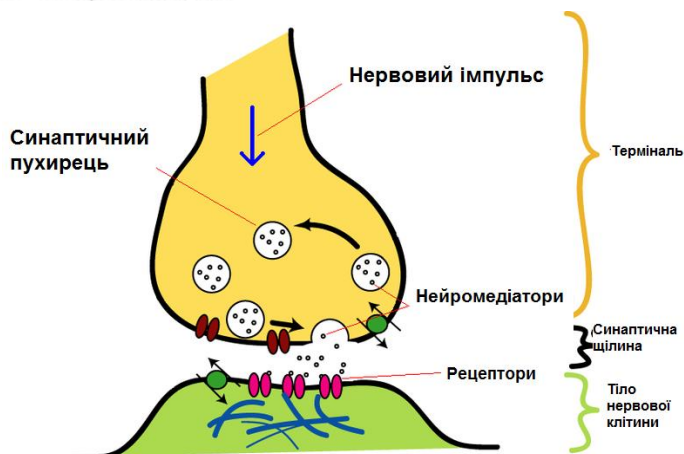
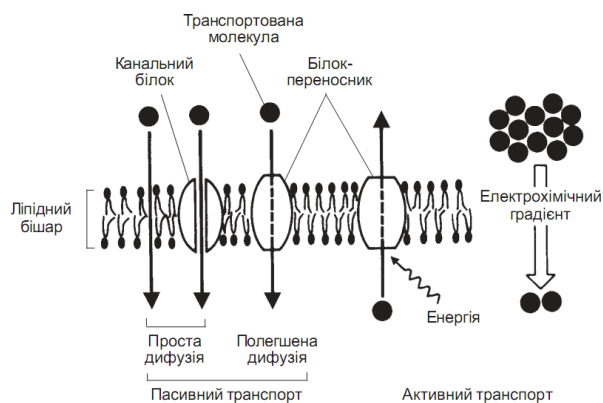
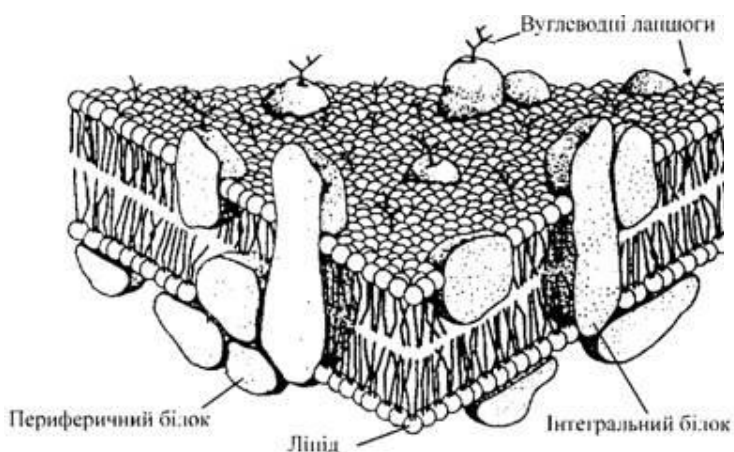


БАЙЛЯК М.М.

БІОЛОГІЧНІ МЕМБРАНИ

Курс лекцій



ББК 28.072

УДК 571.1

Байляк М.М. Біологічні мембрани: курс лекцій.

У посібнику розглядаються особливості хімічного складу та структурної організації біологічних мембран у взаємозв'язку із виконуваними ними функціями; наведено сучасні методичні підходи до вивчення мембранних структур, динамічної поведінки мембранних систем та білок-ліпідних взаємодій. Детально розглядаються основні функції мембран (транспорт речовин через мембрани, роль мембран у взаємодіях клітин з оточенням, механізми передачі сигналів через мембрани), біогенез різних мембран та їх функціональна спеціалізація.

Для студентів, які спеціалізуються в області біології та медицини. Посібник буде корисний всім тим, хто цікавиться широким колом біологічних явищ.

Затверджено до друку Вченою радою Інституту природничих наук
ДВНЗ «Прикарпатський національний університет ім. Василя Стефаника»
(протокол № 5 від 7 лютого 2012 р.)

Рецензенти:

Завідувач кафедри біохімії та біотехнології Інституту природничих наук
ДВНЗ «Прикарпатський національний університет ім. Василя
Стефаника», професор, доктор біологічних наук Луцак Володимир
Іванович

Доцент кафедри біологічної та медичної хімії ім. акад. Г.О. Бабенка Івано-
Франківського національного медичного університету, кандидат
біологічних наук Максимчук Тарас Петрович

ТЕМА 1. ВСТУП ДО БІОМЕМБРАНОЛОГІЇ

1. Предмет та завдання біомембранології
2. Історія досліджень структури мембран
3. Клітинні мембранні структури
4. Біологічні функції мембран

1. Предмет та завдання біомембранології

З розвитком біологічної науки визначальна роль мембран у житті клітини стає все більш очевидною. Ця структура завдяки особливостям своєї будови є не тільки обов'язковою складовою будь-якої клітини, але й визначає особливості їхнього функціонування. До добре відомих властивостей мембран обмежувати клітини від зовнішнього середовища, контролювати вибіркоче проникнення в клітину і з неї різноманітної кількості речовин, внаслідок бурхливого розвитку біологічної науки додалися принципово нові властивості:

1) здатність сприймати, посилювати і передавати всередину сигнали із зовнішнього середовища;

2) забезпечувати утворення і транспорт вздовж по мембранних індукторах специфічної різниці потенціалів, які відіграють роль специфічного джерела енергії;

3) створювати спеціальні умови для протікання реакцій, які здійснюються гідрофобними мембранними ліпідно-білковими кластерами;

4) здійснювати контроль за взаємодією між окремими білками, які занурені в мембранну товщу.

Вивчення мембран є місцем «прикладання» різних наукових дисциплін – від біофізики до молекулярної біології.

Поширення і поглиблення наших знань про біологічні мембрани призвело до виникнення нової галузі знань – **біомембранології**.

На сьогодні, **мембранологія** – галузь знань, яка вивчає структуру і функції мембран та вплив на них різних факторів зовнішнього середовища.

Таким чином, *предметом вивчення біомембранології є клітинні мембрани, їхній хімічний склад, роль у транспорті речовин, перетворенні енергії та передачі інформації всередину клітини та взаємодії із сусідніми клітинами. Значне зацікавлення викликає вивчення функціонування мембранних структур за умов захворювання організму. Знання про мембрани необхідне для розуміння таких процесів, як взаємодія клітин при утворенні тканин, живлення клітин, фагоцитоз і секреція. За сучасними уявленнями, мембрани складають основу структурної організації клітини. Це означає, що мембрани не тільки оточують клітину, а й знаходяться у всередині клітин.*

Завдання біомембранології:

1) вивчення хімічного складу, структури і функцій мембранних ліпідів, мембранних білків та мембранних вуглеводів;

2) вивчення динамічної поведінки мембран та білок-ліпідних взаємодій; встановлення рухливості мембранних ліпідів та їх ролі в підтримці рідинно-кристалічної структури мембран;

3) вивчення транспортних процесів через мембрани, зокрема механізмів активного і пасивного транспорту, характеристика іонних каналів;

4) вивчення ролі мембран у взаємодії клітин з міжклітинним середовищем та іншими клітинами, з'ясування механізмів передачі сигналів через мембрани у різних типах клітин;

5) вивчення особливостей цитоплазматичних мембран органел та біогенезу мембран;

6) вивчення пошкоджень та змін біомембран за певних патологій, старіння та дії оксидативного стресу;

7) вивчення структурно-функціональних особливостей мембран клітин імунної, нервової та інших функціональних систем.

2. Історія досліджень структури мембран

Наявність мембран навколо живих клітин було встановлено понад 100 років тому в роботах К. Негелі, який у 1855 році виявив, що неушкоджені клітини можуть змінювати свій об'єм при зміні осмотичного тиску навколишнього середовища. Ці дослідження були продовжені Е. Овертоном, який показав, що неполярні молекули легше проходять через клітинну мембрану, ніж полярні сполуки. На основі цих спостережень він вперше висловив припущення, що клітинна мембрана має ліпідну природу. Розвиток ідей про структуру мембран істотно просунувся завдяки роботам Е. Гортера і Ф. Грендела, які в 1925 році вперше висунули ідею ліпідного бішару.

Ця ідея виникла на основі простого експерименту. Ліпіди еритроцитів екстрагували ацетоном і потім отримували з них тонку плівку на поверхні води. За допомогою поплавка стискали шар ліпідних молекул на межі розділу вода/повітря доти, поки цей шар не починав чинити опір подальшому стисненню; це явище було пояснене утворенням щільно упакованої мономолекулярної ліпідної плівки. Вимірювання площі, яку займали ліпіди, та її порівняння з площею поверхні еритроцитів, з яких ці ліпіди були екстраговані, дало співвідношення 2:1. Звідси був зроблений висновок, що мембрана еритроцитів складається з ліпідних молекул, розташованих у два шари.

Думка про те, що з мембрани містять білки, була висловлена десятьма роками пізніше Дж. Даніелі. Була висловлена гіпотеза, що мембрана складається з подвійного ліпідного шару, і припущено, що на її поверхні є білок, – **модель Даніелі-Девсона**, або **модель «Сендвіча»** (рис. 1.1). Це була дуже вдала модель, і протягом наступних 30 років експериментальні дані повністю підтвердили її адекватність. Основними компонентами біологічної мембрани є ліпід і білок, і тому питання про взаємне розташування цих компонентів у мембрані стало предметом тривалих дискусій, оскільки виявилось, що мембрани виконують різноманітні функції.

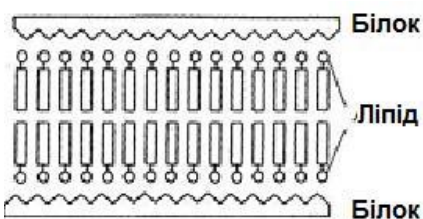


Рис. 1.1. Модель будови біологічних мембран Даніелі-Девсона

Швидкий прогрес в мембранології був досягнутий значною мірою завдяки успіхам у вивченні властивостей мембранних білків. Електронно-мікроскопічні дослідження при застосуванні методу заморожування-сколювання показали, що в мембрани вбудовані глобулярні частинки. Тим часом біохімікам за допомогою детергентів вдалося «роздрібнити» мембрани до стану функціонально активних «частинок». Дані спектральних досліджень вказували на те, що для мембранних білків характерний високий вміст α -спіралей і що вони, ймовірно, утворюють глобули, а не розподілені у вигляді моношару на поверхні ліпідного бішару. Неполлярні властивості мембранних білків наводили на думку про наявність гідрофобних контактів між білками і внутрішньою неполярною областю ліпідного бішару.

Були запропоновані й інші моделі мембран – модель ліпідно-білкового килимка (Бенсон, 1965; Грін, 1966), за якою білки і ліпіди переплетені між собою, і мозаїчна модель, яка враховує неоднакове розміщення білків у ліпідному шарі (рис. 1.2).

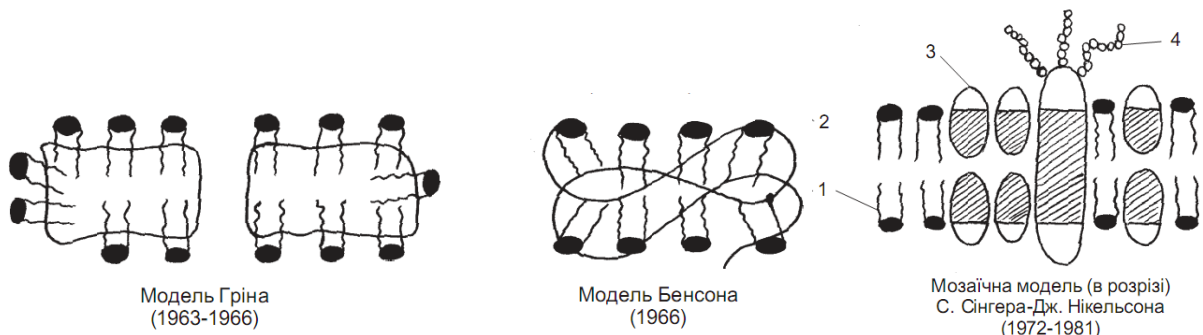


Рис. 1.2. Моделі будови біологічних мембран: 1 – ліпіди, 2 – фібрилярні гідрофобні білки; 3 – глікопротеїни; 4 – вуглеводи.

В основі сучасних уявлень про біологічні мембрани лежить **рідинно-кристалічна (мозаїчна) концепція**, висунута С. Сінгером і Дж. Нікольсоном в 1972 р. і удосконалена С. Сінгером в 1981 р. (рис. 1.2). Згідно неї білкові молекули плавають у рідкому фосfolіпідному бішарі, утворюючи в ньому своєрідну «мозаїку», при цьому мозаїчний візерунок не є жорстко фіксованим і білки можуть змінювати у ньому своє положення.

В останні роки **рідинно-мозаїчна модель** також піддалася модифікаціям, і цей процес буде продовжуватися відповідно до вдосконалення наших знань. Виявляються нові функції цитоскелету. Стає зрозумілим, що не всі мембранні білки дифундують в рідкому ліпідному бішарі. Є дані про існування в мембрані ліпідних доменів. Виявлені динамічні асоціати ліпідів, що більш щільно упаковані (рафти). Виявлений специфічний клас амфіфільних білків, які під впливом позаклітинних сигналів змінюють свою гідрофобність і зворотно дисоціюють від мембран. Таким чином, клітинна мембрана все більше відрізняється за своїми властивостями від «класичного» ліпідного бішару. Тим не менш, рідинно-мозаїчна модель в її різних модифікаціях все ще служить концептуальною основою для пояснення багатьох мембранних феноменів.

3. Клітинні мембранні структури

Мембрани – це відмінний за структурою шар цитоплазми, який відокремлює клітину від міжклітинного простору і ділить її на ряд відділів (компаратментів), здатних до автономного існування. Розрізняють плазматичні (поверхневі) та цитоплазматичні (внутрішньоклітинні) мембрани. Основні принципи структурної організації всіх мембран прокариотів та еукаріотів по суті однакові.

Будь-яка клітина має зовнішню мембрану – її називають **плазматичною**. **Плазматична мембрана:** 1) відіграє роль перепони, що відокремлює вміст клітини від зовнішнього середовища; 2) регулює надходження молекул та іонів у клітину і вихід їх назовні; 3) у ній знаходяться різні ферменти, природа яких залежить від особливостей даної клітини; вона містить спеціалізовані ферменти, які беруть участь у міжклітинних контактах і взаємодіях, в гормональній відповіді і системах транспорту через мембрану як малих, так і великих молекул.

Плазматична мембрана надзвичайно еластична, завдяки чому клітини тварин можуть досить сильно змінювати форму без розриву мембран.

Більшість рослинних клітин, на відміну від тварин, не можуть змінювати свою форму, так, як їх мембрани оточені товстою, міцною і малопружною оболонкою. Її називають **клітинною стінкою**. Клітинні стінки є також у бактерій та грибів.

Усередині клітини еукаріотичних організмів мембрани можуть утворювати **субклітинні частки (органели)** різного призначення (рис. 1.3). Слід зауважити, що зовнішній вигляд органел неоднаковий в клітинах різного типу.

*До органел відносяться **мітохондрії** – своєрідні «енергетичні станції» клітини, спеціалізовані на утворенні АТФ. У цих органелах здійснюються окислювальні перетворення субстратів, що завершуються утворенням АТФ. В одній клітині може міститися від декількох десятків до декількох тисяч мітохондрій. Вони відрізняються за розмірами і обрисами. Найчастіше мітохондрії мають вигляд ниток або гранул. Незалежно від розміру і форми кожна мітохондрія містить дві мембрани – зовнішню і внутрішню. Внутрішня мембрана утворює складки у вигляді перегородок, які називають кристами, і містить ферменти, що беруть участь в транспорті електронів і синтезі АТФ. Простір, обмежений цією мембраною, носить назву матриксу, в якому протікають багато метаболічних процесів.*

*Інші субклітинні органели – **лізосоми** – одномембранні органели, що містять близько 50 протеолітичних та інших гідролітичних ферментів, які розщеплюють білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди та інші сполуки. Речовини, захоплені клітиною шляхом ендо- або фагоцитозу і які необхідно розщепити, доставляються в лізосоми за допомогою везикул – фагосом. У лізосомах відбувається також розщеплення компонентів клітини. Лізосомні ферменти здатні розщеплювати не тільки чужорідні речовини, а й саму клітину. Якщо відбувається загибель клітини, мембрани лізосом розриваються і запускаються процеси автолізу. У звичайних умовах лізосомальна мембрана надійно захищає клітину від дії власних смертоносних ферментів.*

***Фагосоми** – це короткоживучі внутрішньоклітинні везикули, утворені в результаті фагоцитозу – процесу поглинання, захоплення великих часток,*

комплексів, аж до цілих клітин, наприклад, клітин бактерій. Цей процес характерний тільки для клітин деяких типів (амеби, макрофаги). Після транспорту фагосоми всередину клітини вона зливається з лізосомами.

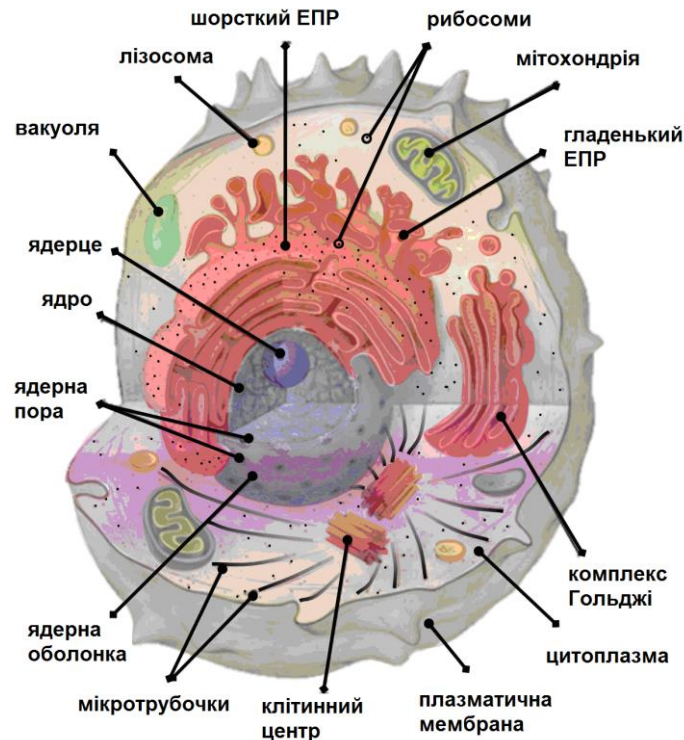


Рис. 1.3. Типова будови тваринної клітини

Пероксисоми – це органели, які містять окислювальні ферменти, що беруть участь у деградації малих молекул, таких, як амінокислоти, ксантин і жирні кислоти. Їх назва пов'язана з присутністю в них каталази, яка розкладає пероксид водню, що утворюється як побічний продукт окислення.

Ендоплазматичний ретикулум – глибокі складки, що безпосередньо примикають до плазматичної мембрани. Це складна мережа цистерн і трубочок, яка займає значну частину внутрішнього об'єму клітини. На мембранах шорсткого ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР) розташовані рибосоми. Він служить місцем біосинтезу білків, які потім транспортуються до місць їх функціонування. Області ЕПР, які не містять рибосом, називаються гладеньким ЕПР. Тут здійснюється біосинтез стеролів, відбувається десатурація (утворення подвійних зв'язків) жирних кислот. Мембрани ЕПР виконують й іншу важливу функцію – вони знешкоджують речовини, присутність яких порушує нормальну роботу клітини. Цей процес називається детоксикацією. Ці процеси входять в узгоджену систему транспорту електронів, який здійснюється за участю цитохромів b_5 і P_{450} .

До мембран ендоплазматичної мережі примикає так званий **комплекс Гольджі**, який також складається з обмежених мембранами пухирців і цистерн, зібраних у купки. Білки, синтезовані рибосомами, через кілька хвилин починають переміщатися до апарату Гольджі. За допомогою електронного мікроскопу вдалося встановити, що в апараті Гольджі білки щільно упаковані в гранули: така упаковка білків відбувається перед їх секрецією. В апараті Гольджі відбувається також дозрівання складних білків, наприклад, посттрансляційна модифікація

глікопротеїнів, синтезованих в ЕПР і призначених для секреції, включення в плазматичну мембрану або доставки в лізосоми. Апарат Гольджі містить глікозидази і глікозилтрансферази, які вступають в дію послідовно, по мірі того, як білок, який піддається процесингу, переміщається від початку апарату Гольджі (цис-область) до його кінця (транс-область). У деяких клітинах апарат Гольджі формує також лізосоми та інші субклітинні частки.

Оболонка, яка оточує **ядро**, складається з двох мембран, зовнішньої і внутрішньої, розділених проміжком, який називається перинуклеарним простором. Ця мембрана походить з ЕПР і нерозривно пов'язана з ним. Ядерна мембрана захищає генетичну інформацію від шкідливих зовнішніх впливів. Найбільш характерними морфологічними ознаками ядерної мембрани є наявність пор. Вони мають діаметр близько 600 Å. У тому місці, де розташовані ці структури, внутрішня і зовнішня ядерні мембрани з'єднуються. Вважають, що пори дозволяють комплексам мРНК-білок переходити з ядра в цитоплазму, а регуляторним білкам переміщатися в обох напрямках, з цитоплазми в ядро, і навпаки.

Крім органел, характерних для більшості клітин, є й спеціалізовані мембранні системи, такі, як саркоплазматичний ретикулум м'язових клітин, мієлінова оболонка периферичних нервових волокон, тилакоїдні мембрани хлоропластів і мембрани дисків у паличках сітківки. У прокаріотів також є мембрани, хоча і не настільки складно побудовані, як у еукаріотичних організмів. Грам-позитивні бактерії, наприклад, *Bacillus subtilis*, мають лише цитоплазматичну мембрану, а грам-негативні бактерії (*Escherichia coli*) – ще й зовнішню оболонку, розташовану поверх тонкої пептидогліканової клітинної стінки. У клітинах прокаріотів виявлені також деякі спеціалізовані органели (зокрема, хроматофори, що містять фотосинтезуючий апарат у пурпурних бактерій *Rhodobacter sphaeroides*).

Всі клітинні мембрани відрізняються винятковою тонкістю, при цьому є досить міцними на розрив, стійкими і гнучкими, а за електроізоляційними властивостям переважають багато ізоляційних матеріалів, що застосовуються в техніці. Загальна площа мембран в органах і тканинах організму досягає великих розмірів. Печінка щура важить всього 6 г, сумарна ж площа її клітинних мембран становить кілька сотень квадратних метрів.

4. Біологічні функції мембран

Незважаючи на різноманіття різних типів клітин, їхні мембрани виконують загальні біологічні функції.

1) Перш за все, мембрани відмежовують живе від неживого. Окрім того, вони організують всередині клітини *компартименти* (органели) з різними властивостями. У кожному компартменті мембрани забезпечують збереження специфічних фізико-хімічних умов. Тому по обидві сторони мембрани такі умови середовища як кислотність, концентрація розчинених речовин, електричний потенціал, зазвичай, не однакові.

2) Мембрани не тільки розділяють клітину на окремі компартменти, але і беруть участь у регуляції метаболічних сигналів, які передаються між зовнішньою і

внутрішньою стороною цих компартментів. Це може проявлятися у вигляді фізичного перенесення іонів або молекул через мембрану або за допомогою конформаційних змін, індукованих у мембранних компонентах. Таким чином, мембрани контролюють проникнення в клітину і вихід з неї метаболітів.

3) За допомогою мембранних рецепторів мембрани реагують на зовнішні сигнали і трансформують їх, тобто здатні класифікувати і вибірково модулювати їх, передаючи всередину клітини суттєву інформацію. Мембрани здатні забезпечувати утворення і підтримку різниці потенціалів, а також транспортувати мембранний потенціал вздовж по мембранних індукторах, дозволяючи використовувати цей специфічний вид енергії в різних частинах клітини.

4) З мембранами пов'язане функціонування багатьох клітинних ферментів. Деякі ферменти активні тільки тоді, коли вони прикріплені до мембрани, інші, навпаки, в цьому стані не виявляють активності і починають діяти лише після відщеплення їх і виходу в цитоплазму. Тому важливою властивістю мембран є здатність створювати спеціальне середовище для захисту гідрофобних білків від атаки водорозчинними сполуками і забезпечення їх функцій, тобто в мембрані створюються спеціальні умови для протікання реакцій, які здійснюються гідрофобними білками. Одночасно мембранні ліпіди здійснюють контроль за взаємодією між окремими білками, зануреними в мембранну товщу.

4) Деякі ферменти утворюють своєрідні мембранні ансамблі, які здійснюють ланцюг послідовних перетворень саме завдяки тому, що їх компоненти об'єднані загальною локалізацією, яка організована мембраною. Завдяки цій обставині підвищується ефективність сумарного процесу. Є ферменти, які, діючи на мембранозв'язані субстрати, тим самим беруть участь у біосинтезі мембран. За участю мембран в тій чи іншій мірі здійснюється більшість життєво важливих функцій, наприклад, протікають такі різні процеси, як реплікація прокаріотичної ДНК, біосинтез білків та їх секреція, біоенергетичні перетворення, а також функціонування систем гормональної відповіді.

5) Мембрани беруть участь у взаємодії клітин із середовищем. Ця властивість лежить в основі забезпечення специфіки міжклітинних контактів та імунологічних відповідей. Клітини розпізнають собі подібних, вступають з ними в контакт і обмінюються різноманітною інформацією. Якщо подрібнити ембріони амфібії до стану стовбурових клітин і перемішати їх, можна спостерігати, що через деякий час клітини самовільно починають «сортуватися»: родинні клітини об'єднуються в пласти, що дають початок тканинам, і, в решті-решт, знову утворюються структури, які нагадують ембріон. Завдяки цій властивості клітини здатні створювати тканини, органи і цілісні організми.

Більшість мембран, окрім загальних, виконують також спеціальні функції. Наприклад, мембрани мітохондрій і хлоропластів зелених рослин здійснюють трансформацію енергії. Мембрани, розташовані в стінках кишківник, виконують функції, пов'язані з процесами пристінкового травлення. Мембрани нервових клітин генерують електричні імпульси. Мембрани м'язових клітин беруть участь в ініціації та регуляції скорочення. Клітини органів почуттів містять спеціалізовані мембрани, що перетворюють енергію світла і звуку в електричні імпульси і передають центральній нервовій системі інформацію про запахи, зміни температури чи тиску.

ТЕМА 2. СТРУКТУРНІ КОМПОНЕНТИ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН: ЛІПІДИ

1. Структура окремих груп мембранних ліпідів
2. Жирні кислоти та їх просторова конфігурація
3. Амфipатична природа мембранних ліпідів і організація ліпідних міцел, ліпосом та бішару
4. Біологічні функції мембранних ліпідів

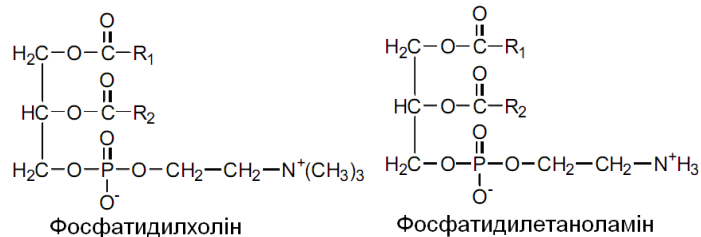
У більшості мембран міститься 50-75% ліпідів, решту вмісту припадає на білки. У плазматичній мембрані виявлено до 10% вуглеводів, які складають вуглеводну частину глікопротеїнів або гліколіпідів. В інших мембранах вуглеводів є значно менше.

1. Структура окремих груп мембранних ліпідів

Ліпіди складають у середньому 40% сухої маси мембран, з них 80% припадає на фосфоліпіди, решту – гліколіпіди та стероїди (у мембранах знаходиться приблизно 15% холестерину від сухої маси).

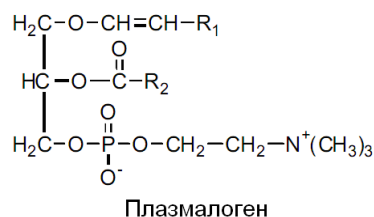
1) **Фосфоліпіди.** Із фосфоліпідів найчастіше в мембранах зустрічаються гліцеролфосфоліпіди (похідні фосфатидної кислоти – фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин, фосфатидилінозит) та сфінголіпіди (сфінгомієліни), рідше – інозитфосфоліпіди. У назві фосфоліпідів, які втратили один з двох ацильних залишків, вводиться приставка «лізо». Лізофосфоліпіди виявляють в мембранах в невеликих кількостях: поява цих речовин призводить до порушення структури бішару і лізису клітин.

Основними ліпідами мембран клітин тварин є гліцеролфосфоліпіди: фосфатидилхолін (лецитин) і фосфатидилетаноламін (кефалін).



Існує кілька груп фосфоліпідів, що відрізняються від наведених вище фосфоліпідів по своїй будові: 1) *плазмалогени*, 2) *діольні фосфоліпіди* і 3) *дифосфатидилгліцериди*.

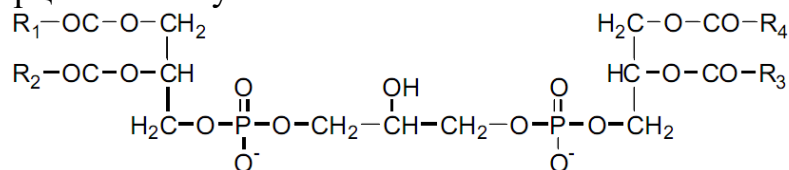
У молекулі *плазмалогену* перший вуглець гліцерину (C₁) замість ацильної групи приєднує залишок ненасиченого довголанцюгового спирту. Радикал R₃ у плазмалогенах м'язів представлений холіном, а в плазмалогенах мозку – серином або етаноламіном.



Діольні фосфоліпіди характеризуються тим, що замість гліцерину в складі їх молекул містяться двоатомні спирти: етиленгліколь або пропандіол. За фізико-хімічними властивостями, діольні фосфоліпіди нагадують лізоформи фосфоліпідів. Відносно клітинних мембран вони проявляють більш руйнівну дію, ніж лізофосфоліпіди. У малих кількостях вони не пошкоджують мембрану, а лише змінюють її властивості, наприклад, підвищують проникність для невеликих молекул та іонів. У великих кількостях вони викликають гемоліз еритроцитів, знижують рецепцію ацетилхоліну чи модифікують імунні реакції. Деякі клітини починають інтенсивно синтезувати діольні ліпіди в період швидкого росту і припиняють їх утворення, коли клітинний ріст сповільнюється. Можливо, це пов'язане з тим, що в період росту клітин їхні мембрани повинні бути більш лабільними. Ці ліпіди присутні у вигляді незначних домішок в органах і тканинах, що характеризуються посиленою активністю (дозрівання насіння, регенерація печінки і т.д.).

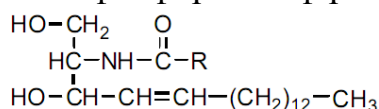
Цікаво, що існують організми, яким не страшні високі концентрації діольних ліпідів. Клітини морських зірок, наприклад, можуть накопичувати дуже багато діольних ліпідів без шкоди для їх власних мембран, але механізм захисту клітинних мембран від цих сполук невідомий.

Дифосфатидилгліцериди – найбільш поширеним представником цієї групи фосфоліпідів є кардіоліпін – необхідний компонент мітохондрій, виділений першопочатково з серцевого м'язу.



