

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Основные принципы построения
мембранных липидных структур

Модельные мембраны

Молекулярная организация
биологических мембран

Биогенез мембран

Транспорт через мембраны

Характеристика отдельных
биологических мембранных систем

Каждая живая клетка окружена мембраной, которая обеспечивает внутри клетки необходимый «микроклимат», играет активную роль в поддержании ее жизнедеятельности, контролирует потоки веществ и ионов в клетку и из нее. Клеточная мембрана — сложная высокоорганизованная двумерная система, состоящая главным образом из липидов и белков.

Мембраны — важнейшая составная часть и клеточных компонентов — ядра, митохондрий, хлоропластов, лизосом и т. п. Как видно на рисунке 278, клетка (животная) весьма насыщена мембранными структурами, образующими, в сущности, разветвленную, четко организованную сеть. Отсюда понятна ключевая роль клеточных мембран в процессах биологической регуляции.

Исторический очерк. В 1665 г. изобретатель микроскопа англичанин Роберт Гук, изучая строение тонких срезов коркового дерева, назвал увиденные им замкнутые ячейки *клетками* (cellulae). Двенадцать лет спустя голландский ученый, основатель научной микроскопии А. Левенгук описал общие черты строения клеток бактерий, сперматозоидов и эритроцитов. Однако прошло более 150 лет, прежде чем немецкий анатом Т. Шванн сформулировал в 1839 г. клеточную теорию.

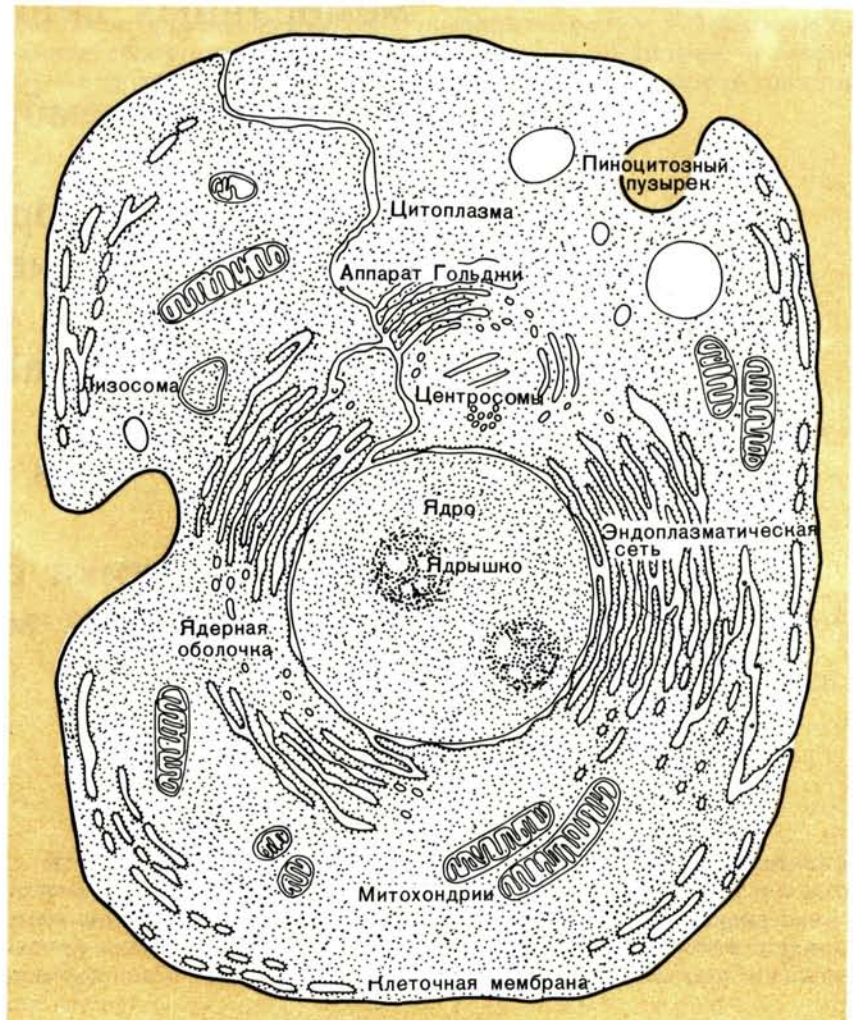


Рис. 278. Схема строения клетки.

Термин «мембрана» используется вот уже более 100 лет для обозначения клеточной границы, служащей, с одной стороны, барьером между содержимым клетки и внешней средой, а с другой — полупроницаемой перегородкой, через которую могут проходить вода и некоторые из растворенных в ней веществ. В 1851 г. немецкий физиолог Х. фон Моль описал плазмолиз клеток растений, предположив, что клеточные стенки функционируют как мембраны. В 1855 г. ботаник К. фон Негели наблюдал различия в проникновении пигментов в поврежденные и неповрежденные растительные клетки и исследовал клеточную границу, которой он дал название *плазматическая мембрана*. Он предположил, что клеточная граница ответственна за осмотические свойства клеток. В 1877 г. немецкий ботаник В. Пфеффер опубликовал свой труд «Исследование осмоса», где постулировал существование клеточных мембран, основываясь на сходстве между клетками и осмометрами, имеющими искусственные полупроницаемые мембраны. В 80-х годах прошлого столетия датский ботаник Х. де Фриз продолжил осмометрические исследования растительных клеток, предположив, что неповрежденный слой протоплазмы между плазмалеммой и тонопластом функционирует как мембрана. Его исследования послужили фундаментом при создании физико-химических теорий осмотического давления и электролитической диссоциации голландцем Я. Вант-Гоффом и шведским ученым С. Аррениусом. В 1890 г. немецкий физикохимик и философ В. Оствальд обратил внимание на возможную роль мембран в биоэлектрических процессах. Между 1895 и 1902 годами Э. Овертон измерил проницаемость клеточной мембраны для большого числа соединений и наглядно показал зависимость между растворимостью этих соединений в липидах и способностью их проникать через мембраны. Он предположил, что мембрана имеет липидную природу и содержит холестерин и другие липиды. Современные представления о строении мембран как подвижных липопротеиновых ансамблей были сформулированы в начале 70-х годов нашего столетия.

Быстрое развитие биоорганической химии мембран и, прежде всего, широкое исследование структуры мембранных белков и липидов во многом обусловили прогресс в познании важнейших функций биомембран, таких, как транспорт различных метаболитов, генерация энергии, взаимодействие клеток и их деление, передача нервного возбуждения, рецепция сигналов внешней среды и т. п.

Основные принципы построения мембранных липидных структур

Основу мембран клетки составляет липидный матрикс, образуемый высокоорганизованными ансамблями липидов. Большинство же функций мембран связано с белками, встроенными в липидную фазу или локализованными на ее поверхности. Кроме того, в состав многих мембран могут входить углеводы, а также соединения другой природы (каротиноиды, порфирины и т. п.).

В водных растворах и на границе раздела вода — воздух липиды, в силу их специфической природы, образуют за счет невалентных взаимодействий гигантские агрегаты, которые в известном смысле можно считать липидными «биополимерами». Это в существенной степени объясняет тот факт, что липиды, наряду с белками, нуклеиновыми кислотами и углеводами, обычно рассматриваются в разделах, посвященных биологическим макромолекулам и им отводится заслуженное место в «большой четверке» биополимеров.

Среди ассоциатов, образующихся при самосборке липидов, наиболее известны мономолекулярные липидные пленки (монослои), мицеллы и бимолекулярные липидные слои (бислои).

Монослои

Монослои липидных молекул формируются на границе раздела между водой и воздухом или водой и маслом. Обычно их получают, помещая на поверхность воды каплю раствора липидов в летучем растворителе. После испарения растворителя образуется пленка толщиной в один слой молекул, в котором полярные (гидрофильные) группировки молекул направлены в сторону воды, а углеводородные цепи (гидрофобные группы) — в сторону воздуха (рис. 279).

При отсутствии ограничений пленка липида на границе раздела вода—воздух стремится занять максимально возможную площадь и представляет систему, аналогичную так называемому «двумерному» газу (рис. 279, *а*). В этом состоянии монослоя молекулы липида свободно перемещаются вдоль поверхности воды, практически не взаимодействуя друг с другом. При постепенном сжатии монослоя, приводящем к увеличению плотности упаковки, молекулы начинают взаимодействовать между собой, и на поверхности воды образуется сплошная пленка липида, отвечающая жидкорастянутому состоянию монослоя, другими словами, состоянию «двумерной жидкости» (рис. 279, *б*). При дальнейшем увеличении сжатия молекулы будут стремиться к максимально плотной упаковке. При этом они упорядочивают свою ориентацию в монослое так, что их полярные головки обращаются в сторону водной фазы, а углеводородные цепи выступают в воздух в виде своеобразного «частокола» (рис. 279, *в*). Такая плотно упакованная пленка, в которой углеводородные цепи липидных молекул сохраняют определенную подвижность, называется конденсированным монослоем. Если давление увеличивать и дальше, образуется твердый, практически несжимаемый конденсированный монослой, в котором площадь, приходящаяся на одну молекулу, минимальна. Когда же давление превысит некоторую предельную величину, называемую давлением коллапса, произойдет разрушение пленки, при котором монослои молекул надвигаются один на другой.

Изменения состояния монослоя по мере сжатия могут быть обнаружены путем измерения зависимости между поверхностным давлением (π) и площадью (A), приходящейся на одну молекулу липида. Типичная диаграмма зависимости поверхностного давления — площадь представлена на рисунке 280. Как видно из этой диаграммы, на кривых наблюдаются точки перегиба, которые соответствуют переходу монослоя из одного состояния в другое. Экстраполяция кривых сжатия к нулевому давлению позволяет рассчитать площадь, занимаемую молекулами различных липидов на границе раздела фаз.

Изотермы площадь — давление могут быть измерены с помощью специального устройства, называемого пленочными весами Лэнгмюра, как показано на схеме, приведенной на рисунке 281. В этом устройстве монослой ограничивают с одной стороны подвижным барьером (*B*), с помощью которого можно увеличивать или уменьшать площадь пленки. С другой стороны монослоя находится легкий плавающий барьер *A*, связанный с прибором, измеряющим усилия, которые воздействуют на поплавок при сжатии пленки. Поверхностное давление определяется как разность между поверхностным натяжением чистой воды (σ_0) и поверхностным натяжением в присутствии монослоя (σ):

$$\pi = \sigma_0 - \sigma$$

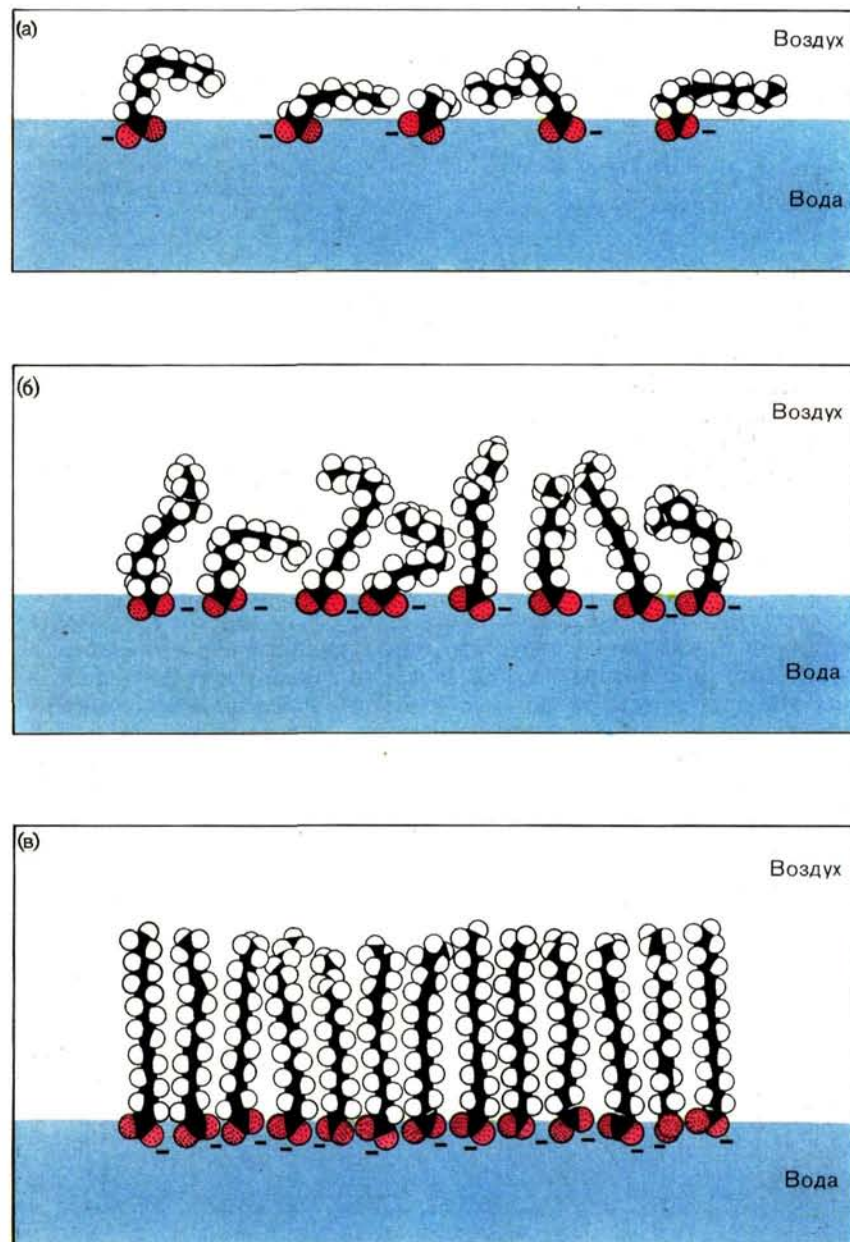


Рис. 279. Липидные молекулы на границе вода/воздух:
(*a*) — «газообразное» состояние монослоя; (*б*) — состояние «двумерной» жидкости; (*в*) — «твердый» конденсированный монослой.

Другой способ измерения поверхностного давления, известный как метод Вильгельми, основан на взвешивании тонкой пластинки из инертного материала, приведенной в соприкосновение с поверхностью монослоя.

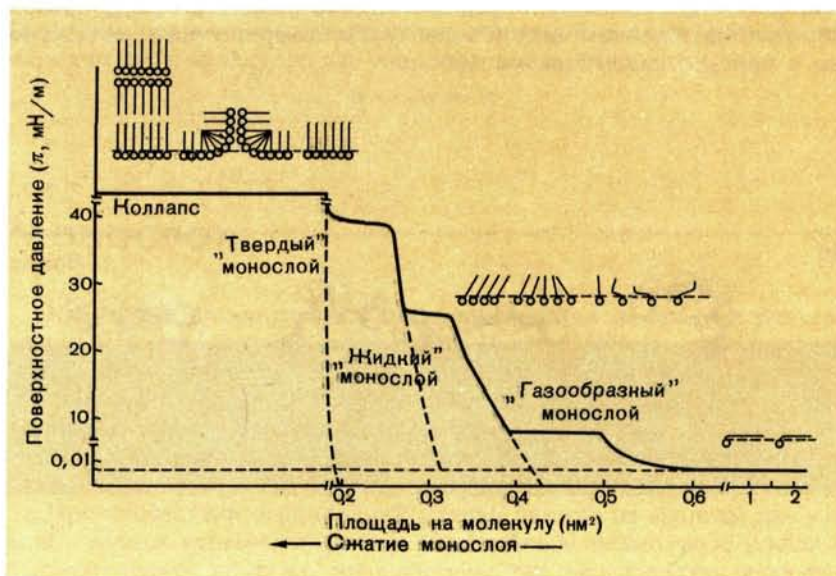


Рис. 280. Общий вид диаграммы зависимости поверхностного давления от площади, приходящейся на молекулу липида.

Важную информацию о свойствах монослоя несет поверхностный потенциал, зависящий от природы и взаимного расположения полярных групп на границе раздела фаз. Зная величину скачка потенциала (ΔV), можно вычислить величины дипольных моментов и получить данные об ориентации поверхностно-активных молекул на поверхности монослоя, а также определить характер их взаимодействия с липидами и структуру образующихся при этом комплексов. Измерения поверхностной вязкости также могут быть полезны для характеристики реологических свойств мембранных компонентов, особенно при изучении процессов, сопровождающихся изменениями фазового состояния монослоя. И наконец, путем измерения поверхностной радиоактивности монослоя можно изучать процессы адсорбции меченых мембранных агентов на границе раздела воз-

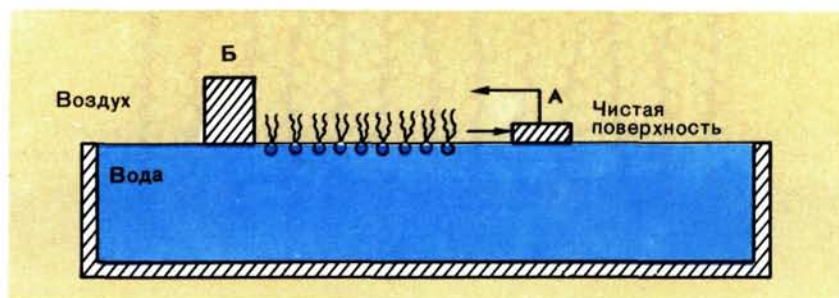


Рис. 281. Схема измерения поверхностного давления по методу Лэнгмюра.

дух—вода. Конструкция комплексной установки, позволяющей для одного и того же монослоя измерять поверхностное давление, поверхностный потенциал и поверхностную радиоактивность, показана на рисунке 282.

Липидные монослои издавна рассматривались исследователями как простейшие модели биологических мембран. Физико-химические параметры подобных монослоев интенсивно исследовались уже в начале XX в., т. е. гораздо раньше, чем началось экспериментальное изучение других мембранных моделей. Значительный вклад в исследования монослоев внесли Б. Франклин, лорд Релей (Дж. В. Стратт) и И. Лэнгмюр. Как модельная система липидные монослои и сегодня не утратили своего значения, позволяя оценивать поверхностную активность отдельных мембранных компонентов и изучать взаимодействие других мембранных молекул в ориентированных мономолекулярных структурах, хорошо имитирующих поверхность раздела мембрана—вода.

Поведение липидных молекул в монослое существенно зависит от их строения. Насыщенные жирные кислоты, их метиловые эфиры и триацилглицерины (например, пальмитиновая кислота, метилпальмитат и трипальмитоилглицерин) образуют конденсированные монослои при поверхностном давлении 10^{-4} Н/см. Конденсированная пленка ведет себя при этом как несжимаемое твердое тело. Площадь, приходящаяся на одну молекулу в монослое, для гомологичного ряда кислот не зависит от длины углеводородной цепи и при максимально плотной упаковке монослоя, отвечающей давлению коллапса, составляет $0,19—0,2$ нм². Введение одной двойной связи в жирнокислотную цепь существенно увеличивает площадь, приходящуюся на молекулу. Так, например, для олеиновой кислоты предельная площадь возрастает до $0,26—0,27$ нм². Однако введение дополнительных двойных связей уже мало влияет на площадь, приходящуюся на одну молекулу жирной кислоты. Монослои, образуемые ненасыщенными жирными кислотами, проявляют свойства менее упорядоченных жидкорастянутых пленок.

Жидкорастянутые монослои образуют также моноацилглицерины вследствие присутствия двух свободных гидроксильных групп в молекуле. Предельная площадь для моноацилглицеринов составляет около $0,25$ нм² на молекулу. Диацилглицерины дают более конденсированные монослои. Площадь, приходящаяся на молекулу, растет пропорционально числу имеющихся жирнокислотных остатков. Так, в случае насыщенных триацилглицеринов предельная площадь составляет около $0,6$ нм² на молекулу.

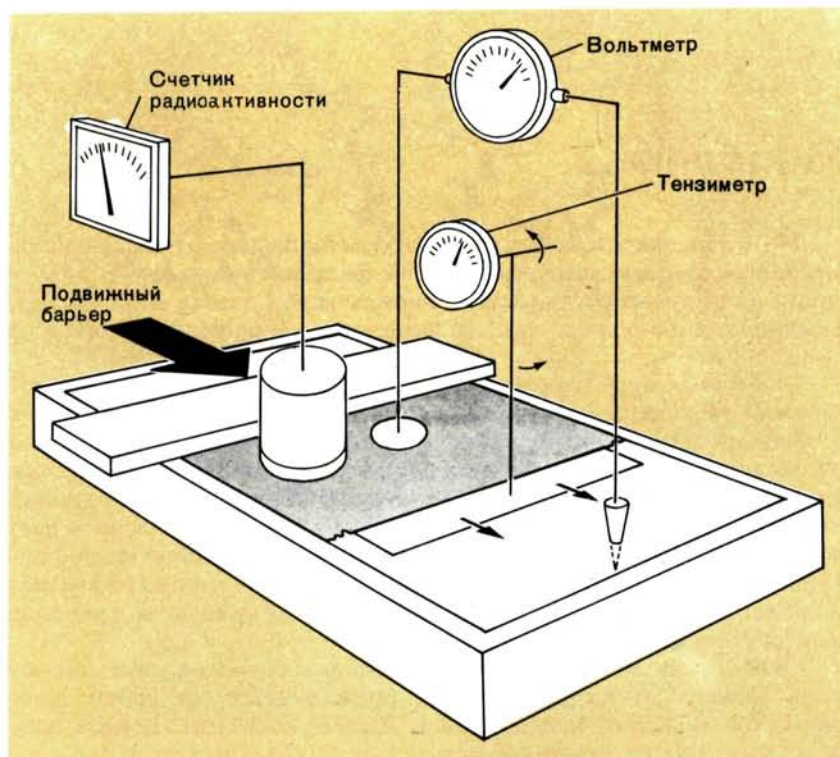


Рис. 282. Схема прибора, позволяющего определять поверхностное давление, поверхностный потенциал и поверхностную радиоактивность монослоя.

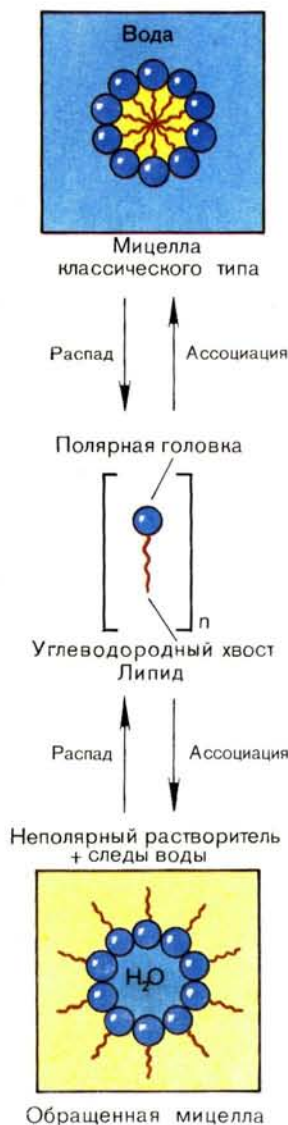


Рис. 283. Липидные мицеллы в воде и неполярных растворителях.

Характер упаковки фосфолипидных молекул в монослой зависит как от строения их углеводородных цепей, так и от природы гидрофильных полярных головок. Фосфолипиды с остатками насыщенных кислот дают конденсированные монослои при поверхностном давлении 10^{-4} Н/см. Как и в случае свободных жирных кислот, площадь, приходящаяся на фосфолипидную молекулу, значительно возрастает при введении одной двойной связи в жирнокислотную цепь. Дальнейшее увеличение степени ненасыщенности в той же жирнокислотной цепи слабо сказывается на величине площади, занимаемой молекулой. Однако если вторая двойная связь вводится в другую ацильную цепь, то площадь заметно возрастает. Так, в ряду дипальмитоилфосфатидилхолин, яичный фосфатидилхолин и диолеилфосфатидилхолин предельная площадь на молекулу составляет 0,44, 0,62 и 0,72 нм^2 соответственно.

Фосфатидилэтаноламин образует более конденсированные монослои по сравнению с фосфатидилхолином. Средняя площадь на молекулу фосфатидилэтанолamines, содержащих ненасыщенные жирные кислоты, существенно меньше, чем для соответствующих фосфатидилхолинов. Возрастание рН или концентрации электролитов в водной фазе приводит к расширению монослоя фосфатидилэтаноламина. В еще большей степени влияние рН и неорганических солей сказывается на свойствах монослоев, образуемых кислыми фосфолипидами, такими, как фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, дифосфатидилглицерин, фосфатидовая кислота и др. В общем виде ионизация полярных групп липидов при увеличении рН приводит к более разреженному монослою вследствие электростатического отталкивания отрицательно заряженных группировок. Присутствие катионов в водной фазе оказывает обратное действие за счет экранирования заряда фосфатных групп. Многовалентные катионы, особенно Ca^{2+} , оказывают сильное влияние на монослои отрицательно заряженных фосфолипидов, приводя к значительному уменьшению средней площади, приходящейся на молекулу.

Значительное влияние на свойства липидного монослоя могут оказывать также макромолекулы, присутствующие в водной фазе. Взаимодействие этих веществ, в частности белков, с липидным монослоем сопровождается их адсорбцией на поверхности монослоя и проникновением в монослой. По изменениям поверхностного давления и потенциала, а также площади, приходящейся на молекулу, могут быть изучены факторы, влияющие на белково-липидные взаимодействия в монослое.

Мицеллы

Мицеллы представляют собой простейшие агрегаты, образуемые липидными молекулами в объемной фазе растворителя. В зависимости от природы растворителя липиды могут давать либо мицеллы обычного типа, либо так называемые «обращенные» мицеллы (рис. 283).

В обычных мицеллах гидрофильные полярные головки липидных молекул обращены в сторону водной фазы, тогда как неполярные углеводородные цепи образуют гидрофобное ядро, изолированное от водного окружения. В обращенных мицеллах, существующих в таких растворителях, как бензол, гексан и др., молекулы липидов имеют иную ориентацию: их гидрофобные цепи направлены в растворитель, а полярные головки формируют центральную гидрофильную область мицеллы. Образование обращенных мицелл значительно облегчается при добавлении следовых количеств воды в неполярный растворитель.

Склонность липидов к формированию ассоциатов мицеллярного типа зависит от их строения и, прежде всего, от соотношения размеров полярной и неполярной частей молекулы. В воде легко дают мицеллы те липиды, которые имеют объемистую и/или заря-

женную полярную головку и сравнительно небольшие углеводородные цепи (рис. 284).

К мицеллообразующим липидам относятся соли высших жирных кислот и лизоформы фосфолипидов, у которых на молекулу приходится всего лишь одна углеводородная цепь, а также фосфолипиды, имеющие две углеводородные цепи, но небольшой длины, такие, как дигексаноил- и диоктаноилфосфатидилхолины. Наличие в молекуле непомерно большой полярной головки, как, например, в ганглиозидах, даже при нормальной длине углеводородных цепей способствует мицеллообразованию в воде.

Для вышеперечисленных веществ характерны довольно высокие по сравнению с другими липидами значения критической концентрации мицеллообразования порядка $10^{-3} - 10^{-5}$ М. Образуемые ими мицеллы обладают диаметром от 3 до 6 нм, имеют сферическую или эллипсоидальную форму и содержат от нескольких десятков до сотен липидных молекул на мицеллу. С ростом концентрации липида происходит укрупнение мицелл и превращение их в длинные стержнеобразные частицы, содержащие более 1000 молекул на мицеллу (рис. 285).

Иные соотношения размеров полярных групп и углеводородных цепей типичны для липидов, способных образовывать обращенные мицеллы в неполярных растворителях. Формированию таких мицелл

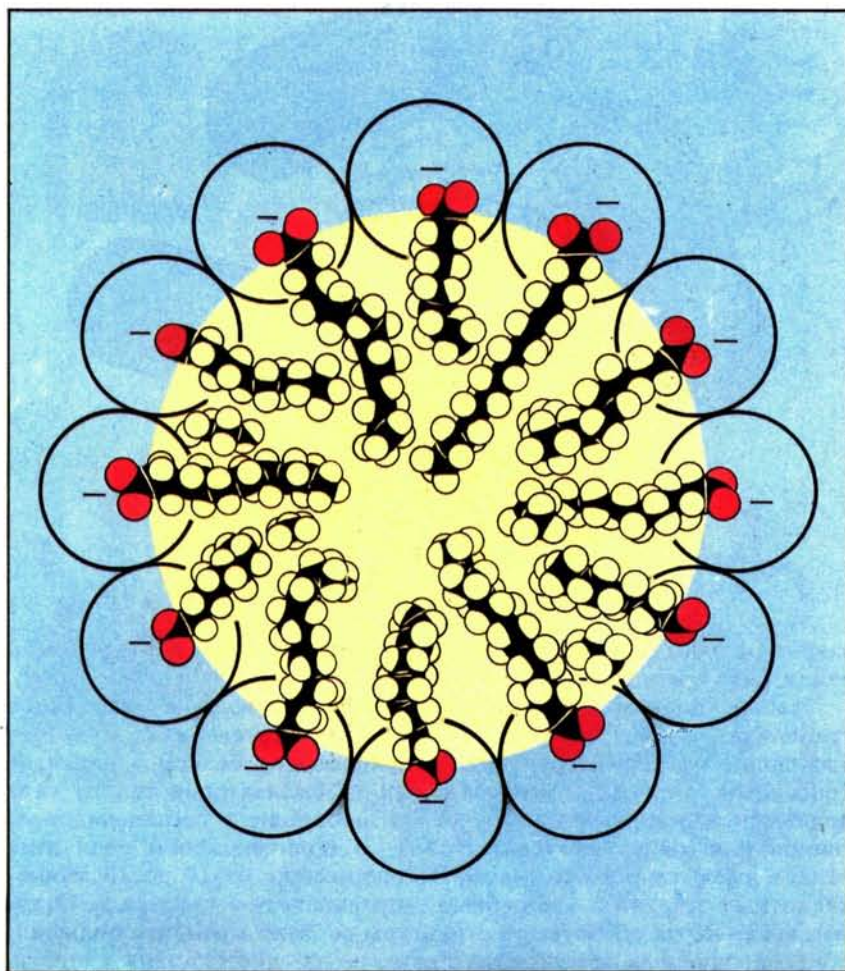


Рис. 284. Упаковка молекул в мицелле соли жирной кислоты.

благоприятствуют малый объем полярных головок, нейтрализация их заряда, а также наличие в молекуле массивных углеводородных цепей. Так, например, яичный фосфатидилхолин легко образует в бензоле обращенные мицеллы, тогда как в водной среде его молекулы не в состоянии упаковаться в компактные мицеллярные агрегаты. Тем не менее даже такие липиды могут быть переведены в мицеллярное состояние в водной среде, если они находятся в смеси с другими поверхностно-активными веществами. В частности, образование смешанных липидных мицелл легко происходит в присутствии детергентов.

Обычно смешанные детергент-липидные мицеллы имеют такую структуру, как показано на рисунке 285. Однако особый интерес представляет молекулярная организация мицелл, образуемых смесями солей желчных кислот с фосфолипидами. Эти мицеллы имеют форму диска, в центральной части которого находятся фосфолипидные молекулы, а по периферии расположены молекулы желчной кислоты (рис. 286). Толщина диска (4—5 нм) в точности соответствует удвоенной длине фосфолипидной молекулы, а его диаметр

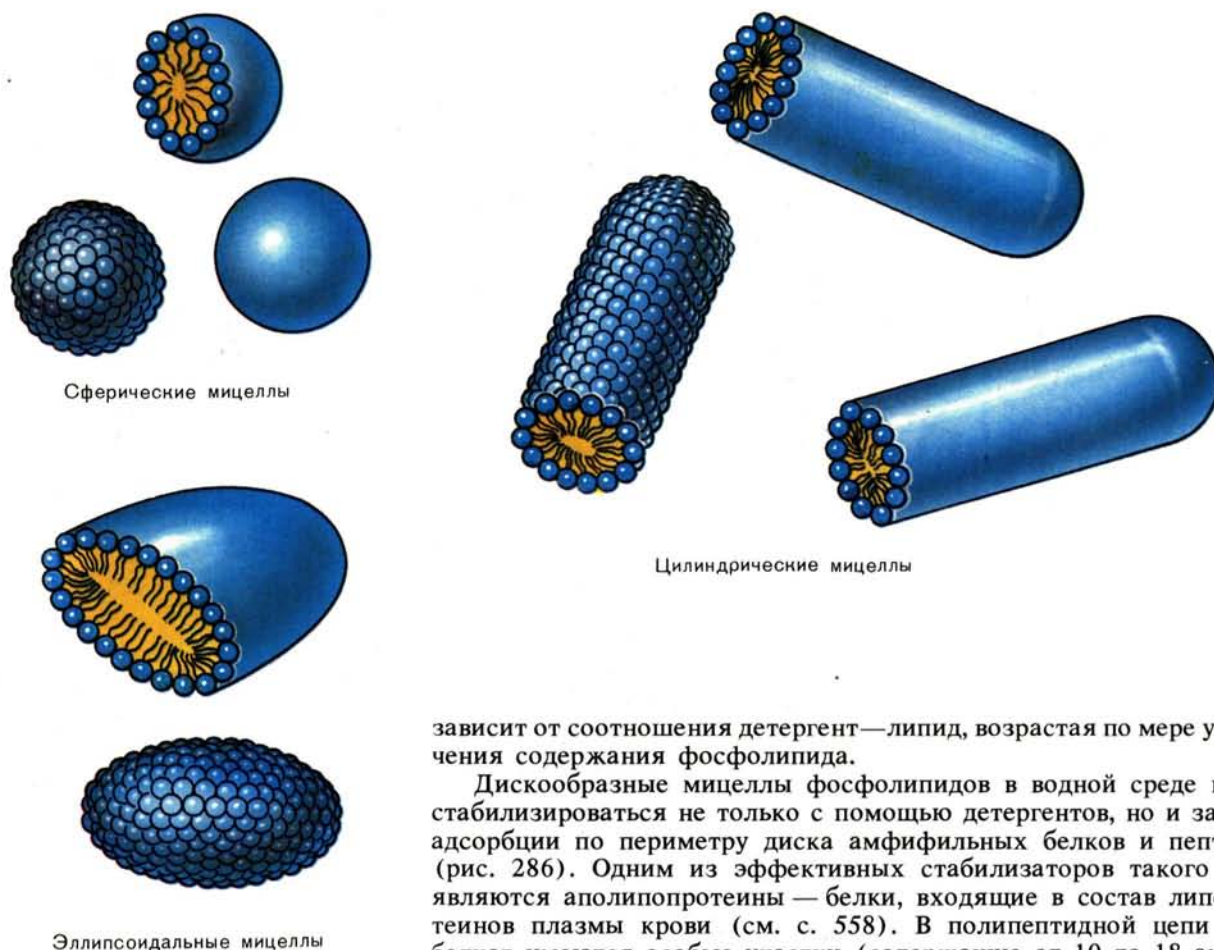


Рис. 285. Различные типы мицелл, образуемых липидами в воде.

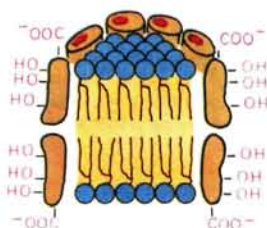
зависит от соотношения детергент—липид, возрастающая по мере увеличения содержания фосфолипида.

Дискообразные мицеллы фосфолипидов в водной среде могут стабилизироваться не только с помощью детергентов, но и за счет адсорбции по периметру диска амфифильных белков и пептидов (рис. 286). Одним из эффективных стабилизаторов такого типа являются аполипопротеины — белки, входящие в состав липопротеинов плазмы крови (см. с. 558). В полипептидной цепи этих белков имеются особые участки (содержащие от 10 до 18 аминокислотных остатков), способные сворачиваться в α -спираль. Отличительная черта образуемой структуры состоит в том, что большинство гидрофобных остатков расположено на одной стороне спирали,

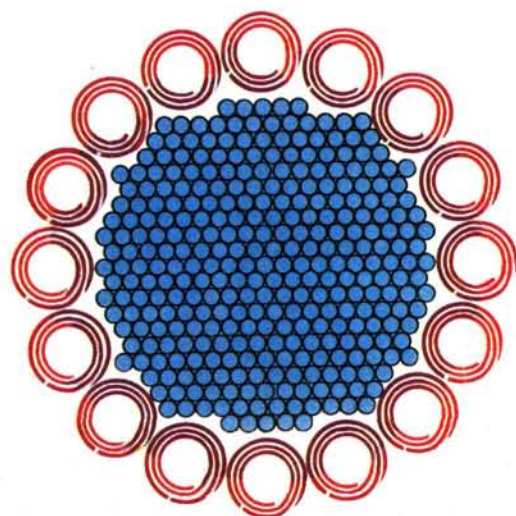
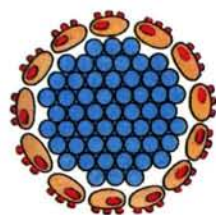
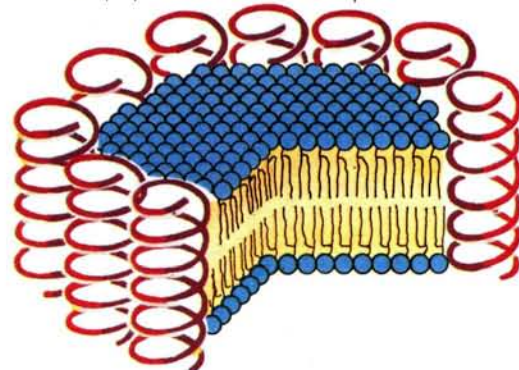
тогда как заряженные и сильно полярные аминокислотные остатки находятся на ее противоположной стороне (рис. 287). Таким образом, в смешанных белково-липидных мицеллах гидрофобные области α -спиральных участков полипептидной цепи должны находиться в контакте с углеводородными цепями фосфолипидов, а гидрофильные области спиралей будут обращены в водную среду.

Важным свойством липидных мицелл является их способность солюбилизовать, т. е. растворять в себе, те вещества, которые в отсутствие мицелл в среде нерастворимы. Так, обращенные мицеллы могут включать значительное количество воды во внутренний объем, ограниченный полярными головками липидных молекул. Вместе с водой внутрь обращенных мицелл захватываются растворенные в ней неорганические соли, свободные сахара и даже молекулы биополимеров (рис. 288). Например, в обращенные мицеллы фосфолипидов в углеводородных растворителях легко включаются такие белки, как цитохром с, фосфолипаза А₂, родопсин и реакционные центры *Rhodospseudomonas sphaeroides*, которые в этих условиях сохраняют свою пространственную структуру и функциональную

Смешанные мицеллы
фосфолипидов и солей
желчных кислот



Диски, образуемые фосфолипидами и
амфифильными аполипопротеинами



← 5 нм →

← 15 нм →

Рис. 286. Дискообразные мицеллярные агрегаты.

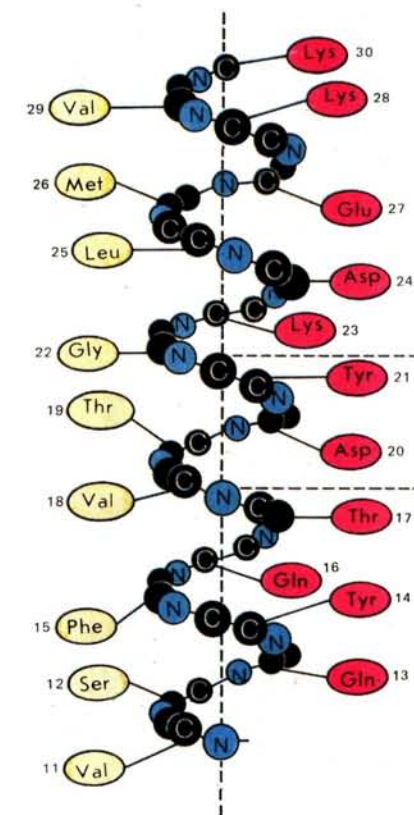


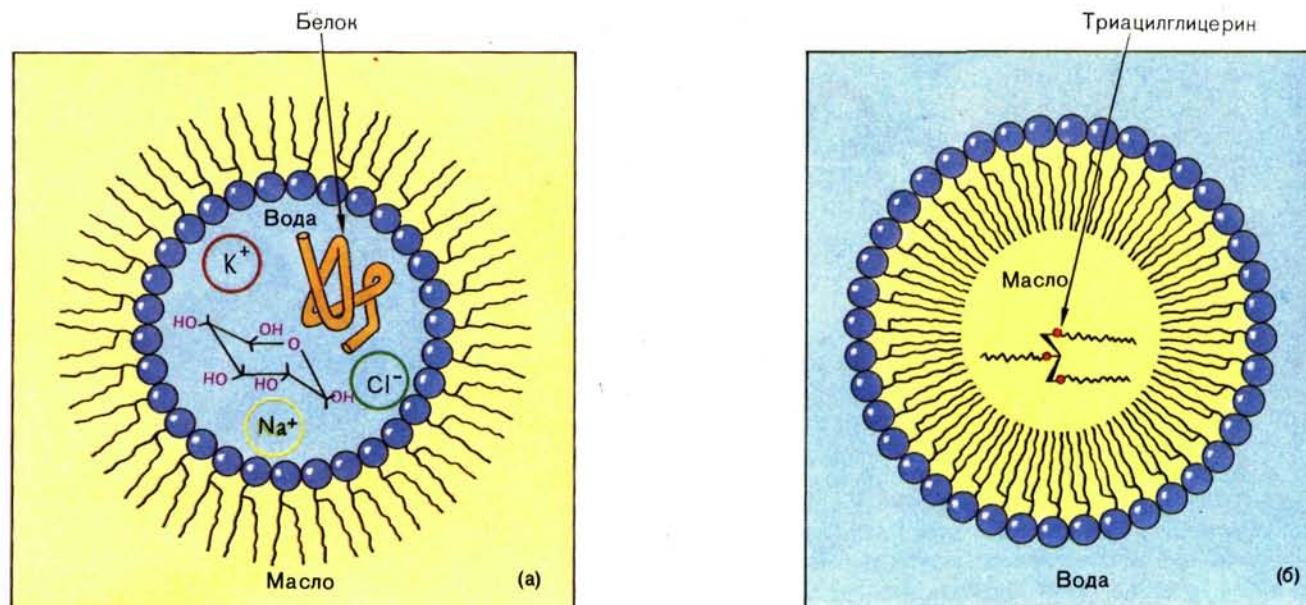
Рис. 287. α -Спираль отдельного участка полипептидной цепи аполипопротеина А-II.

