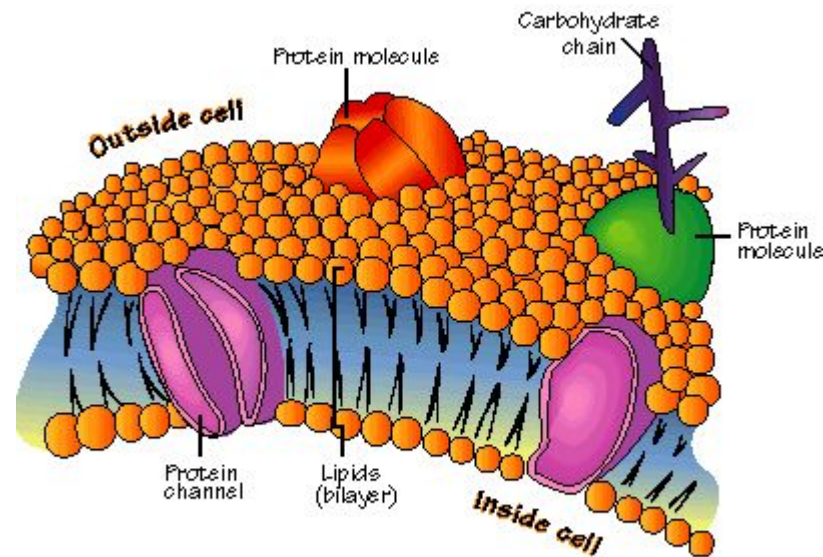


Раздел 3: Биофизика мембранных процессов



**Тема: структура и функции
биологических мембран**

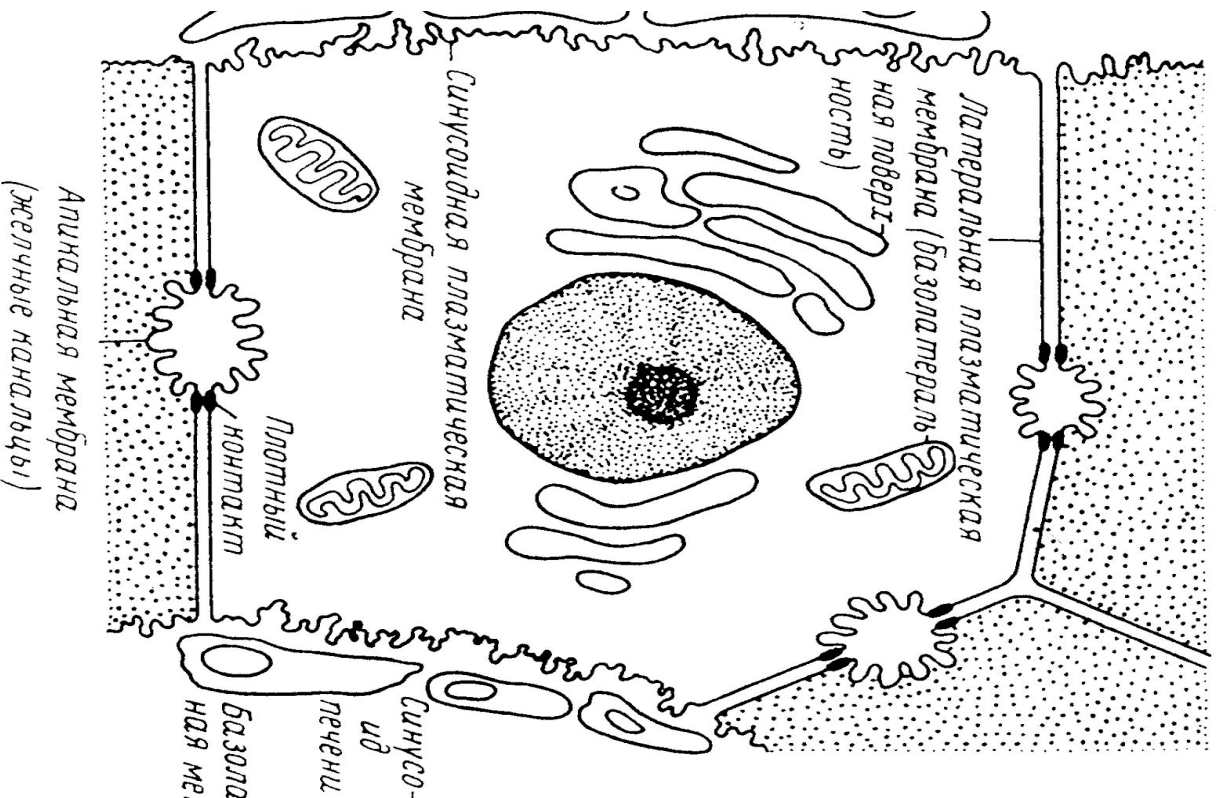
Биологические мембраны в клетке

- **Плазматическая мембрана - образует границу клетки**

Органеллы

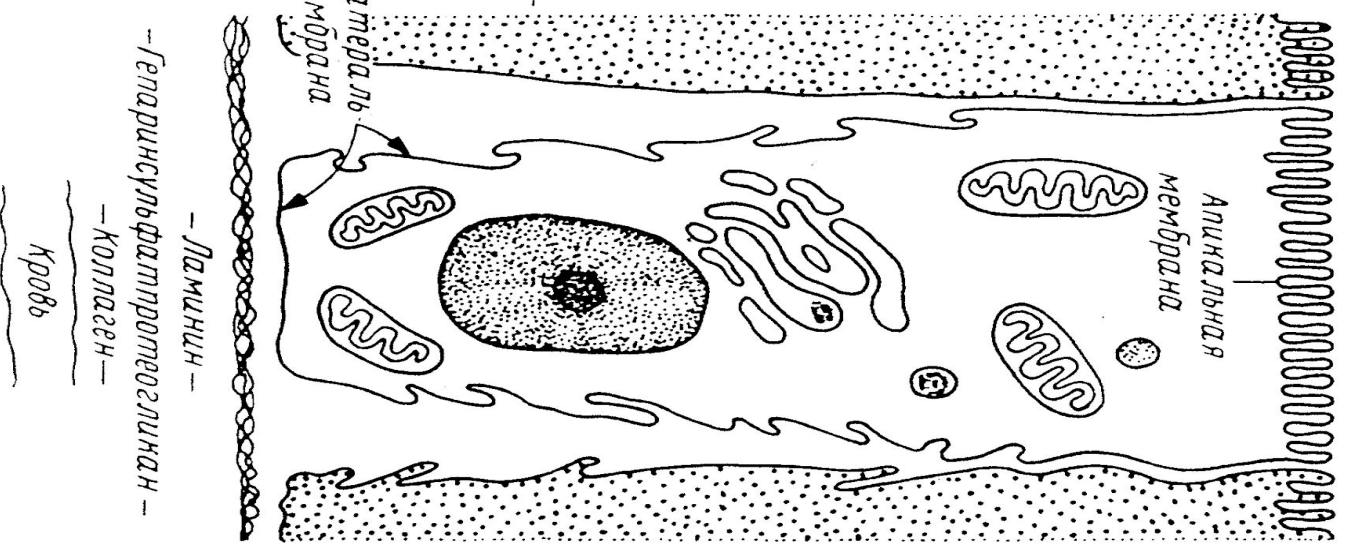
- **Ядро**
- **Эндоплазматический ретикулум**
- **Аппарат Гольджи**
- **Лизосомы**
- **Митохондрии**
- **Хлоропласты**
- **....**

клетка паренхимы печени



б

эпителиальная клетка



Некоторые функции биологических мембран

Клетки	Мембраны	Функция
Все клетки	Клеточные (цитоплазматические)	Активный транспорт ионов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , поддержание осмотического равновесия
Большинство клеток	Клеточные	Связывание гормонов и включение механизмов внутриклеточной сигнализации
Нервные и мышечные клетки	Клеточные	Генерация потенциалов покоя и действия, распространение потенциала действия
Большинство клеток (кроме эритроцитов)	Внутренняя мембрана митохондрий	Перенос электронов на кислород и синтез АТФ (окислительное фосфорилирование)
Большинство клеток (кроме эритроцитов)	Эндоплазматический ретикулум	Перенос ионов кальция из клеточного сока внутрь везикул
Клетки зрительного эпителия	Мембраны зрительных дисков	Поглощение квантов света и генерация внутриклеточного сигнала

Основные функции биомембран