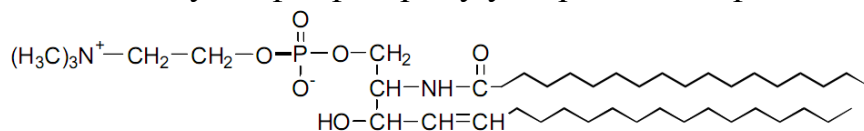
Кардіоліпін

Як згадувалося вище, окрім гліцерофосфоліпідів, до групи фосфоліпідів входять і **сфінголіпіди**, які можна представити як похідні цераміду (ефіру сфінгозину з жирною кислотою) і монофосфорних ефірів спиртів.



Церамід

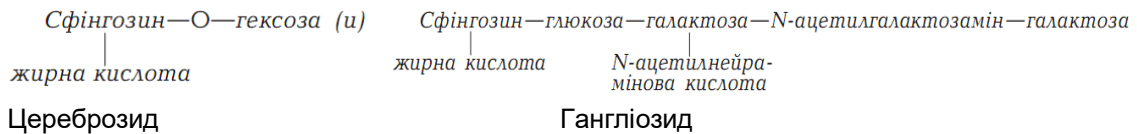
Шляхом приєднання до гідроксилу сфінгозину залишку фосфохоліну, фосфоетаноламіну чи фосфосерину утворюються сфінгомієни.



Сфінгомієліни містяться у великих кількостях у білій речовині мозку, в мієлінових оболонках нервових стовбурів. Жирні кислоти, що входять до його складу, довголанцюгові і містять мало подвійних зв'язків. Зазвичай це лігноцеринова (C_{24:0}) і нервонова (C_{24:1}) кислоти. У сірій речовині мозку до 70% жирних кислот сфінгомієліну представлено стеариноювою кислотою (C_{18:0}).

2) **Гліколіпіди** клітинних мембран – глікозильні похідні цераміду,

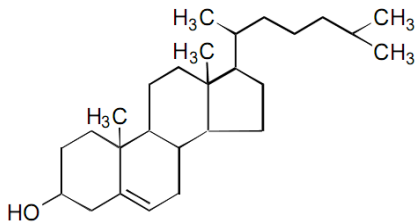
представлені цереброзидами, сульфатидами та гангліозидами.



Багато гліколіпідів виявлені в мембранах мієліну. Природною функцією мембранних гангліозидів є участь в диференціюванні нейрональної тканини, гангліозиди інших клітин – лімфоцитів – визначають видоспецифічність і регулюють міжклітинні контакти.

3) Стероїди – спирти з стерановим скелетом, до яких відносяться як немембранні ліпіди (з них найбільш важливі – гормони), так і компоненти мембран. У перелік мембранних компонентів стероїдного ряду входять холестерин, ситостерин, тетрахіменін. У тканинах тварин поширений холестерин. У рослинних клітинах холестерин не виявлений, його замінюють фітостерини. У бактерій стероїди відсутні.

Холестерин та його ефіри – обов'язкові складові плазматичних мембран клітин тварин. При цьому холестерин легше вбудовується в мембрану, ніж його ефіри.



Холестерин

Молекули холестерину, як і інші ліпідні молекули, мають полярну голову і витягнуту в довжину неполярну частину. Тому вони добре вбудовуються в двошарові ліпідні структури, що утворюють клітинні мембрани. При утворенні ефірів холестерину зв'язок молекули з бішаром послаблюється, що полегшує його витіснення з мембрани. Особливо багато холестеролу міститься в

зовнішніх мембранах клітин. Наприклад, у плазматичній мембрані клітин печінки холестерин становить близько 30% всіх мембранних ліпідів.

Роль холестерину в біологічних мембранах. Було показано, що холестерин впливає на рухливість жирно-кислотних хвостів мембранних ліпідів. Якщо мембрана занадто ригідна і існує небезпека «застигання» жирно-кислотних ланцюгів, холестерин викликає її розрідження, оскільки ланцюги в його присутності стають більш рухливими. Якщо ж мембрана занадто «рідка», то холестерин її ущільнює. Таким чином, холестерин грає роль регулятора, що забезпечує правильну упаковку ліпідної частини мембрани, необхідну для її нормальної роботи.

Яка ж природа ущільнюючої дії холестерину? Зазвичай вуглеводневі хвости фосфоліпідів розміщуються не перпендикулярно до площини мембрани, а під деяким кутом. За присутності холестерину нахил хвостів стає меншим. Кожна молекула лецитину займає за присутності холестерину меншу площу на поверхні мембрани, внаслідок чого відбувається її ущільнення.

2. Жирні кислоти та їх просторова конфігурація

До складу молекул ліпідів входять різні залишки жирних кислот. Завдяки цьому властивості ліпідів сильно відрізняються. Проте, при всій різноманітності

жирних кислот у даній тканині, зазвичай, переважають, дві або три з них.

В організмі тварин, окрім пальмітинової і олеїнової кислот, міститься багато стеаринової кислоти, а також і більш високомолекулярні кислоти з числом атомів вуглецю 20 і більше. Зазвичай, жирні кислоти мають парну кількість атомів вуглецю; жирні кислоти з непарним числом атомів зустрічаються тільки в складі церебросидів і гангліозидів. Ацильні зв'язки в молекулах природних фосфоліпідів, як правило, представлені різними жирними кислотами. Якщо ненасиченою є лише один жирнокислотний ланцюг, то він приєднаний до другого вуглецевого атома гліцерину. Число подвійних зв'язків у молекулах жирних кислот коливається від 1 до 6 і залежить від навколишнього середовища існування, складу їжі, сезону і т.д. Подвійні зв'язки в жирних кислотах тваринного походження розділені метиленою групою $-CH = CH-CH_2-CH = CH-$.

У вищих рослинах присутні, в основному, пальмітинова, олеїнова і ліолева кислоти (стеаринова майже не виявляється), а кислоти з парним числом атомів вуглецю від 20 до 24 зустрічаються вкрай рідко. Жирні кислоти рослин часто мають зв'язані (кон'юговані) зв'язки: $-CH = CH-CH = CH-$.

Насичені жирні кислоти можуть приймати безліч конфігурацій внаслідок високої свободи обертання навколо одинарних C-C зв'язків. Термодинамічно найбільш вигідною є транс-конфігурація. Ненасичені жирні кислоти мають жорстку структуру, оскільки обертання навколо подвійних зв'язків неможливо. Вони існують або у транс- або в цис-конфігурації. Ненасичені жирні кислоти містять подвійні зв'язки майже завжди в цис-конформації, транс-ненасичені жирні кислоти в природі майже не зустрічаються. Винятком є лише вакценова кислота – конфігураційний антипод олеїнової кислоти.

Цис-конфігурація подвійного зв'язку зумовлює вигин ланцюга під кутом приблизно 30°. Тому цис-ненасичені жирні кислоти з одним подвійним зв'язком викликають локальні збурення бішару. При цьому довжина такого ланцюга зменшується, а об'єм, який він займає, зростає. В області локалізації подвійних цис-зв'язків утворюються вигини (так звана гош-форма) (рис. 2.1).

При підвищенні температури теплова рухливість жирнокислотних ланцюгів призводить до спонтанного виникнення вигинів. Якщо вигини, відповідні гош-конформації, з'являються на прилеглих ділянках жирнокислотного ланцюга, ця область може приймати форму петлі або порожнини (кінк). В результаті взаємоперетворень транс- і гош-конформацій (так званого транс-гош переходу) кінки можуть «ковзати» уздовж ланцюга, забезпечуючи переміщення їх вмісту поперек мембрани. Таким чином, може здійснюватися дифузія захопленої води через гідрофобний бішар. При підвищенні щільності упаковки бішару конфігураційна рухливість C-C-зв'язків зменшується. У цій ситуації в бішарі оптимальними є дві конфігурації ланцюга: коли весь ланцюг знаходиться в транс-конфігурації, або коли є «подвійний гош», тобто вигини, які виникають на двох сусідніх ділянках ланцюга внаслідок утворення гош-конформації, компенсують один одного, і весь ланцюг в цілому не має вигинів.

У бактерій поліненасичені жирні кислоти, як правило, відсутні. Для їх мембран також характерний більш високий вміст вільних жирних кислот. Жирнокислотний склад мембранних ліпідів тварин, на відміну від бактеріальних і

рослинних організмів, не такий неоднорідний, але більш варіабельний.

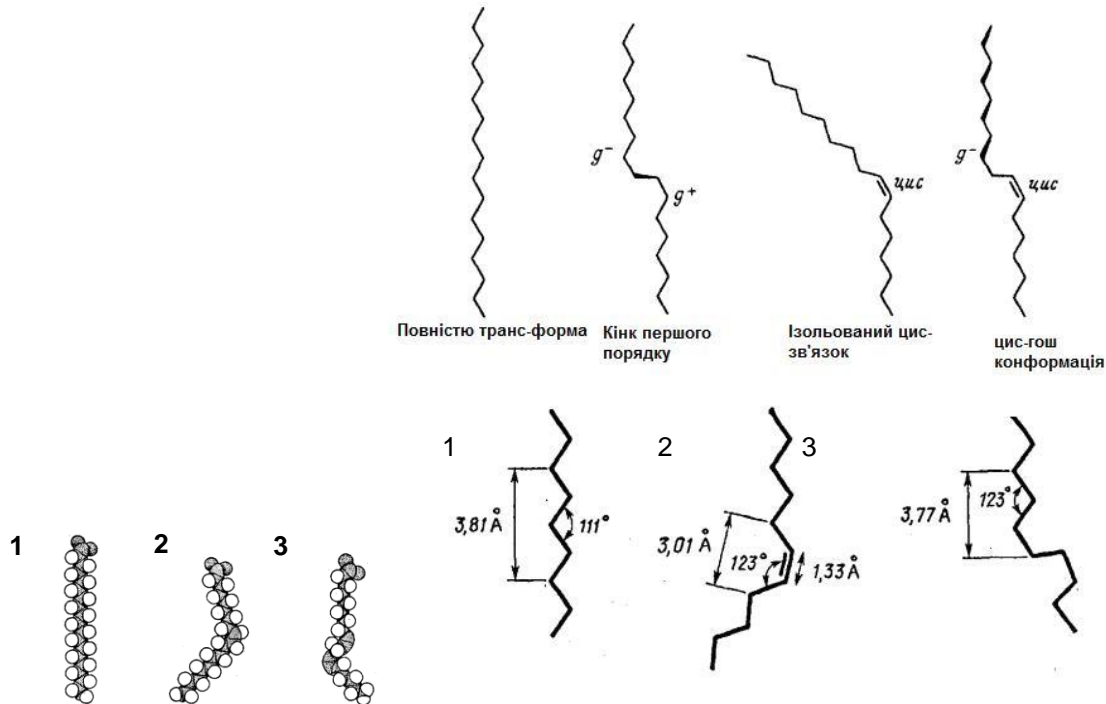


Рис. 2.1. Просторова конфігурація жирних кислот. 1 – насичений вуглеводневий ланцюг. 2 – ненасичений ланцюг в цис-конфігурації. 3 – насичений ланцюг у гош-конформації.

Зміна складових дієти, особливо ліпідної частини, швидко призводить до зміни ліпідного складу мембранних структур. Зміна умов середовища проживання, наприклад, при переході до зимової сплячки у тварин, при зміні солоності у прохідних риб (смолтифікація) і т.д., також змінює жирнокислотний склад мембранних ліпідів, пристосовуючи властивості мембран до умов середовища і нових потреб організму.

Гіпотеза адаптаційної ролі мембранних ліпідів була висунена і обґрунтована Е.М. Крепсом. Згідно з нею, при порівнянні мембран мозку риб з різних середовищ існування найбільш різкі відмінності в жирнокислотному складі виявляють гангліозиди, а саме: зниження температури і збільшення глибини синергічно підвищують вміст поліненасичених жирних кислот у складі гангліозидів. Цереброзиди і сульфатиди адаптаційної мінливості не виявляють.

3. Амфipатична природа мембранних ліпідів і організація ліпідних міцел, ліпосом та бішару

Стереоконфігурація мембранних ліпідів має спільні риси. Опинившись у водному розчині, фосфоліпіди поведуться подібним чином: намагаються створити ансамблі з багатьох молекул ліпідів. Водночас, ліпіди погано розчиняються як в полярному розчиннику – воді (заважають неполярні хвости), так і в неполярному середовищі – олії (заважають полярні головки). Щоб підкреслити різне ставлення до води і жиру, головки називають гідрофільними, а хвости ліпофільними (або гідрофобними). Відповідно, ліпіди, молекули яких містять як гідрофільні, так і

ліпофільні групи, називають **амфіфільними** (або **амфінатичними**).

Амфінатичні ліпіди, а також жирні кислоти на поверхні води утворюють моношар, у якому полярні ділянки (голівки) взаємодіють із водою, а аполярні хвости спрямовані у повітря (рис. 2.2).

Будова ліпідних агрегатів у водному середовищі залежить не тільки від природи самого ліпиду, але й від його концентрації, температури і присутності інших речовин. Більшість ліпідів погано розчиняються у воді. Ліпіди лише при дуже великому розведенні знаходяться у воді у вигляді окремих, не пов'язаних між собою молекул. Навіть при невеликому підвищенні концентрації ліпиду його молекули об'єднуються в замкнуті агрегати, так звані *міцели*. Концентрацію, при якій утворюються міцели, називають *критичною концентрацією міцелоутворення* (ККМ). Для більшості мембранних ліпідів вона становить менше 1%. При збільшенні концентрації ліпиду у воді і при зниженні температури кількість таких міцел зростає. У розведених водних розчинах утворюються переважно кулясті *міцели* – мікроскопічні капельки, у яких полярні головки направлені назовні, а неполярні хвости звернені всередину. У олії відбувається аналогічний процес, але тут міцели виявляються ніби вивернутими навиворіт. Якщо концентрація ліпідів у воді висока, то міцели зливаються і утворюються плоскі *бімолекулярні шари*, які є аналогами структури мембранного ліпідного бішару (рис. 2.2).

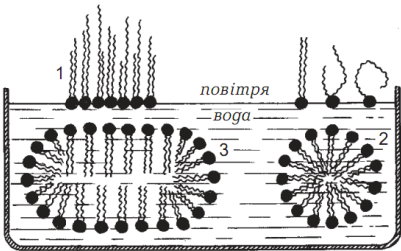


Рис 2.2. Розміщення фосфоліпідів на межі поділу: 1 – моношар амфіфільних ліпідів на поверхні води; 2 – міцела; 3 – бімолекулярний ліпідний шар.

При відносно малому вмісті води фосфоліпіди можуть утворювати декілька типів рідкокристалічних структур (рис. 2.3).

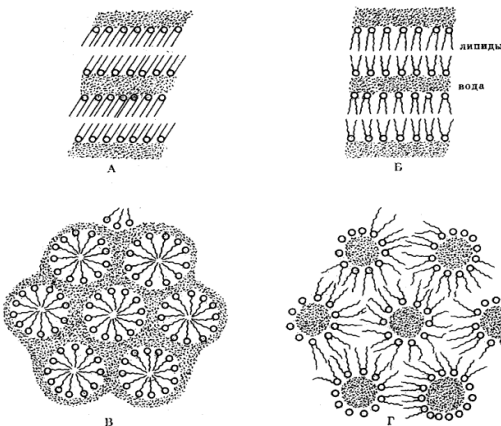
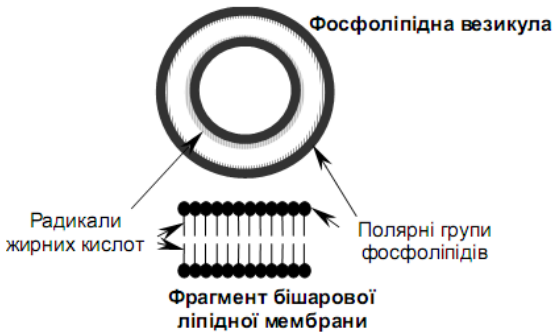


Рис 2.3. Структури ліпідних агрегатів у воді: А – гелеподібна, Б – ламелярна, В – циліндрична (гексагональна) фаза ліпідів у воді, Г – циліндри води в ліпідній фазі.

Серед них є ламелярна (шарувата) структура, що складається з ліпідних молекулярних шарів і водних проміжків, які чергуються, а також циліндричні структури з молекул ліпідів, розташованих у водній фазі. Одна структура може переходити в іншу при зміні концентрації води та температури. Таку поведінку називають «*мезоморфізмом*». Якщо перехід одних агрегатів в інші залежить від вмісту води, говорять про «*ліотропний мезоморфізм*». Коли він здійснюється під впливом змін температури – про «*термотропний мезоморфізм*». Такі фазові переходи можливі і в біологічних мембранах і вони відіграють велику роль у житті клітин.

Наявність у молекул ліпідів двох частин – полярної (голівки) і неполярної (хвостів) – має пряме відношення до їх спроможності мимовільно утворювати

мембрани – відбувається так зване *самозбирання мембранного бішару*. У бішарових структурах полярні «головки» обернені до води, а гідрофобні хвости орієнтовані всередину бішару. Як штучні, так і природні мембрани, завжди замкнені самі на себе, створюючи округлі вакуолі, бульбашки,



везикули, плоскі замкнуті мішки або трубчасті утворення. Природні фосфоліпіди – виражені амфіфіли. Величина *критичної концентрації міцелоутворення* для них дуже мала. Іншими словами, вже при низьких концентраціях при кімнатній температурі вони утворюють впорядковані міцели, що зливаються при підвищенні концентрації фосфоліпіду в

одношарові або багатшарові фосфоліпідні везикули – *ліпосоми*. Термін ліпосома (лат. – ліпідне тіло) стосується будь-яких ліпідних бішарових структур, вміст яких є водним розчином якоїсь речовини. Вони є широко розповсюдженою моделлю біологічних мембран. Ліпосоми являють собою замкнені сферичні пухирці, утворені з різних амфipатичних речовин, таких, як фосфоліпіди. При взаємодії з водними розчинами ці речовини самоорганізуються у двошарові мембрани. У процесі утворення ліпосом у них можуть включатися різноманітні хімічні сполуки, зокрема це використовується для створення систем доставки включених у них лікарських препаратів.

Форма і розміри утворених ліпідних асоціатів залежать від багатьох факторів:

1) від довжини ацильних ланцюгів фосфоліпідів – при зростанні довжини жирнокислотного ланцюга щільність упаковки в міцелах збільшується швидше;

2) від жирнокислотного складу фосфоліпідів – асоціати, утворені жирними кислотами з парною кількістю атомів вуглецю, стабільніші;

3) від ступеня ненасиченості ацильних ланцюгів фосфоліпідів – плівки із суміші ліпідів, що містять як насичені, так і ненасичені ланцюги при тій же температурі є більш рідкими, ніж плівки, побудовані з ліпідів, що містять тільки насичені ланцюги. Для того, щоб клітина могла проявляти процеси життєдіяльності, ліпіди, що входять до складу її мембран, обов'язково повинні перебувати в стані «рідкої» плівки.

Зрозуміло тому, що клітини дуже чутливо реагують на зміни температури, прагнучи до того, щоб їх мембрана постійно залишалася в «рідинно-кристалічному» стані. Як тільки знижується температура навколишнього середовища, бактерії замінюють насичені ліпіди у своїх мембранах на ненасичені. Так само поведуться клітини рослин та холоднокровних тварин. Організм людини і теплокровних тварин забезпечують «рідкий» стан своїх клітинних мембран, підтримуючи строго постійну температуру тіла.

4) від структури полярної частини молекул фосфоліпідів. Головки несуть або негативний заряд, або одночасно негативний і позитивний заряди, які нейтралізують один одного. Саме останній тип ліпідів (нейтральні) переважає в більшості клітинних мембран. У разі електронейтральних полярних головок ліпідні молекули можуть бути упаковані так, щоб повністю реалізувалася вигода гідрофобної взаємодії неполярних ланцюгів.

Трансмембранна асиметрія ліпідів

Клітинні мембрани замкнуті, вони мають внутрішню та зовнішню поверхні, які розрізняються за ліпідним і білковим складом – цю особливість мембран називають **трансмембранною асиметрією**. Відомо декілька механізмів, що забезпечують асиметричність розподілу фосфоліпідів у мембрані. Асиметрія ліпідів виникає, перш за все, тому, що в разі замкнутого мембранного бішару ліпідні з більш об'ємними полярними «голівками» намагаються перебувати в зовнішньому моношарі, оскільки там площа поверхні, яка припадає на полярну «головку», більша. Через це фосфатидилхолін та сфінгомієлін локалізовані переважно в зовнішньому моношарі, а фосфатидилсерин і фосфатидилетаноламін, в основному, у внутрішньому.

Другий механізм реалізується за рахунок відмінностей в складі середовища по обидва боки бішару в умовах нативної клітини. З позаклітинної сторони мембрану омиває середовище з високим вмістом іонів натрію і кальцію, а з боку цитоплазми мембрана контактує з магнієм і калієм. Відмінності іонного складу поза- і внутрішньоклітинного середовища вносять внесок у створення та підтримання вигинів, тобто в асиметрію бішару.

4. Біологічні функції мембранних ліпідів

Окрім того, що ліпідні є основним структурним компонентом мембран, вони виконують й інші клітинні функції. Вони входять до складу внутрішньоядерних структур, таких, як хромосоми, хроматин, ДНК-мембранний комплекс і ядерний матрикс. Вони також беруть участь у регуляції реплікації, репарації і транскрипції ДНК за рахунок зміни активності ферментів, які забезпечують процеси біосинтезу нуклеїнових кислот. Особливості ліпідного складу бактерій часто використовують для їх класифікації. Розподіл їх на грам-негативні і грам-позитивні ґрунтується на відсутності чи наявності забарвлення за Грамом відповідно до наявності або відсутності в складі клітинної стінки пептидогліканів та тейхоєвих кислот.

Розглянемо деякі фактори, які, можливо, визначають ліпідний склад мембрани.

1. Суміш ліпідів обов'язково повинна бути здатною утворювати стабільний бішар, в якому могли б функціонувати білки.

2. Деякі ліпідні сприяють стабілізації сильно викривлених ділянок мембрани, утворенню контакту між мембранами або зв'язуванню певних білків.

3. Деякі ліпідні є важливими біорегуляторами. Найбільш вивчена в цьому відношенні регуляторна роль похідних фосфатидилінозиту плазматичних мембран клітин еукаріотів.

4. Деякі ліпідні беруть участь в реакціях біосинтезу. Наприклад, в клітинах *E. coli* фосфатидилгліцерол постачає гліцерофосфатний фрагмент при біосинтезі периплазматичних олігосахаридів.

5. Окремі ліпідні необхідні для підтримання оптимальної активності ряду ферментів. Вони формують середовище для функціонування мембранних білків, здатних приймати нативну конформацію лише в гідрофобному оточенні. Виділені з

мембран ферменти, позбавлені ліпідного оточення, як правило, не проявляють каталітичної активності, або змінюють її при зміні гідрофобності середовища. Така, наприклад, мітохондріальна креатинкіназа, фермент, яка каталізує утворення креатинфосфату. Для прояву її нормальної активності необхідна взаємодія з кардіоліпіном внутрішньої мембрани мітохондрій.

6. Гангліозиди відіграють важливу роль у регуляції росту клітин, є специфічними рецепторами в плазматичній мембрані і відповідальні за клітинну адгезію.

7. Деякі ліпіди виконують «якірну» функцію, наприклад, до молекули фосфатидилінозитулу через олігосахариди можуть приєднуватися специфічні білки зовнішньої поверхні клітини – утворюється фосфатидилінозитолглікан. Приклад такого заякореного білка – ацетилхолінестераза, яка каталізує гідроліз ацетилхоліну в синаптичній щілині.

8. Ліпіди можуть бути аллостеричними активаторами мембранних ферментів. Наприклад, протеїнкіназа С у неактивній формі знаходиться в цитозолі. Однак після стимуляції клітини (при підвищенні в клітині концентрації Ca^{2+}) фермент швидко активується іонами кальцію і виявляється зв'язаним з мембраною.

*Експериментально було показано, що організми часто можуть витримувати, причому без всяких наслідків, суттєві зміни ліпідного складу мембран. Наприклад, за допомогою генетичної трансформації можна отримати життєздатний штам *E. coli*, в мембранах якого міститься до 34% фосфатидної кислоти, зазвичай відсутньої в штаммах дикого типу. Ймовірно, той ліпідний склад, який характерний для штамів дикого типу, не є обов'язковим для виживання клітин, принаймні, в умовах їх вирощування в лабораторії.*

ТЕМА 3. СТРУКТУРНІ КОМПОНЕНТИ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН: ВУГЛЕВОДИ МЕМБРАН ТА МЕМБРАННІ БІЛКИ

1. Мембранні вуглеводи
2. Мембранні білки: особливості будови та локалізації
3. Функції мембранних білків
4. Цитоскелет та глікокалікс мембран

1. Мембранні вуглеводи

Вуглеводи, у складі мембран виявляються лише в з'єднаній з білками (глікопротеїни і протеоглікани) і ліпідами (гліколіпіди) формі. У мембранах глікозилізовано близько 10% всіх білків і від 5 до 26% ліпідів (залежно від об'єкту). Серед вуглеводних компонентів – глюкоза, галактоза, нейрамінова кислота, фукоза і маноза. У складі сполучної тканини і міжклітинної речовини виявляються протеоглікани: вуглеводні компоненти в них сульфатуються.

Вуглеводні компоненти мембранних структур в переважній більшості напрямлені в позаклітинне середовище. Їх функції пов'язані з контролем за міжклітинними взаємодіями, підтримкою імунного статусу клітини, забезпеченням стабільності білкових молекул в мембрані. Типовим прикладом глікокон'югатів, що виконують свої функції в складі мембран, є антигенні детермінанти еритроцитів різних груп крові. Вони представлені як гліколіпідами, так і глікопротеїнами, серед яких білок глікофорину.

2. Мембранні білки: особливості будови та розташування

Більшість білків мембран є глобулярними. Якщо полярних ділянок у молекулі білка недостатньо для того, щоб ізолювати гідрофобні ділянки глобули від зіткнення з водою, то частина з них опиняється на поверхні. Для того, щоб зменшити термічно не вигідні контакти з водою, гідрофобні білки утворюють асоціати, що складаються з декількох субодиниць. Саме таку будову має переважна кількість мембранних білків, тому можна припустити, що в їх складі переважають амінокислоти з неполярними амінокислотними залишками. Для багатьох мембранних білків це дійсно справедливо.

Важливий білковий компонент мембрани – глікопротеїни. Периферійні білки або домени інтегральних білків, розташовані на зовнішній поверхні мембрани, майже завжди глікозилізовані. Припускають, що одна з функцій процесу глікозилування – забезпечити можливість білкам, синтезованим в апараті Гольджі, транспортуватись через клітинну мембрану. Глікопротеїни, розташовані на поверхні клітин, відповідальні за такі важливі процеси, як взаємне розпізнавання клітин та встановлення міжклітинних контактів. Глікозилізовані білки досить резистентні до протеолізу і тому мають довгу тривалість життя.

Локалізація білків у бішарі

Мембрани містять від 20 до 80% білка (за масою). При цьому в різних мембранах кількість білків істотно відрізняється. Так, в мембранах мітохондрій на частку білків припадає близько 75%, а в плазматичній мембрані клітин мієлінової оболонки – близько 25%. Оскільки ліпідні молекули мають невеликий розмір (5 Å) і невисоку молекулярну масу, їх кількість в 50 разів більша кількості білкових молекул. Тому білкові молекули ніби вкраплені в ліпідний бішар мембрани.

Білки розрізняються за своїм положенням у мембрані. Молекули білків можуть глибоко проникати в ліпідний бішар і пронизувати його (*інтегральні білки*), або прикріплюватися до мембрани різними способами (*периферійні білки*) (рис. 3.1). Периферійні білки відрізняються від інтегральних меншою глибиною занурення в бішар і слабшими білок-ліпідними взаємодіями. Периферійні білки можуть зворотно змінювати свій статус, прикріплюючись до мембрани на певний час (такі білки називають *амфіпатичними*). Прикріплюючись до мембрани, вони взаємодіють або з інтегральними білками, або з поверхневими ділянками ліпідного бішару. Для амфіпатичних білків є спеціальні сигнали, що стимулюють їх асоціацію з мембраною (часто таким сигналом є їх фосфорилування специфічними кіназами, що змінює їх третинну структуру і гідрофобність). До таких білків, наприклад, відносяться протеїнкіназа C і фактори згортання крові.

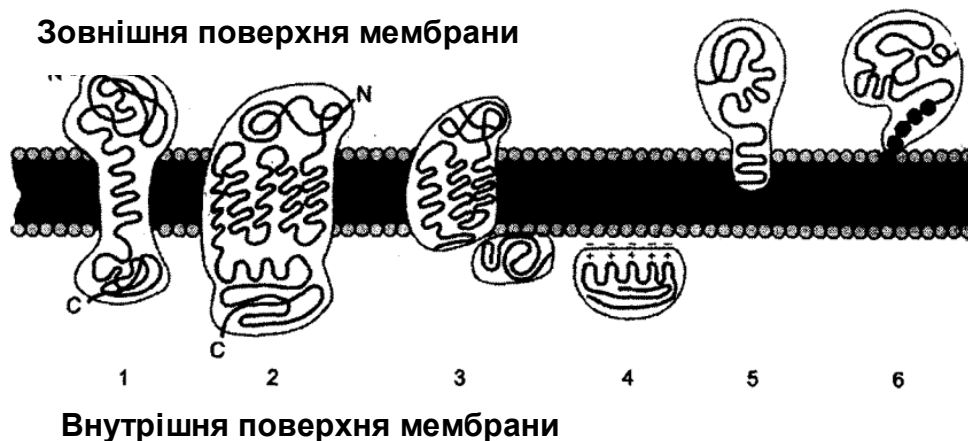


Рис. 3.1. Локалізація білків в мембранах. Трансмембранні білки: 1 – глікофорин, 2 – рецептор адреналіну. Поверхневі білки: 3 – білки, пов'язані з інтегральними білками (сукцинатдегідрогеназа); 4 – білки, приєднані до полярних «голівок» ліпідного шару (протеїнкіназа C); 5 – білки, «заякорені» в мембрані за допомогою короткого гідрофобного кінцевого домену (цитохром b_5); 6 – білки, «заякорені» в мембрані за рахунок жирнокислотного залишку, ковалентно приєднаного до білкової молекули (G-білок).

Відповідно до класифікації, *інтегральні* білки пронизують ліпідний бішар. Розмір інтегральних мембранних білків в середньому становить 80 Å, але зустрічаються і більші білки – до 350 Å (білок тилакоїдів хлоропластів). Зазвичай ці білки володіють вираженою асиметрією і, відповідно, асиметрично розташовані в мембрані. Деякі з трансмембранних білків пронизують мембрану один раз (глікофорин з мембрани еритроцитів) – це *бітопічний білок* інші мають кілька

ділянок (доменів), послідовно перетинають бішар – *політопічні білки*. *Монотопічні* білки відносяться до периферійних білків (рис. 3.2-3.3).

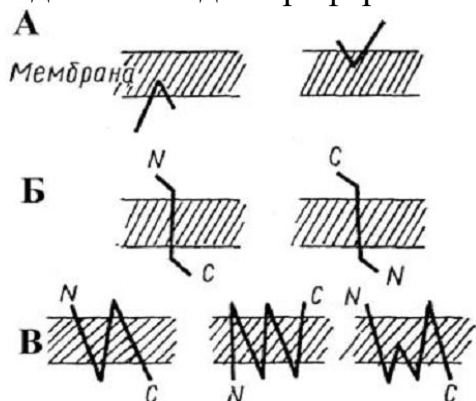


Рис. 3.2. Монотопічна (А), бітопічна (Б) та політопічна (В) локалізація білків в мембрані

Прикладом політопічних білків є транспортні АТФази, бактеріородопсин з мембрани *Halobacterium halobium*.

