

Р и с. 2.5. Один из способов конструирования искусственного липидного бислоя: один монослой образуется на границе раздела вода — гептан, другой — вокруг капли водного раствора, внесенного пипеткой в гептан; при их соприкосновении появляется истинный двойной слой

2.2. СОСТАВ И СТРУКТУРА БИОЛОГИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

Как отмечалось выше, основными компонентами биологических мембран являются липиды, белки и углеводы, причем в процентном отношении большая часть массы приходится на долю белков и липидов. Кроме того, в мембранах выявлены такие минорные компоненты, как нуклеиновые кислоты, полиамины и неорганические ионы, а также связанная вода. Соотношение основных структурных компонентов — белков и липидов — значительно колеблется в зависимости от вида мембраны. Так, в мембранах митохондрии массовая доля белка составляет 60 — 65 %, а липидов — 35 — 40 %. В миелиновой оболочке нерва содержится всего 20 — 40 % белка, остальные 60 — 80 %

составляют липиды. В табл. 2.1 приводятся данные об относительном содержании белков и липидов в мембранах различных клеточных оргanelл.

Таблица 2.1

Содержание белков и липидов в различных мембранах*, %

Структура мембраны	Белки	Липиды
Миелии (седалищный нерв)	20 – 40	60 – 80
Эритроциты	60	40
Митохондрии	60 – 65	35 – 40
Ядра	48 – 52	38 – 47
Хлоропласты	50 – 60	40 – 50
Бактерии	55 – 65	10 – 20

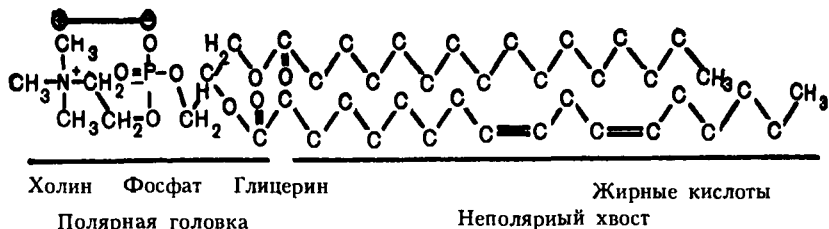
* Относительное содержание белков и липидов в мембранах клеточных оргanelл неодинаково, поскольку они выполняют различные функции.

2.2.1. МЕМБРАННЫЕ ЛИПИДЫ

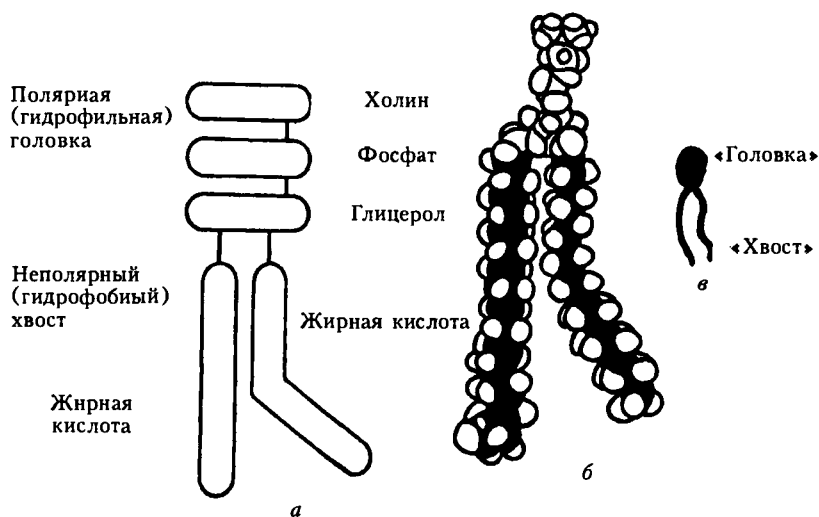
Известно, что мембраны клеток животных, человека, растений и бактерий различны по своему липидному составу. Так, липиды хлоропластов содержат в основном моно- и дигалактодиглицериды, а в липидах мембран животных клеток преобладают фосфатидная кислота и фосфатидилэтаноламин. Различия в составе мембран оргanelл одной клетки менее выражены, однако ядерная, митохондриальная и микросомальная мембраны заметно отличаются друг от друга.