активность. Фактически при большом содержании воды обращенные мицеллы можно рассматривать как капельки микроэмульсии типа «вода в масле», стабилизированной липидным монослоем на границе раздела вода—неполярный растворитель.

Иной тип микроэмульсии, а именно «масло в воде», образуется при солюбилизации в нормальных липидных мицеллах неполярных и малополярных веществ, плохо растворимых в воде. В этом случае монослой липидных молекул формируется на поверхности микрокапелек солюбилируемого вещества, стабилизирует их и поддерживает во взвешенном состоянии (рис. 288). Таким путем в водной среде удастся легко эмульгировать неполярные органические растворители, а также жиры и масла. Размер частиц микроэмульсий варьирует в широких пределах, от 5 до 100 нм и больше. Например, средний диаметр частиц микроэмульсии, приготовленной обработкой ультразвуком из смесей фосфатидилхолина и триолеилглицерина в соотношении 1:1, составляет ~ 27 нм, а при соотношении 1:10 он возрастает до ~ 230 нм.

Классическим примером липидных эмульсий природного происхождения являются липопротеины плазмы крови, основная функция которых состоит в транспорте фосфолипидов, триацилглицеринов, холестерина и его эфиров в организме теплокровных животных. В плазме найдены четыре основных класса липопротеинов. В порядке возрастания удельной плотности они располагаются в следующий ряд: хиломикроны, липопротеины очень низкой плотности (ЛОНП), липопротеины низкой плотности (ЛНП) и липопротеины высокой плотности (ЛВП). Содержание различных классов липопротеинов у человека зависит от возраста, пола, условий жизни и т. д. и изменяется при некоторых патологических состояниях организма (инфаркт миокарда, атеросклероз и другие сосудистые заболевания). Морфологически липопротеины представляют собой сферические частицы мицеллоподобного типа (рис. 289). Несмотря на различия в относительном содержании основных компонентов, входящих в состав липопротеинов, все они устроены по одинаковому принципу (рис. 290): внутреннее ядро липопротеиновых частиц состоит из неполярных нейтральных липидов (триацилглицеринов и эфиров холестерина), а на поверхности находится монослой, образуемый фосфолипидами, холестерином и амфифильными апопротеинами.

Рис. 288. Способы солюбилизации различных веществ в липидных мицеллах: (а) — микроэмульсия типа «вода в масле»; (б) — микроэмульсия типа «масло в воде».



Следует отметить, что мицеллообразование играет также очень важную роль в процессах пищеварения. Благодаря присутствию солей желчных кислот, поступающих из желчного пузыря в двенадцатиперстную кишку, нерастворимые в воде пищевые жиры превращаются в тонкодисперсную эмульсию, что делает их доступными для расщепления липолитическими ферментами и облегчает всасывание продуктов гидролиза в тонком кишечнике.

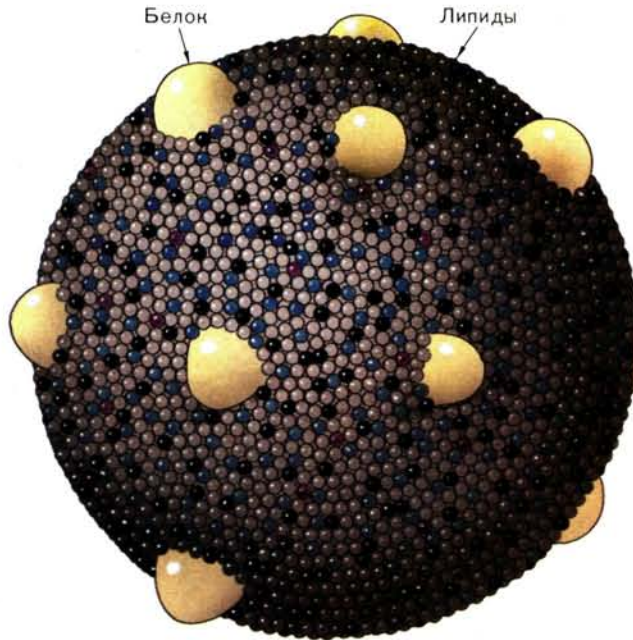
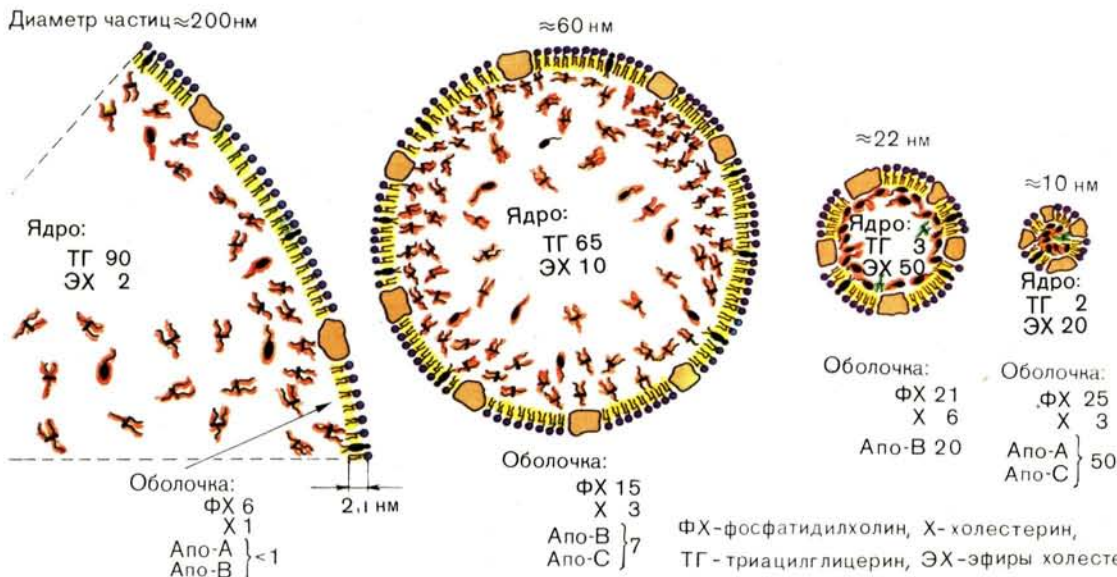


Рис. 289. Модель частицы липопротеина плазмы крови.

Рис. 290. Примерный состав (в %) и размеры липопротеинов плазмы крови человека. Толщина поверхностного монослоя (2,1 нм) дана в том же масштабе, что и диаметр ядра.



Необходимо упомянуть также еще об одной области, где практическое знание закономерностей образования и поведения мицеллярных структур имеет прямое отношение к исследованиям биологических мембран. Речь идет о проблемах разборки мембран на составные компоненты с выделением из них отдельных мембранных белков и последующей реконструкции функционально активных комплексов в модельных системах. В настоящее время наиболее предпочтительным подходом к решению этих проблем является использование детергентов. При действии детергентов на выделенные препараты клеточных мембран происходит солюбилизация белков и липидов с образованием смешанных мицелл (рис. 291).

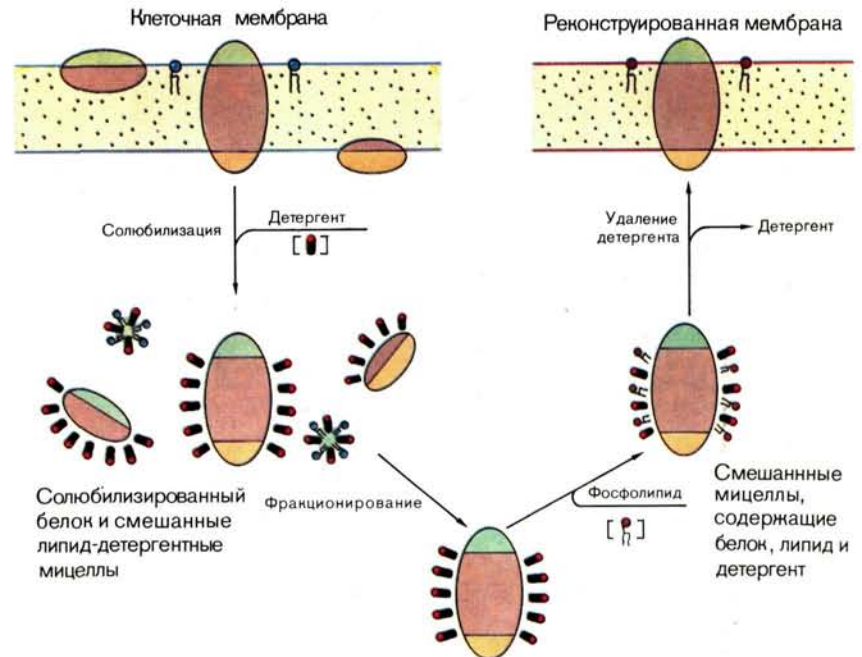
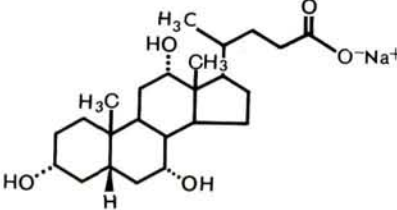
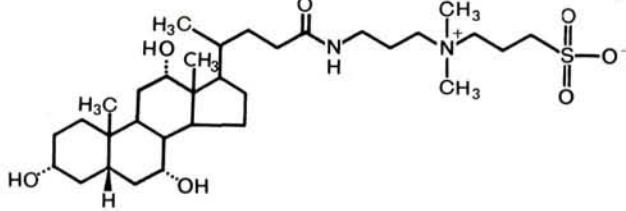
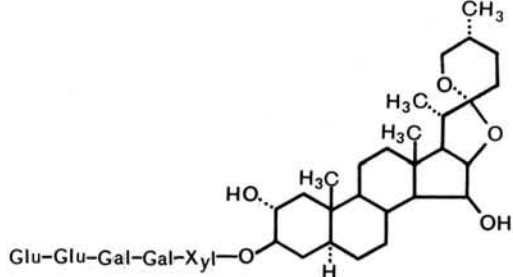
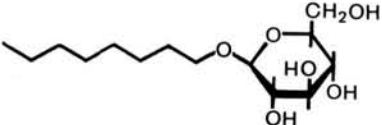
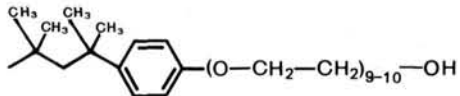



Рис. 291. Разборка и сборка мембраны с помощью детергентов.

С помощью разнообразных методов фракционирования мембранные белки в солюбилизированной форме могут быть разделены и очищены до индивидуального состояния. Последующее удаление детергента в присутствии подходящих фосфолипидов позволяет реконструировать в искусственной мембране ту или иную функцию изучаемого белка. В таблице 23 приведены структурные формулы и названия детергентов, наиболее часто используемых для солюбилизации и реконструкции мембран.

В настоящее время выявился еще один аспект перспективного применения мицеллярных систем в мембранных исследованиях: с помощью детергентов оказалось возможным достаточно хорошо моделировать липидное окружение мембранных пептидов и белков. Поскольку мицеллы занимают промежуточное положение между растворами и истинно мембранными системами, то это значительно расширяет возможности получения тонкой структурной информации о таких белках с помощью современных спектральных методов.

Детергенты, наиболее часто используемые для солюбилизации и реконструкции мембран

Структурная формула	Название
	<p>Холат натрия (3α, 7α, 12α-тригидрокси-5β-холанат натрия)</p>
	<p>ЧАПС (3-[(3-холамидопропил)-диметиламмонно]-пропансульфонат)</p>
	<p>Дигитонин</p>
	<p>Октилглюкозид (октил-β-D-глюкопиранозид)</p>
	<p>Тритон X-100 п- (трет-октил)-фениловый эфир полиэтиленгликоля</p>
	<p>Луброл РХ (додecilовый эфир полиэтиленгликоля)</p>

Бислой

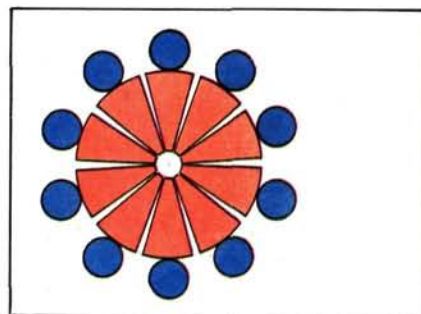
Бислой, или бимолекулярный липидный слой, представляет собой термодинамически наиболее выгодную форму ассоциации тех липидов, молекулы которых не способны образовывать в воде небольшие агрегаты мицелярного типа. Возможность упаковки молекул в бислой, как и в случае мицелл, определяется прежде всего соотношением размеров полярной и неполярной частей молекулы (рис. 292).



Луццати [Luzzati] Витторио (р. 1923), французский биофизик. Окончил университет в Буэнос-Айресе (1947); с 1947 г. работает в Национальном центре научных исследований (Франция), в настоящее время — в Институте молекулярной генетики. Основные работы связаны с исследованием структуры и полиморфизма липидов, липопротеинов и биологических мембран.



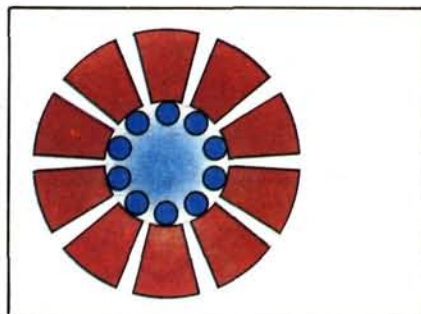
Конус



Нормальные мицеллы



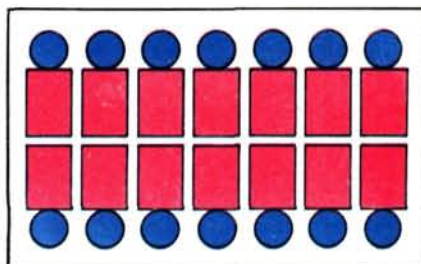
Обратный конус



Обращенные мицеллы



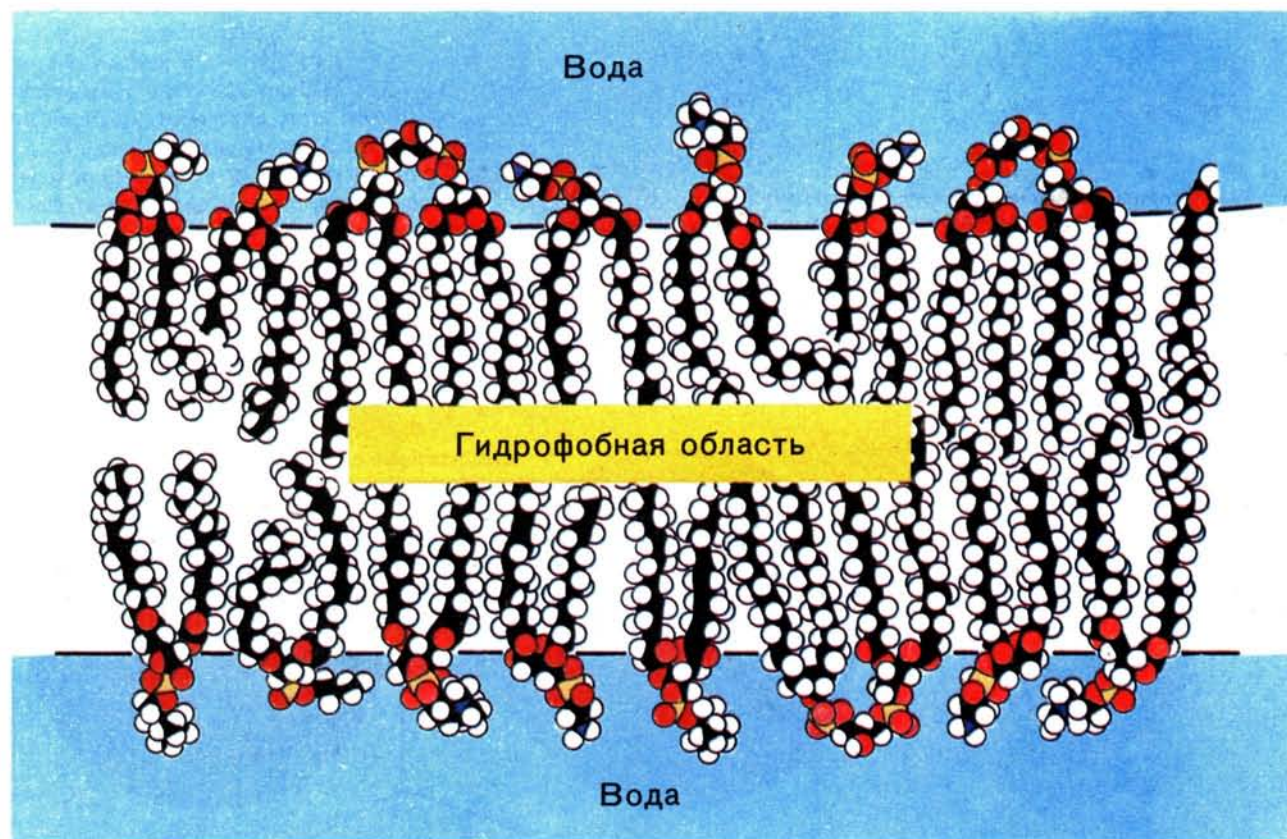
Цилиндр



Липидный бислой

Рис. 292. Схематическое изображение формы липидных молекул, наиболее склонных к образованию нормальных мицелл, обращенных мицелл и бимолекулярного слоя.

Как правило, бислоем легко формируется липидами, у которых невелики различия между площадью, занимаемой полярной головкой, и поперечным сечением углеводородных цепей. Именно такое соотношение размеров характерно для большинства фосфолипидов, являющихся основными компонентами биологических мембран. В бислое агрегированные молекулы липидов уложены в виде двух параллельных монослоев, обращенных друг к другу своими гидрофобными сторонами. Полярные группы липидных молекул образуют соответственно две гидрофильные поверхности, отделяющие внутреннюю углеводородную фазу бислоя от водной среды.



Характерным признаком липидов, образующих бислойные структуры, является исключительно низкая величина критической концентрации мицеллообразования ($\sim 10^{-10}$ М). Это означает, что доля неассоциированных липидных молекул, находящихся в равновесии с бислоем, исключительно мала и практически весь липид находится в составе крупных надмолекулярных образований. Их структура и морфология зависят от соотношения липид—вода. Значительный вклад в исследование такого рода водно-липидных систем внес В. Луццати.

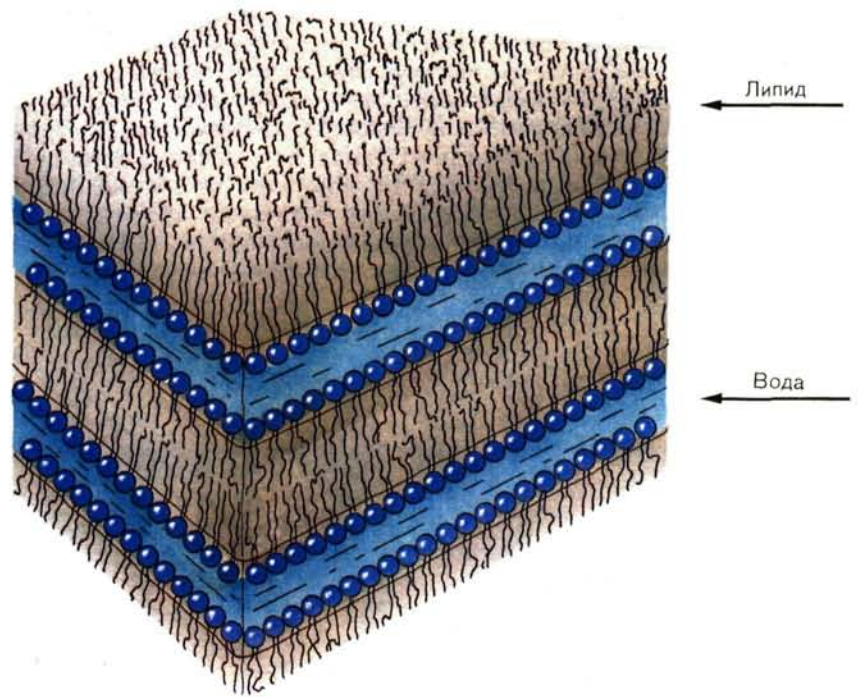


Рис. 293. Мультиламеллярное строение водно-липидных систем, образуемых протяженными бислоями.

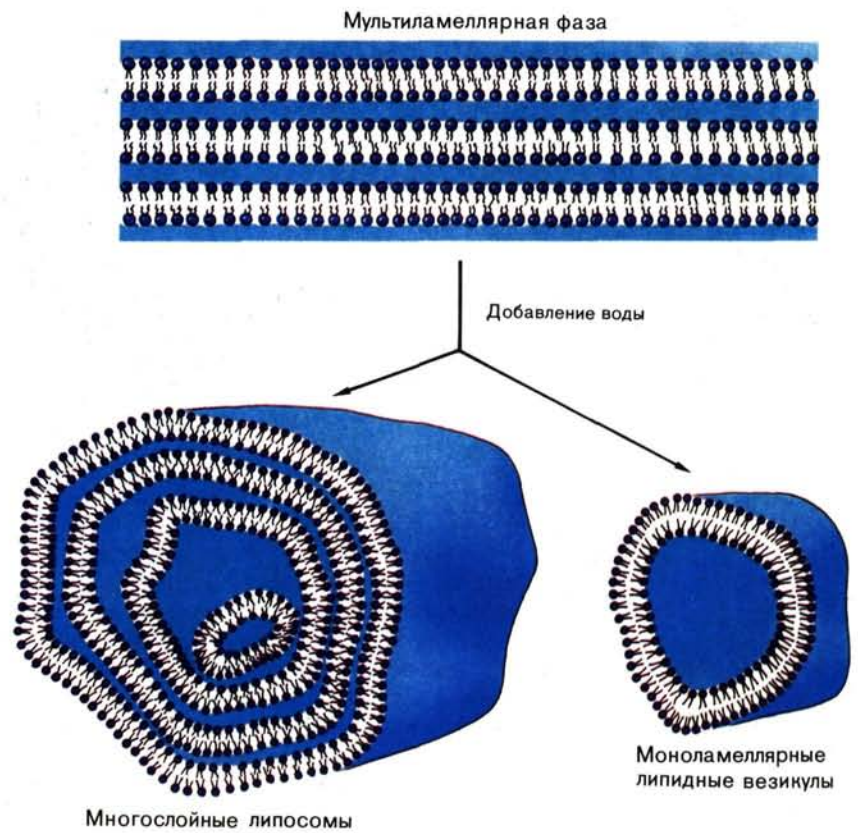
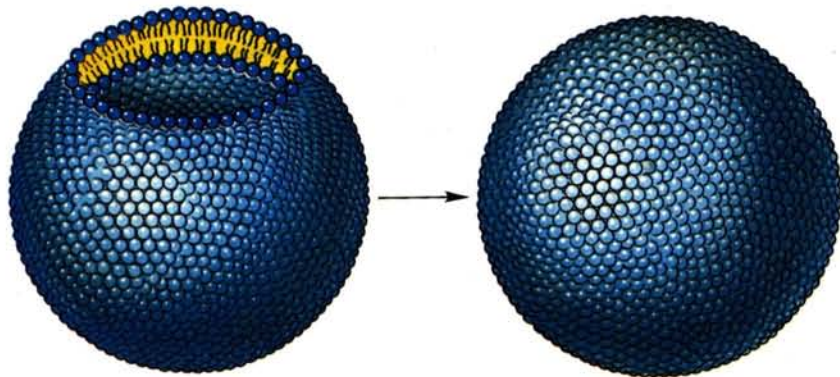


Рис. 294. Структуры, образуемые липидными бислоями в избытке воды.

При низком содержании воды (в случае фосфатидилхолина до 40% воды по массе) водно-липидная система существует в виде гомогенной фазы, имеющей ламеллярное (слоистое) строение. Она образована параллельно расположенными протяженными бислоями, отделенными друг от друга водными прослойками (рис. 293). При дальнейшем увеличении содержания воды система становится двухфазной, состоящей из фрагментов максимально гидратированной ламеллярной фазы в избытке воды. Эти фрагменты, получившие название липосомы (см. далее), представляют собой замкнутые многослойные макроструктуры, которые состоят из концентрических липидных бислоев, разделенных изолированными водными промежутками (рис. 294). В определенных условиях могут быть получены также монослойные липидные пузырьки (или везикулы); в них только один липидный бислой отделяет внутреннее водное содержимое от окружающей среды. Возможность замыкания бислоя самого на себя с образованием однослойных или многослойных везикулярных структур обеспечивается его эластичностью и гибкостью, а движущей силой этого процесса является стремление устранить энергетически невыгодный контакт воды с гидрофобными областями на краях незамкнутого бислоя.

Толщина липидного бислоя определяется прежде всего длиной углеводородных цепей и обычно варьирует в пределах 4—5 нм. Она зависит также от наличия двойных связей и боковых заместителей в цепи, т. е. в конечном счете от плотности упаковки липидных молекул в бислой. Присутствие в углеводородных цепях двойных связей в *цис*-конфигурации, боковых метильных групп и других



заместителей нарушает плотность упаковки молекул и приводит к уменьшению толщины бислоя. Внешним фактором, сильно влияющим на степень упорядоченности липидного бислоя, является температура.

В зависимости от температуры липидный бислой может находиться в двух основных фазовых состояниях — кристаллическом (или гелевом) и жидкокристаллическом. Нередко эти состояния называют «твердым» и «жидким», имея в виду, что физический смысл перехода между ними заключается в плавлении или замораживании углеводородных цепей липидных молекул. Переход бислоя из кристаллического в жидкокристаллическое состояние (и обратно) происходит при строго определенной температуре, характерной для



Чепмен [Chapman] Деннис (р. 1926), английский биофизик, работающий в области биофизической химии, член Лондонского Королевского общества. Известен работами по исследованию биофизических мембран, в частности по выяснению природы липид-липидных и липид-белковых взаимодействий.

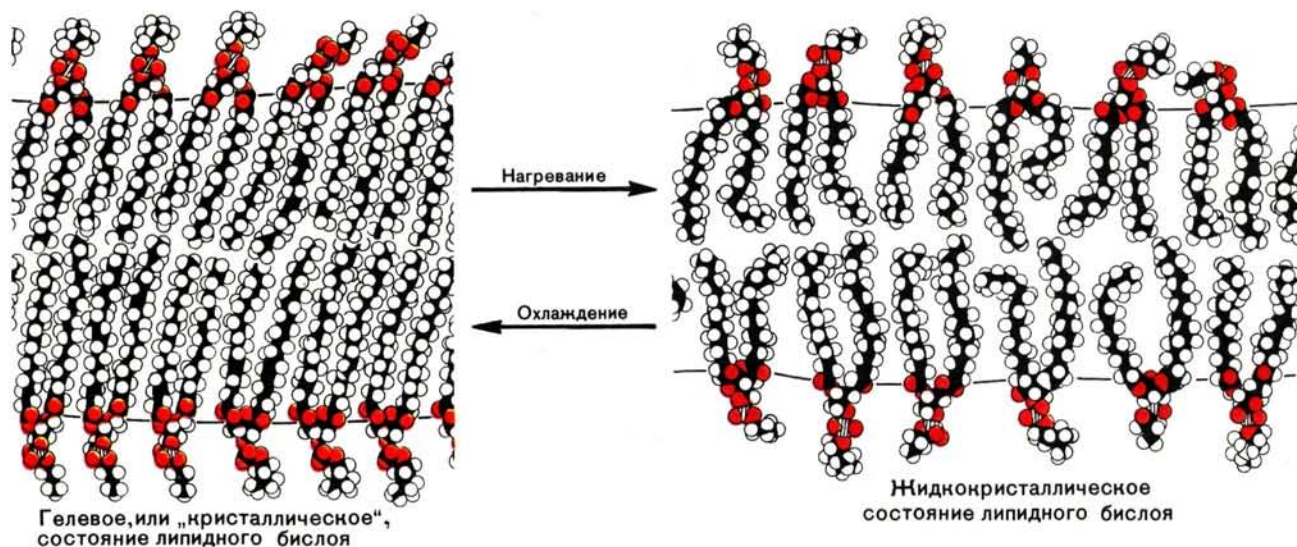
данного липида и называемой температурой фазового перехода гель—жидкий кристалл ($t_{п}$). Важную роль в изучении фазовых переходов в липидном бислое сыграл Д. Чепмен.

Таблица 24

Температура фазового перехода ($t_{п}$) для некоторых фосфолипидов

Длина ацильной цепи	Название фосфолипида	$t_{п}$ (°C)
12	Дилауроилфосфатидилхолин	0
14	Димиристоилфосфатидилхолин	23
16	Дипальмитоилфосфатидилхолин	41
18	Дистеароилфосфатидилхолин	58
18	1-Стеароил-2-олеоилфосфатидилхолин	2
18	Диолеоилфосфатидилхолин	-22
14	Димиристоилфосфатидилэтанолламин	51
16	Дипальмитоилфосфатидилэтанолламин	63
16	Дипальмитоилфосфатидилсерин	51

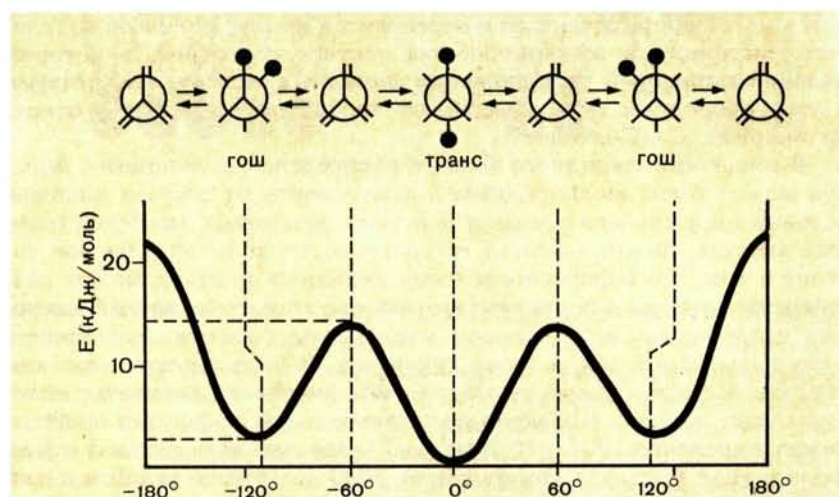
Температура фазового перехода зависит как от строения углеводородных цепей липидных молекул, так и от природы их полярных головок. Как правило, чем длиннее углеводородные цепи в молекуле, тем выше температура фазового перехода (табл. 24). В гомологичном ряду липидов $t_{п}$ обычно возрастает на 15—20 °C при увеличении длины насыщенной цепи на 2 метиленовых звена. Введение *цис*-этиленовой связи даже в одну углеводородную цепь липидной молекулы резко понижает температуру фазового перехода. Еще большее снижение $t_{п}$ происходит при введении *цис*-двойной связи в другую углеводородную цепь. При этом степень снижения $t_{п}$ зависит от положения двойной связи в цепи: наибольший эффект наблюдается, когда двойная связь занимает положение у девятого или десятого атома углеводородной цепи. Аналогичным образом влияет введение метильной группы в углеводородные цепи липидных молекул: $t_{п}$ сильнее всего снижается, если метильная группа находится в середине



цепи, но практически не меняется, когда разветвление происходит на ее конечном участке.

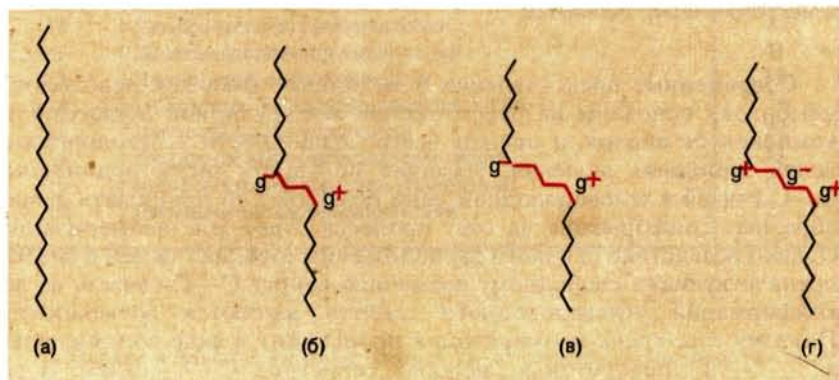
Различия в строении полярных головок липидных молекул также существенно сказываются на температуре фазового перехода. Например, при одних и тех же углеводородных цепях $t_{\text{п}}$ для фосфатидилхолина на 20°C ниже, чем для фосфатидилэтаноламина. В случае отрицательно заряженных фосфолипидов температура фазового перехода зависит от степени ионизации полярных групп (обычно $t_{\text{п}}$ падает по мере увеличения степени ионизации) и присутствия двухвалентных катионов (особенно Ca^{2+}) в водной среде (как правило, связывание Ca^{2+} повышает $t_{\text{п}}$). Изменения $t_{\text{п}}$ в зависимости от условий среды показывают, что температура не является единственным фактором, определяющим фазовое состояние липидного бислоя. Во многих случаях фазовые изменения могут происходить и при постоянной температуре за счет изменений рН, ионного состава среды, присутствия мембранотропных веществ, а также изменений липидного состава бислоя. О важности фазового состояния липидов для функционирования мембран свидетельствуют, например, многочисленные факты корреляции между $t_{\text{п}}$ мембранных липидов и активностью ряда мембраносвязанных ферментов.

Современные представления о механизме фазовых переходов в мембранах основаны на рассмотрении молекулярной подвижности компонентов бислоя, и прежде всего подвижности углеводородных цепей липидных молекул. Наличие большого числа ординарных С—С-связей в углеводородной цепи позволяет ей принимать разнообразные конформации за счет процесса *гош-транс*-изомеризации. Однако вследствие близкого расположения соседних цепей в бислое, препятствующих свободному вращению вокруг С—С-связей, не все конформации углеводородного скелета являются возможными. Поэтому *гош-транс*-изомеризация происходит в виде сопряженных $g^+ - t - g^-$ -поворотов в смежных сегментах С—С-связей. В результате на углеводородной цепи появляется ряд изгибов или изломов (кинков), в которых два *гош*-ротамера разделены одним, двумя, тремя и т. д. *транс*-сегментами (рис. 295). Углеводородная цепь средней длины (16—18 углеродных атомов) может содержать до 5 *гош*-ротамеров. Возникающие при этом кинки постоянно мигрируют вдоль цепи, что приводит к появлению в бислое дефектов упаковки липидных молекул. Аналогичное влияние на упаковку оказывают *цис*-этиленовые связи, присутствие которых приводит к образованию постоянного кинка в углеводородной цепи.



При температуре ниже t_n углеводородные цепи липидных молекул имеют максимально вытянутую трансoidную конформацию и находятся в состоянии наиболее плотной упаковки. Подвижность цепей в гелевой фазе бислоя очень ограничена, и они претерпевают лишь слабые торсионные колебания. Плавление углеводородных цепей во время фазового перехода сопровождается резким усилением их вращательной и колебательной подвижности за счет повышения вероятности *гош-транс*-изомеризации и, как следствие этого, возникновения кинков в цепях. Такие кинки воздействуют на

Рис. 295. Формирование кинков на углеводородной цепи вследствие сопряженных *гош/транс*-изомеризаций: (а) — полностью трансoidная конформация цепи; (б) — 2g1-кинк; (в) — 2g2-кинк; (г) — 3g2-кинк.



структуру бислоя, вызывая укорочение цепей и увеличение расстояния между отдельными липидными молекулами. Результатом этого является уменьшение толщины бислоя, сопровождающееся его латеральным растяжением (рис. 296). Например, появление 2 кинков в каждой ацильной цепи фосфолипидной молекулы уменьшает толщину бислоя на 0,7 нм и увеличивает площадь, приходящуюся на одну молекулу, примерно на 0,22 нм². Таким образом, вследствие возрастания подвижности углеводородных цепей при температурах выше температуры фазового перехода липидный бислой становится менее упорядоченным и переводится из твердообразного гелевого состояния в жидкоподобное, текучее состояние, в котором дальний порядок в расположении липидных молекул отсутствует, а углеводородные цепи совершают хаотические движения вокруг ординарных С—С-связей.

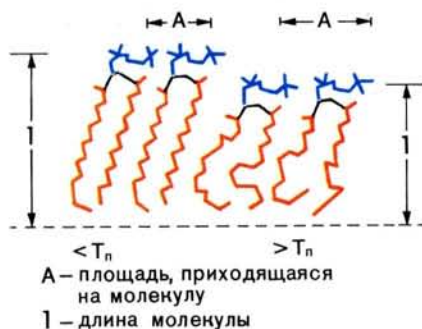


Рис. 296. Влияние фазового перехода на упаковку молекул в бислое.

В плоскости липидного бислоя распределение липидных молекул может быть неоднородным в зависимости от состава липидов, условий окружающей среды и действия различных мембранотропных агентов. Важный аспект гетерогенности липидов в бислое состоит в том, что перераспределение липидных молекул между различными доменами подразумевает их способность к легкой миграции вдоль поверхности бислоя или, иными словами, способность к так называемой латеральной диффузии. В жидкокристаллическом состоянии бислоя скорость латеральной диффузии липидных молекул очень высока. Коэффициент латеральной диффузии липидов лежит в пределах 10^{-9} — 10^{-7} см² · с⁻¹. Это означает, что за 1 с фосфолипидная молекула совершает от 1000 до 100 000 скачков с размером шага, равным ее поперечнику (~ 1 нм). Скорость латераль-

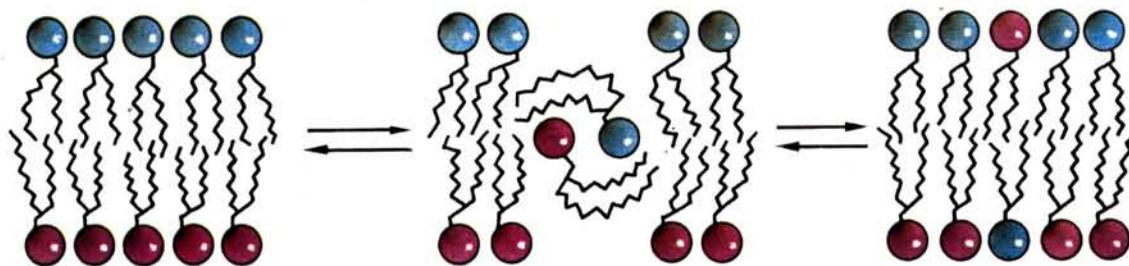
ной диффузии липидных молекул резко падает при переходе бислоя из жидкокристаллического в гелевое состояние.

В отличие от латеральной диффузии, миграция липидов с одной стороны бислоя на другую обычно происходит чрезвычайно медленно. Этот процесс получил в литературе название «флип-флоп» (рис. 297). Скорость латеральной диффузии и флип-флопа липидов была впервые измерена Р. Д. Корнбергом и Г. М. Мак-Коннелом в 1971 г. Полупериод флип-флопа составляет величины порядка нескольких часов или даже дней, т. е. фосфолипидной молекуле для пересечения бислоя толщиной в 4—5 нм понадобится целый день, тогда как в ходе латеральной диффузии она преодолевает это расстояние за $\sim 2,5$ мкс. Причина исключительно медленного флип-флопа заключается в его энергетической невыгодности, так как требуется перенести полярную головку фосфолипидной молекулы через гидрофобную область бислоя. Однако в ряде случаев скорость флип-флопа может значительно возрасти под действием ряда факторов, таких, как необычная структура липида, неустойчивое фазовое состояние бислоя или присутствие в нем молекул, облегчающих перенос полярной головки липидной молекулы через гидрофобную среду.

С трансмембранной миграцией липидов тесно связан вопрос об их распределении между двумя сторонами бислоя. В результате замыкания бислоя в везикулярные структуры обе его поверхности становятся топологически неэквивалентными: наружная поверхность бислоя в таких структурах контактирует с окружающим водным раствором, а внутренняя ограничивает собственный водный объем везикул. Более того, обе поверхности отличаются по своей кривизне — наружная является выпуклой, а внутренняя — вогнутой. Все это приводит к тому, что условия, в которых находятся липидные молекулы на разных сторонах бислоя, значительно различаются по таким параметрам, как плотность упаковки молекул, ионный состав среды, рН, наличие или отсутствие каких-либо мембрано-



Мак-Коннел (McConnell) Гарден Мерсен (р. 1927), американский физикохимик. Образование получил в университете Дж. Вашингтона в Сент-Луисе и Калифорнийском технологическом институте в Пасадене, с 1964 г. работает в Стэнфордском университете. Основные работы — по применению методов ЭПР и ЯМР в химии и исследованиях мембран и рецепторов. Связал спектры ЭПР сверхтонкой структуры с распределением спиновой плотности неспаренных электронов по углеродным атомам молекулы (1956, уравнение Мак-Коннелла).



активных веществ и др. В результате состав липидов на наружной стороне бислоя может быть иным, чем на внутренней. Это явление, известное под названием «топологической асимметрии липидов», действительно имеет место в случае везикулярных липидных мембран. Факторы, влияющие на трансмембранное распределение липидных компонентов, весьма разнообразны, и изучение их в липидных бислоях способствует пониманию механизмов формирования топологически асимметричных биологических мембран.

Рис. 297. Асимметричное распределение и флип-флоп липидных молекул в бислое.