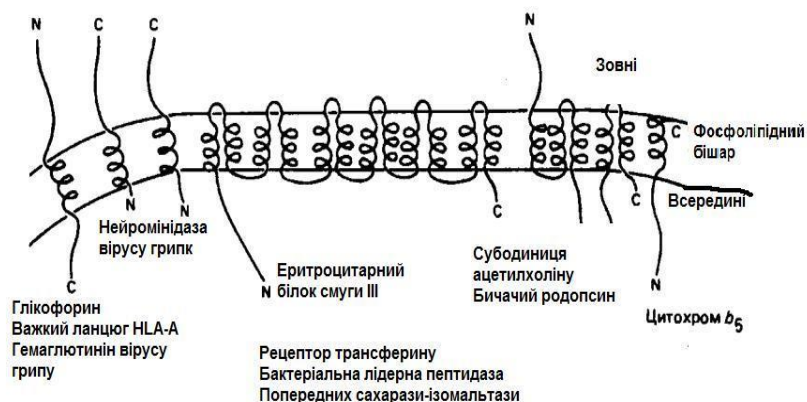


Рис. 3.3. Інтегральні білки мембран, які містять від 1 до 12 трансмембрних доменів

Аналіз амінокислот деяких мембрних білків показав, що вони містять приблизно стільки ж полярних

амінокислот, скільки і звичайні водорозчинні білки, проте у воді вони розчиняються дуже погано. Причина їх гідрофобності криється не в самому амінокислотному складі, а в порядку чергування амінокислотних залишків: гідрофобні амінокислотні радикали не розкидані вздовж поліпептидного ланцюга, а сконцентровані в гідрофобні домени.

Деякі мембрні білки збільшують свою гідрофобність за допомогою ковалентного зв'язку з ліпідними компонентами мембран. Ці білки використовують для більш міцного контакту з бішаром міристинову ($C_{14:0}$) або пальмітинову ($C_{16:0}$) жирні кислоти або глікозилфосфатиділінозитол. Білки, які зв'язані із залишками жирних кислот, локалізовані, в основному, на цитоплазматичній поверхні плазматичної мембрани, а білки, пов'язані з глікозилфосфатиділінозитолом, – на зовнішній.

Рухливість білків у бішарі

Білки в бішарі вельми лабільні і можуть здійснювати різні види рухів (рис. 3.4), при цьому рухливість білків у бішарі та їх асоціація контролюється ліпідами (I).

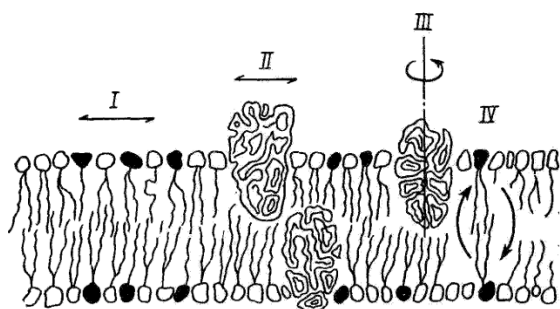


Рис. 3.4. Рухливість компонентів біологічних мембран: I – латеральна рухливість ліпідів у бішарі, II – латеральна рухливість білкових молекул, III – обертальна рухливість, IV – фліп-флоп перехід ліпідних молекул.

Деякі мембранні білки переміщуються уздовж бішару (II). Наприклад, фосфоліпаза А, зв'язуючись з цитоплазматичною поверхнею мембрани, може латерально переміщатися по поверхні бішару і гідролізувати кілька тисяч фосфоліпідів до тих пір, поки не дисоціюється від мембрани. Латеральна дифузія інтегральних білків у мембрані обмежена їх великими розмірами, взаємодією з іншими мембранними білками, а також елементами цитоскелету або позаклітинного матриксу.

Обертальна рухливість білків (III) пов'язана з їх обертанням навколо осі, перпендикулярній поверхні бішару. Периферійні білки менш впливають на стан і рухливість ацильних ланцюгів фосфоліпідів. В той же час, інтегральні білки суттєво обмежують рухливість анулярних ліпідів, які їх безпосередньо оточують в мембрані.

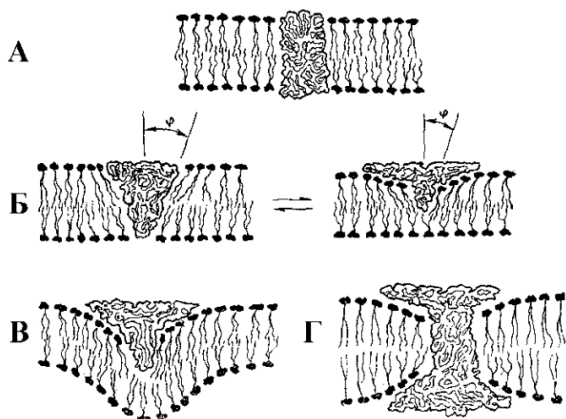
Білок-ліпідні взаємодії

Аналіз білок-ліпідних взаємодій у мембрані дозволяє виділити контакти 4 основних типів (рис. 3.5).

I тип (рис. 3.5А) : найбільш поширений випадок, коли впроваджуваний у бішар білок викликає локальне зростання впорядкованості частини ліпідної маси (утворення анулярного шару). Так діють, наприклад, бактеріородопсин та граміцидин (пептидний іонофор, який збільшує проникність мембран для іонів).

II тип (рис. 3.5Б): периферійні білки, які не проникають на всю глибину бішару, викликають еластичну деформацію одного його боку. Такий вплив на фізико-хімічні параметри бішару характеризується певною дальністю. Саме ним визначається полегшення взаємодії мембранних рецепторів з інсуліном та іншими гормонами.

III тип (рис. 3.5В): у результаті яскраво вираженої гідрофобності білка може відбуватися різка зміна градієнта кривизни і деформація бішару, що має місце у випадку взаємодії з мембраною цитохрому b_5 .



IV тип (рис. 3.5Г): поєднання гідрофільних і гідрофобних властивостей білкової молекули може забезпечити не тільки проникнення білка через бішар, але й істотний тиск на нього, що приводить до зміни геометрії бішару – стискання одних частин і розширення інших (наприклад, у випадку білка еритроцитарних мембран глікофорину).

Рис. 3.5. Типи модифікацій бішару, які викликаються білками

3. Функції мембранних білків

Зазвичай, саме білки відповідальні за функціональну активність мембран. Мембранні білки за біологічними функціями можна розділити на три групи:

I – білки-ферменти, що мають каталітичну активність;

II – рецепторні білки, які специфічно зв'язують ті чи інші речовини;

Ш – структурні білки.

I. Білки-ферменти – найбільш поширені серед всіх мембранних білків. До них належать як інтегральні (мембранні АТФази), так і периферійні (ацетилхолінестераза, кисла і лужна фосфатази, РНКаза) білки.

Ферменти входять до складу як плазматичних, так і внутрішньоклітинних мембран. Наприклад, на зовнішній мембрані епітеліальних клітин, що вистилають травні органи, є ферменти, які здійснюють розщеплення поживних речовин ще до того, як вони потраплять всередину клітини. Зовнішня мембрана клітин печінки містить більше 20 різних ферментів.

Мембранні ферменти потребують контактів з оточуючими їх ліпідами. Коли ферменти витягують з ліпідного оточення (наприклад, коли ліпіди екстрагуються з мембрани неполярними розчинниками), робота мембранних ферментів порушується.

II. Рецепторними білками називають білки, які специфічно зв'язують ті чи інші низькомолекулярні речовини. При зв'язуванні специфічних лігандів рецепторні білки зворотно змінюють свою форму. Ці зміни запускають всередині клітини відповідні хімічні реакції. Часто рецептори входять до складу більш складних мембранних комплексів, що містять білки-виконавці. Наприклад, холінорецептор сприймає сигнал від нейромедіатора і передає його на білки-каналотворювачі. Ця реакція відкриває проникність мембрани для іонів натрію і калію і формує збудливий потенціал.

III. Структурні мембранні білки позбавлені явних ферментативних властивостей, і можливо саме тому в хімічному відношенні вони мало вивчені. Їх дослідження ускладнюється, головним чином, двома обставинами. По-перше, структурні білки ніби «німі», тобто не мають відомої ферментативної активності. По-друге, структурні білки мають у складі своїх молекул великі гідрофобні ділянки, і тому при очищенні ці білки легко утворюють тісні асоціати один з одним або з ліпідами, що утруднює їх характеристику.

4. Цитоскелет і глікокалікс мембран

Структурні білки мембрани зв'язані з боку цитоплазми з примембранними білками, які є компонентами цитоскелету. Структура цитоскелету досить лабільна.

Досліджена орієнтація білків цитоскелету еритроцитів, а також відносне розташування індивідуальних білків цієї структури (рис. 3.6). До складу цитоскелету входять 12 різних білків з молекулярною масою від 25 до 250 кДа. Ці білки дозволяють зробити мембрани більш стійкими без втрати певної рухливості її компонентів, необхідної для забезпечення транспортних функцій мембран. Наприклад, жорсткість плазматичної мембрани без'ядерних еритроцитів створюється за рахунок ковалентного зв'язування структурних білків з інтегральними білками мембран. В її склад входить так званий «білок смуги 3» – інтегральний глікопротеїн, який забезпечує транспорт іонів через бішар. Одночасно через білок анкерін він зв'язується з молекулами спектрину, основного білка цитоскелету, який, у свою чергу, утворює двомірну мережу, до якої прикріплюється актин. Актин цитоскелету не існує у вигляді окремих глобул, а утворює

мікрофіламенти – скорочувальний апарат цитоскелету.

З проміжними філаментами цитоскелету зв'язана також зовнішня ядерна мембрана. Вони фіксують положення ядра в об'ємі цитоплазми. Мітохондрії переміщуються у клітині також за участю елементів цитоскелету. До цитоскелету примикають мікротрубочки, які утворюються при полімеризації глобулярного білка тубуліну. Основна роль мікротрубочок полягає в забезпеченні примембранного транспорту речовин, секреції та ендоцитозу.

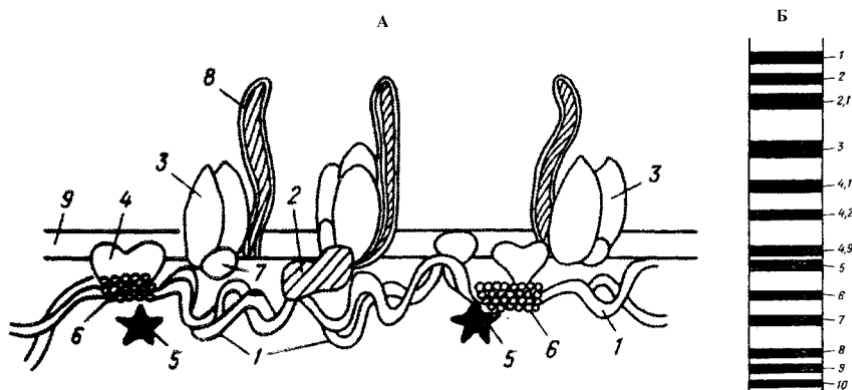


Рис. 3.6. Цитоскелет клітини: *А* – схема розташування білків в цитоскелеті еритроцитів: 1 – спектрин; 2 – анкерін; 3 – білок смуги 3, 4 – білок смуги 4.1; 5 – білок смуги 4.9; 6 – олігомер актину; 7 – білок смуги 6, 8 – глікофорин; 9 – мембрана. *Б* – електрофореграма білків цитоскелету: 1, 2 – спектрин; 2.1 – анкерін; 5 – актин; 6 – неідентифікований білок; 7 – тропоміозин; 8-10 – глікофорин, решта білки позначені цифрами, відповідно до їх положення на електрофореграмі.

Глікокалікс – зовнішній по відношенню до клітинної мембрани шар. Він складається з глікопротеїнів, протеогліканів і глікозаміногліканів і зв'язується з мембранними структурами за допомогою спеціальних білків-рецепторів, об'єднуючи цитоскелет, мембрану і позаклітинний матрикс у динамічну, рухливу структуру. Як показали електронно-мікроскопічні дослідження, глікокалікс має вигляд пухкого волокнистого шару завтовшки 30-49 Å, який вкриває всю поверхню клітини.

До складу глікокаліксу входять полісахаридні ланцюжки мембранних інтегральних білків – глікопротеїнів, які містять такі вуглеводи, як манозу, глюкозу, сіалові кислоти та ін. Вуглеводні гетерополімери глікокаліксу утворюють розгалужені ланцюжки, між якими розташовуються вільні гліколіпіди і протеоглікани. Шар глікокаліксу сильно обводнений, має гелеподібну консистенцію, що значно знижує дифузію різних речовин з клітини. Тут можуть накопичуватися виділені клітиною гідролітичні ферменти, що беруть участь у позаклітинному розщепленні полімерів (позаклітинне травлення) до мономерних молекул, які потім транспортуються в клітину.

ТЕМА 4. РІЗНІ ВИДИ РУХЛИВИХ КОМПОНЕНТІВ ЛІПІДНОГО БІШАРУ

1. Види рухливості ліпідів
2. Дефектні зони. Роль холестерину
3. Фазові переходи мембранних ліпідів

1. Види рухливості ліпідів

Молекули фосфоліпідів здатні до декількох видів рухливості у бішарі (рис. 4.1):

- 1) зміна орієнтації полярних голівок;
- 2) латеральний рух;
- 3) коливання ацильних ланцюгів;
- 4) утворення кінків та їх переміщення вздовж ацильних ланцюгів (у поперечному напрямку);
- 5) ротаційна рухливість (обертання навколо довгої осі);
- 6) перехід з однієї сторони бішару на іншу (по типу фліп-флоп);
- 7) вихід з бішару.

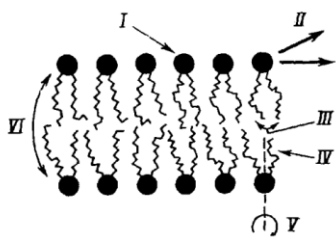


Рис. 4.1. Види рухливості ліпідних компонентів у бішарі: I – зміна орієнтації полярних голівок; II – швидка латеральна дифузія у двохвмірному просторі бішару; III – швидкі коливання жирнокислотних ланцюгів, IV – утворення кінків та їх рух по ацильних ланцюгах; V – обертальний рух навколо довгої осі; VI – повільний обмін між моношарами мембрани.

Розглянемо деякі види рухливості молекул фосфоліпідів докладніше.

Латеральний рух. Здатність ліпідів переміщуватися в мембрані в латеральному (поздовжньому) напрямку показана багатьма експериментами. Наприклад, для суспензії яєчного лецитину при 25°C молекула долає шлях, який рівний 2,5 мкм за 1 сек. Латеральна дифузія робить можливим утворення ліпідних кластерів. Латеральна дифузія виявляється можливою навіть при температурі кристалічного стану. Очевидно, єдиний механізм, який міг би задовільно пояснити цей факт, полягає в латеральній неоднорідності мембрани, наявності дефектних зон (порожнин), куди можуть витіснятися молекули з сусідніх упорядкованих областей.

Упорядкованість мембран, яка вимірюється за допомогою ЕПР-спектроскопії, знижується при русі до метильних радикалів ацильного ланцюга, що свідчить про збільшення рухливості жирнокислотних ланцюгів в цьому напрямку. Обертальна рухливість молекул фосфоліпідів, виміряна методом ЯМР, показала, що рухливість гідрофобних сегментів ланцюгу підвищується напрямку від складноєфірного зв'язку до метильної групи, тобто до центру бішару.

Трансмембранний перехід «фліп-флоп» типу. У ліпідних штучних мембранах такі переходи здійснюються вельми повільно, наприклад, напівперіод переходу молекул холестерину з одного боку бішару на інший в ліпосомах з

фосфатидилхоліну займає більше 24 годин. Молекули ліпідів не можуть подолати ліпідний бішар в поперечному напрямку шляхом перескоку молекул з одного боку бішару на інший (фліп-флоп), якщо в молекулі немає особливих ферментів, відомих під назвою транслокаторів. Ліпіди і в біологічних мембранах з досить великою частотою мігрують з одного боку мембрани на інший, тобто здійснюють «фліп-флоп» переходи. Можливо, що гетерогенність ліпідного складу біологічних мембран збільшує вірогідність «фліп-флоп» переходу в природних мембранах. Одним з результатів цієї гетерогенності є можливість утворення гексагональної фази (вивернутих везикул), короткочасне існування яких дозволяє залучати молекули ліпідів з одного боку бішару і повертати їх на інший бік.

2. Дефектні зони. Роль холестерину

Різні види рухливості ліпідних компонентів у бішарі порушують гомогенну упаковку і призводять до утворення різних дефектів. Висока швидкість обертання жирнокислотних радикалів навколо С-С-зв'язків, а також наявність у складі мембранних фосфоліпідів цис-ізомерів ненасичених жирних кислот роблять бішар досить рихлим. Утворення дефектів такого роду демонструє рис. 4.2.

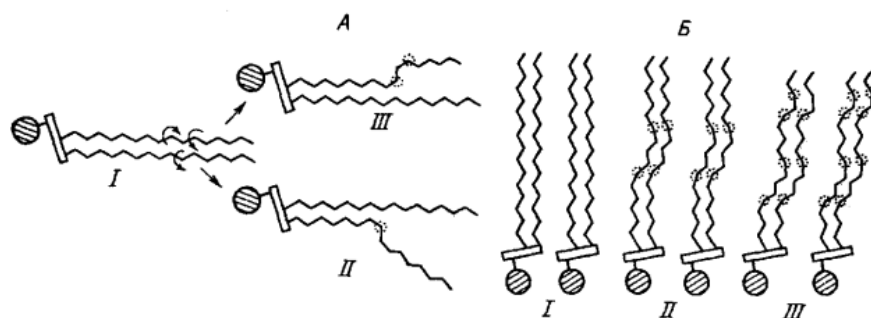


Рис. 4.2. Утворення дефектів в мембранному бішарі. *А – обидва жирнокислотні ланцюги молекули фосфоліпиду знаходяться в транс-конфігурації, обертання навколо С-С зв'язків (вказане круговими стрілками), нічим не обмежене (I); в результаті незгодженого обертання утворюється скошена (гош-) конформація (II) або кінк (III); Б – вплив кінку на упаковку бішару: I – кінки відсутні, II – один кінк на жирнокислотний ланцюг, III – два кінки на жирнокислотний ланцюг.*

Розглянемо спочатку насичені вуглеводневі ланцюги (рис. 4.2). Найбільш стабільна транс-конформація (I), в якій ланцюг максимально витягнутий і не змінює свого напрямку, тоді, як в гош-конформації його напрям змінюється (II) і утворюється дефект упаковки. Послідовність гош-транс-гош для трьох суміжних С-С зв'язків призводить до появи в ланцюзі зламу (кінк), в результаті чого ділянки ланцюга вище і нижче зламу виявляються значно зміщеними одна відносно іншої (III) – утворюється дефект.

У випадку ненасичених жирних кислот майже всі подвійні зв'язку в мембранних ліпідах знаходяться у цис-формі. Як і в випадку гош-форми, це призводить до зміни загального напрямку ланцюга – утворюється дефект. В

результаті появи дефектів бішар стає більш рихлим. Їх концентрація і рухливість залежить від температури (рис. 4.3).

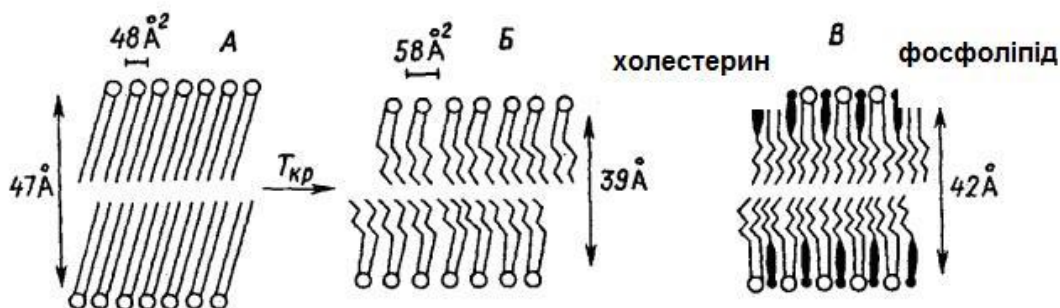


Рис. 4.3. Зміна упаковки бішару при термоіндукованому фазовому переході (від А до Б) і при вбудовуванні в бішар молекул холестерину (від Б до В). Вказані товщина бішару в ангстремах і площа перерізу, яку займає кожна молекула фосфоліпіду.

Жирнокислотні радикали бішару не розпрямлені повністю, а утворюють рихлі структури. Через цей факт площа мембрани виявляється дещо більшою. Вбудовування холестерину в бішар робить можливим зміни форми мембран у результаті значної деформації обох сторін ліпідного бішару, оскільки, на відміну від фосфоліпідів, холестерин може легко переміщатися з одного моношару в інший.

У фазі гелю насичені вуглеводневі ланцюги фосфоліпідів знаходяться переважно в повністю транс-конформації; насичені фосфатидилетаноламіни у фазі гелю упаковуються так, що їх ацильні ланцюги розташовуються перпендикулярно площині бішару.

На рисунках ланцюги фосфоліпідів у бішарі, як правило, представляють скошеними щодо перпендикулярної осі мембран. Кут нахилу ланцюгів визначається природою полярної головки молекули: нахил виникає в тому випадку, якщо об'єм гідратованої головки молекули більший площі перерізу її хвостової частини.

Підвищена щільність упаковки (структуризація) бішару збільшує опір дифузії молекул, які транспортуються через мембрану, та підвищує її мікров'язкість. Тому швидкість переміщення молекул залежить від мікров'язкості мембран, яка, в свою чергу, визначається відносним вмістом насичених і ненасичених жирних кислот у складі ліпідів. Мікров'язкість мембран менша, якщо в складі ліпідів переважають ненасичені жирні кислоти, і більша при високому вмісті насичених жирних кислот. На цей параметр впливають навіть розміри вуглеводневих «хвостів» ліпідів, зі збільшенням довжини яких мікров'язкість бішару зменшується.

3. Фазові переходи мембранних ліпідів

У водному середовищі різні структури, утворені фосфоліпідами (ламелярні, міцелярні, гексагональні) поведуть себе як рідкі кристали, тобто анізотропні рідини з ознаками впорядкованості (рис. 4.4). Таким структурам притаманні *ліотропний мезоморфізм* (залежність структури від гідратації) і *термотропний мезоморфізм* (залежність структури від температури). Фазові переходи ліпідів, які здійснюються

по типу «гель – рідкий кристал», відбуваються при температурі ($T_{кр}$), величина якої залежить від вмісту води в системі.

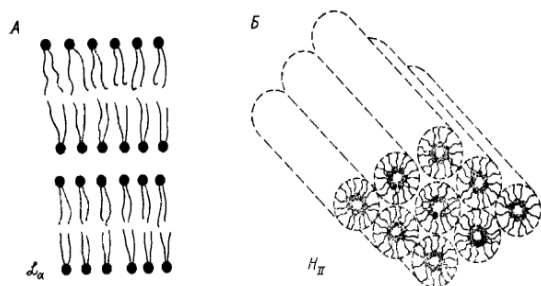


Рис. 4.4. Структури, які утворюються у водних суспензіях ліпідами, схильними до утворення ламелярних утворень (А) і небішарових гексагональних утворень (Б)

$T_{кр}$ досягає мінімуму, коли загальний вміст води перевищує ту кількість, яку можуть зв'язувати ліпідні структури. Фазова діаграма для яєчного лецитину, що характеризує співвідношення різних мезоформ цього ліпиду у різних умовах представлена на рис. 5.5.

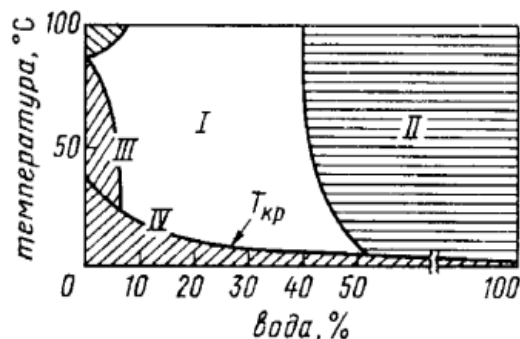


Рис. 5.5. Фазова діаграма суміші яєчного лецитину з водою: I – рідко-кристалічний стан, бішар; II – двофазна система: вода-бішарова структура; III – область існування ламелярних і гексагональних структур; IV – гель. $T_{кр}$ – крива температури фазового переходу.

Прикладом того, як суттєво впливає вода на фазові переходи, є модифікація фазового стану мембрани під впливом перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), коли $T_{кр}$ знижується. Це явище пояснюється збільшенням вмісту води в бішарі. Чому це відбувається?

Гідратація бішару залежить від присутності заряджених фосfolіпідів, найбільш сильно вона зростає при індукції ПОЛ. Гідропероксиди, які утворюються в якості проміжних продуктів, є високогідрофільними, вони ефективно руйнують бішар, збільшуючи доступність гідрофобних доменів мембрани для молекул води. Саме з цих причин ПОЛ має такий «руйнуючий» вплив на мембранні структури.

У момент фазового переходу бішару відбувається кілька одотимчасових подій: зростає рухливість полярних $-N^+-(CH_3)_3$ -груп; збільшується обертальна рухливість С-С зв'язків, що призводить до полегшення транс-гош переходу і утворення кінків; збільшується швидкість латеральної дифузії молекул.

Наслідком цього є зміна геометричних розмірів бішару, яка пояснюється латеральним розширенням площі, яку займає кожна молекула фосfolіпідів, та збільшенням гідрофобного об'єму мембрани. Через неодноразовість прояви цих властивостей у ході фазових перебудов бішару більш впорядковані області мембрани співіснують з уже розплавленими – спостерігається фазовий поділ (рис. 4.6). За цих умов для мембрани характерно існування різного роду дефектів, які індукують взаємодію білкових молекул одна з одною, вбудовування у бішар сполук, підвищення проникності для іонів і т.д.

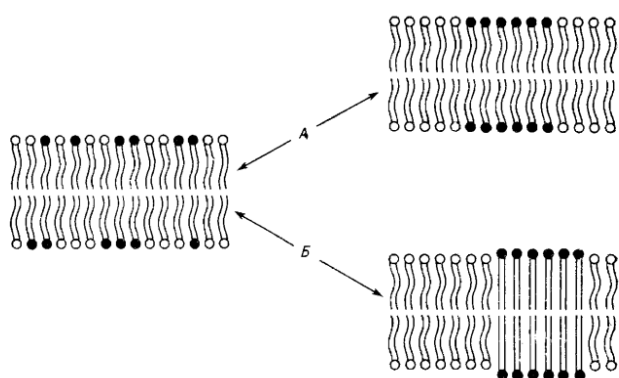


Рис. 4.6. Розділення фаз у гетерогенному бішарі (А) з одночасним фазовим переходом частини бішару (Б) під впливом температури.

Фазові переходи в мембрані індукуються не тільки змінами температури. Вони можуть бути викликані змінами рН середовища, електричного потенціалу, двохвалентними катіонами, що сприяють утворенню кластерів певних фосфоліпідів і розділенню фаз; фазові переходи також супроводжують дію гормонів на біологічні мембрани. Таким чином, дослідження термотропних переходів має не тільки теоретичне значення: аналогічні переходи здійснюються в біологічних системах при підготовці тварин до сну або виході із зимової сплячки, при термоадаптації, адаптації риб, які мігрують до морської води.

Окрім переходу типу «гель – рідкий кристал» ліпіди можуть зазнавати перетворення іншого роду, що призводять до утворення *гексагональної фази H_{II}* . Ці небішарові структури легко утворюють коротколанцюгові фосфоліпіди з полярними головками (наприклад, фосфатидилсерин, фосфатидна кислота). Утворенню гексагональних структур сприяють такі явища, як підвищення температури, збільшення ненасиченості жирнокислотних ланцюгів, висока іонна сила при лужному рН, а також зниження гідратації бішару. Перехід окремих ділянок бішару в фазу H_{II} приводить до порушення цілісності мембрани, формуванню каналів проникності, утворення дефектних зон.

Переходи такого роду були зареєстровані у штучних мембранах. У нативних мембранах, ймовірно, вони також можуть утворюватися. Для мембран хлоропластів переходам бішару в гексагональну H_{II} -фазу приписується важлива регуляторна роль. Припускають, що в мембранах саркоплазматичного ретикулуму м'язів такі переходи можуть індукуватися в результаті ферментативного обміну залишками жирних кислот між довголанцюговими фосфатидилсерином і коротколанцюговим фосфатидилхоліном. Як вже згадувалося, гексагональна фаза може полегшувати фліп-флоп переходи ліпідних молекул.

ТЕМА 5. СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ДОСЛІДЖЕННЯ МЕМБРАННИХ СТРУКТУР

1. Виділення і характеристика мембранних фракцій
2. Методи дослідження мембранних структур:
 - А) Дифракція рентгенівських променів
 - Б) Електронна мікроскопія
3. Методи вивчення динамічної поведінки мембранних систем і ліпід-білкових взаємодій
 - А) Мікров'язкість мембран і застосування мембранних зондів
 - Б) Електронний парамагнітний резонанс
 - В) Деполяризація флуоресценції
 - Г) Ядерно-магнітний резонанс
 - Д) Метод кругового дихроїзму
 - Е) Метод скануючої калориметрії
 - Є) Флуоресцентна спектроскопія

1. Виділення і характеристика мембранних фракцій

Дослідження мембран, як правило, пов'язане з їх очищенням, причому для кожного типу мембран характерні свої умови препаративного виділення.

Для отримання мембран клітини спочатку **руйнують**, використовуючи один з таких *методів*: осмотичний шок, розтирання нарізаних шматочків тканини із кварцовим піском або скляними кульками, або роздрібнення гомогенізаторами різних типів. Метод руйнування клітин та тривалість обробки вибирають залежно від типу тканини. Бактеріальні протопласти та еритроцити, зазвичай, піддають осмотичному шоку. М'які тканини (печінку, мозок) руйнують за допомогою скляного гомогенізатора Поттера, більш щільні – ножовим гомогенізатором, зябра риб розтирають з кварцовим піском.

Якщо отриману шляхом гомогенізації суміш органел і мембранних фрагментів піддати **центрифугуванню**, то частинки, що мають різну щільність і розміри, будуть осідати з різною швидкістю. При постійному відцентровому прискоренні швидкість осадження буде прямо пропорційна масі частинок і різниці між їх густиною та густиною середовища.

Зруйновані клітинні мембрани здатні замикатися і утворювати бульбашки (*везикули*) діаметром 0,3-3,0 мкм. Як приклад можна привести: 1) мікросоми, одержувані з плазматичної мембрани, ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР) або спеціалізованих систем; 2) субмітохондріальні частинки з внутрішньої мітохондріальної мембрани; 3) синаптосоми, що утворюються при відриві нервових закінчень в області синаптичних контактів; 4) бактеріальні мембранні везикули, які утворюються з плазматичної мембрани *E. coli*.

Везикули утворюються і з інших мембранних систем, наприклад, з мембран апарату Гольджі. Деякі мембрани, зокрема, мембрани бічних поверхонь тваринних клітин, які дотикаються, не утворюють везикул.

У таблиці 5.1. наведено дані про розміри і густини різних органел і

одержуваних з них фрагментів.