В состав биологических мембран входят липиды трех различных классов: фосфолипиды, гликолипиды и стероиды. Основная роль в формировании бислоистой липидной мембраны отводится фосфолипидам: глицерофосфолипидам (производным фосфатидной кислоты) — фосфатидилхолину (рис. 2.6), фосфатидилэтаноламину, фосфатидилсерину, фосфатидилинозитидам, сфинголипидам (производным церамида) и сфингомиелинам. Структурная формула ФЛ, входящих в состав мембран животных клеток, представлена на рис. 2.7. Среди ФЛ наиболее распространены фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин. Так, в мембранах митохондрий половину (48 %) от всех фосфолипидов составляет фосфатидилхолин. В большом количестве этот липид содержится и в других мембранах животных клеток. Особое место среди фосфолипидов занимают фосфатидилсерин и фосфатидная кислота, полярные головки которых заряжены отрицательно,

что определяет поверхностный заряд тех участков мембраны, где сосредоточены молекулы данных липидов (табл. 2.2).



Р и с. 2.6. Структура молекулы фосфатидилхолина (лецитина)



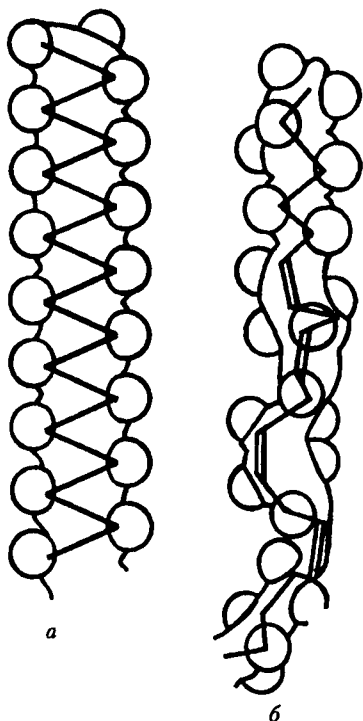
Р и с. 2.7. Молекула фосфолипида фосфатидилхолина, представленная схематически (а), в виде пространственной модели (б) и символа (в)

Различия в составе липидов в мембранах объясняются еще и тем, что ФЛ могут отличаться не только полярными «головками», но и жирно-кислотными хвостами. Функциональные свойства липидов во многом зависят от того, насыщенные или ненасыщенные жирные кислоты входят в состав ФЛ. На рис. 2.8 и 2.9 показаны структура насыщенных и ненасыщенных жирных кислот и организация сформированных из них монослоев.

Таблица 2.2

Липидный состав мембран клеток млекопитающих, % от массы всех липидов

Липиды	Плазматические мембраны	Митохондрии	Лизосомы	Ядра	Эндоплазматический ретикулум	Комплекс Гольджи
Фосфатидилхолин	18,5	37,5	23,0	44,0	48,0	24,5
Сфингомиелин	12,0	0	23,0	3,0	5,0	6,5
Фосфатидилэтноламин	11,5	28,5	12,5	16,5	19,0	9,0
Фосфатидилсерин	7,0	0	6,0	3,5	4,0	2,5
Фосфатидинозитол	3,0	2,5	6,0	6,0	7,5	5,0
Лизофосфатидилхолин	2,5	0	0	1,0	1,5	3,0
Дифосфатидилглицерин	0	14,0	5,0	1,0	0	0
Другие фосфолипиды	2,5	—	—	—	—	—
Холестерин	19,5	—	14,0	10,0	5,5	7,5
Эфиры холестерина	2,5	2,5	8,0	1,0	1,0	4,5
Свободные жирные кислоты	6,0	—	—	9,0	3,5	18,0
Другие липиды	15,0	15,0	2,5	5,0	5,0	16,0



Р и с. 2.8. Структура насыщенных (а) и ненасыщенных (б) жирных кислот

межмолекулярными взаимодействиями.

Поверхностные явления в БЛМ описываются уравнением адсорбции Гиббса:

$$-d\sigma = \Gamma_i d\mu,$$

где σ — поверхностное натяжение; Γ_i — степень адсорбции на поверхности; μ — химический потенциал.