Барьерная – обеспечивает селективный, регулируемый пассивный и активный обмен веществом с окружающей средой.

(селективный – значит избирательный: одни вещества переносятся через биологическую мембрану, другие нет; регулируемый – проницаемость мембраны для определенных веществ меняется в зависимости от генома и функционального состояния клетки).

Матричная – обеспечивает определенное взаимное расположение и ориентацию мембранных белков для их оптимального взаимодействия.

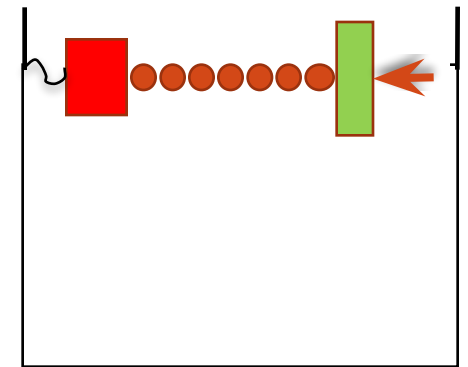
Механическая – обеспечивает прочность и автономность клетки, внутриклеточных структур

Дополнительные функции биомембран

- **Энергетическая** – синтез АТФ на внутренних мембранах митохондрий и фотосинтез в мембранах хлоропластов
- **Генерация и проведение потенциалов**
- **Рецепторная** – механическая, акустическая, обонятельная, зрительная, химическая, терморецепция – мембранные процессы)
-

Развитие представлений о строении биологических мембран (БМ)

- XIX в – плазматическая мембрана - определенная структура
- к XIX в – Овертон: БМ состоят из молекул, которые похожи на молекулы масла (липиды)
- 1925г – Гортел и Грендел - БМ образована двойным слоем липидных молекул (липидный бислой) – простой опыт с помощью



кюветы Ленгмюра

- 1935г Коул и Кертис – подтвердили гипотезу БМ - двойной липидный слой электрическое сопротивление $\sim 10^7 \text{ Ом} \cdot \text{м}^2$