Модельные мембраны

Бимолекулярные липидные мембраны (БЛМ), называемые также бислойнными или «черными» липидными мембранами, представляют собой широко используемую экспериментальную модель, которая позволяет воспроизводить в искусственных условиях многие свойства и характеристики биологических мембран. Структурной

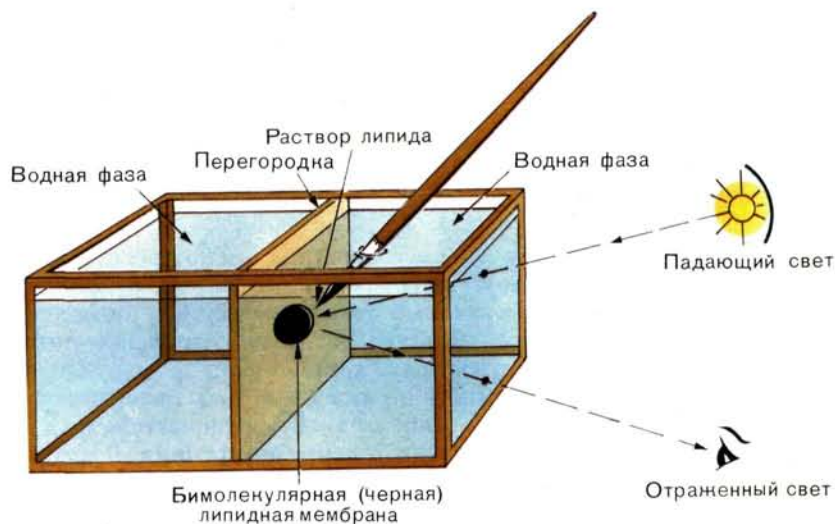
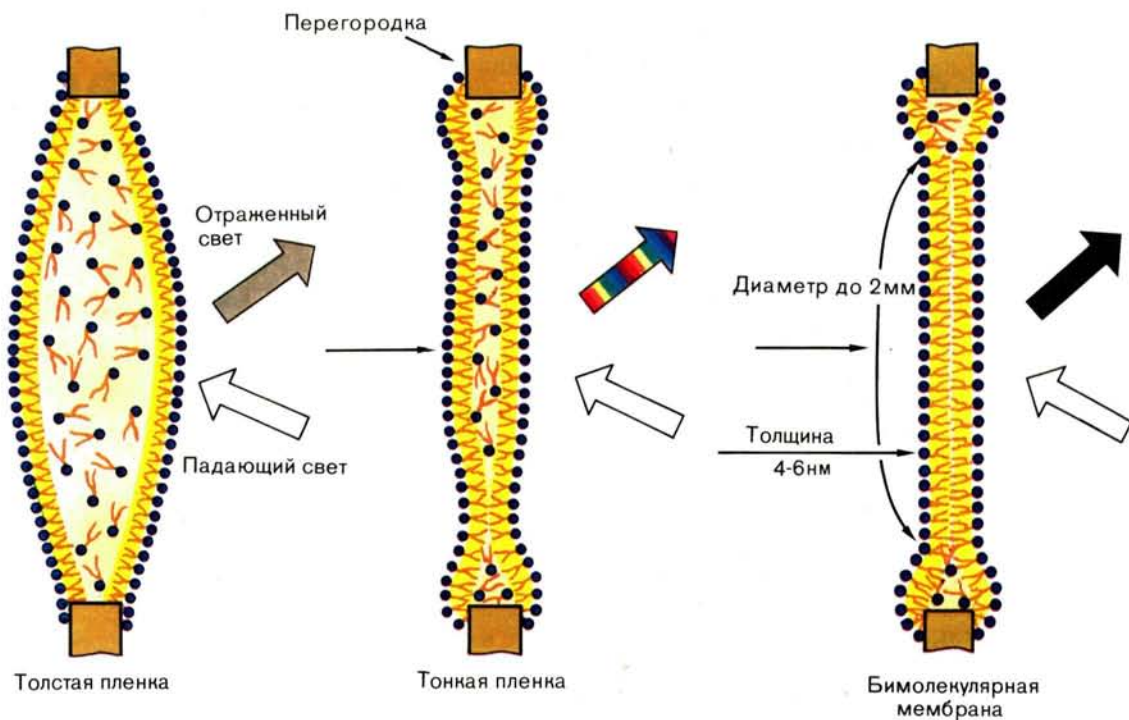


Рис. 298. Процесс формирования БЛМ.



основой таких мембран является одиночный липидный бислой, разделяющий две водные фазы и прикрепленный по периметру к инертной подложке из гидрофобного материала типа полиэтилена или тефлона. Самопроизвольное образование мембраноподобной пленки на небольшом отверстии в перегородке, разделяющей два водных отсека, было впервые описано американским ученым П. Мюллером в 1962 г.

Предложенный П. Мюллером с сотрудниками способ формирования бислойных мембран технически прост. Капельку раствора липида в органическом растворителе с помощью кисточки наносят под водой на отверстие диаметром 1—2 мм, сделанное в тонкой тефлоновой перегородке. Образующаяся при этом пленка сначала является довольно толстой и в отраженном свете имеет серый оттенок. Затем за счет действия сил поверхностного натяжения она в течение нескольких минут становится все тоньше и тоньше, приобретая вследствие интерференции света яркую, постоянно меняющуюся радужную окраску. В этот момент пленка имеет толщину в пределах 100—600 нм. Наконец на пленке появляются сначала отдельные черные пятна, а затем она вся становится «черной» (рис. 298). Это происходит за счет смыкания двух липидных монослоев в один протяженный бислой, который вследствие своей малой толщины практически утрачивает отражательную способность по отношению к видимому свету. В процессе формирования бислоя органический растворитель выдавливается к краям отверстия, где он образует визуально легко наблюдаемый толстый слой. Следует отметить, что образовавшаяся липидная пленка не является идеально бимолекулярной. Она все еще содержит довольно значительное количество остаточного растворителя, который собирается в средней области бислоя в отдельные микролинзы (рис. 299).

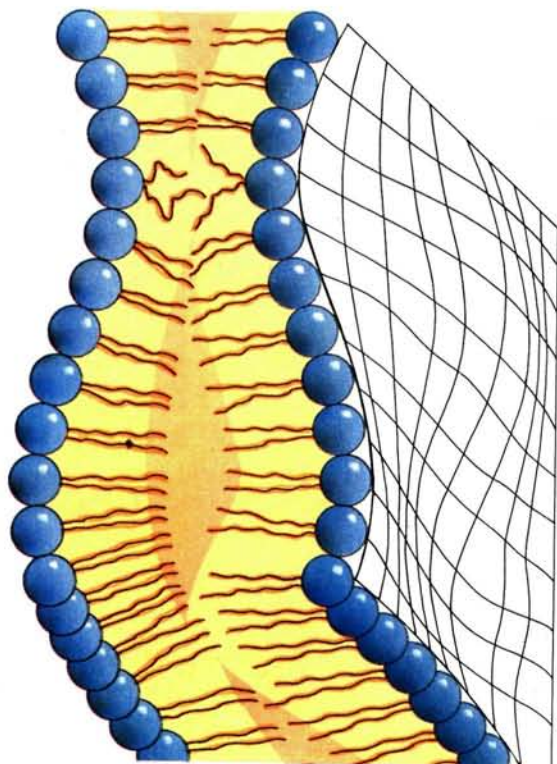


Рис. 299. Микролинзы растворителя в гидрофобной области БЛМ.

Можно, однако, приготовить так называемые «сухие» бислойные мембраны, не содержащие органического растворителя, путем механического приведения в соприкосновение двух мономолекулярных слоев, образуемых липидом на границе раздела вода — воздух. Этот способ впервые был предложен японскими исследователями (М. Такаги и сотр., 1965) и впоследствии был усовершенствован М. Монталом (1972—1974). Важным преимуществом метода формирования БЛМ по М. Монталу является возможность получения асимметричных мембран из исходных монослоев разного липидного состава (рис. 300).

Для формирования бимолекулярных липидных мембран могут быть использованы в чистом виде или в смеси практически любые липиды. В первых работах мембраны приготавливали из плохо охарактеризованных тканевых липидных экстрактов и затем получали их из индивидуальных липидов, как природных, так и синтетических. При формировании БЛМ по методу П. Мюллера применяется широкий набор различных растворителей, однако наилучшие результаты дает использование высших нормальных алканов, таких, как *n*-декан или *n*-тетрадекан.

Несмотря на кажущуюся простоту приготовления БЛМ, работа с ними требует от экспериментатора большого мастерства, терпения и настойчивости. Существенной является проблема стабильности бислойных мембран, так как рано или поздно, а чаще всего в самый неподходящий момент любая мембрана лопается. Время жизни

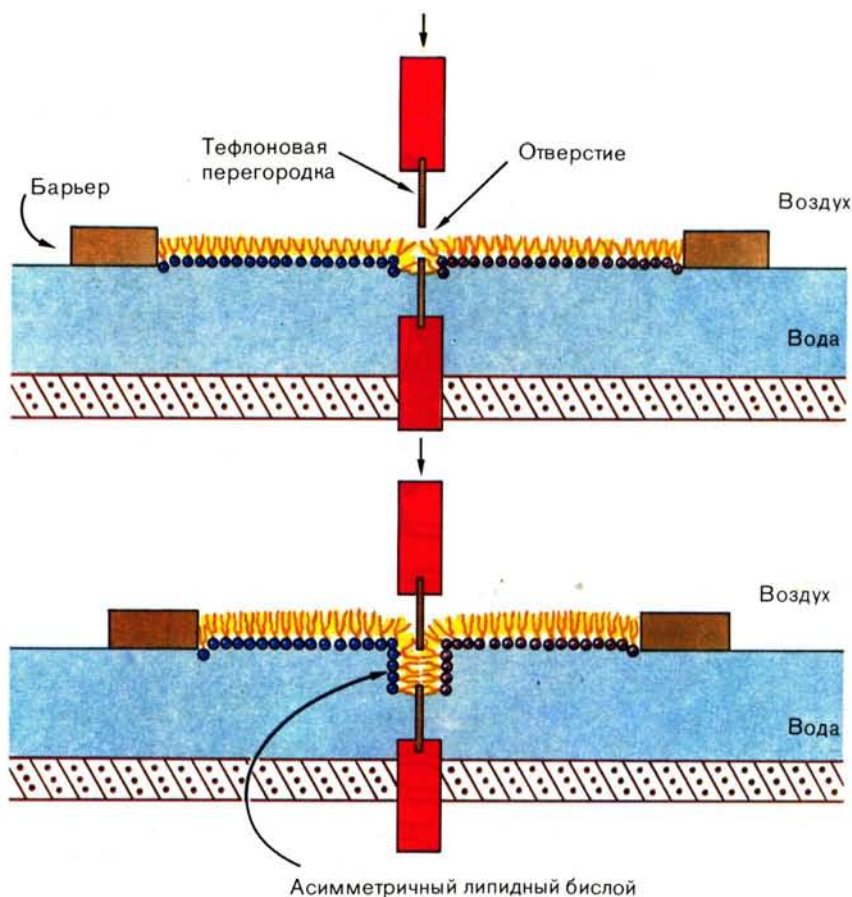


Рис. 300. Схема формирования БЛМ из двух монослоев.

мембран обычно варьирует от нескольких минут до 1—3 ч. Нестабильность бислоевых мембран вызывают разнообразные факторы, такие, как наличие нежелательных примесей в образце, окисление липидов, загрязнение оборудования и посуды, неподходящий для формирования растворитель, колебания температуры, вибрация, резкие перепады концентрации и вязкости среды и т. д. Тем не менее образующийся липидный бислой обладает исключительно высокой механической прочностью и эластичностью. Бислоевые мембраны выдерживают осторожное прикосновение стеклянной палочки, несколько прогибаясь при ее нажиме. Они легко деформируются под действием механического или осмотического давления, переходя при этом из плоской конфигурации в полусферу и обратно. Можно даже выдувать из бислоя так называемые сферические бислои, которые представляют собой пузырьки довольно большого размера с площадью поверхности до 50 мм^2 (рис. 301). Более того, липидный бислой такого пузырька или плоской мембраны можно проткнуть волосом, тонкой проволокой или кончиком стеклянного микроэлектрода и вынуть их обратно, не вызвав разрушения мембраны. Таким образом, липидный бислой обладает не только высокой прочностью, но и способностью к «самозалечиванию» его повреждений.

БЛМ отличаются также исключительно высокой устойчивостью к кратковременному действию сильного электрического поля. Электрический пробой мембраны происходит при потенциале около

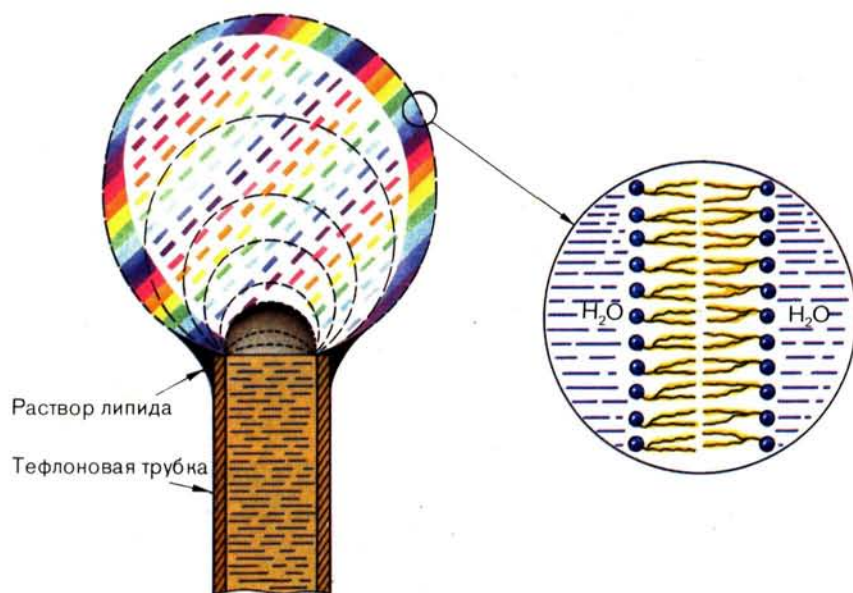


Рис. 301. Образование сферической БЛМ.

$4 \cdot 10^5 \text{ В/см}$. По своим диэлектрическим свойствам липидный бислой не уступает лучшим из известных в настоящее время изоляторов, таким, как, например, твердый парафин, циркониевый фарфор или поливинилхлорид. При этом, в отличие от пробоя в твердых телах, действие электрического поля на бислой является обратимым: после снятия поля мембрана полностью восстанавливает свои функции.

Какие характеристики липидного бислоя можно изучать, используя БЛМ как мембранную модель? На рисунке 302 показана схема экспериментальной установки, обычно применяемой для проведения измерений на бислойных мембранах. Лучше всего эта модельная система подходит для измерения электрических характеристик липидного бислоя, таких, как электрическая емкость, проводимость, потенциал пробоя, мембранные потенциалы и др. Именно благодаря возможности проведения разнообразных электрических измерений БЛМ сыграли исключительно важную роль в изучении ионного транспорта через биологические мембраны. В таблице 25 сравниваются некоторые физические характеристики БЛМ и биологических мембран.

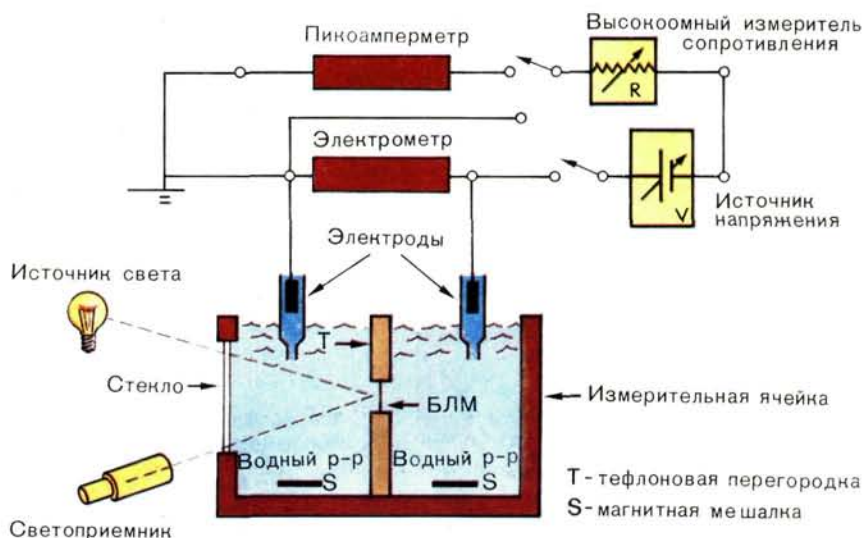


Рис. 302. Схема экспериментальной установки для изучения БЛМ.

Таблица 25

Сравнение некоторых свойств искусственных бислойных и биологических мембран

Свойства	Бислойные мембраны	Биологические мембраны
Толщина (нм)	4 – 9	4 – 13
Электрическое сопротивление (Ом · см ²)	10 ⁶ – 10 ⁹	10 ² – 10 ⁵
Электрическая емкость (мкФ · см ⁻²)	0,33 – 1	0,5 – 1,3
Потенциал пробоя (В/см)	10 ⁵ – 10 ⁶	10 ² – 10 ⁵
Поверхностное натяжение (мН · м ⁻¹)	0,5 – 2	0,03 – 1
Проницаемость (мкм · с ⁻¹ · 10 ²)		
вода	31,7	0,37 – 400
мочевина	4,2	0,015 – 280
глицерин	4,6	0,003 – 27
эритрит	0,75	0,007 – 5

Включение мембранных белков в бимолекулярные липидные мембраны открывает новые перспективы на пути дальнейшего сближения этой модельной системы с биологическими мембранами. В качестве примера успешной реконструкции функционально активных бислоевых мембран можно привести слияние белок-содержащих липосом с уже сформированными мембранами в условиях осмотического стресса или под действием ионов Ca^{2+} и других агентов, облегчающих слияние мембран (рис. 303).

Таким образом, возможности практического использования бислоевых мембран в различных исследованиях весьма широки и перспективы их применения непрерывно растут. Следует также указать на реальную возможность создания на основе бислоевых мембран биосенсорных устройств. Можно ожидать, что созданные на этом принципе устройства будут обладать высокими технологическими параметрами, легкостью использования, портативностью, биосовместимостью и дешевизной.

Липосомы. Другой модельной системой, хорошо воспроизводящей многие свойства биологических мембран, являются *липосомы*. На возможность использования липосом в качестве моделей биологических мембран впервые обратил внимание А. Бэнгхем. В 1965 г. он показал, что фосфолипиды при набухании в воде самопроизвольно образуют пузырькообразные частицы, которые состоят из множества замкнутых липидных бислоев, разделенных водными промежутками. Использование липосом в качестве модельных систем оказалось исключительно плодотворным и позволило выяснить целый ряд вопросов, касающихся молекулярной организации и функционирования биологических мембран.

В зависимости от размера частиц и числа образующих их липидных слоев липосомы подразделяются на три основных типа:

— многослойные (мультиламеллярные) липосомы, имеющие диаметр 5—10 мкм и насчитывающие до нескольких десятков, а то и сотен липидных бислоев;

— малые мономламеллярные липосомы, образованные одинарным липидным бислоем и имеющие диаметр в пределах 20—50 нм;

— крупные мономламеллярные липосомы, также образованные одинарным бислоем, с диаметром обычно от 50 до 200 нм, а иногда и более.

Многослойные липосомы (рис. 304), как правило, легко образуются при простом механическом встряхивании водной дисперсии набухшего липида. При этом получается гетерогенная взвесь липо-

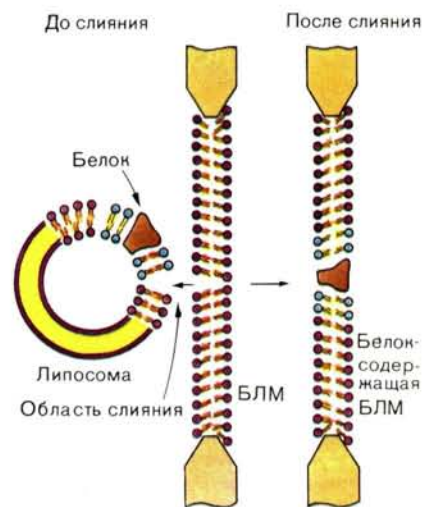


Рис. 303. Образование белоксодержащих БЛМ путем слияния липосом с плоским бислоем.

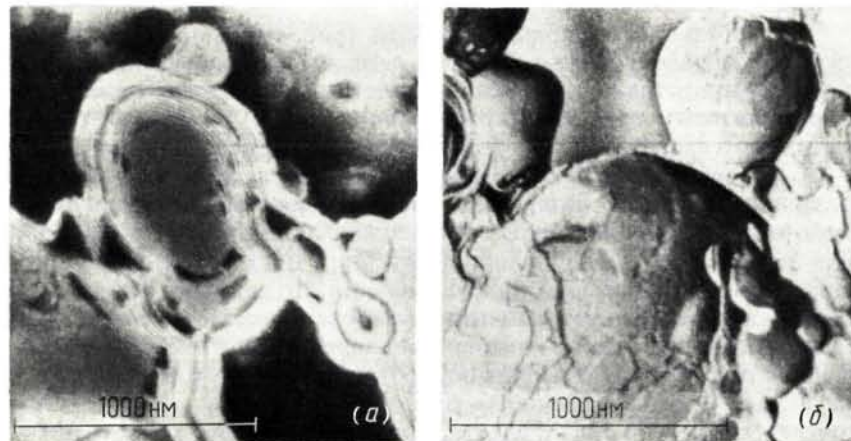


Рис. 304. Микрофотографии многослойных липосом, образовавшихся из фосфатидилхолина: (а) — негативное контрастирование молибдатом аммония; (б) — «замораживание — скалывание» (см. с. 583).



Бэнгхем (Bangham) Алек Д. (р. 1921), английский биофизик. Окончил Лондонский университет (1944), с 1952 г.— в Институте физиологии животных в Бабрахаме. Основные работы — по изучению физики и химии клеточной поверхности, явлений адгезии и слияния клеток, свойств фосфолипидов и модельных мембран. Впервые предложил использовать липосомы в качестве моделей биологических мембран.

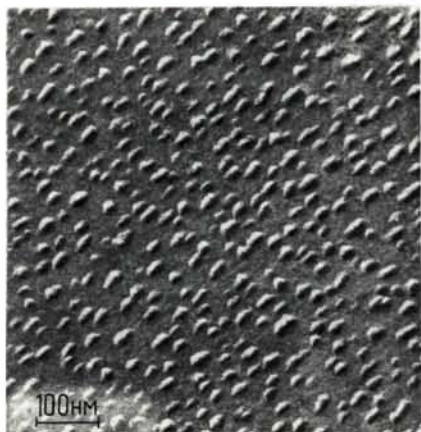


Рис. 305. Микрофотография малых моноламеллярных липосом, приготовленных из фосфатидилхолина обработкой ультразвуком (негативное контрастирование фосфовольфрамом калия).

сом с широким распределением частиц по размерам. Сравнительно гомогенную дисперсию липосом можно получать, пропуская их через фильтры с определенным размером пор. Способность фосфолипидов к диспергированию в водной среде с образованием липосом зависит от температуры фазового перехода липида. Так, липосомы легко получаются из ненасыщенных фосфолипидов, которые при обычных температурах находятся в жидкокристаллическом состоянии. В то же время фосфолипиды с насыщенными жирнокислотными остатками образуют липосомы только при температурах, превышающих температуру их фазового перехода. Существенную роль играет также природа полярной группы фосфолипида. Например, фосфатидилэтаноламин не дает замкнутых бислоев при диспергировании в солевых растворах при нейтральных рН. Это объясняется слабой гидратацией полярных групп фосфатидилэтаноламина вследствие образования солевой связи между аминокруппами и фосфатными группами соседних молекул. Однако липосомы удается получить, если диспергирование фосфатидилэтаноламина проводить в растворах с низкой ионной силой и при высоких значениях рН или диспергировать фосфатидилэтаноламин в смеси с фосфатидилхолином.

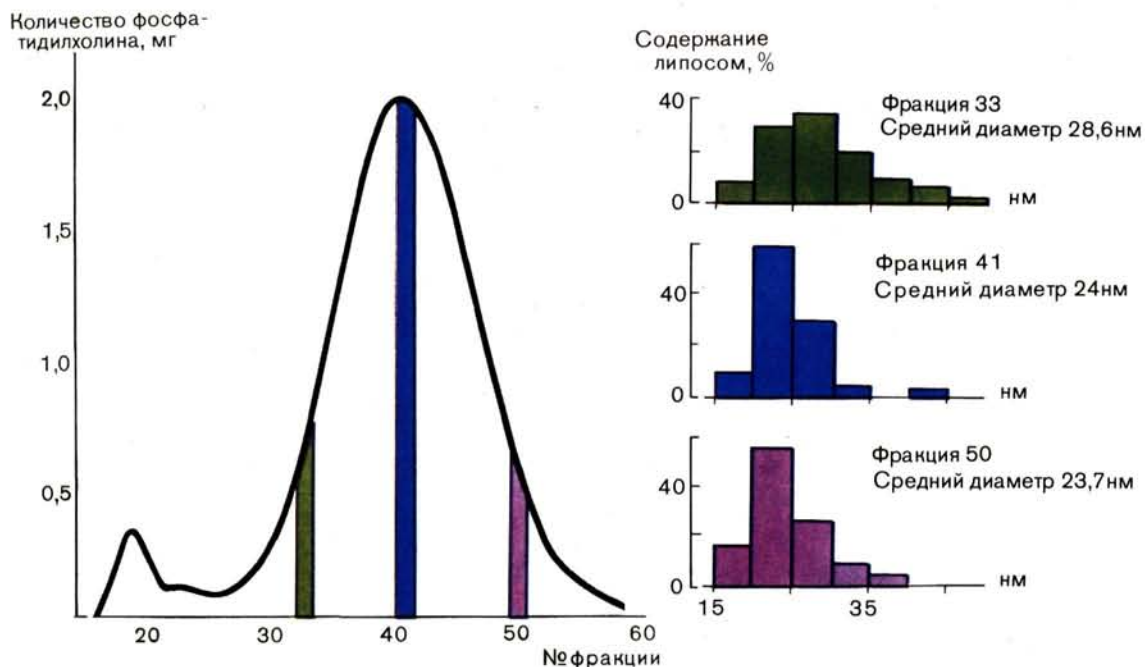
По данным рентгеноструктурного анализа общая толщина липидного бислоя в многослойных липосомах из яичного фосфатидилхолина составляет 4 нм, а толщина его диглицеридной части равна 3 нм. Площадь, приходящаяся на одну молекулу фосфатидилхолина в липосомальном бислое, составляет около $0,72 \text{ нм}^2$, что соответствует площади в фосфатидилхолиновом монослое, сжатом до давления $2,0\text{—}2,5 \cdot 10^{-4} \text{ н/см}$. Толщина водного промежутка между двумя соседними липидными бислоями составляет около 2—3 нм, но может возрастать до 20 нм и более в случае заряженных бислоев. Соответственно увеличивается и суммарный внутренний водный объем липосом. В среднем объем водной фазы многослойных липосом обычно составляет около 20—40% от их общего объема. В расчете на 1 моль липида ($\sim 1000 \text{ г}$) многослойные липосомы могут включать от 1 до 4 л воды.

Большая часть внутренней воды многослойных липосом осмотически активна, благодаря чему они обладают свойствами идеального осмометра, меняя свой объем в ответ на изменение концентрации наружного раствора. В гипотонических растворах вода устремляется внутрь липосом и они быстро набухают. В гипертонических средах липосомы «сморщиваются» за счет потери воды из межламеллярного пространства. Однако часть воды в липосомах остается осмотически неактивной. Например, у яичного фосфатидилхолина на 1 молекулу липида приходится около 25 молекул осмотически неактивной воды, что отвечает минимальной ширине межламеллярного пространства в 1,2—1,4 нм.

Малые моноламеллярные липосомы (рис. 305) могут быть получены при обработке многослойных липосом ультразвуком. Другие способы приготовления малых липосом включают инъекцию (впрыскивание) спиртовых растворов липидов в водную среду, экструзию (продавливание) водных липидных дисперсий под большим давлением в так называемом прессе Френча, а также удаление солибилизирующего детергента диализом или гель-фильтрацией. Гомогенную фракцию малых липосом удается выделить при их гель-фильтрации на крупнопористых агарозных гелях (рис. 306) либо с помощью ультрацентрифугирования. По данным светорасеяния, аналитического ультрацентрифугирования и электронной микроскопии, средний диаметр моноламеллярных липосом, полученных из яичного фосфатидилхолина обработкой ультразвуком, составляет 25 нм, а их молекулярная масса равна $1,5 \cdot 10^6$ — $2,1 \cdot 10^6$. Это соответствует 2—3 тыс. молекул фосфатидилхолина на одну липо-

сому. Диаметр внутренней водной полости малых липосом составляет 7—8 нм. Удельный водный объем малых липосом сравнительно невелик и составляет всего 0,2—1,5 л/моль липида. В отличие от многослойных малые мономеллярные липосомы не проявляют осмотической активности.

Размер липосом, получаемых обработкой ультразвуком, зависит от природы используемого липида. В случае кислых фосфолипидов (например, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит и др.) образуются, как правило, липосомы меньшего размера (диаметр около 20 нм). Размер однослойных липосом также уменьшается по мере снижения длины жирнокислотных цепей фосфолипидных молекул. Напротив, включение холестерина в липосомы приводит к увеличению их диаметра до 35—40 нм.



Вследствие того что размеры малых липосом по порядку величины сравнимы с толщиной образующего их липидного бислоя, имеются значительные различия в расположении и характере упаковки липидных молекул на наружной и внутренней сторонах мембраны. Прежде всего это проявляется в различном количестве молекул на обеих сторонах бислоя: в липосомах диаметром 20—25 нм наружный монослой содержит примерно вдвое больше липидных молекул, чем внутренний. Впервые такое различие удалось показать в 1969 г. В. Ф. Быстрову и Л. И. Барсукову с помощью предложенного ими метода ЯМР с использованием гидрофильных парамагнитных зондов, сдвигающих или уширяющих сигналы от молекул на наружной стороне бислоя (рис. 307). Метод оказался также весьма полезным в установлении факта спонтанно возникающей асимметрии липидного бислоя в малых липосомах. В зависимости от размера полярных групп, их заряда, а также от длины и степени ненасыщенности углеводородных цепей наружный и внутренний монослой малых везикул могут значительно различаться по своему липидному составу (рис. 308). Как правило, на наружной стороне бислоя находятся преимущественно те липиды, которые имеют более крупную полярную головку, нескомпенсированный заряд, а также более длинные насыщенные углеводородные цепи. Липидные молекулы с более короткими или ненасыщенными жирнокислотными остатками располагаются предпочтительно во внутренней половине бислоя.

Рис. 306. Элюирование малых мономеллярных липосом на колонке с 2%-ным гелем агарозы.

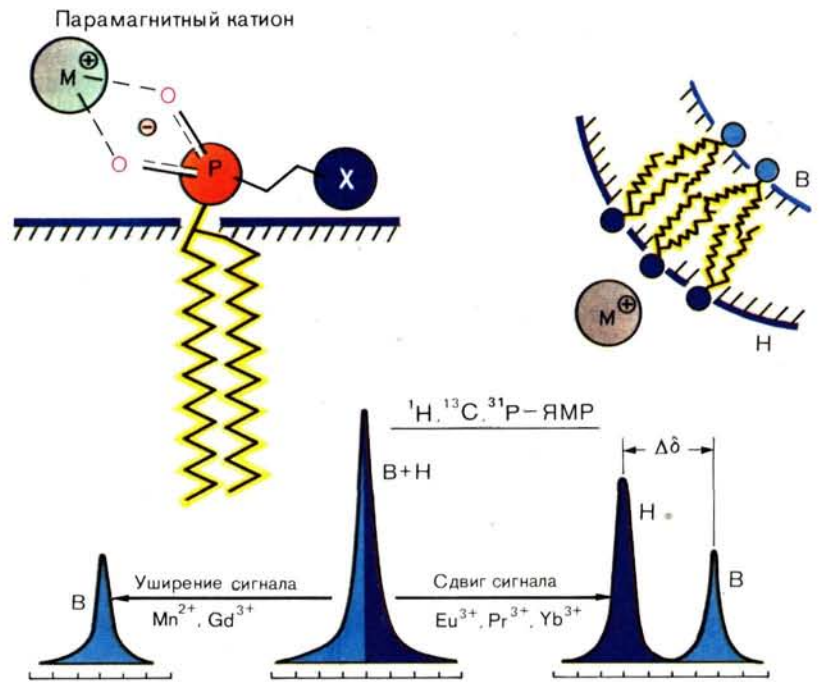


Рис. 307. Дифференциация наружной и внутренней сторон бислоя методом ЯМР (В — внутренний, Н — наружный).

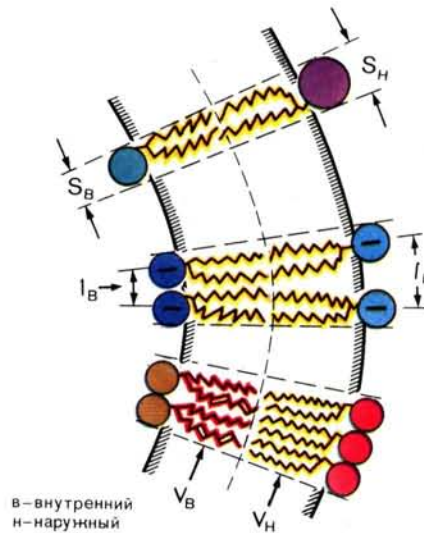


Рис. 308. Асимметрия липидного бислоя на участках большой кривизны:
 S — площадь, приходящаяся на одну липидную молекулу на границе раздела мембрана — вода;
 l — расстояние между полярными головками соседних липидных молекул;
 V — объем, занимаемый углеводородными цепями липидных молекул.

Липидные дисперсии, состоящие из малых моноламеллярных липосом, как правило, отличаются высокой устойчивостью к агрегации и не коагулируют в течение длительного времени. Поэтому эти дисперсии оказались весьма подходящими объектами для исследования различными спектральными методами. Недостатком малых липосом является небольшой внутренний объем, что ограничивает возможности их применения для моделирования транспортных функций мембранных систем.

Этого недостатка лишены большие моноламеллярные липосомы (рис. 309), которые в настоящее время широко используются для реконструкции различных систем мембранного транспорта. По своим свойствам они занимают промежуточное положение между малыми моноламеллярными липосомами и многослойными липосомами. Как и последние, большие моноламеллярные липосомы имеют значительный внутренний удельный водный объем (8—14 л/моль липида) и обладают осмотической активностью. В то же время к ним применимы многие спектральные методы, что позволяет более полно охарактеризовать свойства образующего их липидного бислоя. Методы получения крупных моноламеллярных и малых липосом во многом сходны. Они включают, например, удаление солибилизирующего детергента в условиях контролируемого диализа, а также инъекцию раствора липида в легколетучем растворителе (диэтиловый эфир, петролейный эфир, пентан) в подогретую до 60 °С водную фазу (метод обращенно-фазового упаривания). Крупные однослойные липосомы могут быть также получены из малых липосом путем их слияния под действием ионов Ca^{2+} или в условиях термотропного фазового перехода.

В процессе приготовления липосом в их внутренний водный объем включаются те вещества, которые содержатся в исходном водном растворе. Обмен этими веществами между липосомами и окружающей средой связан с их прохождением через липидный бислой, являющийся диффузионным барьером, вследствие чего липосомы широко используются для выяснения барьерной функции липидов и для моделирования различных транспортных процессов.

Существующие методы изучения проницаемости липосом можно разделить на две группы: 1) методы, основанные на прямом измерении количества какого-либо вещества, вышедшего из липосом за определенный промежуток времени; 2) методы, основанные на осмотических свойствах липосом. Наибольшее распространение получил метод прямого измерения концентрации диффундирующего вещества. Этот метод сравнительно прост в техническом отношении и особенно пригоден для веществ, имеющих низкую проницаемость, например для неорганических катионов и анионов, глюкозы, аминокислот и т. д. Обычно используются соединения, меченные радиоактивными изотопами: соли, содержащие $^{22}\text{Na}^+$, $^{24}\text{Na}^+$, $^{42}\text{K}^+$, $^{36}\text{Cl}^-$, $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ или органические соединения, меченные ^{14}C или ^3H .

Как модели, липосомы значительно ближе к биологическим мембранам, чем бислоиные липидные пленки. Как и биологические мембраны, они представляют собой замкнутые системы, что делает их пригодными для изучения пассивного транспорта ионов и малых молекул через липидный бислой. В отличие от БЛМ, липосомы достаточно стабильны и не содержат органических растворителей. Состав липидов в липосомах можно произвольно варьировать и таким образом направленно изменять свойства мембраны. В настоящее время хорошо разработаны методы включения функционально-активных мембранных белков в липосомы. Такие искусственные белково-липидные структуры обычно называются *протеолипосомами* (рис. 310). Благодаря возможности реконструкции мембраны из ее основных компонентов удается моделировать ферментативные, транспортные и рецепторные функции клеточных мембран. В липосомы можно ввести антигены, а также ковалентно присоединить антитела (рис. 311) и использовать их в иммунологических исследованиях. Они представляют собой удобную модель для изучения действия многих лекарственных веществ, витаминов, гормонов, антибиотиков и т. д. Как уже отмечалось, при образовании липосом водорастворимые вещества захватываются вместе с водой и попадают во внутреннее пространство липосом. Таким путем можно «начинать» липосомы различными веществами, включая

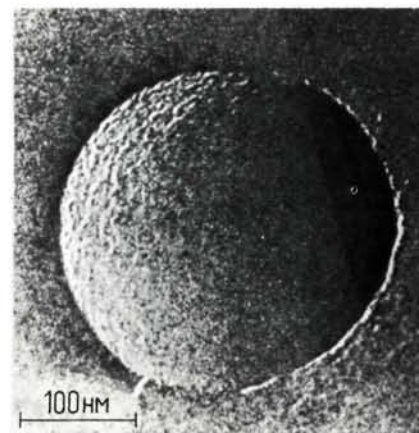


Рис. 309. Микрофотография сколов крупных моноламеллярных липосом, полученных из азолектина удалением хлорида натрия диализом. Оттенение Pt—С.

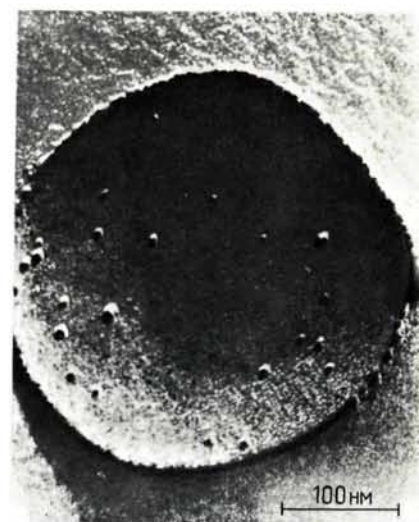


Рис. 310. Микрофотография сколов реконструированных протеолипосом, содержащих Na^+ , K^+ -АТФазу почечки свиньи. Оттенение Pt—С.

лекарственные препараты, пептиды, белки и даже нуклеиновые кислоты и их фрагменты.

В настоящее время во многих лабораториях мира ведутся интенсивные работы по выяснению возможностей медицинского применения липосом в качестве средства доставки различных лекарственных препаратов в определенные органы и ткани с целью воздействия на целый организм. По-видимому, наиболее интересные

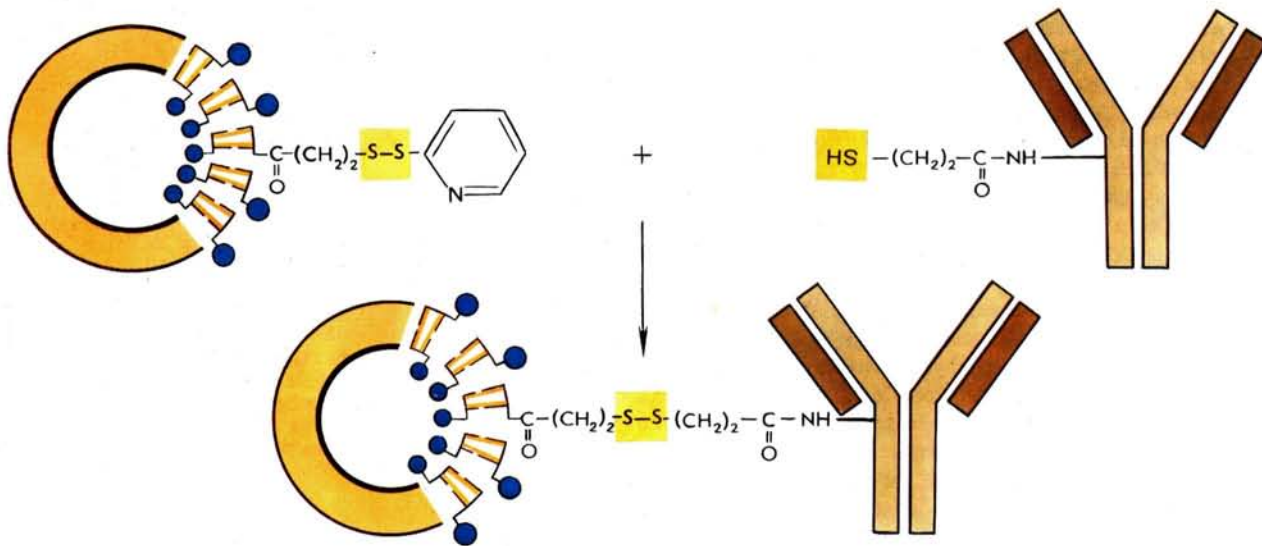


Рис. 311. Ковалентное присоединение антител к липосомам.

перспективы практического применения липосом связаны с химиотерапией рака, лечением диабета, артрита и лейшманиоза, коррекцией ферментной недостаточности и исправлением дефектов клеточных мембран, модификацией иммунного ответа организма, а также с введением РНК и ДНК в клетки для решения проблем генной инженерии и биотехнологии.

Молекулярная организация биологических мембран

В стремлении понять то, как устроены биологические мембраны, многие исследователи давно пытались свести все разнообразие различных мембранных систем к одной универсальной модели, которая объясняла бы имеющиеся экспериментальные факты. Однако возникновение новых методов открывало неизвестные ранее стороны в функционировании и структуре мембран и приводило к рождению новых идей и концепций.

