные белки и медирующие транспорт антигенных пептидов из цитозоля в ЭР.

АВС транспортеры найдены во всех живых организмах. Различные члены этого семейства локализованы в плазматической мембране, ЭР, а также в других органеллах. Каждый АВС транспортер является специ-

фичным для одного или нескольких родственных субстратов, но все семейство имеет большое число субстратов, включая неорганические ионы, сахара, аминокислоты, сложные полисахариды, пептиды и даже белки. Специализированные члены семейства действуют как ионные каналы (например, CFTR, cystic fibrosis transmembrane regulator) или регулируют функции других мембранных белков, например, рецептора сульфонилмочевины. ABC транспортеры отличаются от других насосов по структуре и функциям. Они не продуцируют ионные градиенты.

Таблица 5.4

Транспортеры ABC

Насос	Число субъединиц	Локализация	Субстрат	Функции
MRP1 Р-гликопротеин	1	Плазматическая мембрана	лекарства	Секреция лекарств
CFTR	1	Плазматические мембраны дыхательного тракта панкреатического эпителия	АТФ, Cl^-	Секреция Cl^-
ТАР1, 2	2	Эндоплазматический ретикулум	Антигенные пептиды	Транспорт антигенных пептидов из цитоплазмы в ЭР
MRP2	1	Апикальная плазматическая мембрана клеток печени	Фосфатидилхолин	Фосфолипид флипаза, секреция желчи
STE6	1	Плазматическая мембрана дрожжей	Феромоны	Сигнализация

Все транспортеры имеют два АТФ-связывающих домена в цитоплазме и два трансмембранных домена, содержащих 6 α -спиралей (рис. 5.7). Четыре домена, требуемые для обеспечения активности транспортера, могут быть четырьмя отдельными субъединицами или могут быть инкорпорированными несколькими способами в полипептиды двумя или четырьмя доменами. Пучки α -спиралей связываются со стороны цитоплазмы с нуклеотид-связывающими доменами, образующими «шапки» у цитоплазматического окончания пучков. Две аминокислотные последовательности (мотивы) в нуклеотид-связывающем домене определяют его название. Мотив Walker A (GXXGXGKS/T, где X – любой остаток) называется также петлей Р, так как он связывает γ -фосфат АТФ в транспортерах ABC и других АТФ-связывающих белках. Мотив Walker B ($\text{RX}_{6-8}\text{F}_4\text{D}$, где F – любой гидрофобный остаток) взаимодействует с АТФ, с которым связан также ион Mg^{2+} . Наиболее типичное разделение мотивов В и А составляет от 100 до 150 аминокислотных остатков.

Пучки α -спиралей (трансмембранные домены) формируют камеру, через которую транспортируемый субстрат пересекает мембрану. Связывание субстрата в камере специфично. Транспортёр CFTR имеет дополнительный регуляторный домен (R) в цитоплазме.

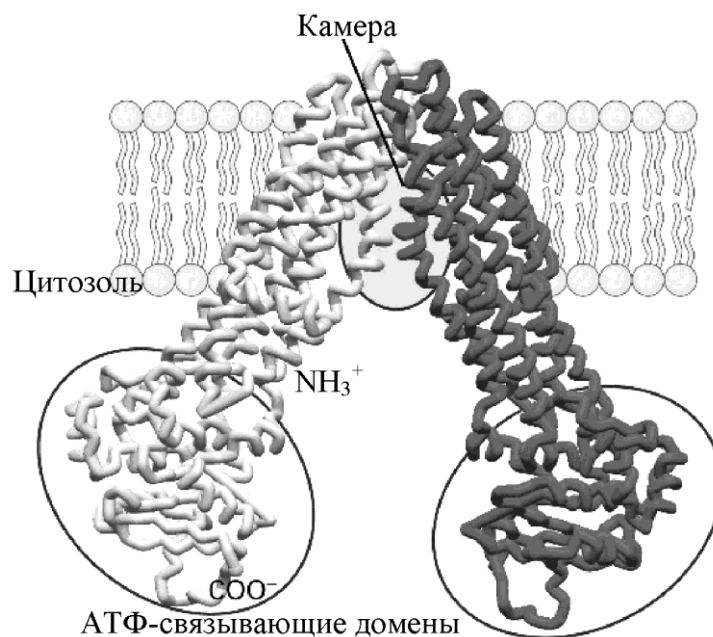


Рис. 5.7. Структура ABC транспортеров

Рис. 5.8 иллюстрирует механизм функционирования ABC транспортеров.

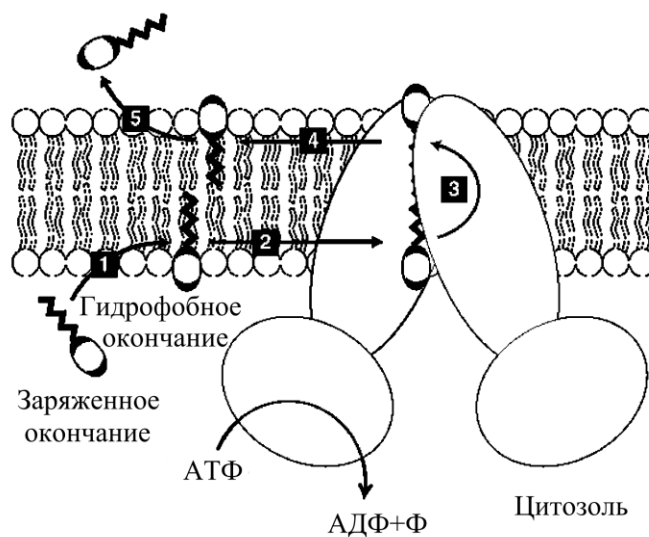


Рис. 5.8. Схема транспорта веществ ABC транспортерами

У белка без связанного АТФ камера открыта со стороны цитоплазмы и располагается во внутреннем монослое бислоя. Постулируется, что связывание и гидролиз АТФ запускает цикл конформационных изменений, в которых участвуют вместе нуклеотид-связывающие домены, в результате субстраты в камере экспонируются к внеклеточному монослою бислоя

или к внеклеточному пространству, обеспечивая уход субстратов. Примером такого транспортера является флипаза MsbA, перемещающая фосфолипиды от одного монослоя бислоя к другому. Бактериальные пермеазы перекачивают питательные вещества в клетку, а TAP1 и TAP2 перекачивают пептидные фрагменты антигенных белков в люмен ЭР.

5.4.2. Вторичный активный транспорт

Насосы называются первичными активными транспортерами, так как они превращают электрохимическую или химическую энергию в трансмембранные концентрационные градиенты. Градиенты концентрации ионов, созданные насосами, используются некоторыми переносчиками, называемыми вторичными транспортерами, для переноса ионов или растворенных веществ.

При первичном активном транспорте энергия АТФ расходуется на установление градиента концентрации веществ через мембрану. В случае вторичного активного транспорта этот градиент используется для транспорта необходимых молекул уже в направлении областей с меньшими концентрациями переносимых веществ. Пример такого механизма: в *E. coli* устанавливается градиент концентрации протонов (H^+) через клеточную мембрану (используется энергия АТФ для транспорта протонов за пределы клетки). Трансмембранный белок – пермеаза лактозы использует энергию, запасаемую при создании электрохимического потенциала протонов, для транспорта лактозы в клетку. В *E. coli* подобный тип протон-зависимого симпорта используется для транспорта рибозы, арабинозы и некоторых аминокислот.

Модель для симпортеров можно представить подобной модели для унипортера. Симпортер имеет две конформации с местами связывания субстратов, открытыми с любой стороны мембраны. Место связывания может быть свободным или занятым одиночным субстратом, как и у унипортера, но два субстрата могут связываться одновременно. Второе различие состоит в том, что трансмембранная переориентация мест связывания является более предпочтительной для свободного транспортера и транспортера с двумя связанными субстратами, чем для транспортера только с одним связанным субстратом. Это характерное свойство симпортеров минимизирует утечку отдельного субстрата через мембрану. Примерами симпортеров являются также Na^+ /аминокислота котранспортер и $Na^+/K^+/2Ca^{2+}$ -котранспортер.

Антипортеры транслоцируют два различных субстрата и используют концентрационный градиент одного из субстратов для перемещения другого субстрата в направлении, где его концентрация выше. Эти транспортеры подвергаются обратимым конформационным изменениям, вследст-

вие которых место связывания с одной стороны мембраны перемещается на другую. Установлены две особенности функционирования антипортеров. Во-первых, за места связывания с антипортерами конкурируют два субстрата, S_1 и S_2 . Во-вторых, транспортер, свободный от субстрата, не подвергается конформационным изменениям, требуемым для изменения ориентации его мест связывания. Эти различия делают транспорт двух субстратов зависимым друг от друга.

Например, $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (участвующий в обеспечении низкой внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в сердечной мышце) связывает ионы Na^+ или Ca^{2+} и использует большой градиент для ионов Na^+ через плазматическую мембрану для перемещения ионов Ca^{2+} из цитоплазмы наружу, где концентрация кальция выше. У внешней поверхности клетки переносчик связывает три иона Na^+ . После конформационного изменения, приводящего к переориентации мест связывания, три иона Na^+ диссоциируют внутри клетки и связывается один ион Ca^{2+} . При последующей переориентации места связывания этот ион Ca^{2+} переносится на внешнюю поверхность клетки, где он диссоциирует. В этом процессе играет роль не только концентрационный градиент, но и мембранный потенциал, так как этот обмен не является электрически нейтральным, и мембранный потенциал может влиять на связывание переносчиком одного или обоих субстратов.

Антипортеры обычно обменивают подобные по свойствам субстраты: катионы на катионы, анионы на анионы, сахара на сахара и так далее. Антипортер полосы 3 эритроцитов обменивает Cl^- на HCO_3^- . Окись углерода, продуцируемая в тканях в окислительных реакциях диффундирует в эритроциты, где цитоплазматический фермент карбоангидраза трансформирует окись углерода в HCO_3^- . Антипортер обеспечивает путь возврата HCO_3^- в плазму, где она переносится к легким как бикарбонат анион. Антипортер UhpT позволяет *E. coli* перехватывать глюкозо-6-фосфат из среды в обмен на неорганический фосфат. Антипортеры в митохондриях, состоящие из димеров (каждый содержит шесть спиралей), обменивают цитоплазматический АДФ на АТФ, синтезируемый этими органеллами.

5.5. ЭЛЕКТРОДИФфуЗИЯ. ИОННЫЕ КАНАЛЫ

5.5.1. Электродиффузия веществ через мембраны

При создании в растворе электролитов градиента электрического потенциала ионы начнут перемещаться, причем направление движения будет определяться направлением электрического поля и знаком заряда иона.

Если два раствора с различной концентрацией ионов разделяет полупроницаемая мембрана, то на мембране возникает скачок электрического потенциала. Разность потенциалов возникает на мембране в результате диффузии различных ионов через мембрану. Прохождение ионов и молекул через мембраны можно охарактеризовать проводимостью и проницаемостью. Проводимость описывает движение электролитов (ионов и заряженных молекул) через мембрану при наличии мембранного потенциала. Проницаемость описывает движение незаряженных молекул (неэлектролитов), а также движение электролитов в отсутствие мембранного потенциала. Для каждого типа ионов характерно свое значение ионной проницаемости и ионной проводимости.

Плотность потока ионов i -го типа (валентностью z_i) в мембране в стационарном состоянии определяется уравнением Нернста – Планка:

$$J_i = -D_i \left(\frac{dC_i(x)}{dx} + z_i C_i(x) \frac{F}{RT} \frac{d\phi(x)}{dx} \right), \quad (5.8)$$

где $C_i(x)$ – концентрация иона i -го типа в мембране, D_i – коэффициент диффузии иона i -го типа, $\phi(x)$ – электрический потенциал в мембране, F – постоянная Фарадея, R – газовая постоянная. Это уравнение описывает электродиффузию ионов при одновременном влиянии градиентов концентрации и электрического потенциала.

Трансмембранный потенциал определяется уравнением Гольдмана:

$$V_M = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K C_K^c + P_{Na} C_{Na}^c + P_{Cl} C_{Cl}^b}{P_K C_K^b + P_{Na} C_{Na}^b + P_{Cl} C_{Cl}^c}, \quad (5.9)$$

где P_{Na} , P_K и P_{Cl} – мембранная проницаемость для ионов натрия, калия и хлора, соответственно, C_K^b и C_K^c – концентрация ионов калия внутри клетки и во внеклеточной среде, соответственно, C_{Na}^b и C_{Na}^c – концентрация ионов натрия внутри клетки и во внеклеточной среде, соответственно, C_{Cl}^b и C_{Cl}^c – концентрация ионов хлора внутри клетки и во внеклеточной среде, соответственно. В опытах на гигантских аксонах кальмара определено, что в состоянии покоя $V_M = -60$ мВ и совпадает с величиной трансмембранного потенциала, рассчитанного по формуле Гольдмана.

5.5.2. Классификация и структура ионных каналов

Ионные каналы обнаружены во всех клетках и различаются по структуре, функциям и механизмам регуляции активности. Они обеспечивают перенос ионов через мембраны клеток, отвечают за электрическую активность нервной ткани, мышц и сенсорных органов, регулирование клеточ-

ного гомеостаза и многих других функций клеток. Активность ионных каналов регулируется рядом химических и физических факторов. Ионные каналы создают условия для электродиффузии ионов через клеточные мембраны. Характеристики пассивного транспорта определяются наличием электрохимического градиента для ионов и ионной селективностью открытых каналов.

Концептуально ионные каналы можно рассматривать как молекулярные машины, которые могут находиться в двух состояниях – открытом и закрытом. Переход между этими состояниями регулируется так называемым воротным механизмом (от английского gate – ворота). Когда ионные каналы открыты и движение ионов зависит от величины градиента электрохимического потенциала, имеют место: 1) изменение концентрации соответствующих ионов внутри и снаружи клетки; 2) изменение мембранного потенциала; 3) изменение сопротивления мембраны.

Ионные каналы классифицируются несколькими способами. Общепринятой является классификация по типу ионов, которые переносят каналы, – ионов калия, натрия, кальция и хлора. Перенос названных ионов натриевыми, калиевыми, кальциевыми и хлорными каналами имеет место во всех типах клеток тканей млекопитающих. Каналы осуществляют перенос тех ионов, к которым они селективны. В некоторых клетках присутствует ряд белков, формирующих каналы, через которые осуществляется перенос ионов водорода, железа и некоторых других.

Широко используемый способ классификации каналов учитывает так называемый воротный механизм их открывания и закрывания. У одних каналов поры открываются после связывания белковой молекулой небольшой молекулы-лиганда (или иона) по принципу молекулярного (или ионного) узнавания. У других открывание поры регулируется трансмембранным потенциалом. Таким образом, в зависимости от типа механизмов регулирования переноса ионов через поры каналы подразделяют на лиганд-управляемые (лиганд-зависимые) и потенциал-управляемые (потенциал-зависимые). В табл. 5.5 приведены сведения о наиболее распространенных ионных каналах.

Открывание пор, через которые проходят ионы в белковых молекулах, обеспечивается при появлении доступа ионов к так называемым «воротам» («калитке») канала. Вероятность открывания каналов, т. е. вхождения ионов в водную белковую пору и прохождения через нее, помимо названных факторов регуляции – трансмембранного потенциала и связываемых лигандов – зависит также и от ряда других физико-химических факторов. Например, вероятность открывания некоторых каналов является функцией pH среды (pH-зависимые каналы). В волосковых клетках внутреннего уха содержатся катионные каналы, открывание которых ре-

гулируется механическим воздействием – колебаниями, вызываемыми звуком. Существуют каналы, которые чувствительны к световому воздействию.

Таблица 5.5

Примеры наиболее распространенных ионных каналов

Потенциал-управляемые каналы	Управление	Унитарная проводимость	Блокаторы
Na ⁺	Деполаризация	10 пСм	Тетродотоксин
K ⁺ (DR)	Деполаризация	55 пСм	Ba ²⁺
K ⁺ (Ca ²⁺)	Деполаризация/Ca ²⁺	240 пСм	Харибдотоксин/Ba ²⁺
Ca ²⁺ (L) (Медленная инактивация)	Высокопороговая деполаризация	9 пСм (Ca ²⁺) 25 пСм (Ba ²⁺)	Дигидропиридины
Ca ²⁺ (N)	Высокопороговая деполаризация	12 пСм (Ba ²⁺)	ω-конотоксин GVIA
Ca ²⁺ (P)	Высокопороговая деполаризация		ω-агатоксин IVA
Ca ²⁺ (Q)	Высокопороговая деполаризация		ω-конотоксин MVIIC
Ca ²⁺ (T) (Быстрая инактивация)	Высокопороговая деполаризация	8 пСм (Ca ²⁺) 8 пСм (Ba ²⁺)	
Лиганд-управляемые каналы	Управление	Селективность	Блокаторы
Никотиновый рецептор	Ацетилхолин	Одновалентные катионы	Бунгаротоксин
Рецептор NMDA	Глутамат	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Рецептор поп-NMDA	Глутамат	Одновалентные катионы	
Рецептор GABA A	γ-аминомасляная кислота	Cl ⁻	
Внутриклеточные каналы	Управление	Селективность	Блокаторы
Рианодиновый рецептор	Кофеин	Ca ²⁺	Рутениевый красный
Рецептор InsP ₃	Инозитол трифосфат	Ca ²⁺	

В зависимости от геометрических особенностей расположения в мембране каналы можно разделить на три группы – тетрамерные, пентамерные и гексамерные (рис. 5.9, а). В каждом случае пора канала локализована в центре белкового комплекса. В пределах каждой субъединицы белковая полипептидная цепь пересекает мембрану 2–6 раз, формируя области трансмембранного пересечения – трансмембранные сегменты.

К тетрамерным ионным каналам, содержащим четыре домена или субъединицы, относятся потенциал-управляемые Na⁺-, K⁺- и Ca²⁺-каналы, в том числе K⁺-каналы с внутренним выпрямлением, которые содержат высокоселективные поры, допускающие прохождение через пору одного типа ионов. Каналы, управляемые вторичными мессенджерами, включая

каналы, зависящие от циклических нуклеотидов, также являются тетрамерными, но их катион-проницаемые поры менее селективны к ионам, чем поры потенциал-управляемых каналов. Каждый из четырех доменов содержит от двух до четырех трансмембранных сегментов. Схема формирования поры в тетрамерном канале приведена на рис. 5.9, б.

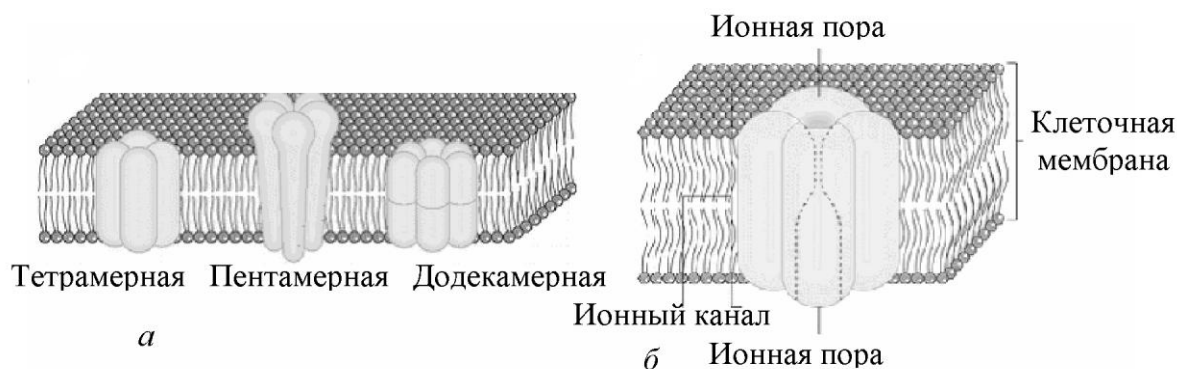


Рис. 5.9. Топологические формы расположения каналов в липидном бислое (а).
Схема расположения поры в тетрамерном канале в мембране (б).

Пентамерные ионные каналы имеют вид «розетки» из пяти субъединиц, и в их число входит большое количество каналов, регулируемых нейротрансмиттерами. Каналы с рецепторами для никотинацетилхолина, глутамата и 5-гидрокситриптамина содержат катион-проницаемые поры, в то время как каналы с рецепторами для глицина и γ -аминомасляной кислоты являются анион-проницаемыми.

Наконец, каналы межклеточных контактов (коннексиновые ионные каналы) формируются при ассоциации по принципу «конец к концу» двух гексамеров, содержащих по шесть доменов, расположенных вокруг центральной поры. Эти каналы обеспечивают взаимодействие клетка – клетка, а через поры этих каналов проходят не только неорганические ионы, но и некоторые большие молекулы.

Ионные каналы проводят ионы через плазматическую мембрану или мембраны внутриклеточных органелл со скоростью, близкой к диффузионному пределу. Ионы движутся быстрее через каналы, чем через транспортеры. Скорость прохождения для селективных ионных каналов варьирует от 10^6 до 10^8 ионов в секунду, что соответствует току от 10^{-12} до 10^{-10} А. Для сравнения, через Na^+/K^+ -насос в течение одной секунды транспортируется 300 ионов Na^+ и 200 K^+ , что соответствует току примерно $1,5 \cdot 10^{-17}$ А.

На рис. 5.10 изображена схема расположения основных функциональных единиц ионного канала. Изображение частей белка на рисунке произвольное, так как их размеры для различных каналов неодинаковы.

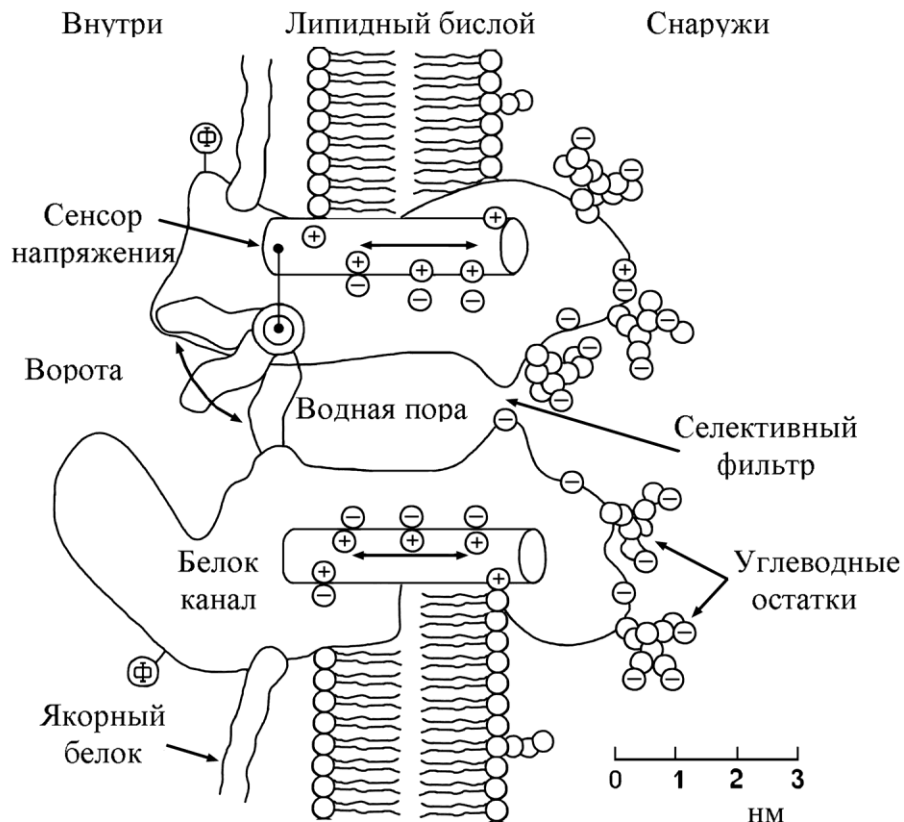


Рис. 5.10. Схематическое изображение функциональных единиц ионного канала

Главными структурными компонентами, обеспечивающими функционирование ионного канала, являются трансмембранные домены – ворота, контролирующие активацию и инактивацию канала, фильтр селективности и сенсор напряжения (для потенциал-управляемых каналов). Области субъединиц, погруженные в мембрану, формируют ион-проводящую пору. Остальные области субъединиц, расположенные в цитоплазме и снаружи клетки, необходимы для обеспечения нормального функционирования каналов и регулирования их свойств. Цитоплазматические (внутриклеточные) участки белковых субъединиц принимают участие в регуляции активности каналов. Внеклеточные участки субъединиц канала связывают внешние сигнальные молекулы и определяют идентичность ионов, которые могут входить в клетку.