Таблиця 5.1. Клітинні компоненти печінки щурів

Фракція	Діаметр частинок, мкм	Режим осадження		Рівноважна густина, г/см ³
		Прискорення, g	Час, хв	
Цілі клітини	15-20	600	15	1,20
Ядра	3-12	600	15	1,32
Апарат Гольджі великі фрагменти везикули	1-3	2000	20	1,12-1,16
	0,05-0,5	14500	15	
Мітохондрії	0,7-1,1	10000	25	1,06-1,14
Лізосоми	0,4-0,8	10000	25	1,17-1,21
Шосткі мікросоми	0,05-0,2	14500	25	1,12-1,16
Гладкі мікросоми	0,05-0,3	14500	25	1,13-1,25
Плазматичні мембрани великі фрагменти везикули	3-20	1500	15	1,15-1,19
	0,05-0,3	14500	30	1,07-1,19

Як видно з таблиці 5.1, якщо гомогенат якої-небудь тканини центрифугувати з невеликим прискоренням (наприклад, в режимі 600 g, 15 хв), то осядуть тільки ядра і незруйновані клітини; при великих прискореннях (10000 g, 15 хв) можна осадити фракцію, яка містить переважно мітохондрії, а потім – змішану мікросомальну фракцію. Після центрифугування в режимі 100000 g протягом 1 год у супернатанті залишаються тільки розчинні білки (фракція цитозолу); всі мембранні фрагменти випадають в осад. Метод вибіркового осадження клітинних фрагментів називають *методом диференційного центрифугування*, а одержувані за його допомогою препарати – *субклітинними фракціями*.

Фракції, отримані при одноразовому центрифугуванні, ніколи не бувають чистими. Так, мітохондріальна фракція, окрім мітохондрій і їх фрагментів, буде містити в різних кількостях лізосоми, везикули, утворені з плазматичної мембрани та мембран ЕПР. Результати фракціонування залежать від способу руйнування, складу середовища і типу клітин, оскільки ці фактори визначають характер розриву мембран, а, отже, розміри утворюваних фрагментів. Після виділення субклітинних фракцій необхідно їх ідентифікувати і перевірити ступінь забрудненості іншими органелами.

При з'ясуванні морфології мембранних фракцій важливу роль відіграли два методи: *дифракція рентгенівських променів та електронна мікроскопія*. Проте при з'ясуванні детальної картини молекулярної організації мембран обидва методи стикаються з низкою обмежень.

Мікроскопію з фазовим контрастом застосовують, в першу чергу, для ідентифікації ядерної фракції. Мітохондріальні фрагменти або везикули шорсткого ЕПР легко розпізнаються морфологічно.

Визначення активності маркерних ферментів. Фермент може слугувати маркером певного типу мембран, якщо він міцно зв'язаний з мембраною, не інактивується при виділенні даної фракції і локалізується виключно в даних органелах. На жаль, багато маркерних ферментів (наприклад, Na/K-АТФази, 5'-нуклеотидаза, сукцинатдегідрогеназа) при виділенні або зберіганні можуть втрачати активність. Крім того, більшість вбудованих у мембрану ферментів характеризуються асиметричною локалізацією активного центру. З цієї причини їх активність у замкнутих фрагментах часто не вдається визначити через недоступність для субстрату. Це так звана «латентна активність ферменту». Вона може бути виявлена за присутності низьких концентрацій детергенту або іонофорів (типу аламетицину), що утворюють великі канали в замкнутих мембранних везикулах. У таблиці табл. 5.2 наведені маркерні ферменти різних субклітинних фракцій.

Таблиця 5.2. Біохімічні маркери різних клітинних мембран

Органела	Біохімічний маркер
Плазматична мембрана	Na, K-АТФаза, 5'-нуклеотидаза, аденілатциклаза
Ендоплазматичний ретикулум	Глюкозо-6-фосфатаза, цитохром-Р ₄₅₀ , НАДФН-дегідрогеназа, цитохром b ₅
Мітохондрії зовнішня мембрана матрикс внутрішня мембрана	Моноамінооксидаза Малатдегідрогеназа Цитохром с оксидаза, сукцинатдегідрогеназа УДФ-галактозилтрансфераза
Апарат Гольджі	Кисла фосфатаза, кислі гідролази
Лізосоми	Каталаза
Пероксисоми	Лужна фосфатаза, сахараза
Мембрани лужної облямівки Синаптосоми	Ацетилхолінестераза, ацетилхолінові рецептори

2. Методи дослідження мембранних структур

А) Дифракція рентгенівських променів

Дифракція рентгенівських променів – метод вивчення атомної і молекулярної структури кристалічних речовин з використанням рентгенівських променів. Рентгенівські промені направляють на такі речовини і вивчають їхній розподіл після проходження (розсіювання) через кристал, обумовлене дифракцією променів на атомах, внаслідок чого з'являються дифраговані пучки – результат інтерференції вторинного рентгенівського випромінювання, що виникає при взаємодії первинного випромінювання з електронними оболонками атомів.

Цей метод дозволяє з високою роздільною здатністю отримувати інформацію про структуру кристалічних речовин. У випадку малоупорядкованих препаратів

можливості цього методу обмежені. Деякі спеціалізовані мембранні системи мають регулярну структуру, тому їх можна вивчати рентгеноструктурними методами. Найбільш поширеним таким прикладом є *мієлінова оболонка*, яка, багаторазово обертаючись навколо аксона, формує регулярну систему з концентричних мембранних структур. Цей метод можна застосовувати і для вивчення *штучно створених систем*, які утворюються при колапсуванні в умовах центрифугування мембранних везикул, отриманих з мітохондрій та еритроцитів. Хоча рентгеноструктурні дані дозволяють отримати деяку інформацію про те, як розташована в мембрані більшість мембранних білків (інтегральних або периферійних), в цілому метод рентгеноструктурного аналізу не дає детальної молекулярної картини.

Б) Електронна мікроскопія

Просвічуюча електронна мікроскопія тонких зрізів *мієліну*, як і багатьох інших мембранних структур, виявляє характерну картину, що складається з двох електроногустих смуг, розділених проміжком близько 80 Å. Така картина виходить у результаті обробки мембранних препаратів чотириокисом осмію, який, зазвичай, застосовується у цьому методі. Однак у цьому методі є істотний артефакт – при приготуванні препаратів для аналізу мембрани піддаються несприятливим впливам. Обробка чотириокисом осмію призводить до значної втрати білка з еритроцитарної мембрани. І хоча тришарова структура, яка при цьому спостерігається, до певної міри відображає організацію бішарової мембрани, більш детальні відомості щодо локалізації білків у мембрані цим методом отримати не вдається.

Деяку інформацію про розташування мембранних білків дали нові електронно-мікроскопічні методи, які стали тепер вже класичними, – *методи заморожування-сколювання і заморожування-травлення (сублімація)*. У цьому випадку препарати швидко заморожують, не піддаючи їх ушкоджуючій дії. Процес підготовки препарату включає наступні операції (рис. 5.1):

1. Після заморожування зразок, який представляє собою суспензію клітин або мембран, сколюють за допомогою ножа при низькій температурі (-100°C) у глибокому вакуумі. При цьому мембрана розколюється по своїй серединній області та розщеплюється на дві половинки. У результаті на утворених площинах відколу оголюється внутрішня область мембрани.

2. За необхідності зразок піддають травленню – проводять звичайну сублімацію льоду в вакуумі. Це дозволяє краще візуалізувати поверхневі структури клітинних мембран.

3. Після цього отримують так звану репліку з оголеною поверхнею (саме цю репліку і досліджують під електронним мікроскопом). Для отримання репліки спочатку напилюють на зразок платину під кутом близько 45° , щоб виявити топологічні характеристики препарату. Потім платиновій репліці надають механічної міцності, напиливши на неї шар вуглецю. Після цього препарат відтаюють, репліка спливає і піддається аналізу.

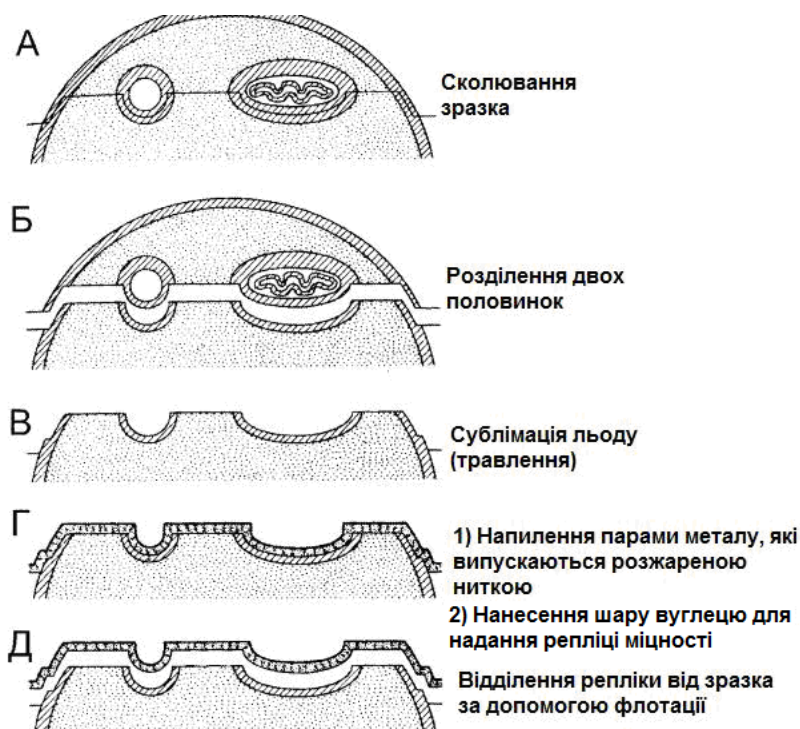


Рис 5.1. Дослідження мембран методом заморожування-сколювання. *А* – площина відколу замороженої клітини частково проходить через центральну частину різних мембран. *Б* – роз'єднання двох половинок. *В* – зразок піддають сублімації для виявлення деталей поверхні шару. *Г* – на зразок напильють шар платини, а потім шар вуглецю, отримуючи репліку з поверхні зразка. *Д* – отриману репліку відокремлюють від препарату і досліджують під електронним мікроскопом.

Найбільш характерні структури, що спостерігаються при вивченні мембран методом заморожування-сколювання, – це численні внутрішньомембранні частинки діаметром від 80 до 100 Å, які лежать в площині мембранних сколів. Зазвичай, вони розташовані хаотично, але іноді утворюють групи. Найімовірніше, ці частинки є мембранними білками. При електронній мікроскопії тонких зрізів подібні структури не виявляються. Репліки, отримані від двох половинок розщепленої мембрани, не завжди топологічно комплементарні. Це означає, що деякі частинки зв'язані тільки з однією з половин мембрани.

3. Методи вивчення динамічного поведінки мембранних систем і ліпід-білкових взаємодій

Усі біологічні структури за своєю природою динамічні, і при розгляді їхніх функцій необхідно враховувати рухливість компонентів, з яких ці структури складаються.

Що криється за поняттям «динамічні властивості мембран»? Поперечна асиметрія в розподілі ліпідів, а, можливо, і пасивна дифузія через бішар певним чином пов'язані зі швидкістю трансмембранного фліп-флоп переходу ліпідів. Швидкість ферментативних реакцій, що протікають за участю мембранозв'язаних компонентів, залежить від швидкості латеральної дифузії компонентів мембран. І,

нарешті, ліпідно-білкові взаємодії залежать від швидкості, з якою відбувається обмін ліпідами між найближчим оточенням білків й іншими об'єктами мембрани.

Вивчаючи процеси, що протікають в мембранних структурах, необхідно представляти їх тимчасові характеристики одночасно і тимчасову роздільну здатність методів, які використовують для аналізу.

Для прикладу на рис. 5.2 наведено зіставлення деяких хімічних і фізичних реакцій у біологічних мембранах з діапазоном швидкостей, доступних для вимірювання за допомогою розповсюджених методів.



Рис. 5.2. Порівняння характерних частот рухів мембранних білків і ліпідів з діапазоном чутливості різних спектроскопічних методів. Діапазон чутливості методів вказаний приблизно.

Часовий діапазон різних форм рухливості, зафіксованих в мембрані, вельми широкий: від молекулярних коливань з частотою 10^{14} s^{-1} до трансмембранного фліп-флоп переходу ліпідів, характерний час якого може досягати декількох годин. Одні методи дозволяють отримати статичну картину мембрани, оскільки характерний час відповідних рухів більший, ніж час вимірювання, а інші методи дають усереднену за часом картину, оскільки час переміщення молекул набагато менший, ніж час вимірювання.

Розглянемо два основних типи експериментів.

Перші ґрунтуються на використанні *внутрішньо-мембранних зондів* для вивчення мікрров'язкості мембрани. Індикаторами фізичного стану мембрани, а також характеру ліпідно-білкових взаємодій можуть служити *низькомолекулярні ЕПР-мітки і флуоресцентні зонди*.

Другий тип експериментів спрямований на пряме вимірювання латеральної дифузії мембранних білків або ліпідів і обертальної рухливості білків усередині бішару.

А) Мікрров'язкість мембран і застосування мембранних зондів

Для звичайної рідини, якою є, наприклад, вода, текучість визначається як

величина, обернена в'язкості. В'язкість характеризує тертя, що виникає між сусідніми шарами рідини, які рухаються з різними швидкостями. В'язкість рідини можна оцінити, вимірявши швидкість, з якої падає мармуровий кулька в рідкому середовищі. У разі мембран термін «плинність» зазвичай носить якісний характер: мається на увазі опір, якого надає мембрана різним типам переміщень в ній.

В'язкість відіграє важливу фізіологічну роль при адаптації різних організмів до зовнішніх впливів. Подібні явища спостерігаються найчастіше при вивченні термічного стресу, коли мікроорганізми, рослини, пойкилотермні або зимуючі тварини піддаються впливу низьких температур. Адаптація полягає в зміні ліпідного складу мембран, а саме у збільшенні вмісту ненасичених ліпідів або зменшенні середньої довжини ацильного ланцюга. Подібні зміни ведуть до зменшення щільності упаковки ліпідів у мембрані і таким чином підтримують мікров'язкість мембран на необхідному рівні.

Зазвичай мембрани знаходяться у рідко-кристалічному стані. При переході мембрани з рідко-кристалічної фази у фазу гелю (більш твердий стан) мікров'язкість збільшується. Структурні та функціональні властивості бішару, який знаходиться у фазі гелю, несумісні з організацією і успішним функціонуванням білкових компонентів у мембрані. При переході мембрани з рідко-кристалічної фази у фазу гелю мікров'язкість збільшується приблизно на два порядки. Як правило, для вимірювання плинності вимірюють молекулярну рухливість спінових або флуоресцентних зондів, включених у мембрану. *Зондами*, зазвичай, є невеликі молекули, які можна порівняти з розмірами мембранних фосfolіпідів.

Обертальна рухливість молекули зонда в мембрані не ізотропна, а до певної міри обмежена. Часто зонди всередині мембрани мають переважну орієнтацію та їхні рухи обмежені певними рамками. Локалізація різних зондів у мембрані залежить від їх природи, тому, підбираючи зонди різної структури, можна отримувати інформацію від різних ділянок мембран. Чим більш щільніша упаковка характерна для мембрани, тим суттєвіше обмежується рухливість зонда.

Розглянемо 3 методи: електронний парамагнітний резонанс (ЕПР), метод деполяризації флуоресценції, які дозволяють вимірювати як швидкість руху зонда, так і опір цьому руху, і метод ядерного магнітного резонансу (ЯМР).

Необхідно мати уявлення про те, що саме вимірюється за допомогою мембранних зондів. Розглянемо загальний випадок, який застосуємо до ЕПР, вимірювання флуоресценції або ^2H -ЯМР. Всі три спектроскопічні методи чутливі до орієнтації молекул зондів. Спектр ^2H -ЯМР чутливий до орієнтації зв'язку C-D (вуглець-дейтерій) щодо прикладеного поля. Градієнт локального поля, векторно підсумовуючись із зовнішнім полем, дає результуючу, яка і вловлюється дейтерієм. Аналогічна ситуація характерна і для ЕПР. Спектр ЕПР залежить від орієнтації нітросильного зв'язку N-O, який містять більшість використовуваних зондів, щодо прикладеного магнітного поля. У разі флуоресцентної спектроскопії вимірювана поляризація світла, що випускається, залежить від орієнтації дипольного моменту переходу щодо напрямку, що визначається використовуваним поляризатором.

Б) Електронний парамагнітний резонанс (ЕПР)

Принцип парамагнітного резонансу був відкритий в 1944 році проф. Є.К. Завойським. Як метод дослідження рухливості (впорядкованості) макроstruktur він став застосовуватися лише після розробки способу створення стабільних парамагнітних сполук, що містять нітроксильний радикал.

Неспарений електрон атома азоту стабільного парамагнітного з'єднання (спінового зонда або спінової мітки – різниця між ними в тому, що молекули першого типу вільно плавають у мембрані, а другого – ковалентно зв'язані з її компонентами) при накладенні сильного магнітного поля переходить з одного енергетичного рівня на інший під дією мікрохвильового випромінювання (близько 10^{10} Гц). Метод досить чутливий: спектр зонда може бути зареєстрований при концентрації спінових міток близько 10^{-6} М. Спектр ЕПР представляють у вигляді першої похідної від спектру поглинання.

У спектрі нітроксильного радикала є три піки, які відповідають спін-спіновим взаємодіям неспареного електрона і ядра атома азоту. Як вже було зазначено, спектр ЕПР залежить від орієнтації молекули – спінової мітки або спінового зонда, які містять нітроксильний радикал, щодо прикладеного магнітного поля.

Рухливість, яка описується цим методом, характеризується так званим часом обертальної кореляції, який знаходиться в межах 10^{-8} - 10^{-10} сек (від декількох нсек до 0,1 нсек) для вільного обертання мітки. Приклади ЕПР спектрів наведені на рис. 5.3.

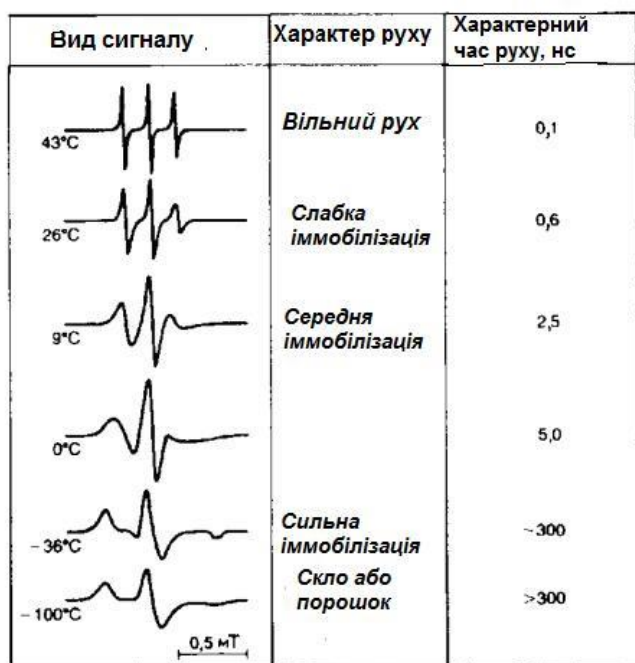


Рис. 5.3. Залежність ЕПР-спектрів нітроксильної спінової мітки від швидкості молекулярного обертання. Спектри отримані при різних температурах і, отже, при різній в'язкості середовища.

Характер спектра залежить від характеру обертання молекули. На рисунку наведено спектри для різних випадків – від вільного обертання до повної загальмованості. Метод ЕПР-спектроскопії має певні обмеження. Високі концентрації спінових зондів модифікують бішар, а ковалентні мітки, зв'язуючись з білками, можуть

інактивувати їх. У результаті дослідник вивчає мембрану не в нативному стані, а в тому вигляді, який вона приймає після модифікації. Крім того, треба мати на увазі, що швидкості процесів, які описуються за допомогою методу ЕПР, набагато більші за ті, які лежать в основі функціонування мембранних ферментів.

В) Деполяризація флуоресценції

Для вимірювання обертальної дифузії молекул давно використовується метод деполяризації флуоресценції. Обертання деяких зондів у мембранах часто порівнюють з їх обертанням в оліях з відомою в'язкістю, при цьому користуються поняттям «мікров'язкість». Суть методу полягає в тому, що зразок опромінюють поляризованим світлом, який буде переважно порушувати ті молекули, які мають таку ж орієнтацію дипольного моменту. Світло, що випускається, аналізують за допомогою поляризаторів. Мікров'язкість бішару дуже висока (відповідає величинам 1-10 пуаз, 1 Пуаз = грам/(см с), 1 Пуаз = 0.1 Па с.), тому час обертальної кореляції невеликих флуоресцентних і ЕПР-зондів становить 10^{-8} - 10^{-9} сек. У воді, що має в'язкість 0,01 пуаз, молекули такого розміру оберталися б принаймні в 100 разів швидше. Методи ЕПР і деполяризації флуоресценції реєструють швидкі процеси, які здійснюються за час порядку 10^{-8} с, а інформація про більш повільні рухах вислизає від спостереження.

Мембранні білки мають значно більші розміри, ніж згадані мітки, і тому обертаються набагато повільніше. Щоб мітки, пришиті до цих білків, були чутливі до обертання білків, їх час життя у збудженому стані має становити 10^{-3} с. Метод деполяризації флуоресценції у цьому випадку непридатний, оскільки час життя молекул у збудженому стані становить близько 10^{-8} сек, і в такому тимчасовому масштабі молекули білків представляються нерухомими. Тому використовуються певні модифікації методу.

1) До досліджуваного білка приєднують зонд, час життя якого в збудженому триплетном стані досить великий. Якщо мітка жорстко зв'язана з білком, то для реєстрації обертання білка можна використовувати вимірювання анізотропії фосфоресценції. Для таких вимірювань виявилися придатними похідні еозину, оскільки час життя еозину в триплетному стані складає приблизно 2 мс.

2) Інший випадок, коли самі молекули білка містять групи, що переходять при флеш-фотолізі в довгоживучий збуджений стан, параметри якого можна оцінити за допомогою дихроїзму поглинання. Як приклад, можна навести родопсин і бактеріородопсин, де використовуються збуджений стан зв'язаного ретиналя і збуджені стани, які спостерігаються при фотолізі комплексів цитохром-СО з використанням цитохром с оксидази і цитохрому Р₄₅₀. Вимірювання можна проводити *in situ* (наприклад, у складі мітохондріальних мембран) або з очищеним білком, вбудованим у фосфоліпідні везикули.

3) За допомогою звичайної ЕПР-спектроскопії не вдається реєструвати обертання, характерна частота яких дорівнює частоті обертання мембранних білків. Для цих цілей розроблено спеціальний метод – ЕПР з переносом насичення, діапазон чутливості якого дуже широкий – від 10^{-7} до 10^{-3} с. Цей метод застосовувався при вивченні обертання декількох мембранних білків з ковалентно пришитими до них спіновими мітками.

Г) Ядерно-магнітний резонанс (ЯМР)

В основі ЯМР-спектроскопії лежить поглинання електромагнітних хвиль у радіочастотному діапазоні ядрами, які мають магнітний момент. Найчастіше в дослідженнях використовуються ядра ^{13}C , ^2H , і ^{31}P . Детальну картину будови гідрофобної області ліпідного бішару вдалося отримати за допомогою методу ^2H -ЯМР. Атоми водню в певних місцях ліпідної молекули можна вибірково замінити дейтерієм. Це м'який спосіб зондування мембран. Вважається, що він, як правило, не вносить збурень в їхню структуру. Спектри деяких дейтерованих диміристоїлфосфатидилхолінів представлені на рис. 5.4.

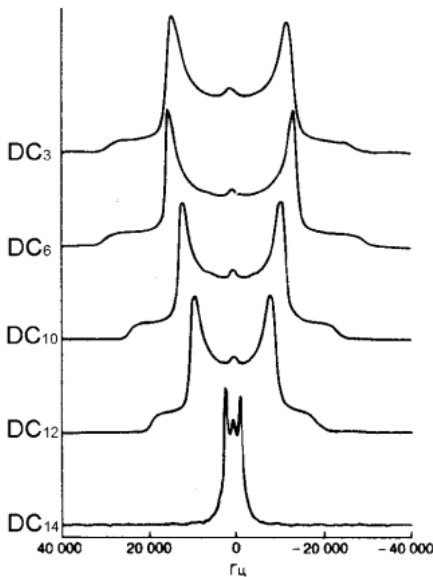


Рис 5.4. Спектри ^2H -ЯМР диміристоїлфосфатидилхоліну, дейтерованого за різними положеннями ацильного ланцюга. Цифри зліва позначають положення двох (чи трьох) атомів дейтерію в кожному ланцюзі. Спектр зразка з дейтерованою кінцевою метильною групою набагато вузчий всіх решти наведених спектрів, що вказує на значну неупорядкованість центральної області бішару.

Піки ЯМР лежать у радіочастотному діапазоні, а відмінності в частотах сигналів для різних ізотопів набагато перевищують ширину сигналу поглинання. Спектри ЯМР малих молекул добре роздільні. Так, спектр ЯМР молекули холестеролу дозволяє ідентифікувати резонанс кожного атома окремо і отримати інформацію про рухливість різних ділянок молекули в залежності від її оточення. Метод ЯМР дозволяє з високою вибірковістю отримати відомості про поведінку різних частин молекули.

При переході до більш великих молекул спектри ЯМР сильно ускладнюються і часто стають нероздільно-здатними. Іншим недоліком ЯМР-спектроскопії є досить низька чутливість – концентрація зразка повинна бути не менше 10^{-3} М (що досить багато), в той час, як оптичні методи дозволяють отримати інформацію про молекули, концентрація яких становить 10^{-6} - 10^{-7} М.

Д) Метод кругового дихроїзму

Метод кругового дихроїзму дозволяє з'ясувати, який тип вторинної структури переважає у мембранних білках. Величина кругового дихроїзму, яка характеризується зазвичай еліптичністю, являє собою різницю в поглинанні зразком право- і лівополяризованого світла. Вона пояснюється відмінностями в коефіцієнтах молярної екстинкції право- і лівополяризованого по колу світла.

На перший погляд видається, що частка спіральних ділянок в молекулі білка – не найінформативніший параметр. Але за допомогою цього методу можна з'ясувати, чи здійснюється прямий вплив на мембранні структури зовнішніх факторів, якщо

цей вплив змінює спіралізацію білкових молекул. Ця зміна часто має місце в тих випадках, коли спостерігається власний конформаційний зсув у молекулі білка або є взаємодія молекул білка один з одною, що змінює їх конформацію.

Е) Метод скануючої калориметрії

Принцип методу диференційної скануючої калориметрії полягає у вимірюванні тепла, необхідного для збільшення температури об'єкта на дуже малу величину при безперервному підвищенні температури об'єкта. При роботі з ліпідами мембран зміна їх фазового стану також може супроводжуватися поглинанням або виділенням тепла. Чим вище значення поглиненого тепла, тим більш значна молекулярна реорганізація відбувається в зразку за цих умов. Таким чином, зміну конформації макромолекул можна вимірювати, реєструючи тепло, що виділяється або поглинається при конформаційних переходах.

Чому метод називається диференційним? Тому що для знаходження теплоти фазового стану речовини необхідно з реєстрованого поглинання (або виділення) системою тепла вирахувати тепло, що поглинається (або виділяється) нею за відсутності фазових переходів, – власну теплоємність.

Сучасні чутливі калориметри дозволяють вимірювати фазові переходи у водно-ліпідних дисперсіях. Застосування цього методу для дослідження простих штучних систем дало цінну інформацію про принципи організації бішару.

Для нативних мембран цінність методу диференційної скануючої калориметрії нижча, ніж для штучних систем. Високий вміст холестеролу в плазматичних мембранах не дозволяє виявити виразних змін теплопродукції в області фазових переходів. У разі внутрішньоклітинних мембран фазові переходи не виявляються з іншої причини: ці мембрани виявляються досить «рідкими» в прийнятному інтервалі температур (5-60°C).

Є) Флуоресцентна спектроскопія

Світлова хвиля, стикаючись з молекулою якої-небудь речовини, або розсіюється (змінює напрямок руху), або поглинається (передає свою енергію молекулі). При цьому молекула переходить у збуджений стан. Енергія, поглинена молекулою, може розсіятися у вигляді тепла (в результаті зіткнення з іншими молекулами) або випромінюватись у вигляді світла. Яка саме подія із зазначених тут матиме місце, визначається станом молекули в момент зіткнення. Збуджені електрони повертаються на основний рівень двома шляхами: або випромінюючи світло, або за допомогою безвипромінюючого переходу. У першому випадку світло, яке випускається, має меншу енергію і більшу довжину хвилі (так званий Стоксовий зсув), оскільки частина енергії втрачається.

Ефективність флуоресценції (ймовірність випромінювального переходу) визначають і внутрішні, і зовнішні фактори. До числа зовнішніх факторів відноситься зіткнення з молекулою гасителів (*динамічне гасіння*) або утворення комплексу флуоресцентної молекули з гасителем (*статичне гасіння*).

Перший процес (випромінювальний перехід) залежить від в'язкості середовища і може бути використаний для її вимірювання. Гасителями флуоресценції є важкі аніони або катіони (J, Br, Cs⁺, Cu²⁺), парамагнетики (Mn²⁺, нітросильні радикали). Крім того, спостерігається гасіння флуоресценції в полярних розчинниках, наприклад, у воді.

Другий випадок – безвипромінювальний перехід в основний стан – відбувається, якщо найбільш високий коливальний підрівень основного стану має приблизно ту ж енергію, що і низький коливальний рівень збудженого стану. Такий перехід характерний для «гнучких» молекул. У «жорстких» молекул, які містять ароматичні кільця, найчастіше спостерігається випромінювання частини поглиненої енергії. Перехід молекули в збуджений стан супроводжується зміною дипольного моменту молекули. Це, в свою чергу, поляризує електронні оболонки оточуючих молекул, що призводить до зміщення атомів і переорієнтації молекул. Витрата енергії на ці процеси і призводить до зрушення в довгохвильову область спектра.

У деяких випадках збуджена молекула, стикаючись з ідентичною збудженою молекулою, утворює комплекс – ексимер. При цьому з плоских молекул виникають структури типу сендвіча, які стабілізовані переносом заряду від одної молекули до іншої. На перенесення заряду витрачається частина енергії поглиненого кванта, тому ексимер флуоресцює в більш довгохвильовій області. Ступінь ексимеризації залежить від концентрації хромофора, температури і в'язкості навколишнього середовища.

Поширеним флуоресцентним зондом, який використовується для вимірювання мікрров'язкості мембран за легкістю його ексимеризації, є пірен. Пірен концентрується в гідрофобних компартментах мембрани, розташовуючись між жирнокислотними ланцюгами ліпідів. Його ексимеризація пропорційна рухливості молекул у бішарі, тому при інших однакових умовах і незмінній концентрації пірену величина ексимеризації може служити характеристикою мікрров'язкості мембрани.

Зниження температури збільшує мікрров'язкість бішару, обмежує рухливість молекул пірену і знижує рівень його ексимеризації. При зростанні температури рухливість ланцюгів жирних кислот у серцевині бішару зростає, збільшується і ймовірність зустрічі молекул пірену. Вивчення залежності ексимеризації пірену в мембранах від температури (або інших чинників) дозволяє з'ясувати відносну мікрров'язкість мембранних структур і виявити область критичних температур, при яких спостерігається фазовий перехід у мембранах.

ТЕМА 6. ТРАНСПОРТ РЕЧОВИН ЧЕРЕЗ МЕМБРАНИ

1. Загальна характеристика механізмів проходження речовин через мембрани
2. Пасивний транспорт
3. Активний транспорт
4. Молекулярні основи первинно-активного транспорту іонів
5. Конкретні системи переносу низькомолекулярних речовин через мембрану
6. Перенесення через мембрани макромолекул і частинок. Цитоз

1. Загальна характеристика механізмів проходження речовин через мембрани

Одна з найбільш істотних функцій біологічних мембран – забезпечення вибіркової проникності для речовин, які транспортуються в процесі життєдіяльності як з клітини в середовище, так і з середовища у внутрішній простір клітини. За допомогою транспортних систем здійснюється регуляція об'єму клітин, величини рН та іонного складу цитоплазми.