Для бинарной системы, например для системы липид — вода, уравнение Гиббса приобретает более простой вид:

$$-d\sigma = \Gamma_1 d\mu_1 + \Gamma_2 d\mu_2.$$

При $\Gamma_2 = 0$, т. е. низкой концентрации растворенного вещества, адсорбирующегося на поверхности раздела фаз,

$$-d\sigma = \Gamma_1 d\mu_1.$$

В случае разбавленных растворов $d\mu = RT \ln a = RT \ln C$, тогда

$$\Gamma_1 = -a_1 d\sigma / RT da_1 = -C_1 d\sigma / RT dC_1.$$

Образование мембранных структур представляет собой динамический процесс усложнения (увеличения) числа монослоев липидов в мембране. Искусственные мембраны подразделяют на:

1) монослой — мембрана, состоящая из одного слоя молекул липида на границе полярной фазы (1/2 БЛМ);

2) бислой (двойной монослой) — мембрана, состоящая из двух слоев молекул липида, — БЛМ (размером 5 — 7 нм);

3) мультиламеллярные липосомы — везикулы, мембраны которых образованы несколькими БЛМ (диаметр липосом составляет несколько микрон);

4) мономламеллярные липосомы — везикулы, мембраны которых образованы одной БЛМ (диаметр липосом от 20 до 100 нм);

5) протеолипосомы — липосомы, в состав мембран которых включены белки.

Известно, что формирование и устойчивость мембран определяются поверхностными явлениями и

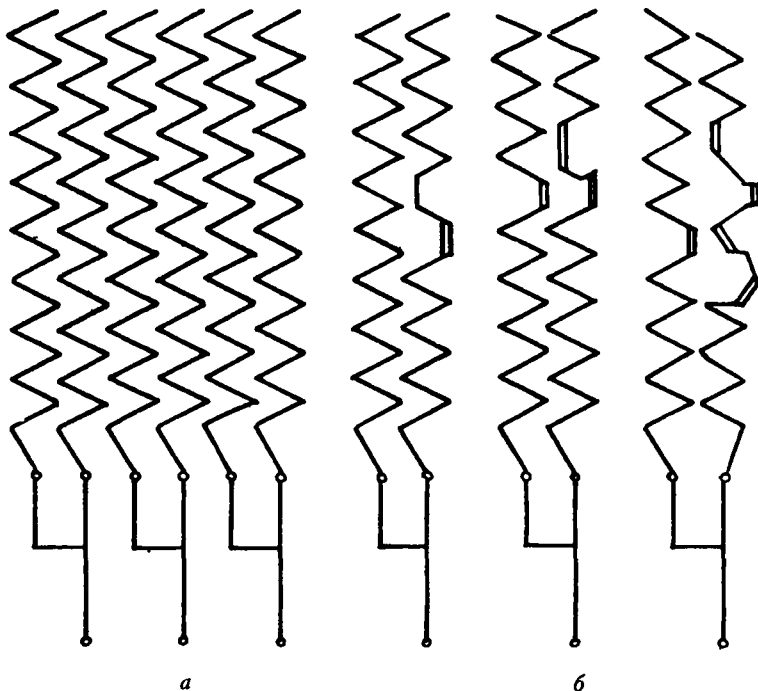


Рис. 2.9. Организация монослойных фосфолипидных мембран: *а* — монослой из ФЛ, содержащих насыщенные жирные кислоты, удельная плотность > 1 , площадь сечения двух углеводородных цепей в плоскости мембраны $2,1 \text{ нм}^2$, проницаемость мембраны низкая, расстояние между углеводородными цепями $0,42 \text{ нм}$; *б* — монослой из ФЛ, содержащих ненасыщенные жирные кислоты, удельная плотность < 1 , площадь сечения двух углеводородных цепей в плоскости мембраны $4,2 \text{ нм}^2$, проницаемость мембраны высокая, расстояние между углеводородными цепями увеличено

Если $-\sigma/dC$ — поверхностная активность при C , стремящемся к нулю, то для поверхностно-активных веществ $d\sigma/dC < 0$, $\Gamma > 0$ (липиды).

Под энергией *гидрофобных взаимодействий* подразумевают работу переноса липида из воды в органическую фазу. Известно, что энергия ГВ увеличивается по мере роста длины углеводородной цепи. ГВ также зависят от:

- 1) характера электростатического взаимодействия между NH^+ -группами и фосфатными группами (PO_4^-);
- 2) энергии гидратации (от 210 до 840 м кДж/моль);
- 3) типа электростатических взаимодействий.

Электростатические взаимодействия подразделяют на:

- латеральные (тангенциальные) — взаимодействие заряженных групп, расположенных в одном полуслое БЛМ;
- трансмембранные — взаимодействия заряженных групп, расположенных по разные стороны одной мембраны;
- межмембранные — взаимодействия заряженных групп, расположенных на поверхности двух соседних мембран.