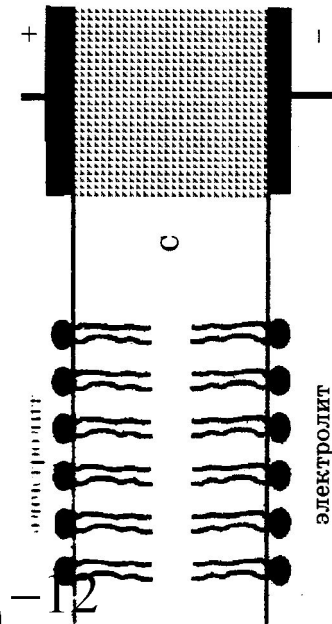
удельная электрическая емкость $\sim 0,5 \cdot 10^{-2} \text{ Ф/м}^2$

БМ – электрический конденсатор

Толщина неполярной части

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

$$d = \frac{\epsilon \epsilon_0 S}{C} = \frac{\epsilon \epsilon_0}{C_{yd}} = \frac{2 \cdot 8,86 \cdot 10^{-12}}{0,5 \cdot 10^{-2}} \cong 3,5 \text{ нм}$$

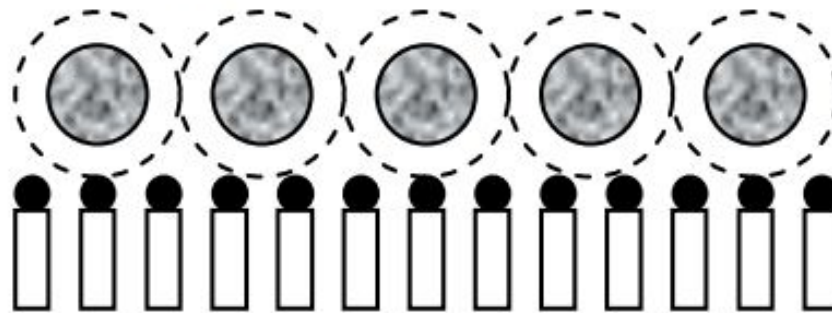


1935г Дэвисон и Даниелли – модель БМ «сендвича»

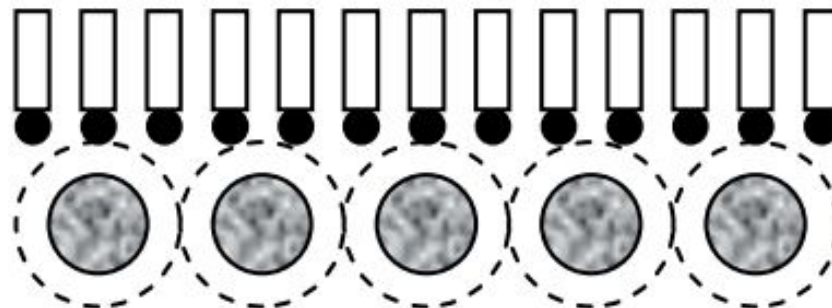
Рентгеноструктурный анализ – упорядоченность в расположении липидных молекул в БМ