Центральная часть поры гидрофильная. Она узнает и позволяет проходить через пору только ионам определенного типа. Эта способность пор определяется селективным фильтром. Другие ионы не проходят через пору как неподходящие по размеру или заряду.

Еще одна часть канала играет роль «ворот» или «калитки». Только когда ворота открыты, ионы, узнаваемые селективным фильтром, проходят через канал. Ворота открываются в ответ на разнообразные стимулы, включая изменение величины мембранного потенциала или присутствие

определенных веществ внутри или снаружи клетки.

Среди всех типов каналов наиболее изучены воротные каналы, характеризующиеся наличием структурного элемента – сенсора, который может быть либо сенсором напряжения, либо сенсором лиганда. При соответствующих изменениях напряжения или в присутствии соответствующего лиганда «ворота» открываются. Обычно это означает, что увеличивается либо частота спонтанных открытий канала, либо время нахождения канала в открытом состоянии. В результате канал открыт дольше и, следовательно, через него проходит большее число ионов за конкретное время.

5.5.3. Потенциал-управляемые каналы

Потенциал-управляемые ионные каналы представляют собой ион-селективные белковые каналы, найденные в бактериях, эукариотах и вирусах. Потенциал-управляемые каналы имеют общую доменную структуру (рис. 5.11, *a*). Чаще всего домен состоит из шести трансмембранных спиралей, включая S5, Р-петлю и S6. В K^+ -каналах и бактериальном Na^+ -канале этими доменами являются четыре отдельных полипептида, которые связаны нековалентно. Na^+ и Ca^{2+} -каналы состоят из четырех подобных, но не идентичных доменов, ковалентно соединенных в отдельный полипептид. Потенциал-управляемые каналы имеют дополнительные специализированные домены и/или субъединицы, но основные функции выполняют четыре главных домена.

Р-петля и сегменты S5 и S6 каждого домена участвуют в формировании поры и селективного фильтра. Многочисленные доказательства указывают на S4, как на часть сенсора напряжения, который сопрягает процессы деполяризации мембраны и открытия канала.

В потенциал-управляемых калиевых, кальциевых и натриевых каналах четвертый трансмембранный домен (сегмент), обозначаемый как S4, содержит положительно заряженные основные аминокислоты, лизин или аргинин, локализованные в каждой третьей позиции вдоль альфа-спирали (рис. 5.11).

Эти положительные заряды «чувствуют» изменения величины трансмембранного потенциала. Отрицательный внутренний мембранный потенциал стабилизирует закрытое состояние канала. В ответ на деполяризацию мембраны спираль S4 поворачивается примерно на 180 градусов, перенося положительные заряды ближе к внешней стороне мембраны. Это перемещение сопряжено с открытием активируемых ворот канала. Вероятность открытия этих каналов является функцией напряжения.

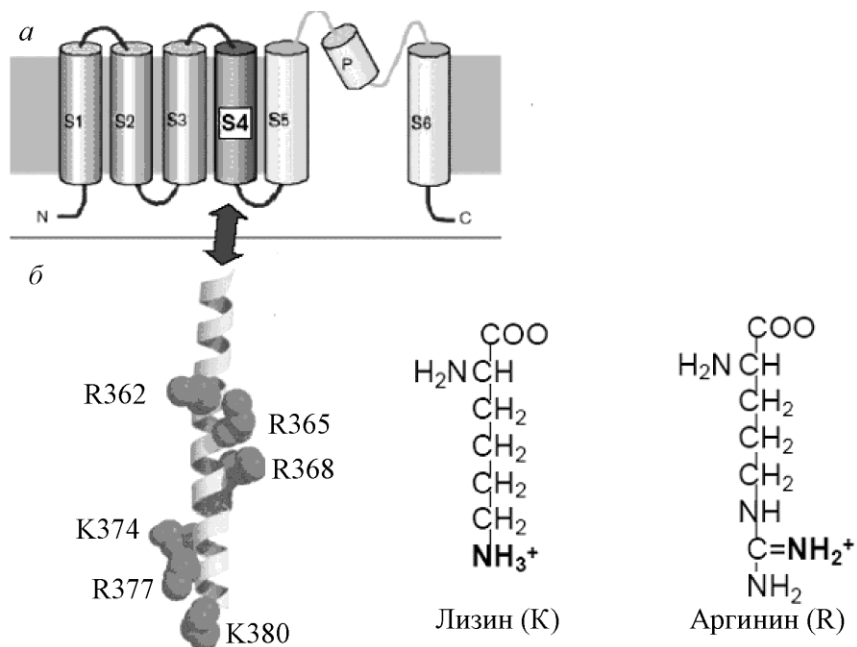


Рис. 5.11. Сенсор напряжения потенциал-управляемого канала: а – отдельная субъединица калиевого канала (или отдельный мотив в натриевых или кальциевых каналах), б – К и R обозначают лизиновые и аргининовые остатки в сенсоре напряжения S4

Переход между открытыми и закрытыми состояниями в простых потенциал-управляемых каналах обеспечивается переходами только между двумя конформациями белка. Сложные каналы переключаются от закрытого состояния к открытому, затем к инактивированному, затем назад к закрытому без возврата к открытому состоянию

Временная зависимость тока является результатом случайного открытия и закрытия одиночного канала (рис. 5.12). Когда натриевый канал открыт, он проводит ионы Na^+ со скоростью примерно $36 \cdot 10^6$ ионов в секунду, что определяет ток величиной 6 пА.

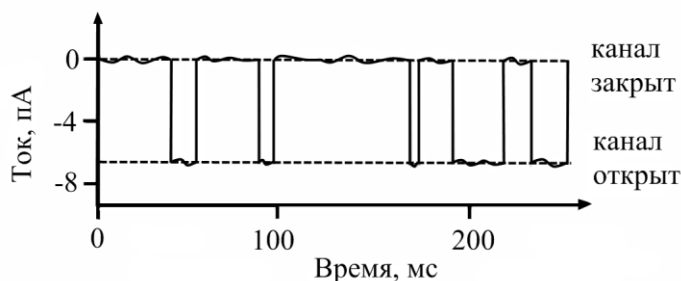


Рис. 5.12. Регистрация тока через одиночный катионный (натриевый) канал

Доля времени, в течение которого канал открыт, определяет ионный поток для заданного канала. Так как каналы действуют независимо друг от друга, то общий ионный поток через мембрану зависит от числа каналов, открытых в данное время.

Если канал в открытом состоянии находится в течение нескольких

миллисекунд, то ионный состав цитоплазмы, а, следовательно, и ионные градиенты практически не изменяются. Длительное открытие в течение десятков миллисекунд может изменять ионный состав клетки. Например, потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы остаются открытыми достаточно долго для того, чтобы изменить концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} .

В некоторых случаях процесс, называемый инактивацией, прерывает поток ионов через активные каналы. Подвижные цитоплазматические домены инактивируют потенциал-управляемые каналы, закупоривая открытую пору. Большие органические или неорганические ионы, например, полиамины или Mg^{2+} , могут также блокировать открытые каналы, закрывая вход. Локальные анестетики являются фармакологическими блокаторами каналов. Места связывания блокирующих ионов могут находиться снаружи, внутри или по обеим сторонам мембраны, в зависимости от канала. Инактивация канала переводит канал в состояние, нечувствительное к изменению внешних условий.

С применением метода фиксации потенциала можно получить зависимость тока через мембрану от напряжения, приложенного к мембране. В мембранах клеток содержатся различные типы ионных каналов, и результирующий мембранный ток будет представлять сумму токов всех каналов, активируемых при изменении трансмембранного потенциала. Следовательно, как только в эксперименте блокируются все каналы (с использованием лекарств или непроникающих ионов), кроме изучаемого канала, метод фиксации потенциала может быть использован для измерения зависимости тока от времени и от приложенного потенциала для выбранного типа канала (рис. 5.13).

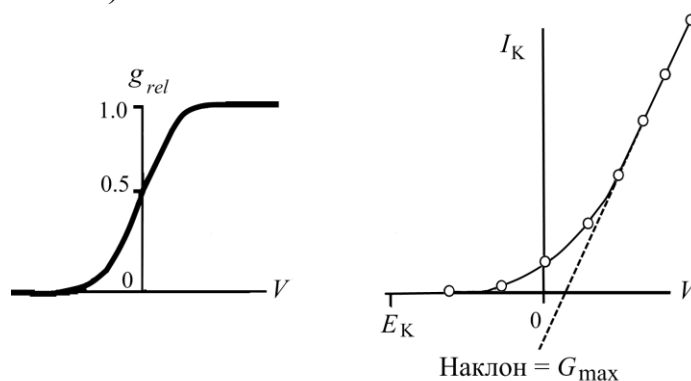


Рис. 5.13. Зависимости вероятности открытия (а) и тока от напряжения (б) для калиевых каналов в мембране

Ток через калиевые каналы в мембране равен

$$I_K = G_{\max} \cdot g_{\text{rel}} \cdot (V - E_K),$$

где $G_{\max}$ — максимальное значение проводимости, g_{rel} — относительная проводимость, V — трансмембранный потенциал и E_K — равновесный калиевый потенциал.

Калиевые потенциал-управляемые каналы. Калиевые каналы обеспечивают поток ионов калия через мембраны клеток и существенны для генерации электрического тока через возбудимые мембраны. Калиевые каналы являются также мишенями для различных регуляторных соединений, лекарств, токсинов.

На основе имеющихся данных о физикохимических свойствах белковых молекул и их расположении в мембранах калиевые каналы разделены на четыре класса (рис. 5.14).

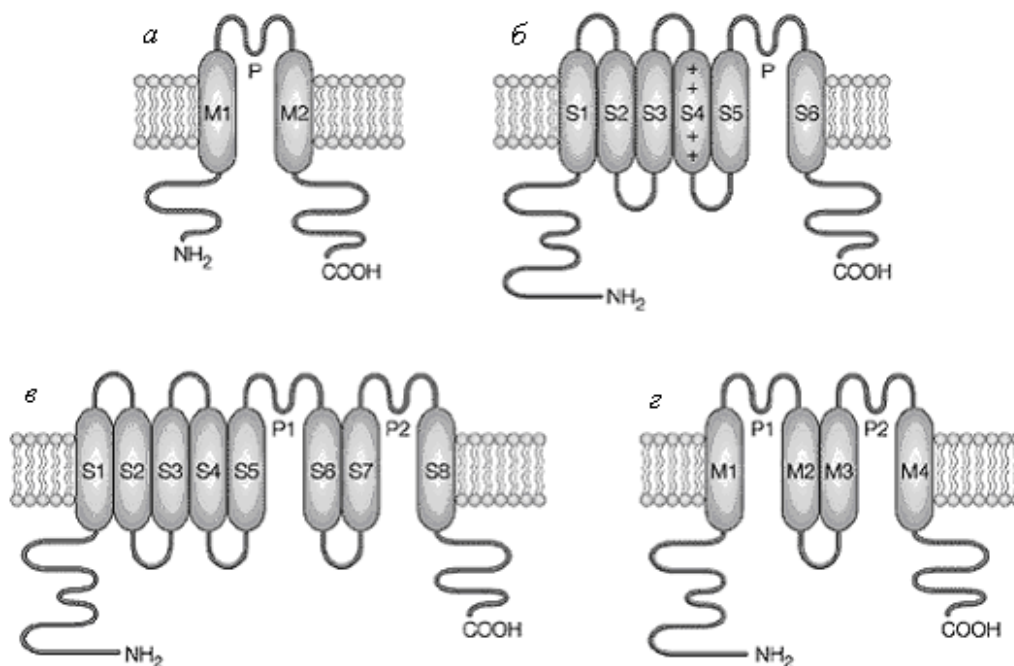


Рис. 5.14. Четыре класса калиевых каналов:

a – 2TM/P-каналы; *b* – 6TM/P-каналы; *c* – 8TM/2P-каналы; *d* – 4TM/2P-каналы

2TM/P-каналы состоят из двух трансмембранных (ТМ) спиралей с петлей Р между ними. Примерами таких каналов служат K^+ -каналы с внутренним выпрямлением и бактериальные каналы, такие как KcsA. 4TM/2P-каналы состоят из двух повторов 2TM/P-каналов. 6TM/P-каналы – преобладающий класс среди потенциал-управляемых и лиганд-управляемых K^+ -каналов. Сегмент S4 обозначен знаками «+», чтобы показать его роль в чувствительности к потенциалу в потенциал-зависимых K^+ -каналах. 8TM/2P-каналы представляют собой гибриды 6TM/P- и 2TM/P-каналов (найжены впервые в дрожжах). Каналы типа 8TM/2P и 4TM/2P располагаются в мембране, по-видимому, в виде димеров, формирующих каналы. Последние представляют собой так называемые каналы утечки, являющиеся мишенями многочисленных анестетиков. P₁ и P₂ обозначают два типа петель между спиралями в каналах 8TM/2P и 4TM/2P.

Все известные потенциал-управляемые K^+ каналы собираются из четырех α -субъединиц. Эти тетрамеры имеют профиль квадрата, окружающего центральную пору.

KcsA, K^+ -канал с двумя трансмембранными сегментами в эубактерии *Streptomyces lividans*, состоит из четырех идентичных субъединиц, каждая с двумя трансмембранными спиралями, соединенными петлей P. Трансмембранные спирали плотно упакованы вместе на цитоплазматической стороне бислоя, но разнесены друг от друга на внеклеточной стороне, создавая пространство для поры и фильтра селективности. Наиболее узкая часть поры формируется последовательностью из трех аминокислотных остатков (GYG), найденной во всех K^+ -каналах. Карбонилы этих аминокислотных остатков выстилают пору длиной 1,3 нм и диаметром 0,2 нм.

В растворе каждый ион K^+ окружен восемью молекулами воды. Когда гидратированный ион приближается к фильтру селективности, молекулы воды отрываются и функционально замещаются кислородом карбонильных групп аминокислот, которые формируют селективный фильтр. Ионы K^+ входят настолько идеально, что атомы кислорода замещают молекулы воды в оболочке K^+ без затрат энергии, в то время как меньшие по размерам ионы Na^+ связываются более сильно со своей гидратной оболочкой, чем с порой (рис. 5.15).

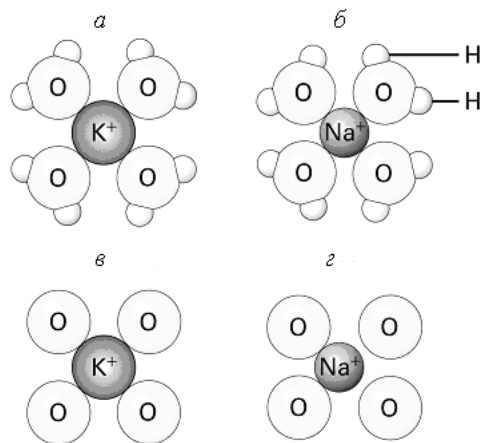


Рис. 5.15. Ионы K^+ и Na^+ в калиевом канале (вид сверху):
а – ион калия в воде, б – ион натрия в воде, в – ион калия в канале, з – ион натрия в канале

В селективном фильтре связываются два иона K^+ и каждый из них окружен восемью атомами кислорода карбонильных групп. Такая координация обеспечивает высокое сродство мест связывания для ионов K^+ .

Локальная концентрация ионов K^+ в селективном фильтре превышает концентрацию этих ионов внутри или снаружи клетки более, чем в 10 раз, так что фильтр действительно концентрирует ионы K^+ . Однако это не препятствует диффузии через пору, так как электростатическое отталки-

вание близко расположенных и одинаково заряженных ионов приводит к их расхождению, что обеспечивает высокую скорость прохождения ионов через фильтр.

Натриевые потенциал-управляемые каналы. Na^+ -канал представляет собой отдельную полипептидную цепь (α -субъединицу), содержащую четыре повторяющихся домена, каждый из которых содержит все спирали от S1 до S6, а также Р-петлю. Белок весом примерно 260 кДа содержит от 25 % до 30 % углеводов. Некоторые Na^+ -каналы содержат также одну или две небольшие (39 кДа) β -субъединицы. β_1 -субъединица прикрепляется нековалентно к α -субъединице, в то время как β_2 -субъединица прикрепляется ковалентно через дисульфидную связь. β_1 - и β_2 -субъединицы гликозилированы в нескольких местах.

Наиболее вероятное расположение субъединиц Na^+ -канала в нейронах мозга проиллюстрировано на рис. 5.16.

Аминокислотная последовательность в Na^+ -канале обозначена узкой линией, длина каждого сегмента приблизительно пропорциональна его длине в молекуле. Трансмембранные α -спирали показаны в виде цилиндров. Остатки аминокислот, важные для выполнения специфических функций, имеют следующие обозначения:

«++» – положительно заряженные сенсоры напряжения в трансмембранных сегментах S4;

○ – остатки, необходимые для связывания ядов и их зарядовые характеристики, показанные знаками «-», «+»;

Ⓜ – остатки, необходимые для быстрой инактивации;

Ф – места, фосфорилируемые цАМФ-зависимой протеинкиназой;

Ⓟ – места, фосфорилируемые протеинкиназой С.

Большая часть углеводов на субъединице канала – это остатки сиаловой кислоты, несущие значительный суммарный отрицательный заряд. Гликозилирование необходимо для нормального биосинтеза и сборки функциональных каналов в клетках. Если гликозилирование ингибируется, то вновь синтезируемые α -субъединицы быстро деградируют и не встраиваются в поверхностную мембрану клетки.

Схема функционирования потенциал-зависимого натриевого канала приведена на рис. 5.17. В закрытом состоянии (обозначим его как конформационное состояние I) ворота канала закрыты. Кроме того, закрытое состояние обеспечивается также взаимодействием четырех положительно заряженных потенциал-чувствительных α -спиралей с отрицательно заряженным интерьером покоящейся клетки. Канал-инактивирующий сегмент располагается в цитозоле.

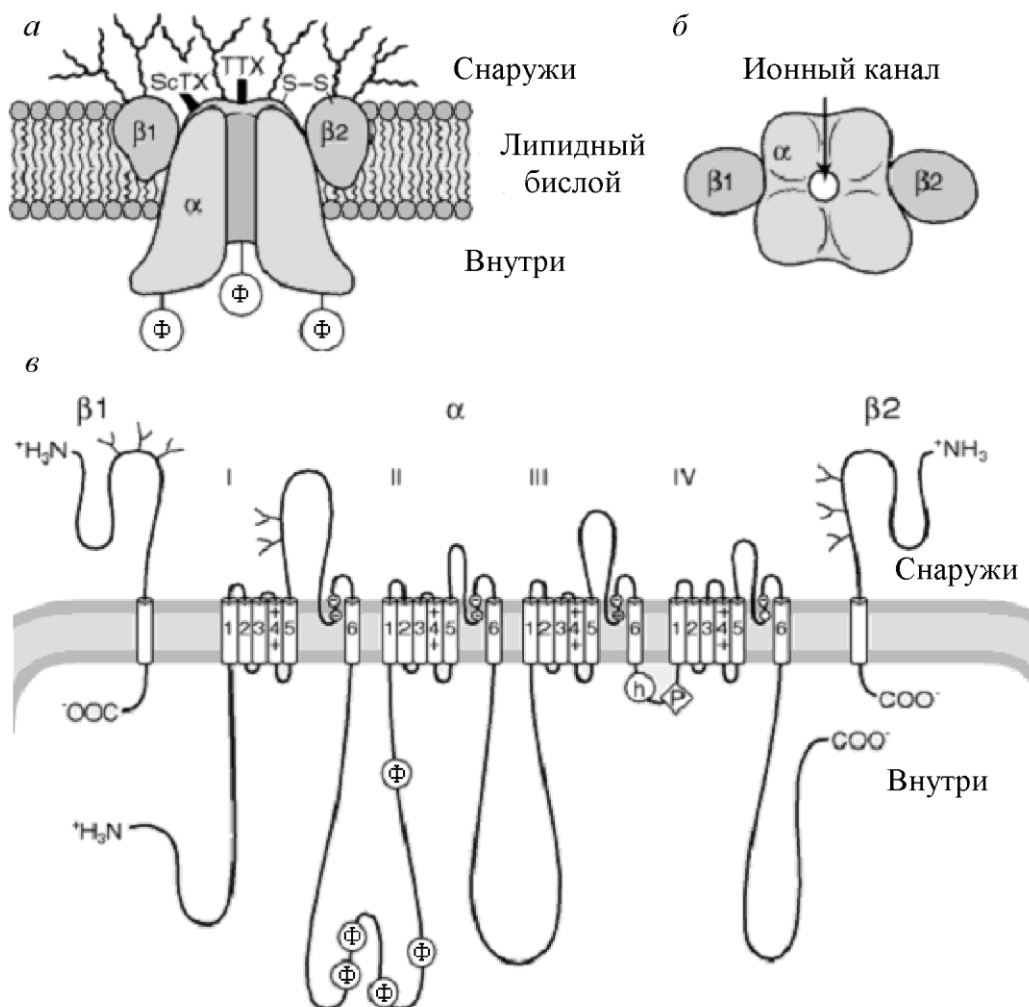


Рис. 5.16. Структурная модель натриевого канала:

a – топологическая модель натриевого канала в нейронах мозга крысы, иллюстрирующая вероятную трансмембранную ориентацию трех субъединиц, олигосахаридные цепи и цАМФ-зависимые места фосфорилирования (Ф); *б* – вид анфас белка с внутриклеточной стороны, иллюстрирующий формирование трансмембранной ионной поры в середине из четырех трансмембранных доменов α-субъединицы; *в* – модель трансмембранного расположения α- и β-субъединиц в Na⁺-канале

На начальной стадии деполяризации мембраны (стадия *a*) внешняя поверхность заряжается отрицательно и потенциал-чувствительные α-спирали перемещаются к внешней поверхности мембраны. Переход в новое конформационное состояние (состояние II) с перемещением ворот, закрывающим в состоянии I внутренний вестибюль происходит за время, меньшее 0,1 мс, и сопровождается открытием натриевого канала. Ионы натрия через открытый канал переносятся внутрь клетки. В течение 0,5–1 мс (стадия деполяризации мембраны *б*) потенциал-чувствительные спирали возвращаются в положение, которое они занимали в положении покоя, предотвращая дальнейшее движение ионов через канал. Канал определенное время (рефракторный период) будет находиться в конформа-

ционном состоянии III. При этом канал-инактивирующий сегмент закрывает внутренний вестибюль канала (инактивированное состояние). Таким образом, во время нахождения канала во II и III конформационных состояниях мембрана остается деполяризованной. На следующей стадии в длительностью в несколько миллисекунд канал из конформационного состояния III возвращается в состояние I. Это обусловлено тем, что мембрана реполяризуется (потенциал внутри клетки опять становится отрицательным). Ворота закрываются, а канал-инактивирующий сегмент перемещается в цитозоль. Белок возвращается в исходное, закрытое состояние, из которого опять может перейти в открытое состояние при деполяризации мембраны.

У позвоночных встречается более 10 изоформ натриевых каналов, отличающихся по чувствительности к анестетикам, нейротоксинам и содержащих от пяти до семи мест, при фосфорилировании которых регулируется активность каналов.