Первые представления о структуре биологических мембран, по-видимому, следует связывать с предположением Э. Овертона о том, что мембрана должна иметь липидную природу (1899). В 1925 г. голландские исследователи Э. Гортер и Ф. Грендель измерили площадь, занимаемую в монослое липидами, экстрагированными из мембраны эритроцитов, и пришли к выводу, что количества липидов, имеющихся в одной клетке, достаточно для образования по всей ее поверхности сплошного слоя толщиной в две молекулы. На основании этого они высказали гипотезу, что клеточная мембрана представляет собой двойной липидный слой, в котором гидрофильные группы липидных молекул локализованы на поверхности, а углеводородные цепи образуют гидрофобную внутреннюю область. Несмотря на то что в работе были допущены методические ошибки, представление о липидном бислое как о полупроницаемом барьере, окружающем клетку, захватило воображение биологов того времени и дало мощный толчок развитию дальнейших исследований.

Мысль о том, что с мембранами связаны белки, высказал впервые Дж. Даниелли в 1935 г. в связи с необходимостью объяснить явное расхождение между поверхностным натяжением на границе раздела масло — вода и мембрана — вода. Хотя в то время какая-либо информация о мембранных белках отсутствовала, Дж. Даниелли и Х. Давсон в том же 1935 г. выдвинули гипотезу об общем принципе структурной организации клеточных мембран, в соответствии с которым мембрана представляется как трехслойная структура (рис. 312) — своеобразный сэндвич, где двойной слой ориентированных одинаковым образом липидных молекул заключен между двумя слоями глобулярного белка, формирующего границу мембраны с водой. Предполагалось, что в этой структуре связывание липидов с белками осуществляется за счет полярных взаимодействий. Поскольку толщина мембраны в то время не была известна, считалось, что пространство между двумя липидными монослоями может быть заполнено липоидным, жироподобным материалом.

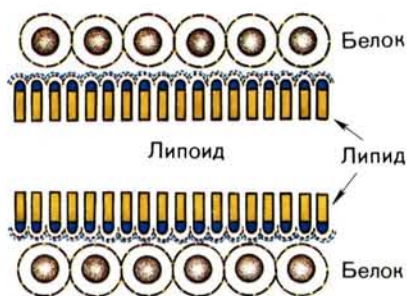


Рис. 312. Модель Даниелли — Давсона.

Впоследствии Дж. Даниелли в совместной работе с В. Стейном (1956) несколько усовершенствовал предложенную ранее модель, чтобы учесть возможность гидрофобных взаимодействий неполярных боковых цепей аминокислотных остатков с липидными молекулами, а также согласовать ее с уже известным в то время фактом облегченной диффузии через мембрану некоторых низкомолекулярных водорастворимых веществ. Было предположено, что белок на поверхности мембраны находится в развернутой конформации, а его алифатические цепи частично проникают в липидный бислой (рис. 313). На отдельных участках мембраны белок полностью пронизывает липидный бислой, формируя в нем поры, через которые могут транспортироваться различные водорастворимые вещества.

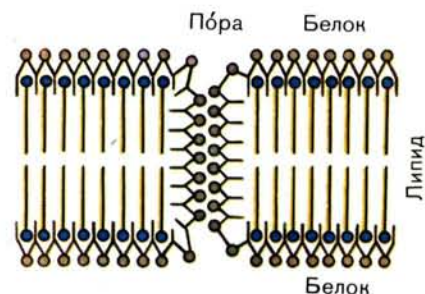
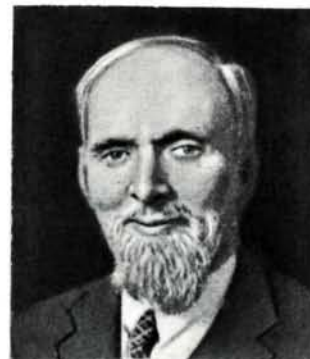


Рис. 313. Модель Стейна — Даниелли.



Гортер [Gorter] Эверт (1881—1954), голландский химик. Образование получил в Лейдене и Париже, с 1923 г. — профессор Лейденского университета. Основные работы посвящены коллоидной химии. Изучал мономолекулярные слои жирных кислот и белков, разработал методы анализа белков.

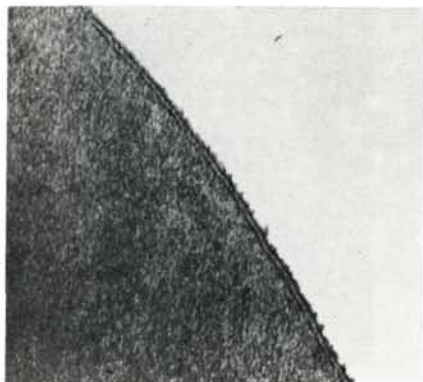


Рис. 314. Микрофотография мембраны эритроцита, полученная методом ультратонких срезов.

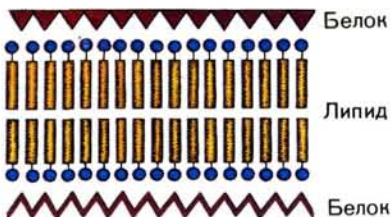
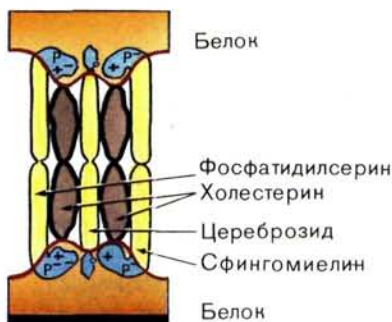


Рис. 315. Модель Робертсона.



Модель мембраны по Финеану

За период с 1936 по 1960 г. с помощью методов дифракции рентгеновских лучей, поляризационной микроскопии, измерений электрических характеристик мембран, их проницаемости и поверхностной активности были получены многочисленные факты, свидетельствующие в пользу моделей Даниелли — Давсона. Но наиболее мощную поддержку эта модель получила на рубеже 1950—1960 гг. благодаря прогрессу, достигнутому в технике приготовления ультратонких срезов тканевых препаратов для электронной микроскопии. На полученных микрофотографиях различных мембран была отчетливо видна трехслойная структура толщиной 6—12,5 нм, состоящая из двух темных слоев электроплотного материала по краям и светлого слоя в середине (рис. 315). Такая картина прекрасно соответствовала модели липопротеинового сэндвича, предложенной Дж. Даниелли и Х. Давсоном.

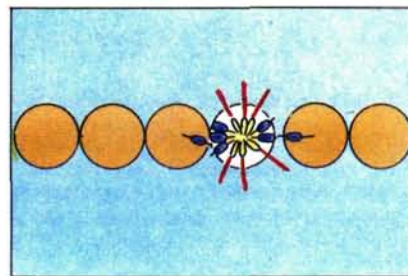
Трехслойная структура наблюдалась на фиксированных срезах многих биологических мембран. Основываясь на этом морфологическом сходстве, Дж. Д. Робертсон в 1959 г. предположил, что все клеточные мембраны — как плазматические, так и внутриклеточные — построены по единому принципу, и высказал концепцию унитарной (или единообразной) мембраны. В целом модель, предложенная Дж. Д. Робертсоном в 1960 г. (рис. 314), во многом сходна с классической моделью Дж. Даниелли: основу мембраны составляет липидный бислой, а ее нелипидные компоненты (прежде всего белок) в полностью развернутой конформации лежат на поверхности бислоя, связываясь с липидами электростатически и за счет гидрофобных взаимодействий. Однако в модели Робертсона нашла отражение еще одна важная структурная особенность мембраны — ее асимметрия.

На структурную асимметрию биологических мембран указывали данные дифракции рентгеновских лучей, свидетельствовавшие о неодинаковом характере распределения электронной плотности на противоположных сторонах мембраны. В этом отношении представляет интерес модель мембраны миелина, описанная Дж. Б. Финеаном в 1957—1966 гг., в которой на основании данных рентгеновской дифракции подчеркнуты различия в распределении белка между двумя сторонами мембраны. Особенность модели Финеана состоит еще и в том, что она представляет собой первую попытку описать структуру конкретной мембраны на основе рассмотрения реальной формы образующих ее липидных молекул.

Дальнейшее развитие техники электронной микроскопии, сопровождавшееся улучшением разрешения, и в частности применение нового метода, основанного на негативном контрастировании мембранных препаратов, позволило выявить морфологически более сложную картину структурной организации биологических мембран. Оказалось, что во многих случаях, и особенно на микрофотографиях внутриклеточных органелл, мембрана выглядит не как сплошная трехслойная линия, а как гранулярная структура, имеющая разрывы (или поры) и состоящая из отдельных глобулярных частиц.

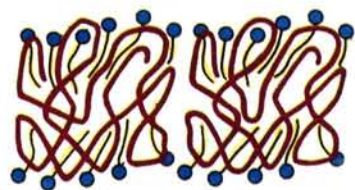


Модель Шёстранда



Модель Люси

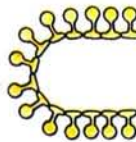
Более того, попытки разобрать мембрану с помощью детергентов привели к получению отдельных липопротеиновых фрагментов, из которых при удалении детергента удавалось вновь собрать мембраноподобные структуры. Эти факты вызвали сомнения в правильности модели Робертсона и породили целый ряд новых моделей, в той или иной форме отражающих концепцию глобулярной организации биологических мембран.



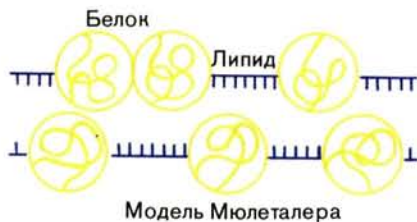
Модель Бенсона



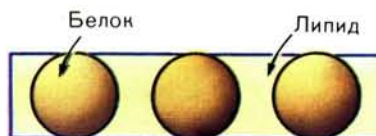
Модель Грина — Пердюю



Так, Ф. С. Шёstrand в 1963 г. предположил, что глобулярные частицы в мембране представляют собой липиды в форме мицелл. Полярные головки липидных молекул находятся на поверхности мицелл, покрытых слоем белка. В модели, предложенной Дж. А. Люси (1964), мицеллярная форма приписывалась не только липидам, но и белкам, а вся мембрана рассматривалась как структура, построенная из чередующихся липидных мицелл и белковых глобул. А. А. Бенсон (1966) рассматривал мембрану как ассоциат липопротеиновых комплексов своеобразной структуры, в которых углеводородные цепи липидов тесно переплетены с белковой полипептидной цепью и удерживаются ею за счет гидрофобных взаимодействий; при этом отрицательно заряженные головки фосфолипидов находятся на поверхности липопротеиновых комплексов. Согласно модели Д. Е. Грина и Дж. Ф. Пердюю (1966), предложенной прежде всего применительно к митохондриям, основой мембраны является регулярно построенный ассоциат липопротеиновых субъединиц довольно сложной конфигурации.



Модель Мюлеталера



Модель Брэнтона

Благодаря усилиям К. Мюлеталера (1963) и впоследствии Д. Брэнтона (1966) был разработан новый вариант электронной микроскопии, не требующий предварительной фиксации и окрашивания мембранного препарата и потому устраняющий возможность появления связанных с данными операциями артефактов. Метод, получивший название «замораживание — скалывание», и его модификация, известная как «замораживание — травление», основаны на раскалывании быстро замороженных препаратов мембран по их гидрофобной области (рис. 316). На электронных микрофотографиях поверхность скола многих мембран выглядела как гладкий матрикс, испещренный большим количеством нерегулярно расположенных внутримембранных частиц. Хотя электронная микроскопия не давала возможности химически идентифицировать эти характерные структурные образования, однако косвенные данные говорили о том, что внутримембранные частицы имеют белковую природу. Исходя из полученной картины, мембрану можно было представить как сложную мозаику, состоящую из липидного бислоя, в который вкраплены многочисленные мембранные белки. Некоторые из них лишь частично погружены в бислой, тогда как другие пронизывают его насквозь.

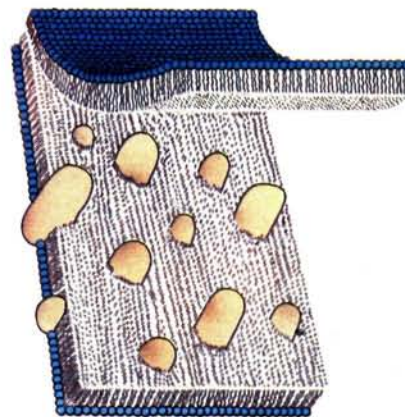


Рис. 316. Раскалывание мембраны по методу «замораживания — скалывания».



Робертсон [Robertson] Джеймс Дэвид (р. 1922), американский биофизик. Окончил Алабамский университет (1942), с 1966 г.— профессор университета Дьюка в Дареме. Известен работами по изучению биологических мембран с помощью электронной микроскопии, автор унитарной модели организации мембран.

В середине 60-х годов химия мембранных белков только зарождалась и делались первые попытки найти подходы к разработке методов их выделения и характеристики. Было известно, что мембраны различного происхождения содержат разное количество белка (от 20 до 75% от сухой массы). Многие мембрано-связанные белки обладают ферментативной активностью. В ряде случаев экстракция липидов из мембраны приводила к полной утрате или к значительному снижению ферментативной активности. Иногда активность удавалось восстановить после обратного добавления липидов. Более детально изучать мембранные белки было затруднительно: они плохо растворялись как в воде, так и в органических растворителях.

Решающий сдвиг в исследованиях мембранных белков произошел, когда в экспериментальную практику был введен метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии анионного детергента — додецилсульфата натрия (А. Л. Шапиро с сотр., 1967; К. Вебер и М. Осборн, 1969). Оказалось, что большинство мембран содержат весьма богатый набор белков, причем точное определение их числа в каждой мембране ограничивается главным образом разрешающей способностью методов, используемых для анализа. Эти работы положили начало широкому использованию различных детергентов для выделения, очистки и анализа индивидуальных мембранных белков.

По своему аминокислотному составу типично мембранные белки часто не отличались от обычных водорастворимых белков. Это подтверждало предположение о том, что особенностью мембранных белков является характерная последовательность расположения гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков в полипептидной цепи.

Принципиально важное значение для выработки правильного взгляда на структуру мембран имело открытие В. Луццати в 1968 г. фазового полиморфизма водно-липидных систем, а также установление того факта, что во многих природных мембранах липиды при физиологических температурах находятся в жидкокристаллическом состоянии. Введенная в 1966 г. Д. Чепменом концепция текучести липидного бислоя заставила по-новому взглянуть на мембраны как на подвижную, динамичную систему, обладающую свойствами двумерной жидкости. Идея молекулярной подвижности липидов и белков в бислое была подтверждена, в частности, измерениями скорости их латеральной диффузии как в биологических, так и в модельных мембранах, проведенными Л. Д. Фраем и М. Эдином в 1970 г. и Г. М. Мак-Коннелом в 1971 г.

Таким образом, к началу 70-х годов накопилось достаточно много новых фактов, на основании которых С. Дж. Синджер и Г. Л. Николсон предложили в 1972 г. новую модель молекулярной организации биологических мембран, получившую название жидкомозаичной модели (рис. 317).

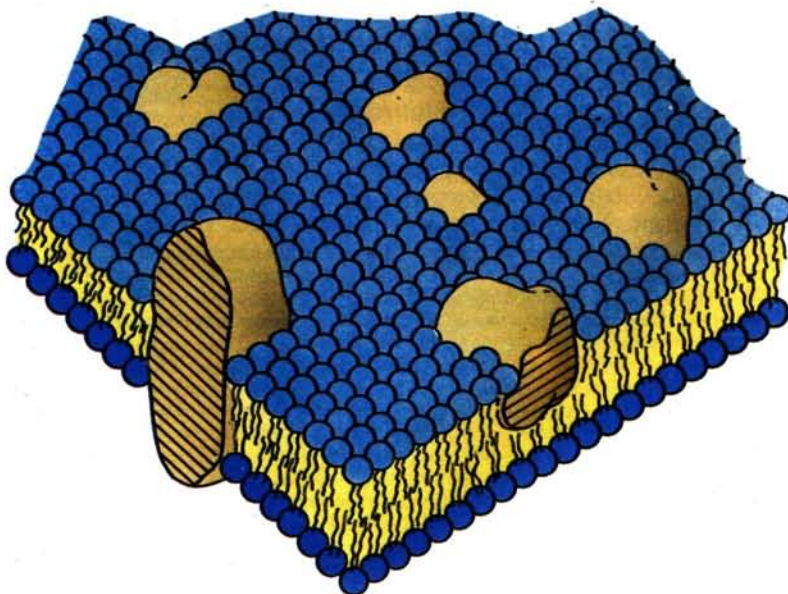


Рис. 317. Модель Синджера — Николсона.

В соответствии с этой моделью, структурной основой биологических мембран является липидный бислой, в котором углеводородные цепи молекул фосфолипидов находятся в жидкокристаллическом состоянии. В бислой, имеющий вязкость растительного масла, погружены или встроены молекулы белков, способные передвигаться по мембране. В противоположность прежним моделям, рассматривавшим мембраны как системы, состоящие из жестко фиксированных элементов, жидкомозаичная модель представляет мембрану как «море» жидких липидов, в котором плавают «айсберги» белков.

В зависимости от прочности связи с мембраной белки в рамках мозаичной модели подразделяются на два типа: периферические и интегральные. К периферическим относятся белки, которые связаны с мембраной за счет полярных и ионных взаимодействий и относительно легко отделяются от нее в мягких условиях, например при промывании буферными растворами с различными значениями рН или ионной силы, либо растворами, содержащими комплексообразующие вещества типа ЭДТА (этилендиаминотетрауксусная кислота) или ЭГТА ([этилен-бис(оксиэтилендинитрил)]-тетрауксусная кислота).

Интегральные белки имеют на своей поверхности большие гидрофобные участки и располагаются внутри мембраны. Для выделения интегральных белков необходимо сначала разрушить липидный бислой.

Солюбилизация интегральных белков может проводиться с использованием органических растворителей, хаотропных веществ и детергентов. Применение органических растворителей для извлечения липидов и освобождения интегральных белков в настоящее время является весьма ограниченным, поскольку такая обработка часто инактивирует мембранные белки. Хаотропные вещества, вызывающие нарушение упорядоченной структуры воды, тоже разрушают липидный бислой. Однако и они применяются довольно редко, так как их солюбилизирующая эффективность в большинстве случаев очень мала.

Наиболее широко применяемый в настоящее время метод солюбилизации мембранных белков — это разрушение липидного бислоя детергентами. Чтобы в максимальной степени сохранить нативную конформацию выделяемого белка, необходимо использовать для солюбилизации неденатурирующие детергенты. К ним, например, относятся соли желчных кислот или их производные. Для солюбилизации и очистки мембранных белков используются также такие неионные детергенты, как тритон, нонидет, эмульфоген, октилглюкозид и др. Интегральные белки, солюбилизированные солями желчных кислот или неионными детергентами, как правило, сохраняют свою биологическую активность.

Хотя жидкомозаичная модель сейчас общепризнана, следует помнить, что она все же представляет собой упрощенное и схематичное отражение столь сложной и разносторонней системы, как биологическая мембрана. Одним из основных постулатов этой модели является предположение о свободном движении молекул белков и липидов в двумерной фазе липидного бислоя. Однако вскоре выяснилось, что не все белки и липиды способны к свободному перемещению, в некоторых случаях их подвижность сильно ограничена. Во многих мембранах интегральные белки находятся в фиксированных положениях за счет высокой концентрации белка, вследствие его агрегации, образования липидных доменов, а также в результате взаимодействия белков с цитоскелетом, образуемым внутренними структурами клетки.

В некоторых мембранах значительные количества липидов могут находиться в сильно упорядоченном состоянии или, наоборот, в составе так называемых небислойных фаз. Это означает, что распределение липидов вдоль поверхности мембраны не является гомогенным, как можно было бы ожидать в случае их свободной диффузии, а в значительной мере гетерогенно. Гетерогенное распределение липидов в биологических мембранах обусловлено также их топологической асимметрией.

Для выполнения векторных функций клеточные мембраны должны быть асимметричны, т. е. наружная и внутренняя стороны мембраны должны отличаться по



Николсон (Nicolson) Гарт Л. (р. 1943), американский биохимик и биофизик. Окончил Калифорнийский университет в Лос-Анжелесе (1965), с 1980 г. — профессор Техасского университета в Хьюстоне. Основные работы посвящены изучению молекулярных механизмов злокачественного перерождения клеток. Вместе с Дж. Синджером является автором гипотезы жидкомозаичной модели структуры биологических мембран (1971).

составу образующих их компонентов. В создании этой асимметрии участвуют как белковые, так и липидные компоненты мембраны. Существенная особенность асимметрии липидов состоит в том, что она, в отличие от топологической асимметрии белков, носит относительный характер: как правило, одни и те же липиды находятся как в наружном, так и во внутреннем монослое, но концентрация их в каждом из слоев неодинакова. Асимметрия белков в мембране является абсолютной в том отношении, что пространственная ориентация белковой молекулы в бислой всегда является однозначной.

Если асимметрия белков в мембранах определяется путями их биогенеза, то трансмембранное распределение липидов может складываться также под влиянием различных условий среды по обе стороны мембраны. Существенное значение может иметь кривизна мембраны. На участках высокой кривизны различия в упаковке липидных молекул между наружным и внутренним монослоями могут быть причиной неодинакового трансмембранного распределения липидных молекул, отличающихся по стерическим требованиям и заряду.

Топологическое распределение липидов тесно связано с их межмембранным обменом, а также с трансмембранной миграцией. В модели Синджера — Николсона подразумевается, что асимметричное распределение липидов сохраняется, поскольку молекулы липидов чрезвычайно медленно переходят с одной стороны мембраны на другую. Однако исследования последних лет показали, что скорость флип-флопа в биологических мембранах может быть очень велика (полупериод $\sim 1-2$ мин), причем это ускорение вызывается действием некоторых интегральных мембранных белков.

Таким образом, в настоящее время модель Синджера — Николсона нуждается в значительных уточнениях. Особенность современного этапа исследований по молекулярной организации биологических мембран состоит в том, что настала пора переходить от общих всеобъемлющих схем к построению детальных «топографических карт» конкретных мембранных систем, оценивая степень подвижности отдельных компонентов в мембране, их взаимное расположение, а также специфичность взаимодействия друг с другом. Воспользовавшись образным сравнением липидного бислоя с «морем», а белков — с «айсбергами», можно сказать: чтобы уверенно плавать в «липидном море», не опасаясь крушений и столкновения с айсбергами, необходимо иметь на руках надежную лодку и верный прогноз погоды. Именно в этом направлении развиваются сегодня работы по молекулярной организации биологических мембран во многих лабораториях мира.

Биогенез мембран

Трудно говорить об образовании мембран *de novo*, поскольку существование клетки предполагает существование ее мембран. Однако можно считать установленным, что процесс формирования клеточной мембраны идет непрерывно, путем введения в нее новых составных частей, обновления компонентов, прежде всего липидов, белков и т. п. В частности, полупериод жизни мембранных компонентов клеток печени, в течение которого обновляется половина их исходного содержания, составляет для белков микросом, ядерной мембраны и цитоплазматической мембраны 2—3 дня, белков внешней митохондриальной мембраны — 5—6 дней, внутренней митохондриальной мембраны — 8—10 дней, для липидов микросом — 1—2 дня. Однако, несмотря на постоянное обновление всех мембранных элементов, их структурная организация в течение жизни клетки сохраняется неизменной.

Биосинтез мембран, как правило, начинается в эндоплазматическом ретикулуме, где образуется большая часть фосфолипидов, холестерина; кроме того, здесь синтезируются и многие интегральные мембранные белки. Затем образовавшиеся мембранные компоненты перемещаются к месту назначения, например в плазматическую мембрану; в этом случае они проходят последовательно через аппарат Гольджи и цитоплазму, модифицируясь в соответствии со своими функциональными потребностями (гликозилирование, процессинг и т. п.). Перемещение осуществляется путем диффузии в форме липидных везикул; подходя к мембране, везикулы, часто нагруженные белками, встраиваются в тот или иной участок мембраны с помощью экзоцитоза. Другими словами, везикулярный транспорт мембранных компонентов функционирует в клетке постоянно и проходит с достаточно большими скоростями (рис. 318). При этом везикулы играют роль своеобразных «челночных» переносчиков, специализированных для каждого липида или белка.

Скорость обновления различных липидов во внутриклеточных мембранах неодинакова. Медленнее всего обновляется сфингомиелин (время, за которое обновляется половина исходных молекул, $\tau_{1/2} \sim 38$ ч), несколько быстрее — фосфатидилсерин ($\tau_{1/2} \sim 23$ ч); скорость обновления фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина примерно одинакова (около 15 ч). К наиболее быстро обновляемым липидам относятся фосфатидилинозит и фосфатидовая кислота, обмен которых может проходить за несколько минут в условиях действия на мембрану внешних стимулов. Такие значительные различия показывают, что фосфолипидные компоненты во время синтеза возникают в мембране неодновременно и, по-видимому «новая

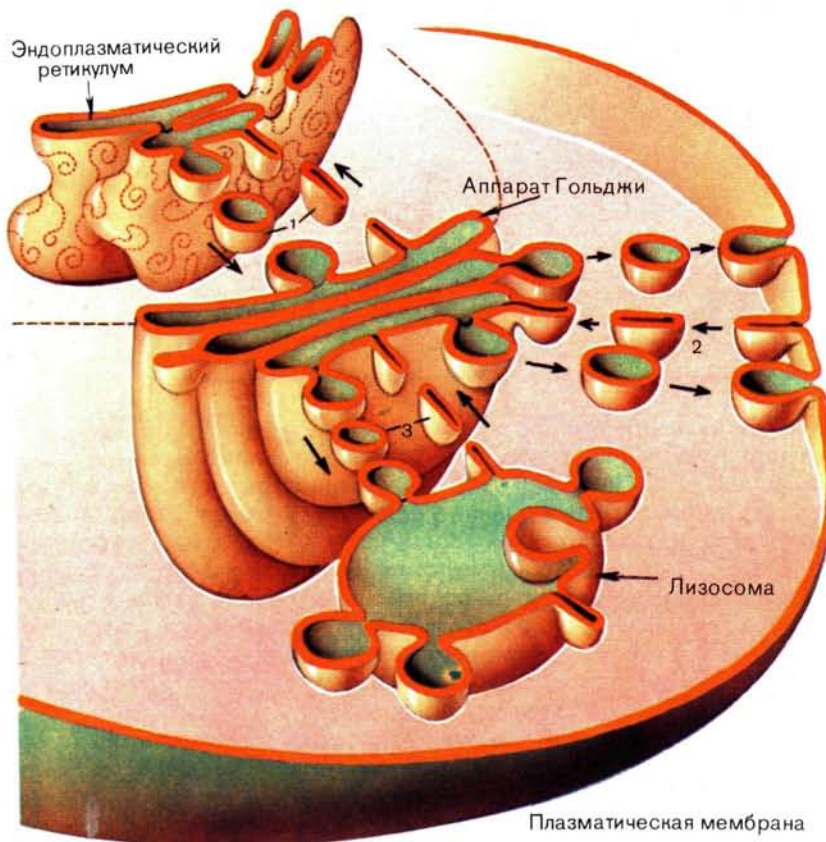


Рис. 318. Везикулярный внутриклеточный транспорт мембран:

1 — челночный перенос между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи; 2 — перенос секреторных везикул между аппаратом Гольджи и плазматической мембраной; 3 — перенос везикул между аппаратом Гольджи и лизосомами.

мембрана» не синтезируется целиком заново, а наращивается путем постепенного добавления различных липидных компонентов к уже существующей основе. Внутри клетки доставка вновь синтезированных липидов к месту сборки мембраны осуществляется иногда с помощью специальных цитозольных белков-переносчиков, открытых в 1969 г.

Что же касается мембранных белков, то их биосинтез и встраивание в мембрану осуществляются в соответствии с механизмом, предложенным Г. Блобелом и Д. Сабатини (см. с. 245).



Перенос белка от места синтеза к месту сборки мембраны обычно сопровождается посттрансляционными изменениями его структуры. Многие мембранные белки, особенно предназначенные для плазматической мембраны эукариотических клеток, подвергаются гликозилированию. N-Гликозилирование проходит через две основные стадии (рис. 319). Начальная стадия протекает в полости эндоплазматического ретикулума и представляет собой перенос

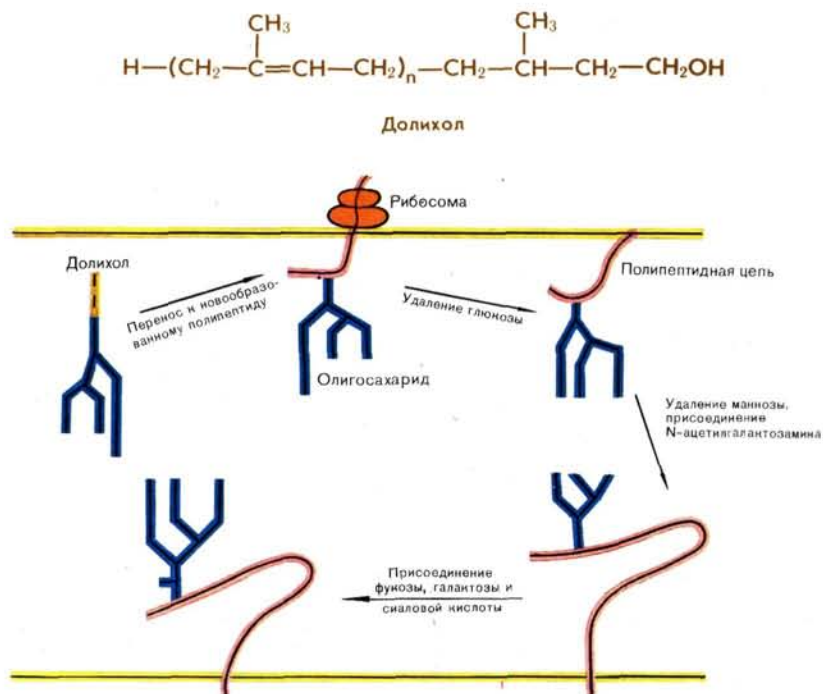


Рис. 319. Отдельные этапы N-гликозилирования мембранных белков.

маннозосодержащего олигосахаридного фрагмента от гликозилированного долихолфосфата к новообразованной полипептидной цепи. После этого синтезированные белки транспортируются в аппарат Гольджи, где происходит удлинение углеводной цепи.

Аппарат Гольджи выполняет также такую важную функцию, как «сортировка» белков, углеводов, липидов и мукополисахаридов, предназначенных для различных внутриклеточных органелл. Пройдя через слой мембран Гольджи, они собираются в мембранных везикулах, которые отделяются от цистерн и транспортируются

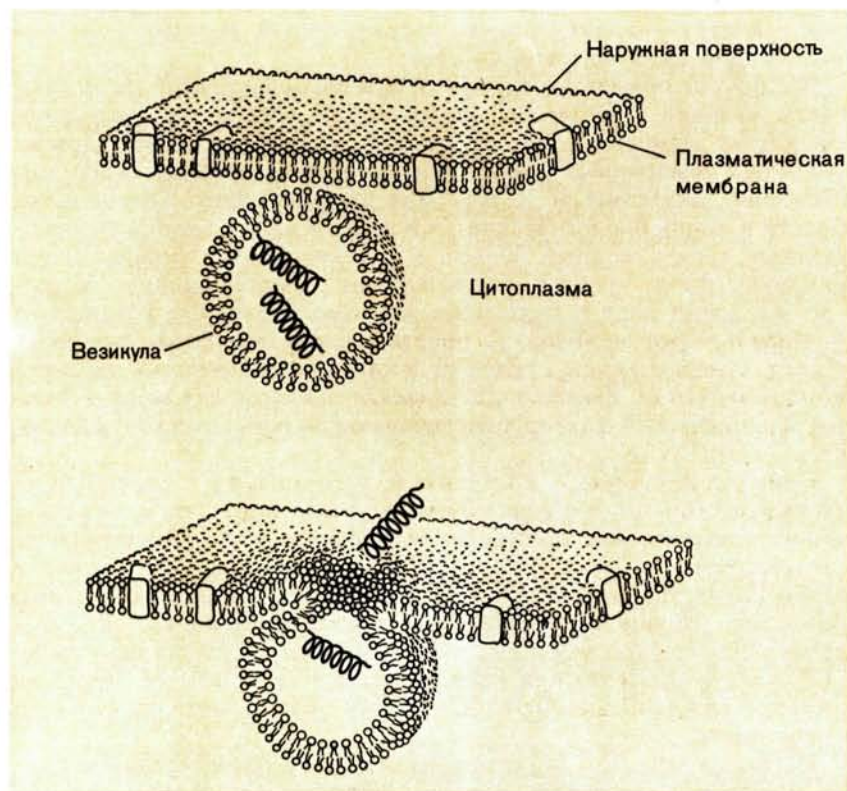
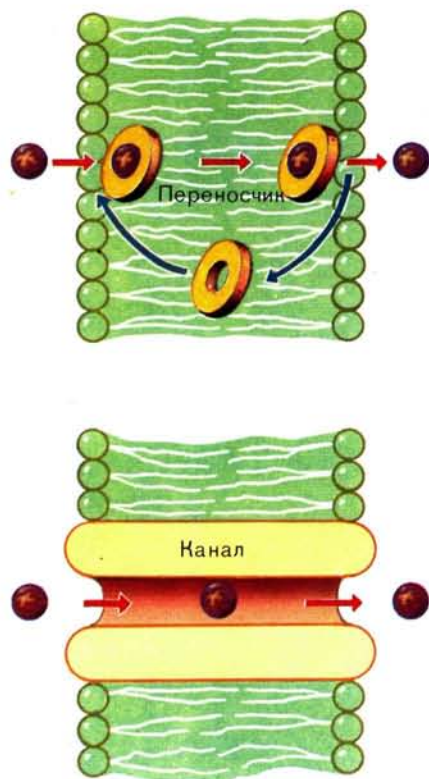


Рис. 320. Слияние везикулы с плазматической мембраной.

к другим клеточным мембранам. Секреторные пузырьки направляются к плазматической мембране и сливаются с ней; при этом содержимое пузырьков изливается наружу (рис. 320). Таким образом, в клетке происходит постоянный перенос мембран от эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи и из аппарата Гольджи в плазматическую мембрану.

Безусловно, конкретные пути транспорта и комплектования тех или иных компонентов мембран требуют детального изучения. У митохондрий, например, часть мембранных структур (субъединиц белков и т. п.) синтезируется внутри митохондриального матрикса и затем переносится к внутренней мембране, в то время как другая часть синтезируется в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме, вне митохондрии, и транспортируется к ней через всю цитоплазму. В настоящее время биосинтез ряда мембранных систем изучен достаточно хорошо (Г. Шатц и др.).

Транспорт через мембраны



Избирательный транспорт различных веществ и ионов — главная функция биологических мембран. Он обеспечивает активный обмен клетки и ее органелл с окружающей средой, служит основой всех биоэнергетических механизмов, определяет эффективность процессов рецепции, передачи нервного возбуждения и т. п. Именно функционирование многочисленных транспортных мембранных комплексов, строго скоординированных в пространстве и времени, делает клетку — элементарную ячейку живой материи — весьма совершенной динамической системой.

Все формы обмена между клеткой и внешней средой, за исключением явлений пинацитоза, предполагают пересечение окружающей клетку мембраны; это остается в силе и для любых других замкнутых мембранных структур, находящихся в клетке (ядро, митохондрии, лизосомы и т. п.). Для подавляющего большинства веществ и ионов биологические (и искусственные) мембраны представляют диффузионный барьер, и в таком случае перенос через липидную фазу требует значительных энергетических затрат. В то же время вода и некоторые низкомолекулярные соединения проникают через мембрану с поразительной легкостью, вероятно, за счет использования дефектов жидкокристаллической решетки липидного бислоя. Высокая проницаемость клеток для воды — важный биологический фактор, обеспечивающий осмотическое равновесие.

Принято различать активный транспорт через биологические мембраны, требующий специальных источников энергии и обычно совершаемый против электрического или концентрационного градиента, и пассивный транспорт, определяемый только разностью концентраций переносимого агента на противоположных сторонах мембраны или направлением поля. В обоих случаях, однако, должен существовать механизм селективного переноса данного вещества или иона, поскольку сама по себе липидная (липопротеиновая) мембрана для такого рода агентов практически непроницаема.

Наиболее детально исследованы процессы транспорта ионов через модельные мембраны, которые описываются в этом разделе. Собственно биологические системы, участвующие в транспорте различных метаболитов через клеточную мембрану, рассматриваются далее.

Принципиально возможны два пути переноса веществ и ионов через мембрану: с помощью так называемых переносчиков, функционирующих по «челночному» механизму, или с помощью каналов.

Ионофоры

Под переносчиками понимаются специфические молекулы или их ансамбли, которые связывают транспортируемый агент на одной стороне мембраны и в виде комплекса переносят его через гидрофобную зону. После диссоциации комплекса на противоположной стороне мембраны переносимый агент оказывается в водной фазе,

а переносчик возвращается в исходное положение. Таким образом, транспорт в целом включает стадии образования и диссоциации комплекса, а также движение в мембране как комплекса, так и свободного переносчика.

Идея о том, что в мембранах для переноса электролитов могут использоваться вещества, образующие с соответствующими ионами растворимые в липидах комплексы, высказывалась в общем виде еще в 1930—1935 гг. В. Остергоутом. Однако впервые явление транспорта ионов через биологические мембраны по механизму переносчиков было обнаружено Б. Прессманом в 1964 г. В качестве таких переносчиков он использовал некоторые антибиотики, названные им ионофорами. Классическим представителем мембранных ионофоров является антибиотик депсипептидной природы — валиномицин.

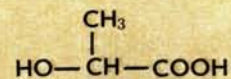
Валиномицин выделен Г. Брокманном в 1955 г., его строение как циклододексадепсипептида окончательно установлено М. М. Шемякиным и сотрудниками в 1963 г. и подтверждено полным синтезом как самого антибиотика, так и его многочисленных аналогов.

Молекула валиномицина построена из трех идентичных фрагментов, в каждый из которых входит остаток D-валина, L-молочной кислоты, L-валина и D-гидроксиизовалериановой кислоты.

Уникальный принцип функционирования валиномицина в качестве ионофора выяснен на основе исследований, осуществленных главным образом в СССР М. М. Шемякиным и др. Валиномицин способен избирательно увеличивать проницаемость липидных бислоев для ионов щелочных металлов (А. А. Лев, 1967; П. Мюллер, Д. Рудин, 1967). Валиномицин образует в неполярных растворителях устойчивые комплексы с K^+ , Rb^+ , Cs^+ , но очень слабо взаимодействует с ионами Na^+ ; K , Na -селективность этого депсипептида является рекордной и составляет величину порядка 10^4 — 10^5 . Такое поведение валиномицина связано с его пространственным строением: депсипептидная цепь антибиотика формирует «ионную ловушку», точно подогнанную под ионы калия.

Конформация самого валиномицина в неполярных средах напоминает собой браслет, стабилизированный шестью внутримолекулярными водородными связями ($C=O \cdots H-N$); в более полярных средах реализуется форма лишь с тремя H -связями, а в водных растворах предпочтительной оказывается открытая форма, лишенная водородных связей (рис. 321).

В конформации валиномицина, установленной на основании данных ЯМР- и ИК-спектроскопии и подтвержденной затем рентгеноструктурным анализом, амидные карбонилы участвуют в стабилизации «браслета», а сложноэфирные карбонилы свободны (рис. 322, а).



Молочная кислота

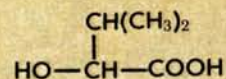
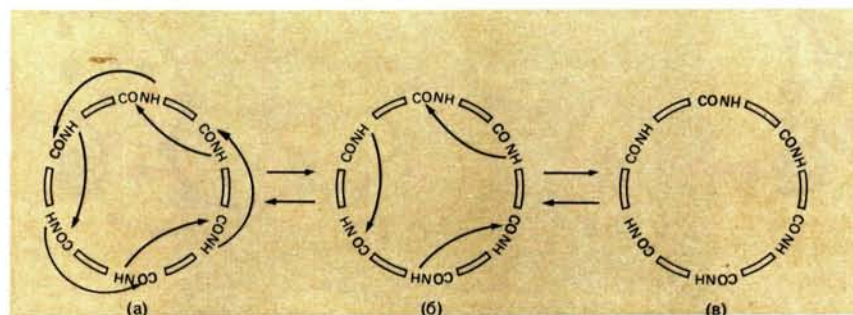
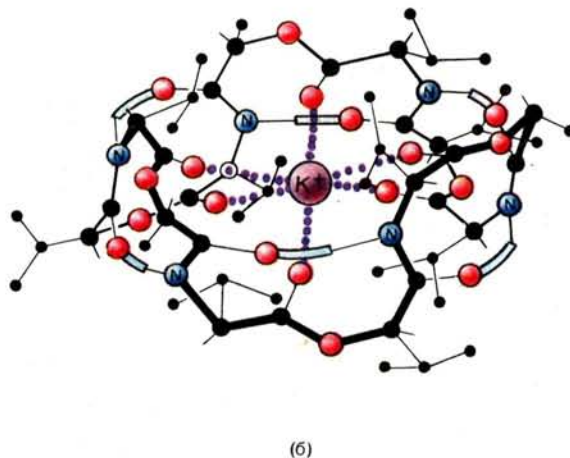
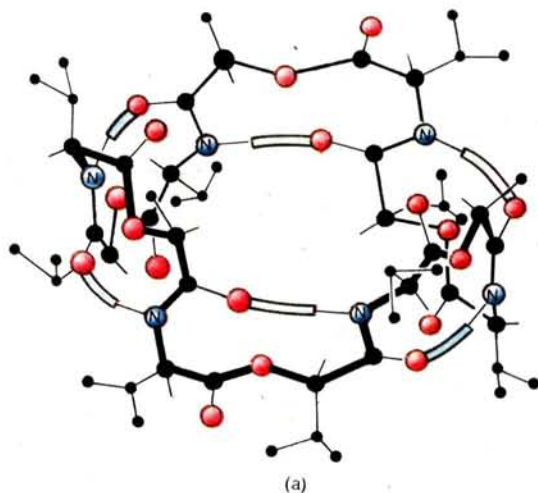
Гидроксиизовалериановая
кислота

Рис. 321. Система внутримолекулярных водородных связей валиномицина в неполярных средах (а), в средах средней полярности (б) и в воде (в).



Рис. 322. Конформация валиномицина (а) и его K^+ -комплекса (б).