Электронная микроскопия – в БМ встроены глобулярные частицы

А Наружная поверхность

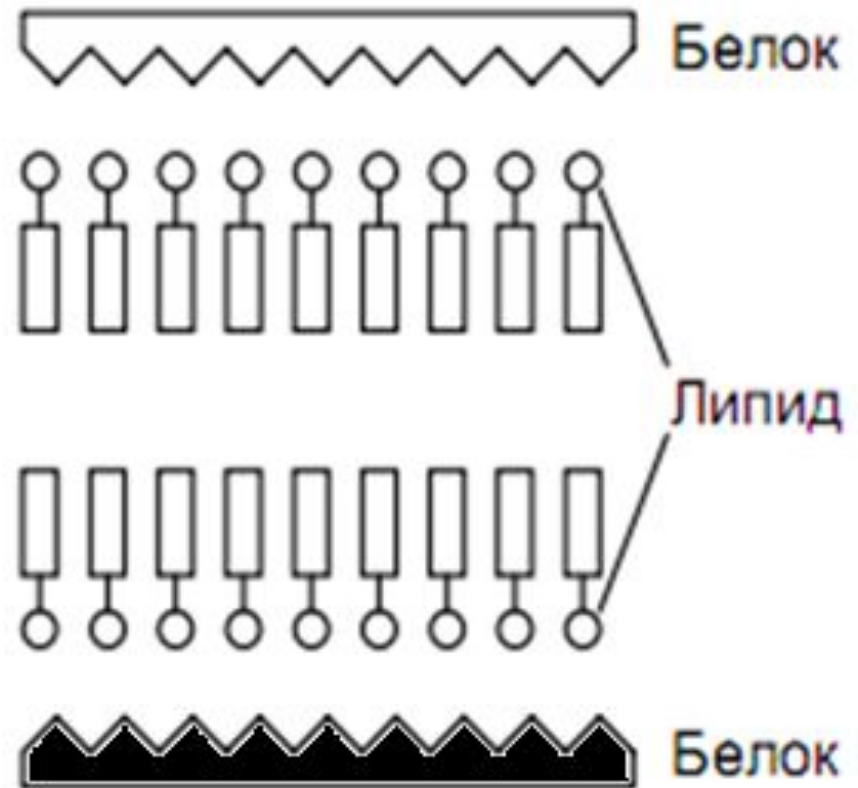


Липоид

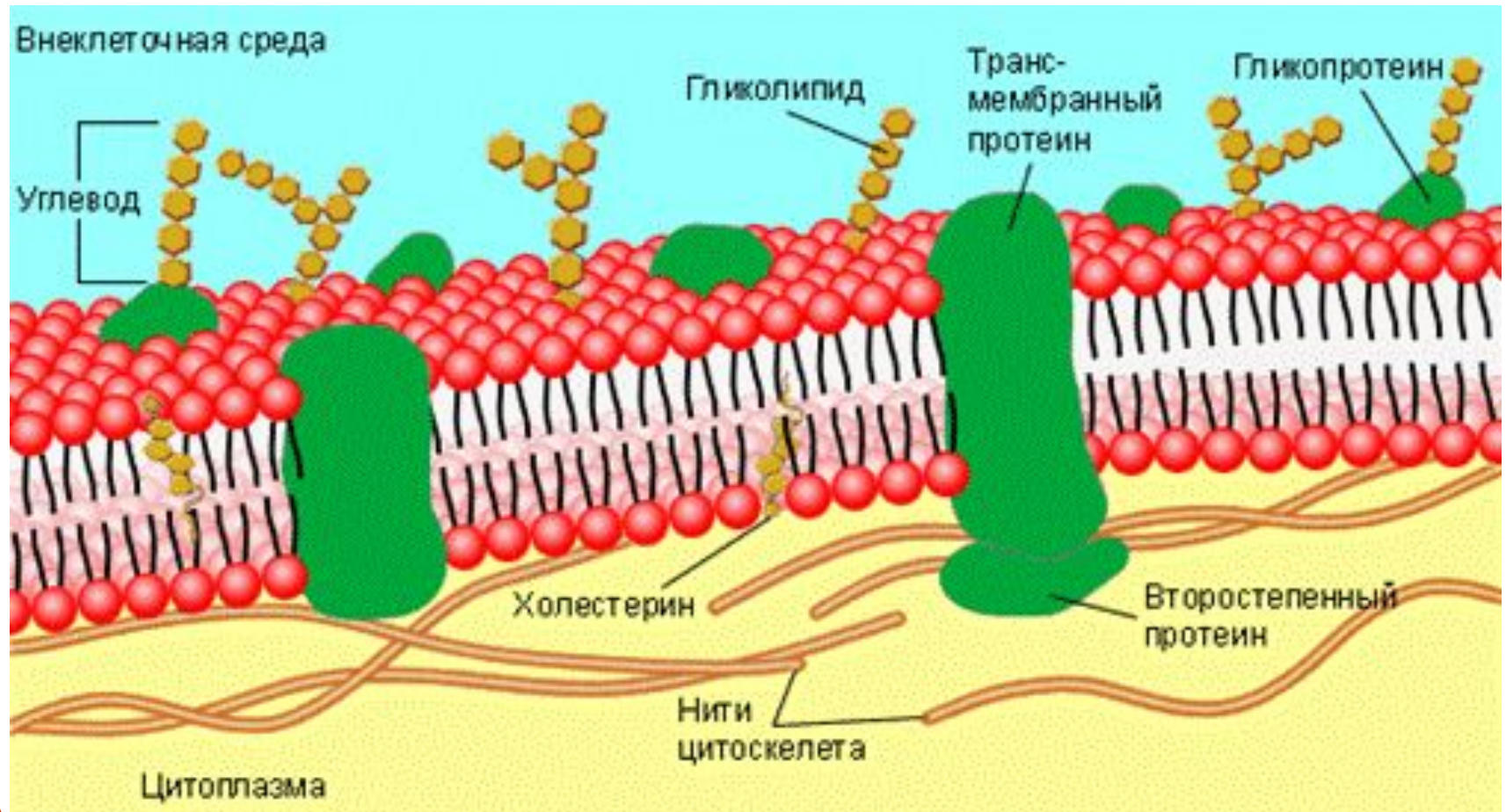


Внутренняя поверхность

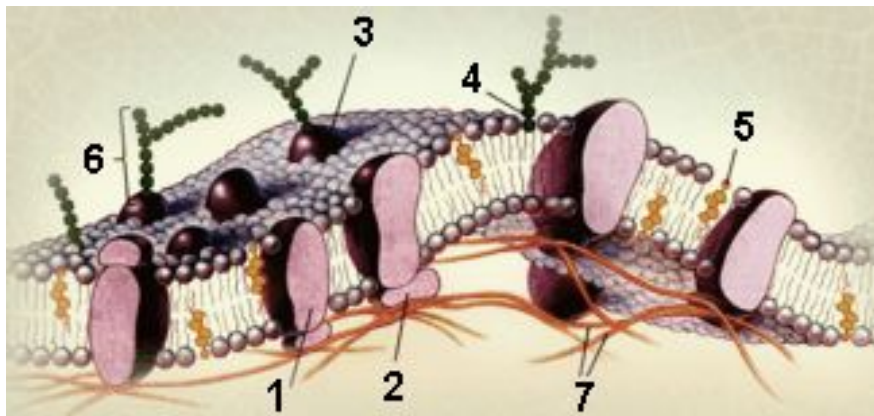
1959 г Дж.Д. Робертсон предположил, что все клеточные мембраны построены по одному принципу, и высказал концепцию унитарной (или единообразной мембраны). Эта модель во многом сходна с классической моделью Дж.Даниелли: основу мембраны составляет липидный бислой, а нелипидные компоненты лежат на поверхности связываясь с липидами за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий. В его модели нашла отражение важная структурная особенность — **асимметрия**.