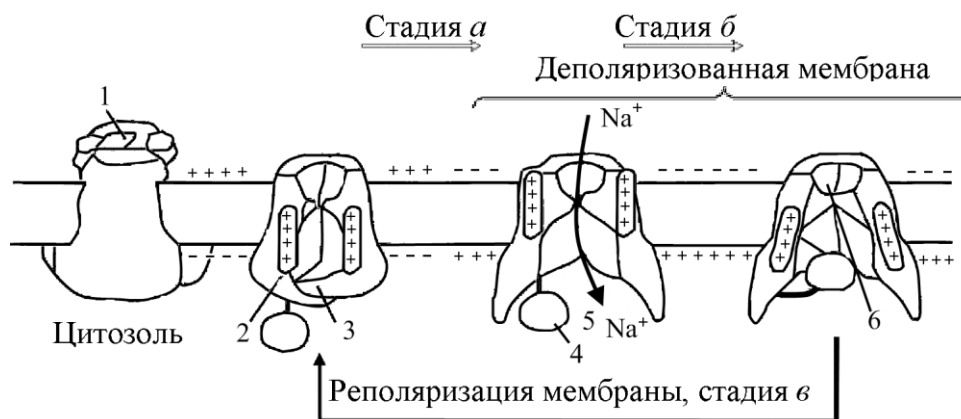


Рис. 5. 17. Схема функционирования потенциал-зависимого натриевого канала:

1 — ион-селективная пора; 2 — сенсор напряжения; 3 — ворота; 4 — канал-инактивирующий сегмент; 5 — внутренний вестибюль; 6 — внешний вестибюль

Кальциевые потенциал-управляемые каналы. Ca^{2+} -канал по структуре подобен Na^{+} -каналу. Эти белковые каналы представляют собой структуры из гетеротетрамерных единиц, эквивалентные гомотетрамерным структурам большинства K^{+} -каналов. Все четыре структурные единицы Ca^{2+} -каналов, как и Na^{+} -каналов, гомологичны отдельной единице в гомотетрамерных K^{+} -каналах. Негомологичные β -субъединицы Na^{+} - и Ca^{2+} -каналов выполняют регуляторные функции.

Схема расположения субъединиц Ca^{2+} -канала относительно липидного бислоя показана на рис. 5.18. Цилиндры представляют собой α -спиральные сегменты. Центральная субъединица (α_1) состоит из 24 трансмембранных спиралей, соединенных петлями, и большого полипептидного участка, расположенного в цитоплазме. Вспомогательные субъе-

диницы (α_2 , δ , β и γ) окружают субъединицу, формирующую пору. Сплошные линии – полипептидные цепи, длина каждого участка которых приблизительно пропорциональна длине аминокислотной последовательности. Субъединицы α_1 , δ и γ Ca^{2+} -канала пересекают липидный бислой, субъединица α_2 расположена снаружи мембраны, а субъединица β находится в цитоплазме.

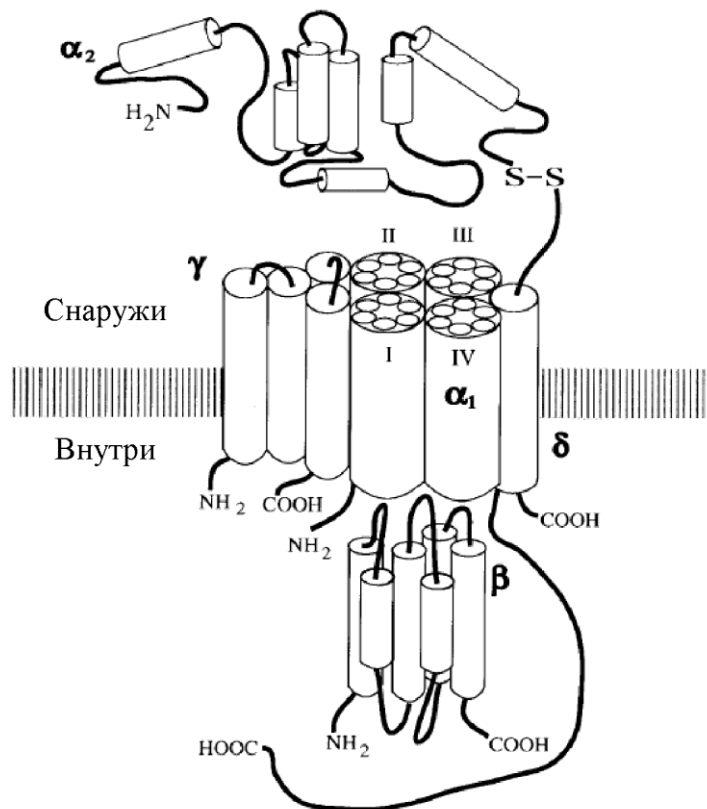


Рис. 5.18. Трансmemбранная организация потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов

Ca^{2+} - и Na^+ -каналы имеют ряд существенных отличий. α_1 -Субъединица Ca^{2+} -каналов аналогична по структуре α -субъединице Na^+ -каналов. Ca^{2+} -каналы нейронов имеют ассоциированные с α_1 -субъединицей α_2 - и δ -субъединицы, которые формируют связанный дисульфидными связями трансmemбранный гликопротеиновый комплекс, а также внутриклеточную β -субъединицу. Дополнительные субъединицы Ca^{2+} -каналов не соответствуют β -субъединице Na^+ -каналов.

Подобно потенциал-управляемым Na^+ -каналам Ca^{2+} -каналы активируются при деполяризации мембраны, и инактивируются и возвращаются в состояние покоя, когда мембрана реполяризуется. Инактивация Ca^{2+} -каналов – более медленный процесс, чем инактивация Na^+ -каналов.

Установлено шесть классов Ca^{2+} -каналов (L, N, P, Q, R и T). Они разделены на две категории: каналы, активируемые при низких напряжениях (LVA), и каналы, активируемые при высоких напряжениях (HVA). Пер-

вую категорию представляет только один Т-тип каналов. Эти каналы активируются и инактивируются при малых изменениях мембранного потенциала, проявляют низкую проводимость (~ 9 пСм), и через них текут малые токи.

L-, N-, P-, Q- и R-типы кальциевых каналов открываются при значительной деполяризации мембранного потенциала (≤ -20 мВ), инактивируются в широкой области напряжений (от -10 до -120 мВ), их скорости закрывания и инактивации варьируют от средних по величине до малых значений потенциала, и все они характеризуются большой проводимостью канала (от 13 до 25 пСм). Дальнейшая классификация HVA-каналов, как и ионных каналов других типов, проводится на основе их чувствительности к различным органическим блокаторам Ca^{2+} -каналов, пептидным токсинам, дивалентным ионам, таким как Ni^{2+} и Cd^{2+} . К настоящему времени обнаружено свыше 20 изоформ как α_1 -субъединиц, так и других (вспомогательных) субъединиц в Ca^{2+} -каналах.

Хлорные потенциал-управляемые каналы. Хлорные каналы найдены у всех животных, бактерий и в других организмах. Среди функций, выполняемых девятью найденными у человека Cl^- -каналами, – реабсорбция солей в почках, мышечное сокращение (сохранение трансмембранного потенциала), закисление эндосом и другие.

Хлорные каналы (обычно обозначаются ClC) являются α -спиральными мембранными белками, пересекающими мембрану 10 или 12 раз в зависимости от типа канала. Оба терминальных домена хлорных каналов у млекопитающих – N-терминальный, содержащий в зависимости от природы белковой молекулы примерно 50–130 аминокислотных остатков, и C-терминальный, длиной в 170–420 аминокислотных остатков, находятся в цитоплазме. Топология ClC-каналов в мембране не установлена. Эти каналы представляют собой двухпоровые гомодимеры (рис. 5.19).

Все известные катионные α -спиральные белки ионных каналов формируют однопоровый олигомер 4-, 5- и 6-кратной симметрии, в котором пора находится вдоль оси симметрии олигомера (рис. 5.19, *a*, вверху). В то же время двухпоровая конструкция гомодимера диктует свои особенности строения ClC-канала. В частности, число аминокислотных остатков, выстилающих пору, должно быть большим, а сами остатки должны принадлежать различным участкам полипептидной цепи. Сама пора не совпадает с осью симметрии молекулы, и поэтому, в отличие от однопоровых олигомерных каналов, поры в ClC-каналах не перпендикулярны латеральной плоскости мембраны. Неподчиняющаяся требованиям симметрии пора, очевидно, не будет вытянутой в одном направлении, скорее, она будет изогнутой или закрученной.

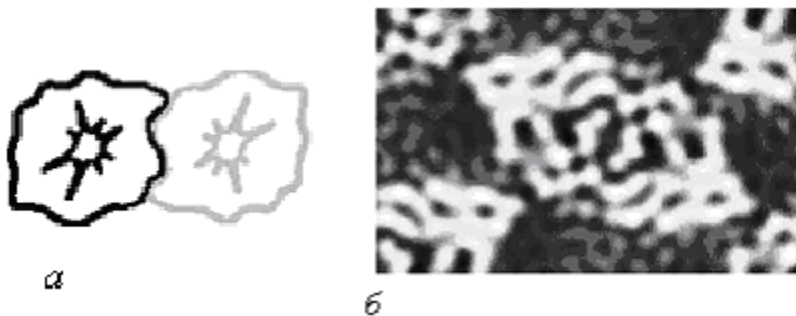


Рис. 5.19. Схема расположения хлорных каналов ClC (вид в плоскости мембраны) (а); проекция структуры бактериального хлорного канала типа ClC, полученная от двумерного белкового кристалла с помощью криоэлектронной микроскопии (б). Светлые области на фотографии – части молекул белка, темные – вода. В центре фотографии видны два белковых димера, внутри которых (темные участки), по-видимому, расположены водные поры

У млекопитающих обнаружено 9 типов хлорных каналов, в том числе в плазматической мембране клеток – ClC-1, ClC-2, ClC-Ka и ClC-Kb, в внутриклеточных везикулах (эндосомах и лизосомах) – ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 и ClC-7. Каналы ClC-Ka и ClC-Kb имеют дополнительную малую β -субъединицу Barttin, а канал ClC-7 – малую β -субъединицу Ostm1.

Проводимость хлорных каналов сильно различается. Так, проводимость хлорного канала ClC-2 млекопитающих составляет ~ 3 пСм, канала ClC-1 – приблизительно 1,5 пСм, а канал ClC-0 электрического ската – 10 пСм. Недавно обнаружено, что эндосомальные белки ClC-4 и ClC-5 являются электрогенными Cl^-/H^+ -обменниками.

5.5.4. Лиганд-управляемые каналы

Многие ионные каналы открываются или закрываются в ответ на связывание малых сигнальных молекул или лигандов. Такие каналы называются лиганд-управляемыми.

Внешние лиганды связываются с сайтами на внеклеточной стороне канала. Например, связывание нейротрансмиттера ацетилхолина на синаптической мембране приводит к открытию натриевых каналов, что инициирует генерацию нервного импульса или сокращение мышцы. Связывание γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) у определенных синапсов в центральной нервной системе обеспечивает вход ионов Cl^- в клетку и ингибирует возникновение нервного импульса.

Внутренние лиганды связываются с экспонированными к цитозоллю сайтами белка-канала. Например, вторичные мессенжеры, такие как цАМФ и цГМФ регулируют каналы, вовлеченные в инициацию импульсов в нейронах в ответ на действие феромонов или света соответственно.

Число каналов, функции которых зависят от связывания лигандов, достаточно велико: в литературе приводятся сведения примерно о 500 активируемых лигандами субъединицах ионных каналов. Во всех клетках есть все типы ионных каналов – натриевые, калиевые, кальциевые и хлорные, которые регулируются лигандами.

Лиганд-управляемые каналы делят на два больших класса: каналы, управляемые внеклеточными лигандами, и каналы, управляемые внутриклеточными лигандами.

Класс каналов, управляемых внеклеточными лигандами, в свою очередь, разделен на три подкласса (рис. 5.20). Рецепторы с *cys*-петлей, к которым относятся никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, рецепторы глицина, ГАМК и 5-НТ₃, а также некоторые анионные каналы, активируемые глутаматом и гистидином, состоят из пяти гомологичных субъединиц. Субъединицы этого подкласса распределены по двум четко разделяемым монофилетическим (разделенным в эволюционном процессе временным интервалом) группам, одна из которых содержит субъединицы, формирующие анионные рецепторы (глицина, ГАМК и GLUCI), а другая – субъединицы, формирующие катионные рецепторы (5-НТ₃ и никотиновые). Каналы второго подкласса – АТФ-управляемые (P2X-рецепторы) – содержат по три гомологичные субъединицы. Наконец, активируемые глутаматом катионные каналы (NMDA-, AMPA-рецепторы, каинатные рецепторы и др.) состоят из четырех субъединиц.

В качестве примера рассмотрим подкласс АТФ-зависимых катионных каналов. Каналы (P2X-рецепторы) отвечают на действие АТФ – функционального нейротрансмиттера, высвобождаемого при экзоцитозе из многих типов нейронов. На основе фармакологических свойств эти каналы, найденные только у животных, распределены на семь групп (P2X1 – P2X7). Такие каналы, функционирующие в местах соединений нейрон – нейрон и нейрон – мышца, играют роль в контроле кровяного давления и болевых ощущений, а также в функциональной активности лимфоцитов и тромбоцитов. Места связывания АТФ находятся на внешней поверхности клеток и включают аминокислотные остатки вблизи иле-67. Семь различных рецепторов P2X различаются по их чувствительности к АТФ и различным аналогам АТФ, а также по кинетике инактивации. Связывание АТФ первоначально вызывает открытие неселективного катионного канала, обеспечивающего вход Ca^{2+} . Длительная экспозиция слабо инактивированных форм к АТФ ведет к расширению поры, делая ее проницаемой и для больших молекул (вплоть до 1000 Да). Затем пора функционирует как проницаемая для органических катионов, таких как этидиум и N-метил-D-глюкамин. Формирование этой поры регулируется C-терминальным гидрофильным доменом по крайней мере одного из этих рецепторов – P2X7.

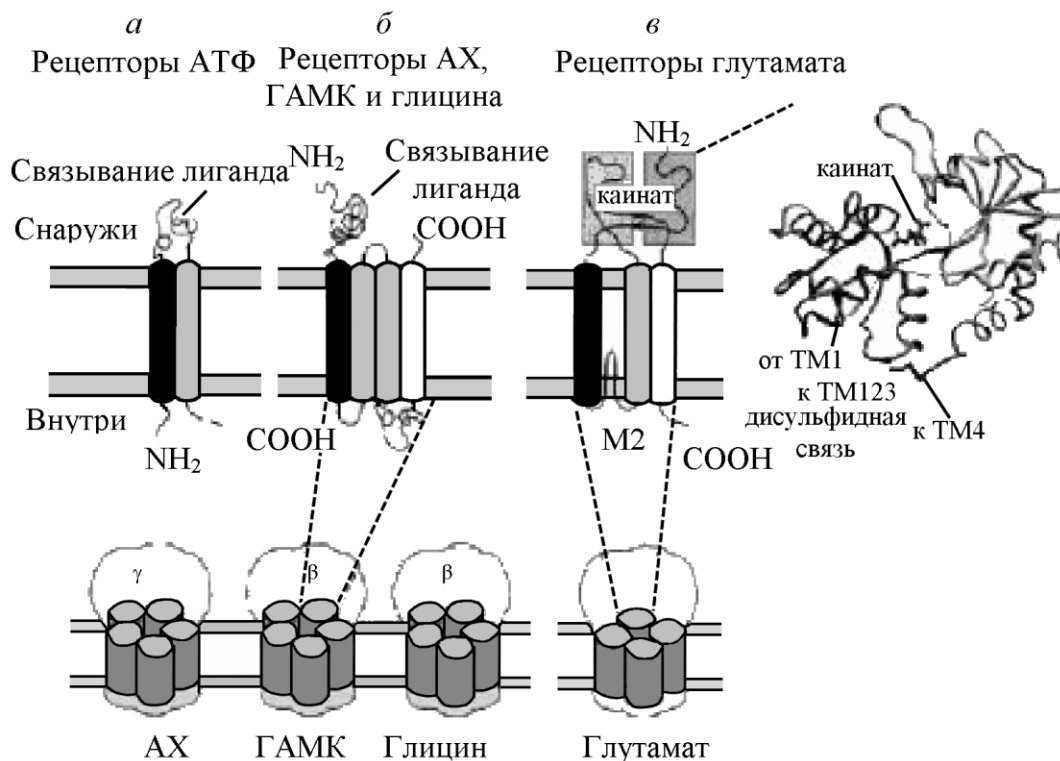


Рис. 5.20. Лиганд-управляемые каналы:

a – АТФ-управляемые каналы; *б* – каналы с суш-петлей; *в* – глутамат-зависимые катионные каналы. Внизу показаны схемы расположения субъединиц в каналах, активируемых соответственно ацетилхолином (АХ), ГАМК, глицином и глутаматом

Рецептор P2X1 является доминантным типом P2X-рецепторов в нейронах гладких мышц. Рецепторы P2X4 и P2X6 широко распространены в центральной нервной системе. Рецептор P2X1 имеется также в клетках иммунной системы и структурах гематопозеза.

Белки АТФ-зависимых катионных каналов очень подобны по аминокислотной последовательности (> 35 % идентичности); обладают примерно 380–1000 аминокислотными остатками на субъединицу с вариабельностью по участку, локализованному в С-терминальных доменах. Внеклеточные домены рецептора между этими двумя сегментами (примерно 270 остатков) содержат несколько консервативных (эволюционно закрепленных) остатков глицина и 10 консервативных остатков цистеина. Гидрофильные С-окончания варьируют по длине от 25 до 240 остатков. АТФ-зависимые катионные каналы, вероятно, являются гетеро- или гомоолигомерами нескольких субъединиц и транспортируют моновалентные катионы (Me^+). Некоторые из АТФ-зависимых катионных каналов также транспортируют Ca^{2+} и после длительной экспозиции к АТФ, как уже было отмечено, начинают транспортировать ряд метаболитов.

Число управляемых внутриклеточными лигандами каналов также велико. Внутриклеточными лигандами являются цАМФ, цГМФ, Ca^{++} , АТФ, фосфатидилинозитол, ряд фосфорилируемых белков и другие вещества.

ГЛАВА 6. МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ МЕМБРАНЫ

6.1. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН

Важнейшая функция ряда биологических мембран – превращение одной формы энергии в другую. Такие мембраны называются энергопреобразующими. Энергопреобразующие биологические мембраны способны к превращению химической энергии и энергии квантов света в электрическую энергию (через формирование трансмембранной разности электрических потенциалов) или осмотическую энергию, определяемую разностью концентраций содержащихся в разделенных мембранами компартаментах.

Один из типов энергопреобразующих мембран – внутренняя мембрана митохондрий. Митохондрии – внутриклеточные органеллы с размерами 2×1 мкм (рис. 6.1). Обычно в эукариотической клетке содержится около 2000 митохондрий, общий объем которых составляет до 25 % объема клетки. Каждая митохондрия ограничена двумя мембранами – гладкой внешней и складчатой внутренней. Складки внутренней мембраны входят в глубь митохондрий, образуя поперечные перегородки – кристы. Внешняя мембрана, как и внутренняя, имеет толщину около 6 нм. Мембраны отделены друг от друга межмембранным пространством толщиной около 5–10 нм. Внутренняя поверхность мембран, незаполненная кристами, называется матриксом.

Различные типы клеток отличаются друг от друга как по количеству и форме митохондрий, так и по количеству крист в них. Особенно много крист имеют митохондрии в тканях с активными окислительными процессами, например, в сердечной мышце. Форма митохондрий зависит также от их функционального состояния.

В отличие от внутренней мембраны внешняя мембрана митохондрий не обладает энергопреобразующей функцией. Внешняя мембрана митохондрий содержит особые каналообразующие белки – порины, которые делают мембрану проницаемой для молекул и ионов с молекулярной массой до 10 кДа. Внешние мембраны митохондрий служат барьером, не проницаемым для белков, растворенных в межмембранном пространстве и цитоплазме. Внешняя мембрана примерно на 50 % состоит из белков и на 50 % из липидов. Между тем, внутренняя мембрана митохондрий характеризуется необычно высоким содержанием белков (75 %). В их число входят транспортные белки, компоненты дыхательной цепи и АТФ-синтаза. Кроме того, во внутренней мембране содержится фосфолипид кардиолипин. Матрикс также обогащен белками, особенно ферментами цитратного цикла.

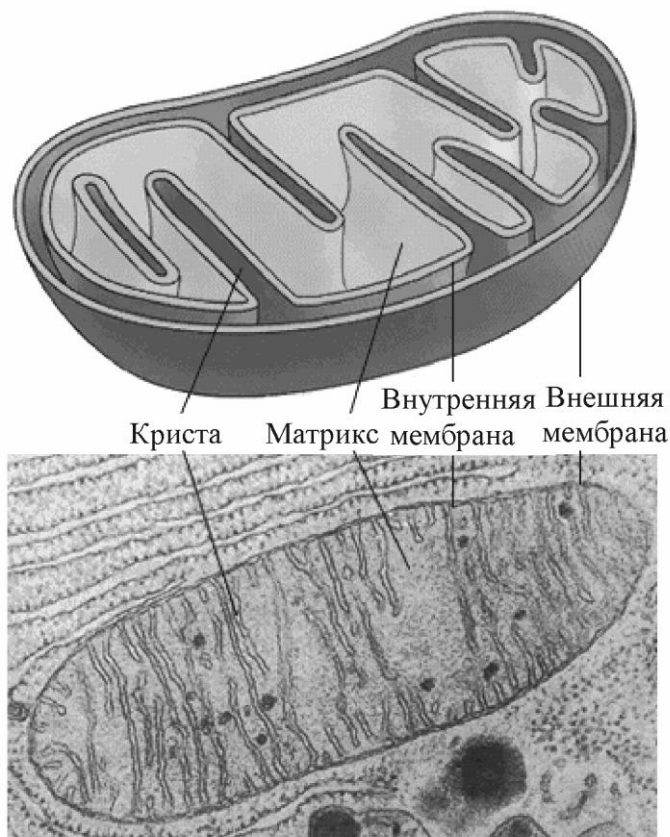


Рис. 6.1. Схематическое изображение митохондрии и ее структур (вверху) и фотография митохондрии, полученная с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (внизу)

Внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для большинства соединений за исключением низкомолекулярных незаряженных молекул, к которым относятся O_2 , CO_2 , H_2O , NO , H_2O_2 . Она удерживает не только продукты промежуточного метаболизма (например, пируват и ацетил-КоА), но и неорганические ионы (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-). Поэтому в цитоплазме и митохондриях существуют независимые пулы ионов и метаболитов. В результате неравновесного распределения ионов матрикс митохондрий заряжен отрицательно по отношению к цитоплазме. Трансмембранная разность электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий может достигать значения -200 мВ. Поэтому напряженность электрического поля во внутренней митохондриальной мембране больше, чем на плазматической мембране.

Обмен веществ между цитоплазмой и матриксом обеспечивается специальными транспортными системами, локализованными во внутренней мембране митохондрий и способными переносить разнообразные вещества (пируват, фосфат, АТФ, АДФ, глутамат, аспартат, малат, 2-оксоглутарат, цитрат, жирные кислоты) по механизмам типа антипорт, симпорт, унипорт. Например, большая часть АТФ, продуцируемого митохондриями,

ми в матриксе, доставляется в цитоплазму с помощью АДФ/АТФ-транслоказы в обмен на АДФ. Фосфат поступает в митохондрии вместе с протонами независимо от транспорта АДФ и АТФ. Аналогичным образом при участии пируват-специфичного переносчика осуществляется одно-временный перенос пирувата и протонов через внутреннюю мембрану. Во внутренней мембране митохондрий имеются также транспортные системы для ионов Ca^{2+} , которые наряду с транспортными системами эндоплазматического ретикулула регулируют концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме.

Источником движущей силы транспортных процессов во внутренней мембране митохондрий служит концентрационный градиент метаболитов или градиент электрохимического потенциала ионов. Например, карнитиновая система транспорта жирных кислот функционирует из-за высоких концентраций ацил-КоА в цитоплазме. Движущая сила импорта фосфата и пирувата обеспечивается протонным градиентом, в то время как обмен АТФ/АДФ и выброс ионов Ca^{2+} зависят от разности электрохимических потенциалов на внутренней мембране митохондрий.

В митохондриях протекают следующие метаболические процессы: превращение пирувата в ацетил-КоА, катализируемое пируватдегидрогеназным комплексом; цитратный цикл; окислительное фосфорилирование; расщепление жирных кислот путем β -окисления и, частично, цикл мочевины. Главной функцией митохондрий является захват богатых энергией субстратов (жирные кислоты, пируват, аминокислоты) из цитоплазмы и их окислительное расщепление с образованием CO_2 и H_2O , сопряженное с синтезом АТФ. Основные стадии этого процесса – формирование электрохимического градиента протонов и фосфорилирование молекулы АДФ протекают на внутренней мембране митохондрий с участием дыхательной цепи и H^+ -АТФ-синтазы. Рассмотрим более подробно строение и механизмы функционирования этих систем.

6.2. ОРГАНИЗАЦИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ

Дыхательная цепь митохондрий – это комплекс ферментов, катализирующих сопряженный с генерацией электрохимического градиента протонов процесс переноса электронов от восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) на кислород. То есть, дыхательная цепь катализирует реакцию



Из-за большой разности окислительно-восстановительных потенциалов акцептора (O_2) и донора (НАДН) электронов реакция (6.1) является высокоэкзергонической. Рассчитаем энергию, выделяющуюся в этой ре-

акции с использованием стандартных восстановительных потенциалов реакций



где E^0 – обозначение стандартного восстановительного потенциала при рН 7,0. Значение разности редокс-потенциалов для реакции (6.1) составляет +1136 мВ. Соотношение между свободной энергией Гиббса и редокс-потенциалом описывается выражением:

$$\Delta G^0 = -zF\Delta E^0, \quad (6.4)$$

где ΔG^0 – изменение свободной энергии Гиббса при рН 7,0, z – число переносимых в редокс-реакции электронов, F – число Фарадея, ΔE^0 – разность редокс-потенциалов. В стандартных условиях для реакции (6.1) $\Delta G^0 = -219,2 \text{ кДж/моль}$. Если бы реакция (6.1) протекала без участия ферментов, то выделение такого количества энергии привело бы к разрушению внутриклеточных структур. Фактически дыхательная цепь «разбирает» на части энергию реакции взаимодействия НАДН и кислорода, и проводит эту реакцию так, чтобы энергия запасалась при создании электрохимического градиента. Таким образом, ферменты дыхательной цепи не только увеличивают скорость химической реакции (многие окислительно-восстановительные реакции мгновенно протекают в водных растворах и без ферментов), но и обеспечивают последовательный перенос электронов от одного компонента дыхательной цепи к другому.

Дыхательная цепь митохондрий включает три белковых комплекса (комплексы I, III и IV), встроенные во внутреннюю митохондриальную мембрану, и две подвижные молекулы-переносчики – убихинон (кофермент Q) и цитохром *c*. Сукцинатдегидрогеназа, принадлежащая собственно к цитратному циклу, также может рассматриваться как комплекс II дыхательной цепи. Однако сукцинатдегидрогеназа переносит электроны от сукцината на кофермент Q без трансмембранного переноса протонов. Поэтому не будем подробно рассматривать механизм ее функционирования. Наряду с этим, H^+ -АТФ-синтазу иногда называется комплексом V, хотя она не принимает участия в переносе электронов.

Комплексы дыхательной цепи построены из большого числа полипептидов и содержат ряд различных окислительно-восстановительных коферментов, связанных с белками. К ним принадлежат флавиномонуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД), железо-серные центры и группы гема.

Проследим путь двух электронов от НАДН к кислороду (рис. 6.2), состоящий из трех этапов, каждый из которых катализируется тремя липо-

протеидными комплексами, встроенными во внутреннюю мембрану митохондрий. Комплексы являются интегральными белками, контактирующими с водными фазами как матрикса, так и межмембранного пространства митохондрий. В жидкой липидной фазе имеет место латеральная диффузия комплексов в мембране, в результате чего они могут сближаться друг с другом.

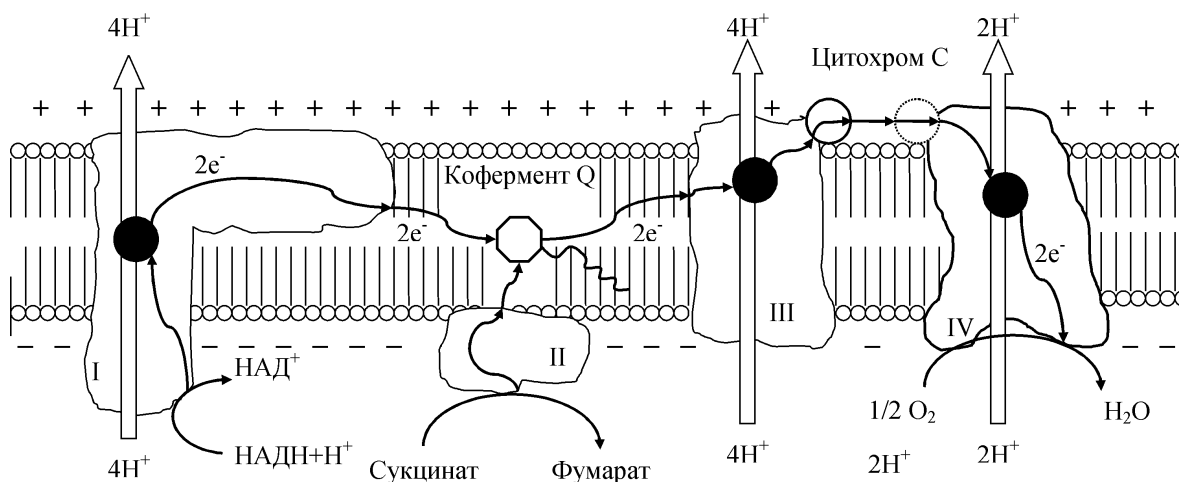


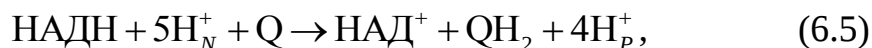
Рис. 6.2. Дыхательная цепь митохондрий:

I – комплекс I; II – сукцинатдегидрогеназа; III – комплекс III; IV – комплекс IV

Комплекс I, который также называется НАДН-убихинон оксидоредуктазой или НАДН-дегидрогеназой, - самый большой фермент дыхательной цепи. Комплекс I состоит из 43 субъединиц и имеет молекулярную массу 850 кДа. При этом комплекс I катализирует два энергетически сопряженных процесса: экзергонический перенос на убихинон гидрид-иона ($2e^-$, $1H^+$) от НАДН и протона из матрикса; эндергонический перенос 4 протонов из матрикса в межмембранное пространство. Перенос протонов происходит в направлении электрохимического градиента, поэтому требует затрат энергии. Таким образом, комплекс I является протонным насосом, работающим за счет энергии окислительно-восстановительных реакций. Чтобы обозначить трансмембранный перенос протонов при записи результирующей реакции, катализируемой комплексом I, протоны отрицательно заряженного матрикса обозначают индексом N (от англ. – negative), а протоны положительно заряженного межмембранного пространства митохондрий – индексом P (от англ. – positive).

Первая стадия окисления НАДН катализируется комплексом I, один активный центр которого контактирует с водной фазой матрикса и связывает НАДН. Два электрона, отщепленные от НАДН, переносятся через флавиномононуклеотид и железосерные центры на убихинон, который связывается с другим активным центром, расположенным внутри гидрофоб-

ной фазы мембраны. В результате происходит реакция:



в ходе которой электроны из водного окружения (молекула НАДН) попадают в гидрофобное окружение мембраны (молекула убихинола).

Электроны поступают в дыхательную цепь различными путями. При окислении НАДН комплекс I переносит электроны через ФМН и железосерные центры на убихинон. Образующиеся при окислении сукцината электроны переносятся на убихинон комплексом II через связанный с ферментом ФАД, железосерные кластеры и гем группы *b*. Через убихинон в дыхательную цепь поступают также электроны от ацил-КоА. Первая стадия β -окисления катализируется ацил-КоА-дегидрогеназой, которая переносит электроны от ацил-КоА через ФАД на электротранспортирующий флавопротеин ETF (electron-transferring flavoprotein). Перенос электронов от ETF на убихинон происходит через ФАД и железосерные кластеры фермента ETF-убихинон оксидоредуктазы. Через группу ФАД фермента глицерол-3-фосфат дегидрогеназы на убихинон также могут поступать электроны от глицерол-3-фосфата из цитоплазмы. При этом окисленная форма кофермента Q восстанавливается в ароматический убигидрохинон или убихинол (рис. 6.3).

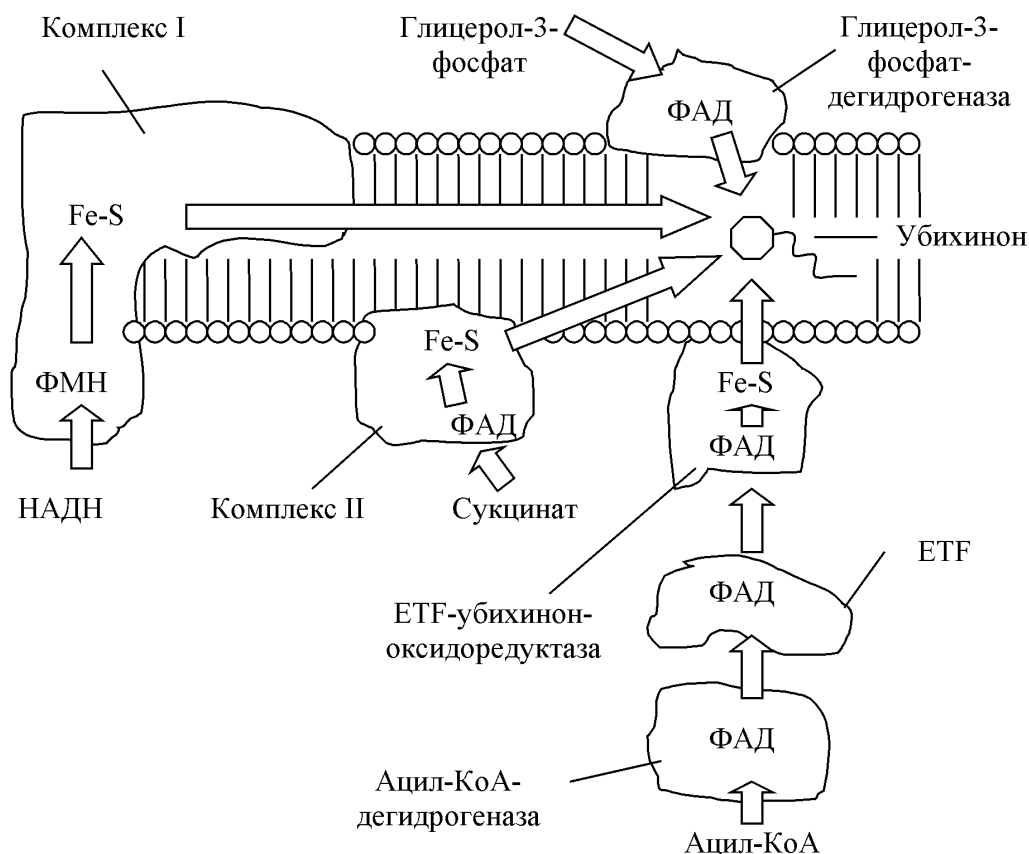
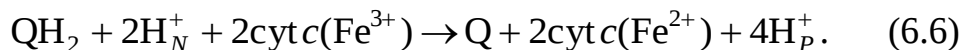


Рис. 6.3. Пути поступления электронов в дыхательную цепь

Убихинон не растворим в воде, но хорошо растворяется в растворителях с низкой диэлектрической постоянной. Важное свойство убихинона состоит в том, что его молекула может восстанавливаться поэтапно, принимая последовательно по одному электрону (и протону). При одноэлектронном восстановлении убихинона возникает полувосстановленная форма – убисемихинон.

Электроны от убихинола при участии комплекса III переносятся на цитохром *c*. Комплекс III (убихинол-цитохром *c* оксидоредуктаза) содержит железо как в комплексах с серой, так и в виде комплексов с порфиринами. Такие комплексы называются гемами, а комплексы гемов с полипептидными цепями – цитохромами. Комплекс III передает электроны через реакции с цитохромом *b* и цитохромом *c*₁ к акцептору электронов цитохрому *c*.

Экзергонический процесс транспорта электронов через простетические группы комплекса III сопряжен с эндергоническим переносом протонов. Суммарная реакция, катализируемая ферментом, описывается уравнением



На основе изучения структуры комплекса и редокс-реакций, протекающих с участием простетических групп фермента, для описания механизма трансформации энергии окисления убихинола цитохромом *c* в энергию электрохимического градиента протонов при работе комплекса III дыхательной цепи предложена модель, получившая название Q-цикла.

Полувосстановленная форма убихинона ($\bullet\text{QH}$) присоединяет электрон от комплекса I и протон из матрикса с образованием убихинола (на рис. 6.4 стадия 1). Комплекс III содержит два гема группы *b*: *b*_L – гем с низким редокс-потенциалом, *b*_H – гем с высоким редокс-потенциалом. У границы мембраны с межмембранным пространством восстановленный убихинон (QH_2) реагирует с железом гема *b*_L и, восстанавливая его, освобождает протон в водную фазу, превращаясь в полувосстановленную форму (на рис. 6.4 стадия 2). Электрон от гема *b*_L переносится в мембране к железу гема *b*_H, расположенному ближе к матриксу митохондрий. Полувосстановленный $\bullet\text{QH}$ отдает второй электрон на железосерные кластеры (Fe-S), при этом второй протон оказывается в водной фазе межмембранного пространства (на рис. 6.4 стадия 3), а электрон передается далее на железо цитохрома *c*₁, а затем на окислитель убихинола – цитохром *c*. Окисленный убихинон, образовавшийся у границы с межмембранным пространством, теперь диффундирует назад к той стороне мембраны, которая обращена к матриксу.

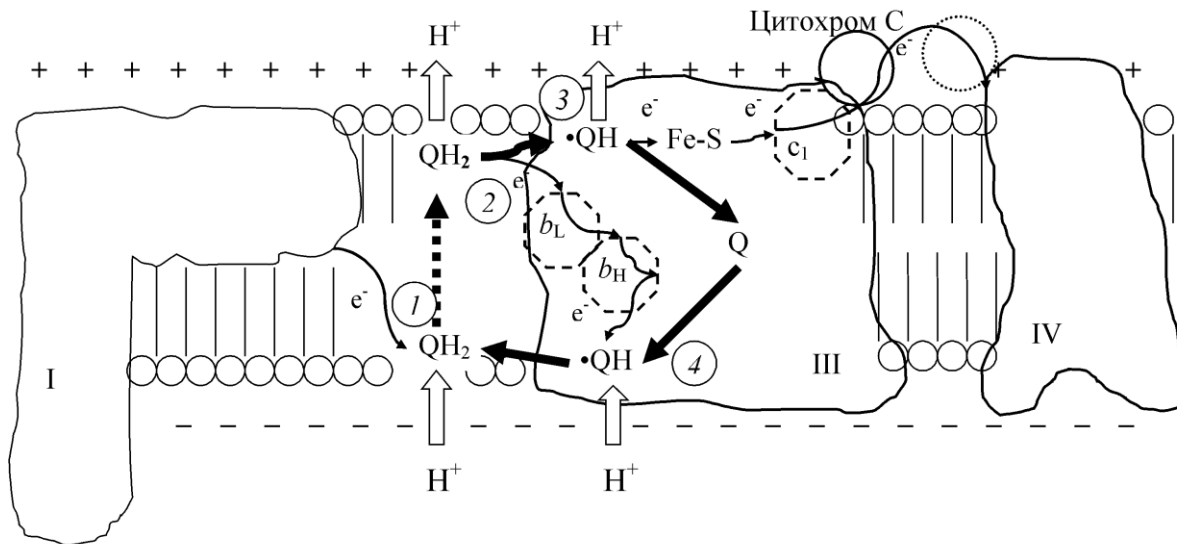


Рис. 6.4. Q-цикл в комплексе III:
 QH_2 – убухинол; $\bullet\text{QH}$ – убухисемихинон; Q – убухинон (пояснения в тексте)

Здесь убухинон получает электрон от гема b_H (заметим, что исходно электрон принадлежал к убухинолу) и протон из водной фазы матрикса (на рис. 6.4 стадия 4). Образуется полувосстановленный семиубихинон ($\bullet\text{QH}$), который принимает электрон от комплекса I и протон из матрикса. В мембране получается восстановленный убухинол и весь процесс начинается заново. Таким образом, передача одного электрона от комплекса I к цитохрому c сопровождается переносом двух протонов из матрикса в межмембранное пространство митохондрий. Перенос двух электронов через комплекс III к цитохрому c сопровождается, соответственно, трансмембранным переносом четырех протонов. В результате окисления QH_2 цитохромом высвобождаемая энергия запасается, таким образом, в виде разности электрохимических потенциалов протонов.

Таким образом, электроны из гидрофобной фазы, где они входят в состав убухинола (восстановленного убухинона), попадают в водное окружение – на атом железа гемовой группы белка цитохрома c . Энергетический потенциал электронов (теперь в цитохроме c) становится еще ниже. Окисленный цитохром c связывается с комплексом III, а восстановленный – с комплексом IV. Это означает, что комплексы III и IV избирательно взаимодействуют с молекулами окисленного и восстановленного цитохрома c (молекулярная масса около 13 кДа), отличающихся по строению друг от друга всего на один электрон, – яркий пример того, что связывание малого по размеру лиганда (в данном случае электрона) способно приводить к изменению конформации белка.

Цитохром c переносит электроны к комплексу IV, цитохром c -оксидазе. В состав цитохром c -оксидазы входят два медьсодержащих центра и гемы a и a_3 , через которые электроны, наконец, поступают к кисло-

роду. При восстановлении кислорода образуется анион O^{2-} , который при взаимодействии с протонами образует воду. Перенос каждого электрона через простетические группы цитохром *c*-оксидазы сопряжен с переносом протона из матрикса в межмембранное пространство митохондрий. Суммарная реакция, катализируемая комплексом IV, описывается уравнением



Из вышесказанного следует, что электроны, передаваемые НАДН, не переносятся непосредственно на кислород. Они проходят по меньшей мере десять промежуточных окислительно-восстановительных систем, большинство из которых – связанные простетические группы в комплексах I, III и IV. Изменение свободной энергии ΔG в реакциях восстановления зависит только от разности окислительно-восстановительных потенциалов акцептора и донора электронов. Стандартные редокс-потенциалы некоторых редокс-пар дыхательной цепи представлены в табл. 6.1.

Таблица 6.1

Редокс-пары и стандартные редокс-потенциалы ($T = 25^\circ\text{C}$ и $\text{pH } 7,0$)

Редокс-пара	Полуреакция	E^0 (В)
НАД ⁺ /НАДН	$\text{НАД}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{НАДН}$	-0,320
ФМН/ФМНН ₂	$\text{ФМН} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ФМНН}_2$	-0,300
ФАД/ФАДН ₂	$\text{ФАД} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ФАДН}_2$	-0,219
фумарат/ сукцинат	$\text{фумарат} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{сукцинат}$	+0,031
убихинон/ убихинол	$\text{CoQ} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{CoQH}_2$	+0,045
цитохром <i>b</i> (ок/вост)	$\text{Cyt } b(\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Cyt } b(\text{Fe}^{2+})$	+0,077
цитохром <i>c</i> ₁ (ок/вост)	$\text{Cyt } c_1(\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Cyt } c_1(\text{Fe}^{2+})$	+0,23
Цитохром <i>c</i> (ок/вост)	$\text{Cyt } c(\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Cyt } c(\text{Fe}^{2+})$	+0,25
Цитохром <i>a</i> (ок/вост)	$\text{Cyt } a(\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Cyt } a(\text{Fe}^{2+})$	+0,29
Цитохром <i>a</i> ₃ (ок/вост)	$\text{Cyt } a_3(\text{Fe}^{3+}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Cyt } a_3(\text{Fe}^{2+})$	+0,55
$\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$	$\frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	+0,816

Наличие дополнительных окислительно-восстановительных систем между НАДН и O_2 не приводит к изменению свободной энергии реакции. Общая величина энергии реакции (более 200 кДж/моль) разбивается на небольшие «пакеты», величина которых определяется разностью окислительно-восстановительных потенциалов соответствующих промежуточных продуктов.

Расчет величины энергии, запасаемой в электрохимическом градиенте протонов, произведем с использованием уравнения:

$$\Delta G = n\Delta\tilde{\mu}, \quad (6.8)$$

где n – количество вещества (в молях) в системе, $\Delta\tilde{\mu}$ – изменение электрохимического потенциала. Электрохимический потенциал системы ($\tilde{\mu}$) определяется на основе уравнения

$$\tilde{\mu} = \mu_0 + RT \ln C + zF\varphi, \quad (6.9)$$

где μ_0 – стандартный химический потенциал.

Электрохимический потенциал протона, для которого заряд $z = +1$, будет

$$\tilde{\mu}_{H^+} = \mu_0 + RT \ln[H^+] + F\varphi. \quad (6.10)$$

Перейдем к десятичному логарифму в выражении (6.10)

$$\tilde{\mu}_{H^+} = \mu_0 + 2,3RT \log_{10}[H^+] + F\varphi. \quad (6.11)$$

Используя определение pH, преобразуем выражение (6.11) в выражение

$$\tilde{\mu}_{H^+} = \mu_0 - 2,3RT(\text{pH}) + F\varphi. \quad (6.12)$$

Определим величину разности электрохимического потенциала для протона через митохондриальную мембрану

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = 2,3RT \log_{10} \frac{[H^+]_P}{[H^+]_N} + F(\varphi_P - \varphi_N), \quad (6.13)$$

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = F\Delta\varphi - 2,3RT(\Delta\text{pH}). \quad (6.14)$$

Матрикс митохондрий является более щелочной средой ($\text{pH}_N \approx 8,0$), чем межмембранное пространство ($\text{pH}_P \approx 7,25$), т.е. ΔpH составляет 0,75 единиц. Если принять разность потенциалов $\Delta\varphi$ равной 160 мВ получим, что согласно (6.14) изменение свободной энергии при переносе одного моля протонов составляет около 20 кДж/моль. Поскольку при окислении 1 моля НАДН переносится 10 молей протонов, суммарное изменение свободной энергии составит 200 кДж/моль. Таким образом, эффективность работы дыхательной цепи такова, что около 90% энергии, высвобождаемой при окислении молекулы НАДН, трансформируется в энергию электрохимического потенциала протонов.

Единица измерения электрохимического потенциала – джоуль·моль⁻¹. Для перевода величины разности электрохимического потенциала в вольты ее необходимо разделить на число Фарадея. Полученное частное П. Митчел, создатель хемиосмотической теории, по аналогии с электрондвижущей силой предложил называть протондвижущей силой

$$\Delta p = \frac{\Delta\tilde{\mu}_{H^+}}{F} = \Delta\varphi - \frac{2,3RT}{F}(\Delta\text{pH}), \quad (6.15)$$

При движении протонов под действием протондвижущей силы совер-

шается работа. Энергия, запасенная в разности электрохимических потенциалов протонов, используется для транспорта пирувата и фосфата внутрь митохондрий. Однако основная часть запасенной на внутренней мембране митохондрий энергии с помощью фермента H^+ -АТФ-синтазы трансформируется в энергию химических связей молекулы АТФ.

6.3. H^+ -АТФ-СИНТАЗА: СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ

H^+ -АТФ-синтаза (H^+ -АТФаза) является ферментом, катализирующим фосфорилирование АДФ за счет энергии, запасаемой при создании градиента электрохимического потенциала протонов. Важно отметить, что H^+ -АТФ-синтаза является ферментом, который способен катализировать как синтез, так и гидролиз АТФ в энергопреобразующих мембранах клеток растений, животных и бактерий. В режиме синтеза АТФ функционирование H^+ -АТФ-синтазы обеспечивается за счет движения протонов в результате существующего градиента их концентраций. В то же время H^+ -АТФ-синтаза может функционировать как протонный насос. За счет энергии, выделяющейся при гидролизе АТФ, она может перекачивать ионы водорода в направлении градиента электрохимического потенциала протонов.

H^+ -АТФ-синтаза состоит из двух частей. Схематическое изображение АТФ-синтазного комплекса представлено на рис. 6.5. Мембранная часть H^+ -АТФ-синтазы называется фактором сопряжения F_0 . Водорастворимый фрагмент H^+ -АТФ-синтазы, выступающий из мембраны в виде сферического образования, называется фактором сопряжения F_1 . В митохондриях H^+ -АТФ-синтаза встроена во внутреннюю мембрану, а комплекс F_1 обращен в сторону матрикса. Образование АТФ из АДФ и неорганического фосфата (Ф) происходит в каталитических центрах H^+ -АТФ-синтазы, расположенных в комплексе F_1 . Белковый комплекс F_1 можно сравнительно легко отделить от мембраны, при этом он сохраняет способность катализировать гидролиз АТФ. Однако изолированный фактор сопряжения F_1 не способен синтезировать АТФ. Связано это с тем, что работа АТФ-синтазы в режиме синтеза АТФ сопряжена с переносом через нее протонов, путь которых протекает через F_0 и направлен в сторону F_1 . Такой направленный перенос протонов возможен только в том случае, если H^+ -АТФ-синтаза встроена в мембрану замкнутых энергопреобразующих органелл или в плазматическую мембрану бактериальной клетки.