2.2.2. ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ В ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ

Совокупность данных, полученных с помощью различных физико-химических методов, позволяет заключить, что в биологических и модельных мембранах (липосомах и БЛМ) липидный бислоем может находиться в состоянии либо твердого двумерного кристалла, либо бимолекулярной жидкой пленки (жидкокристаллическое состояние). В дальнейшем мы будем говорить просто о твердом и жидком состояниях липидного бислоя в мембранах. В обоих случаях сохраняется бимолекулярная структура липидной фазы, а молекулы фосфолипидов имеют плотную гексагональную упаковку в плоскости мембраны, но ее плотность в твердом и жидком состоянии неодинаковая и зависит от структуры жирных кислот. Например, молекула фосфатидилхолина в твердом состоянии бислоя занимает площадь $0,46 - 0,48 \text{ нм}^2$, а в жидком — $0,6 - 0,8 \text{ нм}^2$. Соответственно изменяется и толщина бислоя: в жидком состоянии она меньше, чем в твердом. БЛМ в указанных состояниях различаются вязкостью липидной фазы и растворимостью в ней веществ. Молекулярную основу данных различий составляют конформации жирно-кислотных цепей. Отдельная жирно-кислотная цепь может принимать множество конформаций благодаря вращению вокруг одинарных С—С-связей. В липидном бислое за счет плотной упаковки молекул в норме реализуются преимущественно две плоские конформации углеводородной цепи — *транс*- и *цис*-конформации (рис. 2.10, а, б), но существуют и промежуточные (рис. 2.10, в; 2.11, е).

В твердом состоянии все молекулы фосфолипида обладают *транс*-конформацией углеводородных цепей жирных кислот, что определяет их ограниченную подвижность в БЛМ. В этом случае осуществляются лишь небольшие согласованные колебания или вращательные движения (прецессия) возле точки крепления жирной кислоты и полярной группы ФЛ. В жидком состоянии БЛМ возможны тепловые движения жирно-кислотных цепей, сопровождающиеся *транс-гош*-переходами. Важно отметить, что расположенные рядом *гош*-конформации могут образовывать полости в бислое (так называемые кинки), в которые и попадают молекулы, «захваченные» из раствора. Изменения конформации цепей вызывают движение такого кинка вместе с находящимися в нем молекулами вдоль цепи (поперек мембраны) или между цепями (в плоскости мембраны) (рис. 2.12).

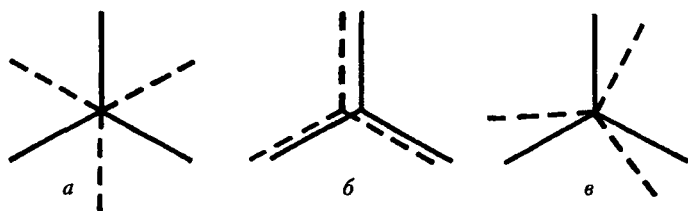


Рис. 2.10. Расположение СН-связей этана в *транс*- (а), *цис*- (б) и промежуточной (в) конформациях (проекция на плоскость, перпендикулярную С-С-связям)

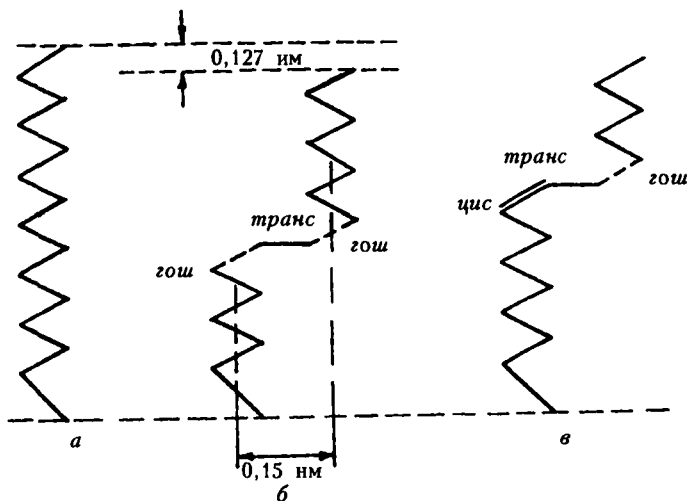


Рис. 2.11. Углеводородные цепи в *транс*-конфигурации (а), *гош-транс-гош*-конфигурации (б), *цис-транс-гош*-конфигурации (в)