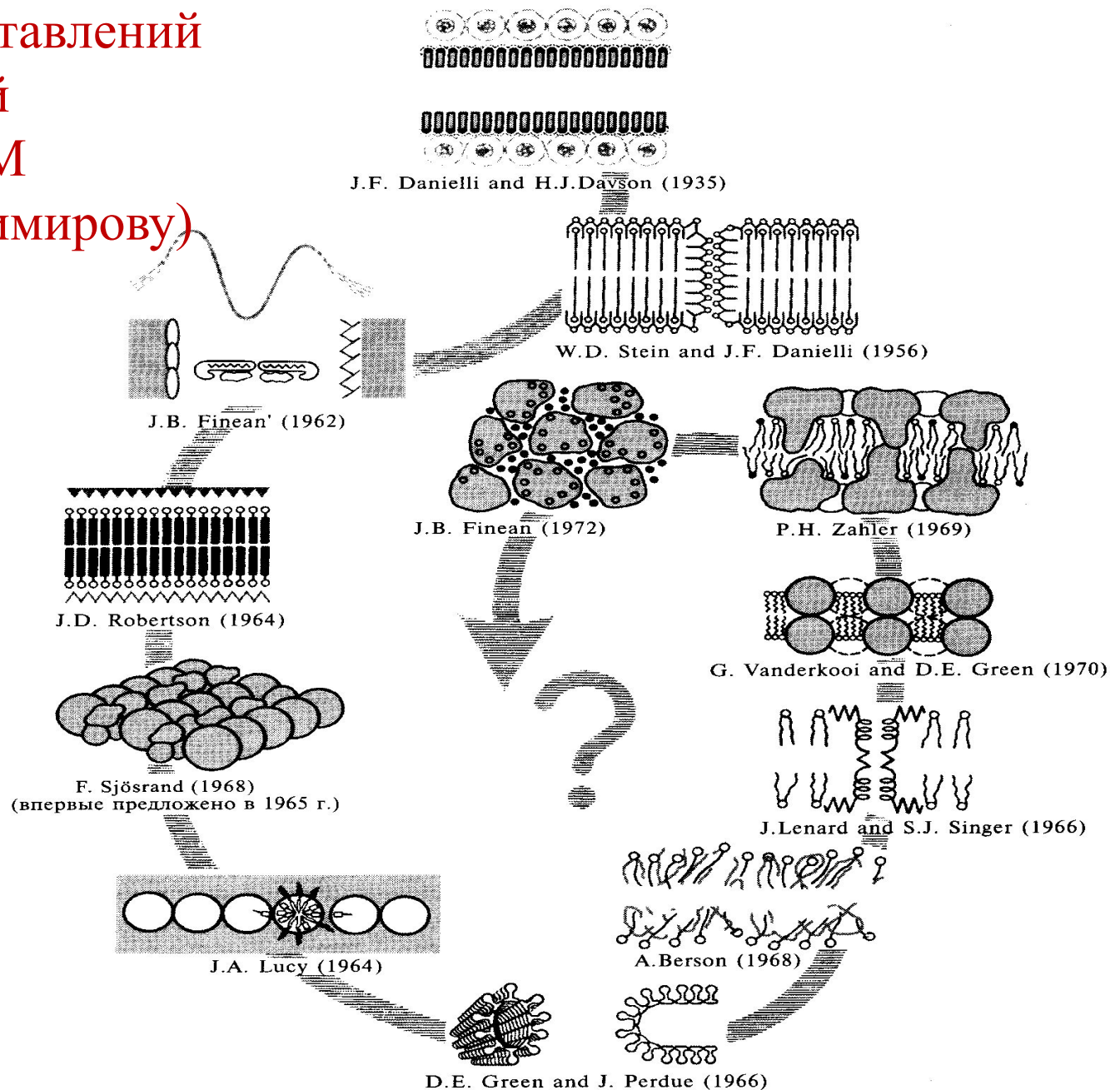
1972г – Сингер и Николсон – жидкостно-мозаичная модель
БМ: БМ текучий фосфолипидный слой, в который
погружены свободно диффундирующие белки



Согласно модели Сингером и Николсоном мембрана состоит из бислоя липидов, в котором плавают (или закреплены) белковые молекулы, образуя в нём своеобразную мозаику. Мембранные белки могут пронизывать бислой насквозь (интегральный белок - 1), примыкать к бислою (периферический белок - 2) или погружаться в него. Многие белки мембраны являются гликопротеинами (3), мембранообразующие липиды - гликолипидами (4), на схеме также показаны: холестерол (5); углевод (6); элементы цитоскелета (7).