Водорастворимый фрагмент H^+ -АТФ-синтазы представляет собой белковый комплекс, который состоит из девяти субъединиц пяти типов, получивших название субъединиц α , β , γ , δ и ϵ . Одна молекула фермента содержит три одинаковые α - и три одинаковые β -субъединицы, а также по одной субъединице γ , δ и ϵ (сокращенное обозначение комплекса F_1

$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$). На субъединицах α и β находятся центры связывания АТФ и АДФ, однако каталитической активностью обладают только β -субъединицы.

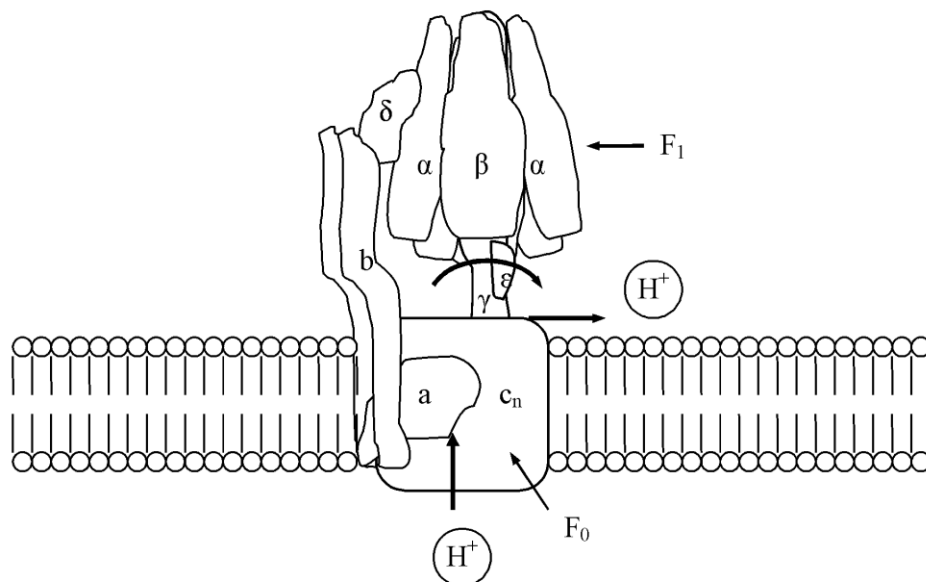


Рис. 6.5. Схематическое изображение H^+ -АТФ-синтазы

Полипептидные цепи α - и β -субъединиц уложены в похожие по строению белковые глобулы, которые все вместе образуют ансамбль, состоящий из шести субъединиц ($\alpha_3\beta_3$). Этот ансамбль имеет вид слегка приплюснутого шара высотой 8 нм и шириной 10 нм. В центре шара находится субъединица γ , которая образована двумя протяженными полипептидными цепями и напоминает слегка деформированный изогнутый стержень длиной около 9 нм. Нижняя часть субъединицы γ выступает из шара на 3 нм в сторону мембранного комплекса F_0 . Субъединица δ расположена снаружи комплекса F_1 . Внутри ансамбля $\alpha_3\beta_3$ находится минорная субъединица ϵ , которая связана с субъединицей γ . Мембранный фрагмент F_0 состоит из полипептидных субъединиц трех типов. В его состав входят одна субъединица типа a и две субъединицы типа b , имеющие молекулярные массы 20–30 кДа, а также довольно большое число ($n = 10 - 12$) одинаковых копий более мелкой субъединицы c (молекулярная масса 6–11 кДа). Сокращенное обозначение молекулярной структуры фактора сопряжения F_0 будет ab_2c_n . Каждая из субъединиц b содержит лишь один сравнительно короткий участок, погруженный в мембрану. Остальная часть субъединиц b заметно выступает из мембраны в сторону комплекса F_1 и закрепляется за расположенную на его поверхности субъединицу δ (рис. 6.5). Субъединицы c образуют единый ансамбль (c_n), имеющий форму цилиндра, погруженного в мембрану. Выступающая из комплекса F_1 в сторону F_0 субъединица γ , по-видимому, погружена внутрь этого цилинд-

ра и закреплена в нем.

Перенос протонов проходит через два протонных «полуканала», расположенные на границе между субъединицами α и c . Один из «полуканалов» находится ближе к той стороне мембраны, которая обращена в область с повышенной концентрацией ионов водорода. Этот «полуканал» обеспечивает поступление протонов к определенным функциональным группам F_0 , расположенным внутри фермента. Другой «полуканал», обращенный в противоположную сторону мембраны, обеспечивает выход протонов в область с меньшей концентрацией ионов водорода. Считается, что «полуканалы» не связаны друг с другом непосредственно, поскольку они смещены друг относительно друга. Перенос протонов проходит с участием кольца из субъединиц c . Каждая из этих субъединиц в своей центральной части содержит протонируемую карбоксильную группу, которая способна присоединять и отдавать протоны через соответствующие протонные «полуканалы».

Особенность функционирования H^+ -АТФ-синтазы заключается в том, что фермент представляет собой полную аналогию электродвигателей, созданных человеком и состоящих из ротора и статора. Причем энергия для работы данного «мотора» вырабатывается с помощью водородно-кислородного топливного элемента, реализованного природой в виде дыхательной цепи митохондрий.

Представления об H^+ -АТФ-синтазе как молекулярной машине, работа которой связана с ее вращением, хорошо согласуются со структурными особенностями H^+ -АТФ-синтазы, в которой можно выделить две группы белковых субъединиц. Одна из них образует статор мотора, который неподвижен относительно мембраны, а другая соответствует подвижному ротору, вращающемуся внутри статора (см. рис. 6.5).

Статор включает в себя шарообразный гексамер, образованный тремя субъединицами α и тремя субъединицами β , а также субъединицы a и b мембранного комплекса F_0 . Ротор состоит из субъединиц γ и ϵ комплекса F_1 . Вопрос о том, в состав какого функционального узла АТФ-синтазы, статора или ротора, входят субъединицы c , является спорным. Некоторые исследователи полагают, что субъединица γ жестко сцеплена с кольцом из субъединиц c и во время работы АТФ-синтазы кольцо из субъединиц c вращается, подобно маховому колесу, вместе с субъединицами γ и ϵ .

Вращение ротора H^+ -АТФ-синтазы происходит как при гидролизе АТФ, так и в условиях синтеза АТФ. Сила, приводящая в движение ротор АТФ-синтазы, работающей в режиме синтеза АТФ, возникает за счет потока протонов, протекающих через «полуканалы». Блокирование протонного канала с помощью ингибитора, действующего на одну из субъединиц c мембранного комплекса F_0 , одновременно подавляет вращение ро-

тора и синтез АТФ.

Субъединица γ не может свободно вращаться внутри комплекса $\alpha_3\beta_3$ за счет энергии тепловых движений. Для того чтобы провернуть ротор внутри статора, и тем самым заставить фермент синтезировать АТФ, необходим внешний источник энергии. Когда H^+ -АТФ-синтаза работает в режиме синтеза АТФ, движущую силу процесса обеспечивает градиент электрохимического потенциала протонов. При работе H^+ -АТФ-синтазы в режиме гидролиза АТФ источником энергии для вращения ротора служит энергия, запасенная в молекуле АТФ.

Самое впечатляющее доказательство того, что субъединица γ действительно вращается при функционировании фермента, было получено группой японских исследователей в конце прошлого века, которым впервые удалось непосредственно увидеть вращение субъединицы γ с помощью флуоресцентного микроскопа. Чтобы наблюдать за вращением субъединицы γ , к ее основанию, выступающему из комплекса F_1 , прикрепили специальный макромолекулярный маркер – фрагмент нити актина (белок, входящий в состав мышц) длиной около одного микрона, который, в свою очередь, поместили молекулами флуоресцирующего красителя. Остальную часть отделенной от мембраны молекулы F_1 прикрепили к неподвижной подложке.

Наблюдая с помощью микроскопа за изменением положения флуоресцирующей нити актина, жестко связанной субъединицей γ , удалось непосредственно увидеть ее вращение. В дальнейшем было показано, что молекула F_1 вращает актиновый хвост дискретными скачками с шагом, равным 120° . Один скачок на 120° сопровождается гидролизом одной молекулы АТФ. При отсутствии источника энергии (когда система не содержала молекул АТФ) регулярного направленного вращения субъединицы не происходило, а наблюдались лишь очень редкие случайные повороты в обоих направлениях, обусловленные тепловыми движениями. Молекулярный мотор H^+ -АТФ-синтаза характеризуется высоким коэффициентом полезного действия (КПД). Показано, что работа, которую совершает мотор при повороте актинового хвоста на 120° , практически равна энергии, запасенной в молекуле АТФ. То есть, КПД мотора близок к 100 %.

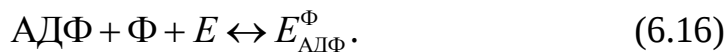
Максимальная скорость вращения такого макромолекулярного мотора достигала четырех оборотов в секунду. Это, конечно, ниже скорости вращения ротора (17 оборотов в секунду), которую можно было бы ожидать исходя из того, что в нормальных условиях (без нагрузки) одна молекула фермента гидролизует 52 молекулы АТФ в секунду. Однако вращение длинного хвоста, пришитого к субъединице γ для того, чтобы можно было наблюдать ее вращение, представляет собой большую гидродинамическую нагрузку для мотора макромолекулярных размеров. Вращательный

момент, развиваемый этим мотором, превышает величину $4,5 \cdot 10^{-20}$ Н·м. Таким образом, АТФ-синтаза является самым маленьким из всех известных моторов.

Синтез АТФ связан со структурными перестройками H^+ -АТФ-синтазы, в ходе которых изменяются состояния каталитических центров фермента. Считается, что поворот субъединицы γ вызывает одновременное изменение конформации всех трех каталитических субъединиц β . Каждая из трех каталитических β -субъединиц может поочередно находиться в одном из трех конформационных состояний, различающихся по степени сродства молекул АТФ, АДФ и Ф к каталитическому центру. Эти состояния схематически показаны на рис. 6.6: 1 – состояние «открытого» центра, с которым могут связаться молекулы АДФ и Ф; 2 – состояние с «закрытым» каталитическим центром, который прочно удерживает молекулы АТФ, АДФ и Ф; 3 – состояние, в котором ослабляется связь молекулы АТФ с каталитическим центром и происходит ее диссоциация в раствор.

Рассмотрим последовательность событий, приводящих к образованию АТФ. Для описания цепи реакций будем использовать следующие символы: E – для обозначения каталитической β -субъединицы фермента, свободной от субстратов (АДФ и Ф) и продуктов (АТФ) реакции, $E_{\text{АДФ}}^{\Phi}$ и $E_{\langle \text{АДФ} \rangle}^{\langle \Phi \rangle}$ – для обозначения β -субъединиц, содержащих слабо- и прочносвязанные молекулы АДФ и Ф, соответственно, а $E_{\langle \text{АТФ} \rangle}^{H_2O}$ и $E_{\text{АТФ}}^{H_2O}$ – β -субъединиц, содержащих прочно- и слабосвязанные молекулы АТФ, соответственно.

Самым первым актом в цепи событий, приводящих к образованию АТР, является связывание молекул АДФ и Ф активным центром свободной β -субъединицы (E), находящейся в состоянии 1,



За счет энергии внешнего источника в молекуле F_1 происходят конформационные изменения, в результате которых АДФ и Ф прочно связываются с каталитическим центром (состояние 2),



В этом состоянии в каталитическом центре фермента становится возможным образование АТФ:



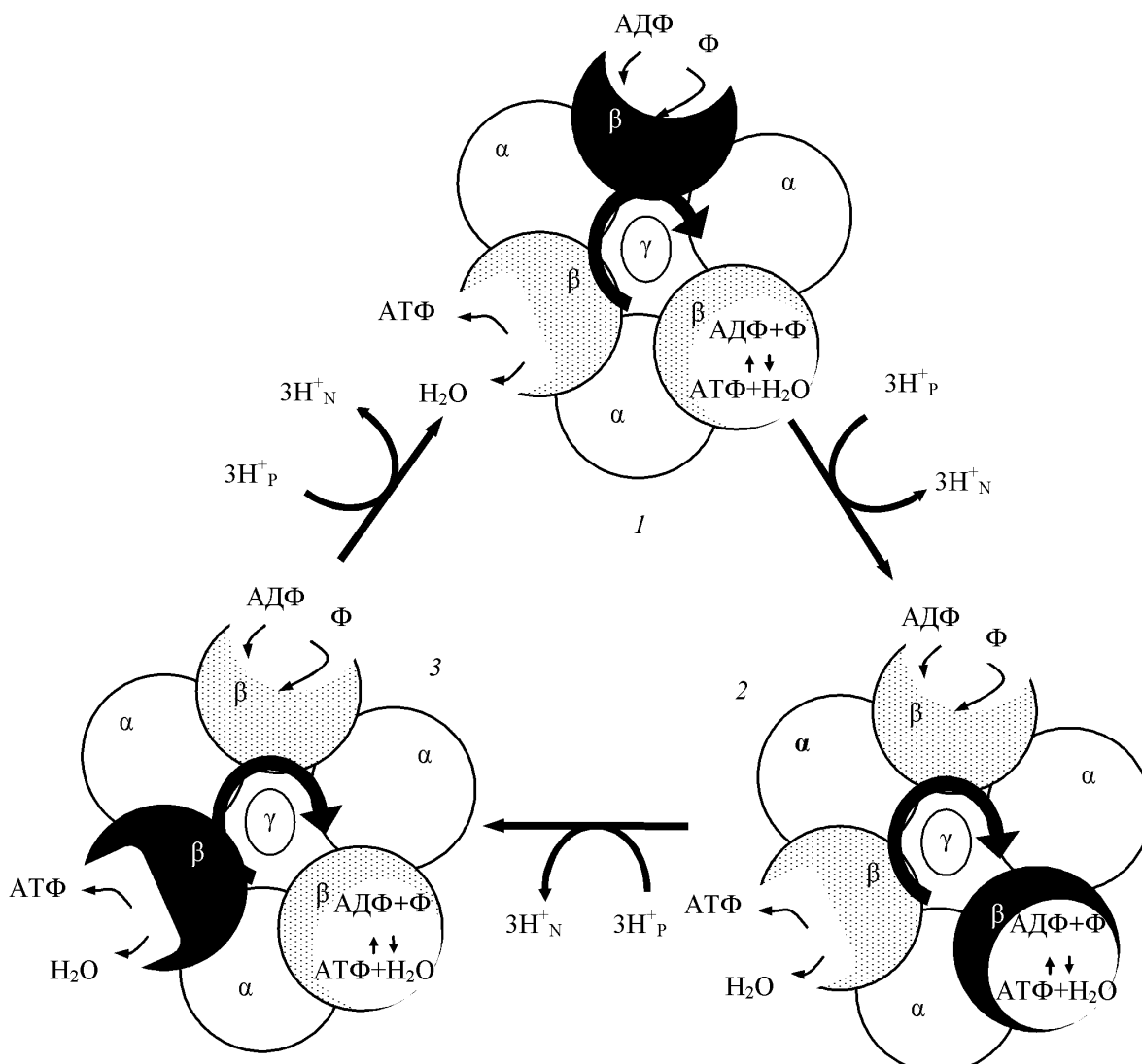


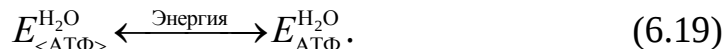
Рис. 6.6. Синтез АТФ:

1 – состояние «открытого» центра, с которым могут связаться молекулы АДФ и Ф; 2 – состояние с «закрытым» каталитическим центром, который прочно удерживает молекулы АТФ, АДФ и Ф; 3 – состояние, в котором ослабляется связь молекулы АТФ с каталитическим центром и происходит ее диссоциация в раствор

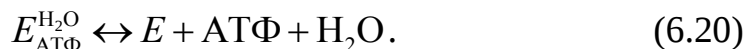
Следует особо отметить, что на данной стадии работы АТФ-синтазы, когда происходит образование ковалентной связи между фосфатными группами молекул АДФ и Ф, ферменту практически не требуется энергии. С помощью радиоактивных изотопов O^{18} и P^{32} было установлено, что реакции синтеза и гидролиза АТР в каталитическом центре фермента активно идут при отсутствии внешнего источника энергии, поскольку они наблюдаются даже в разобщенных митохондриях. Установлено, что константа равновесия реакции $E_{<АДФ>}^{<Ф>} \leftrightarrow E_{<АТФ>}^{H_2O}$ близка к единице. Это означает, что в каталитическом центре фермента самопроизвольно идут многочисленные акты образования и разрыва ковалентной связи между фос-

фатными группами АДФ и Ф. В цикле ферментативного синтеза АТФ внешняя энергия необходима в первую очередь для освобождения прочно связанной молекулы АТФ из каталитического центра.

Поэтому следующий этап работы фермента заключается в том, что в результате энергозависимого структурного изменения молекулы F_1 каталитическая субъединица β , содержащая прочно связанную молекулу АТР, переходит в новое состояние, в котором связь АТР с каталитическим центром ослаблена:



В результате этого молекула АТФ покидает фермент, уступая место в каталитическом центре другим молекулам АДФ и Ф из раствора:



Оказавшись свободной, субъединица β возвращается в исходное конформационное состояние 1, благодаря чему и обеспечивается цикличность работы фермента.

Описанные выше переходы между состояниями $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 1$ (см. рис. 6.6) происходят в результате энергозависимых структурных перестроек H^+ -АТФ-синтазы, которые осуществляются за счет энергии внешнего источника. Эти перестройки имеют кооперативный характер – они одновременно затрагивают состояния всех трех каталитических субъединиц β , входящих в состав H^+ -АТФ-синтазы. В результате трех последовательных структурных переходов одной β -субъединицы в растворе появляется одна новая молекула АТФ и становится меньше на одну молекулу АДФ и одну молекулу Ф. Однако, учитывая, что молекула F_1 содержит три β -субъединицы, то после каждого энергозависимого структурного перехода H^+ -АТФ-синтазы в растворе будет появляться одна новая молекула АТФ.

Предполагают, что структурные перестройки фермента, вызывающие изменение сродства молекул АТФ, АДФ и Ф к каталитическим субъединицам происходят в результате электростатических взаимодействий, инициированных процессами протонирования и ионизации кислотных групп аминокислотных остатков, входящих в состав фактора сопряжения F_1 . До тех пор, пока за счет работы цепи электронного транспорта на мембране будет поддерживаться поток протонов через H^+ -АТФ-синтазу, циклический процесс протонирования и депротонирования функциональных кислотных групп фермента будет повторяться многократно, обеспечивая синтез новых молекул АТФ.

6.4. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ФУНКЦИИ ДЫХАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ

Процесс поглощения кислорода в митохондриях, называемый также дыханием, осуществляется при функционировании электронтранспортных цепей. При этом кислород в реакциях, катализируемых компонентами данных цепей, не всегда используется в процессах, сопряженных с запасанием энергии в виде АТФ.

Митохондрии коры надпочечников содержат электронтранспортную цепь, аналогичную электронтранспортной цепи ЭР, в которой с помощью цитохрома P450 осуществляется оксигенация холестерина в процессе синтеза стероидных гормонов. Митохондрии клеток бурого жира в большом количестве содержат белок-протонофор – термогенин. С помощью термогенина протоны из межмембранного пространства митохондрий переносятся в матрикс. Энергия протонного градиента при этом диссипатируется в тепло. Таким образом, в данном механизме энергия окисления кислородом органических веществ трансформируется в тепло, минуя стадию синтеза и гидролиза АТФ.

Наряду с этим, метаболизм кислорода в митохондриях сопровождается образованием активных форм кислорода (АФК), обладающих широким спектром физиологического действия. К группе АФК относят супероксидный анион-радикал ($\dot{O}_2^-$), пероксид водорода (H_2O_2) и другие продукты метаболизма кислорода. Образование супероксидного анион-радикала в дыхательной цепи обусловлено переносом электронов с комплекса I или комплекса III через молекулу убисемихинона на молекулу кислорода. Появление $\dot{O}_2^-$ в любой биологической или модельной системе сопровождается образованием H_2O_2 в результате реакции дисмутации супероксидного анион-радикала. Молекула H_2O_2 – незаряженная стабильная молекула, способная диффундировать к своим мишеням на сравнимые с размерами клеток расстояния. Основными мишенями H_2O_2 в клетке являются тиолы белков, константа скорости реакции с которыми для пероксида водорода достигает $10^2 \text{ (моль/л)}^{-1} \text{с}^{-1}$. В результате взаимодействия пероксида водорода с тиолами образуются дисульфидные связи и изменяется активность белков. Избыток молекул пероксида водорода удаляется специальными ферментами, такими как пероксидазы и каталазы.

При функционировании дыхательной цепи образование АФК происходит постоянно. Процессы образования АФК митохондриями усиливаются при действии различных фармакологических препаратов и физиологических стимулов. В качестве сигнальных молекул АФК участвуют в регуляции метаболизма, дифференцировки и апоптоза клеток. Функциональный ответ клетки на повышение концентрации АФК зависит от типа активных

форм кислорода, их концентрации и длительности концентрационного стимула АФК. Таким образом, митохондрии являются многофункциональными органеллами, мембраны которых участвуют в кислородзависимых процессах обработки информации, преобразования энергии и вещества.

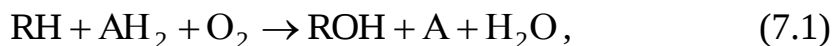
ГЛАВА 7. МЕМБРАНЫ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА, АППАРАТА ГОЛЬДЖИ И ДРУГИХ ОРГАНЕЛЛ

7.1. ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ МЕМБРАНЫ ГЛАДКОГО ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

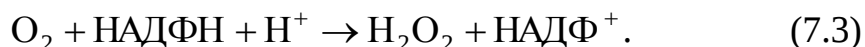
Общие для всех мембран барьерная и матричная функции обеспечиваются главным образом липидным бислоем, структура которого примерно одинакова во всех мембранах. Однако набор белков индивидуален для каждого типа мембран, что позволяет мембранам участвовать в выполнении самых разных функций в клетках и клеточных структурах.

Около половины площади всех мембран клетки занимают мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭР). Выделяют два типа эндоплазматического ретикулума: гладкий и гранулярный (шероховатый). В мембранах гладкого ЭР локализована система микросомального окисления, участвующая в метаболизме физиологических соединений и детоксикации гидрофобных ксенобиотиков (чужеродных веществ).

Основным компонентом системы микросомального окисления является цитохром Р450, названный так за характерный спектр поглощения восстановленного комплекса белка с СО в области 450 нм. Ферментативная активность цитохрома Р450 зависит от типа молекул-субстратов. Наиболее типичной активностью данной системы является окисление липофильных субстратов в монооксигеназной реакции:

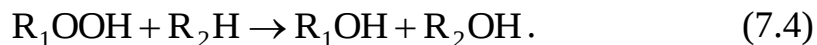


где R – липофильный субстрат, AH_2 – донор электронов. Донорами электронов для микросомальной системы окисления служат, в основном, динуклеотиды НАДФН или НАДН. Наряду с монооксигеназной активностью цитохром Р450 может проявлять и оксидазную активность, восстанавливая O_2 до $\dot{O}_2^-$ и H_2O_2 :



Цитохром Р450 проявляет также пероксидазную активность, используя

в реакции окисления в качестве косубстратов органические пероксиды или пероксид водорода вместо НАДФН:



Активация кислорода и внедрение кислорода в молекулу субстрата происходит в результате циклических окислительно-восстановительных преобразований с участием ионов железа в составе цитохрома P450. Микросомальная система окисления эндоплазматического ретикулума состоит из четырех белков: цитохрома P450, НАДФН-цитохром P450-редуктазы, цитохрома b_5 и НАДН-цитохром b_5 -редуктазы. Перенос электронов от НАДФН на цитохром P450 происходит через простетические группы ФАД и ФМН НАДФН-цитохром P450-редуктазы. Перенос электронов от НАДН происходит через флавиновые группы НАДН-цитохром b_5 -редуктазы и гемовую группу цитохрома b_5 . Следует отметить, что в ряде случаев перенос электронов от НАДФН на цитохром P450 происходит с участием цитохрома b_5 .