Виділяють 5 різновидів мембранного транспорту. Низькомолекулярні речовини транспортуються за механізмом пасивного (проста та полегшена дифузія) та активного транспорту (первинно-активний та вторинно-активний транспорт) (рис. 6.1). Макромолекули і великі часточки транспортуються за механізмом, який пов'язаний із зміною структурної цілісності мембран – ендоцитозу (надходження речовин в клітини) та екзоцитозу (перенесення речовин з клітини).

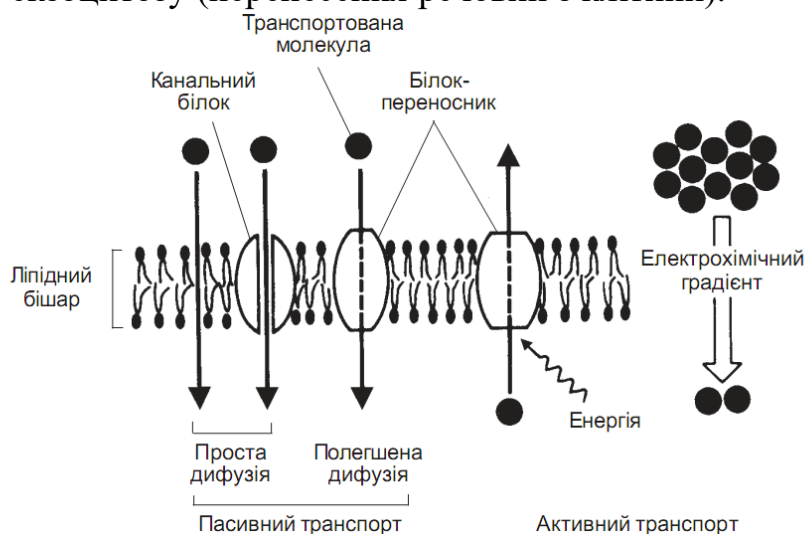


Рис 6.1. Способи проходження речовин через біологічну мембрану

2. Пасивний транспорт

Пасивний транспорт – це перенесення речовин з однієї сторони мембрани на іншу, яке відбувається за градієнтом і для своєї реалізації не потребує енергії АТФ або інших макроергічних сполук.

Рухливими силами пасивного транспорту речовин через біологічну мембрану можуть бути такі градієнти:

- концентраційний – для нейтральних молекул,

- електрохімічний – для іонів,
- градієнт гідростатичного тиску і осмотичний градієнт – для води.

Транспортування відбувається до моменту вирівнювання градієнтів з обох сторін (за відсутності інших процесів, які б підтримували його на постійному рівні). Залежно від природи переносуваних речовин, пасивний транспорт відбувається простою (неспецифічною) або полегшеною дифузією.

А) Проста дифузія – швидкість проходження речовин способом простої дифузії пропорційна концентраційному градієнту даної речовини та площі, через яку здійснюється дифузія. Проникнення речовин через мембрани є сумарним результатом хаотичного теплового руху їх молекул через гідрофільні ділянки (канальні білки) або пори, що виникають між рухомими вуглецевими ланцюгами жирних кислот (через кінки, які виникають в ділянці дефектних зон бішару) або між молекулами ліпідів і білкових компонентів мембран. За допомогою простої дифузії через мембрану проходять гідрофільні речовини малого розміру – H_2O , CO_2 , O_2 , гліцерин, сечовина. Сторонні ліпофільні речовини проходять через мембрани шляхом розчинення у ліпідній частині мембрани. При вирівнюванні концентрацій дифузія припиняється, а якщо співвідношення концентрацій змінюється на протилежне, то змінюється і напрям дифузії (наприклад, це має місце у випадку проходження CO_2 через мембрани еритроцитів).

Б) Полегшена дифузія – при цьому способі переносу речовина проходить через мембрану також за градієнтом концентрації, але за допомогою спеціальних білків – переносників або пороутворювачів.

Переносники мають високу вибірковість по відношенню до речовин, які транспортуються.

Для полегшеної дифузії характерні наступні відмінності:

- 1) перенесення іонів за участю переносника відбувається значно швидше порівняно з вільною дифузією;
- 2) полегшена дифузія має властивість насичення – при збільшенні концентрації з одного боку мембрани щільність потоку речовини зростає лише до деякої межі, коли всі молекули переносника вже зайняті;
- 3) при полегшеній дифузії спостерігається конкуренція переносуваних речовин, якщо одним переносником переносяться різні речовини;
- 4) речовини, які утворюють міцний комплекс з молекулами переносника, перешкоджаючи подальшому переносу, блокують полегшену дифузію.

Проста дифузія може здійснюватись за допомогою канальних білків, які, на відміну від білків-переносників, пронизуючи мембрану наскрізь, є нерухомими. Канальні білки утворюють в мембрані заповнені водою пори, проникні для певних іонів. Наприклад, є специфічні іонні канали для іонів Na^+ , K^+ чи Ca^{2+} .

На відміну від іонних каналів, білки-переносники утворюють специфічний комплекс з молекулою субстрату, який має здатність легко проникати через мембрану. У цьому відношенні білки-переносники схожі на ферменти. Вони проявляють високу специфічність, іноді групову, до субстратів, що підлягають

перенесенню через мембрану. Канальний тип транспорту має лінійну залежність швидкості транспорту від концентрації субстрату, а за участю переносників характеризується кінетикою насичення.

Переносники вуглеводів та амінокислот називаються пермеазами, у внутрішній мембрані мітохондрії виявлено спеціальний переносник – транслоказу, що здійснює перенесення АТФ з мітохондрій в цитоплазму, а АДФ – у мітохондрії з цитоплазми.

Інший приклад мембранних транспортерів представляють **іонофори** – гідрофобні речовини, які утворюють з катіонами жиророзчинні комплекси, здатні вбудовуватися в мембрану. Ці молекули можуть функціонувати за принципом як рухомих переносників, так і каналоформерів. Принцип дії іонофорів полягає у тому, що вони екранують заряд іону, що транспортується, і це дозволяє йому перетинати за концентраційним градієнтом гідрофобну область ліпідного бішару біологічної мембрани.

Прикладом іонофору, що працює як рухливий переносник, може слугувати депсіпептид (пептид, який поряд з амідними ділянками містить також і складноєфірні зв'язки) – *валіноміцин*, який продукується одним із штамів *Streptomyces*. Він здатний утворювати комплекси з калієм на 3 порядки активніше, ніж з натрієм. Це дозволяє використовувати валіноміцин як специфічний калієвий іонофор. Він, зв'язуючи іони K^+ , змінює свою конформацію – з гідрофільного стає гідрофобним, що дає йому можливість пересікати ліпідний бішар, і переносить іони K^+ через мембрану (рис. 6.2).

Інший антибіотик – *граміцидин* – поліпептид лінійної природи, що прошиває мембрану і формує канал, через який рухаються іони Na^+ .

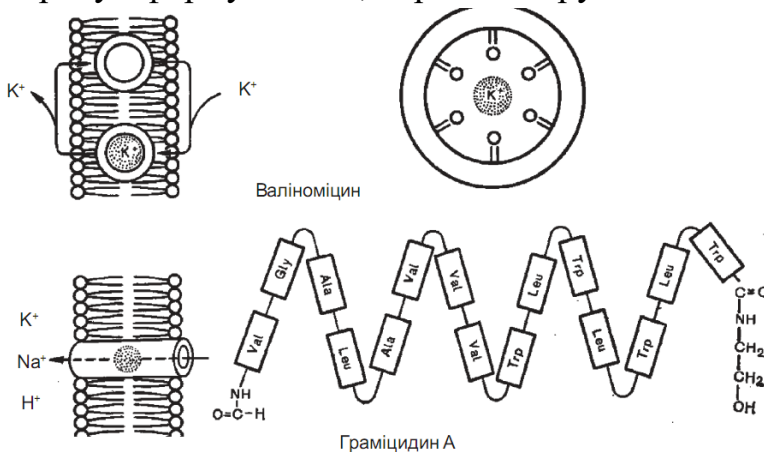


Рис 6.2. Схема перенесення іонів через мембрану за допомогою іонофорів (валіноміцину та граміцидину).

До утворення каналів у мембрані здатні антибіотики трьох груп: граміцидини, аламетицин та полієнові

антибіотики. Відомі й інші іонофори, здатні переносити як одно-, так і двовалентні іони: нактини, еніатіни, макроциклічні полієфіри (крауни), жиророзчинні слабкі кислоти (протонофори) та ін.

Доведено, що більшість природних переносників є нерухомими і забезпечують транспорт гідрофільних речовин шляхом утворення каналів, які можуть бути у закритому і відкритому стані.

Іонні канали забезпечують передачу нервового імпульсу і м'язове скорочення, здатні вибірково взаємодіяти з певними іонами при зміні мембранного потенціалу, за дії гормональних і осмотичних впливів. У залежності від способу управління

оборотними механізмами каналу з боку сенсора зовнішнього сигналу канали діляться на дві групи. Першу групу складають такі типи каналів, у яких сенсор зовнішнього стимулу безпосередньо входить до складу молекули каналу. Ця група включає потенціал- і ліганд-залежні канали. Потенціал-залежні іонні канали (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-) реагують на зміну мембранного потенціалу, ліганд-залежні – відкриваються і закриваються при зв'язуванні з рецептором специфічних агоністів, що беруть участь, наприклад, у процесі швидкої передачі сигналів. У каналів другої групи сенсор зовнішнього стимулу просторово відділений від каналу. У цьому випадку сигнал від сенсора передається на канал через систему внутрішньоклітинних посередників. Ця група включає рецептор-залежні канали і канали, керовані G-білками.

Довгий час вважалося, що для дифузії води через клітинні мембрани достатньо її природної проникності через ліпідну частину мембран за рахунок руху кінків. У 1988 р. в лабораторії П. Агре (лауреат Нобелівської премії з хімії за 2003 рік) були описані *аквапорини* – новий клас білків, які високоефективно пропускають молекули води, будучи абсолютно непроникними ні для інших іонів, включаючи протони. На відміну від іонних каналів, аквапорини здійснюють вибіркоче пропускання води через мембрани клітин. Аквапорини мають молекулярну масу ~ 30 кДа і знаходяться в мембрані у вигляді тетрамерів. Вони зустрічаються в клітинах всіх живих організмів і відіграють особливо важливу роль у фізіології нирок (у людини через них проходить до 170 л води на добу).

3. Активний транспорт

Активний транспорт – це процес перенесення речовин через мембрану проти градієнту концентрації, який потребує затрат енергії. Залежно від джерела енергії активний транспорт може бути первинним і вторинним.

Первинний активний транспорт використовує для перенесення речовин проти градієнту концентрації енергію АТФ. *При вторинному транспорті* джерелом енергії виступає електрохімічний градієнт на мембрані будь-якої речовини (наприклад, іонів Na^+ чи H^+), для створення якого була використана АТФ. Створений електрохімічний градієнт на мембрані застосовується для перенесення іншої речовини.

Транспортні системи, які переносять мінеральні іони за рахунок енергії АТФ, називаються *АТФазами* або *іонними помпами* – це білкові структури, які вибірково зв'язують відповідні іони, гідролізують АТФ, а енергію гідролізу застосовують для переміщення іонів через мембрани. У результаті дії системи первинно-активного транспорту в клітині створюється іонний склад, що відрізняється від такого в позаклітинному середовищі. У клітинах ссавців виявлені такі транспортні АТФази іонів – Na^+, K^+ -АТФаза, Ca^{2+} -АТФаза, Mg^{2+} -АТФаза, H^+ -АТФаза, HCO_3^- -АТФаза. Аденозинтрифосфатгідролазна активність іонних насосів потребує для своєї роботи іонів Mg^{2+} . При роботі Na^+, K^+ -АТФази за рахунок гідролізу 1 молекули АТФ у клітину переносяться 2 іони K^+ і викачуються 3 іони Na^+ . Ca^{2+} -АТФаза забезпечує активне перенесення 2 іонів Ca^{2+} , протонний насос – 2 протонів на 1 молекулу АТФ. У рослин роль протонного насоса виконує протонна пірофосфорилаза (H^+ -PPa).

Існує класифікація способів, які забезпечують транспорт речовин через мембрану (рис. 6.3).

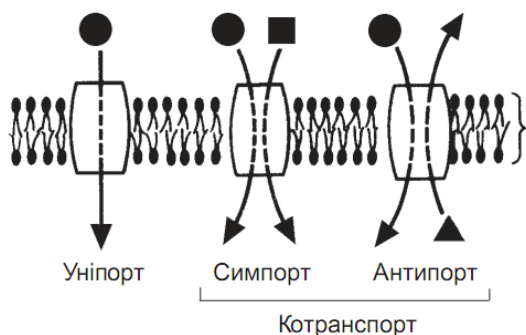


Рис. 6.3. Схема способів переносу речовин через мембрану.

Транспорт може відбуватись за механізмом *уніпорту* (полегшена дифузія), згідно якого тільки одна речовина переноситься через біомембрану в одному напрямку за допомогою каналних чи транспортних білків (наприклад, транспорт глюкози в клітинах печінки, іонів Ca^{2+} через внутрішню мембрану мітохондрій – це приклад вторинного транспорту – у цьому випадку перенесення іону Ca^{2+} здійснюється за градієнтом потенціалу, утвореного на мембрані). Спряжене перенесення двох чи більше іонів в одному напрямку, називають *симпортом* (активний вторинний транспорт амінокислот чи глюкози разом з іонами Na^+ в епітеліальних клітинах кишечника).

Транспорт іонів (речовин) спряжений з перенесенням інших іонів (речовин) у протилежному напрямку називають *антипортом* (наприклад, обмін HCO_3^- на Cl^- в мембрані еритроцитів; Na^+/H^+ -антипорт на внутрішній мембрані мітохондрій).

4. Молекулярні основи первинно-активного транспорту іонів

У більшості випадків джерелом енергії для первинно-активного транспорту іонів є АТФ. Тому більшість іонних насосів одночасно є ферментами, які гідролізують АТФ, – АТФазами. Всі транспортні АТФази прокаріотичних і еукаріотичних клітин діляться на АТФази Р-, V- і F-типу.

Загальною властивістю *АТФаз Р-типу* є здатність утворювати ковалентний фосфорильований інтермедіат (Р), який бере участь в реакційному циклі. До цих АТФаз належать Na^+, K^+ -АТФаза, Ca^{2+} -АТФаза і H^+ -АТФаза плазматичної мембрани еукаріотичних клітин, а також Ca^{2+} -АТФаза ендо(сарко)плазматичного ретикулуку і K^+ -АТФаза зовнішньої мембрани прокаріотів (*E. coli*, *Streptococcus faecalis*). Припускають, що високоспецифічне ($K_m=10-30$ мкМ) поглинання іонів калію клітинами рослин може забезпечуватися K^+, H^+ -АТФазою, K^+ -АТФазою і (або) K^+, H^+ -симпортером.

У процесі функціонування АТФаз Р-типу при гідролізі АТФ залишок фосфорної кислоти переноситься на карбоксильну групу аспартату активного центру і утворюється фосфорильована форма ферменту (Е-Р). Ефективним інгібітором АТФаз Р-типу є ванадат-іон, який здатний заміщати фосфат в активному центрі ферменту. Різні АТФази Р-типу відрізняються одна від одної за чутливістю до будь-яких інших модифікаторів, окрім ванадату, який є сильним інгібітором саме цього типу транспортних АТФаз. Наприклад, H^+ -АТФаза плазматичних мембран інгібується диетилстильбестролом (ДЕС) і високими концентраціями дициклогексилкарбодііміда (ДЦКД), Na^+, K^+ -АТФаза – серцевими глікозидами, Ca^{2+} -АТФаза плазмалемі активується білком кальмодуліном і пригнічується

рутенієвим червоним, SH-реагентами і еритрозином В, а Ca^{2+} -АТФаза СПР – тапсигаргіном.

Іон-транспортні АТФази V-типу відносяться до мембранозв'язаних структур, які відрізняються від мітохондрій і ендоплазматичного ретикулу. Вони виявлені в вакуолях дріжджів і тонопластах рослин, а також в лізосомах, ендосомах і секреторних гранулах. Більшість цих АТФаз є переносниками протонів і беруть участь в транспорті аніонів та амінокислот, репарації мембран при ендо-і екзоцитозі. Для них не встановлено утворення ковалентно-зв'язаного інтермедіату в ході каталітичного циклу. Крім ДЦКД, АТФази V-типу блокуються нітратом, KSCN і SH-реагентами. Ні ванадат (інгібітор Р-типу АТФаз), ні олігоміцин (інгібітор F-АТФаз) не діють на ці системи.

АТФази F-типу (або (F_0+F_1) -АТФази) виявляються в мембранах бактерій, в хлоропластах і мітохондріях. Вони мають дуже складну будову: містять водорозчинну частину F_1 , яка складається з декількох субодиниць і має каталітичну активність (здатна каталізувати як синтез, так і гідроліз АТФ), і гідрофобну частину F_0 , яка бере участь в транслокації H^+ . Основні відмінності між цими ферментами виявляються в гідрофобному F_0 -компоненті, зануреному в мембрану. Число поліпептидів в F_0 може коливатися від 3 до 8. Активність F-АТФаз пригнічується олігоміцином, ДЦКД, вентурицидином, іонами кадмію. У клітині ферменти перших двох типів виступають як споживачі, а третього – як продуценти АТФ.

5. Конкретні системи транспорту низькомолекулярних речовин через мембрану

А) Na^+, K^+ -АТФаза – відкрита у всіх клітинах тварин, рослин і бактерій. В організмі людини її активність найвища в нервовій тканині та секреторних органах. Na^+, K^+ -АТФаза локалізована в плазматичній мембрані і служить маркером цих мембран (рис. 6.4). За структурою – це білок з молекулярною масою 250-300 кДа, який складається з двох субодиниць.

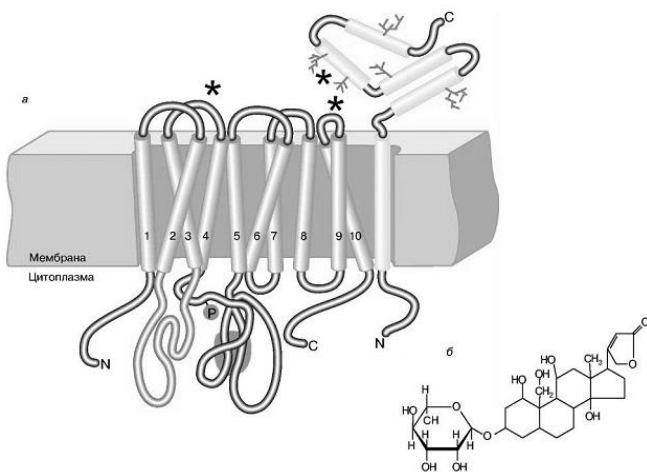
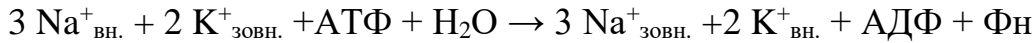


Рис. 6.4. Схема розташування Na^+, K^+ -АТФази в клітинній мембрані (а) і структура її специфічного інгібітора уабаїну (б).

Менша субодиниця пересікає мембрану тільки один раз, в той час, як велика – багато разів, утворюючи п'ять двійних петель, при цьому обидва кінці пептидного ланцюга обернені в цитоплазму і доступні для цитоплазматичної АТФ. Для Na^+, K^+ -АТФази необхідні іони Mg^{2+} , які сприяють зв'язуванню АТФ з активним центром ферменту. Приєднання Mg^{2+} -АТФ до активного центру ферменту змінює його спорідненість з іонами Na^+ і K^+ . Спочатку на внутрішній стороні мембрани до АТФази приєднуються 3 іони Na^+ . Це викликає гідроліз АТФ до АДФ і Фн, при

цьому фосфатний залишок приєднується до АТФази. Як наслідок, відбувається зміна конформації ферменту, що проявляється закриттям іонного каналу з внутрішнього боку мембрани та відкриттям з зовнішнього боку; одночасно спостерігається зменшення спорідненості центрів зв'язування Na^+ на внутрішній стороні мембрани та підвищення її з іонами K^+ на зовнішній. Таким чином, іони Na^+ залишають фермент на зовнішній стороні мембрани, а до нього приєднуються іони K^+ . Останні призводять до відриву залишку фосфату та зміни конформації ферменту: іонний канал закривається зовні і відкривається всередині. Спорідненість з іонами K^+ знижується і вони потрапляють в цитозоль.

Загальне рівняння:



Оскільки перенесення іонів є нерівнозначним, то одночасно з різницею їх концентрацій виникає різниця електричних потенціалів, тобто натрієва помпа створює трансмембранний електрохімічний потенціал μ ; $\Delta\mu = F\Delta\phi + RT\ln\Delta C$ ($\Delta\phi$ – різниця електричних потенціалів).

За рахунок створеного градієнту іонів Na^+ реалізується вторинний транспорт через мембрани (глюкоза, амінокислоти). Натрієва помпа захищає клітину від осмотичного набухання; бере участь у створенні градієнту концентрації іонів, необхідних для передачі нервового імпульсу при збудженні.

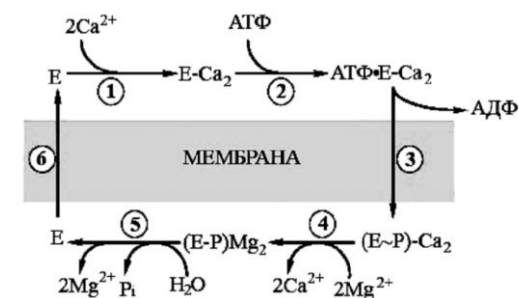
Інгібіторами Na^+, K^+ -АТФази є серцеві глікозиди (наприклад, убаїн, строфантин G), іони заліза, міді, деякі гормони (наприклад, глюкагон, адреналін). Підвищують активність Na^+/K^+ -АТФази – дипептид карнозин; кортикостероїдні гормони мають здатність стимулювати біосинтез ферменту в нирках.

Б) Ca^{2+} -АТФаза – знаходиться як на плазматичній, так і на внутрішньоклітинних мембранах (ЕПР, мітохондрії). Це мономерні білки, які розрізняються за молекулярною масою (108-120 кДа). Ця АТФаза використовує енергію гідролізу АТФ для перенесення проти градієнту концентрації іонів Ca^{2+} .

Ca^{2+} -АТФаза плазматичних мембран забезпечує викачування Ca^{2+} з клітини в міжклітинний простір, має центр зв'язування білка кальмодуліну. Наприклад, завдяки плазматичній Са-помпі в еритроцитах вміст Ca^{2+} менший 0,001 мМ, а в плазмі крові – 1,2-2,5 мМ. Ca^{2+} -помпа внутрішньоклітинних мембран забезпечує закачування Ca^{2+} з цитоплазми до внутрішньоклітинних депо (наприклад, Ca^{2+} -АТФаза СПР переносить Ca^{2+} з цитоплазми до цистерн ретикулуму і є важливим компонентом, що регулює цикл скорочення-розслаблення м'язового волокна). Ca^{2+} -АТФаза є електронейтральною: відкачування іонів Ca^{2+} супроводжується

надходженням у клітину еквівалентної кількості іонів Mg^{2+} або Na^+ (рис. 6.5). Інгібується Ca^{2+} -АТФаза рутенієм червоним, ванадатом і SH-реагентами.

Рис 6.5. Цикл роботи Са-АТФази: 1 – зв'язування іонів кальцію, 2 – зв'язування АТФ, 3 – утворення фосфоферменту, 4 – відщеплення іонів кальцію, 5 – гідроліз фосфоферменту, 6 –



повернення ферменту в початковий стан.

В) H^+ -АТФаза – використовує енергію гідролізу АТФ для перенесення через мембрану іонів H^+ . У рослин H^+ -АТФаза плазматичної мембрани викачує H^+ з клітини назовні і не тільки підтримує рН цитоплазми близьким до нейтрального, але й створює на мембрані різницю потенціалів, що визначає електричні властивості вищих рослин. H^+ -АТФаза лізосом тварин і вакуолі рослин викачує протони з цитоплазми в ці компартменти. З функціонуванням H^+ -АТФази в рослинній клітині пов'язана робота вторинного транспорту.

У тварин і рослин H^+ -АТФаза виявлена і на внутрішній мембрані мітохондрій – має складну структуру (10 субодиниць) з двох функціональних частин: F_0 і F_1 . F_0 – гідрофобний білок, що виконує функцію каналу, через який просочується H^+ . F_1 – частина, призначення якої фосфорилування АДФ до АТФ, тобто білок функціонує як H^+ -АТФ-синтетаза. Каталізуючи протилежну реакцію, H^+ -АТФ-синтетаза працює як H^+ -АТФаза. За цих умов вона відкачує протони з матриксу в міжмембранний простір за рахунок енергії гідролізу АТФ. У слизовій оболонці і кишечника – K^+ , H^+ -АТФаза нечутлива до уабаїну, інгібується фторидом, бере участь у створенні високої кислотності шлунку: $4H^+/1$ АТФ.

5. Перенесення через мембрану макромолекул і частинок

Ці процеси зв'язані зі зміною структурної цілісності мембран. Сюди належать процеси вивільнення медіаторів при збудженні синапсів (відбувається злиття синаптичних пухирців з мембраною і вивільнення їх вмісту в синаптичну щілину); перенесення генетичного матеріалу через ядерну мембрану, процеси ендо- і екзоцитозу, а також діяльність пермеаз бактерій, які забезпечують перенесення через клітинну стінку олігопептидів.

Перенесення білків від одних органел до інших відбувається за допомогою везикул. Везикули відбруньковуються від мембран одних органел, а потім зникають, зливаючись з мембраною другої органели. Перенесення через біомембрани білків із значною молекулярною масою здійснюється спеціальними транспортними системами. З цитоплазми в ядро білки потрапляють через великий заповнений водою пориновий комплекс, транспорт енергозалежний. Ядерні білки несуть одну чи кілька сигнальних послідовностей, за допомогою яких вони зв'язуються з пориновим комплексом та імпортуються зі збереженням третинної структури. Імпорт білків з цитоплазми в органели здійснюється переносниками – білковими комплексами, які переносять лінійні поліпептиди з використанням енергії. Процеси розгортання і вторинної укладки білків контролюються шаперонами.

Перехід частинок через плазмалему відбувається шляхом **цитозу** – у складі мембранного пухирця чи везикули, тому цитоз ще називають везикулярним транспортом. За напрямком транспорту і за характером перенесених речовин розрізняють:

1) Ендоцитоз – перенесення частинок в клітину: а) *піноцитоз* – захоплення і поглинання клітиною розчинених маромолекулярних сполук; б) *фагоцитоз* – те саме, тільки у відношенні твердих частинок; в) *ендоцитоз, опосередкований рецепторами* – коли субстрат спочатку зв'язується з поверхневими рецепторами плазмалеми (частковий варіант фаго- і піноцитозу, особливо в імунних процесах).

Найбільш активні до ендоцитозу – лейкоцити, макрофаги, клітини ендотелію капілярів. Механізм ендоцитозу ще не до кінця вивчений. Встановлено, що під час контактів макромолекул або частинок із зовнішньою поверхнею клітинної мембрани, остання наче прогинається, втягуючи їх усередину клітини. Як наслідок, у клітині формується міхурець, утворений компонентами мембрани, що містять поглинуті речовини. Припускають, що в мембрані особливий глікопротеїн – клатрин допомагає втягувати всередину клітини ділянку мембрани, що контактує з поглинутою частинкою.

Речовини, що потрапили в клітину, як правило, зливаються з лізосомами, де піддаються дії гідролітичних ферментів. Ці процеси (перетравлювання в лізосомах) лежать в основі оновлення та утворення нових молекул та органел. Запальні процеси супроводжуються пошкодженням мембранних структур, зокрема мембран лізосом. Руйнування сполучнотканинної основи тканини при ревматоїдному артриті, міодистрофії, інфаркті міокарду пов'язане з дією лізосомальних ферментів.

В основі піноцитозу і опосередкованого рецепторами поглинання розчинених речовин лежить утворення облямованих ямок і облямованих везикул. Відмінною їх особливістю є наявність гратчастої структури з молекул білка клатрину, який зв'язується з поглибленнями на поверхні плазматичної мембрани і везикулами, що утворюються з таких ямок. На частку облямованих ямок зазвичай припадає 1-2% загальної площі поверхні плазматичної мембрани, і більшість білків плазматичної мембрани не виявляються на цих ділянках. Однак певні білки концентруються в області формування облямованих ямок.

У табл. 7.1 перераховані деякі рецептори плазматичної мембрани, що беруть участь в поглинанні специфічних лігандів за допомогою облямованих ямок і везикул. У деяких випадках спорідненість рецептора до облямованих ямок постійна, в інших випадках рецептори концентруються в цих структурах тільки при зв'язуванні ліганда (наприклад, рецептор фактора росту епідермісу). Приблизно 70% рецепторів ліпідів низької густини (ЛНГ) сконцентровано в клатринових ямках, де вони легко піддаються інтерналізації. Фізіологічний зміст цього явища полягає в тому що за допомогою опосередкованого рецепторами ендоцитозу відбувається захоплення клітинами ЛНГ з кров'яного русла. Цей механізм являє собою основний шлях «доставки» холестерину до клітин.

Таблиця 7.1. Деякі рецептори, які інтерналізуються при ендоцитозі

Групи рецепторів	Приклади рецепторів
I. Рецептор повертається до клітинної поверхні, ліганд надходить в лізосоми	Рецептори маннози, асіалоглікопротеїну (галактози), манозо-6-фосфату, γ -макроглобуліну, ЛНГ
II. Рецептор і ліганд надходять в лізосоми	Рецептори ФРЕ, інсуліновий
III. Трансцитоз	IgA/IgM-рецептор, IgG-рецептор
IV. Рецептор і ліганд повертаються до одного й того ж домену плазматичної мембрани	Трансферинний рецептор

2) Екзоцитоз – перенесення частинок з клітин. Екзоцитоз властивий тим клітинам, які здатні до секреції в позаклітинний простір біомолекул (білків, гетерополісахаридів, травних ферментів, білкових гормонів...).

А) найбільш поширений спосіб екзоцитозу – *секреція* – виведення з клітини розчинних сполук, наприклад, білкових гормонів передньої долі гіпофізу, низькомолекулярних сполук (іонів H^+ в шлунку і нирках; амінів в сполучній тканині; медіаторів в пресинаптичних закінченнях)). В одних випадках накопичення речовин в клітині відбувається у вигляді секреторних пухирців, які зливаються з плазмлемою (приклад – секреція гормонів, медіаторів), рідше секреція відбувається за типом полегшеної дифузії чи активного транспорту (наприклад, секреція іонів H^+ в шлунку і нирках). Екзоцитоз ліпідів при утворенні молока в молочних залозах відбувається так: жири в клітинах молочної залози утворюють краплі, які вільно зависають в цитоплазмі. Жирові краплі, прилипаючи до плазмалеми, викликають місцеве вип'ячування її у вигляді міхурця, заповненого жиром.

Б) якщо з клітини видаляються тверді частинки, то таку різновидність екзоцитозу, називають *екстракцією* (наприклад, видалення з ретикулоцитів сітчастої субстанції в кінці еритропоезу).

В) *рекреція* – перенесення твердих частинок – поєднання фагоцитозу і екстракції (наприклад, дендритні клітини, які здійснюють презентацію лімфоцитам антигенів).