Развитие представлений о молекулярной организации БМ (по Ю.А. Владимирову)



Биомембраны

- Функциональные структуры клетки, которые ограничивают цитоплазму и большинство внутриклеточных структур, образуют единую систему канальцев, складок и замкнутых полостей
- Толщина ~ 10 нм
- масса ~ 1/2 массы сухой клетки
- Состав: липиды, белки, углеводы

Относительное содержание белков и липидов (%) в
некоторых мембранах (Котык А., Янычек К.
Мембранный транспорт. М.:Мир,1980 С.45)

Мембраны	Белки	Липиды
Бычий миелин	22	78
Эритроциты человека	49	44
Плазматические мембраны клеток печени	60	40
Наружные митохондриальные мембраны	55	45
Внутренние митохондриальные мембраны	78	22
Микросомы из печени крыс	62	32

Вода в биомембранах

- 1) Связанная вода
- 2) Свободная вода
- 3) Захваченная вода

Липиды мембран

Состав липидов в мембранах эритроцитов человека
(Котык А., Янычек К. Мембранный транспорт. М.:
Мир, 1980 С.45)

Название	Содержание в мембране, %
Фосфолипиды	36,3
Сфингомиелины	29,6
Холестерин	22,2
Гликолипиды	11,9

Липидный состав субклеточных мембран крыс , в % от всех липидов

	митохон дрия	микрос омы	лизосо мы	плазмале мма	Ядерная мембрана	мембрана АГ
Кардиолипин	18	1	1	1	4	1
Фосфотидилэтаноламин	35	22	14	23	13	20
Фософотидилхолин	40	58	40	39	55	50
Фосфотидилинозитол	5	10	5	8	10	12
Фосфотидилсерин	1	2	2	9	3	6
Фосфатидная кислота	-	1	1	1	2	<1
Лизофосфоглицериды	1	11	7	2	3	3
Сфингомиелин	1	1	20	16	3	8
Фософлипиды (мг/мг белка)	0,175	0,374	0,156	0,672	0,500	0,825
Холестерол (мг/мг белка)	0,003	0,014	0,038	0,128	0,038	0,078

Глицеролипиды



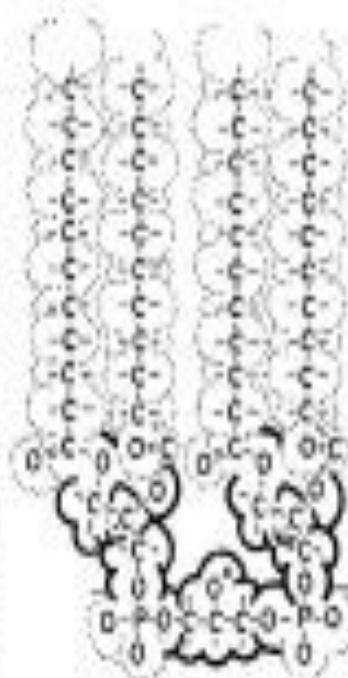
Фосфатидил-

-этанол-амин

-серия (кефалины)

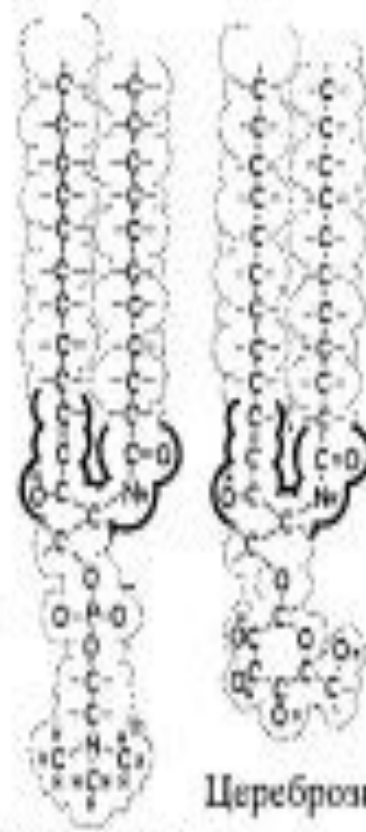
-инозит

-холин (лецитин)