В результате окислительных модификаций, катализируемых микросомальной системой ЭР, попавшие в организм ксенобиотики становятся более электрофильными. На следующем этапе детоксикации модифицированный ксенобиотик связывается с отрицательно заряженным соединением (реакция конъюгация). Эта реакция катализируется трансферазами, расположенными на мембране ЭР. Конъюгация реактивных электрофильных групп ксенобиотиков с глутатионом или глюкуроновой кислотой увеличивает гидрофобность соединений и способствует их активному выведению из клеток.

Мембрана гладкого эндоплазматического ретикулума содержит также ферменты, участвующие в синтезе жирных кислот и фосфолипидов. В мембране ЭР образуются почти все липиды, необходимые для построения новых клеточных мембран, включая фосфолипиды и холестерин. Основным синтезируемым фосфолипидом является фосфатидилхолин, который образуется в три этапа из двух жирных кислот, глицерофосфата и холина (рис. 7.1). Каждый этап катализируется в мембране ЭР ферментами, активные центры которых обращены в цитозоль. На первом этапе ацилтрансфераза добавляет к глицерофосфату две жирные кислоты с образованием фосфатидной кислоты (рис. 7.1, 1). Затем фосфатаза отсоединяет фосфат с образованием диацилглицерола (рис. 7.1, 2). На следующей стадии формируется полярная «голова» молекулы липида (рис. 7.1, 3). По аналогичным механизмам синтезируются фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол.

Синтез фосфолипидов происходит в монослое ЭР, обращенном к цитозолю. Часть образованных молекул фосфолипидов переносится в другой монослой ЭР с помощью «флип-флоп» переходов (рис. 7.1, 4). В ЭР коли-

чество фосфолипидов выравнивается с двух сторон мембраны за минуты, что почти в 10^5 раз быстрее, чем скорость, рассчитанная для спонтанного «флип-флоп» перехода в искусственных липидных бислоях. Быстрое перемещение через бислой происходит при участии специфических транслокаторов фосфолипидов – флипаз.

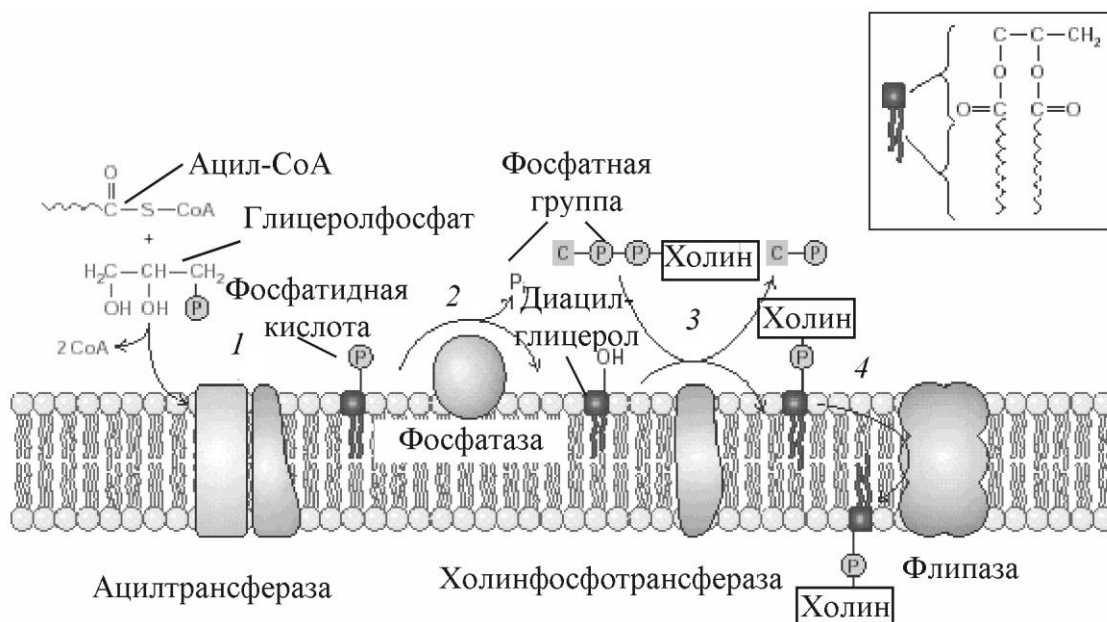


Рис. 7.1. Образование фосфатидилхолина (пояснения в тексте)

Известно, что в ЭР образуются также холестерин и церамид. Церамид экспортируется в аппарат Гольджи (АГ), где он служит предшественником двух типов липидов: к одной части молекул церамида присоединяются олигосахаридные цепи с образованием гликосфинголипидов, а к другой – головная фосфохолиновая группа от фосфатидилхолина с образованием сфингомиелина. Таким образом, и гликолипиды и сфингомиелин образуются на сравнительно поздних этапах процессов формирования мембран.

7.2. ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ МЕМБРАНЫ ГРАНУЛЯРНОГО ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Все эукариотические клетки содержат значительное количество гранулярного ЭР, на внешней поверхности которого локализованы участвующие в синтезе мембранных и секретируемых белков рибосомы. Считается, что цистерны гладкого и гранулярного ЭР связаны между собой и образуют единый компартмент. Количество каждого из двух типов ЭР зависит от специализированных функций клетки. Например, большим содержанием гранулярного ЭР отличаются ациноциты, в которых синтезируются пищеварительные ферменты, и гепатоциты, в которых синтезируют-

ся белки плазмы. Гладкий ЭР широко представлен в эндокринных клетках, синтезирующих стероидные гормоны.

Синтезируемые в клетке белки распределяются между органеллами двумя различными способами. Во-первых, они могут непосредственно проникать через мембрану с помощью специального белка-транспортера. Второй путь передвижения белковых молекул опосредован транспортными пузырьками. Эти пузырьки захватывают определенные молекулы в полости одного компартмента (от которого они отсоединяются) и переносят их в другой компартмент, сливаясь с ним. Именно так происходит перенос растворимых белков из ЭР к АГ.

Оба типа транспортных процессов избирательно контролируются с помощью специальных «сигналов сортировки». У белка, который напрямую переносится через мембрану, эти сигналы распознаются транспортером в мембране. А в транспортном пузырьке белок, имеющий соответствующий сигнал сортировки, связывается с рецептором на мембране пузырька.

Считается, что существуют два типа сигналов сортировки, управляющих распределением белков между клеточными компартментами. При переносе белка через мембрану с помощью транспортера сигналы сортировки представляют собой протяженный участок аминокислотной последовательности длиной в 20–50 остатков. После переноса сигнальный пептид отрезается. Сигналом сортировки может также служить определенная трехмерная структура, образуемая группами атомов на поверхности белка. Аминокислотные остатки, формирующие такие сигнальные участки, могут быть расположены очень далеко друг от друга в линейной последовательности белка. Сигнальные пептиды направляют белки из цитозоля в ЭР, митохондрии, хлоропласты и ядро; они также отвечают за то, чтобы некоторые белки оставались в ЭР.

Белки, транспортируемые в ЭР, содержат N-концевой сигнальный пептид длиной от 16 до 30 аминокислотных остатков. Его центральная часть образована гидрофобными аминокислотными остатками. Перенос белков через мембрану ЭР происходит одновременно с их трансляцией (котрансляционно). Данный процесс протекает в несколько стадий, которые изображены на рис. 7.2.

Перемещение рибосомы к мембране ЭР происходит с участием распознающей сигнал частицы (SRP – signal-recognition particle) и ее рецептора, известного как стыкующий белок. Сразу после образования сигнального пептида (рис. 7.2, стадия 1) частица, распознающая сигнал, связывается с ним (рис. 7.2, стадия 2). SRP состоит из 6 полипептидов, соединенных молекулой РНК. Эта частица присоединяется и к сигнальному пептиду (как только он появляется на большой субъединице рибосомы), и к рибо-

сомному участку связывания аминоксил-тРНК. В результате трансляция останавливается, поскольку блокируется связывание следующей аминоксил-тРНК с рибосомой.

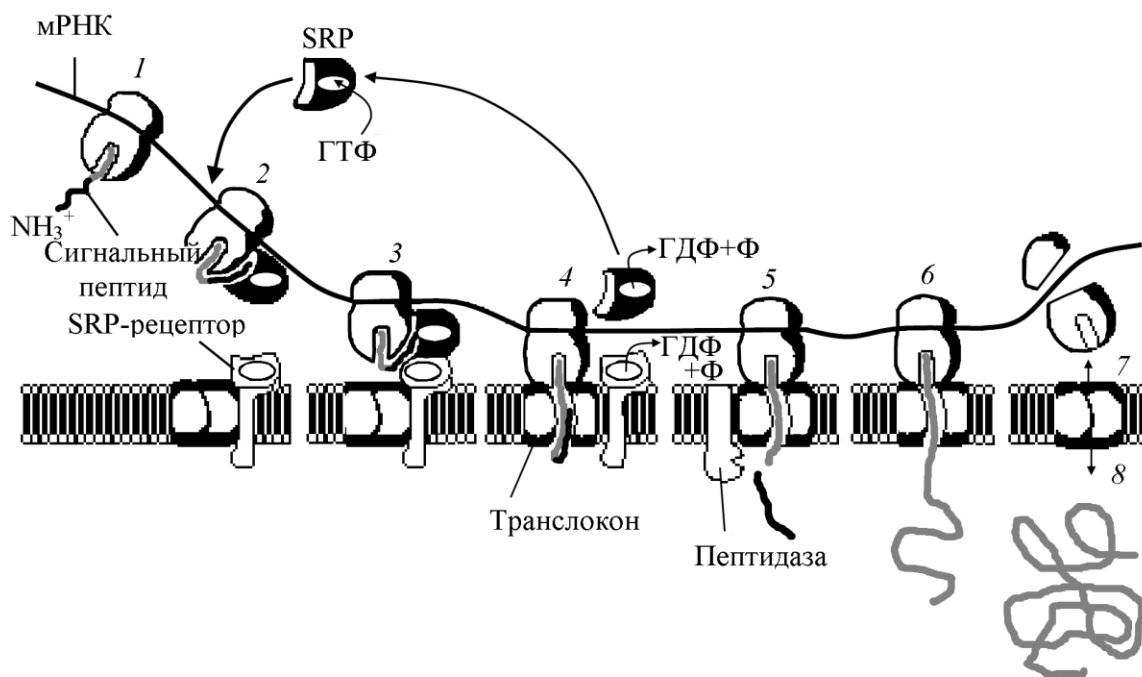


Рис. 7.2. Синтез и транслокация секреторных белков в мембране ЭР

Пауза в трансляции длится до тех пор, пока захватившая рибосому частица не свяжется с SRP-рецептором, находящимся на цитоплазматической стороне мембраны гранулярного ЭР (рис. 7.2, стадия 3). SRP-рецептор – это интегральный мембранный белок, состоящий из двух субъединиц. Он взаимодействует с SRP-связанными рибосомами таким образом, что частица меняет свое положение и трансляция возобновляется (рис. 7.2, стадия 4). Одновременно рибосома связывается с мембраной ЭР, и растущая на ней полипептидная цепь переносится к системе транслокации в мембране.

SRP и SRP-рецептор содержат полипептидные участки, обладающие ГТФазной активностью. Наличие молекул ГТФ в активных центрах белков необходимо для взаимодействия между SRP и SRP-рецептором. Связывание SRP к SRP-рецептору запускает гидролиз ГТФ и высвобождение ГДФ и фосфата из белков.

Перенос синтезируемой аминокислотной цепи осуществляется через специальный белковый канал, так называемый транслокон. Эта транслокационная пора образована несколькими единицами комплекса Sec61p. Комплекс Sec61p является гетеротримером, состоящим из небольших α -, β - и γ -субъединиц. После связывания рибосомы с транслоконом происходит отделение SRP и синтезированный первичный пептид входит в канал

транслокона диаметром около 2 нм. После этого возобновляется синтез полипептидной цепочки, цепочка удлиняется и ее сигнальный участок вместе с растущей цепочкой оказывается во внутренней части ЭР, называемой люменом. Таким образом, синтезируемый белок проходит через мембрану ЭР во время его синтеза котрансляционно, то есть одновременно с его трансляцией. В люмене ЭР с помощью специальной пептидазы сигнальный участок отщепляется от синтезируемой аминокислотной последовательности (рис. 7.2, стадия 5). Продолжающаяся трансляция приводит к перемещению аминокислотной цепи в люмен ЭР (рис. 7.2, стадия 6). После завершения транслкации пептида рибосома отсоединяется от ЭР и канал закрывается (рис. 7.2, стадии 7, 8).

В полости ЭР полипептидная цепь сворачивается в глобулу. Данный процесс сопровождается образованием дисульфидных связей между SH-группами цистеина. Образование дисульфидных связей протекает с участием акцепторов электронов. Набор доноров электронов, содержащихся в цитозоле, предотвращает самопроизвольное образование дисульфидных связей. Однако в полости ЭР концентрация доноров электронов намного ниже, чем в цитозоле и поэтому присутствующие в ЭР акцепторы электронов индуцируют процессы образования дисульфидных связей. Образование и перестройка дисульфидных связей в ЭР протекает с участием дисульфидизомеразы (рис. 7.3).

Дисульфидизомераза – это белок, который в большом количестве содержится в полости ЭР и прикреплен к внутренней стороне его мембраны. Как показано на рис. 7.3, восстановление окисленной формы дисульфидизомеразы (PDI) сопровождается образованием дисульфидных связей в белке-субстрате. Повторное окисление дисульфидизомеразы протекает с участием белка Ero1. Восстановленная форма дисульфидизомеразы участвует в перестройке дисульфидных связей внутри белка.

При биосинтезе белка дисульфидные связи формируются между различными цистеинами и данный процесс иногда приводит к образованию «неправильной» конформации белка. Механизм действия дисульфидизомеразы состоит в том, что, разрезая S-S-связи, она ускоряет переход белка в конформацию с наименьшей свободной энергией. Таким образом, фермент облегчает сворачивание синтезированных белков, которые попадают в ЭР.

В ЭР синтезируются как растворимые, так и мембранные белки. Начальные стадии синтеза мембранных белков сходны с начальными стадиями при синтезе растворимых белков. Здесь также участвует распознающая сигнал частица SRP и происходит прохождение начального участка белковой цепи через транслокон. Однако в цепи синтезирующегося мембранного белка существует одна или несколько аминокислотных по-

следовательностей, которые препятствуют движению белковой цепи через мембрану. Эти последовательности образованы 20–30 остатками гидрофобных аминокислот и называются стоп-сигналами переноса. При появлении стоп-сигнала в транслоконе полипептидная цепь из белка диффундирует в липидный бислой и в области стоп-сигнала остается связанной с мембраной. При этом синтез белка на рибосоме не останавливается, в результате чего синтезированный белок остается встроенным в мембрану.

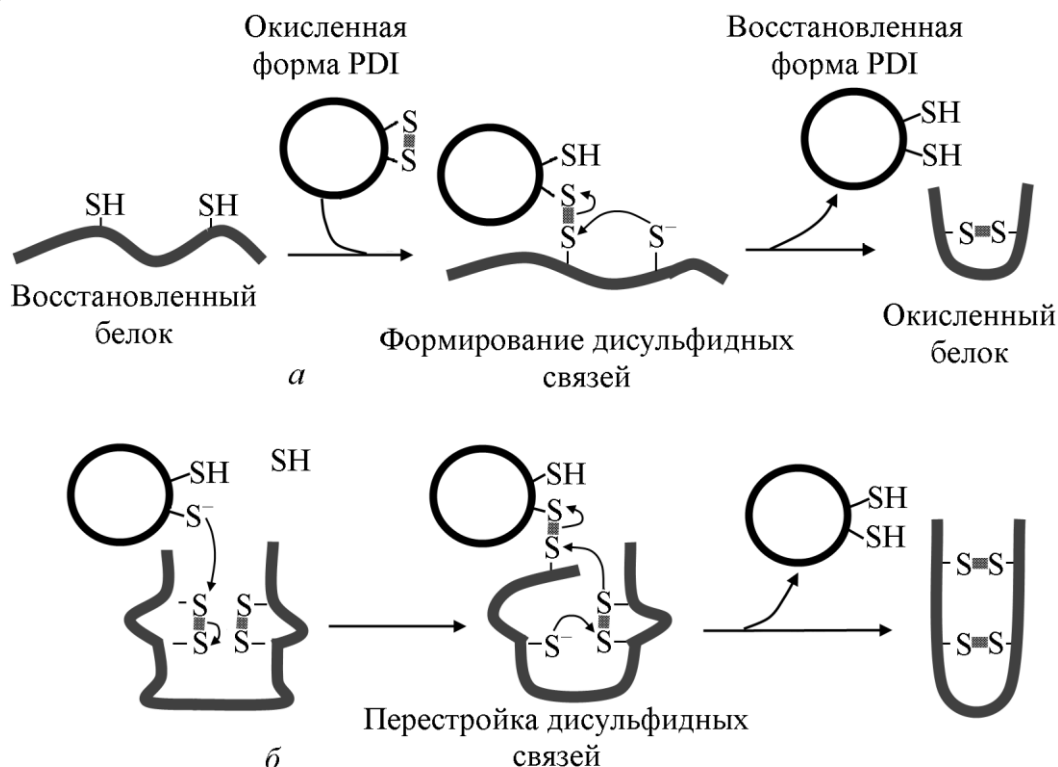


Рис. 7.3. Формирование (а) и перестройка (б) дисульфидных связей белка с участием дисульфидизомеразы (PDI)

Известно множество белков, полипептидная цепь которых пронизывает липидный бислой несколько раз. В таких белках содержится внутренний сигнальный пептид, который является сигналом начала переноса. При транслокации в данном случае транспортируется полипептидная петля между двумя гидрофобными сегментами. Оба этих сегмента в интегральном белке представляют собой α -спиральные мембраносвязанные домены. Для сложного трансмембранного белка, у которого липидный бислой пронизывает большое число гидрофобных α -спиралей, транслокация должна вновь запускаться вторым стартовым пептидом и продолжаться до тех пор, пока следующий стоп-сигнал переноса не прервет ее.

Большинство белков ЭР перед транспортировкой в аппарат Гольджи, лизосомы, плазматическую мембрану или внеклеточное пространство, подвергаются гликозилированию, т.е. ковалентному присоединению уг-

леводов. Связывание растущей полипептидной цепи с олигосахаридами происходит во время ее трансмембранного переноса. При этом к полипептидной цепи присоединяется олигосахарид, состоящий из 2 молекул N-ацетилглюкозамина, 9 молекул маннозы и 3 молекул глюкозы. Этот олигосахарид транспортируется в люмен ЭР из цитоплазмы с участием липида долихола. Связывание олигосахарида с полипептидной цепью осуществляется через аминокруппу аспарагинового аминокислотного остатка, поэтому этот олигосахарид называют N-связанным или аспарагин-связанным. Каждый аспарагиновый остаток связывается с олигосахаридным комплексом, с помощью фермента олигосахаридтрансферазы, являющегося интегральным белком мембран ЭР. Сигналами для N-гликозилирования служат две последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr (где X – любая аминокислота, кроме пролина). Гликозилированию подвергаются как растворимые, так и мембранные белки, синтезированные в ЭР. В люмене ЭР от олигосахаридных остатков синтезированных белков отсоединяются молекулы глюкозы. В конечном итоге все белки имеют одинаковые олигосахаридные цепи, состоящие из двух молекул N-ацетилглюкозамина, шести молекул маннозы. Можно сказать, что важнейшей функцией ЭР, вне зависимости от специализации или тканевой принадлежности клеток, является образование новых клеточных мембран, так как на мембране ЭР синтезируются мембранные белки и липиды.

7.3. ФУНКЦИИ МЕМБРАН АППАРАТА ГОЛЬДЖИ

Основу аппарата Гольджи (АГ) составляют мембранные структуры, называемые диктиосомами. В диктиосоме плотно друг к другу (на расстоянии 20-25 нм) расположены в виде стопки плоские мембранные мешки, или цистерны диаметром около 1 мкм. В одной диктиосоме может быть 20 таких мешков. Если диктиосомы связаны между собой каналами в единую трехмерную систему, то такая структура АГ называется сетчатой. Если диктиосомы не связаны между собой, то такая структура АГ называется диффузной.

С диктиосомой всегда ассоциирована масса мелких (диаметром около 60 нм) пузырьков, ограниченных мембраной. Они группируются на стороне, примыкающей к ЭР, а также по периферии стопки вблизи расширенных краев каждой цистерны. Эти пузырьки (пузырьки Гольджи) переносят белки и липиды в АГ, транспортируют их из него и между остальными цистернами. В зоне диктиосомы принято различать проксимальный или формирующийся, *цис*-участок, и дистальный или зрелый, *транс*-участок (рис. 7.4). *Цис*-участок тесно связан с элементами ЭР; *транс*-участок расширяется, образуя трубчатый ретикулум, называемый *транс*-сетью Гольджи. В *транс*-сети происходит разделение и сортировка секре-

тируемых продуктов. Белки и липиды в составе небольших пузырьков попадают в диктиосому с *цис*-стороны, а покидают ее, перемещаясь в различные компартменты, вместе с пузырьками, образующимися на *транс*-стороне. Переходя из одной стопки Гольджи в другую, эти молекулы претерпевают последовательные серии модификаций.

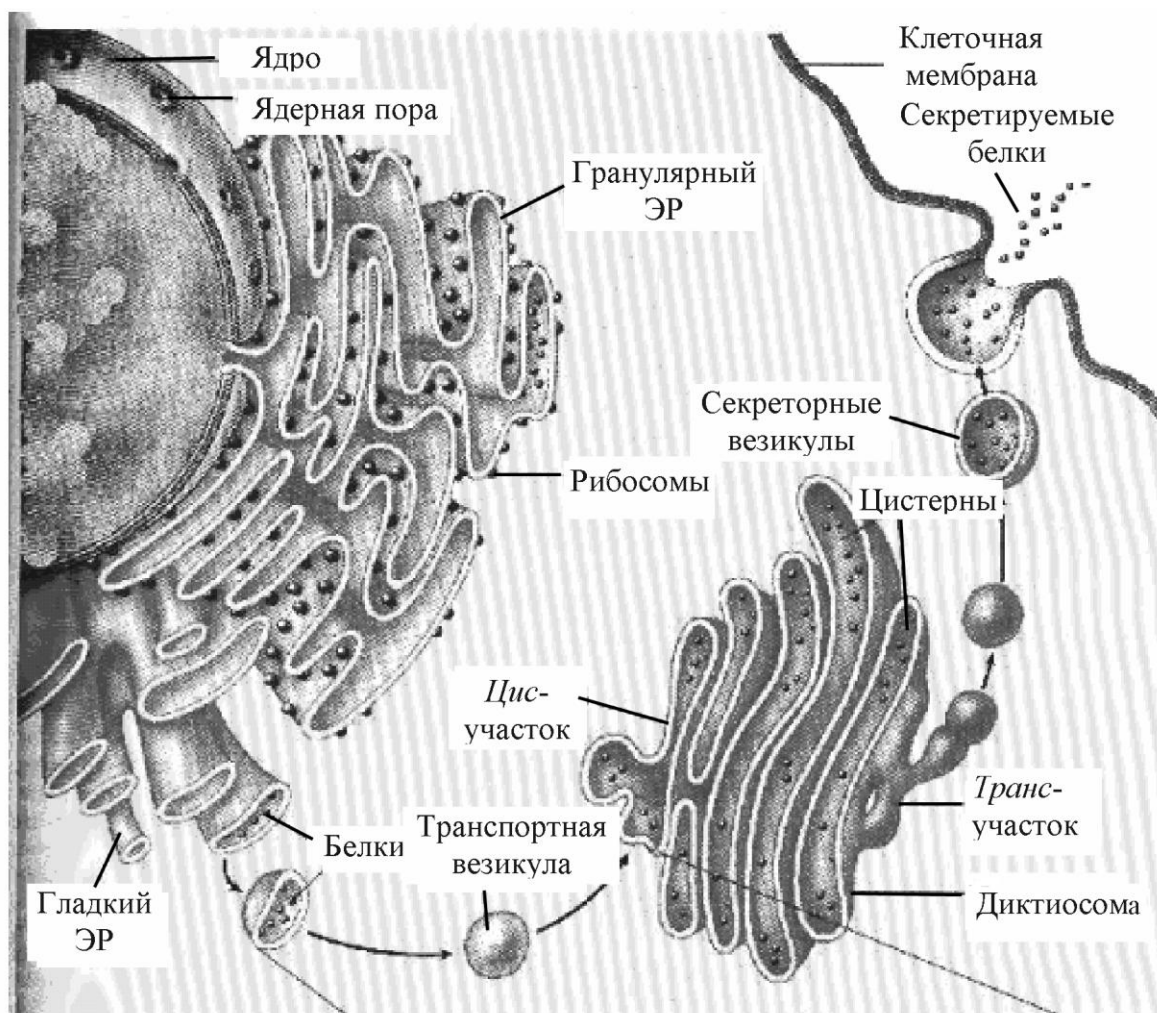


Рис. 7.4. Эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и внутриклеточный транспорт белков

В *цис*-участке аппарата Гольджи начинается вторичная модификация олигосахаридных цепей белков, поступающих в АГ после первичного гликозилирования в ЭР. Богатые маннозой олигосахариды на гидролитических ферментах, направляемых в лизосомы, фосфорилируются, а олигосахариды белков, направляемых в секреторные гранулы или к плазматической мембране, подвергаются сложным превращениям, в которых они теряют ряд сахаров и присоединяют галактозу, N-ацетилглюкозамин и сиаловые кислоты. Каждый такой олигосахарид состоит из сердцевины, сформированной из исходного N-связанного олигосахарида и концевой

области, состоящей из варьiruемого числа трисахаридов (N-ацетилглюкозамин-галактоза-сиаловая кислота), присоединенных к сердцевинным остаткам маннозы.