Комплексы валиномицина с K^+ в любых средах сохраняют конформацию браслета, при этом ион металла попадает во внутреннюю полость молекулы и связывается шестью сложноэфирными карбонилами с помощью ион-дипольных взаимодействий (рис. 322, б).

Размеры полости хорошо соответствуют ионным радиусам несольватированных ионов калия ($r=0,133$ нм) и рубидия ($r=0,149$ нм), но несколько малы для цезия ($r=0,165$ нм) и слишком велики для натрия ($r=0,098$ нм), что находится в полном согласии с данными по селективности комплексообразования. Валиномицин, таким образом, обеспечивает связываемому иону идеальную «сольватную оболочку», фиксированную в оптимальном положении молекулярным каркасом антибиотика, и благоприятными для комплексообразования оказываются не только энергетические (энергия шести ион-дипольных взаимодействий), но и энтропийные факторы.

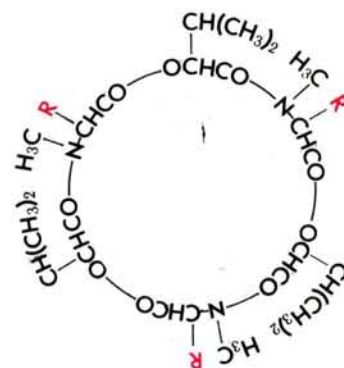
В комплексе валиномицин — калий ион оказывается хорошо «спрятанным» во внутренней сфере антибиотика, а внешняя сфера достаточно гидрофобна и обеспечивает беспрепятственное передвижение иона через липидную мембрану. Установленный впервые на примере валиномицина принцип функционирования ионофоров оказался универсальным не только для мембранных переносчиков, но и для других типов молекулярных ловушек и катализаторов, широко используемых в настоящее время в химии и в технике. Неудивительно поэтому, что скульптурная композиция, изображающая изящную структуру калиевого комплекса валиномицина, украшает здание Института биорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР в Москве.

Достаточно часто высказывается мысль, что валиномицин во многих отношениях напоминает фермент. Действительно, роль ферментов сводится к катализу тех или иных химических реакций, т. е. к снижению их энергии активации. Валиномицин понижает энергетический барьер перехода ионов калия с одной стороны мембраны на другую. Как и ферменты, валиномицин действует в каталитических количествах (вплоть до 10^{-9} – 10^{-11} моль/л), многократно регенерируясь после выполнения своей функции. Валиномицин имеет ярко выраженный специфический субстрат, а именно ион K^+ , причем проявляет по отношению к этому субстрату высочайшую селективность. Более того, при связывании «субстрата»

молекула валиномицина претерпевает характерную для ферментов «индуцированную подгонку» (induced fit) своей конформации, заключающуюся в переориентации сложноэфирных карбонильных группировок из положения «наружу» в положение «внутри» для захвата катиона. Наконец, валиномицин обладает высокой биологической активностью как антимикробный агент, что позволяет четко контролировать его поведение.

Аналогично валиномицину ведут себя и депсипептидные антибиотики энниатиновой группы, открытые П. Платтнером в 1947 г. и охарактеризованные в структурном отношении М. М. Шемякиным и сотр. в 1963 г.

Меньшая эффективность комплексообразования в данном случае связана с более открытой структурой комплекса и большей доступностью иона для растворителя. Однако этот недостаток может в существенной степени компенсироваться тем, что ионы щелочных металлов способны в таком случае переноситься через мембрану в виде «сэндвичей» или «стопок» (рис. 323), где соотношение макроцикл — катион равно 2:1 или 3:2 (рис. 324).



Энниатин А	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$
Энниатин В	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Энниатин С	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Боверицин	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

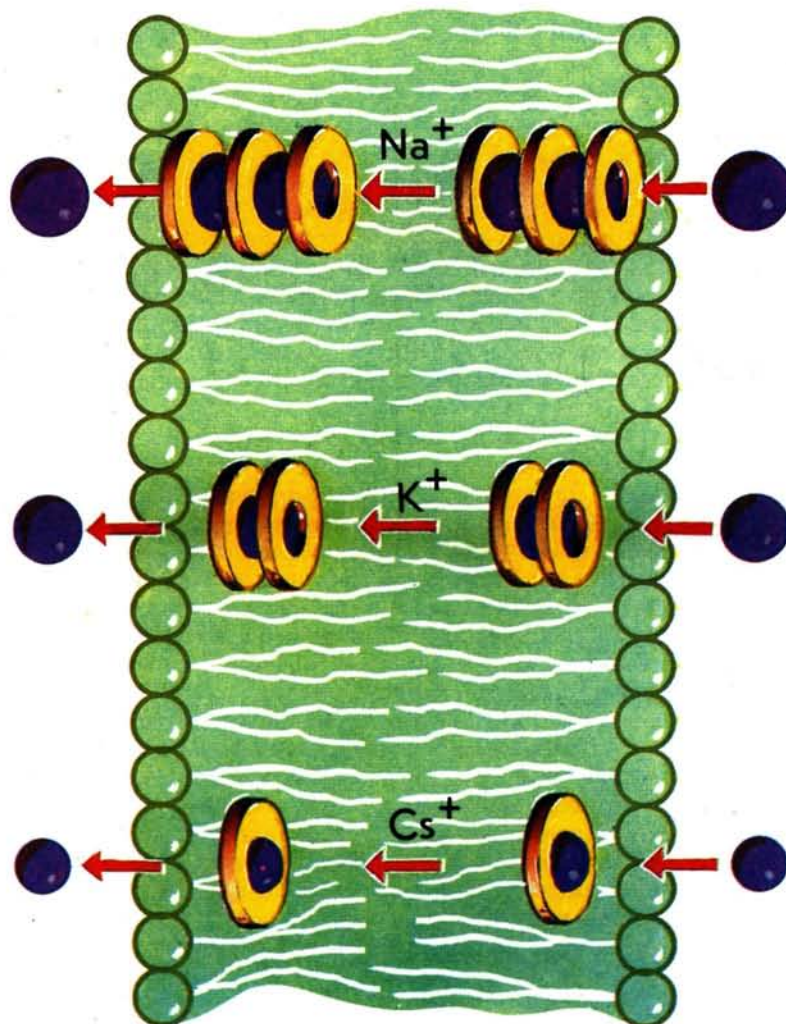


Рис. 323. Транспорт ионов щелочных металлов переносчиками энниатиновой группы.

Структура комплексов энниатина с K^+ была выяснена Д. Данитцем с сотр. (в кристалле) и М. М. Шемякиным с сотр. (в растворе) в 1969 г., а образование межмолекулярных «сэндвичей» и «стопок» в неполярных средах и в процессе транспорта через мембраны однозначно доказано на основе структурных и кинетических данных.

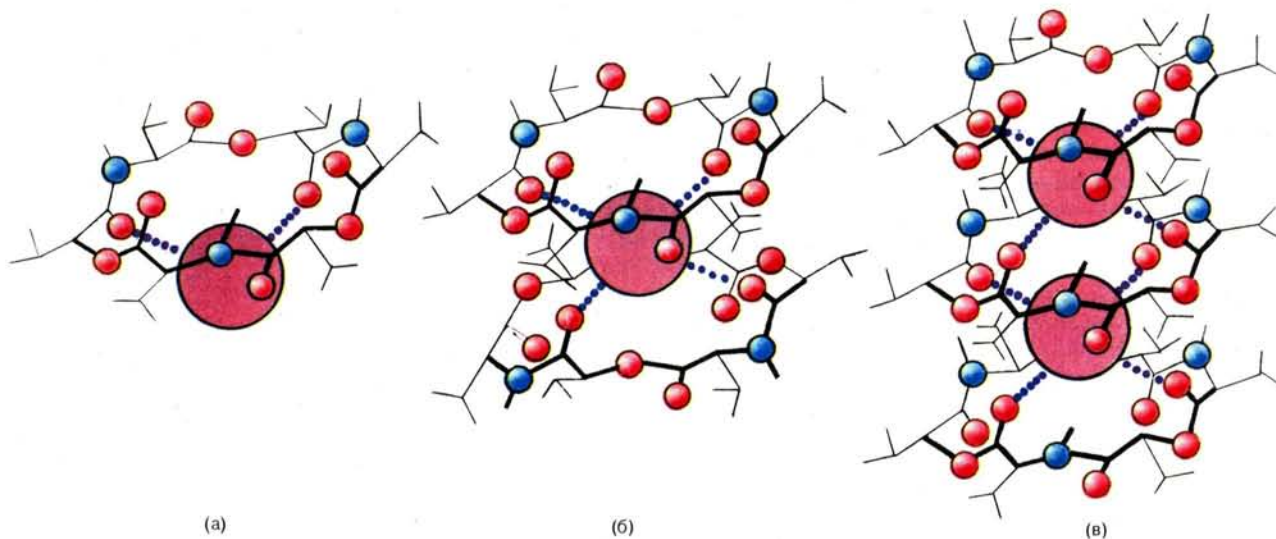


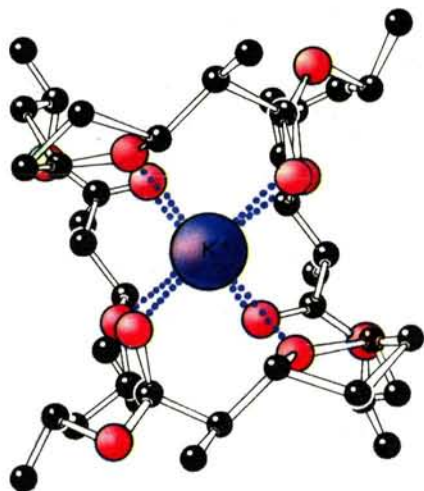
Рис. 324. Структура комплексов энниатина В. Соотношение макроцикл — катион 1 : 1 (а), 2 : 1 (б) и 3 : 2 (в).

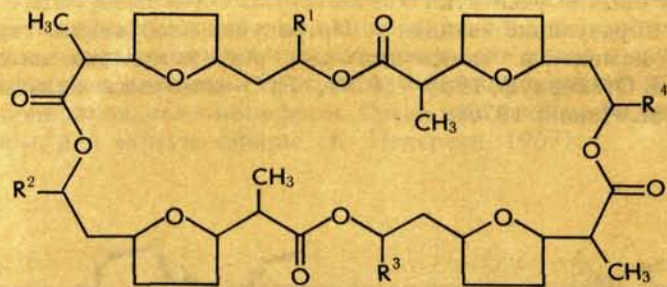
Другую известную группу ионофоров, открытую практически одновременно с депсипептидами, представляют макротетралиды группы нонактина. Строение этих макроциклических лактонов было установлено швейцарским исследователем В. Прелогом с сотр. в 1962 г., Д. Данитцем и др. в 1967 г. на основе рентгенографических данных выяснена структура кристаллического комплекса нонактина с K^+ .

В калиевом комплексе нонактина форма цепи молекулы антибиотика напоминает бороздку теннисного мяча, а восемь О-атомов сложноэфирных и простых эфирных группировок расположены в вершинах куба и связывают ион за счет ион-дипольных взаимодействий. Существенно, что макротетралиды являются наиболее селективными переносчиками для ионов аммония (NH_4^+).

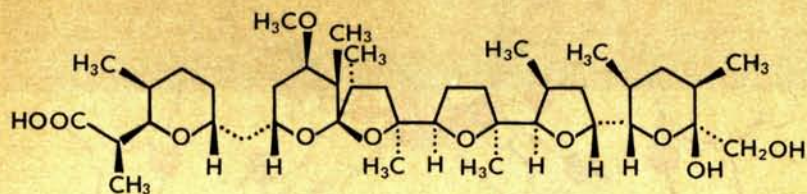
Позднее была открыта новая интересная группа антибиотиков-ионофоров, содержащих незамкнутую полиэфирную цепь; наиболее известными среди них являются моненсин, нигерицин, антибиотик А-537 и кальцимицин (антибиотик А-23187).

Некоторые из этих антибиотиков, например моненсин, селективно связывают ионы щелочных металлов, в частности натрия. Однако особую популярность они получили как переносчики ионов Ca^{2+} и по масштабам использования в исследованиях мембран приближаются к валиномицину. Как установлено с помощью рентгеноструктурного анализа, в комплексах с ионами молекулы полиэфирных антибиотиков «обволакивают» связываемый ион, удерживая его за счет ион-дипольных взаимодействий с простыми эфирными группировками. Подковообразная конформация антибиотика нередко стабилизируется водородной связью между группами, расположенными на противоположных концах цепи; в случае Ca^{2+} в

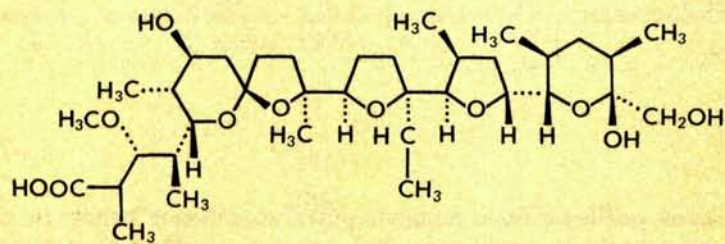




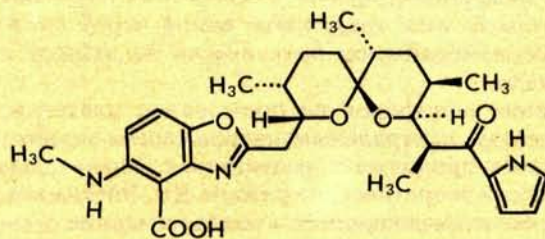
Нонактин $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = CH_3$
 Монактин $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3; R^4 = C_2H_5$
 Динактин $R^1 = R^3 = CH_3; R^2 = R^4 = C_2H_5$
 Тринактин $R^1 = CH_3; R^2 = R^3 = R^4 = C_2H_5$



Нигерицин

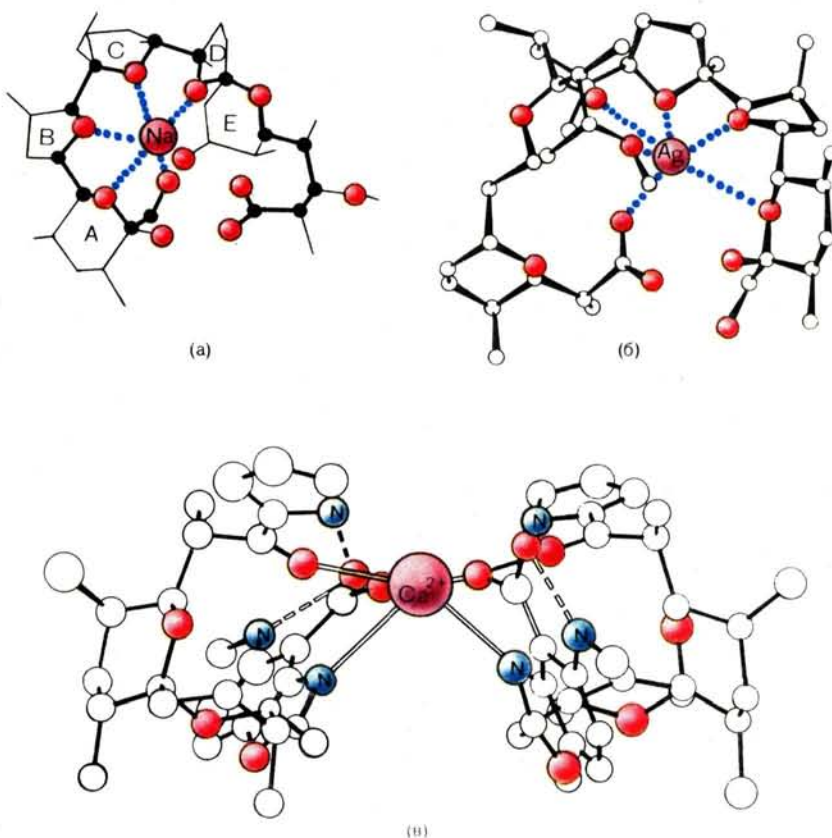


Моненсин



Кальцимидин (А—23187)

связывании обычно участвуют две молекулы соответствующего антибиотика, образующие «сэндвич». На рисунке изображены структуры Na^+ -комплекса моненсина (а), Ag^+ -комплекса нигерицина (б) (Л. Стейнрауф, 1968—1970), Ca^{2+} -комплекса кальцимицина (в) (М. Чаней, 1976).

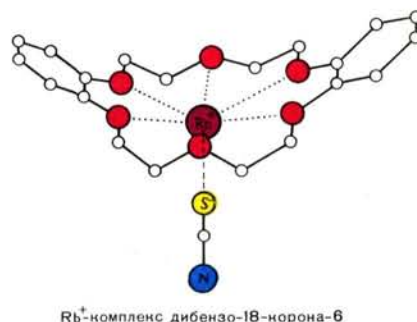
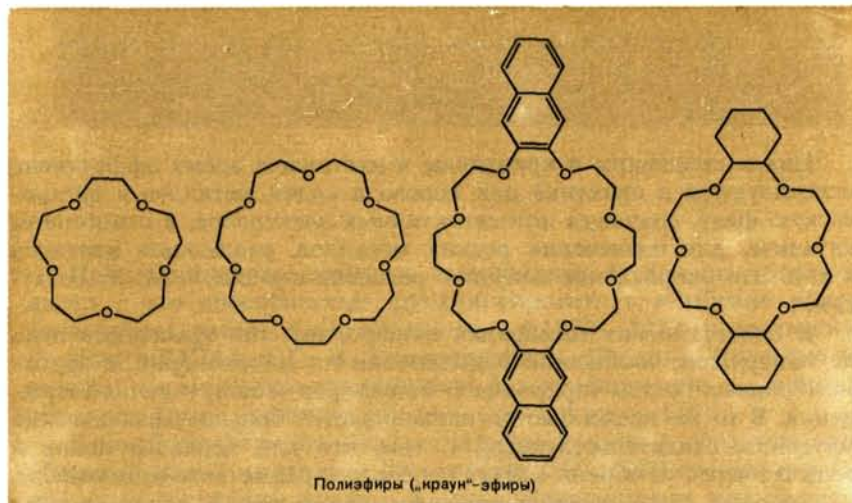


Грелл [Grell] Эрнст (р. 1941), немецкий физикохимик. Образование получил в Базельском университете (1967), с 1978 г. работает в Институте биофизики Общества М. Планка во Франкфурте-на-Майне. Основные работы посвящены изучению механизма ферментативных реакций методами быстрой кинетики и спектроскопии, а также ионного транспорта через мембраны.

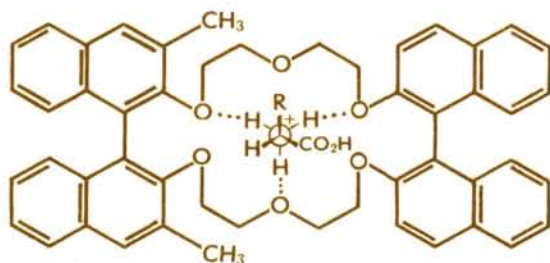
Важной особенностью полиэфирных ионофоров является наличие в их молекуле карбоксильной группы, которая ионизируется в процессе комплексообразования. Поэтому, в отличие от положительно заряженных комплексов депептидов и нактинов (например, валиномицин· K^+), комплексы полиэфирных антибиотиков, как правило, электронейтральны. Отсюда и их различное поведение при индуцируемом ими транспорте ионов через биологические и искусственные мембраны: он практически не зависит от мембранного потенциала.

Исследование ионофоров на протяжении длительного периода было, по существу, центральным направлением мембранологии и в настоящее время продолжает развиваться. Значительный вклад в эту область внесли теоретические работы Дж. Эйзенмана и П. Лойгера, кинетические исследования Э. Грелла, создание новых ионофорных молекул В. Симоном и другие работы. Ионофоры — тончайшие инструменты изучения процессов транспорта ионов через искусственные и биологические мембраны.

В этой связи можно отметить, что в настоящее время в химии, химической технологии и медицине широко и успешно применяются синтетические молекулярные «ловушки» для ионов и других полярных агентов, которые и построены и функционируют на основе тех же принципов, что и ионофоры. Среди них наиболее известны полиэферы, или «краун»-эферы (К. Педерсен, 1967):



Соединения этого типа селективно связывают ионы металлов, ионы аммония, аминокислоты и т. п.; если такой полиэфер обладает асимметрическим строением, т. е. является хиральным, он способен избирательно связывать L- или D-формы соответствующих соединений (В. Прелог, Д. Крам, 1973—1975)



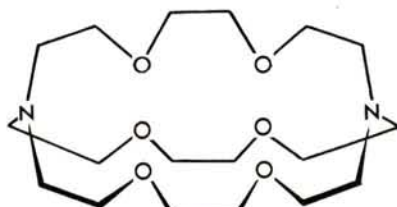
Неменьший интерес представляют предложенные Ж.-М. Леном криптанды (а) (и их комплексы — криптаты (б)), которые могут быть сконструированы для избирательного связывания самых разнообразных низкомолекулярных веществ и ионов



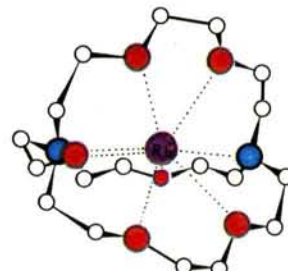
Эйзенман [Eisenman] Джордж. (р. 1929), американский биофизик. Окончил Гарвардский университет (1949), с 1965 г. — профессор Калифорнийского университета в Лос-Анжелесе. Основные работы — по изучению селективности ионного транспорта через биологические мембраны. Открыл катион-селективные стеклянные электроды (1956) и разработал теорию ионной селективности.



Богатский Алексей Всеволодович (1929—1983), советский химик-органик, академик АН УССР (1976). Окончил Одесский университет (1951); с 1977 г. — директор Физико-химического института АН УССР, председатель Южного научного центра АН УССР. Основные работы посвящены динамической стереохимии, конформационному анализу гетероциклов, химии физиологически активных веществ, химии макроциклов. Лауреат Государственной премии СССР (1980).



(a)



(б)

Циклополиэфиры и криптанды в настоящее время эффективно используются в практике для перевода солей металлов в органическую фазу, создания ион-селективных электродов, в гомогенном катализе, для извлечения редких металлов, разделения изотопов и т. п. Это направление получило развитие и в СССР (А. В. Богатский).

В биологических мембранах ионофорный тип транспорта пока не обнаружен; сообщения о выделении из митохондрий и других мембранных систем «природных» ионофоров не получили подтверждения. В то же время быстро накапливается большой фактический материал, свидетельствующий о том, что для переноса ионов и веществ через мембраны клетка использует различного типа каналы.

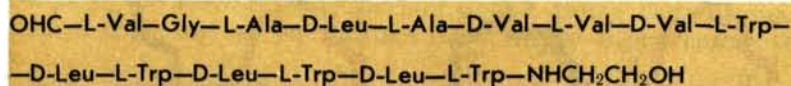
Впервые существование ион-проводящих мембранных каналов было постулировано еще в 40—50-х годах нашего столетия при изучении проблемы проведения нервного импульса (А. Ходжкин, Э. Ф. Хаксли). Позднее получила распространение концепция «биологических насосов», обеспечивающих активный транспорт ионов через плазматическую мембрану клетки. Принцип переноса веществ и ионов через селективные каналы биологических мембран хорошо согласовывался с данными теории и кинетическими экспериментами. Все более очевидным становился факт, что роль каналов в мембранах выполняют сложные белковые комплексы, однако их выделение и структурное изучение представило значительную проблему.

Антибиотики-каналообразователи

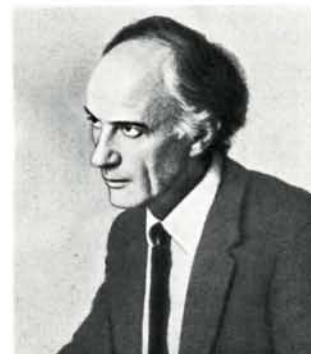
Определенный прогресс в понимании того, какой может быть молекулярная организация трансмембранных каналов, связан с изучением антибиотиков-каналообразователей; среди них наиболее известны грамицидин А, амфотерицин В, аламетин.

Антибиотики грамицидиновой группы были открыты Р. Дюбо в 1939 г., строение основного представителя этого семейства, грамицидина А, установлено Р. Сарджесом и Б. Виткопом в 1965 г. Как оказалось, антибиотик является линейным пентадекапептидом с блокированными концевыми группами и чередующимися L- и D-конфигурациями аминокислотных остатков.

После того как Б. Прессманом было обнаружено индукционное влияние грамицидина А на ионный транспорт (K^+ , Na^+ , H^+ и др.) через биологические мембраны, С. Хладки и Д. Хейдон в 1970 г. однозначно установили, что антибиотик функционирует в мембране по принципу канала.



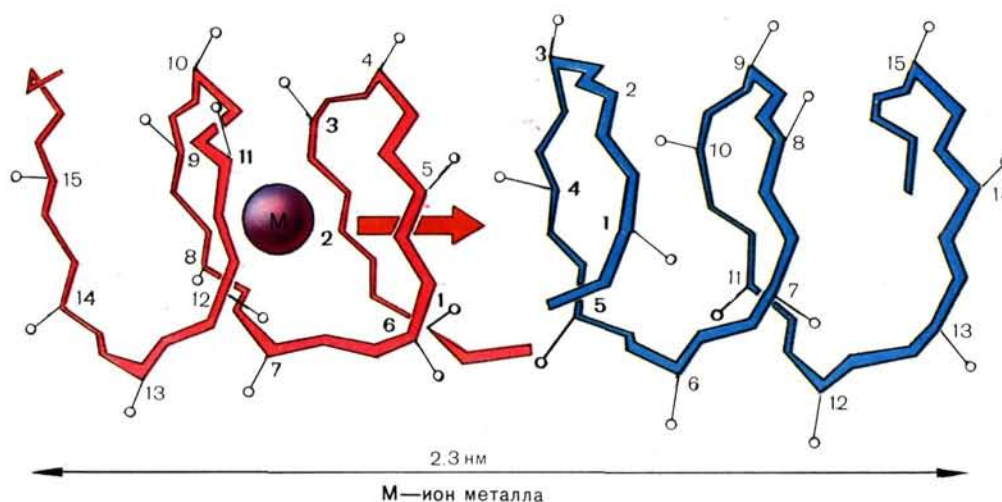
Грамицидин А



Хейдон [Haydon] Дэнис (р. 1930), английский биофизик. Образование получил в Лондонском университете, с 1980 г.— профессор Кембриджского университета. Известен работами по изучению характеристик липидных бислоев и способов их формирования. Совместно с С. Хладки разработал методику измерения проводимости одиночных ионных каналов.

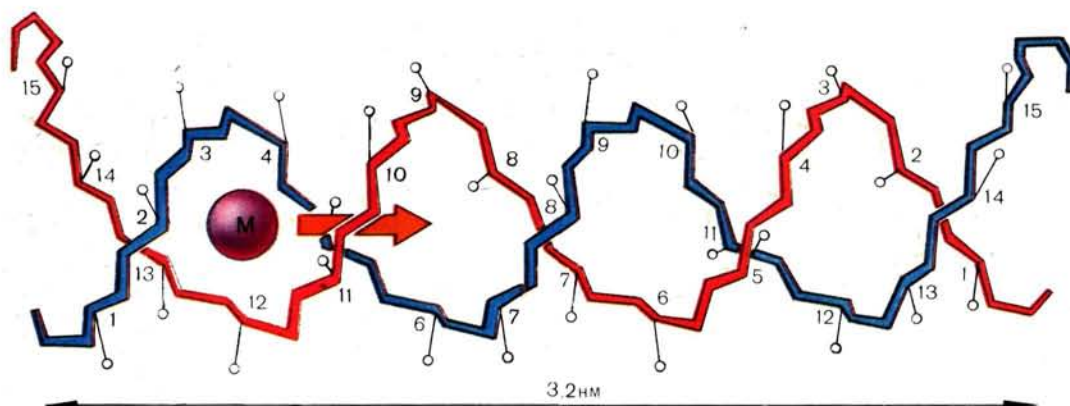
Пространственное строение грамицидина А, хорошо согласующееся с его способностью функционировать в мембране в виде каналообразователя, было предложено в 1971—1972 гг. независимо Д. Урри (США) и Г. Н. Рамачандраном (Индия). Согласно их модели, две молекулы грамицидина А в конформации π_{LD} -спирали образуют димер «голова к голове» (см. также с. 117).

В такой конформации молекулы грамицидина А образуют своеобразный полый цилиндр, в котором все СО- и NH-группы пептидной цепи соединены внутри- и межмолекулярными водородными связями.

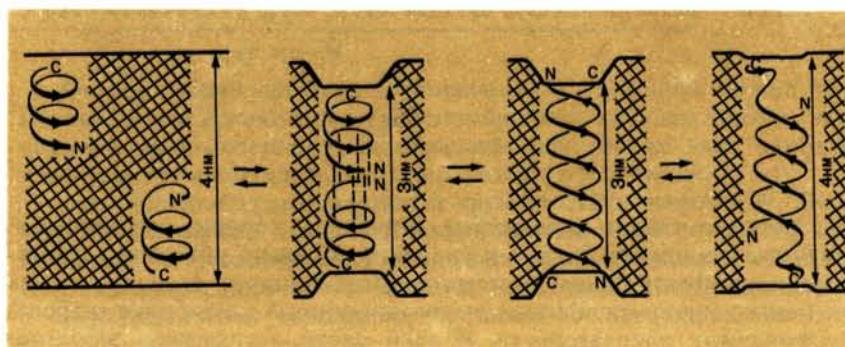


Хотя по своим параметрам структура хорошо соответствует толщине липидного бислоя и удовлетворительно объясняет наблюдаемую эффективность и селективность ионного транспорта, тем не менее вопрос о конформации грамицидина А в мембране требовал однозначных доказательств. В этой связи заслуживал внимания

предложенный в 1974 г. Э. Блоутом и Б. Витчем альтернативный вариант пространственной укладки молекулы грамицидина А, в котором две молекулы антибиотика образуют двойную спираль

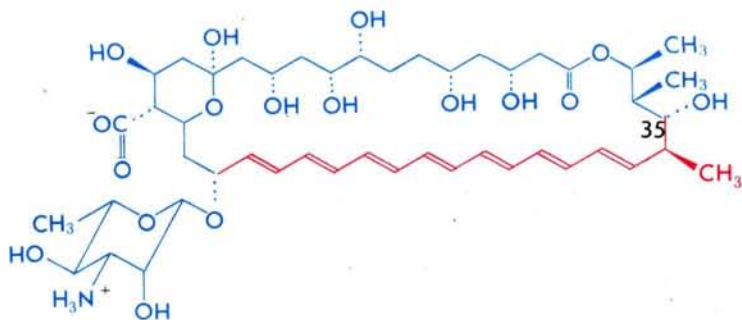


Как сейчас можно считать установленным, и в растворах, и в мембране грамицидин А участвует в сложном конформационном равновесии, наиболее важными компонентами которого являются одно- и двухтяжевые спиральные димеры. Диаметр осевой полости как одностебельных, так и двухстебельных спиралей около 0,3 нм, т. е. достаточен для внедрения ионов металлов, а длина димера (~ 3 нм) близка толщине углеводородной зоны липидного бислоя. По-видимому, оба типа димеров способны образовывать ион-проводящие каналы. Отметим, что производительность одиночного канала грамицидина А весьма высока, до 10^9 ионов в секунду, что значительно превышает соответствующий показатель для антибиотиков-переносчиков ($\sim 10^5$ ионов в секунду). Предполагается, что «выключение» грамицидинового канала, т. е. переход в непроводящее состояние, сопряжено с флуктуацией толщины мембраны: при увеличении толщины димер «голова к голове» диссоциирует до мономера, а двойная спираль частично расплетается. С этим предположением согласуется тот факт, что время жизни грамицидинового канала монотонно увеличивается при уменьшении средней толщины мембраны. Возможные структурные перестройки грамицидина А в мембране схематически могут быть изображены так:



При выяснении поведения грамицидиновых антибиотиков в мембране большую роль сыграло исследование его синтетических аналогов, в том числе ковалентно связанных димеров и производных, несущих заряженные группы (В. Т. Иванов, Е. Бамберг и др.); важный вклад был внесен также на основе теоретических расчетов (А. Пюльман) и физико-химических измерений (В. Ф. Быстров, В. Т. Иванов и др.). Следует отметить, что заверченный Б. Уоллес в 1985 г. первый рентгеноструктурный анализ кристаллов грамицидина А позволил сделать вывод, что в избранных условиях, т. е. в мембране, антибиотик представляет собой димер типа двойной спирали и содержит во внутренней полости два переносимых им иона.

Среди антибиотиков-каналообразователей особого внимания заслуживают некоторые полиеновые макролиды, и прежде всего амфотерицин В



Амфотерицин В

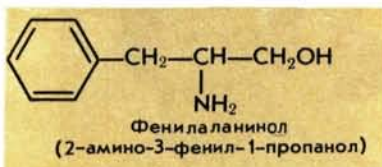


Пюльман (Pullman) Альберта (р. 1920), французский биохимик. Руководит лабораторией Института физико-химической биологии в Париже. Ею выполнены работы по анализу влияния среды на структуру биологических молекул, в том числе нуклеотидов, липидов, белков, и проведены теоретические исследования ион-ионофорных взаимодействий.

Как оказалось, такие антибиотики образуют в мембранах довольно селективные поры с радиусом Стокса — Эйнштейна порядка 0,4 нм, которые в силу своих размеров оказываются проницаемыми для воды, ионов одновалентных металлов, некоторых анионов и небольших нейтральных молекул, например глюкозы. Согласно модели, выдвинутой А. Финкельштейном и Р. Хольцем в 1973 г., амфотерицин В образует канал, состоящий из двух стыкующихся внутри мембраны полупор, каждая из которых представляет собой агрегат из чередующихся молекул антибиотика и стерина (обычно эргостерина, имеющего 3 β -гидроксигруппу и при атоме С-9 боковую цепь), ориентированных длинными осями своих молекул перпендикулярно поверхности мембраны; размеры этих молекул и обычного мембранного фосфолипида — лецитина — практически совпадают. В образовании полупоры принимают участие 8—16 (обычно 10) молекул антибиотика, располагающихся так, что гидрофильные части (гидроксильные) ориентированы внутрь поры, а гидрофобные (полиеновые) части — в сторону мембраны; полупоры собираются на противоположных сторонах мембраны и стабилизируются на поверхности мембран полярными головками антибиотика, состоящими из заряженных группировок карбоксилат-иона и протонированного по аминогруппе остатка сахара (микозамина), а внутри мембраны — водородными связями между гидроксильными группами при атоме С-35 (рис. 325).

В изучении механизма действия амфотерициновых каналообразователей принимают активное участие лаборатории в Голландии (Б. де Круифф) и в СССР (Л. Н. Ермишкин).

Особую группу каналообразователей представляют собой антибиотик аламетицин I и родственные соединения (сузукациллины, антиамёбины, эмеримицины, трихотоксины и др.), в состав которых входят остатки α -аминоизомасляной кислоты (Aib) и фенилаланинола (Phol)



Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phol

Aib— α -изомасляная кислота
Аламетицин I



Аналогично амфотерицину и грамицидину А, аламетицин образует в мембранах серию ион-проводящих агрегатов. Число молекул аламетицина в агрегате варьирует от 6 до 10. Агрегаты меньшего размера проводят только одновалентные катионы, напоминая в этом отношении каналы, образованные грамицидином А. В более крупных агрегатах диаметр канала достигает 1,5 нм и появляется анионная проводимость. Характерной особенностью аламетициновой проводимости

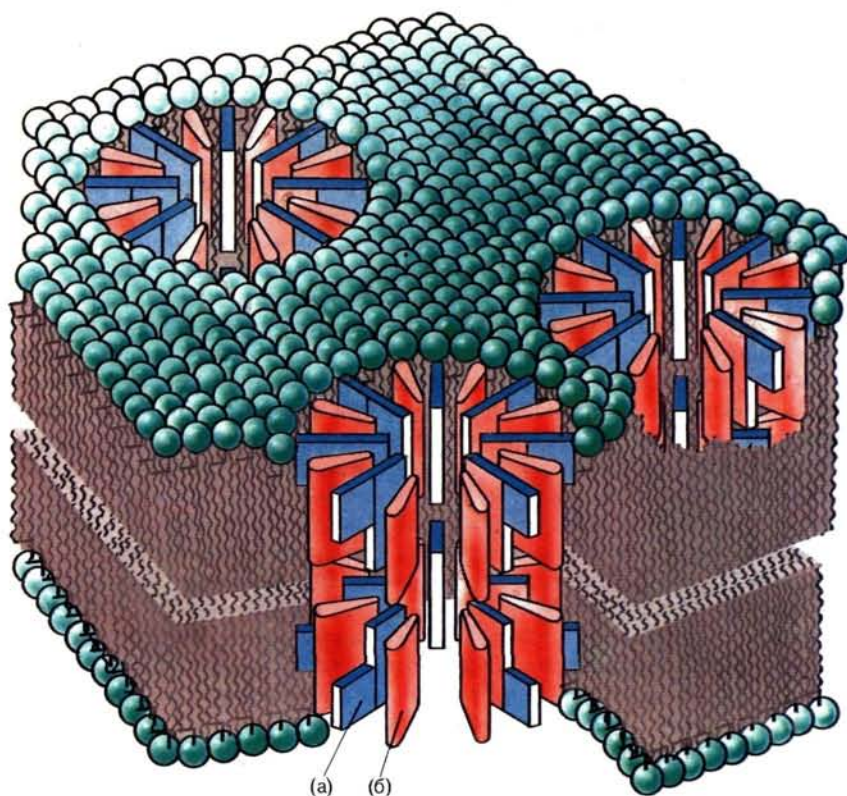


Рис. 325. Модель мембранной поры, образованной молекулами амфотерицина В (а) и стерина (б) (красным цветом показаны гидрофобные, синим — гидрофильные районы молекулы).

мости является ее зависимость от приложенного электрического поля. В отсутствие поля аламетицин не образует ион-проводящих форм, а по мере увеличения потенциала проводимость модифицированных аламетицином мембран резко растет, т. е. увеличивается вероятность пребывания канала во включенном состоянии. В этом отношении аламетицин может рассматриваться как простейшая модель ионных каналов возбудимых мембран. Несмотря на большое число привлекательных гипотез, пока еще нет достаточных данных для окончательного суждения о молекулярной структуре аламетицинового канала. Согласно одной из моделей такого канала, первоначально предложенной Р. Мюллером и долго служившей рабочей гипотезой, сконцентрированные на поверхности мембраны молекулы аламетицина (а) под действием поля ориентируются перпендикулярно плоскости мембраны (б) и затем образуют агрегаты, функционирующие в качестве канала (в).

Впоследствии появились модели, основанные на детальном изучении конформационных особенностей аламетицина. В частности, было установлено (рис. 326), что в кристалле аламетицин принимает в основном α -спиральную конформацию с изломом в районе остатка Pro-14 и несколько разупорядоченной С-концевой частью (Р. Фокс). На этом основании была предложена модель, согласно которой аламетицин образует в мембране агрегаты с утопленной гидрофобной α -спиральной частью и выступающей гидрофильной С-концевой частью. Агрегат, ввиду однонаправленности карбонильных групп в α -спирали, имеет высокий дипольный момент и смещается при включении электрического поля, дотягиваясь до противоположной стороны мембраны, в результате чего канал включается.

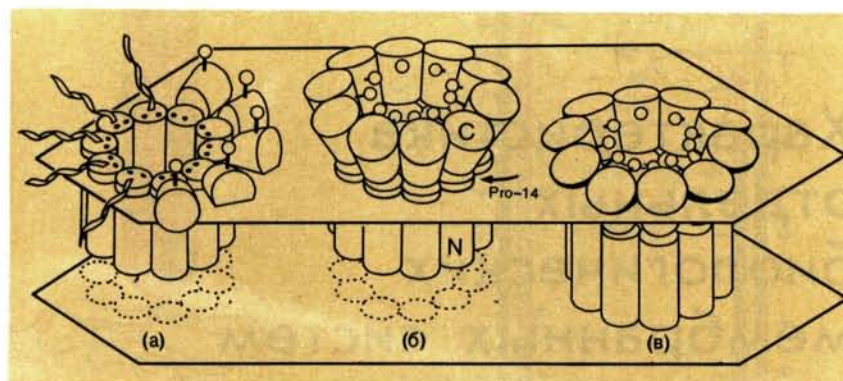
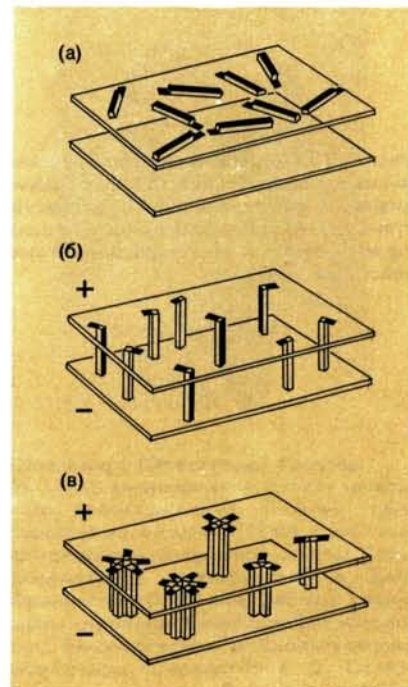
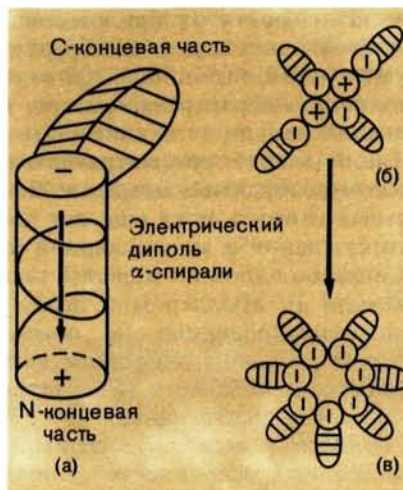


Рис. 326. Аламетициновый ассоциат в мембране в отсутствие электрического поля (а); промежуточная форма, образующаяся под действием приложенного электрического поля (б), и открытая форма ионного канала (в).