ТЕМА 7. АДГЕЗИВНА ФУНКЦІЯ МЕМБРАН

1. Родини адгезивних мембранних білків
2. Типи міжклітинних контактів

1. Родини адгезивних мембранних білків

Адгезивні властивості мембран (від лат. *adhaesio* – прилипання) забезпечують не просто з'єднання клітин між собою, а таке їх з'єднання, яке призводить до формування певних правильних типів гістологічних структур, специфічних для даних типів клітин. З адгезивною функцією мембран пов'язане формування імунологічної відповіді. Дана функція реалізується через спеціальні мембранні адгезивні білки.

Популярний об'єкт вивчення адгезивних мембранних білків – клітини крові та ендотеліоцити. Серед адгезивних взаємодій найкраще охарактеризовані взаємодії цих клітин між собою та компонентами позаклітинного матриксу. Адгезивні білки часто відносять до клітинних рецепторів, проте не всі клітинні рецептори є адгезивними білками (тому, що рецептори можуть реагувати на розчинні сигнальні молекули, які виділяються іншими клітинами). Незалежно від функції рецептора, речовина, з якою він взаємодіє, називається лігандом. Для адгезивних білків ліганд – компонент мембрани другої клітини чи позаклітинного матрикулу. В той же час, даний адгезивний білок є лігандом для речовини, з якою він реагує.

На сьогодні виділяють наступні *родини адгезивних білків*: 1) інтегрини; 2) селектини; 3) імуноглобуліни; 4) кадгерини. Одночасно є ряд білків, які не віднесені до жодної родини. Номенклатура адгезивних білків складна і хаотична.

Інтегрини – інтегральні білки гетеродимерної структури $\alpha\beta$. Взагалі інтегральними є багато інших адгезивних білків (наприклад, селектини та імуноглобуліни), але термін інтегрини використовується тільки для даної родини. Відомо понад 10 типів субодиниці α і близько 15 типів субодиниці β . Кожна субодиниця має по три домени: внутрішньоклітинний, мембранний та позаклітинний. Внутрішньоклітинні домени беруть участь у фіксації цитоскелету: зв'язок між цими доменами та актиновими мікрофіламенами здійснюється за допомогою спеціальних білків – вінкуліну, таліну і безпосередньо актину. Позаклітинні домени відповідають за впізнавання спеціальних лігандів і адгезію з ними.

Найбільш вивчені білки з β -субодиницями перших трьох типів ($\beta_1, \beta_2, \beta_3$). β_1 – інтегрини виявлені в плазмалемі лімфоцитів і тромбоцитів; деякі β_1 -інтегрини беруть участь у взаємодії лімфоцитів з ендотелієм, контактуючи з адгезивними імуноглобулінами на поверхні ендотеліоцитів. Коли лімфоцит виявляється поза судинним руслом, інші β_1 -інтегрини реагують з білками міжклітинної речовини – колагеном, фібронектином, ламініном.

До β_2 -інтегринів відносяться три білки, які виявлені не тільки у лімфоцитах, але й в інших лейкоцитах – гранулоцитах та моноцитах.

β_3 -інтегрини виявляються на поверхні низки лейкоцитів та активованих тромбоцитів; в останніх вони необхідні для зв'язування з фібриногеном.

Селектини – мономерні білки, N-кінцевий домен позаклітинної частини білка володіє властивостями лектинів. *Лектини* – група білків (в основному, рослинного походження, найбільш відомий представник – конканавалін), які мають специфічну спорідненість до того чи іншого кінцевого моносахариду олігосахаридних ланцюжків. Серед конкретних представників селектинів найбільш відомі – L, P, і E-селектини.

L-селектин виявляється на поверхні різних лейкоцитів і бере участь у взаємодії з глікопротеїнами ендотелію. Специфічні для L-селектину глікопротеїни особливо у великій кількості зосереджені в посткапілярних венулах лімфовузлів. Тому саме тут у звичних умовах лімфоцити виходять із судинного русла, що позначається як *хомінг* – повернення лімфоцитів у лімфоїдну тканину. Глікопротеїни високого ендотелію називаються судинними адресинами, і хомінг лімфоцитів забезпечується взаємодією L-селектину і судинних адресинів.

На відміну від L-селектину, P- і E-селектини виявляються на поверхні не лейкоцитів, а ендотелію, причому у більшості судин не постійно, а після стимуляції ендотелію факторами (гістаміном, тромбіном, цитокінами), які стимулюють запалення та ряд інших реакцій. P-селектин, окрім цього виявляється на активованих тромбоцитах.

Адгезивні імуноглобуліни

Класичні Ig, які циркулюють у крові, продукуються плазматичними клітинами, (які утворюються з β -лімфоцитів при антигенній стимуляції) – це антитіла до антигенів. Вони мають характерну олігомерну структуру.

Адгезивні Ig і Ig-подібні білки знаходяться на поверхні лімфоїдних і низки інших клітин (зокрема ендотеліоцитів), виступаючи в якості рецепторів. При цьому на β -лімфоцитах структура даних білків найбільш близька до класичних Ig. В-клітини одного клону мають на поверхні Ig лише однієї імуноспецифічності, тому β -лімфоцити найбільш специфічно реагують з антигенами. На поверхні T-лімфоцитів, Ig присутні, ймовірно, у неповному вигляді – представлені, як вважають, тільки важким ланцюгом, який має варіабельні і константні домени. Такі білки називаються T-клітинними рецепторами (TCR). Специфічність їх взаємодії з антигенами дещо інша, ніж у повних Ig β -клітин. Наприклад, в одного з видів T-клітин (T-хелперів) TCR впізнають не саму по собі антигенну детермінанту, а її комплекс з певним мембранним білком на поверхні клітини, зокрема β -лімфоциту. Таким чином, T-клітини, беручи участь в імунній реакції, зв'язуються за допомогою TCR з другою клітиною. Всі T-клітини одного клону мають на своїй поверхні TCR лише одного виду. Активацію T-клітин можна викликати також лектинами.

Існують такі Ig-подібні поверхневі білки, які зовсім позбавлені імуноспецифічності. Вони відіграють роль звичайних адгезивних білків і беруть участь, зокрема, у тих же процесах взаємодії клітин крові з ендотелієм, що і інтегрини і селектини. Приклади таких білків: LFA2 на T-лімфоцитах, білок LFA3 – на лейкоцитах, еритроцитах, фібробластах, різних клітинах ендотелію і епітелію, білок ICAM – на ендотеліоцитах.

Кадгерини і позасистемні адгезивні білки. Ключовою особливістю кадгеринів є те, що їх адгезивна здатність проявляється тільки у присутності іонів Ca^{2+} . Функціональна роль кадгеринів – участь і формування відносно постійних клітинних контактів в епітеліальній (E- і P-кадгерини), нервовій і м'язовій тканинах (N-кадгерини).

До позасистемних адгезивних білків відносяться зокрема CD26, CD 36, CD44 і CD73. Як і попередні групи адгезивних білків, ці білки також забезпечують взаємодію клітин крові і ендотеліоцитів між собою і (чи) з компонентами міжклітинного матриксу. Деякі з них володіють тією чи іншою ферментативною активністю, наприклад, протеазною (CD26), нуклеотидазною (CD73). Поки-що роль такої активності залишається нез'ясованою.

2. Типи міжклітинних контактів

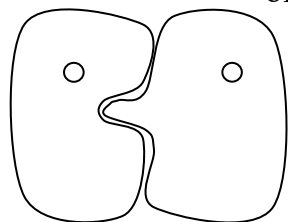
Окрім розглянутих вище тимчасових адгезивних взаємодій, клітини можуть утворювати одна з одною чи позаклітинними структурами відносно постійні контакти. За своїми функціональними властивостями **міжклітинні контакти** поділяються наступним чином:

- 1) контакти простого типу: а) прості міжклітинні з'єднання; б) інтердигітації
- 2) контакти зчепленого типу: а) десмосоми; б) гемідесмосоми; в) адгезивний поясок або опоясуючі десмосоми
- 3) контакти замикаючого типу: щільні з'єднання
- 4) контакти комунікаційного типу: а) щільні з'єднання (нексуси, gap-junctions); б) синапси.

Контакти перших двох груп необхідні для зчеплення клітин одна з одною. В основному цю функцію виконують контакти другого типу. Роль контактів замикаючого типу – повне розмежування середовищ, які лежать по різні сторони клітинного пласту. Контакти комунікаційного типу дозволяють клітинам обмінюватись речовинами (нексуси) чи сигналами (синапси).

Контакти простого типу

Просте міжклітинне з'єднання – цей контакт найбільше нагадує вище описані адгезивні взаємодії: клітини просто зближуються одна з одною до відстані 15-20 нм і взаємодіють адгезивними молекулами своїх плазмалем. Найбільш важливі у цьому плані кадгерини. Завдяки цьому, у процесі гісто- і органогенезу клітини одного типу упізнають одна одну і об'єднуються в надклітинні структури. Пізніше контакт простого типу посилюється за рахунок залучення у взаємодію й інтегринів.



Контактуючі клітини



Інтердигітація чи пальцевидне з'єднання – тут плазмалемами двох клітин, супроводжуючи одна одну, інвагінують в цитоплазму спочатку одної, а потім другої клітини. Такий тип взаємодії зустрічається між кардіоміоцитами.

Контакти зчепленого типу

Десмосома – невелике округле утворення, побудоване з участю обох контактуючих плазмалем. Тут до внутрішньої сторони кожної плазмалеми прилягає



шар, утворений білком десмоплагіном. Від цього шару в цитоплазму відходить пучок проміжних філаментів, які беруть участь в утворенні цитоскелету. Природа проміжних філаментів залежить від типу клітини. В епітелії вони утворені білком кератином, у м'язовій тканині – десміном, у клітинах мезенхімного походження – білком віментином. Що стосується зовнішньої сторони мембрани, то простір між ними в області десмосоми дещо розширений і даний простір

заповнений потовщеним гілкокалікаліксом, який пронизаний білками зчеплення – десмоглеїнами (десмоколінами) – це інтегральні адгезивні білки з родини кадгеринів. Десмоглеїни своїми кінцями міцно зв'язані один з одним.

Якщо епітеліальна клітина лежить на базальній мембрані, то зв'язок між ними здійснюється за допомогою *напівдесмосом (гемідесмосом)*. Це означає, що зі сторони клітини присутні всі елементи десмосоми, включаючи дисковидну пластинку, утворену кінцевими доменами десмоглеїнів. Але тепер ця пластинка прикріплена безпосередньо до базальної мембрани.

Опоясуючі десмосоми або адгезивний поясок – даний контакт має вигляд подвійних стрічок, які розміщені між клітинами, які контактують (рис. 7.1). Такий тип контакту зустрічається в одношарових епітеліях, де кожна клітина контактує з 4 іншими клітинами (не враховуючи базальної мембрани). Тому при роз'єднанні стрічок утворюються ніби пояски, які оточують клітину і розміщені в апікальній її частині. До внутрішньої сторони плазмалеми прилягає шар вінкуліну, від якого у цитоплазму відходять тонкі філаменти, утворені актином. Плазмалеми одна з одною зчеплюються за допомогою лінкерних адгезивних білків.

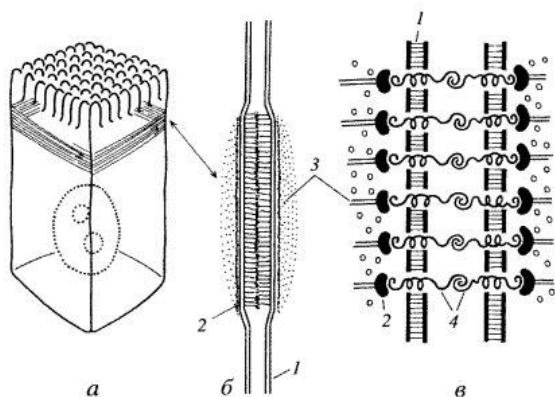
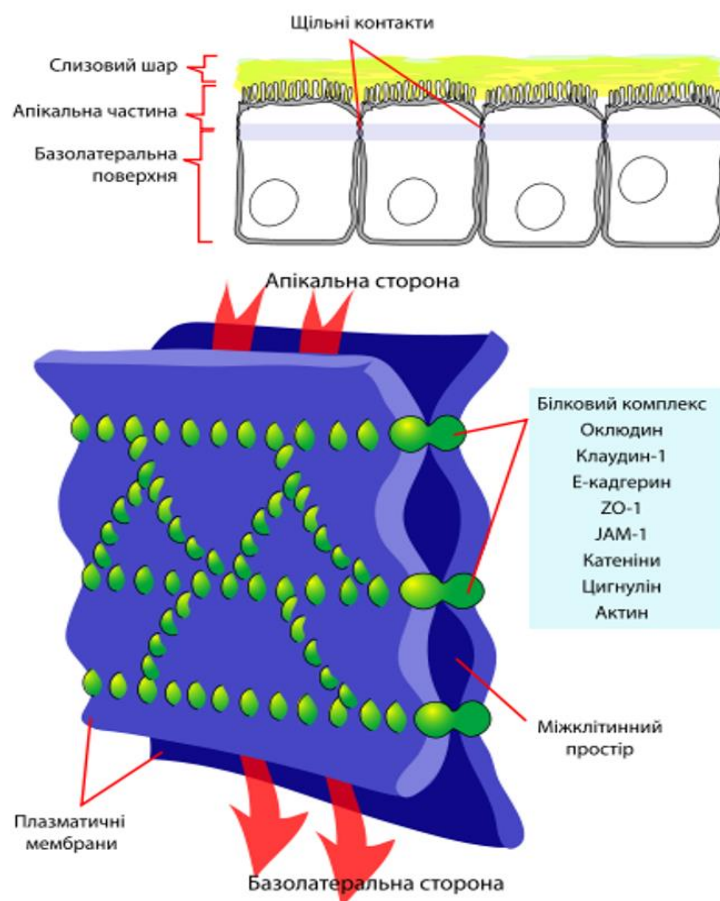


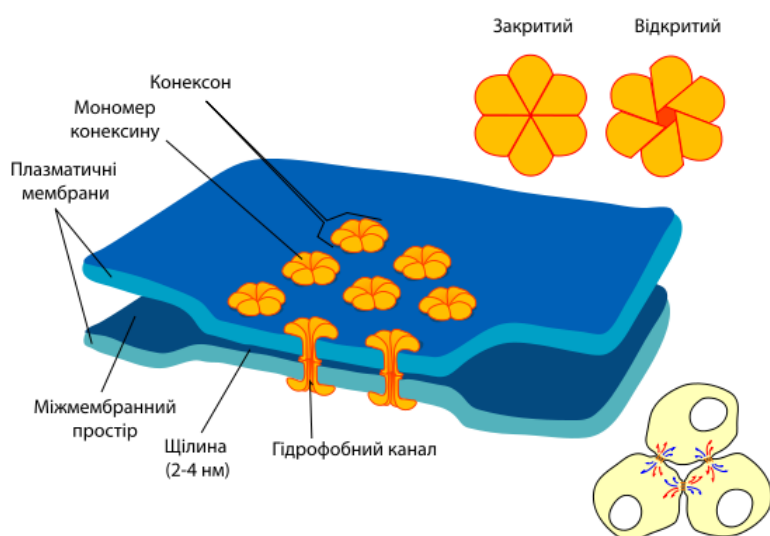
Рис 7.1. Адгезивний поясок: а – епітеліальна клітина; б і в – структура пояска. 1 – плазмалема, 2 – шар вінкуліну, 3 – актинові філаменти, 4 – лінкерні білки



Щільне з'єднання (zona occludens) – це з'єднання також утворюється за допомогою інтегральних адгезивних білків, але зовнішні частини останніх практично не виступають над поверхнею плазмалеми, тому плазмалеми контактуючих клітин практично впритул прилягають одна до одної. Щільні з'єднання зустрічаються в одношарових епітеліях, окрім того вони можуть бути в ендотелії судин.

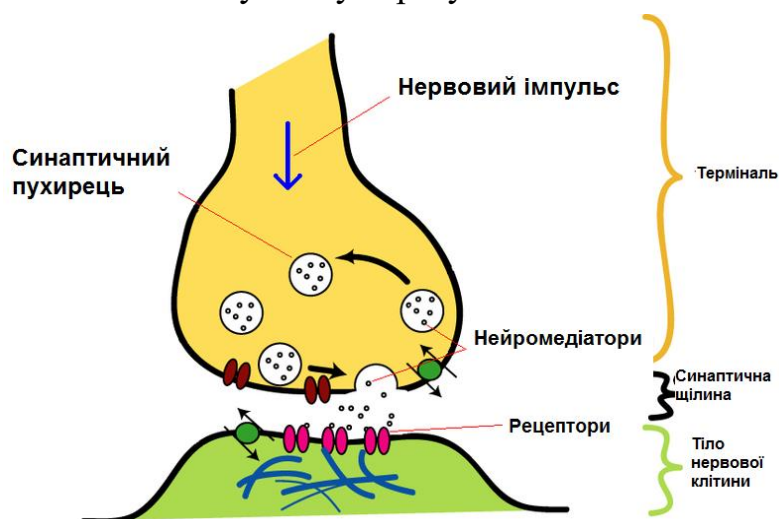
Контакти комунікаційного типу

Нексуси, щілинні з'єднання (gap-junctions) – характеризуються наявністю білкових каналів, які дозволяють проходження іонів та невеликих молекул між сусідніми клітинами, таким чином зв'язуючи їх метаболічно та електрично. Кожен канал складається з двох білкових половинок – конексинів. Конексин пронизує мембрану лише однієї клітини і виступає в міжклітинну щілину на 1-1,5 нм, де стикується із другим конексином.



Сам конексин утворений 6 білковими субодиницями циліндричної форми довжиною 7-8 нм. Його стан регулюється іонами Ca^{2+} : при зростанні концентрації Ca^{2+} провіт каналу звужується впритул до повного закриття (виключення) і навпаки. У відкритому стані ці канали пропускають більшість низькомолекулярних органічних речовин. У безхребетних ці канали складаються з білків інексинів. Нексуси, поряд з десмосомами та інтердигітаціями, знаходяться між кардіоміоцитами. Це полегшує поширення збудження у серцевому м'язі. Нексуси наявні в сперматогенному епітелії, сприяючи розвитку сперматозоїдів, та між клітинами кристалика ока, забезпечуючи живлення клітин, віддалених від кровоносних судин. Щілинні контакти потрібні також для дозрівання фолікула в яєчнику.

Синапс – місце контакту між двома нейронами або між нейроном і ефекторною клітиною, яка одержує сигнал. Служить для передачі нервового імпульсу між двома клітинами, причому в ході синаптичної передачі амплітуда і частота сигналу можуть регулюватися.



Типовий синапс – аксо-дендритний хімічний. Такий синапс складається з двох частин: пресинаптичної мембрани, утвореної булавовидним розширенням закінченням аксона передавальної клітини, і постсинаптичної мембрани, яка представлена контактуючою ділянкою цитолемі сприймаючої клітини. Між обома частинами є синаптична щілина – проміжок шириною 10-50 нм. У

синаптичному розширенні є дрібні везикули, так звані синаптичні пухирці, що містять або медіатор (речовина-посередник у передачі збудження), або фермент, що руйнує цей медіатор. На постсинаптичній, а часто і на пресинаптичній, мембрані присутні рецептори до того чи іншого медіатора.

В залежності від механізму передачі нервового імпульсу розрізняють:

- 1) Хімічні – за участю нейромедіаторів, найбільш поширені.
- 2) Електричні – клітини з'єднуються високопроникними контактами за допомогою особливих конексинів. Відстань між мембранами клітини в електричному синапсі – 3,5 нм (звичайна міжклітинна – 20 нм). Оскільки опір позаклітинної рідини малий, імпульси проходять, не затримуючись через синапс. Електричні синапси звичайно бувають збудливими.

- 3) Змішані синапси: пресинаптичний потенціал дії створює струм, який деполяризує постсинаптичну мембрану типового хімічного синапсу, де пре- і постсинаптичні мембрани не щільно прилягають одна до одної. Таким чином, в цих синапсах хімічна передача служить необхідним посилюючим механізмом.

ТЕМА 8. ПЕРЕДАЧА ІНФОРМАЦІЇ ЧЕРЕЗ КЛІТИННУ МЕМБРАНУ. ВНУТРІШНЬОКЛІТИННІ МЕДІАТОРИ

1. Загальні положення
2. Типи рецепторів
3. Передача гормонального сигналу через мембрану
4. Передача сигналу у фоторецепторних клітинах сітківки
5. Біохімічні механізми нюху і посилення первинних нюхових сигналів
6. Рецептори збудливих тканин
7. Механочутливі іонні канали

1. Загальні положення

Здатність сприймати, переробляти та передавати інформацію – важлива властивість живих організмів. Процес отримання інформації, як правило, починається із взаємодії сигналу з рецептором – мембранним білком – далі передача інформації в центр переробки інформації, який знаходиться всередині клітини. Цей процес відбувається за допомогою сигналу вторинного месенджера – у клітині відбувається біохімічна модифікація або зміна концентрації іонів спеціалізованих молекул-ефекторів. Саме за таким принципом функціонує нервова, гормональна та імунна системи тварин, а також фото біологічні процеси в організмі тварин і рослин (рис. 8.1).

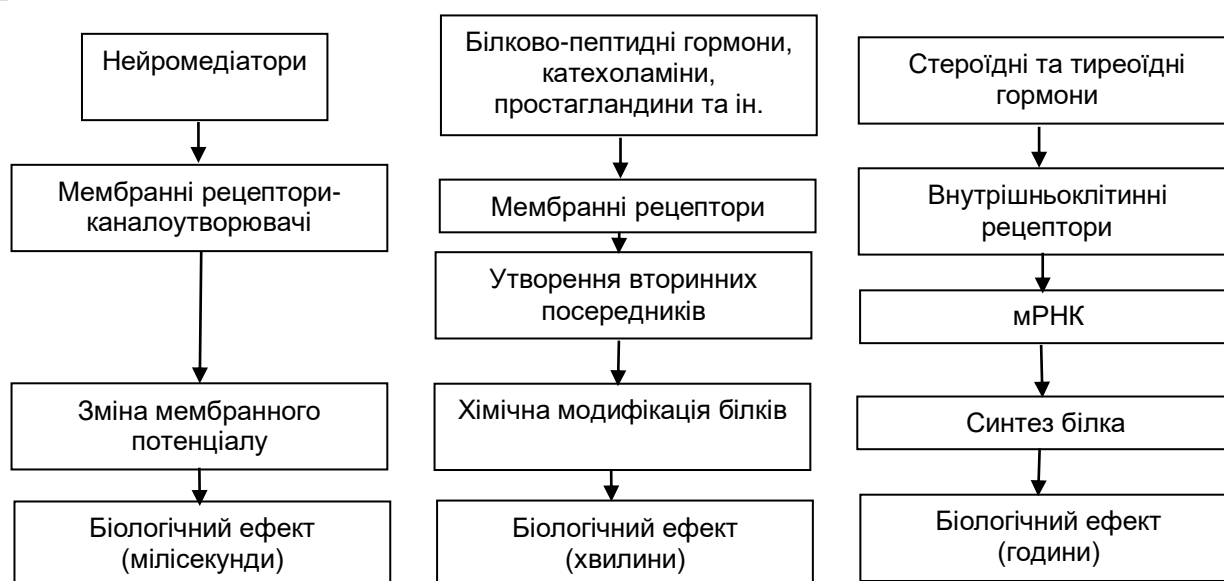


Рис. 8.1. Три основні механізми нейроендокринної регуляції клітин

Сигнальні молекули, як правило, не проникають всередину клітини, а специфічно взаємодіють з рецепторами, які локалізовані у зовнішньому шарі клітинної мембрани. Стероїдні і тиреоїдні гормони, будучи гідрофобними, здатні проникати через плазматичну мембрану всередину клітини, де взаємодіють з розчинними рецепторними білками в цитоплазмі чи нуклеоплазмі.

Різні молекули активують рецептори, діючи на них в дуже малих концентраціях – 10^{-8} - 10^{-9} М.

2. Типи рецепторів

Рецепторні білки поділяються на два класи: *глобулярні* та *мембранні*. *Перші* – вільноплаваючі в цитоплазмі білки, афінні до визначених типів молекул. Поява в цитоплазмі лігандів для цих рецепторів призводить до зміни властивостей цих рецепторів і виконанню ними своїх функцій. Наприклад, ПК С, зв'язуючись з іонами Ca^{2+} , приєднується до мембрани і атакує мембранні субстрати. Сюди належать і рецептори до стероїдних і тиреоїдних гормонів. *Мембранні рецептори* – це інтегральні білки, які зв'язують сигнальні речовини зовні і за рахунок змін своєї конформації генерують новий сигнал на внутрішній стороні мембрани – утворення вторинних месенджерів – порівняно невеликих молекул, дифузія яких до визначених субклітинних структур забезпечує стрімке поширення сигналу.

Розрізняють **три типи рецепторів**:

1) Рецептори, асоційовані з ферментативною активністю – алостеричні ферменти, які мають один трансмембранний поліпептидний ланцюг. Багато з них є тирозиновими протеїнкіназами; сюди належать рецептори інсуліну, ростових факторів і цитокінів. Зв'язування сигнальної речовини веде до димеризації рецептору, при цьому відбувається активація ферменту і фосфорилування залишків тирозину у низці білків. У першу чергу фосфорилується молекула рецептора (автофосфорилування).

2) Ансамблі рецепторів з іонними каналами – це олігомерні мембранні білки, які утворюють ліганд-активуючий іонний канал. Зв'язування ліганду веде до відкриття каналу для іонів Na^+ , K^+ чи Cl^- . За таким принципом здійснюється дія нейромедіаторів, таких, як ацетилхолін (нікотинові рецептори: Na^+ , K^+ -канали) і γ -ГАМК (ГАМК-рецептор, який є Cl^- -каналом). Класичний приклад – катіонні ацетилхолінові рецептори.

3) Рецептори, спряжені з ГТФ-зв'язаними білками (ГТФазами) – поліпептидний ланцюг цих білків включає 7 трансмембранних ланцюгів. Ці рецептори передають сигнал за допомогою ГТФ-зв'язуючих білків на білки-ефектори, які розміщені на сусідніх ділянках мембрани чи в цитоплазмі.

За механізмом дії з цитоплазматичними мішенями *рецептори першого типу* поділяються на дві групи.

Перша група включає рецептори-ферменти, з цитоплазматичної сторони яких знаходиться каталітична ділянка, яка активується при дії на рецептор зовнішнього сигналу. До них належать родина рецепторних тирозинових протеїнкіназ, які фосфорилують залишки тирозину білків-мішеней. Сюди ж належать рецептори, які мають протеїнфосфатазну активність, які дефосфорилують фосфотирозинові залишки. Функції даної групи рецепторів – регуляція клітинного поділу, диференціювання клітин, розвиток імунної відповіді.

Друга група рецепторів не має власної ферментативної активності. Проте у присутності зовнішнього сигналу вони набувають здатності зв'язувати цитоплазматичні (нерецепторні) протеїнтирозинкінази, які у вільному стані неактивні, але у комплексі з рецептором активуються і фосфорилують його. Включення фосфатних залишків в такий рецептор-якір створює умови для зв'язування з ним інших білків-мішеней, які також фосфорилуються і тим самим

передають сингал. Сюди входять рецептори, які беруть участь в розвитку імунної відповіді – рецептори антигенів і цитокінів.

Ряд білків-ефекторів здійснює свої функції внаслідок фосфорилування цАМФ-залежними протеїнкіназами. Родина протеїнкіназ поділяється на групи за механізмом активації і за типом субстрату. ПК А активується цАМФ, ПК G – цГМФ, ПК С – диацилгліцеролом, Ca^{2+} , кальмодулін-залежні кінази – іонами Ca^{2+} . За типом субстрату – відомі тирозинкінази та серин (треонін) -кінази.

G-білки і вторинні месенджери

На сьогодні в основу класифікації клітинних сигнальних систем покладені вторинні месенджери і клітинні реакції, які ними регулюються. До основних сигнальних систем відносяться: циклоаденілатна, Ca^{2+} -фофоінозитлтрифосфат-залежна, ліпооксиненазна, НАДФН-оксидазна, NO-синтазна. В останній час особлива увага приділяється MAP-кіназній системі, яка регулює клітинний цикл. У більшості з цих систем в якості проміжних ланок залучені так звані G-білки.

Рецептори, спряжені з G-білками (G-protein coupled receptors, GPCR) передають сигнал від первинних месенджерів до внутрішньоклітинних мішеней – через G-білки на ефекторний білок. Первинними сигналами для цих рецепторів слугують низькомолекулярні гормони і нейромедіатори (адреналін, ацетилхолін, серотонін, гістамін), опіоїди, гормони пептидної і білкової природи, деякі нейропептиди. Сюди належать і хімічні сигнали, які сприймаються нюховими та смаковими сенсорними клітинами, а також світло, рецептором для якого слугує пігмент фоторецепторних клітин – родопсин. Один і той же сигнал може передаватись через різні GPCR.

За рецептором в сигнальному каскаді розміщений G-білок. На сьогодні ідентифіковано близько 20 G-білків. Найбільш поширені G_s і G_i -білки, які відповідно стимулюють та інгібують аденілатциклазу (АЦ), G_q – активує фосфоліпазу С, G-білки сенсорних клітин: фоторецепторних – G_t (трансдуцин), нюхових – G_{olf} і смакових – G_g . G-білки – гетеродимери, які складаються з субодиниць трьох типів: α , β і γ . У природних умовах останні субодиниці функціонують як єдиний $\beta\gamma$ -комплекс.

Важлива характеристика G-білків – наявність на α -субодиниці центру для зв'язування гуанілових нуклеотидів: ГДФ і ГТФ. Якщо з G-білком зв'язаний ГТФ, то G-білок активний; якщо ГДФ, то неактивний. Активований рецептор каталізує обмін ГДФ, який зв'язаний з G-білком, на ГТФ. Ця подія називається ГДФ/ГТФ-обмін, який супроводжується дисоціацією тримерної молекули G-білка на дві субодиниці: α -субодиниця містить ГТФ, і $\beta\gamma$ -комплекс. Далі одна з цих субодиниць (залежно від типу сигнальної системи) взаємодіє з ефекторним білком-ферментом або катіонним каналом → клітинна відповідь. Ефекторними білками можуть бути АЦ і фосфоліпаза С (каталізує гідроліз фосфатидилінозиту до диацилгліцеролу і IP_3), фосфодіестераза, яка розщеплює цГМФ до ГМФ, деякі K^+ і Ca^{2+} -канали. При передачі сингалу – рецептор → G-білок → ефекторний білок → сигнал може багаторазово посилюватись (молекула рецептора в активному стані може активувати кілька молекул G-білка) → 10^5 - 10^6 раз посилення.

При припиненні дії зовнішнього стимулу компоненти сигнальної системи

виключаються → первинний сигнал дисоціює від GPCR і рецептори фосфорилуються під дією спеціальних протеїназ і зв'язуються із спеціальним білком. G-білки мають здатність гідролізувати ГТФ до ГДФ, що забезпечує їх інактивацію. Спеціальні механізми відновлюють вихідний рівень вторинних месенджерів (наприклад, цАМФ гідролізується до АМФ під дією фосфодіестерази).

Роль мембранних фосфоінозитидів у передачі сигналу

Зовнішній сигнал після взаємодії з рецептором через G-білок активує фосфодіестеразу (фосфоліпазу С), яка гідролізує фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфат (ІФ₂) з утворенням диацилгліцеролу та інозитолтрифосфату.