Кардиолипин

Сфинголипиды



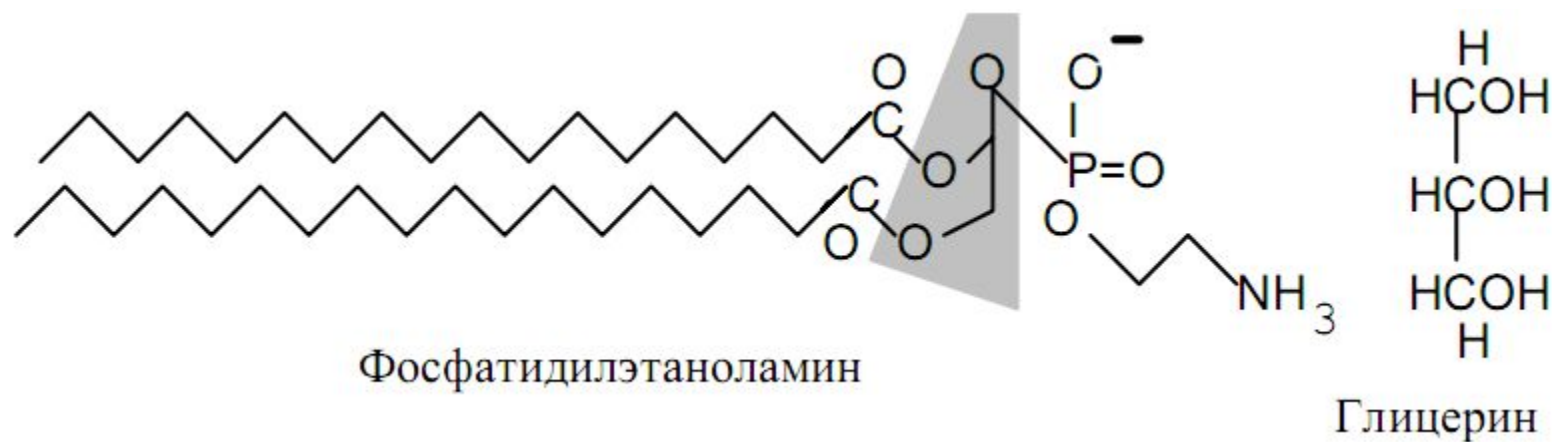
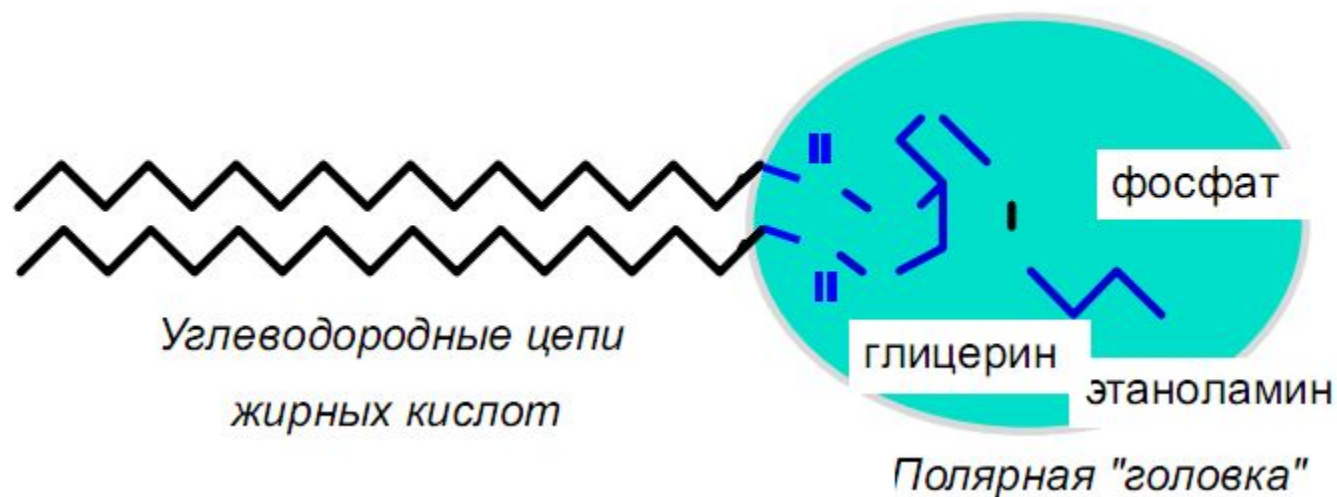
Сфингомиелин