Такие превращения олигосахаридов осуществляются с помощью мембранных ферментов – гликозидаз и гликозилтрансфераз, которые работают в строго определенной последовательности. Каждая цистерна представляет собой отдельный компартмент, со своим собственным набором ферментов, а вся стопка, таким образом, образует ячейку многостадийного процессинга. Белки модифицируются последовательно, по мере того, как они перемещаются из цистерны в цистерну. Так в *цис*-участке происходит фосфорилирование манноз. В средней части диктиосом протекает вторичное гликозилирование секреторных белков: дополнительное удаление маннозы и присоединение N-ацетилглюкозамина. В *транс*-участке к олигосахаридной цепи присоединяются галактоза и сиаловые кислоты. Из *транс*-компартмента белки попадают в *транс*-сеть Гольджи; где они распределяются в различные транспортные пузырьки и переносятся к пунктам конечного назначения – плазматической мембране, лизосомам или секреторным пузырькам.

В аппарате Гольджи ряда специализированных клеток происходит синтез и связывание полисахаридов с белками с образованием протеогликанов. Присоединение полисахаридов к белкам осуществляется через сериновые и треониновые остатки (О-гликозилированием). В аппарате Гольджи происходит также сульфатирование гликозаминогликанов и некоторых белков.

В *транс*-участке АГ происходит разделение белков и их сортировка. Рассмотрим принцип отбора отдельных белковых молекул на примере сортировки лизосомных ферментов. Белки-предшественники лизосомных гидролаз связаны со специфическими олигосахаридами, содержащими маннозо-6-фосфатные звенья. Мембраны *транс*-сети АГ содержат трансмембранный маннозо-6-фосфатный рецептор, который узнает фосфорилированные маннозные группировки олигосахаридной цепи лизосомных ферментов и связывается с ними. Связывание происходит внутри цистерн *транс*-сети при нейтральных значениях pH. На мембранах АГ маннозо-6-фосфатные рецепторы образуют кластеры, которые концентрируются в зонах образования мелких пузырьков, покрытых белком клатрином. В *транс*-сети АГ происходит отделение пузырьков и дальнейший перенос к лизосомам. Таким образом, маннозо-6-фосфатные рецепторы, связываясь с лизосомными гидролазами, отделяют их от других белков (например, секреторных, нелизосомных) и концентрируют их в окаймленных пузырьках. Отрываясь от *транс*-сети, пузырьки сливаются с лизосомами, перенося связанные с мембранными рецепторами ферменты в эту везику-

лу. Внутри лизосом из-за активности протонного насоса значение pH составляет 5,0 единиц. При pH 6,0 и ниже лизосомные ферменты отделяются от белка-рецептора и расщепляют поглощенный материал, содержащийся в лизосомах. Участки же мембран вместе с маннозо-6-фосфатными рецепторами возвращаются путем рециклизации мембранных пузырьков обратно в *транс*-сеть АГ. Опосредованный рецепторами транспорт лизосомных гидролаз из АГ к лизосомам аналогичен эндоцитозу внеклеточных молекул, направляющему их от плазматической мембраны в эндосомы. В обоих случаях рецепторы собираются в покрытых клатрином участках мембраны (называемых окаймленными ямками); эти участки отделяются от мембраны, образуя покрытые клатрином окаймленные пузырьки. Пузырьки доставляют затем лиганд к следующему компартменту, имеющему закисленную среду, и оттуда рецепторы возвращаются в исходную мембрану. Вероятнее всего, что та часть белков, которая накапливается в секреторных вакуолях и выводится из клетки после поступления сигнала, проходит такую же процедуру сортировки на рецепторах *транс*-цистерн аппарата Гольджи.

7.4. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА

Многие белки транспортируются между внутриклеточными органеллами в составе транспортных пузырьков или везикул, отсоединяющихся от одного компартмента, мембрана которого названа донорной, и сливающихся с другим компартментом, мембрана которого названа акцепторной. Такой вид транспорта называется везикулярным транспортом. Рассмотрим основные механизмы, лежащие в основе отсоединения и слияния транспортных везикул.

При формировании транспортных везикул отсоединение везикулы от донорной мембраны осуществляется за счет полимеризации растворимых белковых комплексов на поверхности мембраны со стороны цитозоля. Полимеризация белковых комплексов на поверхности мембраны первоначально приводит к изгибу мембраны, а затем после завершения полимеризации – к отсоединению окаймленного белковым слоем транспортного пузырька. Выделяют три типа транспортных везикул, различающихся окаймляющими белковыми слоями: 1) везикулы, покрытые комплексом COPI (COP – coated proteins); 2) везикулы, покрытые комплексом COPII; 3) везикулы, покрытые клатрином. Везикулы первого типа транспортируют белки между цистернами АГ и от АГ к ЭР. Везикулы второго типа транспортируют белки от ЭР к АГ. Везикулы третьего типа транспортируют вещества от плазматической мембраны и от *транс*-сети АГ к эндосомам.

Формирование белкового слоя на поверхности везикулы осуществляется с помощью ГТФ-связывающих белков. В везикулах, покрытых клатрином и COPI, сборка поверхностных комплексов регулируется ГТФ-связывающим белком ARF. В везикулах, порывтых COPII, сборка поверхностных комплексов регулируется ГТФ-связывающим белком Sar1. Белки ARF и Sar1 принадлежат суперсемейству малых ГТФаз, которые также как и G-белки, могут быть в неактивной ГДФ-связывающей форме и активной ГТФ-связывающей форме белка.

Рассмотрим формирование транспортных везикул на примере отсоединения покрытых COPII везикул в ЭР (рис. 7.5).

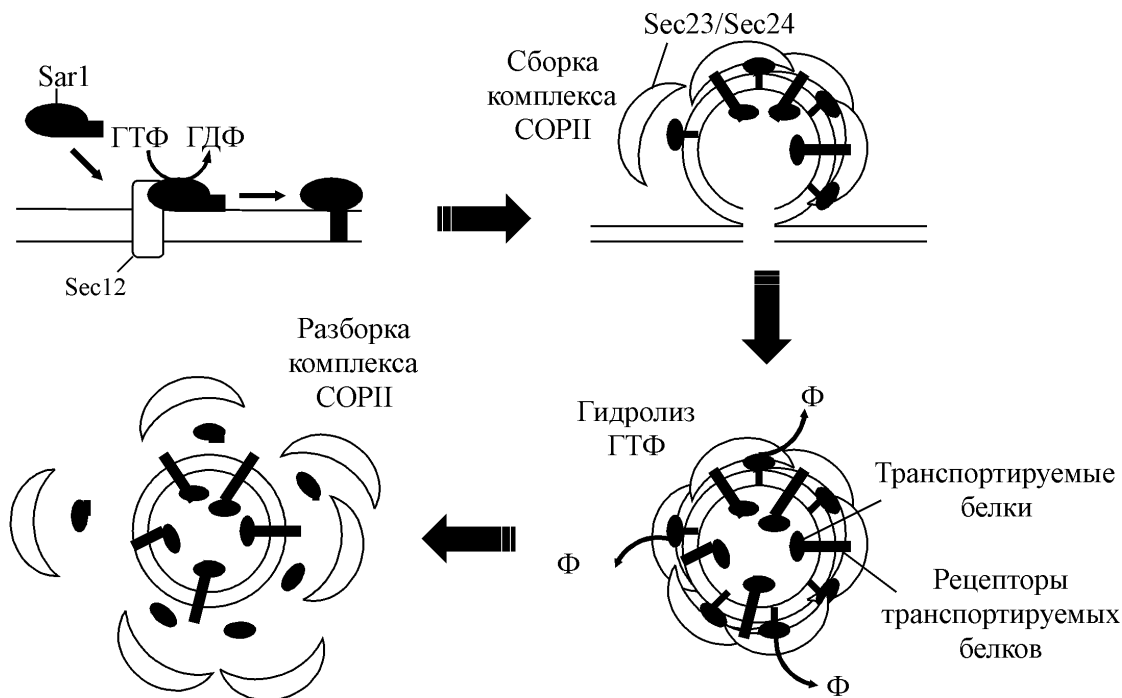


Рис. 7.5. Образование везикул в эндоплазматическом ретикулуме

На первой стадии мембранный белок Sec12 (фактор обмена ГДФ/ГТФ) катализирует обмен молекулы ГДФ на молекулу ГТФ в нуклеотидсвязывающем центре белка Sar1. Вероятно, активация Sec12 запускается связыванием транспортируемых белков со своими рецепторами. Связывание ГТФ с белком Sar1 вызывает изменение конформации последнего, в результате чего на поверхности белка появляются гидрофобные участки, и комплекс Sar1-ГТФ связывается с мембраной ЭР. Связанный с мембраной комплекс Sar1-ГТФ запускают полимеризацию из гетеродимеров Sec23 и Sec24 цитозольного комплекса COPII. В результате полимеризации COPII от мембраны отсоединяется везикула, покрытая белковым комплексом. После отсоединения везикулы Sar1 гидролизует ГТФ, переходит в неактивную форму и отсоединяется от мембраны. Данный процесс активирует

разборку COPII комплекса. Отделившиеся от ЭР везикулы транспортируются с помощью микротрубочек к *цис*-зоне аппарата Гольджи, где и сливаются с его мембранами.

Процесс слияния везикул с другими мембранами происходит с участием специальных белков SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor). После деполимеризации окаймляющего слоя COP II на поверхности везикулы интегральные мембранные белки v-SNARE становятся доступными для связывания. Эти белки специфичны для каждого типа везикул. Мембраны аппарата Гольджи содержат белки t-SNARE и SNAP-25. В местах взаимодействия этих двух групп белков и происходит слияние мембран.

Процесс слияния мембран управляется ГТФ-связывающим белком Rab. Аналогично другим ГТФазам активация Rab происходит при образовании комплекса белка с ГТФ в результате обмена ГДФ на ГТФ в нуклеотид-связывающем центре белка. Связывание Rab с ГТФ индуцирует конформационные изменения структуры белка, в результате которых комплекс Rab-ГТФ прикрепляется к мембране везикулы и взаимодействует с белками-эффекторами Rab, расположенными на акцепторной мембране. После слияния мембраны везикулы с акцепторной мембраной Rab-ГТФ гидролизует ГТФ, переходит в неактивную форму Rab-ГДФ и отсоединяется от мембраны. Для каждого типа везикул слияние управляется своим типом Rab-белка и белка-эффектора Rab. В регуляции транспорта от ЭР к АГ участвует Rab1 и его эффектор белок p115.

Аналогичные механизмы обеспечивают слияние и отсоединение везикул от плазматической мембраны. Плазматическая мембрана клетки не содержит транспортных систем для макромолекул, поэтому перенос макромолекул осуществляется с помощью везикул. Везикулярный перенос можно разделить на два вида: экзоцитоз – вынос из клетки молекулярных продуктов, и эндоцитоз – поглощение клеткой крупных частиц, макромолекул и водных растворов разных веществ.

С экзоцитозом связано выделение синтезированных в клетке разнообразных низкомолекулярных (ацетилхолин, биогенные амины и др.) и высокомолекулярных (пептиды, липопротеиды, пептидогликаны и др.) соединений. Экзоцитоз в большинстве случаев происходит в ответ на внешний сигнал (нервный импульс, гормоны, медиаторы и др.). В ряде случаев экзоцитоз происходит постоянно, например, при секреции фибронектина и коллагена фибробластами.

Рассмотрим молекулярный механизм слияния мембран везикул с плазматической мембраной, (рис. 7.6). Секреторные везикулы содержат белок v-SNARE, известный как VAMP (vesicle-associated membrane protein). Плазматическая мембрана содержит интегральный белок t-SNARE,

называемый синтаксином, и периферический белок SNAP-25. Цитозольные α -спиральные участки этих белков (один из VAMP, один из синтаксина и два из SNAP-25) формируют устойчивый четырехспиральный пучок. Устойчивость данных SNARE-комплексов обеспечивается многочисленными нековалентными межмолекулярными взаимодействиями, возникающими в результате специфического расположения гидрофобных и заряженных аминокислотных участков. Гидрофобные участки находятся в центре пучка, а положительно заряженные и отрицательно заряженные аминокислотные остатки располагаются в спиральях друг напротив друга. Формирование SNARE-комплекса сближает везикулярную и плазматическую мембрану и приводит к слиянию двух мембран.

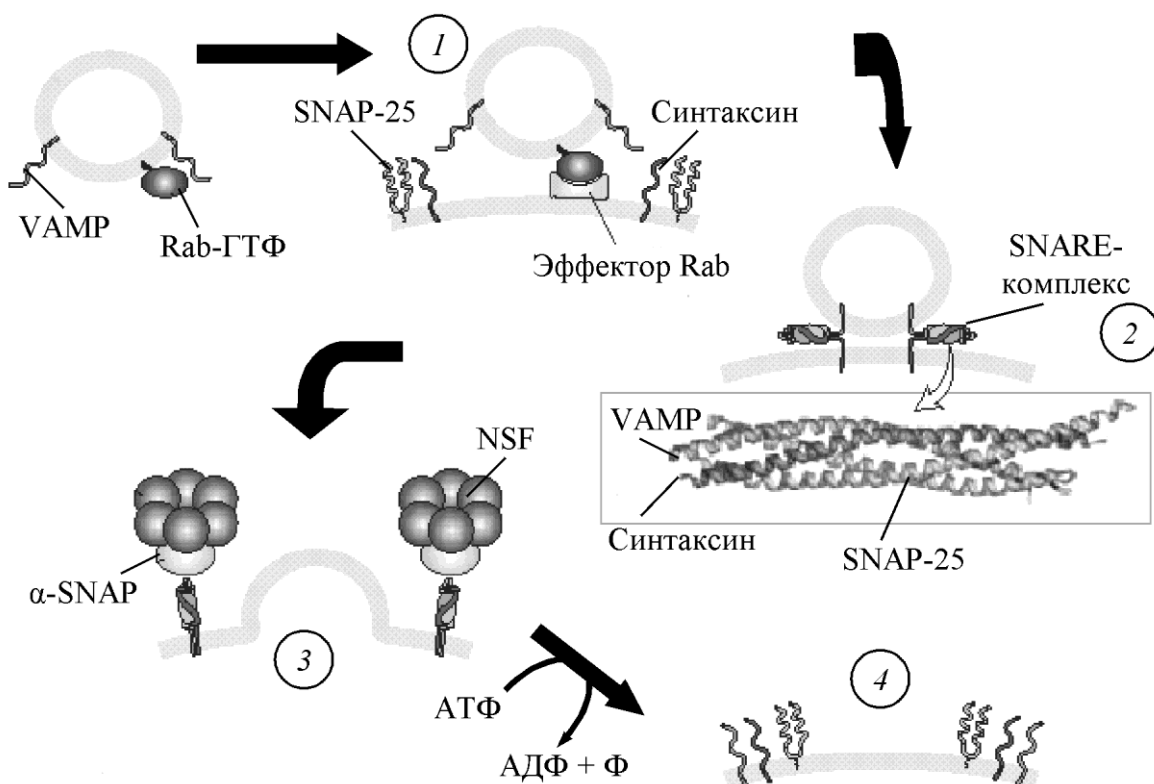


Рис. 7.6. Слияние везикул с акцепторной мембраной:

1 – закрепление везикулы на акцепторной мембране с участием Rab-ГТФ и белка эф- фектора Rab; 2 – образование SNARE-комплекса; 3 – слияние мембрана и связывание белков NSF и α -SNAP; 4 – диссоциация SNARE-комплекса

Диссоциация SNARE-комплекса происходит с затратой энергии и при участии дополнительных белков. Белки, участвующие в диссоциации SNARE-комплекса, называются α -SNAP (soluble NSF attachment protein) и NSF (NEM sensitive factor). Название белка NSF связано с тем фактом, что функции белка *in vivo* блокируются N-этилмалеимидом (NEM – N-ethylmaleimide) – химическим агентом, взаимодействующим с сульфгидриль-

ными группами белков. Комплекс NSF- α -SNAP связывается с SNARE-комплексом, после чего NSF гидролизует АТФ, высвобождая необходимую для диссоциации комплексов энергию.

Эндоцитоз формально разделяют на фагоцитоз и пиноцитоз. Фагоцитоз – захват и поглощение клеткой крупных частиц (иногда даже клеток или их частей). Пиноцитоз вначале определялся как поглощение клеткой воды или водных растворов разных веществ. Сейчас известно, что как фагоцитоз, так и пиноцитоз протекают очень сходно, и поэтому употребление этих терминов может отражать лишь различия в объемах и массе поглощенных веществ. Общее для этих процессов то, что поглощаемые вещества на поверхности плазматической мембраны окружаются частью мембраны в виде везикулы, которая затем перемещается внутрь клетки.

Процесс образования везикул при эндоцитозе протекает также как и отсоединение везикул в ЭР. При эндоцитозе образуются везикулы, окаймляющий слой которых состоит в основном из белка клатрина, ассоциированного с комплексами адаптерного белка (adapter protein complex). Три полипептидные цепи клатрина образуют структуру трискелиона (от греч. – трехногий). Клатриновые трискелионы на внутренней поверхности ямок плазматической мембраны образуют рыхлую сеть. В отделении эндосомы участвуют также ГТФ-связывающие белки – динамины, которые после связывания ГТФ полимеризуются вокруг шейки отделяющегося пузырька. После того, как окаймленный пузырек отделяется от плазматической мембраны, клатриновый слой распадается.

Дальнейшая судьба везикул может быть различной, часть из них может возвращаться к поверхности клетки и сливаться с ней, но большая часть вступает в процесс внутриклеточного расщепления макромолекул. Первичные эндосомы содержат в основном захваченные в жидкой среде чужеродные молекулы и не содержат гидролитических ферментов. После потери клатринового слоя эндосомы начинают сливаться друг с другом, при этом увеличиваясь в размере. Они сливаются затем с первичными лизосомами.

Эндосомы характеризуются более низким значением рН (рН 4–5), то есть более кислой средой, чем другие клеточные вакуоли. Это связано с наличием в их мембранах H^+ -АТФазы – протонного насоса, закачивающего протоны внутрь эндосом. Кислая среда внутри эндосом играет решающую роль в диссоциации рецепторов и лигандов. Кроме того, кислая среда является оптимальной для активации гидролитических ферментов в лизосомах. Эти ферменты активируются при слиянии лизосом с эндосомами, что приводит к образованию эндолизосом, в которых и происходит расщепление поглощенных макромолекул.

Интенсивность эндоцитоза зависит от типа клеток. Так, в клетке эпи-

теля тонкого кишечника образуется до 1000 везикул в секунду, а в макрофагах в минуту образуется порядка 125 везикул. Расходуемая на образование внутриклеточных везикул плазматическая мембрана восстанавливается за счет слияния с везикулами в процессе экзоцитоза. В результате этих процессов плазматическая мембрана быстро обновляется. Так, у макрофагов вся плазматическая мембрана заменяется за 30 минут, у фибробластов – за два часа.

При фагоцитозе крупных частиц или отдельных клеток в образовании везикул участвуют двигательные белки актин и миозин. На поверхности клеток, способных к фагоцитозу (у млекопитающих это нейтрофилы и макрофаги), существует набор рецепторов, взаимодействующих с белками-лигандами на поверхности клеток мишеней. Связывание лигандов с рецепторами активирует процесс передачи сигнала от мембраны клеток к актиновому цитоскелету. Основными участниками внутриклеточной передачи сигнала являются Rho-подобные ГТФазы, функционирующие, подобно другим членам суперсемейства малых ГТФаз, как бинарные переключатели. С их участием регулируется полимеризация и деполимеризация актиновых волокон, транслокация которых внутри клеток осуществляется молекулами миозина.

7.5. ЯДЕРНАЯ ОБОЛОЧКА

От цитоплазмы ядро отделено ядерной оболочкой, образованной за счет расширения и слияния друг с другом цистерн эндоплазматической сети. Ядерная оболочка состоит из двух мембран, внешней и внутренней. Полость ядерной оболочки называется перинуклеарным пространством. Внешняя мембрана ядерной оболочки, непосредственно контактирующая с цитоплазмой клетки, имеет ряд структурных особенностей, позволяющих отнести ее к мембранной системе эндоплазматического ретикулума. Так, на внешней ядерной мембране обычно располагается большое количество рибосом. Эти рибосомы синтезируют как мембранные, так и секретируемые белки, которые могут транспортироваться в перинуклеарное пространство и полости ЭР. Наряду с этим внешняя ядерная мембрана и мембрана эндоплазматического ретикулума близки по составу липидов и белков, что, возможно, и определяет их общие биохимические функции.

Внутренняя мембрана ядерной оболочки структурно связана с жесткой белковой структурой – ламиной, к которой прикреплены нити хромосомной ДНК. Ламина сформирована последовательностью одинаково ориентированных промежуточных филаментов, называемых ламинами. В клетках позвоночных она формируется в основном из ламина А, ламина В и ламина С. Ламины прикрепляются к внутренней мембране ядерной оболочки при помощи заякоренных в ней трансмембранных белков – рецеп-

торов ламинов. В некоторых местах внутренняя и внешняя мембраны ядерной оболочки сливаются и образуют так называемые ядерные поры, через которые осуществляется транспорт молекул из ядра в цитоплазму и в обратном направлении. Ядерные поры имеют сложную структуру, организованную несколькими десятками специализированных белков – нуклеопоринов.

Белковая составляющая ядерной поры обозначается термином «ядерный поровый комплекс» (ЯПК). Комплекс ядерной поры представляет собой надмолекулярную структуру с массой более 125 МДа. Внешний диаметр порового комплекса составляет около 100 нм, а высота – 75 нм. На рис. 7.7. изображена схема строения ядерного порового комплекса.