Весьма правдоподобна модель Г. Юнга (рис. 327), суммирующая элементы двух рассмотренных выше моделей. В отсутствие поля аламетицин ассоциирует в мембране за счет электростатического взаимодействия антипараллельно ориентированных α -спиральных

Рис. 327. Схематическое изображение мономера аламетидина (а) и его ассоциация в отсутствие (б) и в присутствии (в) внешнего электрического поля (флип — флоп и включение канала под действием поля).



участков; данное состояние не является проводящим. После приложения поля достаточной величины мономеры, ориентированные против поля, вынуждены переориентироваться. В результате расталкивания одинаково направленных диполей образуется пора достаточно большого диаметра.

Характеристика отдельных биологических мембранных систем

В каждой клетке сосредоточено множество функционально детерминированных мембранных систем или их комплексов, выполняющих задачи переработки и передачи информации, генерации энергии, синтеза важнейших метаболитов и т. п. Сейчас можно с достаточным основанием утверждать, что такие системы представляют собой белковые ансамбли, встроенные строго ориентированно в липидный матрикс мембраны и работающие как единое целое. Четкое структурное описание этих систем требует привлечения самых современных методов химии, физики и биологии и пока достигнуто лишь на отдельных примерах.

Пурпурная мембрана и бактериородопсин

Хотя соль обычно убивает бактерии и поэтому издавна используется для консервирования пищевых продуктов, тем не менее некоторые бактерии выработали способность жить в средах с очень высокой концентрацией (до 4 М) поваренной соли. Такие микроорганизмы получили название галофильных (т. е. «любящих соль»); среди них особую известность приобрела культура *Halobacterium halobium*, обладающая способностью преобразовывать энергию солнечного света.

В 1971 г. В. Стокениус (США) и Д. Остерхельт (ФРГ) выделили из клеток *H. halobium* мембраны интенсивно пурпурного цвета, главным белковым компонентом которых оказался хромопротеид, названный по аналогии с белком зрительного аппарата млекопитающих бактериородопсином. В качестве хромофорной



Стокениус (Stoeckenius) Вальтер (р. 1921), американский биолог немецкого происхождения. Окончил Гамбургский университет (1950), с 1967 г. — профессор медицинской школы Калифорнийского университета в Сан-Франциско. Основные работы посвящены клеточной биологии, фотобиологии, биоэнергетике и биологическим мембранам. Совместно с Д. Остерхельтом открыл бактериородопсин (1971).

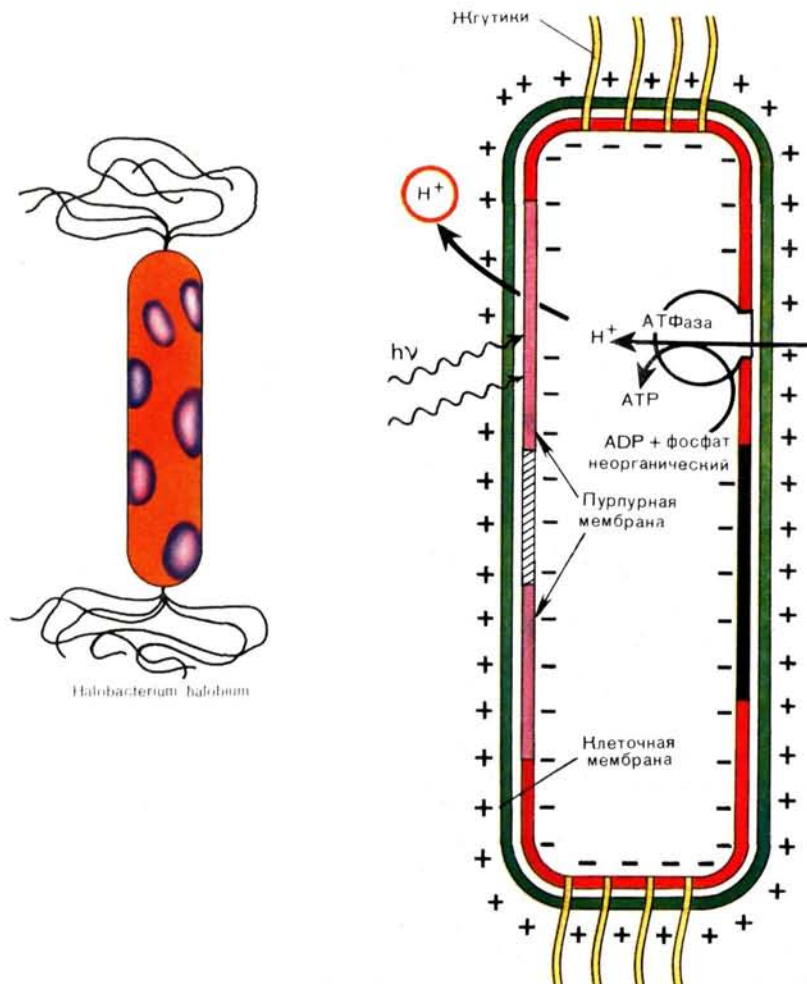


Рис. 328. Светозависимый синтез АТФ в клетках *Halobacterium halobium*.



Хендерсон (Henderson) Ричард (р. 1945), английский ученый, работающий в области молекулярной биологии и мембранологии, член Лондонского Королевского общества. Окончил Эдинбургский университет, с 1973 г. — в лаборатории молекулярной биологии Медицинского исследовательского совета в Кембридже. Основные работы посвящены рентгеноструктурному и электронно-микроскопическому анализу структуры мембранных белков.

группы этот мембранный белок содержит эквимолекулярную смесь 13-*цис*- и полностью *транс*-ретиналя. Липидная компонента пурпурной мембраны *H. halobium* представлена диэфирным аналогом фосфатидилглицерофосфата (50%), сульфогликолипидами (30%), каротиноидами и неполярными липидами.

Оказалось, что в галофильных микроорганизмах бактериородопсин выполняет роль светозависимого протонного насоса, создающего градиент ионов водорода; энергия этого градиента используется клеткой для синтеза АТФ (рис. 328). Другими словами, фотосинтетическая машина галофильных бактерий представлена достаточно простой белковой системой, которая выполняет уникальную функцию «бесхлорофильного фотосинтеза».

Пурпурная мембрана представляет собой естественный двумерный кристалл. Молекулы бактериородопсина организованы в мембране в виде тримеров, причем каждый тример окружен шестью другими так, что образуется правильная гексагональная решетка (рис. 329).

Это обстоятельство позволило применить прямые физические методы для изучения третичной структуры бактериородопсина в мембране. Комбинацией электронно-микроскопических и дифракционных методов анализа была определена молекулярная структура белка в плане мембраны с разрешением в 0,37 нм, в то время как разрешение внутримембранных участков полипептидной цепи достигало всего лишь 1,4 нм. Полученная карта электронной плотности позволила выделить семь сегментов белковой молекулы, пронизывающих всю толщу мембраны в направлении, перпендикулярном ее плоскости. Р. Хендерсону удалось также установить, что каждый сегмент молекулы бактериородопсина находится в конформации α -спирали.



Выяснение первичной структуры бактериородопсина было завершено практически одновременно в 1979 г. в СССР Ю. А. Овчинниковым с сотр. и в США Г. Кораной с сотр. Полипептидная цепь белка состоит из 248 аминокислотных остатков, 67% которых являются гидрофобными. Необходимо отметить, что бактериородопсин явился первым истинно мембранным белком, строение которого было полностью расшифровано.

Одним из главных препятствий при структурном изучении интегральных белков биологических мембран является их низкая растворимость. Мембранные белки практически нерастворимы в водных буферных системах, и это фактически исключает использование протеолитических ферментов в традиционной форме. В процессе работы по установлению полной аминокислотной последовательности бактериородопсина применялись в основном химические методы расщепления полипептидной цепи, и образовавшиеся фрагменты разделялись на биогелях, уравновешенных концентрированным раствором муравьиной кислоты.

При изучении бактериородопсина были, по существу, впервые сформулированы принципы определения топографии мембранных белков. Анализ распределения гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков в полипептидной цепи позволяет сделать вывод о ее пространственной укладке в мембране. Гидрофобные зоны, по всей видимости, представляют собой трансмембранные сегменты, в то время как гидрофильные районы выступают из мембраны и соединяют отдельные внутримембранные α -спиральные тяжи белковой молекулы. Такого рода анализ выявил в первичной структуре бактериородопсина семь участков повышенной гидрофобности, что хорошо согласуется с электронно-микроскопическими данными по топографии белка в мембране.



Остерхельт (Oesterhelt) Дитер (р. 1940), немецкий биохимик. Окончил Мюнхенский университет (1965), с 1979 г.— профессор Института биохимии Общества М. Планка в Мартинсриде. Основные работы посвящены биохимии, биоэнергетике и молекулярной биологии фоторецепторов, мембран и ферментов. Установил, что ретинальсодержащий белок бактериородопсин функционирует как светочувствительный протонный насос (1972).

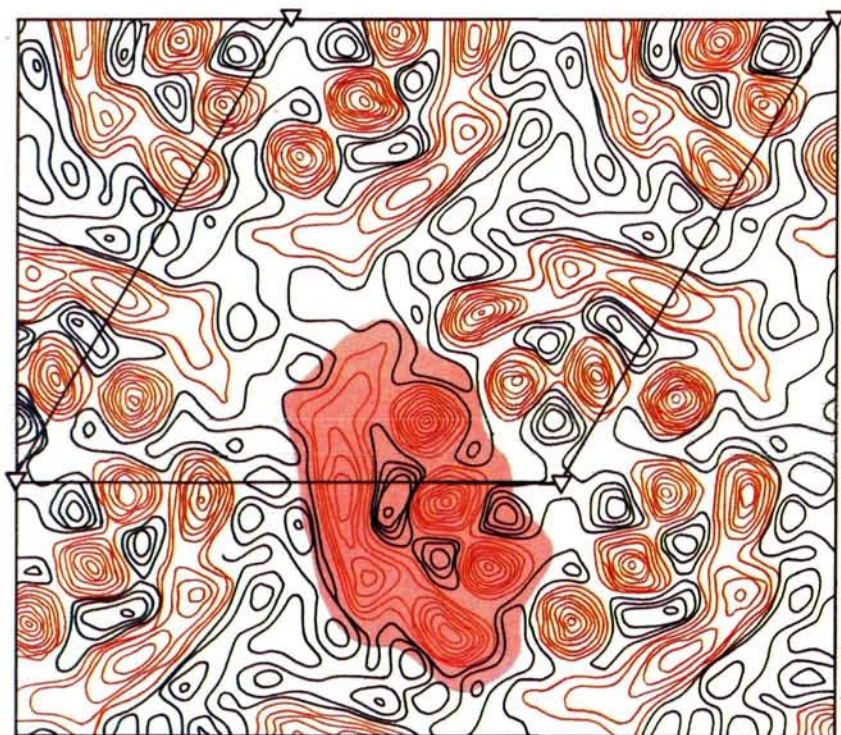


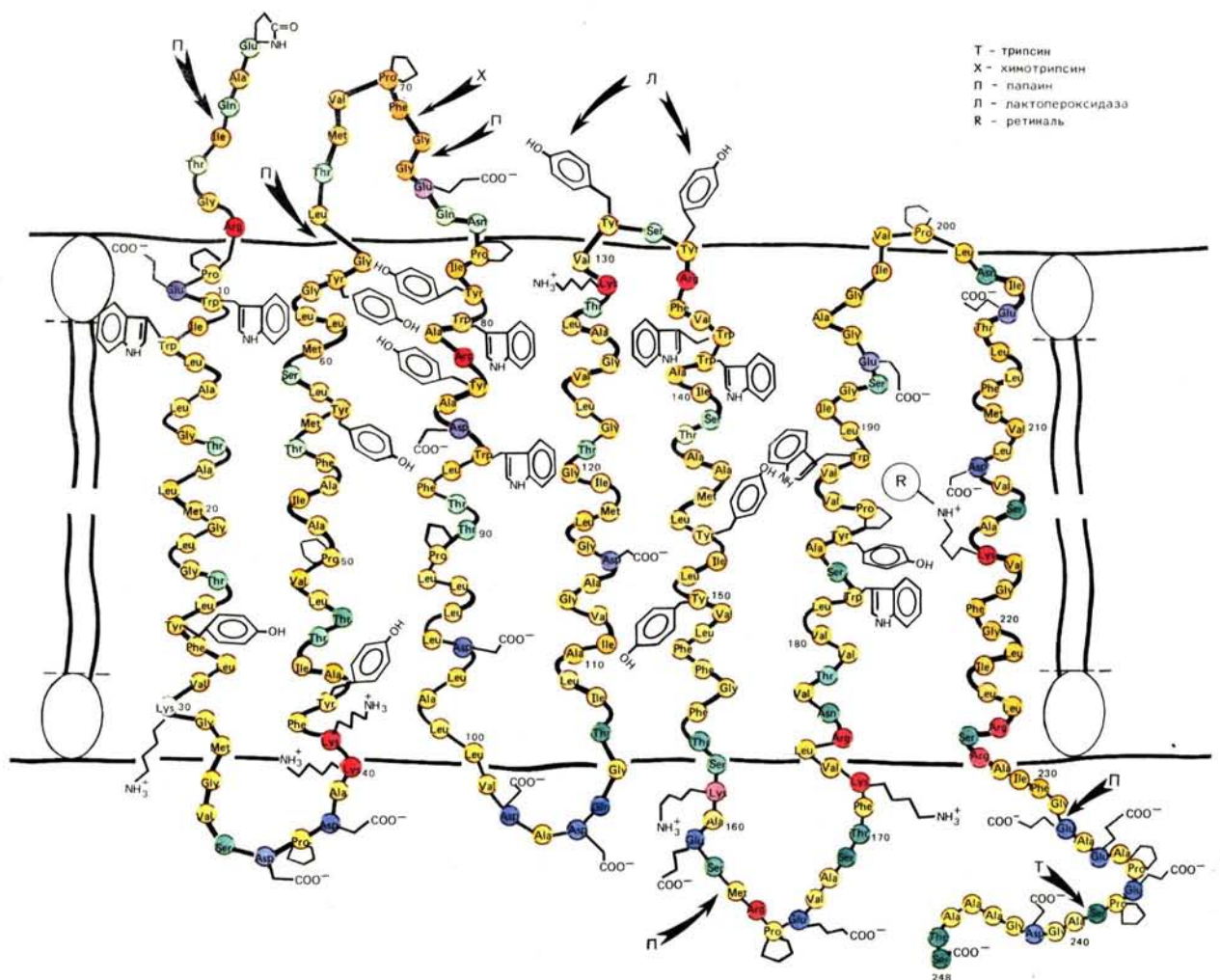
Рис. 329. Карта электронной плотности пурпурных мембран.

Широкое применение нашел метод ограниченного протеолиза в изучении топографии бактериородопсина. Так как молекула бактериородопсина в пурпурной мембране обладает довольно жесткой упаковкой, можно было ожидать, что ее участки, расположенные внутри мембраны, окажутся недоступными для макромолекул ферментов, в то время как области, экспонированные наружу, будут подвергаться ферментативному гидролизу. Ограниченный протеолиз позволил локализовать N- и С-концевые участки белка соответственно на наружной и цитоплазматической поверхностях мембраны.

При обработке пурпурных мембран протеиназами широкой специфичности, в частности папаином, было обнаружено четыре участка полипептидной цепи (рис. 330), выступающих на поверхность по обе стороны липидного бислоя.

Следует подчеркнуть, что бактериородопсин, расщепленный в различных положениях полипептидной цепи и лишенный участков 1—3, 66—72 и 232—248, сохраняет в мембране специфическую укладку, определяющую его функционирование в качестве протонного насоса (В. П. Скулачев). Особо следует отметить тот факт, что как полностью денатурированный бактериородопсин, так и фрагмен-

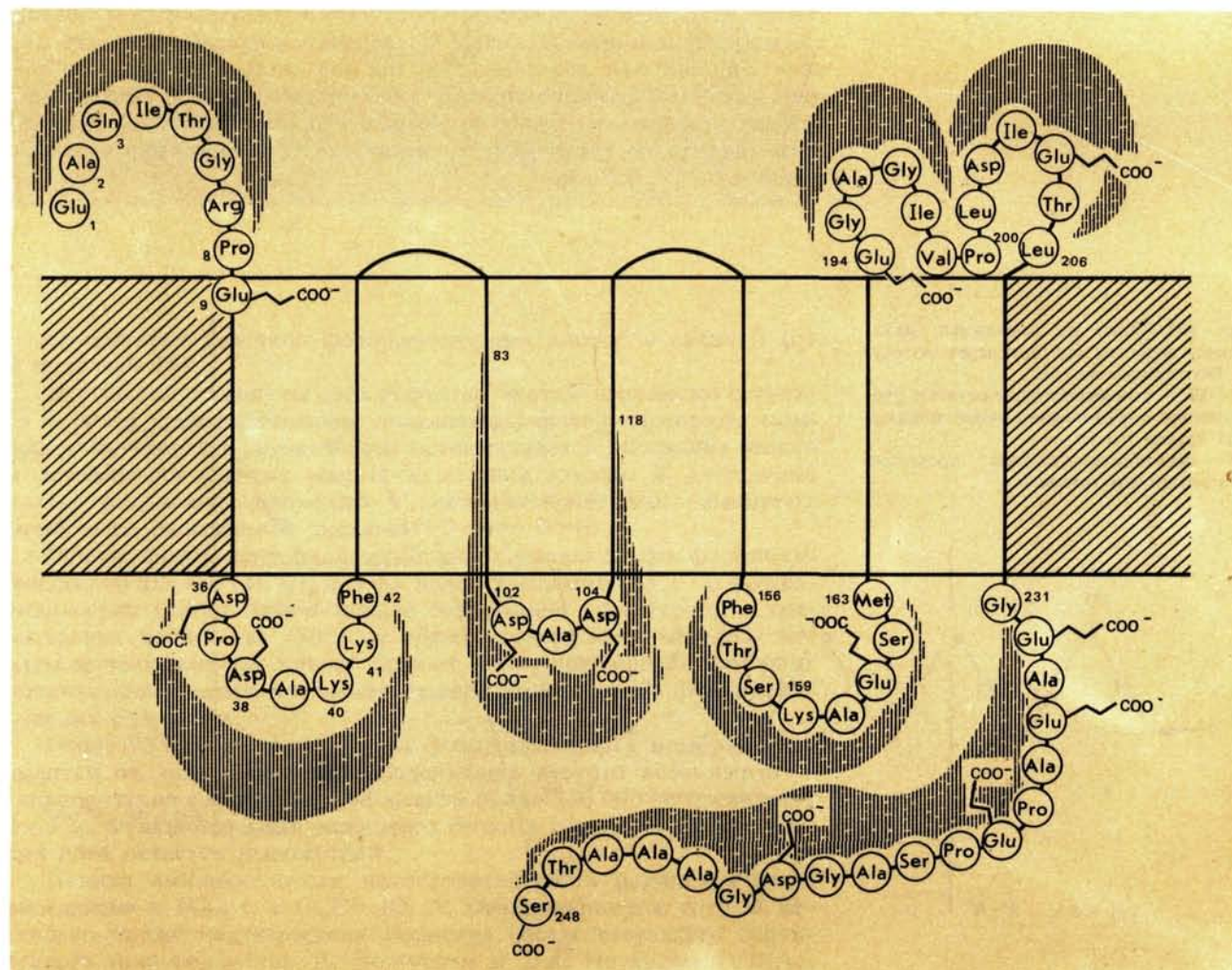
Рис. 330. Топография бактериородопсина в мембране.



ты ограниченного протеолиза химотрипсином способны в присутствии фосфолипидов и ретиналя давать реконструированный комплекс, активность которого практически не уступает активности нативного белка.

Весьма эффективным методом уточнения топографии мембранных белков, прежде всего точной локализации внемембранных участков, является использование моноклональных антител. Для получения гибридом использовались фрагменты бактериородопсина, полученные путем его расщепления протеолитическими ферментами. Наиболее ценными в этом случае оказались синтетические фрагменты: коррелируя величину синтетического пептида и эффективность связывания соответствующего антитела, можно с высокой степенью достоверности зондировать выступающие из мембраны полипептидные петли. Ниже показана локализация различных антигенных детерминант молекулы бактериородопсина в пурпурной мембране (Г. Корана, Н. Г. Абдулаев).

Как же бактериородопсин работает? В ответ на поглощение кванта света бактериородопсин вступает в цикл фотохимических превращений. При этом происходит обратимая изомеризация ретиналя с последующим выбросом протона из молекулы белка и его



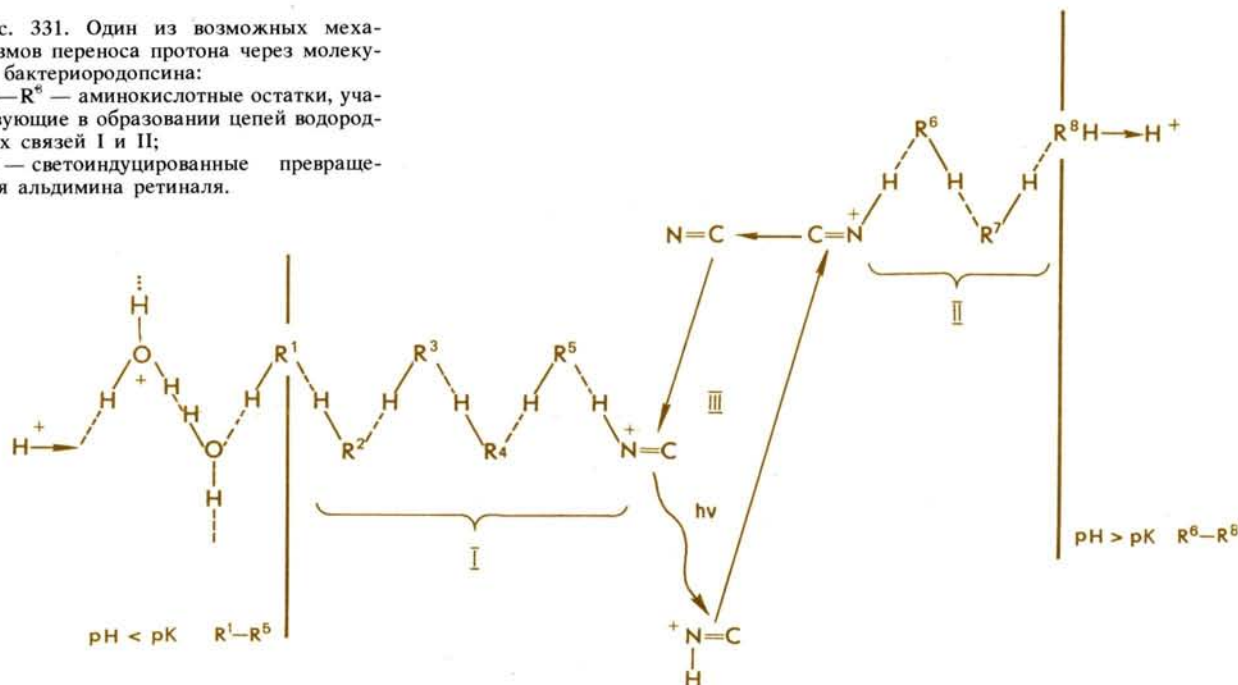
присоединением со стороны цитоплазмы. Одна из спектральных форм бактериородопсина с максимумом поглощения при 412 нм (M-412) обладает депротонированной альдиминной связью между остатком ретиналя и белком.

Возможный механизм переноса протона через бактериородопсин предполагает наличие цепи водородных связей, образованной боковыми радикалами гидрофильных аминокислот и простирающейся через всю толщу белка. Векторный перенос протона через подобную цепь может осуществляться в том случае, если она состоит из двух участков и включает в себя функциональную группировку, способную под действием света изменять свое микроокружение и тем самым последовательно «закрывать» и «размыкать» эти участки. Альдимин ретиналя в молекуле бактериородопсина (при Lys-216) может выполнять роль такого рода «челночного» механизма между двумя предполагаемыми белковыми проводниками протонов, один из которых сообщается с внешней, другой — с цитоплазматической поверхностью мембраны (рис. 331).

В настоящее время природа протон-проводящего пути бактериородопсина интенсивно изучается в различных лабораториях. Одним из наиболее эффективных подходов в этом направлении является использование методов белковой инженерии, суть которых состоит в замене одних аминокислот белка другими путем изменения соответствующих кодонов в гене с помощью направленного мутагенеза. В лаборатории Г. Кораны получено около 15 мутантных генов. Детальное исследование полученных таким образом белков с измененной аминокислотной последовательностью позволит ответить на вопрос о вовлеченности тех или иных аминокислот в общий механизм функционирования бактериородопсина. Безусловно, важная информация будет получена из данных рентгеноструктурного анализа по третичной структуре бактериородопсина с разрешением $0,25 \div 0,3$ нм.

Рис. 331. Один из возможных механизмов переноса протона через молекулу бактериородопсина:

R^1-R^8 — аминокислотные остатки, участвующие в образовании цепей водородных связей I и II;
III — светоиндуцированные превращения альдимина ретиналя.



Родопсин — светочувствительный пигмент фоторецепторных клеток сетчатки глаза позвоночных — является в настоящее время одним из наиболее изученных мембранных белков.



Существуют два типа фоторецепторных клеток — палочки (а) и колбочки (б).

Эти клетки состоят из двух основных частей: наружного сегмента — места непосредственной локализации фоторецепторных мембран и внутреннего сегмента, где осуществляется биосинтез белков и локализован аппарат энергообеспечения клетки. В зрительной клетке родопсин расположен в специализированных замкнутых мембранах, называемых дисками.

Основу фоторецепторной мембраны составляют фосфолипиды: фосфатидилхолин (40%), фосфатидилэтаноламин (38%) и фосфатидилсерин (13%). Очень низкое содержание холестерина и значительные количества (80% от общего содержания липидов) ненасыщенных жирных кислот делают фоторецепторную мембрану чрезвычайно жидкой, что имеет важное значение для функционирования родопсина.

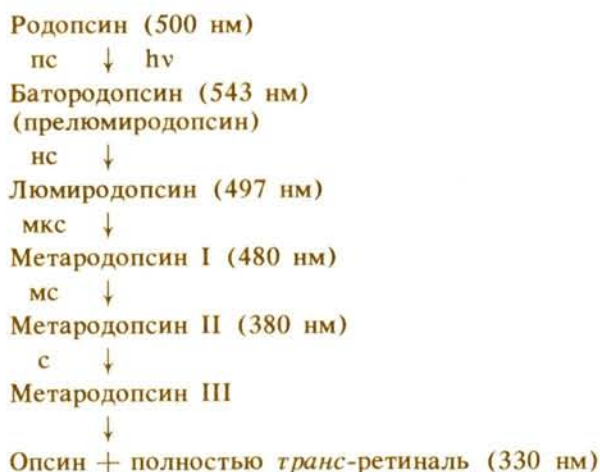
Около 95% белкового состава фоторецепторных мембран приходится на долю родопсина. Содержание второго компонента — гликопротеина с молекулярной массой около 250 000 не превышает 2—3%. Функциональная роль этого белка в процессах фоторецепции пока остается неизвестной.

Полная аминокислотная последовательность родопсина была определена в 1982 г. в СССР Ю. А. Овчинниковым с сотр. и несколько позже подтверждена анализом соответствующего структурного гена родопсина Д. Хогнесом и Дж. Натансом (США).

ный протеолиз белка в составе нативной мембраны, моноклональные антитела, а также химическая модификация проникающими и непроникающими реагентами. Было показано, что мембранную часть молекулы родопсина составляют 7 сегментов полипептидной цепи, находящихся в α -спиральной конформации и пронизывающих толщу фоторецепторной мембраны (рис. 332). Наиболее значительными по величине участками, экспонированными в водную фазу, являются N- и C-концевые области белка. Интересно, что специфическая укладка родопсина и бактериородопсина в мембране во многом аналогична, хотя белки практически не имеют структурной гомологии, а эволюционно их разделяет не один десяток миллионов лет.

Знание структуры родопсина открывает путь к пониманию того, каким образом функционирует этот важнейший белок. Молекула родопсина состоит из белковой части — опсина и хромофорной группы — 11-*цис*-ретиная, связанного с ним альдиминной связью. Белок обладает характерным спектром поглощения с максимумами при 280 и 500 нм. Поглощение при 500 нм обусловливается специфическим взаимодействием хромофора с белковым окружением.

Первым и важнейшим звеном в цепи событий, приводящих к зрительному возбуждению, является индуцированная светом изомеризация 11-*цис*-ретиная в полностью *транс*-форму. С момента поглощения кванта света молекула родопсина претерпевает ряд спектральных превращений



Абдулаев Нажмутин Гаджимагомедович (р. 1941), советский химик-биоорганик. Окончил Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова (1967), работает в Институте биорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Основные работы посвящены выяснению структурных основ функционирования мембранных светочувствительных белков. Лауреат Государственной премии СССР (1986).

Таким образом, молекула родопсина проходит через ряд промежуточных стадий, превращаясь в молекулу опсина и свободный ретинаяль. Весь процесс завершается в течение нескольких секунд.

Одно из важнейших событий, происходящих вслед за фотоизомеризацией ретинаяля, — поляризация плазматической мембраны зрительной клетки. Эта мембрана в темноте проницаема для ионов натрия. Существующий в темноте градиент ионов натрия поддерживается Na^+ , K^+ -зависимой АТФазой, расположенной в плазматической мембране внутреннего сегмента. Поглощение кванта света каким-то непонятным до сих пор механизмом блокирует поступление ионов натрия в клетку. Понижение скорости поступления ионов натрия внутрь клетки приводит к избыточному отрицательному заряду на внутренней стороне плазматической мембраны, т. е. гиперполяризации клетки. Именно этот сигнал,



Скулачев Владимир Петрович (р. 1935), советский биохимик, член-корреспондент АН СССР (1974). Окончил Московский университет (1957), с 1973 г. — заведующий Межфакультетской проблемной лабораторией биоорганической химии и молекулярной биологии им. А. Н. Белозерского в МГУ. Основные работы — по изучению механизма превращения энергии в биологических мембранах. Лауреат Государственной премии СССР (1975).

возникший на плазматической мембране, и передается к синаптическому окончанию зрительной клетки, что и приводит к нервному импульсу.

Фоторецепторные диски морфологически отделены от плазматической мембраны клетки. Молекула родопсина, поглотившая квант света, находится на расстоянии нескольких сотен нанометров от плазматической мембраны. Для объяснения механизма передачи информации от обесцвеченной молекулы родопсина на плазматическую мембрану выдвинуты две гипотезы, каждая из которых основывается на существовании в зрительной клетке медиаторов, способствующих передаче информации от фоторецепторного диска на плазматическую мембрану. Роль таких медиаторов выполняют ионы Ca^{2+} или циклический гуанозинмонофосфат (сGMP). В последнее время общепринято, что роль родопсина в процессах зрительного восприятия состоит в том, чтобы контролировать уровень этих двух медиаторов в клетке.

Согласно первой (так называемой Ca^{2+}) гипотезе, конформационные изменения молекулы родопсина, происходящие в результате поглощения кванта света, приводят к образованию поры в мембране диска. Эта пора служит своеобразным путем выхода Ca^{2+} из внутридискового пространства в цитоплазму. Ионы Ca^{2+} , диффундируя к плазматической мембране, могут блокировать натриевые каналы плазматической мембраны. Основными предпосылками Ca^{2+} гипотезы явились следующие данные: введение ионов Ca^{2+} в клетку в темноте приводит к гиперполяризации, а удаление их из клетки — к деполяризации мембраны. Введение хелатирующих агентов снижает чувствительность клетки к свету.

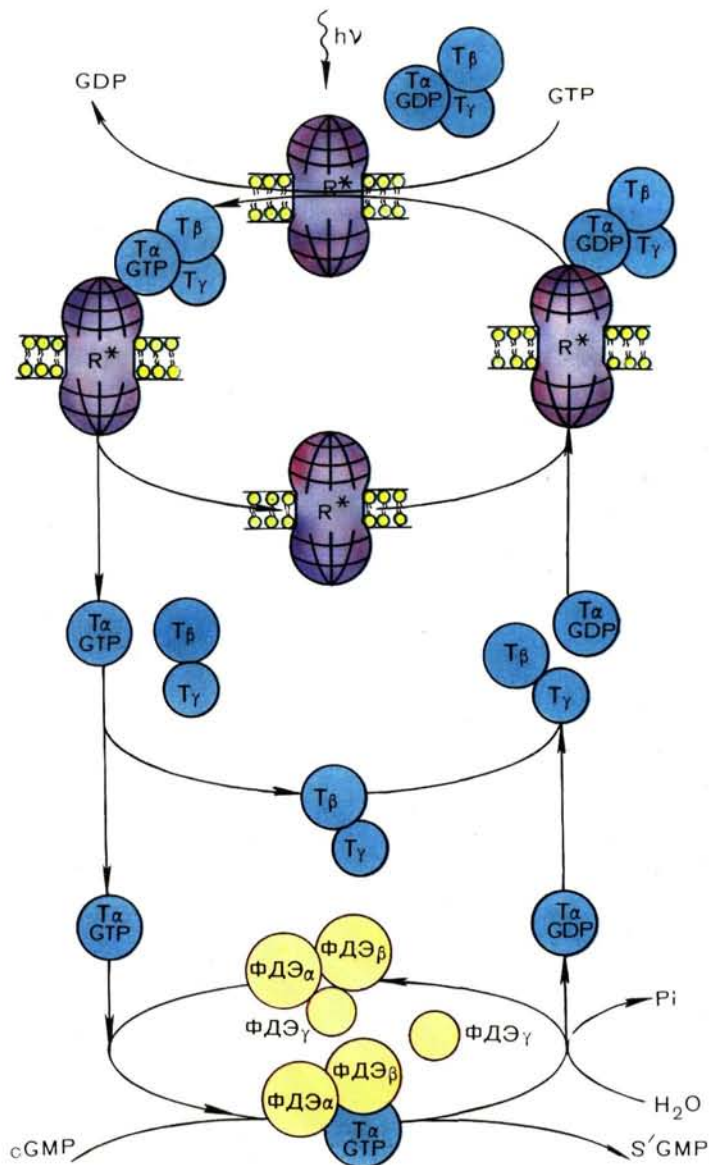
Согласно более вероятной нуклеотидной гипотезе, роль переносчика сигнала от фотовозбужденного родопсина выполняют молекулы сGMP, понижение уровня концентрации которых вызывает блокирование натриевых каналов.

Активируемая светом молекула родопсина — метародопсин II — образует специфический комплекс с находящимся в GDP-связанной форме трансдуцином (первое звено в цепи усиления сигнала света) и катализирует обмен связанного с его α -субъединицей GDP на GTP. GTP-Связанная форма трансдуцина имеет низкое сродство к фотоактивированному родопсину, в результате чего после обмена GDP на GTP комплекс быстро диссоциирует. Разница в аффинности двух форм трансдуцина к родопсину дает возможность последнему совершать быстрый круговорот и активировать большое число молекул трансдуцина. После связывания GTP трансдуцин диссоциирует на комплекс β , γ -субъединиц и комплекс α -субъединицы с GTP. α -Субъединица трансдуцина в GTP-связанной форме активирует цикло-GMP-зависимую фосфодиэстеразу (ФДЭ), снижая ингибиторный эффект γ -субъединицы фермента. Активирующее влияние α -субъединицы трансдуцина на фосфодиэстеразу прекращается после гидролиза GTP. Однако, поскольку гидролиз GTP протекает медленно, фосфодиэстераза находится в активном состоянии достаточно долго и успевает за это время гидролизовать сотни молекул сGMP. Комплекс β , γ -субъединиц трансдуцина ассоциирует с GDP-связанной формой α -субъединицы, и молекулы трансдуцина снова приобретают способность взаимодействовать с фотоактивированным родопсином. Отдельная α -субъединица с родопсином не взаимодействует. Далее весь цикл повторяется.

Строение трех субъединиц (α , β , γ) трансдуцина и фосфодиэстеразы в настоящее время выяснено с помощью методов белковой химии и генетической инженерии, что открывает путь к расшифровке молекулярных механизмов зрительного возбуждения.

Увеличение концентрации $cGMP$ при его непосредственном введении в зрительную клетку коррелирует с увеличением проницаемости цитоплазматической мембраны для ионов, приводит к деполяризации зрительной клетки и увеличивает амплитуду электрического ответа. Избыток $cGMP$ увеличивает латентный период ответа в зависимости от количества введенного циклического нуклеотида. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что молекулы циклического GMP могут быть вовлечены в зрительный процесс.

На рисунке представлена схема функционирования белков зрительного каскада.



Субъединичный состав цитохромоксидазы сильно варьирует в зависимости от источника выделения. Так, цитохром-с-оксидазы бактерий содержат 2—3 субъединицы, митохондрий дрожжей — 7—8, а митохондрий высших животных — 12—13 (Г. Бузе, Б. Каденбах). В настоящее время установлена полная аминокислотная последовательность всех субъединиц фермента из митохондрий сердца быка (Г. Штеффенс, Г. Бузе и др.). Фермент состоит из 12 субъединиц. Их молекулярные массы равны: I — 57 000, II — 26 000, III — 30 000, IV — 17 000, V — 12 500, остальных субъединиц от 5 000 до 10 000. Первичная структура субъединиц I и III предсказана на основании нуклеотидной последовательности соответствующих структурных генов митохондриальной ДНК (Ф. Сенгер и др.). Молекула цитохромоксидазы содержит, по-видимому, по одной копии большинства субъединиц. Биосинтез трех больших субъединиц (I—III) происходит в митохондриях, остальные субъединицы синтезируются в цитоплазме в виде предшественников с N-концевыми сигнальными последовательностями (от 2 000 до 6 000), необходимыми для транспорта через мембрану. Детали процесса самосборки активного комплекса из отдельных субъединиц пока не выяснены. Считается общепризнанным, что субъединицы I и II участвуют в связывании простетических групп (гемов и ионов меди) и образовании 4 окислительно-восстановительных центров. Точная локализация простетических групп в апобелках затруднена, так как они не связаны ковалентно с аминокислотными остатками этих белков и легко теряются при выделении субъединиц.

В результате функционирования цитохромоксидазы происходит генерация электрохимического градиента протонов — движущей силы синтеза АТФ. Долгое время предполагалось, что фермент осуществляет этот процесс, катализируя перенос электронов, а эквивалентное число протонов, необходимых для образования молекулы воды, поглощается из матрикса. В настоящее время имеется ряд убедительных данных, свидетельствующих о том, что цитохромоксидаза функционирует как истинный протонный насос и в действительности на один транспортируемый электрон переносится два протона, один из которых используется в a_3 -Cu-центре, где происходит восстановление кислорода, а второй пересекает мембрану. Предполагается, что основная роль в транспорте протонов принадлежит субъединице III.

Показано, что обработка цитохромоксидазы дициклогексилкарбодиимидом (DCC) приводит к потере протон-транслоцирующей активности, в то время как транспорт электронов практически не затрагивается. DCC в данном случае модифицирует главным образом остатки Glu-90 субъединицы III. Этот район полипептида расположен внутри мембраны и структурно подобен DCC-связывающему участку протеолипида H^+ -АТФазы. Потеря протон-транслоцирующей активности происходит под действием антител к III субъединице. Препараты цитохромоксидазы, из которых избирательно удалена субъединица III (например, с помощью хроматографии комплекса на ДЭАЭ-агарозе), не способны к переносу протонов после реконструкции в липосомы; транспорт электронов при этом не нарушается.

Общие представления о пространственном строении молекулы цитохромоксидазы получены при электронно-микроскопическом анализе двумерных кристаллов этого белка (Р. Хендерсен, Р. Капальди). Согласно этой модели (рис. 333) молекула напоминает по форме букву Y, и общая длина ее ~ 11 нм. Два верхних домена (M_1 и M_2) в основном погружены в липидный бислой и выступают в матрикс на ~ 2 нм, а нижняя часть молекулы (C) экспонирована в цитозоль на 5,5 нм. Расстояние между центрами M_1 и M_2 ~ 4 нм.

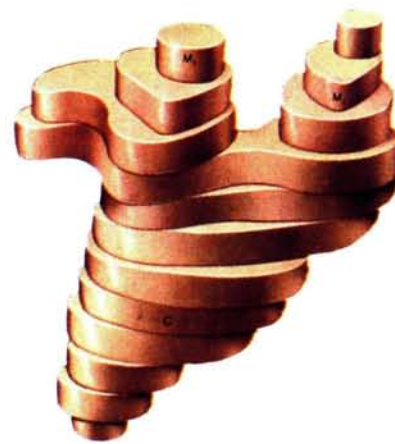


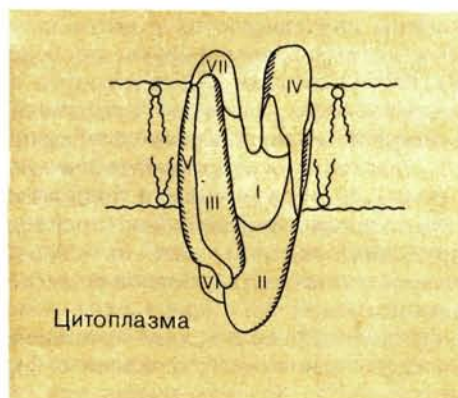
Рис. 333. Трехмерная модель мономера цитохромоксидазы (разрешение $\sim 2,5$ нм).



Митчелл [Mitchell] Питер (р. 1920), английский химик. Окончил Кембриджский университет (1950), с 1964 г.— научный руководитель Глинновского исследовательского института в Корнуолле. Основные работы — по изучению направленности биохимических реакций в пространстве. Разработал хемиосмотическую теорию окислительного фосфорилирования (1961—1966). Лауреат Нобелевской премии по химии (1978).

Домен M_1 больше по объему, чем M_2 . Методом малоуглового рентгеновского рассеяния показано, что оба эти домена содержат α -спиральные структуры, перпендикулярные липидному бислою (8—12 α -спиралей в M_1 и 5—8 в M_2).

Для исследования пространственной организации молекулы фермента в мембране широко используются методы химической модификации непроникающими, гидрофобными и кросс-сшивающими реагентами. В качестве непроникающих меток применяются также антитела к отдельным субъединицам. По имеющимся данным, предложена следующая модель организации цитохромоксидазы в мембране.