Інозитолтрифосфат викликає вивільнення кальцію з мембран ЕПР, мабуть, зв'язуючись зі спеціальним рецептором. Незважаючи на те, що процес викиду кальцію з внутрішньоклітинних депо під дією фосфоінозитидів виявлений в цілому ряді клітин, механізм, за допомогою якого він відкриває внутрішньоклітинні кальцієві канали, остаточно не з'ясований.

Диацилгліцерол (ДАГ) виступає в якості вторинного месенджера, оскільки він ініціює механізми, в результаті яких активуються два типи протеїнкіназ: протеїнкіназа С і цГМФ-залежна кіназа.

Диацилгліцерол може зазнавати подальшої деградації під дією диацилгліцеролліпази до арахідонової кислоти, яка перетворюється в різноманітні біологічно активні метаболіти, в тому числі ейкозаноїди і простагландини.

Інші типи вторинних посередників

Найбільш важливими вторинними месенджерами є цАМФ, цГМФ, Ca²⁺, ІФ₃, диацилгліцерол і монооксид азоту (NO).

ГТФ перетворюється в цГМФ за допомогою ферменту гуанілатциклази. На відміну від аденілатциклази, гуанілатциклаза не зв'язана з мембранними рецепторами. Проте утворення цГМФ частково супроводжується активацією трифосфоінозитидного циклу, оскільки деякі його компоненти, мабуть, викликають активацію гуанілатциклази. Відомо, що цГМФ активує спеціальні G-кінази, що викликають фосфорилування певних білків, фізіологічна роль яких поки не встановлена. Очевидно, цГМФ може відіграти роль вторинного месенджера в клітинах нервової тканини. Окрім того, цГМФ змінює активність інших білків, включаючи іонні канали (як у випадку реалізації світлового сигналу).

цГМФ утворюється двома гуанілатциклазами – мембранозв'язаною і цитозольною формами. Мембранний фермент активується натрійуретичним гормоном (G-білки при цьому не беруть участі), а розчинна (цитозольна) – радикалами NO, CO і OH. Останні являють собою новий клас неорганічних регуляторів.

Який же механізм збільшення внутрішньоклітинної концентрації Ca²⁺, спричиненої інозитолтрифосфатом і диацилгліцеролом, які утворюються при гідролізі фосфатидилінозит-4,5-дифосфату?

Хоча є величезна кількість чинників, що вказують на те, що під дією фосфоінозитол-трисфосфату відбувається вивільнення Ca²⁺ у фізіологічних

умовах, механізм його участі у відкриванні Ca-каналу до кінця незрозумілий.

На частку фосфатидилінозитулу припадає лише 2-8% всіх фосфоліпідів, що містяться в клітинних мембранах еукаріотів. Від 1 до 10% фосфатидилінозитулу, присутнього в мембрані, припадає на частку ФІФ₂. Цей компонент є, ймовірно, першою мішенню для фосфатидилінозитол-специфічної фосфоліпази С, яка активується в багатьох клітинах G-білками. Продукти гідролізу беруть участь як вторинні месенджери у багатьох клітинних процесах. Дослідження цієї системи в деталях ще не закінчено, але в цілому послідовність подій можна подати наступним чином.

Початковими продуктами гідролізу ФІФ₂ є диацилгліцерол і ІФ₃. ДАГ залишається зв'язаним з мембраною, а ІФ₃ вивільняється в цитоплазму. Зазвичай жирні кислоти фосфатидилінозитулу представлені стеариноювою кислотою в положенні 1 і арахідоноювою кислотою в положенні 2. ІФ₃ призводить до мобілізації Ca²⁺, акумульованого в ЕПР. Можливо, цей компонент шляхом прямого зв'язування відкриває Ca²⁺-специфічні канали в ЕПР, що призводить до виходу іонів кальцію з ретикулума в цитоплазму, де його рівень зростає в кілька разів (від 0,1 мкМ до 5-10 мкМ). Одним з ферментів, які регулюються Ca²⁺, є фосфоліпаза С, яка при низькій концентрації Ca²⁺ використовує як субстрат переважно ФІФ₂, але при більш високій концентрації Ca²⁺, принаймні в лабораторних умовах, використовує нефосфорильований фосфатидилінозитол. Найбільш важливим ферментом, що активується Ca²⁺, є протеїнкіназа С. Цей фермент локалізований переважно в цитозолі до моменту появи там ДАГ і Ca²⁺. За присутності обох агентів протеїнкіназа С набуває здатності зв'язуватися з мембраною, вибираючи для цього кластери, збагачені фосфатидилсерином. В активованому стані протеїнкіназа С ефективно фосфорилує білки-мішені по залишках серину і треоніну.

3. Передача гормонального сигналу через мембрану

Гормони – сигнальні речовини, які утворюються в клітинах ендокринних залоз. Після синтезу гормони надходять в кров і переносяться до органів-мішеней, де виконують певні регуляторні функції.

В органах-мішенях є клітини, що несуть рецептори, здатні зв'язувати гормони і тим самим сприймати гормональний сигнал. Існують два основних механізми трансдукції гормонального сигналу в клітину. У першому випадку гідрофобний гормон (стероїдний, йодтиронін, активовані вітаміни А і D) проникає через плазматичну мембрану в цитозоль, а потім і в ядро. У другому випадку гормон-рецепторний комплекс утворюється на зовнішній поверхні плазматичної мембрани. Це викликає або швидке відкриття іонного каналу і вхід іонів в клітину і в результаті нервовий імпульс, або включення систем вторинних посередників, що призводить до більш повільних змін метаболізму і функцій клітин.

Відомі чотири основні і найбільш вивчені системи передачі гормонального сигналу в цитозоль, які представлені на рис. 8.2.

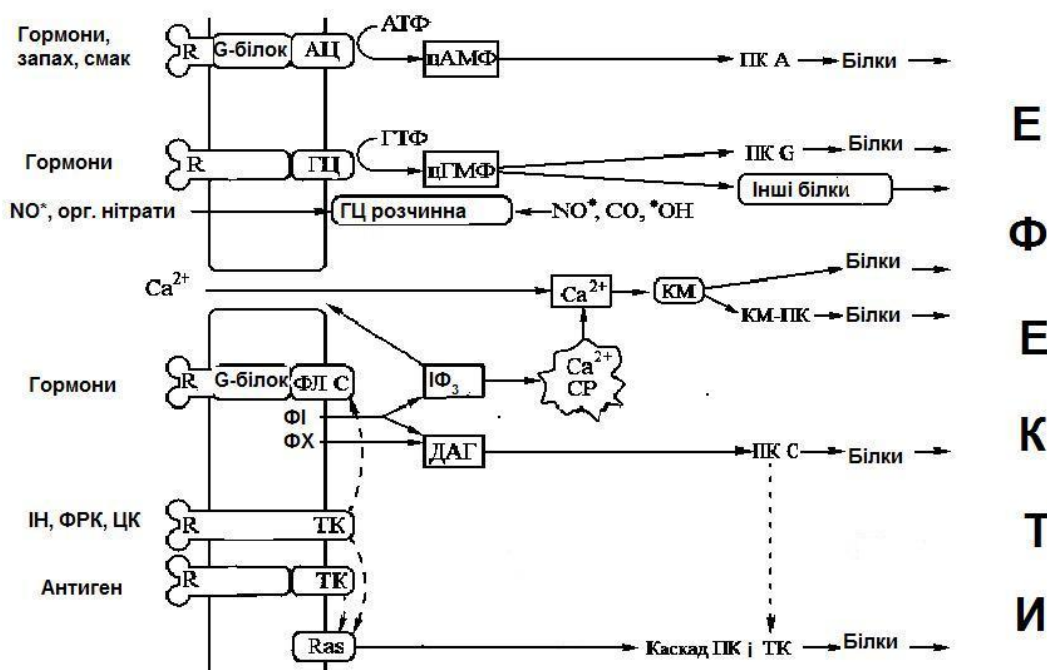


Рис. 8.2. Основні сигнал-трансдукторні системи клітини. АЦ – аденілатциклаза, ГЦ – гуанілатциклаза, КМ – кальмодулін, КМ-ПК – кальмодулінова ПК, ФЛ С – фосфоліпаза С, ФІ – фосфоінозитиди, ФГ – фосфатидилхолін, ІФ₃ – інозитолтрифосфат, ДАГ – диацилгліцерол, ІН – інсулін, ФРК – фактори росту клітин, ЦК – цитокіни, ТК – тирозинкінази

Багато гормонів (аміни, пептиди, білки, простагландини І і Е), а також сигнали дотику і нюху діють через систему цАМФ. Утворення гормон-рецепторного комплексу через G-білки активує або інгібує аденілатциклазу, яка з АТФ утворює цАМФ. Цей вторинний посередник викликає дисоціацію залежної від нього ПК А на регуляторну та каталітичну субодиниці. У результаті остання активується і фосфорилує численні білки-мішені. Це збільшує, наприклад, розпад глікогену і ліпідів, синтез катехоламінів і глюкокортикоїдів, скорочення серцевого м'язу і розслаблення гладеньких м'язів. цАМФ часто розглядають як сигнал голоду і стресу.

Багато гормонів (аміни, пептиди, білки, простагландини F і тромбосани) через G-білок включають систему фосфоліпази С, які з фосфатидилінозитидів утворюють два вторинних посередника: інозитолтрифосфат і диацилгліцерол, а з фосфатидилхоліну – тільки один (останній). Інозитолтрифосфат збільшує в цитозолі концентрацію іонізованого кальцію.

Комплекс Ca^{2+} з його рецептором кальмодуліном активує багато цитозольних ферментів або прямо, або через відповідну протеїнкіназу.

Тирозинкінази (ТК) – це ПК, які фосфорилують в білках залишки тирозину. Ця система включається за дії факторів росту клітин (ФРК), цитокінів та інсуліну, опосередковуючи більшість його цитозольних ефектів. В ядро сигнал зазвичай передається шляхом транслокації в нього цитозольної протеїнкінази або активованого транскрипційного фактора (фосфорильованого нею або звільненого з комплексу з іншим білком). У мітохондрії сигнал передається інакше – шляхом транслокації з цитозолу вторинних посередників: Ca^{2+} або цАМФ.

У кожній клітині функціонує спеціальна біохімічна надбудова, яка регулює

чутливість клітин до сигналу. Проілюструємо її на прикладі рецептора, сполученого з G-білками. Зазвичай рівень сигналів, що діють через систему трансмембранної сигналізації підвищується на кілька хвилин. Цього часу достатньо, щоб відбулося утворення достатньої кількості вторинних посередників (цАМФ, Ca^{2+} , диацилгліцерол), які викликають активацію відповідних протеїнкіназ і наступне за цим фосфорилування білків-мішеней. Якщо ж рівень сигналу зберігається підвищеним протягом десятків хвилин або навіть годин (через гіперфункції ендокринної залози або фармакологічного втручання), то відбувається десенсибілізація відповідного рецептора. Мембранні протеїнкінази, присутні в плазматичній мембрані практично всіх клітин, фосфорилують рецептор, десенсибілізуючи його до присутності ліганду. Такі кінази можуть фосфорилувати тільки гормон-рецепторний комплекс, тому, чим довше гормон зв'язаний з рецептором, тим більша ймовірність того, що рецептор буде впізнаний і помічений кіназою. Якщо таке фосфорилування не в змозі погасити гормональний сигнал, то через 15-30 хв відбувається фосфорилування рецептора другою протеїнкіназою, яка активується відповідним вторинним посередником. Вторинне фосфорилування рецепторів порушує їх зв'язок з G-білками, внаслідок чого вплив гормонів послаблюється. Якщо високий рівень гормону зберігається протягом декількох годин, і перераховані вище механізми десенсибілізації не в змозі погасити регуляторний сигнал, відбувається ендоцитоз гормон-рецепторних комплексів і всередині клітини з'являються рецепторосоми, які ізолюють рецепторні молекули від сигнальних шляхів. Вони можуть знову вбудуватися в плазматичну мембрану, якщо в подальшому рівень гормону знизиться. Якщо цього не відбувається, вони зливаються з лізосомами, після чого рецептори руйнуються. Очевидно, що відновлення чутливості клітини до цього гормону вимагатиме нового синтезу рецепторів.

4. Передача сигналів у фоторецепторних клітинах сітківки

Фоторецепторні молекули сприймають як сигнал квант світла. Проте принципи передачі сигналу через мембрани у фоторецепторів і рецепторів гормонів дуже подібні. Зоровий родопсин локалізований у більшості хребетних у спеціалізованих фоторецепторних клітинах двох типів – паличках та колбочках, які вистилають внутрішню сторону сітківки ока. Палички функціонують в умовах слабкого освітлення. Вони дуже чутливі до світлових сигналів і при сильному освітленні десенсибілізуються. При яскравому світлі зоровий процес забезпечується колбочками. Колбочки передають кольорову гаму зображення.

У колбочках містяться пігменти, що поглинають в різних областях спектру. У людини розрізняють три види колбочок, які поглинають світло в короткохвильовій, середньо- і довгохвильовій областях видимого спектру. При слабкому освітленні колбочки не приймають сигналу і очі не сприймають колір об'єктів.

Рецепторна мембрана паличок складається з замкнутих дисків, які не стикаються з цитоплазматичною мембраною, в той час, як в колбочках вона утворює систему складок. Таким чином, для передачі сигналу в паличках від диска до плазматичної мембрани необхідний гідрофільний посередник. Як палички, так і

колбочки, умовно ділять на два сегменти: зовнішній і внутрішній. Зовнішній сегмент містить фоторецепторні мембрани, а внутрішній спеціалізується на генерації енергії і містить апарат, що синтезує молекули вторинних посередників, які беруть участь у передачі сигналу. З внутрішнього сегмента формується синаптичне закінчення, яке здійснює передачу сигналу до нервових волокон.

Зоровий родопсин (як і бактеріородопсин), містить в активному центрі 11-цис-ретиналь. Білкова частина родопсину без ретиналя називається опсин і функціонує як фермент. До молекули білка приєднані два олігосахаридні ланцюги. Як і у бактеріородопсину, молекула зорового родопсину перетинає мембрану 7 разів. Ретиналь розташований ближче до С-кінця білка. Пігменти з колбочок сітківки ока людини, умовно названі за областю поглинаючого ними світла – «червоний», «блакитний» і «зелений».

Родопсин володіє характерним спектром поглинання в областях 280 і 500 нм.

В основі функціонування як родопсину, так і бактеріородопсину, лежить світлозалежна ізомеризація ретиналю. При поглинанні кванта світла 11-цис-ретиналь родопсину переходить повністю в транс-форму. Ця ізомеризація запускає каскад реакцій, які супроводжуються зміною спектру поглинання молекули родопсину.

Таким чином, в результаті поглинання фотона родопсином відбувається утворення опсину і вільного ретиналю. Інший результат цього процесу – гіперполяризація мембрани паличок. У нормі на мембрані паличок реєструється так званий «темновий струм», який забезпечується входом у клітину натрію і виходом калію за рахунок роботи Na^+, K^+ -АТФази. Трансмембранний потенціал при цьому становить 20 мВ. Спалах світла викликає гіперполяризацію мембрани до 70 мВ. При цьому її величина пропорційна інтенсивності освітлення. Гіперполяризація мембрани палички є необхідною і достатньою умовою передачі світлового сигналу через синапси до зорових нейронів.

Активована світлом молекула родопсину, метародопсин-II, утворює специфічний комплекс з G-білком – трансдуцином, який знаходиться в комплексі з ГДФ, який зв'язується з α -одиницею трансдуцину. Взаємодія родопсину з трансдуцином каталізує обмін на α -субодиниці ГДФ на ГТФ. Після цього комплекс трансдуцина з родопсином дисоціює, і практично одночасно відбувається дисоціація трансдуцина на α -субодиницю, зв'язану з ГТФ, і на комплекс, що складається з β -і γ -субодиниць. α -субодиниця трансдуцину в ГТФ-зв'язаній формі активує цГМФ-залежну фосфодіестеразу. Цей фермент має аналогічну будову (складається з трьох субодиниць, α , β і γ). Інгібування здійснюється за рахунок зв'язування зв'язаної з ГТФ α -субодиниці з γ -субодиницею фосфодіестерази. При цьому γ -субодиниця відділяється, а вільні α -і β -субодиниці здійснюють гідроліз ГТФ. Цей процес протікає з дуже великою швидкістю (до 4000 молекул в секунду). Активуючий вплив трансдуцину на фосфодіестеразу припиняється після гідролізу ГТФ. Надалі комплекс β - і γ - субодиниць трансдуцину асоціює з ГДФ-зв'язаною формою α -субодиниці, і молекула трансдуцину знову набуває здатності взаємодіяти з фотоактивованим родопсином і весь цикл повторюється (рис. 8.3).

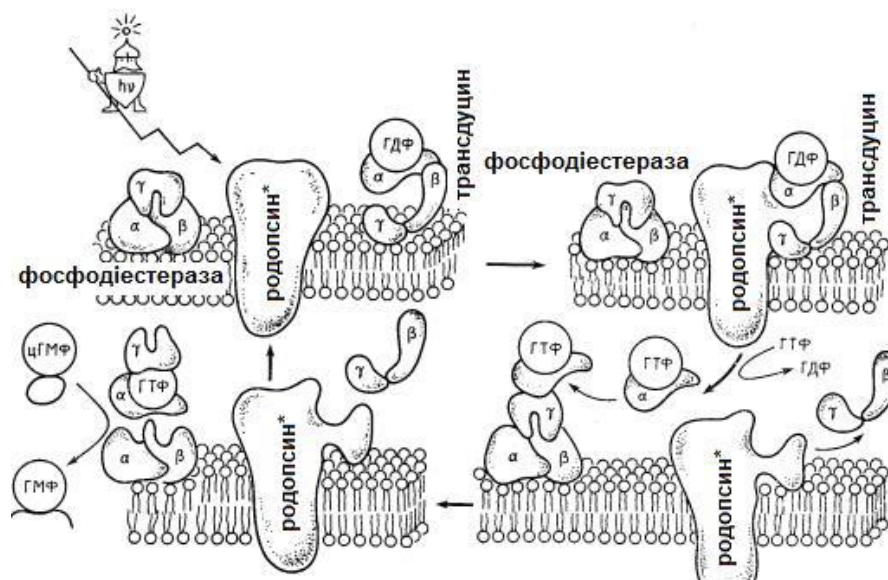


Рис 8.3. Механізм функціонування зорового родопсину

Трансдуцин відіграє ключову роль не тільки в активації, а й в інактивації сигналу. Включення і вимкнення сигналу здійснюються через α -субодиницю. При цьому ключовою стадією управління є гідроліз ГТФ до ГДФ. Реакції, що ведуть до активації процесу, енергетично вигідні. Деякі реакції інактивації вимагають додаткової енергії. Родопсин інактивується за допомогою спеціальної протеїнкінази. Цей фермент приєднує фосфатні групи до декількох амінокислот на одному кінці поліпептидного ланцюга опсину. Потім родопсин утворює комплекс з білком арестином, який блокує зв'язування трансдуцина і повертає систему в початковий «темновий» стан.

5. Біохімічні механізми нюху і посилення первинних нюхових сигналів

На початку 50-х років ХХ ст. Ерл Сезерленд на прикладі адреналіну, що стимулює утворення глюкози з глікогену, розшифрував принципи дії адреналінового рецептора, який виявився загальним для широкого кола рецепторів. Вже в кінці ХХ ст. було виявлено, що сприйняття запахів здійснюється аналогічним чином.

Первинні рецепторні білки – це дуже складні молекули, зв'язування яких зі своїми субстратами викликає в них відчутні структурні зміни, за якими починається каскад ферментативних реакцій. Для рецептора нюху (одорантного), так само, як і для зорового рецептора, цей процес завершується нервовим імпульсом, який сприймається нервовими клітинами відповідних відділів мозку.

Згідно з останніми даними, будова одорантного рецептора абсолютно аналогічна. Рецепторний білок включає таку послідовність амінокислот, яка містить сім гідрофобних ділянок. Ці поліпептидні ділянки, згорнуті в α -спіраль, утворюють мікротрубочки. Таким чином, рецепторний інтегральний білок являє собою своєрідну пачку з семи мікротрубочок, що перетинають біомембрани. Така структура інтегральних білків характерна для рецепторів опсину в сітківці ока, рецепторів серотоніну, адреналіну, гістаміну і одорантів.

Із зовнішнього боку клітинної мембрани білок-рецептор являє собою розетку, побудовану однотипно для різних рецепторних систем. На рис. 8.4 представлена схема взаємодії між молекулою ліра (синтетичний одорант) і нюховим рецептором щура, представленим п'ятьма гідрофобними доменами.

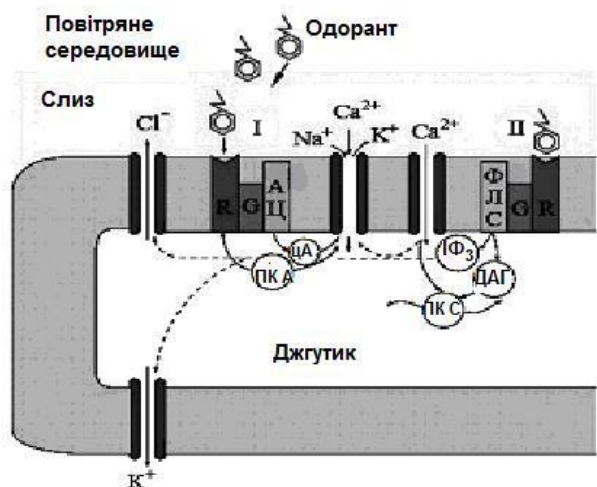


Рис. 8.4. Схематична діаграма будови нюхового джгутика і два хімічні механізми посилення сигналу запаху всередині нюхового волоска: I – мембранний інтегральний комплекс – рецептор (R) + ГТФ-зв'язуючий білок (G) + аденілатциклаза (АЦ); II – мембранний інтегральний комплекс - рецептор (R) + ГТФ-зв'язуючий білок + фосфоліпаза С (ФЛС).

У результаті фосфорилування мембранних білків відкриваються канали провідності катіонів, і, як наслідок, миттєво змінюється мембранний потенціал клітини, в результаті чого генерується потенціал дії. Останній передається по аксону в нюхову цибулину, де і відбувається оцінка та відділення біологічно значущих сигналів від нюхового «шуму», а за цим відібрані сигнали направляються в мозок, де і викликають поведінкову відповідь.

6. Рецептори збудливих тканин

Передача сигналу через мембрану не завжди пов'язана з включенням G-білків. Суттєва кількість рецепторів має властивості самостійного каналу. Ці рецептори об'єднуються в клас рецепторів швидкої відповіді і здійснюють відповідь на сигнал протягом декількох мілісекунд. На збудливі тканини, до яких відносяться нервові, м'язові і секреторні клітини, інформація передається через спеціальне утворення – *синапс* (див. тему 8). Із закінчення нервової клітини виділяється нейромедіатор, що взаємодіє з рецепторами постсинаптичної мембрани іншої клітини. Найбільш типовим прикладом подібних рецепторів є ацетилхоліновий рецептор (холінорецептор). Холінорецептори поділяються на два типи: нікотинові і мускаринові. Як для перших, так і для других агоністом є ацетилхолін, проте перший тип рецепторів активується ще й нікотинном, а другий – мускарином, речовиною, яка міститься в мухоморі (*Amanita muscaria*).

Нікотинові рецептори розташовані в місці контакту аксонів зі скелетними м'язами, а мускаринові зосереджені в мозку, секреторних клітинах, гладеньких і серцевих м'язах. Успіх в дослідженні рецепторів багато в чому завдячує застосуванню природних токсинів, в першу чергу, отрут бджіл, павуків, змій і деяких земноводних. Ці отрути містять фосфоліпази, які руйнують мембранні фосфоліпіди, що також призводить до порушення передачі сигналу в клітині, але найбільш прямий шлях паралізувати жертву – інгібувати її швидкі рецептори.

α -бунгаротоксин з отрути змій родини еланідів (кобри, мамби тощо), здатний

селективно і необоротно зв'язуватися з нікотиновими холінерецепторами. Це дозволило ідентифікувати рецепторний білок і очистити його. Холінерецептор (рис. 8.5) складається з чотирьох субодиниць – α , β , γ і δ , їх молярне співвідношення в білку 2:1:1:1. Всі субодиниці рецептора глікозилзовані.

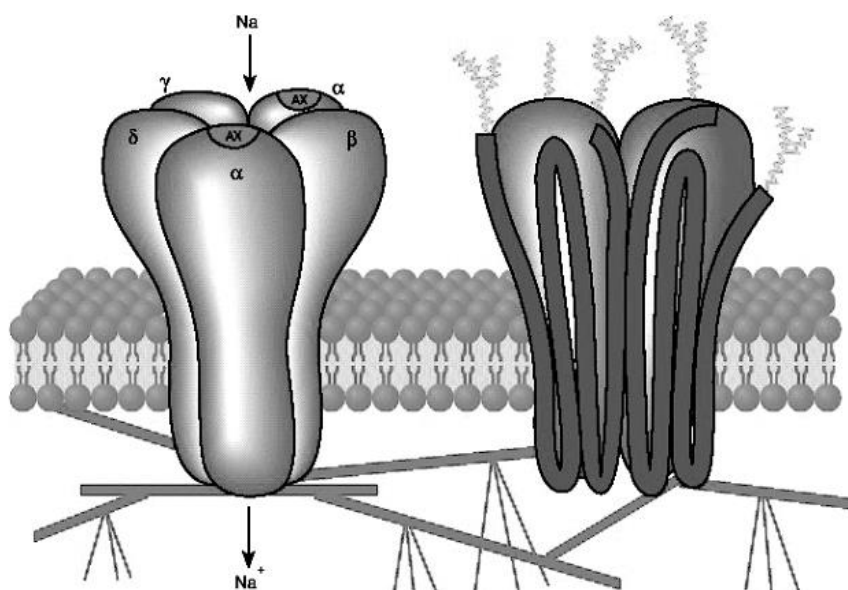


Рис 8.5. Структура нікотинового холінергічного рецептора, який формує іонний канал

П'ять субодиниць холінерецептора (α - β - α - γ - δ) утворюють канал, проникний для іонів натрію, калію і кальцію. Холінерецептор локалізований на постсинаптичній мембрані клітини і при зв'язуванні

ацетилхоліну змінює свою конформацію таким чином, що через вустя, сформоване каналними субодиницями, всередину клітини спрямовуються іони Na^+ . Відбувається деполяризація мембрани, що призводить до виходу іонів K^+ з клітини. Це повертає потенціал мембрани до вихідної величини. У процесі цієї перезарядки мембрани, здійснюваної потенціалом дії, через цей же канал всередину клітини можуть входити іони Ca^{2+} . У той же час це швидкодіюча регуляторна система – потенціал дії, що викликається ацетилхоліном, виникає і згасає в тканинах мозку за 1-2 мсек, завдяки чому синапс може проводити від аксона на іннервуючу клітину до 500 імп/с. У нервово-м'язовому синапсі потенціал дії триває трохи довше (80-120 мсек).

Такий швидкий розвиток і гасіння сигналу можливі завдяки швидкості зв'язування ацетилхоліну з рецептором, а також високим швидкостям його дисоціації від рецептора і руйнування ацетилхолінестеразою. Безперерйне функціонування холінергічного синапсу вимагає великого запасу ацетилхоліну, який синтезується про запас і накопичується в везикулах пресинаптичної мембрани. Крім того, в клітинах повинні існувати досить високі градієнти іонів Na^+ і K^+ по обидві сторони плазматичної мембрани.

Швидкодія ацетилхоліну (як і інших нейромедіаторів) визначається також особливостями того морфологічного утворення, яке існує між аксонами і іннервуючою клітиною і яке називається *синапсом*. Завдяки тому, що відстань між пре-і постсинаптичними мембранами становить всього 300-500 Å, а холінерецептори сконцентровані у вигляді кластерів в області ділянок секреції ацетилхоліну, в момент розриву секреторної бульбашки нейромедіатор швидко виявляється в місці його рецепції. Крім того при подразненні аксона виходить викид такої великої кількості ацетилхоліну, що молекули цього нейромедіатора миттєво насичують всі рецептори і викликають масований вхід Na^+ в клітину (розвиток потенціалу дії).

Холінергічні рецептори нікотинового типу мають доволі низьку спорідненість

до ацетилхоліну – напівмаксимальне насичення рецепторів спостерігається у присутності 10^{-4} М ацетилхоліну, тому, як тільки ацетилхолінестераза (локалізована в областях, що є сусідами з молекулами холінорецептора) починає гідролізувати ацетилхолін і знижувати його рівень у синапсі, відбуваються дисоціація цього нейромедіатора від рецептора і повернення каналу в закритий стан.

Зовсім іншу, відмінну від холінергічного рецептора нікотинового типу, структуру і інший механізм функціонування мають мускаринові холінергічні рецептори (МХР), які локалізовані переважно поза синапсом. На цей рецептор не діє нікотин, але він легко активується мускарином, а також, зрозуміло, ацетилхоліном, до якого має спорідненість порядку 10^{-6} М.

Існують, щонайменше, чотири типи мускаринових рецепторів, причому всі вони близькі за структурою (їх поліпептидний ланцюг сім разів пронизує мембрану) і пов'язані з G-білками, але передають сигнал різними системами внутрішньоклітинної сигналізації. Так, наприклад, МХР можуть стимулювати фосфоліпазу С, яка гідролізує фосфоінозитиди, та інгібувати аденілатциклазу, а також активувати K^{+} -канал. До цього класу рецепторів належать і адренергічні рецептори, а також опіатні рецептори кори півкуль мозку.

Відповідь цих рецепторів розтягнута в часі. Ефекти мускаринових холінорецепторів розвиваються через 1-2 хв після взаємодії з рецептором і гасяться за десятки хв.

7. Механочутливі іонні канали

Канальні структури, які змінюють свою активність в залежності від натягу мембрани, називаються механочутливими, хоча окрім них описані канали, які збільшують активність і при зворотному зміні натягу. Вперше Ca^{2+} -провідні механочутливі канали були показані на ендотеліальних клітинах тварин, де вони виконують роль сенсора кров'яного тиску. Канали з аналогічними властивостями були виявлені в бактеріях, грибах і вищих рослинах.

Функціонування механочутливих каналів відбувається в тісній взаємодії з цитоскелетом. Зв'язок здійснюється набором білків, відомих як анкерини.

Виділяють два типи каналів, чутливих до натягу мембрани: SA-канали (stretch-activated), які активуються при розтягуванні мембрани і SI-канали (stretch-inactivated), які при розтягненні мембрани інактивуються. В залежності від об'єкта і типу клітини зустрічаються механочутливі канали, селективні до K^{+} , Cl^{-} , а також Ca^{2+} та інших двовалентних катіонів, проникні для одно-і двовалентних катіонів, і неселективні (або слабоселективні) для аніонів та катіонів. Найбільш часто в якості інгібітору механочутливих каналів використовують гадолій (Gd³⁺), який зворотно блокує роботу каналів за низьких концентрацій (10 мкМ).

На відміну від рецептор- і потенціал-залежних іонних каналів, механочутливі канали мають набагато меншу щільність розподілу в мембранах (вона становить в середньому $1/\mu\text{m}^2$). Найбільш важливе значення механочутливі іонні канали мають в ростових рухах різного типу і в регуляції роботи апарату устя.

У ссавців (у тому числі, у людини) функціонування механорецепторів вистилки слизової шлунка забезпечують відчуття ситості.

ТЕМА 9. БІОГЕНЕЗ МЕМБРАН

1. Загальні положення
2. Транспорт білків. Екзоцитозний шлях
3. Сигнальні послідовності білків. Сигнальні пептидази
4. Транспорт ліпідів

1. Загальні положення

Біогенез мембрани починається з процесів синтезу складових її компонентів – білків, ліпідів та вуглеводів. Потім ці компоненти повинні бути доставлені до місця призначення і там утворити потрібні структури.