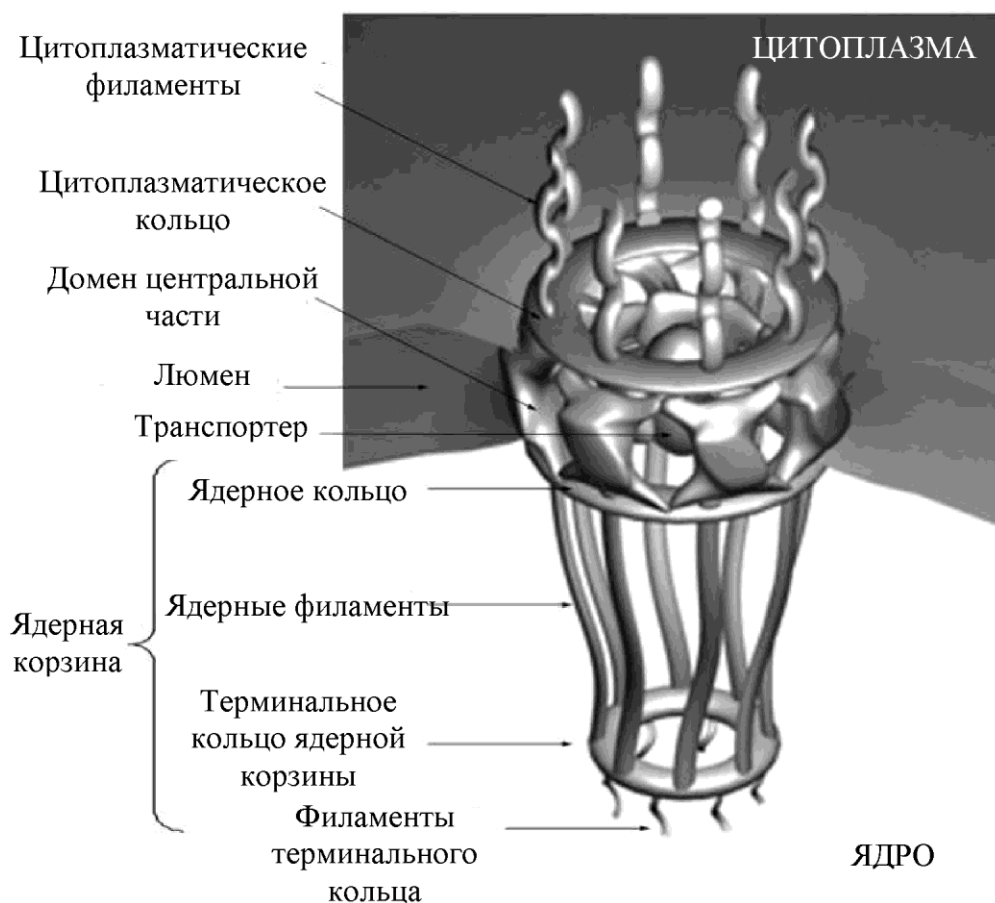


Рис. 7.7. Схема строения ядерного порового комплекса

Проницаемый для молекул канал располагается в центре структуры. ЯПК связан с ядерной оболочкой с помощью трансмембранной части, от которой к просвету канала обращены структуры, получившие название спиц (по аналогии со спицами колеса). Эта основная часть поры, построенная из восьми доменов, с цитоплазматической и ядерной сторон ограничена соответственно цитоплазматическим и ядерным кольцами (у низших эукариот они отсутствуют). К ядерному кольцу прикреплены белко-

вые направленные внутрь ядра ядерные филаменты, к концам которых крепится терминальное кольцо. Вся эта структура носит название ядерной корзины. К цитоплазматическому кольцу также прикреплены направленные в цитоплазму филаменты. В центре цилиндрической фигуры комплекса содержится транспортер. Считается, что транспортер состоит из множества белковых филаментов, обогащенных аланином и глицином (FG-филаменты).

Комплекс закрепляется в ядерной мембране с помощью интегральных гликопротеинов gp 210 и POM 121. Структурная организация ЯПК у всех высших организмов, включая человека, птиц, амфибий, насекомых и высших растений, сходна и является высоко консервативной. Плотность расположения пор в ядерной оболочке варьирует в среднем от 13 до 30 пор на 1 мкм^2 поверхности ядра, достигая 5000 пор на одно ядро в ооцитах лягушки и ранних эмбрионах дрозофилы. Число ядерных пор зависит от типа клетки, метаболической активности и стадии клеточного типа.

Молекулярный обмен между ядром и цитоплазмой осуществляется в результате ядерно-цитоплазматического транспорта. Ионы и молекулы размером меньше 9 нм и молекулярным весом менее 60 кДа перемещаются через ядерную пору в результате пассивной диффузии через узкие каналы (зазоры) между индивидуальными компонентами поры. Транспорт остальных молекул через ЯПК является активным и требует энергетических затрат.

Системы активного транспорта обеспечивают весь макромолекулярный обмен между ядром и цитоплазмой. Молекулы РНК, синтезируемые в ядре, поступают через поры в цитоплазму, а в ядро попадают белки, участвующие в ядерном метаболизме. Белки, транспортируемые в ядро, имеют специальный сигнал сортировки – сигнал ядерной локализации (NLS – nuclear localization signal), который узнается рецепторами ядерных пор. Сигнальный участок полипептидной цепи содержит положительно заряженные аминокислотные остатки аргинина и лизина. Такие NLS характерны для кариофильных белков, т. е. для белков ядерной локализации, которые синтезируются на рибосомах в цитоплазме, а затем транспортируются в ядро.

Транслокация белков в ядро в отличие от транслокации в митохондрии и эндоплазматический ретикулум не сопровождается отщеплением этой сигнальной аминокислотной последовательности и разворачиванием полипептидной цепи. NLS-содержащие белки, как и все другие субстраты систем ядерного транспорта, переносятся в ядро в комплексе со специальными белками – транспортными или кариоферинами. Транспортные, участвующие в транспорте в ядро, называются импортинами, а из ядра – экспортинами. Транспортные (импортин α , импортин β и др. белки) иг-

рают роль рецепторных белков, которые через адапторные белки или напрямую связываются с сигнальными участками транспортируемой молекулы.

Регуляция транспорта белков через ядерные мембраны осуществляется с помощью белков Ran, относящихся к семейству Ras-подобных ГТФаз. Фактор обмена нуклеотидов (GEF – GTPase exchange factor) для Ran, хроматин-связывающий белок RCC1, локализован в ядре, а активатор ГТФазной активности RanGAP1 (GAP – GTPase activation protein) – в цитоплазме. Эта асимметричная локализация регуляторов активности Ran приводит к неравномерному распределению нуклеотидсвязывающих форм белка: в ядре находится преимущественно Ran-ГТФ (ГТФ-связывающая форма Ran), в цитоплазме, наоборот, Ran-ГДФ (ГДФ-связывающая форма). Ran регулирует как процессы импорта, так и процессы экспорта различных субстратов. Процесс циркуляции Ran между ядром и цитоплазмой носит название ГТФазного цикла Ran.

Импорт начинается с того, что транспортируемый в ядро белок связывается с гетеродимером рецептора, то есть с импортинами α и β , локализованными в цитоплазме (рис. 7.8). Затем образовавшийся комплекс закрепляется на цитоплазматических филаментах ядерного порового комплекса и транслоцируется через канал в ядро, где с ним связывается Ran-ГТФ, что вызывает диссоциацию комплекса и высвобождение белка. После чего импортины в комплексе с Ran-ГТФ направляются обратно в цитоплазму, где Ran под действием RanGAP1 гидролизует ГТФ. Комплекс Ran-ГДФ-импортины α/β нестабилен и диссоциирует. Ran-ГДФ поступает обратно в ядро при помощи собственного переносчика, белка-димера NTF2. В ядре под действием белка RanGEF, ГДФ в активном центре Ran заменяется на ГТФ и образуется активная форма Ran-ГТФ.

Из ядра в цитоплазму также существует поток как белков, так и ядерных транскриптов в виде рибонуклеопротеидов (рис. 7.9). В принципе этот экспорт по своей организации сходен с процессом импорта ядерных белков. Одна и та же пора может принимать участие как в импорте, так и в экспорте макромолекул. Из ядра транспортируются макромолекулы, содержащие сигнал сортировки – сигнал ядерного экспорта (NES - nuclear export signal), образованный последовательностью гидрофобных аминокислот.

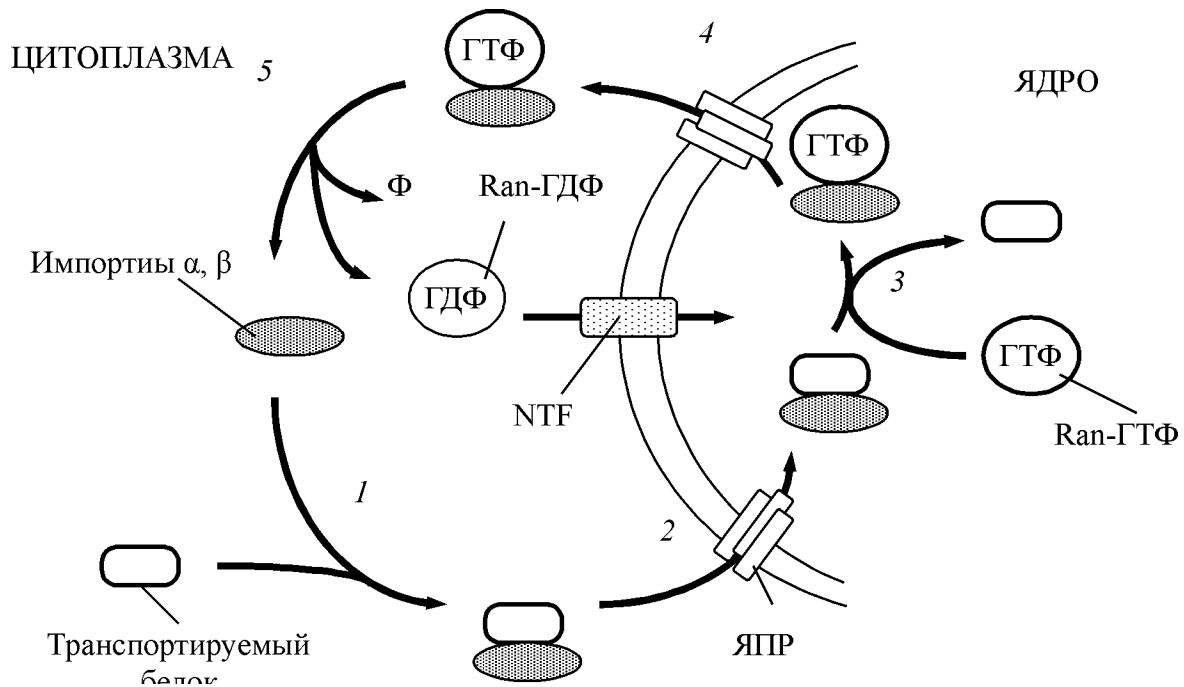


Рис. 7.8. Схема транспорта белков в ядро:

1 – связывание транспортируемого в ядро белка с импортинами; 2 – транслокация комплекса через ядерную мембрану с участием ЯПР; 3 – диссоциация комплекса в результате связывания импортинов с Ran-ГТФ; 4 – экспорт образовавшегося комплекса Ran-ГТФ-импортины в цитоплазму; 5 – гидролиз ГТФ и диссоциация комплекса Ran-ГТФ-импортины

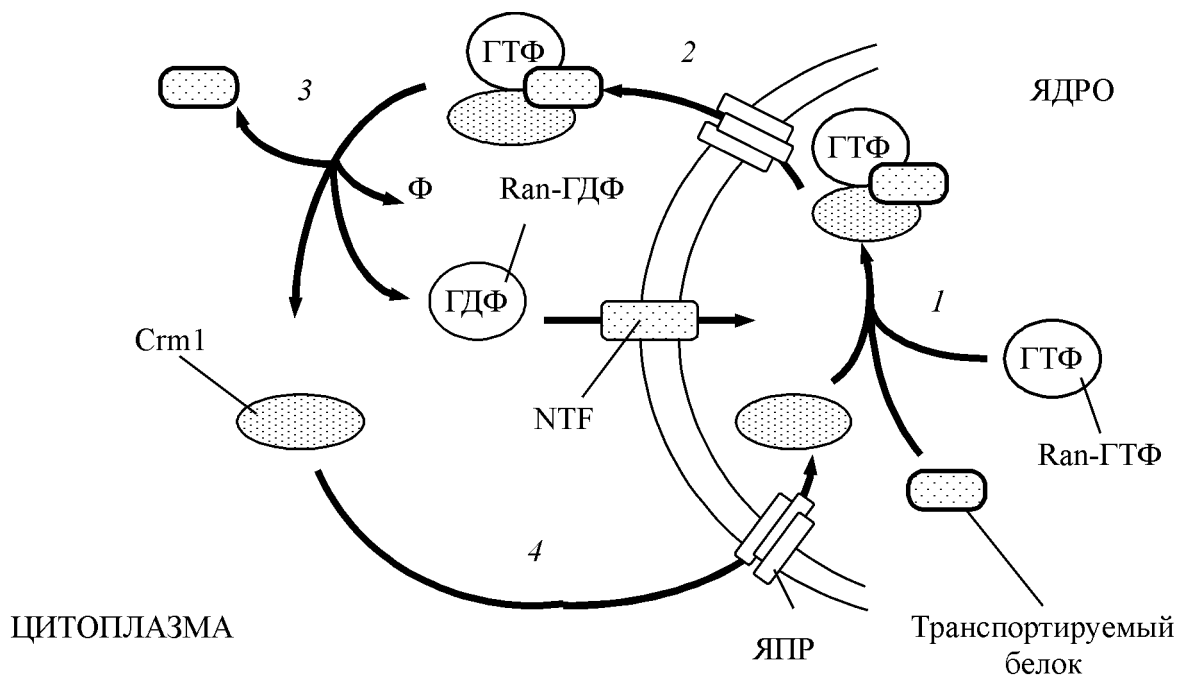


Рис. 7.9. Схема транспорта белков из ядра:

1 – образование комплекса транспортируемого белка с экспортином и Ran-ГТФ; 2 – транслокация комплекса через ядерную мембрану с участием ЯПР; 3 – гидролиз ГТФ и диссоциация комплекса; 4 – импорт экспортина в ядро

Первой стадией транспортировки здесь также является рецепция субстрата специфическим экспортином Crm1 (chromosome region maintenance) и образование комплекса, в состав которого также входит Ran-ГТФ. После прохождения через ядерную пору в цитоплазму Ran расщепляет ГТФ, комплекс теряет стабильность и диссоциирует, высвобождая транспортируемый белок. Экпортин и Ran после гидролиза ГТФ снова возвращаются в ядро.

7.6. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ ЛИЗОСОМ

Лизосомы – это органеллы диаметром 0,1–2,0 мкм, основная функция которых заключается в расщеплении клеточных компонентов и макромолекул. Обычно клетка содержит несколько сотен лизосом. Процесс образования лизосом аналогичен процессу образования секреторных везикул. Основным отличием лизосом от секреторных везикул является набор гидролаз, позволяющий лизосомам участвовать в процессах внутриклеточного расщепления как экзогенных, так и эндогенных биологических макромолекул. Лизосомы содержат около 60 типов гидролаз (протеиназы, нуклеазы, гликозидазы, фосфорилазы, фосфатазы, сульфитазы), максимальная активность которых достигается при pH 5,0.

В мембране лизосом находятся АТФ-зависимые протонные насосы – H^+ -АТФазы, при функционировании которых на мембране лизосом создается электрохимический градиент протонов. Внутренняя среда лизосом имеет pH 5,0, в то время как в цитоплазме pH 7,0–7,3. При pH, характерных для цитоплазмы, лизосомные ферменты обладают низкой активностью. Очевидно, это служит механизмом защиты клеток от самопереваривания в том случае, если лизосомный фермент случайно попадает в цитоплазму. Кроме того, липиды и белки лизосомной мембраны содержат олигосахариды, которые, как предполагается, препятствуют взаимодействию лизосомных ферментов с мембранами лизосом.

Среди различных по морфологии лизосомных частиц можно выделить, по крайней мере, четыре типа: первичные лизосомы, вторичные лизосомы, аутофагосомы и остаточные тельца. Первичные лизосомы представляют собой мелкие мембранные пузырьки размером около 0,1 мкм, отщепляющиеся от аппарата Гольджи. В дальнейшем первичные лизосомы сливаются с фагоцитарными или пиноцитарными везикулами, образуя вторичную лизосому. При этом гидролазы первичной лизосомы получают доступ к субстратам эндоцитарной везикулы, которые они и расщепляют. Лизосомы могут сливаться друг с другом и таким путем увеличиваться в объеме, при этом усложняется их внутренняя структура. Поглощенные лизосомами биогенные вещества расщепляются гидролазами до мономеров, затем эти мономеры транспортируются в цитоплазму, где они вклю-

чаются в метаболические процессы.

Однако расщепление биогенных макромолекул внутри лизосом может идти в ряде клеток не до конца. В этом случае в полостях лизосом происходит накопление негидролизированных продуктов и переход вторичных лизосом в телолизосомы, или остаточные тельца. Телолизосомы удаляются из клетки путем экзоцитоза.

Аутолизосомы (аутофагосомы) по морфологическим признакам относят к вторичным лизосомам, но их отличие состоит в том, что в составе этих везикул встречаются фрагменты или даже целые цитоплазматические структуры, такие, как митохондрии, пластиды, элементы ЭР, рибосомы, гранулы гликогена и т.д.

7.7. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ ПЕРОКСИСОМ

Пероксисомы (называемые также микротельцами) являются небольшими органеллами (0,1–1,0 мкм), окруженными одинарной мембраной. Мембрана пероксисом отграничивает гранулярный матрикс. В центре матрикса часто, особенно в пероксисомах клеток печени, присутствуют кристаллоподобные структуры, состоящие из регулярно упакованных фибрилл или трубочек (рис. 7.10). Название органелл обусловлено наличием ферментов, связанных с метаболизмом пероксида водорода. Пероксисомы содержат ферменты окислительного дезаминирования аминокислот (уратоксидаза, оксидаза D-аминокислот).

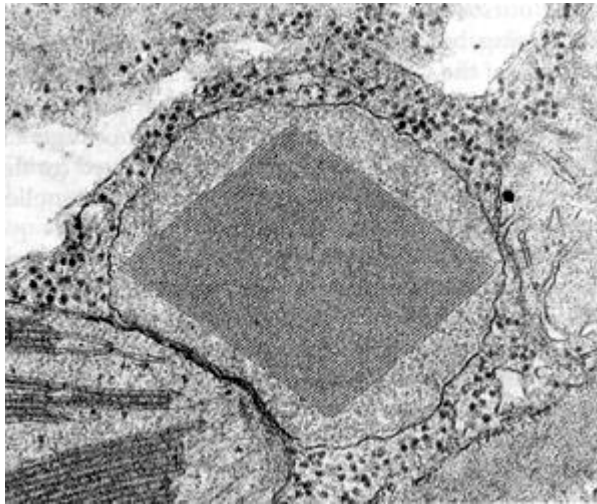
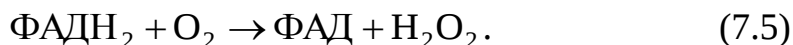


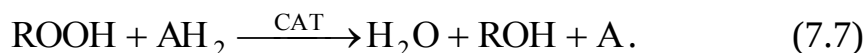
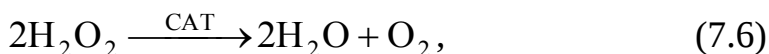
Рис. 7.10. Кристаллоподобные структуры в пероксисомах

Окислительное дезаминирование протекает в две стадии. На первой стадии аминокислота окисляется до неустойчивого промежуточного продукта – иминогруппы, при этом электроны переносятся на флавиновую группу катализирующего реакцию фермента. На второй стадии происходит спонтанное гидролитическое отщепление иминогруппы. Окисление

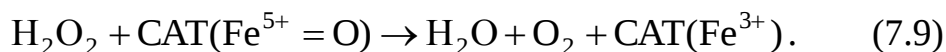
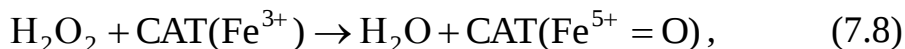
восстановленной простетической группы (ФАДН₂) катализирующих первую стадию ферментов происходит в присутствии кислорода и сопровождается образованием пероксида водорода (Н₂О₂):



В пероксисомах находится также каталаза, расщепляющая пероксид водорода. В пероксисомах печени каталаза составляет до 40 % всех белков и локализована в матриксе. Каталаза является тетрамерным ферментом, состоящим из 4 одинаковых субъединиц весом 60 кДа. Каждая субъединица содержит одно порфириновое кольцо и атом железа. Каталаза (САТ) взаимодействует с Н₂О₂, образуя воду и молекулярный кислород (7.6), и с этиловым спиртом, метиловым спиртом, фенолами или муравьиной кислотой, проявляя пероксидазную активность (7.7):



Взаимодействие пероксида водорода с ферментом индуирует переход каталазы в активированное состояние, называемое веществом I (САТ(Fe⁵⁺=O)). Каталитический механизм взаимодействия каталазы с Н₂О₂ протекает в 2 стадии:



Молекулы пероксида водорода входят в гемовую полость, где взаимодействует с аминокислотными остатками His⁷⁴ и Asn¹⁴⁷. В геме в молекуле пероксида происходит внутримолекулярный перенос протона. Удлиняется и поляризуется О–О связь, которая, в конечном итоге, разрывается при смещении пероксида водорода к железосодержащему центру. При этом образуется молекула воды и вещество I. В течение второй стадии вещество I восстанавливается с образованием молекулы воды и молекулы кислорода. Наряду с этим, вещество I может вступать в реакции с донорами водорода, такими как этиловый спирт, метиловый спирт или ртуть. Окисление этих субстратов происходит благодаря кислороду, присоединенному к молекуле каталазы. В этом процессе каталаза проявляет пероксидазную активность:



Этот тип окислительно-восстановительных реакций особенно важен в клетках печени и почек, пероксисомы которых обезвреживают множество ядовитых веществ, попадающих в кровоток.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Албертс, Б.* Молекулярная биология клетки: В 3 т. / Б. Албертс. М., 1994.
2. *Антонов, В. Ф.* Липиды и ионная проницаемость мембран / В. Ф. Антонов. М., 1982.
3. *Варфоломеев, С. Д.* Биокинетика / С. Д. Варфоломеев, К. Г. Гуревич. М., 1999.
4. Введение в мембранологию / под ред. А. А. Болдырева. М., 1990.
5. *Конев, С. В.* Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы / С. В. Конев. Мн.: Наука и техника, 1987.
6. *Котык, А.* Мембранный транспорт / А. Котык, К. Яначек. М.: Мир, 1980.
7. *Крутецкая, З. И.* Механизмы внутриклеточной сигнализации / З. И. Крутецкая, О.Е. Лебедев, Л.С. Курилова. Спб., 2003.
8. *Мартинович, Г. Г.* Окислительно-восстановительные процессы в клетках / Г. Г. Мартинович, С. Н. Черенкевич. Мн., 2008.
9. *Рубин, А. Б.* Биофизика: В 2 т. / А. Б. Рубин. М., 2000.
10. *Скулачев, В. П.* Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии / В. П. Скулачев. М., 1989.
11. *Хмельницкий, А. И.* Структура и свойства ионных каналов биологических мембран / А. И. Хмельницкий, Н. В. Василевская, С. Н. Черенкевич. Мн., 2004.
12. *Черенкевич, С. Н.* Транспорт веществ через биологические мембраны / С. Н. Черенкевич, А. И. Хмельницкий. Мн., 2007.
13. *Cooper, G. M.* The Cell: a molecular approach / G. M. Cooper, R. E. Hausman. Sinauer: Sunderland, MA, 2003.
14. *Gennis, R. B.* Biomembranes. Molecular structure and function / R. B. Gennis. N.Y., 1989.
15. *Gomperts, B. D.* Signal transduction / B. D. Gomperts, I. M. Kramer, P. Tatham. N.Y., 2003.
16. *Hunter, R. J.* Foundations of Colloid Chemistry / R. J. Hunter. Oxford, 1989. Vol. 1.
17. *Israelachvili, J.* Refinements of the fluid-mosaic model of membrane structure. // Biochim. Biophys. Acta. 1978.469:221-225.
18. *Israelachvili, J.* Intermolecular & Surface Forces / J. Israelachvili. London, 1992. Chap. 4.
19. *Jönsson, B.* In Electrostatic Effects in Soft Matter and Biophysics / ed. C. Holm. Amsterdam: Kluwer Academic Press, 2001.
20. *Katsaras, J.* Lipid Bilayers: Structure and Interactions / J. Katsaras, T. Gutberlet. Berlin, 2001.
21. *Lodish, H.* Molecular Cell Biology / H. Lodish [et al.]. N.Y., 2003.
22. *McIntosh, T. J.* In Phospholipids Handbook / T. J. McIntosh, A. D. Magid / ed. G. Cevc, N.Y., 1993.
23. *Nelson, D. L.* Lehninger Principles of Biochemistry / D. L. Nelson, M. Cox. N.Y., 2004.
24. *Pollard, T. D.* Cell Biology / T. D. Pollard, N.Y., 2007.