Цитохромоксидаза объединяет в себе свойства нескольких металлопротеинов, выполняющих транспортные или окислительно-восстановительные функции для осуществления более сложной комбинации процессов, включающих связывание и восстановление кислорода и транспорт электронов и протонов. Реальные механизмы этих реакций, так же как и многие вопросы относительно структурной организации фермента, в настоящее время неизвестны.

Транспортные аденозинтрифосфатазы (АТФазы)

Важнейшую роль в клетке играют мембранные системы активного (т. е. энергозависимого) транспорта катионов против градиента их электрохимического потенциала, использующие для процесса транслокации энергию гидролиза АТФ и объединенные под названием транспортных аденозинтрифосфатаз, или ионных насосов.

Все известные транспортные АТФазы *in vitro* способны катализировать как сопряженный с гидролизом АТФ активный транспорт ионов, так и обратную реакцию — синтез АТФ за счет энергии

электрохимического градиента. Выполнение *in vivo* преимущественно одного из этих процессов, а также принципиальные различия в структурной организации и механизмах функционирования послужили основой для разделения этих ферментов на две группы. К первой относятся H^+ -АТФазы сопрягающих мембран (АТФ-синтетазы), ко второй — катион-транспортирующие АТФазы, например Na^+ , K^+ -АТФаза, Ca^{2+} -АТФаза и т. п.

H^+ -АТФаза. Обратимая протон-транслоцирующая АТФаза, или H^+ -АТФаза, катализирует последний этап окислительного и фотосинтетического фосфорилирования в митохондриях, хлоропластах и бактериях. Согласно хемиосмотической гипотезе П. Митчелла, постулированной им в 1961 г. и получившей к настоящему времени множество экспериментальных подтверждений, дыхательная или фотосинтезирующая цепь, асимметрично расположенные в мембране, генерируют разность протонных потенциалов на сопрягающей мембране. Обратный транспорт протонов посредством H^+ -АТФазы обуславливает синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата. Поэтому этот фермент иногда называют еще АТФ-синтетазой. Следует отметить, что существуют и другие теории сопряжения окисления и фосфорилирования (Ф. Липман, Э. Слейтер, П. Бойер, Р. Вильямс и др.). Однако они не получили столь широкого распространения, как гипотеза П. Митчелла.

H^+ -АТФазы, выделенные из различных эукариотических и бактериальных клеток, представляют собой сложные мембраносвязанные комплексы и имеют весьма сходную структурную организацию (рис. 334). Их молекулярные массы равны примерно 450 000—500 000. Молекулы этих ферментов состоят из двух частей: водорастворимой каталитической части (F_1), которая, диссоциируя с мембраны, может функционировать только как АТФаза, но не как АТФ-синтетаза, и мембранного сектора (F_0), обладающего протон-транслоцирующей активностью. Обе части имеют сложный субъединичный состав. Только полный $F_1 \cdot F_0$ -комплекс способен осуществлять реакции преобразования энергии, т. е. ре-



Бойер (Boyer) Пол (р. 1918), американский биохимик. Окончил Висконсинский университет, профессор биохимии Калифорнийского университета в Лос-Анжелесе. Основные работы — в области энзимологии. Один из основателей учения об окислительном фосфорилировании.

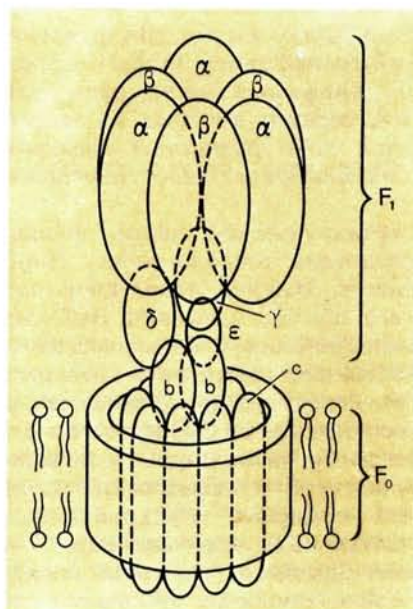


Рис. 334. Модель структурной организации H^+ -АТФазы *E. coli*.



Эрнстер [Ernster] Ларс (р. 1920), шведский биохимик, иностранный член АН СССР (1982). Образование получил в Стокгольмском университете (1956), с 1967 г. — профессор биохимии там же. Основные работы посвящены биоэнергетике, мембранной биохимии и химическому канцерогенезу.

акции, связанные с переносом протонов через мембрану. Связывание N,N' -дициклогексилкарбодиимида (DCC) с F_0 блокирует транслокацию протонов и поэтому ингибирует как синтез, так и гидролиз АТФ $F_1 \cdot F_0$ -комплексом. По данным электронной микроскопии, у бактерий, митохондрий и хлоропластов каталитическая часть F_1 представляет собой сферическую глобулу с диаметром 9—10 нм, прикрепленную к мембране. В митохондриях F_1 прикрепляется к внутренней мембране со стороны матрикса посредством «ножки» длиной 4,5—5 нм. Молекулярная масса F_1 составляет 350 000—400 000. Считается общепринятым, что каталитический центр гидролиза и синтеза АТФ локализован на F_1 . Впервые часть F_1 была выделена Э. Ракером с сотрудниками в 1960 г. из митохондрий сердечной мышцы быка. Позднее было описано выделение белковой мембранной фракции митохондрий сердечной мышцы быка, сообщающей F_1 чувствительность к ингибиторам. Эта фракция была названа F_0 (индекс «0» означает чувствительность к олигомицину). Было показано, что для реконструкции $F_1 \cdot F_0$ -активного комплекса необходимо добавление фосфолипидов, и установлено, что мишенью действия олигомицина является F_0 . Большой вклад в изучение механизма действия как F_1 и F_0 , так и всего $F_1 \cdot F_0$ -комплекса митохондрий внесли работы Л. Эрнстера и сотр.

Очищенный $F_1 \cdot F_0$ -комплекс впервые был выделен Я. Кагавой из мембран термофильных бактерий PS-3.

H^+ -АТФазы бактерий и хлоропластов имеют близкую структурную организацию: F_1 состоит из 5 типов субъединиц, обозначаемых α , β , γ , δ , ϵ в порядке уменьшения их молекулярной массы, а F_0 из трех — a , b , c . До сих пор нет общепринятого мнения о стехиометрии субъединиц $F_1 \cdot F_0$ -комплекса, однако для бактериальных ферментов большинство данных свидетельствует в пользу соотношений $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ для F_1 и $a_1b_2c_6-10$ для F_0 .

Современные представления о функциональной роли субъединиц H^+ -АТФазы, в частности субъединиц F_1 , сформировались главным образом на базе данных, полученных Я. Кагавой, который показал, что каталитический центр фермента локализован в β -субъединице, а в α — находится центр связывания ADP, которому приписывается роль аллостерического регулятора. Комплекс $\gamma\delta\epsilon$ взаимодействует с F_0 , блокируя его протонную проводимость. На основании этих результатов Я. Кагава предположил, что в состав молекулы H^+ -АТФазы входят три функциональных компонента: энергетический трансформер ($\alpha_3\beta_3$), «ворота» ($\gamma\delta\epsilon$) и протонный канал (F_0). Канальная часть непосредственно взаимодействует с воротами, переход которых из закрытого в открытое состояние управляется либо разностью электрохимического потенциала протонов на мембране, либо гидролизом АТФ в трансформере.

В отличие от каталитической части, функциональная роль субъединиц F_0 исследована гораздо хуже. Наиболее изученной является субъединица c . Именно этот белок является мишенью для DCC, поэтому его обычно называют DCC-связывающим белком, а из-за его растворимости в органических растворителях — протеолипидом; в настоящее время ни у кого не вызывает сомнения тот факт, что он непосредственно вовлечен в процесс трансмембранного переноса протонов. Субъединица b , возможно, формирует на мембране центр связывания F_1 и, вероятно, совместно с протеолипидом участвует в образовании протон-проводящего пути в сопрягающей мембране. Функциональная роль третьей субъединицы F_0 остается пока невыясненной.

Ф. Гибсоном было показано, что гены, кодирующие субъединицы H^+ -АТФазы *E. coli*, образуют *unc*-оперон (иногда его назы-



Кагава [Kagawa] Ясуо (р. 1932), японский биохимик. Окончил Токийский университет (1957), с 1972 г.— профессор биохимии медицинской школы Дзюти. Известен работами в области изучения структуры мембранных белков, прежде всего белков, выделенных из мембран термофильных бактерий.

вают атр-опероном), нуклеотидная последовательность которого была установлена благодаря работам Д. Уолкера, М. Футаи и их сотр. (рис. 335).

На основании нуклеотидной последовательности кДНК соответствующих мРНК структурных генов *unc*-оперона были определены аминокислотные последовательности всех субъединиц H^+ -АТФазы *E. coli*. Подобным же методом установлена первичная структура субъединиц H^+ -АТФазы термофильных бактерий PS-3. В случае H^+ -АТФаз митохондрий и хлоропластов информация об аминокислотной последовательности была получена в основном с помощью методов классической белковой химии. H^+ -АТФаза митохондрий имеет более сложное субъединичное строение, чем соответствующие ферменты бактерий и хлоропластов. Установление первичной структуры субъединиц митохондриального фермента (Д. Уолкер, Ю. А. Овчинников, Л. Эрнстер и др.) позволило осуществить сравнительный анализ первичных структур субъединиц H^+ -АТФаз из различных источников с использованием компьютерных программ. На основании полученных данных был сделан вывод, что субъединицы, выполняющие важную функциональную роль в комплексе, например формирующие каталитический центр фермента (α , β) или составляющие основу мембранного сектора (a , c), имеют в значительной степени более консервативную аминокислотную последовательность, вероятно, и более консервативную пространственную организацию в $F_1 \cdot F_0$ - комплексе, чем субъединицы, принимающие участие во взаимодействии каталитической (F_1) и протон-проводящей (F_0) частей комплекса, а также в регуляции его АТФазной или АТФ-синтезирующей активностей.

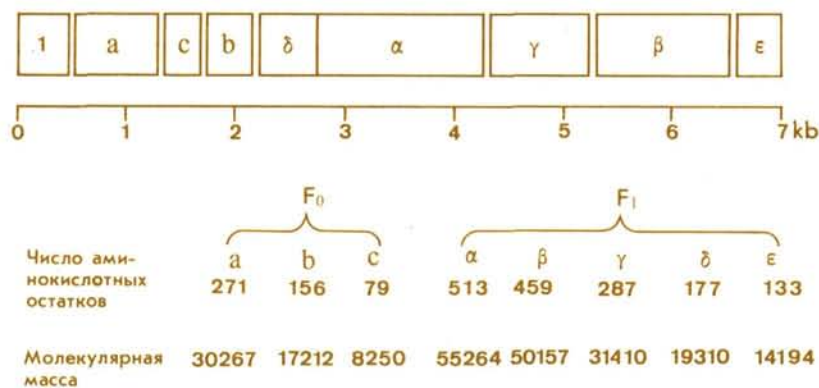


Рис. 335. Схема строения *unc*-оперона *E. coli*.

Na^+, K^+ -Активируемая аденозинтрифосфатаза. Характерной особенностью животных клеток является резко выраженная асимметрия их ионного состава относительно внешней среды. Так, внутриклеточная концентрация ионов калия примерно в 30 раз выше, а ионов натрия в 10 раз ниже, чем в окружающей среде. Градиенты концентрации ионов натрия и калия регулируют объем клетки и ионный состав в узких пределах колебаний, обеспечивают электрическую возбудимость нервных и мышечных клеток и служат движущей силой для транспорта в клетку сахаров и аминокислот. Трансмембранные градиенты концентраций катионов являются

результатом функционирования Na^+, K^+ -активируемой аденозинтрифосфатазы плазматических мембран. Это одно из самых «энергоемких производств» клетки, потребляющее до 40% производимого АТФ.

Более ста лет назад Ю. Либих установил, что в клетках содержится гораздо меньше натрия, чем во внеклеточной среде. С тех пор был накоплен большой экспериментальный материал, свидетельствующий о неравновесном распределении катионов между клеткой и средой. С появлением метода радиоактивных изотопов было обнаружено, что ионы натрия непрерывно проходят через мембрану в обоих направлениях, и возникло предположение о существовании «натриевого насоса» — особого мембранного энергозависимого механизма перекачки ионов натрия из клетки в окружающую среду (Р. Б. Дин, 1941).

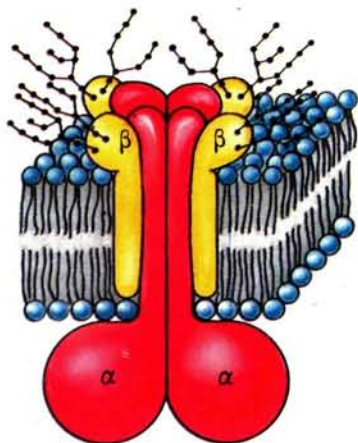
Многочисленные исследования процессов транспорта, проведенные в 50-х годах главным образом на аксонах головных эритроцитов, выявили следующие основные характеристики «натриевого насоса». Активный выброс ионов натрия зависит от внеклеточной концентрации ионов калия, и, наоборот, внутриклеточное содержание Na^+ управляет потоком K^+ в клетку, т. е. потоки Na^+ из клетки и K^+ в клетку взаимосвязаны. Активный транспорт энергозависим и возможен лишь при наличии в клетке АТФ, т. е. ионные потоки сопряжены с гидролизом АТФ.

Na^+, K^+ -Активируемая аденозинтрифосфатаза была открыта Й. Скоу в 1957 г. Во фракции плазматических мембран нервов краба им была обнаружена Mg^{2+} -зависимая АТФ-гидролизующая активность, функционирующая только при одновременном присутствии Na^+ и K^+ и ингибируемая кардиоактивными стероидами. Й. Скоу предположил, что данная АТФаза обеспечивает энергией транспорт ионов натрия и калия против их градиентов.

Na^+, K^+ -Активируемая АТФаза обнаружена во всех исследованных клетках животных. Особенно велико ее содержание в органах, осуществляющих интенсивный солевой обмен (почка, солевая железа) или выполняющих электрическую работу (нерв, мозг, электрический орган). Разработаны методы получения высокоочищенных препаратов Na^+, K^+ -АТФазы. В настоящее время наиболее широко используется метод П. Йоргенсена (1974), заключающийся в избирательном удалении из плазматических мембран (с помощью низких концентраций додецилсульфата натрия в присутствии АТФ) всех белковых компонентов, за исключением Na^+, K^+ -АТФазы, остающейся в мембранном матриксе и полностью сохраняющей функциональную активность. Гомогенный фермент состоит из двух полипептидных цепей с молекулярными массами $\sim 112\,000$ (каталитическая субъединица α) и $\sim 45\,000$ (гликозилированная субъединица β). В опытах по реконструкции очищенного фермента в протеолипосомы Л. Хокиным в 1975 г. было прямо показано, что Na^+, K^+ -АТФаза является не просто энергопреобразующей частью « Na -насоса», но сама осуществляет активный транспорт Na^+ и K^+ , сопряженный с гидролизом АТФ, т. е. представляет собой «натриевый насос».

Активный транспорт одновалентных катионов, сопряженный с гидролизом АТФ, является сложным многостадийным процессом, детальный механизм которого на молекулярном уровне еще не выявлен. В оптимальных условиях функционирования Na^+, K^+ -АТФазы при гидролизе одной молекулы АТФ происходит перенос двух ионов калия внутрь клетки и трех ионов натрия в противоположном направлении.

Пониманию того, как функционирует Na^+, K^+ -АТФаза, способствовало детальное структурное исследование фермента, осуществ-



ленное в 1985—1986 гг. Большая α -субъединица ($\sim 112\ 000$) формирует каталитически активный центр, осуществляющий гидролиз АТФ и расположенный на цитоплазматической стороне мембраны, а также участвует в создании участка связывания кардиоактивных стероидов на наружной стороне мембраны. Таким образом, полипептидная цепь α -субъединицы пронизывает насквозь липидный бислой. Меньшая, гликозилированная β -субъединица ($\sim 45\ 000$) локализована главным образом на наружной стороне мембраны, где она участвует во взаимодействии с кардиоактивными стероидами и где расположены ее углеводные цепи.

В состав молекулы фермента α - и β -субъединицы входят в эквимольных количествах. Протомер $\alpha\beta$ ($\sim 155\ 000$) является, таким образом, практически минимальной структурной единицей Na^+, K^+ -АТФазы.

Общие представления о пространственном строении молекулы Na^+, K^+ -АТФазы были получены с помощью различных подходов. На основании результатов электронно-микроскопических исследований двумерных кристаллов белка была построена трехмерная модель Na^+, K^+ -АТФазы с разрешением 2 нм. В очищенном препарате фермента, представляющем собой фрагменты плазматической мембраны, молекулы белка (в концентрации до 1 г/мл) плотно упакованы в липидном бислое. В результате длительного ингибирования этих препаратов при пониженной температуре в присутствии ионов $\text{Mg}^{2+}, \text{K}^+$ и ванадата происходит ассоциация молекул фермента и формируется область двумерной кристаллизации. Элементарная ячейка этих кристаллов включает два протомера $\alpha\beta$. Результаты трехмерной реконструкции независимых наклонных серий изображений негативно окрашенных кристаллов показаны на рисунке 336 (Ю. А. Овчинников, В. В. Демин, 1985). Вертикальные размеры модели (~ 11 нм) значительно больше толщины липидного бислоя, что также свидетельствует о внемембранном расположении основной части молекулы Na^+, K^+ -АТФазы.

В 1985 г. были определены полные первичные структуры каталитических α -субъединиц Na^+, K^+ -АТФаз из электрического органа ската (Ш. Нума), свиных почек (Ю. А. Овчинников) и почек овцы (А. Шварц). Чуть позднее были расшифрованы аминокислотные последовательности β -субъединиц фермента из двух первых источников. Во всех этих исследованиях использованы главным образом методы анализа нуклеотидных последовательностей, соответствующих их структурным генам. Детекция мРНК в процессе выделения и скрининг библиотек клонов осуществлялись с помощью специфических олигонуклеотидных зондов. Структурная информация, необходимая для синтеза этих олигонуклеотидов, была получена из аминокислотной последовательности пептидных фрагментов белка. Остановимся подробнее на анализе первичной структуры Na^+, K^+ -АТФазы почек свиньи. Как уже упоминалось, α -субъединица в составе нативного мембраносвязанного фермента имеет большие гидрофильные участки, экспонированные на обеих сторонах мембраны, и более чувствительна к действию протеиназ по сравнению с гликозилированной β -субъединицей. В специально подобранных условиях удалось осуществить глубокое расщепление трипсином экспонированных участков α -субъединицы в составе нативной Na^+, K^+ -АТФазы (при полном сохранении интактности β -субъединицы). В результате была установлена структура большинства внемембранных фрагментов α -субъединицы, что в дальнейшем легло в основу модели пространственной организации ее полипептидной цепи.

В случае β -субъединицы для получения пептидов был осуществлен триптический гидролиз гомогенного белка, иммобилизованного на тиол-кремнеземе (см. с. 56).



Скоу (Skou) Йенс Кристиан (р. 1918), датский биохимик. Окончил Копенгагенский университет (1944), с 1963 г.— профессор университета в Аарусе. Исследовал механизм действия местных анестетиков, что привело к открытию Na^+, K^+ -АТФазы (1957).

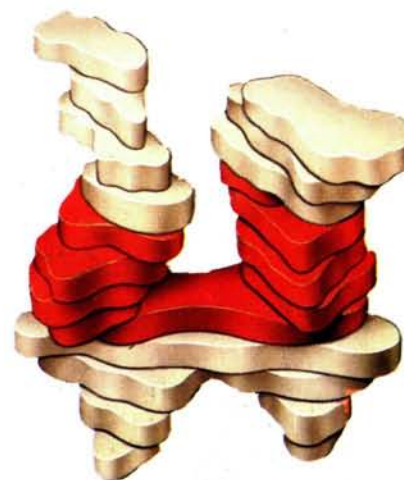


Рис. 336. Трехмерная модель Na^+, K^+ -АТФазы.

Полные нуклеотидные последовательности кДНК, соответствующие транскрибируемым областям мРНК, и выведенные аминокислотные последовательности α - и β -субъединиц Na^+ , K^+ -АТФазы почек свиньи приведены на рисунках 337 и 338 (Ю. А. Овчинников, Е. Д. Свердлов, Н. Н. Модянов). Полипептидная цепь α -субъединицы содержит 1016 аминокислотных остатков. Знание N-концевой последовательности белка позволило установить, что первичный продукт трансляции длиннее на 5 аминокислотных остатков, отщепляемых в ходе процессинга. Структура одного из триптических пептидов полностью совпадает с последовательностью, предшествующей терминирующему кодону (TAG). Аналогичная ситуация имеет место и в случае β -субъединицы. Таким образом, в C-концевых областях обеих субъединиц процессинг отсутствует. β -Субъединица состоит из 302 аминокислотных остатков. Иницирующий

Рис. 337. Аминокислотная последовательность α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФазы почек свиньи.

1-15	AGGACCCGGCGCGGGACACAGACCACCGCCACT ATG GGG AAG GGG GTT
(-5)-(-1)	Met-Gly-Lys-Gly-Val-
16-90	GGA CGC GAT AAA TAT GAG CCC GCA GCC GTG TCA GAG CAT GGC GAC AAA AAG AAG GCC AAG AAG GAG AGG GAT ATG
1-25	Gly-Arg-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Ala-Ala-Val-Ser-Glu-His-Gly-Asp-Lys-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Glu-Arg-Asp-Met-
91-165	GAT GAG CTG AAG AAG GAA GTT TCT ATG GAT GAC CAT AAA CTT AGC CTT GAT GAG CTT CAT CGC AAA TAC GGA ACG
26- 50	Asp-Glu-Leu-Lys-Lys-Glu-Val-Ser-Met-Asp-Asp-His-Lys-Leu-Ser-Glu-Asp-Glu-Leu-His-Arg-Lys-Tyr-Gly-Thr-
166-240	GAC TTG AGC CGA GGC TTA ACA CCT GCT CGA GCT GCT GAG ATC CTA GCC CGA GAC GGT CCC AAT GCC CTG ACA CCC
51- 75	Asp-Leu-Ser-Arg-Gly-Leu-Thr-Pro-Ala-Arg-Ala-Ala-Glu-Ile-Leu-Ala-Arg-Asp-Gly-Pro-Asn-Ala-Leu-Thr-Pro-
241-315	CCA CCC ACA ACC CCT GAA TGG GTC AAG TTC TGT CCG CAG CTC TTC GGA GGC TTC TCC ATG TTA CTG TGG ATC GGA
76-100	Pro-Pro-Thr-Thr-Pro-Glu-Trp-Val-Lys-Phe-Cys-Arg-Gln-Leu-Phe-Gly-Gly-Phe-Ser-Met-Leu-Leu-Trp-Ile-Gly-
316-390	GCG ATT CTT TGT TTC TTG GCC TAT GGC ATT CAA GCT GCT ACA GAA GAG GAA CCT CAA AAT GAT AAT CTG TAC CTT
101-125	Ala-Ile-Leu-Cys-Phe-Leu-Ala-Tyr-Gly-Ile-Glu-Ala-Ala-Thr-Glu-Glu-Glu-Pro-Gln-Asn-Asp-Asn-Leu-Tyr-Leu-
391-465	GGT GTG GTG CTC TCC GCC GTC GTC ATC ATA ACT GGC TGT TTC TCC TAC TAT CAA GAA GCG AAA AGC TCA AAG ATC
126-150	Gly-Val-Val-Leu-Ser-Ala-Val-Val-Ile-Ile-Thr-Gly-Cys-Phe-Ser-Tyr-Tyr-Gln-Glu-Ala-Lys-Ser-Ser-Lys-Ile-
466-540	ATG GAA TCC TTC AAA AAC ATG GTT CCT CAG CAA GCC CTC GTG ATT CGA AAT GGT GAA AAG ATG AGC ATA AAT GCA
151-175	Met-Glu-Ser-Phe-Lys-Asn-Met-Val-Pro-Gln-Gln-Ala-Leu-Val-Ile-Arg-Asn-Gly-Glu-Lys-Met-Ser-Ile-Asn-Ala-
541-615	GAG GAA GTC GTC GTC GGG GAT CTG GTG GAG GTG AAG GGA GGG GAT CGA ATC CCT GCT GAC CTC AGG ATC ATA TCT
176-200	Glu-Glu-Val-Val-Val-Gly-Asp-Leu-Val-Glu-Val-Lys-Gly-Gly-Asp-Arg-Ile-Pro-Ala-Asp-Leu-Arg-Ile-Ile-Ser-
616-690	GCG AAC GGC TGC AAG GTG GAC AAC TCC TCC CTC ACT GGT GAA TCA GAA CCG CAG ACC AGG TCT CCA GAT TTC ACC
201-225	Ala-Asn-Gly-Cys-Lys-Val-Asp-Asn-Ser-Ser-Leu-Thr-Gly-Glu-Ser-Glu-Pro-Gln-Thr-Arg-Ser-Pro-Asp-Phe-Thr-
691-765	AAT GAG AAC CCC CTG GAG ACT AGG AAC ATC GCC TTT TTT TCA ACC AAC TGC GTT GAA GGC ACT GCA CGT GGT ATT
226-250	Asn-Glu-Asn-Pro-Leu-Glu-Thr-Arg-Asn-Ile-Ala-Phe-Phe-Ser-Thr-Asn-Cys-Val-Glu-Gly-Thr-Ala-Arg-Gly-Ile-
766-840	GTG GTG TAC ACT GGC GAT CGC ACC GTG ATG GGC AGA ATC GCT ACC CTT GCT TCC GGG CTG GAA GGG GGC CAG ACT
251-275	Val-Val-Tyr-Thr-Gly-Asp-Arg-Thr-Val-Met-Gly-Arg-Ile-Ala-Thr-Leu-Ala-Ser-Gly-Leu-Glu-Gly-Gly-Gln-Thr-
841-915	CCC ATC GCT GCG GAG ATT GAA CAT TTT ATC CAC ATC ATC ACG GGC GTG GCC GTG TTC CTG GGC GTG TCC TTC TTC
276-300	Pro-Ile-Ala-Ala-Glu-Ile-Glu-His-Phe-Ile-His-Ile-Ile-Thr-Gly-Val-Ala-Val-Phe-Leu-Gly-Val-Ser-Phe-Phe-
916-990	ATC CTT TCT CTG ATC CTC GAG TAC ACC TGG CTC GAG GCC GTC ATC TTC CTC ATC GGG ATC ATT GTA GCC AAC GTG
301-325	Ile-Leu-Ser-Leu-Ile-Leu-Glu-Tyr-Thr-Trp-Leu-Glu-Ala-Val-Ile-Phe-Leu-Ile-Gly-Ile-Ile-Val-Ala-Asn-Val-
991-1065	CCT GAA GGT TTG CTG GCC ACC GTC ACG GTG TGC TTG ACC CTG ACT GCC AAG CGC ATG GCC AGG AAG AAC TGC CTT
326- 350	Pro-Glu-Gly-Leu-Leu-Ala-Thr-Val-Thr-Val-Cys-Leu-Thr-Leu-Thr-Ala-Lys-Arg-Met-Ala-Arg-Lys-Asn-Cys-Leu-
1066-1140	GTG AAG AAC TTG GAG GCT GTG GAG ACC CTG GGG TCC ACA TCC ACC ATC TGC TCA GAC AAA ACC GGA ACC CTC ACC
351- 375	Val-Lys-Asn-Leu-Glu-Ala-Val-Glu-Thr-Leu-Gly-Ser-Thr-Ser-Thr-Ile-Cys-Ser-Asp-Lys-Thr-Gly-Thr-Leu-Thr-
1141-1215	CAG AAC CGA ATG ACA GTG GCC CAC ATG TGG TTC GAC AAT CAA ATC CAC GAG GCT GAC ACG ACG GAA AAT CAG AGC
376- 400	Gln-Asn-Arg-Met-Thr-Val-Ala-His-Met-Trp-Phe-Asp-Asn-Gln-Ile-His-Glu-Ala-Asp-Thr-Thr-Glu-Asn-Gln-Ser-
1216-1290	GGT GTC TCA TTC GAC AAG ACT TCG GCC ACC TGG CTT GCT CTG TCC AGA ATT GCA GGT CTT TGT AAC AGG GCA GTG
401- 425	Gly-Val-Ser-Phe-Asp-Lys-Thr-Ser-Ala-Thr-Trp-Leu-Ala-Leu-Ser-Arg-Ile-Ala-Gly-Leu-Cys-Asn-Arg-Ala-Val-
1291-1365	TTC CAG GCC AAC CAG GAA AAC CTA CCT ATC CTG AAG CGG GCA GTG GCG GGC GAC GCC TCC GAG TCC GCG CTC TTA
426- 450	Phe-Gln-Ala-Asn-Gln-Glu-Asn-Leu-Pro-Ile-Leu-Lys-Arg-Ala-Val-Ala-Gly-Asp-Ala-Ser-Glu-Ser-Ala-Leu-Leu-
1366-1440	AAG TGC ATC GAG CTG TGC TGT GGG TCC GTG AAG GAG ATG AGG GAG CGA TAC ACC AAG ATC GTC GAG ATT CCC TTC
451- 475	Lys-Cys-Ile-Glu-Leu-Cys-Cys-Gly-Ser-Val-Lys-Glu-Met-Arg-Glu-Arg-Tyr-Thr-Lys-Ile-Val-Glu-Ile-Pro-Phe-
1441-1515	AAC TCC ACC AAC AAG TAC CAG CTG TCC ATC CAC AAG AAC CCC AAC ACG GCT GAG CCC CGG CAC CTG CTG GTG ATG
476- 500	Asn-Ser-Thr-Asn-Lys-Tyr-Gln-Leu-Ser-Ile-His-Lys-Asn-Pro-Asn-Thr-Ala-Glu-Pro-Arg-His-Leu-Leu-Val-Met-

кодон в мРНК расположен непосредственно перед последовательностью, кодирующей N-концевую область белка.

Аминокислотные последовательности каталитических α -субъединиц Na^+ , K^+ -АТФаз имеют удивительно высокую степень гомологии, достигающей почти 90% даже для биологически весьма отдаленных источников (почки млекопитающих и электрический орган рыб). Стабильность структуры в ходе эволюции еще раз подчеркивает физиологическое значение «натрий-калиевого насоса» и большую роль α -субъединицы в его функционировании. Этого нельзя сказать о β -субъединице (структуры белков из электрического органа и почек различаются уже на 38%).

АТР-Гидролизующий центр расположен в цитоплазматической области α -субъединицы. Функционально важный остаток аспарагиновой кислоты, подвергающийся фосфорилированию при обра-

1516-1590 AAA GGT GCT CCA GAA AGG ATC CTG GAC CGC TGC AGC TCC ATC CTC ATC CAC GGC AAG GAG CAG CCC CTA GAC GAG
501- 525 Lys-Gly-Ala-Pro-Glu-Arg-Ile-Leu-Asp-Arg-Cys-Ser-Ser-Ile-Leu-Ile-His-Gly-Lys-Glu-Gln-Pro-Leu-Asp-Glu-

1591-1665 GAG CTG AAG GAC GCC TTT CAG AAC GCC TAC CTG GAG CTG GGT GGC CTC GGG GAA CGC GTG CTG GGT TTC TGC CAC
526- 550 Glu-Leu-Lys-Asp-Ala-Phe-Gln-Asn-Ala-Tyr-Leu-Glu-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly-Glu-Arg-Val-Leu-Gly-Phe-Cys-His-

1666-1740 CTT TTC CTG CCG GAC GAG CAG TTC CCC GAA GGC TTC CAG TTT GAC ACC GAC GAT GTG AAT TTC CCT CTC GAT AAT
551- 575 Leu-Phe-Leu-Pro-Asp-Glu-Gln-Phe-Pro-Glu-Gly-Phe-Gln-Phe-Asp-Thr-Asp-Val-Asn-Phe-Pro-Leu-Asp-Asn-

1741-1815 CTC TGC TTC GTT GGG CTC ATC TCC ATG ATT GAC CCA CCG CGA GCG GCC GTC CCG GAT GCC GTG GGC AAA TGT CGA
576- 600 Leu-Cys-Phe-Val-Gly-Leu-Ile-Ser-Met-Ile-Asp-Pro-Pro-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Asp-Ala-Val-Gly-Lys-Cys-Arg-

1816-1890 AGC GCT GGC ATT AAG GTC ATC ATG GTC ACC GGC GAT CAT CCC ATC ACA GCC AAA GCC ATT GCC AAA GGT GTG GGC
601- 625 Ser-Ala-Gly-Ile-Lys-Val-Ile-Met-Val-Thr-Gly-Asp-His-Pro-Ile-Thr-Ala-Lys-Ala-Ile-Ala-Lys-Gly-Val-Gly-

1891-1965 ATC ATC TCG GAA GGC AAT GAA ACG GTC GAA GAC ATC GCT GCC CGC CTC AAC ATC CCA GTG AGC CAG GTG AAC CCC
626- 650 Ile-Ile-Ser-Glu-Gly-Asn-Glu-Thr-Val-Glu-Asp-Ile-Ala-Ala-Arg-Leu-Asn-Ile-Pro-Val-Ser-Gln-Val-Asn-Pro-

1966-2040 AGG GAT GCC AAG GCC TGC GTG GTC CAT GGA AGC GAT CTG AAA GAC ATG ACC TCG GAG CAG CTG GAT GAC ATC TTG
651- 675 Arg-Asp-Ala-Lys-Ala-Cys-Val-Val-His-Gly-Ser-Asp-Leu-Ser-Asp-Met-Thr-Ser-Gln-Leu-Asp-Asp-Ile-Leu-

2041-2115 AAG TAC CAC ACG GAG ATC GTG TTT GCC CGG ACG TCT CCT CAG CAG AAG CTC ATC ATT GTG GAA GGC TGC CAG AGA
676- 700 Lys-Tyr-His-Thr-Glu-Ile-Val-Phe-Ala-Arg-Thr-Ser-Pro-Gln-Gln-Lys-Leu-Ile-Ile-Val-Glu-Gly-Cys-Gln-Arg-

2116-2190 CAG GGC GCC ATC GTG GCC GTG ACT GGC GAC GGT GTC AAT GAC TCT CCC GCT CTG AAG AAG GCA GAC ATC GGG GTT
701- 725 Gln-Gly-Ala-Ile-Val-Ala-Val-Thr-Gly-Asp-Gly-Val-Asn-Asp-Ser-Pro-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Asp-Ile-Gly-Val-

2191-2265 GCC ATG GGG ATT GCT GGC TCG GAC GTG TCA AAG CAA GCT GCT GAC ATG ATC CTC CTG GAT GAC AAC TTC GCC TCC
726- 750 Ala-Met-Gly-Ile-Ala-Gly-Ser-Asp-Val-Ser-Lys-Gln-Ala-Ala-Asp-Met-Ile-Leu-Leu-Asp-Asp-Asn-Phe-Ala-Ser-

2266-2340 ATT GTG ACG GGA GTA GAG GAA GGT CGT CTG ATC TTT GAT AAC TTG AAG AAA TCC ATT GCC TAC ACC CTC ACC AGT
751- 775 Ile-Val-Thr-Gly-Glu-Glu-Gly-Arg-Leu-Ile-Phe-Ile-Asp-Asn-Lys-Lys-Lys-Ser-Ile-Ala-Tyr-Thr-Leu-Thr-Ser-

2341-2415 AAC ATT CCA GAG ATC ACC CCC TTC CTG ATA TTT ATT ATT GCG AAC ATT CCA CTG CCC CTG GGC ACC GTC ACC ATC
776- 800 Asn-Ile-Pro-Glu-Ile-Thr-Pro-Phe-Leu-Ile-Phe-Ile-Ile-Ala-Asn-Ile-Pro-Leu-Pro-Leu-Gly-Thr-Val-Thr-Ile-

2416-2490 CTC TGC ATC GAC TTG GGC ACA GAC ATG GTT CCT GCC ATC TCC CTG GCG TAT GAG CAG GCG GAG AGC GAC ATC ATG
801- 825 Leu-Cys-Ile-Asp-Leu-Gly-Thr-Asp-Met-Val-Pro-Ala-Ile-Ser-Leu-Ala-Tyr-Glu-Gln-Ala-Glu-Ser-Asp-Ile-Met-

2491-2565 AAG AGG CAG CCC CGA AAC CCC AAG ACA GAC AAA CTC GTC AAT GAG CAG CTC ATC AGC ATG GCC TAC GGA CAG ATA
826- 850 Lys-Arg-Gln-Pro-Arg-Asn-Pro-Lys-Thr-Asp-Lys-Leu-Val-Asn-Glu-Gln-Leu-Asn-Ile-Ser-Met-Ala-Tyr-Gly-Gln-Ile-

2566-2640 GGT ATG ATC CAG GCC CTG GGC GGC TTC TTC ACT TAC TTT GTG ATC CTG GCT GAG AAC GGC TTC CTC CCG ATT CAC
851- 875 Gly-Met-Ile-Gln-Ala-Leu-Gly-Gly-Phe-Phe-Thr-Tyr-Phe-Val-Ile-Leu-Ala-Glu-Asn-Gly-Phe-Leu-Pro-Ile-His-

2641-2715 CTG CTG GGC CTC CGG GTG AAC TGG GAT GAC CGC TGG ATC AAC GAC GTG GAG GAC AGC TAC GGG CAG CAG TGG ACC
876- 900 Leu-Leu-Gly-Leu-Arg-Val-Asn-Trp-Asp-Asp-Arg-Trp-Ile-Asn-Asp-Val-Glu-Asp-Ser-Tyr-Gly-Gln-Gln-Trp-Thr-

2716-2790 TAC GAA CAG AGG AAG ATC GTG GAG TTC ACC TGC CAC ACG GCC TTC TTT GTC AGC ATC GTG GTG GTG CAG TGG GCC
901- 925 Tyr-Glu-Gln-Arg-Lys-Ile-Val-Glu-Phe-Thr-Cys-His-Thr-Ala-Phe-Phe-Val-Ser-Ile-Val-Val-Val-Gln-Trp-Ala-

2791-2865 GAC TTG GTC ATC TGC AAG ACC CGG AGG AAT TCC GTC TTC CAG CAG GGG ATG AAG AAC AAA ATC TTG ATC TTT GGC
926- 950 Asp-Leu-Val-Ile-Cys-Lys-Thr-Arg-Arg-Asn-Ser-Val-Phe-Gln-Gln-Cys-Lys-Met-Lys-Asn-Lys-Ile-Leu-Ile-Phe-Gly-

2866-2940 CTC TTC GAA GAG ACG GCC CTG GCT GCT TTC CTC TCC TAC TGC CCC GGA ATG GGC GTG GCC CTG AGG ATG TAC CCC
951- 975 Leu-Phe-Glu-Glu-Thr-Ala-Leu-Ala-Ala-Phe-Leu-Ser-Tyr-Cys-Pro-Gly-Met-Gly-Val-Ala-Leu-Arg-Met-Tyr-Pro-

2941-3015 CTC AAA CCT ACC TGG TGG TTC TGT GCC TTC CCC TAC TCG CTC CTC ATC TTC GTC TAT GAC GAA GTC AGG AAG CTC
976-1000 Leu-Lys-Pro-Thr-Trp-Trp-Phe-Cys-Ala-Phe-Pro-Tyr-Ser-Leu-Leu-Ile-Phe-Val-Tyr-Asp-Glu-Val-Arg-Lys-Leu-

3016-3066 ATC ATC AGG CGA CGC CCT GGC GGC TGG GTG GAG AAG GAA ACC TAC TAC TAG ACCCCCTCCTGCACGCCG
1001-1016 Ile-Ile-Arg-Arg-Arg-Pro-Gly-Gly-Trp-Val-Glu-Lys-Glu-Thr-Tyr-Tyr



Модянов Николай Николаевич (р. 1944), советский химик-биоорганик. Окончил Московский университет (1967), работает в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Занимается изучением систем активного транспорта ионов через биологические мембраны. Лауреат Государственной премии СССР (1982).

зовании интермедиата, локализован в положении 369. Другой участок α -субъединицы, предположительно входящий в активный центр фермента, включает остаток Lys-501, который модифицируется при необратимом ингибировании фермента изотиоцианатом флуоресцеина. О принадлежности к активному центру этой области белка свидетельствует тот факт, что АТФ защищает фермент от ингибирования и модификации.

Для выявления потенциальных внутримембранных участков рассчитывались профили гидрофобности полипептидных цепей субъединиц. В случае α -субъединицы было выявлено 11 таких участков. Из сопоставления полученных данных с аминокислотными последовательностями выделенных внеклеточных пептидов предполагается, что α -субъединица 7 раз пересекает липидный бислой. Поскольку N-концевой участок локализован в цитоплазме, то С-концевая часть экспонирована на внешней стороне мембраны (рис. 339).