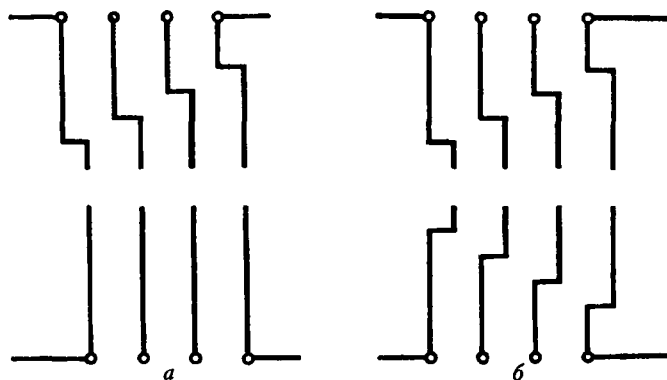
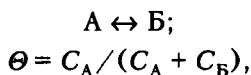


Рис. 2.12. Клик-блоки в углеводородных цепях мембран: а — в одном полуслое; б — в двух монослоях липидного бислоя

Гипотеза петли (кинка) предполагает, что плавление цепей ЖК при фазовом переходе обусловлено вращательной изомеризацией. Наименьшей энергией обладает *транс*-, а наибольшей — *цис*-конфигурация ЖК. Формирование кинка сопровождается уменьшением эффективной длины цепи на 0,13 нм. При этом часть цепи отодвигается на 0,15 нм, образуя свободный объем, в результате общий объем липида увеличивается на 0,025 — 0,050 нм³. Согласно современным представлениям структура кинка способна к диффузии, которая описывается соотношением $D = 0,5 w (\Delta L)^2$, где D — коэффициент диффузии; w — частота скачка кинка; L — шаг одного скачка.

Образование одного кинка облегчает возникновение кинков в соседних цепях, стимулируя их чередование в липидах ПМ. Появление в ходе такого процесса так называемых кинк-блоков (нескольких кинков) приводит, как правило, к разупорядоченности структуры мембраны. Вероятно, трансмембранный перенос малых молекул через мембрану осуществляется внутри свободного объема кинк-блока.

Температура фазового перехода зависит от размера боковых цепей ЖК (чем длиннее цепь и меньше двойных связей, тем выше температура). Действительно, длинные цепи ЖК уменьшают текучесть мембран, а появление двойных связей приводит к ее повышению. Фазовый переход наблюдается, как правило, в интервале температур от 0,2 до 1,0 С°, при этом одна фаза (например, кристаллическая) возникает в матриксе другой фазы (например, жидкой) с образованием большого числа доменов новой фазы. Можно представить данный процесс схематически:



где А — жидкая фаза; В — кристаллическая фаза; Θ — степень перехода из одной фазы в другую; С — доля молекул в каждой из фаз.

Тогда

$$K = K_1 / K_2 = \Theta / (1 - \Theta),$$

или после применения уравнения Вант-Гофа (при $\Theta = 0,5$ и $T = T_{\text{фп}}$)

$$\Delta H_{\text{ВГ}} / 4RT_{\text{фп}}^2 = (d\Theta / dT_{\text{фп}}).$$

Кооперативность фазового перехода (σ) может быть определена из соотношения

$$\sigma = (\Theta / H_{\text{ВГ}})^2,$$

а число молекул в кооперативной единице

$$N = 1 / (\sigma)^{1/2}.$$

В случае, когда $\Theta / H_{\text{ВГ}} = 1$, кооперативность в процессе фазового перехода в мембране отсутствует; при $\sigma \ll 1$ процесс кооперативен.

Межмолекулярные контакты в мембране осуществляются за счет

липид-липидных, липид-белковых и белок-белковых взаимодействий.

Липид-липидные взаимодействия зависят от:

- 1) энергии электростатических сил;
- 2) стерического фактора локализации в мембране фосфолипидных «головок» и «хвостов»;
- 3) энергии гидратации и образования водородных связей;
- 4) образования фосфолипидных доменов.

Липид-белковые взаимодействия определяются:

- 1) сорбцией и электростатическим взаимодействием белка и липида на поверхности монослоя;
- 2) внутримембранным встраиванием и взаимодействием белка и липида (аннулярный слой) в БЛМ.

Белок-белковые взаимодействия обусловлены поверхностной и внутримембранной ориентацией молекул белка (образование кластеров).