Дві головні проблеми стосуються збирання мембранних білків.

1. Всі закодовані в ядрі білки синтезуються загальним пулом рибосом. У зв'язку з цим виникає питання: як окремі мембранні білки доставляються до місця призначення? Чим відрізняються білки плазматичної мембрани від білків внутрішньої мітохондріальної мембрани або від білків мембран ЕПР? Цю складну проблему сортування можна вирішити тільки за наявності певних сигнальних послідовностей у кожному поліпептиді, а також відповідного апарату впізнавання.

2. Який істинний механізм вбудовування мембранних білків у мембрану і як при цьому досягається правильна їх орієнтація щодо мембранного бішару? Чи потребують механізми вбудовування й орієнтації також наявності певних сигнальних елементів і систем впізнавання і якщо так, то які вони? Які властивості забезпечують при вбудовуванні мембранних білків формування правильної третинної, а також четвертинної структури в разі мультисубодиничних ансамблів?

У пошуку відповідей досягнуті великі успіхи. Виявлена частина поліпептидної послідовності, яка служить ділянкою впізнавання, або «сигналом», що направляє окремий поліпептид до мембрани, в яку він вбудовується. Ці сигнальні ділянки часто розташовані на N-кінці новосинтезованих поліпептидів і відщеплюються специфічними сигнальними пептидазам після вбудовування його в потрібну мембрану.

Доставка кожного білка до місця призначення забезпечується ієрархією сигналів, закодованих у кожному поліпептиді. Наприклад, більшість білків, призначених для ЕПР або мітохондрій, синтезується у вигляді попередників більшої молекулярної маси; на N-кінці у них є додаткова послідовність, яка відщеплюється особливими протеолітичними ферментами, які є в цих органелах. Такі первинні сигнали дуже різноманітні і необхідні для того, щоб поліпептиди були упізнані при транслокації специфічними рецепторами в цих органелах. Зв'язування з мітохондріями відбувається одразу після завершення трансляції. Однак для більшості білків, які направляються в ЕПР у клітинах ссавців, спостерігається інша картина. Як видно з рис.9.1, після зв'язування білків з відповідною органелою повинне відбутися подальше сортування. Для цього потрібна додаткова інформація, яка також повинна бути закодована в кожній поліпептидній послідовності і може розглядатися як вторинні сигнали. У кількох випадках їх вдалося ідентифікувати як сигнальні послідовності, фізично відокремлені від первинних, хоча, можливо, так

буває не завжди.

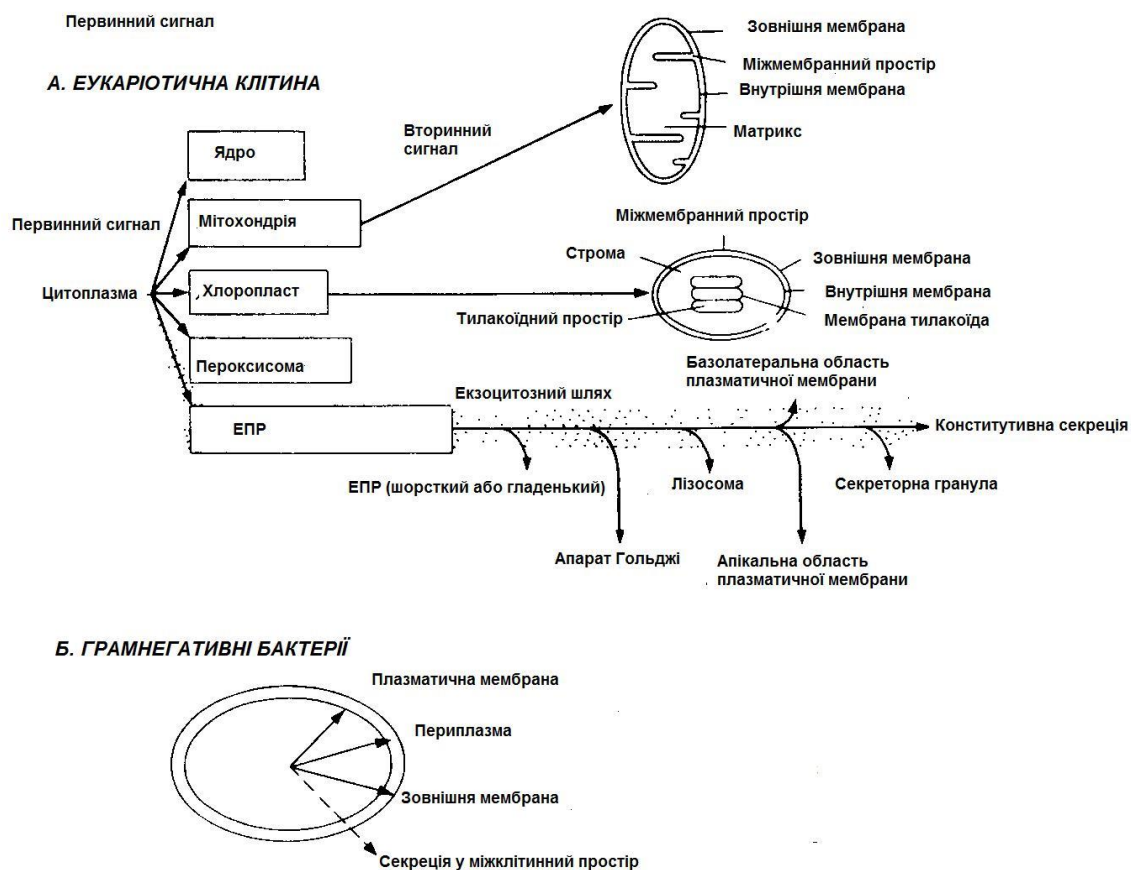


Рис. 9.1. Сортування білків у клітинах еукаріотів та грам-негативних бактерій. Первинні сигнали сортування направляють поліпептид до потрібної органели і необхідні для транслокації. Вторинні сигнали визначають їх кінцеву локалізацію. Наведений екзоцитозний шлях.

На рис. 9.2 схематично показані три загальні механізми проникнення пептидного попередника в мембрану. Механізми А і Б є варіантами схеми лінійного витіснення, згідно з яким сигнальна послідовність направляє поліпептид до переносного пристрою, який включає в себе заповнений водою канал. Сигнальна послідовність може проходити прямо крізь канал (*механізм А*) або залишатися зв'язаною з мембраною, утворюючи петлю (*механізм Б*). За відсутності будь-якого сигналу зупинки процесу перенесення поліпептид буде транспортуватися через мембрану повністю. Однак, якщо всередині поліпептиду є другий сигнальний пептид, названий стоп-сигналом перенесення, то процес зупиняється і стоп-сигнал переносу стає трансмембранним сегментом зрілого мембранного білка. Фіксуєчи білок в мембрані, стоп-сигнал перенесення діє як сигнал сортування. Якщо в білку є й інші сигнали початку і кінця перенесення, то будуть утворюватися такі трансмембранні сегменти. *Схема В* ілюструє можливу роль самочинного включення в мембрану гідрофобних елементів поліпептидного попередника. Цей механізм може реалізовуватися тільки тоді, коли включення в мембрану відбувається після трансляції поліпептиду. Прикладом, що підтверджує існування цього механізму, є пробілок оболонки фага М13. Модель самовільного включення може

використовуватися для пояснення механізму вбудовування поперек мембрани амфіфільних α -спіралей або β -структур.

А. Лінійне проштовхування через канал

Б. Утворення петлі

В. Самовільне вбудовування одинарної спіралі, спіральної шпильки або частково згорнутого "домену вбудовування"

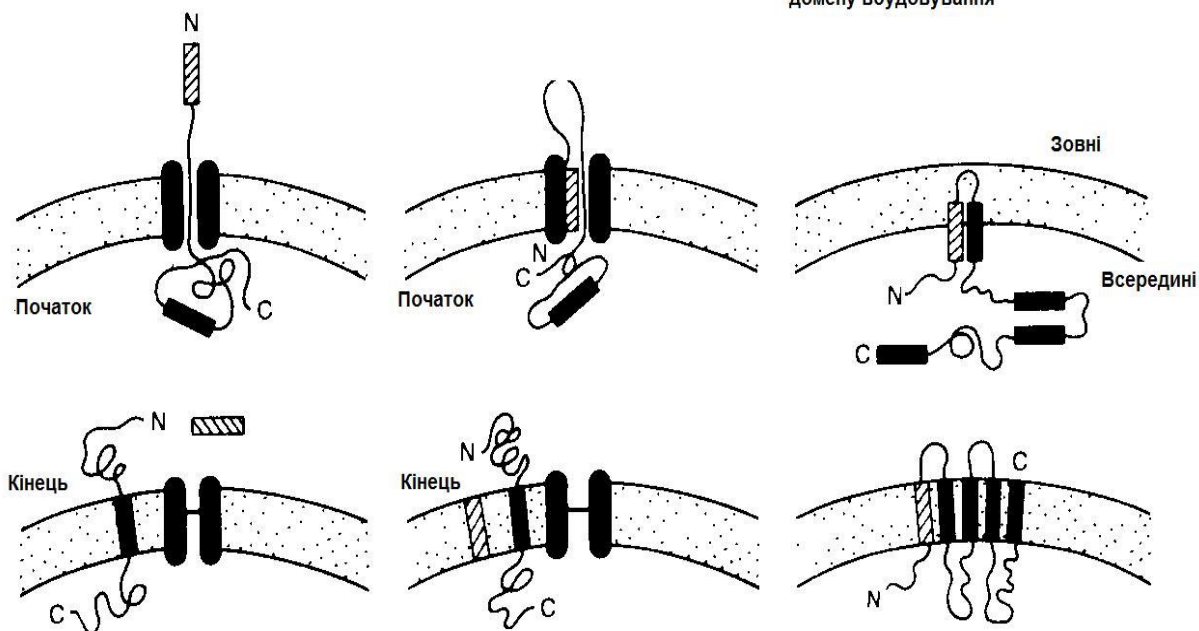


Рис. 9.2. Моделі вбудовування білка

Експериментальні дані, які однозначно свідчили б про існування каналів, що беруть участь в складанні мембранних білків або в перенесенні білків через мембрану, відсутні. Відомо, втім, що як на поверхні мітохондрій, так і в ЕПР, є мембранні рецептори, які специфічно дізнаються про переносувані білки, і, можливо, саме вони є частиною складного апарату, куди входить і канал, по якому переміщається білок.

Для того, щоб перенесення білків відбувалось зі швидкістю, близькою до швидкості синтезу поліпептиду (1-10 залишків в 1 с), енергетичний бар'єр не повинен перевищувати приблизно 18 ккал/моль. За отриманими даними, дві сусідні спіралі можуть спонтанно вбудовуватися в бішар з утворенням спіральної шпильки, і відповідний виграш вільної енергії ~ 60 ккал/моль може стати рушійною силою для часткового втягування полярних і навіть заряджених груп у ліпідний бішар. Однак, для перенесення іонізованих і полярних груп з водного оточення в ліпідний бішар необхідна більша кількість вільної енергії, і навряд чи модель спонтанного вбудовування буде застосовна завжди.

Проте було показано, що деякі невеликі мембранні білки включаються в ліпідний бішар спонтанно. До них відносяться цитохром b_5 і пробілок оболонки бактеріофага M13.

2. Транспорт білків. Екзоцитозний шлях

Транспорт білків здійснюється кількома шляхами, основний з них екзоцитозний. *Екзоцитозним* в еукаріотичних клітинах називається шлях, за допомогою якого здійснюється транспорт білків, які секретуються клітинами або

включаються в зовнішню мембрану. Білки синтезуються на рисосомах шорсткого ЕПР і виводяться з клітини за допомогою того ж механізму, який використовується для включення мембранних білків в ЕПР.

Якщо водорозчинний білок не має вторинних сигналів сортування, то він транспортується до клітинної поверхні і секретується за допомогою «конститутивного» шляху. Білки, що транспортуються цим шляхом, переміщуються з ЕПР послідовно через різні компартменти комплексу Гольджі і врешті-решт потрапляють на поверхню клітини. Вони можуть ставати компонентами цитоплазматичної мембрани або, при наявності вторинних сигналів сортування, залишатися в ЕПР (цитохром P₄₅₀) або в комплексі Гольджі (різні глікозилтрансферази).

У комплексі Гольджі в ході подальшого сортування відокремлюються білки, які секретуються конститутивним шляхом (укорочений шлях), від тих, які направляються в лізосоми або концентруються в секреторних гранулах, за допомогою яких вони потім секретуються при відповідній стимуляції клітини (тобто регульований секреторний шлях). Крім того виявлено, що в зовнішній мембрані ядерної оболонки також можуть синтезуватися мембранні глікопротеїни, які потім транспортуються за допомогою екзоцитозу. Білки при транспортуванні по екзоцитозному шляху піддаються посттрансляційним модифікаціям, зокрема глікозилюванню.

Дослідження виявили кілька особливостей системи екзоцитозного транспорту.

1. Транспорт між різними компартментами органел здійснюється за допомогою везикул, які відокремлюються від «донорної» мембрани і потім зливаються з «акцепторною». Показано, що везикули, які беруть участь в транспорті між компартментами комплексу Гольджі, є «облямованими», але відповідний білок відрізняється від клатрину, що обмережує ендоцитозні везикули. Є вагомі дані на користь того, що клатрин не є істотним компонентом екзоцитозного шляху.

2. Для внутрішньоклітинного транспорту необхідний АТФ, а також білкові компоненти цитозолу. Показано, що для транспорту між цистернами Гольджі, що здійснюється за участю везикул, необхідний ацил-КоА. Яку саме функцію виконують зазначені сполуки у відбруньковуванні і злитті везикул, невідомо.

3. Роль олігосахариду як сигналу сортування новосинтезованих глікопротеїнів, мабуть, непостійна.

3. Сигнальні послідовності білків. Сигнальні пептидази

У більшості білків, вбудованих в мембрану ЕПР або перетинаючих її, на N-кінці є «короткоживучий» сигнальний пептид (від 15 до 30 амінокислотних залишків). Ця сигнальна послідовність безпосередньо взаємодіє принаймні з двома рецепторами, один з яких розчинний (сигнал-розпізнаюча частина), а інший перебуває в мембрані. Можна було б очікувати, що амінокислотна послідовність цього сигнального пептиду буде дуже консервативною і приблизно однаковою у всіх перенесених білків, але очікування ці не виправдалися. Ці сигнальні ділянки не відрізняються сталістю ні щодо довжини, ні щодо амінокислотної послідовності, а численні досліди по мутагенезу показали, що вони можуть зазнавати значних

структурних змін. Дані про те, що сигнальні пептиди містять всю інформацію, необхідну для транспорту білків через мембрани ЕПР або всередину їх, були отримані в дослідях з химерними поліпептидами. Приєднання N-кінцевої сигнальної послідовності до звичайних цитоплазматичних білків, наприклад до глобіну, призводило до того, що вони транспортувалися в порожнину ЕПР.

З точки зору «порівняльної анатомії» N-кінцевих сигнальних послідовностей можна виділити три різних у структурному відношенні ділянки: 1) позитивно заряджену N-кінцеву ділянку (n-ділянка), 2) центральне гідрофобне ядро з 7-15 залишків (h-ділянка); 3) C-кінцеву ділянку (c-ділянка), яка є полярною і містить сайт, впізнаваний сигнальною пептидазою, яка знаходиться на стороні ЕПР, зверненої в порожнину.

Відомо, що відносно невеликі відмінності між сигнальними послідовностями породжують величезні відмінності в поведінці білка. Наприклад, якщо сигнальна послідовність не розпізнається сигнальною пептидазою, то білок частіше залишається зв'язаним з мембраною, ніж секретується, хоча є й винятки з цього правила. Водночас, природа стоп-сигналу переносу точно не відома. Необхідно з'ясувати два питання: 1) чи беруть участь в зупинці процесу специфічні білки апарату перенесення, 2) чи визначається зупинка перенесення гідрофобністю стоп-сигналу або якимись більш тонкими факторами? Було показано, що ділянки стоп-сигналів послідовності, відповідальні за блокування переносу через ЕПР, можуть ніяк не впливати на транспорт через мембрану хлоропласта. Це означає, що згадані два процеси можуть істотно різнитися.

Сигнальні пептидази

Для видалення тимчасових N-кінцевих сигнальних пептидів необхідні специфічні білки. Найбільш повно охарактеризовані сигнальні протеази з *E. coli*. Більшість експортованих білків *E. coli* містять сигнальний пептид, який відщеплюється на периплазматичній поверхні внутрішньої мембрани за допомогою лідер-пептидази. Для переносу білків через внутрішню мембрану ця пептидаза не потрібна, але вона необхідна для вивільнення експортованого білка з цитоплазматичної мембрани. *In vitro* очищений фермент міг функціонувати, будучи включеним у ліпосоми. Специфічність розщеплення вельми висока, але не визначається виключно амінокислотою послідовністю поблизу сайту розщеплення.

Сигнальна пептидаза, яка функціонує в ЕПР, має ту ж специфічність, що і відповідний фермент *E. coli*, що не дивно, якщо врахувати подібність сигнальних послідовностей. Була очищена сигнальна пептидаза з мікросом еукаріотів.

У мітохондріях і хлоропластах повинні бути присутні кілька сигнальних пептидаз, оскільки процесинг відбувається більше, ніж в одному компартменті. Розчинну пептидазу з мітохондріального матриксу вдалося частково очистити, але охарактеризована вона не повністю.

4. Транспорт ліпідів

У *E. coli* весь синтез фосфоліпідів протікає в плазматичній мембрані і ліпіди повинні транспортуватись у зовнішню мембрану. Механізм ліпідного обміну між

цими двома мембранами невідомий, але зазвичай вважають, що внутрішня і зовнішня мембрани мають місця з'єднання або ділянки адгезії.

У еукаріотів синтез фосфоліпідів відбувається як в ЕПР, так і в мітохондріях. Механізм розподілу фосфоліпідів в еукаріотичних клітинах набагато складніший. Єдиним фосфоліпідом, який локалізується виключно в місці свого синтезу, в мітохондріях, є кардіоліпін.

Перенесення мембранних ліпідів від місця їх синтезу до місця призначення здійснюється за допомогою двох процесів: 1) трансмембранного фліп-флоп-переходу, 2) внутрішньомембранного транспорту. Швидкість фліп-флоп-переходу фосфоліпідів особливо велика для тих мембран, в яких відбувається біосинтез ліпідів, її характерний час складає близько кількох хвилин. Є дані про те, що цей процес здійснюється за участю білків і, можливо, вимагає гідролізу АТФ. Було також показано, що холестерол здатний до швидкого спонтанного фліп-флоп-переходу.

У транспорті ліпідів від однієї клітинної мембрани до іншої задіяні кілька процесів. У різних випадках найбільш важливим може виявитися один із них:

1. Самовільне перенесення ліпідів шляхом дифузії мономерних ліпідних одиниць через водну фазу.

2. Дифузія ліпідів через постійні або тимчасові місця з'єднання двох контактуючих мембран.

3. Транспорт за участю білків, що каталізується або білками, які полегшують вивільнення ліпідів з донорної мембрани, або ліпідів зв'язуючими білками.

4. Транспорт за участю везикул, при якому ліпіди, як і мембранні білки, транспортуються в ході безперервного відбруньковування і злиття з мембранами внутрішньоклітинних везикул. Цей процес може бути енергозалежним.

Перенесення новосинтезованих молекул холестеролу з ЕПР в плазматичну мембрану здійснюється за 10 хв. На процес впливають агенти, які блокують біоенергетичні реакції в клітині, наприклад ціанід. Ці та інші дані свідчать про те, що внутрішньоклітинний транспорт холестеролу є енергозалежним процесом і протікає за участю везикул. Проте єдиної думки на цей рахунок не вироблено. Серйозною проблемою є те, що оцінки долі холестеролу, присутнього в плазматичній мембрані, від загальної його кількості в клітині сильно варіюють (від 25 до 95%).

Характерний час перенесення фосфоліпідів з фосфоліпідних везикул набагато більший, ніж холестеролу. Наприклад, для дипальмітоїлфосфатидилхоліну він становить 83 год при 37°C в разі везикул з диміристоїлфосфатидилхоліну. Швидкість перенесення фосфоліпідів за допомогою цього механізму дуже мала, щоб відповідати реальним швидкостям їх мембранного транспорту.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Основна

1. Биохимия мембран: Учеб. пособ. для биол. и мед.-биол. спец. вузов. Кн. 1-9. Под. Ред. А.А. Болдырева. – М.: Высш. шк., 1986-1991 рр.
2. Болдырев А.А., Кяйвярайнен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология: учебное пособие. – Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с.
3. Введение в биомембранологию: Учеб. Пособие / под. Ред. А.А. Болдырева. – М.: Изд-во, МГУ, 1990. – 208 с.
4. Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции. / пер. с англ. Л.И. барсукова, А.Я. Мулкиджаняна, А.Л. Семейкиной, В.Д. Следя. – М.: Мир, 1997. – 366 с.
5. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. Учебное пособие для студентов медицинских вузов. – М. ООО «Медицинское информационное агенство», 2004. – 544 с.
6. Огурцов А.Н. Биологические мембраны: учеб. пособие. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2012. – 368 с.

Додаткова

1. Антонов В.Ф. Биофизика мембран // Соревский обозревательный журнал. – 1996. – № 6. – С 1-12.
2. Биологические мембраны. Методы: пер. с англ. / Под ред. Дж. Б. Финдлея, У.Г. Эванза. – М.: Мир, 1990. – 424 с.
3. Брагина Н.А., Миронов А.Ф. Мембранология. Учебно-методическое пособие. – М.: ИПЦ МИТХТ, 2002. – 98 с.
4. Владимиров Ю.А. Биологические мембраны. Строение, свойства, функции. // Биомембраны. – 9 с.
5. Гонський Я.І, Максимчук Т.П., Калинський М.І. Біохімія людини. – Тернопіль, Укрмедкнига, 2002. – 744 с.
6. Остапченко Л.І., Михайлик І.В. Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій : Навчальний посібник. – К.: Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2006. – 215 с.
7. Lipowsky reinhard. Vesicles and biomembranes // Encyclopediaof Applied Physics. – Vol. 23. – 1998. – P. 199-222.

Алфавітний покажчик основних понять

- Адгезивний поясок 55
Адгезивні білки 52
Адгезивні імуноглобуліни 53
Аденілатциклаза 61, 63
Адреналін 62,
Аквапорини 45
Активний транспорт 45
- первинний активний транспорт 45, 46
- вторинний активний транспорт 45,
Актин 23
Амфіфільність 14
Анкерін 23
Антипорт 46
Арахідонова кислота 61
АТФаза 45
АТФази F-типу 47
АТФази V-типу 47
АТФази Р-типу 46
Ацетилхолін 59, 68
- Біогенез мембран 70
Біомембранологія 3,
Валіноміцин 44
Ванадат 46
Везикули 30
Вінкулін 55
Вторинні месенджери 58, 60, 64
- G-білок 60
Гангліозиди 12, 14
Гасіння флуоресценції 40
ГДФ/ГТФ-обмін 60
Гексагональна структура фосфоліпідів 15, 28, 29
Гемідесмосома 55
Глікозилювання 8, 19
Глікокалікс 24
Гліколіпіди 11, 12
Глікопротеїни 19
Глікофорин 19, 21, 24
Гомогензація 30
Гормон 62
Гош-конформація 13, 14
Грамїцидин 44

Гуанілатциклаза 61, 63

Деполаризація флуоресценції 38

Десмосома 55

Дефектні зони 26

Диацилгліцерол 61, 64

Дифосфатидилгліцериди 10

Дифракція рентгенівських променів 31, 32

Діюльні ліпіди 11

Екзоцитоз 51

Екзоцитозний шлях транспорту білків 73

Екстракція 51

Електронна мікроскопія 31, 33

Електронний парамагнітний резонанс (ЕПР) 37

Ендоплазматичний ретикулум 7

Ендотеліоцити 52

Ендоцитоз 49

ЕПР-мітка 35, 36

Інозитолтрифосфат 61

Інсулін 62,

Інтегральні білки 20

- бітопічні – 20

-монотопічні 21

-політопічні 21

Інтегрини 52

Інтердигітація 54

Іонні канали 43

Іонні помпи 45

Іонофор 44

Кадгерини 54

Кальмодулін 60, 63

Кінк 13, 14, 26

Клатрин 50

Клітинна стінка 6

Комплекс Гольджі 8, 19

Конексин 56, 57

Контакт комунікаційного типу 56

Контакти зчепленого тпу 54, 55

Контакти простого типу 54

Кристи 6

Критична концентрація міцелоутворення 11, 16

Критична температура 28

Ламелярна структура фосфоліпідів 15, 28
Латеральна дифузія 25
Ліганд 50
Лізосоми 6
Лізофосфоліпід 10
Ліпосоми 16
ЛНГ 50

Маркерні ферменти мембран 32
Мезоморфізм 15
- ліотропний 15, 27
- ермотропний 15, 27
Мембрана 6
Мембранні рецептори 59
Метод заморожування – травлення 33
Метод кругового дихроїзму 39
Метод скануючої калориметрії 40
Методи заморожування – сколювання 33
Механорецептори 69
Механочутливі іонні канали 69
Мієлінова оболонка 33
Мікров'язкість мембрани 27, 35
Мікрофіламенти 23
Мітохондрії 6
Міцели 15
Мускариновий холінорецептор 69

Na^+, K^+ -АТФаза 45, 46, 47
 H^+ -АТФаза 45, 46, 49
Нейрамінова кислота 19
Нейромедіатор 58, 59, 60, 66
Нексус 56
Нікотинові холінорецептори 67
Нітрокисильний радикал 36, 37
Обертальна рухливість білків 22
Одорантний рецептор 65
Олеїнова кислота 13
Олігоміцин 47
Органели 6
Осмотичний градієнт 43

Пальмітинова кислота 13
Пасивний транспорт 42
Периферичні білки 20

Пероксисоми 7
Піноцитоз 49
Пірен 41
Плазмалогени 10
Плазматична мембрана 6
ПОЛ 28
Полегшена дифузія 43
Постсинаптична мембрана 58
Пресинаптична мембрана 57
Проста дифузія 42
Просте міжклітинне з'єднання 54
Протеїнкіназа А 60,
Протеїнкіназа С 17
Протеїнкіназа С 62
Протонофори 44

Рецептор 23, 59,
Рецептори, спряжені з G-білками (G-protein coupled receptors, GPCR) 60
Рибосоми 8
Рідинно-мозаїчна модель будови мембран 5
Родопсин 63

Ca²⁺-АТФаза 45, 46, 48
Секреція 51
Селектини 53
Сигнальні пептидні послідовності 70, 74
Синальні пептидази 74
Синапс 57, 68
Синаптична щілина 58, 68
Синпорт 46
Спінова мітка 37
Стероїдні гормони 62
Сфінголіпіди 11, 17

Тирозинова протеїнкіназа 59, 63
Т-клітинний рецептор 53
Трансдуцин 60, 64
Транс-конфігурація 14
Трансмембранна асиметрія 17
Трансмембранний електрохімічний потенціал 48
Тубулін 24

Уніпорт 46

Фагосоми 6

Фагоцитоз 49
Фазовий перехід ліпідів 28
Фліп-флоп перехід 25, 26
Флуоресцентна спектроскопія 41
Флуоресцентний зонд 35, 36, 38
Фосфатидилетаноламін 10, 17
Фосфатидилінозит 10
Фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфат 61
Фосфатидилсерин 10, 17
Фосфатидилхолін 10, 17
Фосфоліпіди 10, 27

Холестерин 13, 26
Хомінг ліцфоцитів 53

цАМФ 61, 64
цАМФ-фосфодіестераза 61
цГМФ 61
Центрифугування 30, 31
Цис-конфігурація 13, 14
Цитоз 49
Цитокіни 62
Цитоскелет 23

Щілинне з'єднання 56
Щільне з'єднання 54, 56

Ядерно-магнітний резонанс (ЯМР) 39
Ядро 8

ЗМІСТ

	С.
ТЕМА 1. ВСТУП ДО БІОМЕМБРАНОЛОГІЇ	3
1. Предмет та завдання біомембранології	3
2. Історія досліджень структури мембран	4
3. Клітинні мембранні структури	6
4. Біологічні функції мембран	8
ТЕМА 2. СТРУКТУРНІ КОМПОНЕНТИ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН: ЛІПІДИ	10
1. Структура окремих груп мембранних ліпідів	10
2. Жирні кислоти та їх просторова конфігурація	12
3. Амфipатична природа мембранних ліпідів і організація ліпідних міцел, ліпосом та бішару	14
4. Біологічні функції мембранних ліпідів	17
ТЕМА 3. СТРУКТУРНІ КОМПОНЕНТИ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН: ВУГЛЕВОДИ МЕМБРАН ТА МЕМБРАННІ БІЛКИ	19
1. Мембранні вуглеводи	19
2. Мембранні білки: особливості будови та локалізації	19
3. Функції мембранних білків	22
4. Цитоскелет та глікокалікс мембран	23
ТЕМА 4. РІЗНІ ВИДИ РУХЛИВИХ КОМПОНЕНТІВ ЛІПІДНОГО БІШАРУ	25
1. Види рухливості ліпідів	25
2. Дефектні зони. Роль холестерину	26
3. Фазові переходи мембранних ліпідів	27
ТЕМА 5. СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ДОСЛІДЖЕННЯ МЕМБРАННИХ СТРУКТУР	30
1. Виділення і характеристика мембранних фракцій	30
2. Методи дослідження мембранних структур	32
А) Дифракція рентгенівських променів	32
Б) Електронна мікроскопія	33
3. Методи вивчення динамічної поведінки мембранних систем і ліпід-білкових взаємодій	34
А) Мікров'язкість мембран і застосування мембранних зондів	35
Б) Електронний парамагнітний резонанс	37
В) Деполяризація флуоресценції	38
Г) Ядерно-магнітний резонанс	39
Д) Метод кругового дихроїзму	39
Е) Метод скануючої калориметрії	40
Є) Флуорисцентна спектроскопія	40
ТЕМА 6. ТРАНСПОРТ РЕЧОВИН ЧЕРЕЗ МЕМБРАНИ	42
1. Загальна характеристика механізмів проходження речовин через мембрани	42
2. Пасивний транспорт	42
3. Активний транспорт	45

4. Молекулярні основи первинно-активного транспорту іонів	46
5. Конкретні системи переносу низькомолекулярних речовин через мембрану	47
6. Перенесення через мембрани макромолекул і частинок. Цитоз	49
ТЕМА 7. АДГЕЗИВНА ФУНКЦІЯ МЕМБРАН	52
1. Родини адгезивних мембранних білків	52
2. Типи міжклітинних контактів	54
ТЕМА 8. ПЕРЕДАЧА ІНФОРМАЦІЇ ЧЕРЕЗ КЛІТИННУ МЕМБРАНУ. ВНУТРІШНЬОКЛІТИННІ МЕДІАТОРИ	58
1. Загальні положення	58
2. Типи рецепторів	59
3. Передача гормонального сигналу через мембрану	62
4. Передача сигналу у фоторецепторних клітинах сітківки	64
5. Біохімічні механізми нюху і посилення первинних нюхових сигналів	66
6. Рецептори збудливих тканин	67
7. Механочутливі іонні канали	69
ТЕМА 9. БІОГЕНЕЗ МЕМБРАН	70
1. Загальні положення	71
2. Транспорт білків. Екзоцитозний шлях	72
3. Сигнальні послідовності білків. Сигнальні пептидази	73
4. Транспорт ліпідів	74
Рекомендована література	77
Алфавітний покажчик основних понять	76