Как уже упоминалось, экспонированные участки β -субъединицы выявлены только на наружной стороне мембраны. Результаты

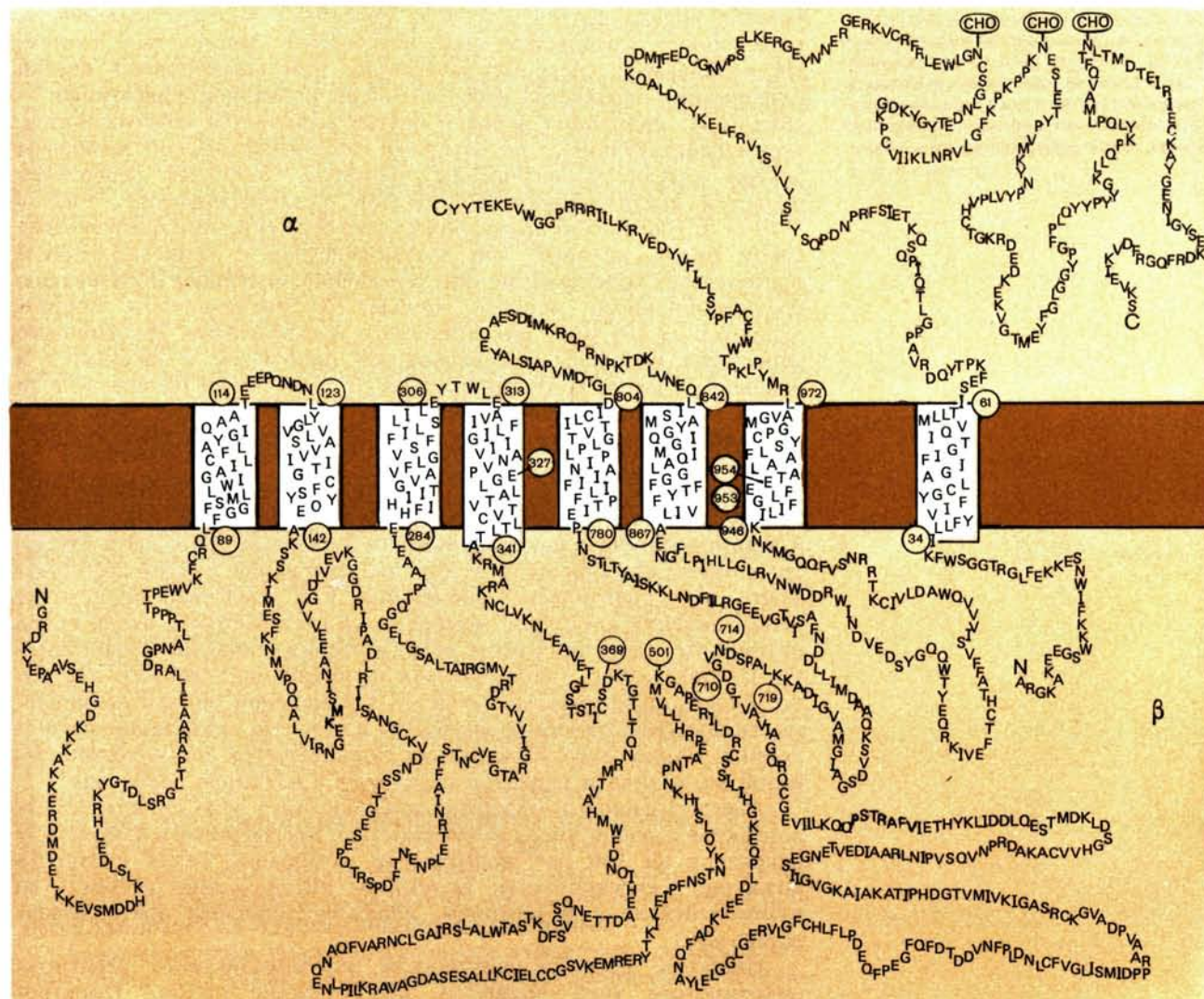
1-3 (-1)	TTGGCAGGAGAGGACGCAAGACGACGCGGCAATCACCCATCTTCAATCCCAGCAGAGCTGCTGACCCGCCACC	ATG Met
4-63	GCC CGC GGA AAA GCC AAG GAG GAG GGC AGC TGG AAG AAA TTG ATG TGG AAC TCC GAA AAG	
1-20	Ala-Arg-Gly-Lys-Ala-Lys-Glu-Glu-Gly-Ser-Trp-Lys-Lys-Phe-Ile-Trp-Asn-Ser-Glu-Lys-	
64-123	AAG GAG TTT TTG GGC AGG ACC GGT GGC AGT TGG TTT AAG ATC CTT CTA TTC TAC GTT ATA	
21- 40	Lys-Glu-Phe-Leu-Gly-Arg-Thr-Gly-Gly-Ser-Trp-Phe-Lys-Ile-Leu-Leu-Phe-Tyr-V1-Ile-	
124-183	TTT TAT GGC TGC CTG GCT GGC ATC TTC ATT GGA ACC ATC CAA GTG ATG CTG CTC ACC ATC	
41- 60	Phe-Tyr-Gly-Cys-Leu-Ala-Gly-Ile-Phe-Ile-Gly-Thr-Ile-Gln-Val-Met-Leu-Leu-Thr-Ile-	
184-243	AGT GAA TTT AAG CCC ACA TAT CAG GAC CGA GTG GCC CCA CCA GGA TTA ACA CAG ATT CCT	
61- 80	Ser-Glu-Phe-Lys-Pro-Thr-Tyr-Gln-Asp-Arg-Val-Ala-Pro-Pro-Gly-Leu-Thr-Gln-Ile-Pro-	
244-303	CAG AGC CAA AAG ACT GAA ATT TCT TTT CGT CCT AAT GAT CCC CAA AGC TAT GAA TCC TAT	
81-100	Gln-Ser-Gln-Lys-Thr-Glu-Ile-Ser-Phe-Arg-Pro-Asn-Asp-Pro-Gln-Ser-Tyr-Glu-Ser-Tyr-	
304-363	GTG GTA AGC ATA GTG AGG TTC CTG GAG AAG TAC AAA GAT TTG GCG CAG AAG GAT GAT ATG	
101-120	Val-Val-Ser-Ile-Val-Arg-Phe-Leu-Glu-Lys-Tyr-Lys-Asp-Leu-Ala-Gln-Lys-Asp-Asp-Met-	
364-423	ATT TTT GAA GAT TGT GGC AAT GTG CCC AGC GAA CTC AAA GAA CGA GGA GAA TAT AAC AAC	
121-140	Ile-Phe-Glu-Asp-Cys-Gly-Asn-Val-Pro-Ser-Glu-Leu-Lys-Glu-Arg-Gly-Glu-Tyr-Asn-Asn-	
424-483	GAA CGA GGA GAG CGA AAA GTG TGC AGG TTC AGG CTC GAA TGG TTG GGA AAC TGC TCT GGA	
141-160	Glu-Arg-Gly-Glu-Arg-Lys-Val-Cys-Arg-Phe-Arg-Leu-Glu-Trp-Leu-Gly-Asn-Cys-Ser-Gly-	
484-543	TTA AAT GAT GAA ACC TAT GGC TAC AAA GAT GGC AAA CCC TGT GTC ATT ATA AAG CTC AAC	
161-180	Leu-Asn-Asp-Glu-Thr-Tyr-Gly-Tyr-Lys-Asp-Gly-Lys-Pro-Cys-Val-Ile-Ile-Lys-Leu-Asn-	
544-603	CGA GTT CTG GGC TTC AAA CCT AAG CCT CCC AAG AAT GAG TCC TTG GAG ACT TAC CCA GTG	
181-200	Arg-Val-Leu-Gly-Phe-Lys-Pro-Lys-Pro-Pro-Lys-Asn-Glu-Ser-Leu-Glu-Thr-Tyr-Pro-Val-	
604-663	ATG AAG TAT AAT CCA TAT GTC CTG CCC GTT CAT TGC ACT GGC AAG CGT GAC GAA GAT AAG	
201-220	Met-Lys-Tyr-Asn-Pro-Tyr-Val-Leu-Pro-Val-His-Cys-Thr-Gly-Lys-Arg-Asp-Glu-Asp-Lys-	
664-723	GAG AAA GTT GGA ACC ATG GAG TAT TTT GGC CTG GGC GGC TAC CCT GGT TTT CCT CTA CAG	
221-240	Glu-Lys-Val-Gly-Thr-Met-Glu-Tyr-Phe-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-Pro-Gly-Phe-Pro-Leu-Gln-	
724-783	TAT TAC CCT TAC TAC GGC AAG CTC CTG CAG CCC AAG TAC CTG CAG CCC CTG ATG GCT GTG	
241-260	Tyr-Tyr-Pro-Tyr-Tyr-Gly-Lys-Leu-Leu-Gln-Pro-Lys-Tyr-Leu-Gln-Pro-Leu-Met-Ala-Val-	
784-843	CAG TTC ACC AAC CTC ACC ATG GAC ACT GAA ATC CGC ATA GAG TGT AAG GCG TAT GGT GAG	
261-280	Gln-Phe-Thr-Asn-Leu-Thr-Met-Asp-Thr-Glu-Ile-Arg-Ile-Glu-Cys-Lys-Ala-Tyr-Gly-Glu-	
844-903	AAC ATT GGG TAC AGT GAG AAA GAC CGT TTT CAG GGA CGC TTT GAT GTA AAA ATT GAA GTT	
281-300	Asn-Ile-Gly-Tyr-Ser-Glu-Lys-Asp-Arg-Phe-Gln-Gly-Arg-Phe-Asp-Val-Lys-Ile-Glu-Val-	
904-912	AAG AGC TGA TCACAACCTCTTCCCACAGCCATTAAGAGTTTAAAGATTTCAGAAACAAAAACCTACTAGTCT	
301-302	Lys-Ser	
	TGAACAAACTGTCATACGTAAGGACCTACACTTAATCTATATGCTTTACACTAGCTTCTGCATTTAATAGGTTAGAAT	
	GTAATTTAAAGGTAGCAATAGCAACAAATATTTATTCTACTG	

Рис. 338. Аминокислотная последовательность β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФазы почек свиньи.

модификации Na^+, K^+ -АТФазы проникающими реагентами свидетельствуют о наличии в β -субъединице также гидрофобной внутримембранной области. В β -субъединице Na^+, K^+ -АТФазы почек свиньи есть три углеводные цепи, присоединенные к остаткам Asp-157, Asp-192, Asp-264; следовательно, эти области белка экспонированы на внешней стороне мембраны. Сопоставляя расположение углеводных цепей с расчетом профиля гидрофобности и данными ограниченного протеолиза, можно предложить, что β -субъединица содержит один трансмембранный участок. Эта модель служит хорошей основой для детального анализа пространственного строения и механизма функционирования Na^+, K^+ -АТФазы.

Среди других ион-транспортирующих АТФаз наиболее хорошо изучена Ca^{2+} -АТФаза мембран саркоплазматического ретикулума. В 1985 г. Д. Мак-Кленоном с сотр. установлена полная первичная структура этого фермента. Он состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 997 аминокислотных остатков, и весьма близок по структурной организации и функциональным параметрам к

Рис. 339. Схема пространственной организации молекул α - и β -субъединиц Na^+, K^+ -АТФазы. Предполагаемые внутримембранные фрагменты белка обозначены прямоугольниками. Гликозилированные остатки аспарагина обозначены CHO.





Карафоли (Carafoli) Эрнесто (р. 1932), швейцарский биохимик. Образование получил в Моденском университете (Италия, 1957), с 1973 г. — профессор Высшей технической школы в Цюрихе. Основные работы посвящены биоэнергетике, биохимии мембран, транспорту кальция и его метаболической роли.

α -субъединице Na^+ , K^+ -АТФазы (ионы Ca^{2+} являются в данном случае аналогом Na^+).

В клетках животных существует и другой тип Ca^{2+} -АТФазы — так называемая калмодулин-зависимая Ca^{2+} -АТФаза плазматических мембран. Фермент состоит из одной полипептидной цепи (молекулярная масса $\sim 140\,000$) и содержится в мембранах в крайне малом количестве (П. Шацман, Э. Карафоли).

Ацетилхолиновый рецептор

Среди разнообразных мембранных белков важное место занимают рецепторные системы, ответственные за передачу информации возбудимыми клетками. Рецепторы клеточной мембраны воспринимают сигнал другой клетки и реагируют на него изменением мембранного потенциала или активацией ферментных систем. На возбудимые (нервные, мышечные или секреторные) клетки информация передается через специализированное образование — синапс. Из окончания нервной клетки выделяется нейромедиатор, взаимодействующий с рецепторами постсинаптической мембраны другой клетки. Классическим примером подобных рецепторов является ацетилхолиновый рецептор (холинорецептор). Еще в 1953 г. Д. Нахманзон предположил, что этот рецептор представляет собой белок, который при взаимодействии с нейромедиатором претерпевает конформационные изменения, ведущие к образованию трансмембранного ионного канала. Холинорецепторы подразделяются на два типа: никотиновые и мускариновые. Никотиновые рецепторы способны активироваться никотином и находятся в основном в месте контакта аксонов со скелетными мышцами, в то время как мускариновые рецепторы имеют высокое сродство к мускарину и сосредоточены в мозге, секреторных клетках, гладких и сердечных мышцах (см. с. 770).

Связывание ацетилхолина с мускариновыми рецепторами сопровождается увеличением концентрации циклических нуклеотидов, а взаимодействие с никотиновыми рецепторами приводит к открытию ионных каналов и соответственно изменению ионной проницаемости постсинаптической мембраны. Как следствие происходит деполяризация клеточной мембраны за счет быстрого входа ионов натрия, что в конечном итоге ведет к возбуждению мышечной клетки. Следовательно, биологическая функция никотинового ацетилхолинового рецептора заключается в изменении ионной проницаемости постсинаптической мембраны в ответ на связывание ацетилхолина. После этого ацетилхолин гидролизуеться ацетилхолинэстеразой до холина и рецептор переходит в исходное состояние.

Ацетилхолиновый рецептор локализован в зоне синаптических контактов с очень высокой плотностью, превышающей 1 молекулу рецептора на 100 нм^2 поверхности мембраны. Такая плотность позволяет секретлируемым молекулам ацетилхолина вступать во взаимодействие с рецептором, избежав гидролиза ацетилхолинэстеразой.

Наиболее богатым источником ацетилхолинового рецептора никотинового типа являются электрические органы (электро-



Шанже (Changeux) Жан-Пьер (р. 1936), французский биохимик. Окончил Парижский университет (1958), с 1975 г. — профессор Пастеровского института и Коллеж де Франс. Предложил (1965, совместно с Ж. Моно и Дж. Уайманом) гипотезу аллостерической регуляции ферментов. Впервые выделил, очистил и охарактеризовал ацетилхолиновый рецептор.

плаксы) скатов *Torpedo marmorata* или *Torpedo californica*, в которых на 1 кг ткани приходится около 100 мг рецептора (для сравнения следует отметить, что в скелетных мышцах млекопитающих холинорецептора примерно в 600 раз меньше). Мембранные препараты электроплаксов на 25—30% состоят из рецептора. Впервые ацетилхолиновый рецептор был выделен в начале 70-х годов с помощью полипептидных нейротоксинов из яда змей. Такие нейротоксины, например α -бунгаротоксин из яда крайта *Bungarus multicinctus* (см. с. 281), способны селективно и практически необратимо связываться с холинорецептором, что позволяет их использовать в процессе его выделения для идентификации и приготовления аффинных сорбентов. Значительный вклад в исследование холинорецепторов внесли лаборатории Ж.-П. Шанже (Франция) и М. А. Рафтери (США), где было осуществлено их выделение, определение субъединичного состава и установление частичной аминокислотной последовательности компонентов.

Ацетилхолиновый рецептор электроплаксов является олигомерным белком, состоящим из четырех субъединиц с предполагаемыми молекулярными массами ~ 40 000, 48 000, 58 000 и 65 000, которые называются соответственно α -, β -, γ - и δ -субъединицами и присутствуют в молярном соотношении 2:1:1:1. Участки связывания ацетилхолина расположены на α -субъединицах, и с одной молекулой рецептора одновременно могут связаться две молекулы нейромедиатора. Все субъединицы белка гликозилированы: из общей молекулярной массы рецептора 285 000—290 000 около 20 000 приходится на углеводные остатки. В мембране электроплаксов ската рецептор в основном находится в димерной форме, образованной за счет дисульфидной связи между δ -субъединицами, причем по функциональной активности мономерная и димерная формы практически не отличаются. Ацетилхолиновый рецептор связан с белком молекулярной массы 43 000, с помощью которого он закрепляется в цитоскелете постсинаптической мембраны.

Холинорецептор является кислым гликопротеином со значением pI 4,5—4,8. Для него характерно высокое содержание остатков дикарбоновых аминокислот. По данным аминокислотного анализа в нем обнаружено присутствие остатков фосфотреонина и фосфосерина. Следовательно, субъединицы рецептора способны фосфорилироваться, однако физиологическая роль этого процесса остается пока неизвестной.

Первоначально были установлены полные аминокислотные последовательности всех субъединиц рецептора ацетилхолина из электрического органа ската *Torpedo*. Работы по структурному анализу холинорецептора методами молекулярной генетики проводились Э. Барнардом (Англия) и Д. М. Патриком (США), а основная часть исследования осуществлена в лаборатории Ш. Нумы (Япония). Поскольку около 2,4% суммарной информационной РНК электроплаксов ската кодирует компоненты рецептора, в библиотеке кДНК удалось достаточно быстро идентифицировать клоны, содержащие структурные гены всех субъединиц. При анализе структуры этих генов было выяснено, что α -субъединица построена из 437, β из 469, γ из 489 и δ из 498 аминокислотных остатков (соответствующие молекулярные массы 50 116, 53 681, 56 601 и 57 565). Трансляция каждой субъединицы осуществляется отдельной мРНК, и для всех субъединиц характерно наличие гидрофобных сигнальных пептидов, состоящих из 17—24 аминокислотных остатков. Оказалось, что субъединицы рецептора обладают высокой степенью структурной гомологии и, по-видимому, их гены образовались в процессе эволюции из одного гена-предшественника.

Аминокислотная последовательность субъединиц холинорецептора определена также на основании исследования соответствующего



Барнард (Barnard) Эрик (р. 1927), английский биохимик, работающий в области молекулярной нейробиологии. Образование получил в Королевском колледже в Лондоне, в настоящее время — руководитель отдела нейробиологии Медицинского исследовательского совета в Кембридже. Основные работы — по исследованию мембранных рецепторов. Одним из первых установил структуру α -субъединицы ацетилхолинового рецептора (1982).

ших генов человека, теленка, цыпленка и др. Так, в геномном банке цыпленка при гибридизации с кДНК γ -субъединицы из электроплаксов обнаружен фрагмент ДНК, состоящий из 9000 нуклеотидов и кодирующий γ - и δ -субъединицы холинорецептора. Гены этих субъединиц содержат по 12 экзонов, характеризуются аналогичной структурой и локализованы в геноме в непосредственной близости друг от друга. α -Субъединицы ацетилхолинового рецептора человека и теленка состоят также из 437 аминокислотных остатков и обладают соответственно 81% и 80% структурного сходства с α -субъединицей из электроплаксов Torpedo. В целом структура компонентов холинорецептора весьма консервативна и сходна для всех исследованных животных. При анализе кДНК мышцы теленка было обнаружено существование нового компонента рецептора — ε -субъединицы, обладающей более 50% структурной гомологии с γ -субъединицами рецепторов человека, теленка и электрического ската.

Первоначально на основании анализа профиля гидрофобности полипептидных цепей холинорецептора было предположено, что каждая субъединица имеет по четыре трансмембранных фрагмента, а N- и C-концевые участки белков расположены снаружи постсинаптической мембраны. Однако с помощью антител против синтетических пептидов, соответствующих C-концевым областям различных субъединиц, удалось доказать локализацию C-концевого фрагмента на цитоплазматической стороне мембраны, вследствие чего субъединицы холинорецептора должны иметь по крайней мере по пять трансмембранных сегментов.

При трансляции мРНК, кодирующих субъединицы холинорецептора, *in vitro* в бесклеточной системе наблюдалось образование белков, соответствующих по размерам компонентам рецептора, но в этих условиях не были обнаружены ни специфичное связывание α -нейротоксинов из яда змей, ни самосборка субъединиц в пентамерный рецепторный комплекс. Трансляцию функционально активных холинорецепторов удалось провести в ооцитах лягушки *Xenopus*. Инъекция в ооциты суммарной мРНК электроплаксов или смеси мРНК, соответствующих четырем субъединицам, приводит к образованию рецепторного комплекса, который не только специфично связывает α -бунгаротоксин, но и изменяет ионную проводимость клеточной мембраны под действием ацетилхолина, либо его агонистов; это использовалось для изучения функциональной роли отдельных субъединиц.

Дальнейшие исследования были направлены на получение в ооцитах гибридного холинорецептора. Рецептор, построенный из α -, β - и δ -субъединиц электроплаксов Torpedo и γ -субъединицы мышцы теленка, обладал функциональной активностью, при этом замена δ -субъединицы на соответствующий компонент из мышцы теленка заметно изменяла воротные свойства, не влияя на проводимость канала ацетилхолинового рецептора. С помощью метода направленного мутагенеза была установлена важная роль остатков Cys-192 и Cys-193 α -субъединицы холинорецептора Torpedo в связывании ацетилхолина, а также охарактеризованы отдельные остатки или фрагменты полипептидной цепи, модификация или делеция которых приводит к блокированию ионного канала (Ш. Нума).

Дифракционными методами были определены размеры молекулы ацетилхолинового рецептора и установлена его трансмембранная организация (рис. 340). На электронных микрофотографиях рецептор имеет вид розетки диаметром около 8,5 нм, в центральной части которой различают входное отверстие ~ 2 нм для трансмембранного канала. Предполагается, что этот канал образован фрагментами полипептидных цепей всех пяти субъединиц. Наиболее

вероятное расположение субъединиц рецептора друг относительно друга — α - β - α - γ - δ .

В электрофизиологических экспериментах установлены основные параметры одиночного канала холинорецептора: его проводимость составляет 20 пСм (См — сименс, единица измерения электропроводности), а время жизни не превышает 1—3 мс. Канал проницаем для ионов натрия, калия, кальция и даже некоторых органических катионов. С учетом размера последних полагают, что канал представляет собой пору, размеры которой в самой узкой части должны быть не менее $0,65 \times 0,65$ нм.

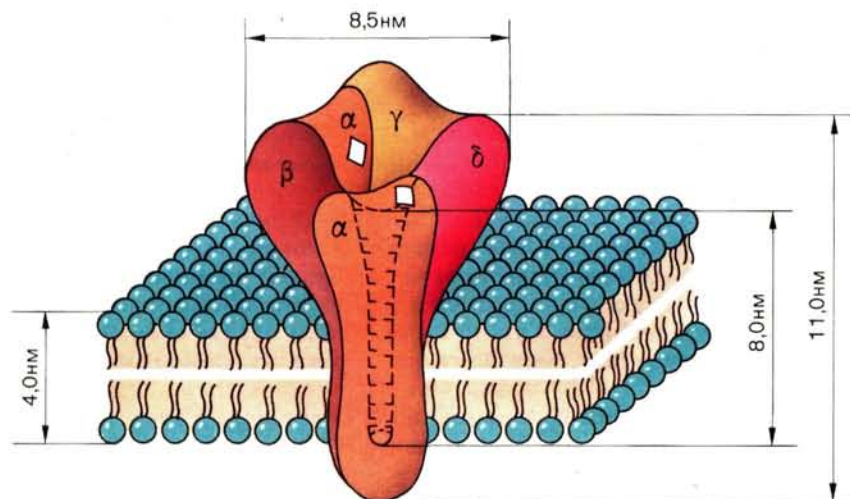


Рис. 340. Модель трансмембранной организации ацетилхолинового рецептора.

Согласно существующим моделям функционирования канала ацетилхолинового рецептора, рецептор может находиться в трех состояниях: покоя, открытом (активированном) и десенситизированном. Активация канала достигается взаимодействием с ацетилхолином и является быстрым процессом, протекающим в миллисекундном диапазоне. В десенситизированном состоянии медиатор все еще связан с рецептором, но канал уже закрыт. Переход из одного состояния в другое, по-видимому, сопровождается существенными конформационными изменениями субъединиц белкового комплекса. Таким образом, ацетилхолиновый рецептор никотинового типа представляет собой трансмембранный комплекс пяти гликопротеинов, образующий хемовозбудимый ионный канал. В отсутствие ацетилхолина канал находится в закрытом состоянии. При связывании с ацетилхолином канал на короткое время открывается для прохождения через него ионов натрия и калия, а затем переходит в десенситизированное состояние.

Натриевый канал

При генерации и проведении нервного импульса первоначальное изменение мембранного потенциала нервного волокна осуществляется за счет повышения проницаемости мембраны для ионов натрия. Этот процесс связан с функционированием быстрых натриевых каналов, управляемых мембранным потенциалом. Еще в начале 50-х годов А. Л. Ходжкин и Э. Ф. Хаксли детально изучили изменение мембранной проницаемости аксонального волокна и предложили теорию функционирования ионных каналов, являющихся, в отличие от хемовозбудимых ацетилхолиновых каналов, типичными представителями электровозбудимых мембранных транспортных систем. При прохождении нервного импульса происходит некоторое снижение мембранного потенциала нерва, что оказывается достаточным для изменения конформации белковых компонентов натриевого канала и перехода его в открытое состояние. Ионы натрия входят внутрь волокна и вызывают деполяризацию мембраны, которая, в свою очередь, активирует находящиеся рядом каналы. Предполагается, что в составе натриевого канала существует два основных функциональных участка — ион-проводящий фрагмент с селективным фильтром и потенциал-чувствительный воротный механизм.

Максимальная концентрация натриевых каналов обнаружена в области перехватов Ранье нервных волокон, где их плотность достигает 2 на 100 нм² поверхности мембраны; примерно в 100 раз меньшее количество их находится в тканях мозга и мышц. Исследование этих транспортных систем в основном осуществлялось электрофизиологическими методами, а также с помощью нейротоксинов.

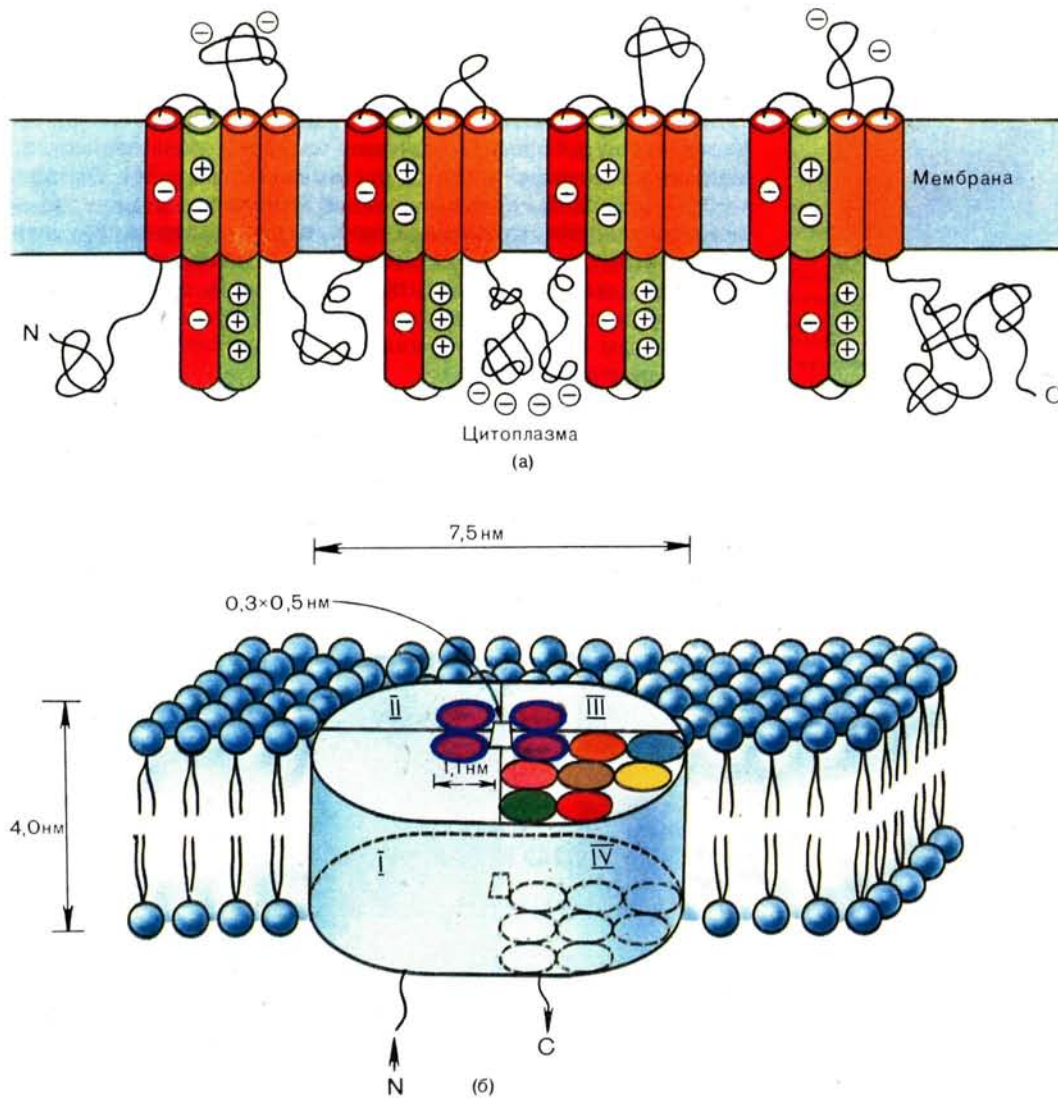
Природные нейротоксины можно использовать в качестве своеобразных инструментов, позволяющих селективно воздействовать на отдельные компоненты канала. В изучение молекулярной организации натриевых каналов как рецепторов нейротоксинов значительный вклад внесли исследования В. А. Катералла (США), М. Лаздунского (Франция), Е. В. Гришина (СССР).

Существуют по крайней мере четыре группы нейротоксинов, по-разному влияющих на работу натриевых каналов. Тетродотоксин и сакситоксин (см. с. 763, 771) селективно блокируют трансмембранный ток ионов натрия и, по-видимому, связываются с ион-проводящей частью канала. Батрахотоксин, аконитин и вератридин влияют на активацию натриевых каналов и, по всей видимости, также взаимодействуют с компонентами, осуществляющими транспорт ионов натрия. Полипептидные токсины скорпионов (см. с. 283) и морских анемонов (см. с. 284) замедляют инактивацию, а некоторые нейротоксины из яда американских скорпионов воздействуют на процесс активации натриевых каналов. Наиболее вероятно, что их рецепторы входят в состав воротного механизма мембранной системы транспорта ионов натрия.

Натриевые каналы были впервые выделены М. А. Рафтери из электрических органов угря *Electrophorus electricus*. Установлено, что они представляют собой гликопротеины молекулярной массы около 260 000, в которых ~30% приходится на углеводные компоненты. Детекция каналов в процессе выделения осуществлялась с помощью радиоактивных производных тетродотоксина или сакситоксина. В других тканях натриевые каналы содержат несколько компонентов. Например, в мозге крысы они образуют олигомерный комплекс из трех гликопротеинов молекулярной массы 260 000 (α), 39 000 (β_1) и 37 000 (β_2). Все субъединицы характеризуются высокой степенью гликозилирования и наличием большого числа остатков дикарбоновых аминокислот. Выделенные препараты каналов из различных электровозбудимых тканей удалось реконструировать

в искусственных мембранах с восстановлением практически полной функциональной активности, присущей натриевым каналам электро-возбудимых мембран.

Аминокислотная последовательность белка натриевого канала из электрического органа угря была определена в лаборатории Ш. Нумы при анализе кДНК, полученной с использованием мРНК электроплаксов. Идентификация клонов в библиотеке кДНК



Участки полипептидной цепи с аминокислотными остатками, заряженными:

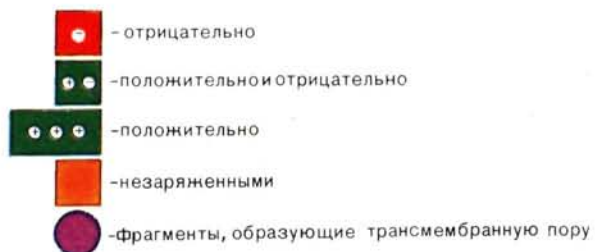
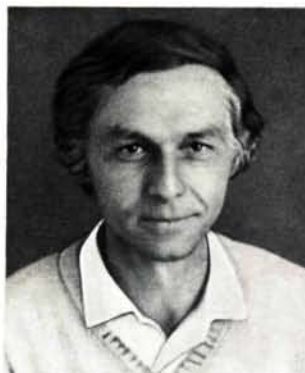


Рис. 341. Гипотетическая модель натриевого канала:
(а) — схема укладки полипептидной цепи;
(б) — схема пространственной организации.



Хубер [Huber] Роберт (р. 1937), немецкий биохимик и кристаллограф. Окончил Технический университет в Мюнхене (1960), с 1972 г. — профессор Института биохимии Общества М. Планка в Мартинсриде. Основные работы — в области изучения структуры и функции белков методом кристаллографии.



Михель [Michel] Хартмут (р. 1948), немецкий биохимик и кристаллограф. Образование получил в Мюнхенском и Тюбингенском университетах, с 1979 г. работает в Институте биохимии Общества М. Планка в Мартинсриде. Основные работы связаны с изучением структуры и функции мембранных белков методом кристаллографии.

осуществлялась с помощью антител к выделенному белку, а также гибридизацией с синтетическими нуклеотидными зондами, комплементарными ряду триптических фрагментов его полипептидной цепи.

Полипептидная цепь натриевого канала из электрического органа угря *Electrophorus electricus* состоит из 1820 аминокислотных остатков, причем сигнальный гидрофобный пептид отсутствует, что предполагает локализацию ее N- и C-концевых участков на цитоплазматической стороне электровозбудимой мембраны. В составе молекулы найдено четыре гомологичных повторяющихся фрагмента, в каждом из которых находятся характерные участки полипептидной цепи с основными, кислыми или незаряженными аминокислотными участками (рис. 341). Предполагается, что четыре подобных участка своими гидрофильными поверхностями образуют трансмембранный канал (рис. 341, а) с размером в самой узкой части около 0,42 нм. По данным электрофизиологических экспериментов размеры ионной поры канала (рис. 341, б) оцениваются ~ 0,3—0,5 нм. В состав воротного механизма канала, по-видимому, входят участки полипептидной цепи, содержащие заряженные аминокислотные остатки, изменение конформации которых под действием электрического поля мембраны, вероятно, и обуславливает переход натриевого канала в открытое состояние. Характерно, что в целом организация канала подобна организации ацетилхолинового рецептора.

Таким образом, ионные каналы непосредственно участвуют в передаче сигнала возбудимыми клетками. Существуют хемовозбудимые (рецепторы ацетилхолина, γ -аминомасляной кислоты, глутамата, глицина и др.) и электровозбудимые (натриевые, калиевые, кальциевые, хлорные и др.) каналы. В эти транспортные системы входят участки связывания нейромедиаторов или сенсоры изменения силы электрического поля мембраны, а также непосредственно ионные поры, образованные несколькими трансмембранными белковыми фрагментами.

Белки фотосинтетических реакционных центров

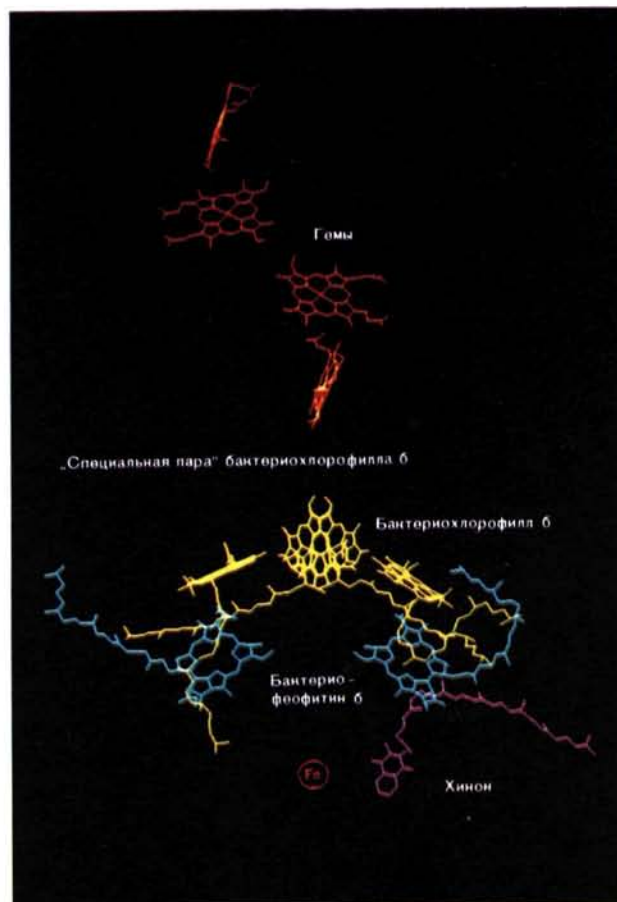
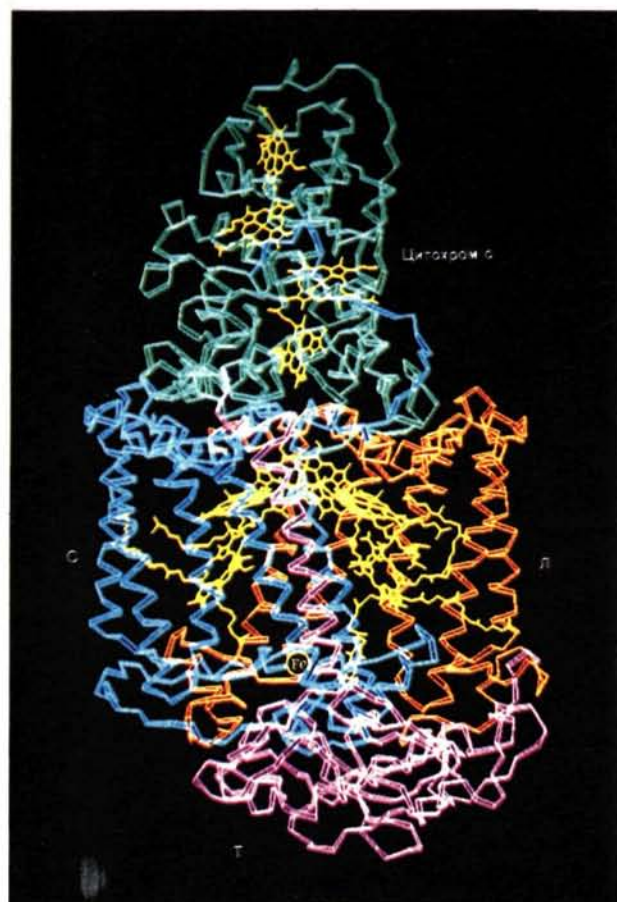
Начальные этапы процесса фотосинтеза осуществляются при непосредственном участии белково-пигментных комплексов фотосинтетических мембран. Энергия света первоначально поглощается светособирающим комплексом и передается далее на реакционные центры, где она с очень высокой эффективностью используется для транспорта электронов через мембрану.

В настоящее время получены данные о структуре мембранных реакционных центров фотосинтезирующих бактерий (Р. Хубер, Х. Михель). Так, в состав реакционного центра пурпурных бактерий *Rhodospseudomonas viridis* входят цитохром *c* и три белка (субъединицы), называемые Л (легкий), С (средний), Т (тяжелый). Простетическими группами, ассоциированными с белками реакционного центра, являются: четыре молекулы бактериохлорофилла *b*, две молекулы бактериофеофитина *b*, две молекулы хинона, два атома негемового железа и каротиноиды.

Полные аминокислотные последовательности белков Л, С и Т были получены из анализа соответствующих генов. Первичная структура четвертого белка реакционного центра, т. е. цитохрома с, пока не установлена. Субъединицы Л, С и Т содержат 273, 323 и 258 аминокислотных остатков соответственно. Важной структурной особенностью является наличие в каждой из легких и средних субъединиц по пяти, а в тяжелой — одного спирализованного участка. Эти участки состоят в основном из 24—30 гидрофобных аминокислот и прерываются короткими гидрофильными фрагментами. Такое построение полипептидных цепей является характерным для мембранных белков. Молекула цитохрома с, входящая в состав реакционного центра, согласно данным аминокислотного анализа содержит 323 аминокислотных остатка и носит ярко выраженный гидрофильный характер. Белок содержит 4 характерных участка связывания гема, последовательность которых аналогична последовательности соответствующих участков других цитохромов с.

Реакционный центр фотосинтезирующих бактерий является единственным комплексом интегральных мембранных белков, полученным в виде высокоупорядоченных кристаллов. Рентгеноструктурный анализ этих кристаллов позволил рассчитать карту электронной плотности с разрешением в 0,3 нм и получить модель пространственного строения протестических групп. Карта электронной

Рис. 342. Трехмерная модель (слева) и пространственное расположение кофакторов внутри этой модели (справа) для белков фотореакционного центра фотосинтезирующих бактерий *Rhodospseudomonas viridis*.



плотности, даже при отсутствии значительной информации о первичной структуре цитохрома *c*, дала возможность однозначно проследить ход отдельных полипептидных цепей (рис. 342). Центральная часть комплекса состоит из субъединиц *L* и *C*, которые связывают бактериохлорофилл *b*, бактериофеофитин *b*, негемовое железо и хинон.

Высокая степень гидрофобности центрального участка реакционного центра свидетельствует о том, что пять α -спиральных сегментов субъединиц *L* и *C*, а также N-концевой фрагмент субъединицы *T* расположены в толще мембраны. Все эти 11 участков и составляют мембранную часть комплекса. Спиральные участки расположены в пространстве практически перпендикулярно плоскости мембраны. Субъединица *T* и цитохром *c* связываются с внутренней и наружной поверхностями мембраны соответственно, причем цитохром *c* не содержит участков, пронизывающих мембрану. По два мембранных фрагмента от каждой из субъединиц *L* и *C* участвуют в связывании негемового железа. Более того, четыре лиганда, необходимые для связывания атома железа, обеспечиваются этими же четырьмя спиральями. На поверхности связывания цитохрома *c* между субъединицами *L* и *C* располагается специальная пара, образованная двумя молекулами бактериохлорофилла *b*, и дополнительные молекулы бактериохлорофилла *b* и бактериофеофитина *b*. Лиганды для ионов магния молекул бактериохлорофилла — остатки гистидина — расположены у самого входа α -спиральных сегментов в мембрану. Что же касается негемового железа, то в его связывании участвуют четыре остатка гистидина субъединиц *L* и *C* и глутаминовая кислота субъединицы *C*.

Трехмерная структура реакционного центра в полном соответствии со спектроскопическими данными дает представление о пути переноса электрона. После поглощения света электрон переносится с возбужденного первичного донора электронов (специальной пары) через бактериохлорофилл *b* на промежуточный акцептор — бактериофеофитин *b* и далее на первичный хиноновый акцептор. Хинон восстанавливает вторичный акцептор — слабо связанный хинон. Полностью восстановленный и протонированный вторичный акцептор освобождается из реакционного центра, а на его место поступает хинон из мембранного окружения. Окисленная специальная пара восстанавливается цитохромом. Перенос электронов через фотосинтетическую мембрану сопровождается транспортом протонов, который сопряжен с синтезом АТФ.