2.2.3. МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ

Белки, входящие в состав мембран, как правило, гидрофобные глобулярные структуры, достаточно прочно связанные с мембранами за счет не только гидрофобных, но и электростатических взаимодействий. По степени влияния на структуру бислоя и силе взаимодействия с мембраной белки делятся на интегральные и периферические: первые пронизывают мембрану, их трудно выделить без разрушения целостности мембраны; вторые локализованы на поверхности липидного бислоя мембраны и легко экстрагируются. Основную роль в ориентации интегральных белков в мембране играют гидрофобные взаимодействия. Периферические белки удерживаются на мембране преимущественно электростатическими взаимодействиями. Молекулы периферических белков разрушаются протеолитическими ферментами (протеазами) полностью, а интегральных белков — частично; протеолизу подвергаются лишь те компоненты интегральных белков, которые вступают в контакт с гидрофильной средой.

В настоящее время идентифицировано более 30 мембранных белков с относительной молекулярной массой 10 000 — 240 000. Мембранные белки выполняют различные функции. Наиболее широко распространены белки-ферменты: интегральные (мембранные АТФ-азы) и периферические (ацетилхолинэстераза, кислая и щелочная фосфатазы). Рецепторы и белки, определяющие иммунную реакцию клетки (антигены), могут быть как интегральными, так и периферическими компонентами мембран. Часто рецепторы входят в состав более сложных мембранных комплексов, содержащих «белки-исполнители». Отметим, что структурные белки, в частности белки цитоскелета, в основном периферические (рис. 2.13).

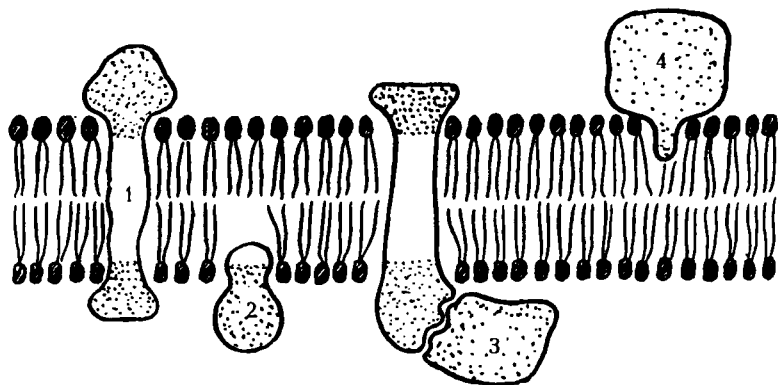


Рис. 2.13. Четыре способа ассоциации мембранных белков с липидным бислоем. Некоторые белки пронизывают бислой насквозь (1), некоторые удерживаются иековалентными взаимодействиями с другими мембранными белками (3). Окончательно не выяснено, существуют ли белки, лишь частично погруженные в бислой (2). Есть мембранные белки, к которым ковалентно присоединена одна или более цепей жирных кислот, помогающих белку «заякориться» в том или другом монослое. Хотя большинство таких белков являются трансмембранными, некоторые могут ими и не быть (4)

Рассматривая характер липид-белковых взаимоотношений в мембране, необходимо отметить, что данные процессы протекают на фоне латеральной диффузии белков и липидов, а также «флип-флоп»-перехода липидов. Под латеральной диффузией понимают хаотическое тепловое перемещение белков и липидов в плоскости мембраны (скачкообразный последовательный обмен местами молекул белков и липидов). Этот показатель определяется рядом параметров, которые связаны следующими соотношениями:

$$R^{-1} = 2 (3)^{1/2} D / A;$$

$$S^2 = 4Dt,$$

где R^{-1} — частота обмена молекул местами, c^{-1} ; D — коэффициент латеральной диффузии, m^2/c ; A — площадь молекулы фосфолипида, m^2 ; S — расстояние, перескакиваемое молекулой при ЛД; t — время перескока, c .

Например, в мембранах, выделенных из саркоплазматического ретикулума, ЛД (при $40^\circ C$ и $D = 10^{-12} m^2/c$) характеризуется величиной $R^{-1} = 5,9 \cdot 10^7 c^{-1}$ и $A = 7 \cdot 10^{-19} m^2$.

Под «флип-флоп»-переходом фосфолипидов в мембране подразумевается перемещение молекул из одного монослоя в другой; процесс продолжается в течение 15 — 60 мин и является основой асимметричного распределения фосфолипидных молекул по разные стороны мембран. Явление асимметрии обеспечивает постоянство пространственного расположения липидов и структурную организацию липид-белковых комплексов.