Цереброзид

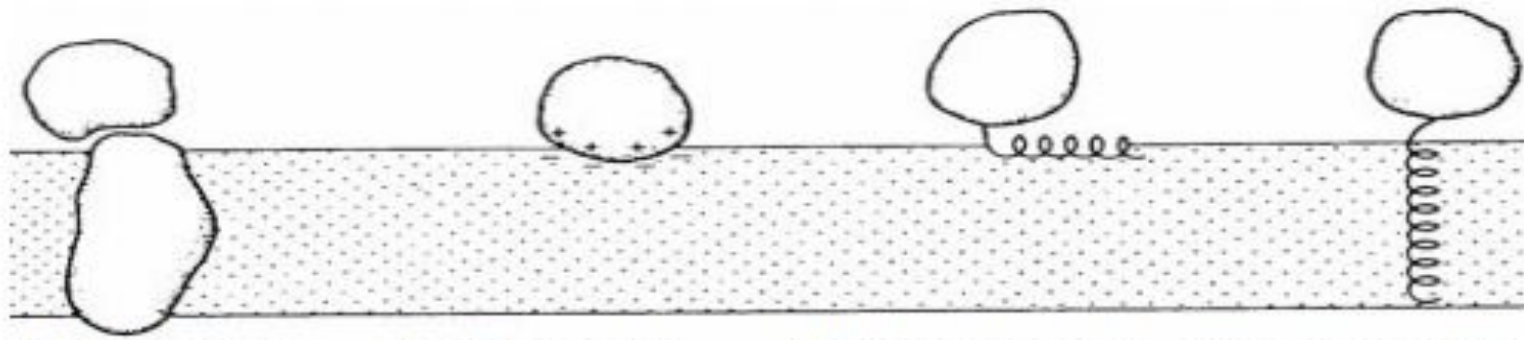


Холестерин

Рис. 2.
Молекула
фосфатидил-
этаноламина



Способы прикрепления мембранных белков

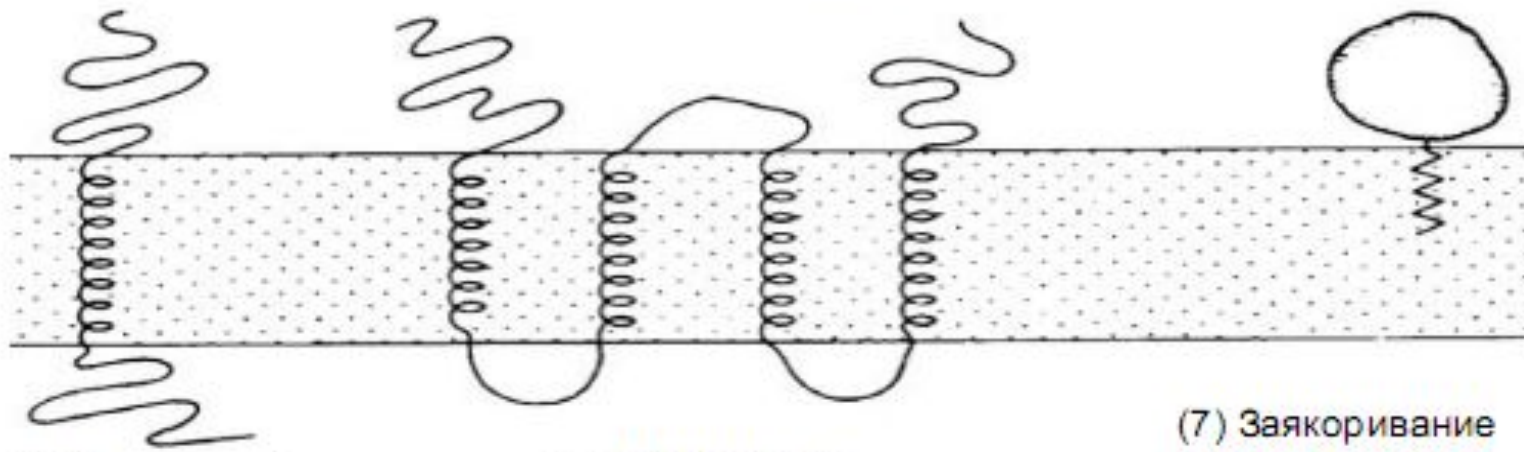


(1) Связывание с другими "якорными" белками

(2) В основном электростатическое связывание с бислоем

(3) В основном гидрофобное связывание, но практически без погружения в бислой

(4) Заякоривание с помощью короткого концевой сегмента



(5) Одиночный трансмембранный сегмент

(6) Множественные трансмембранные сегменты

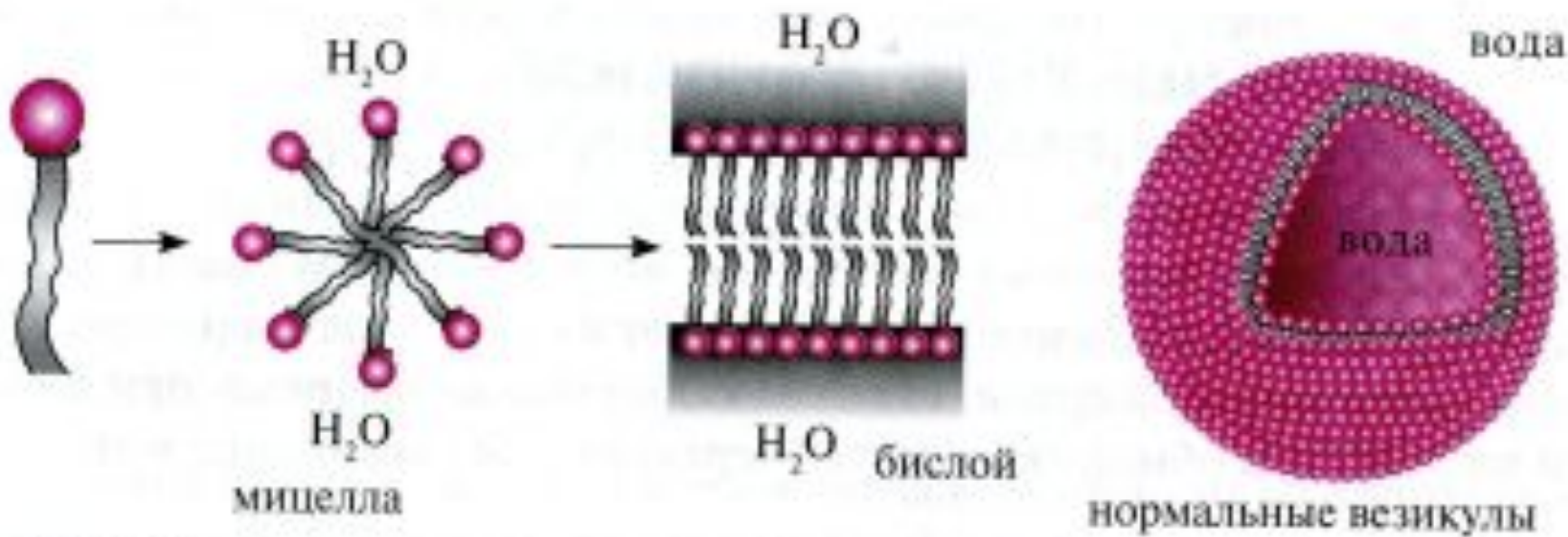
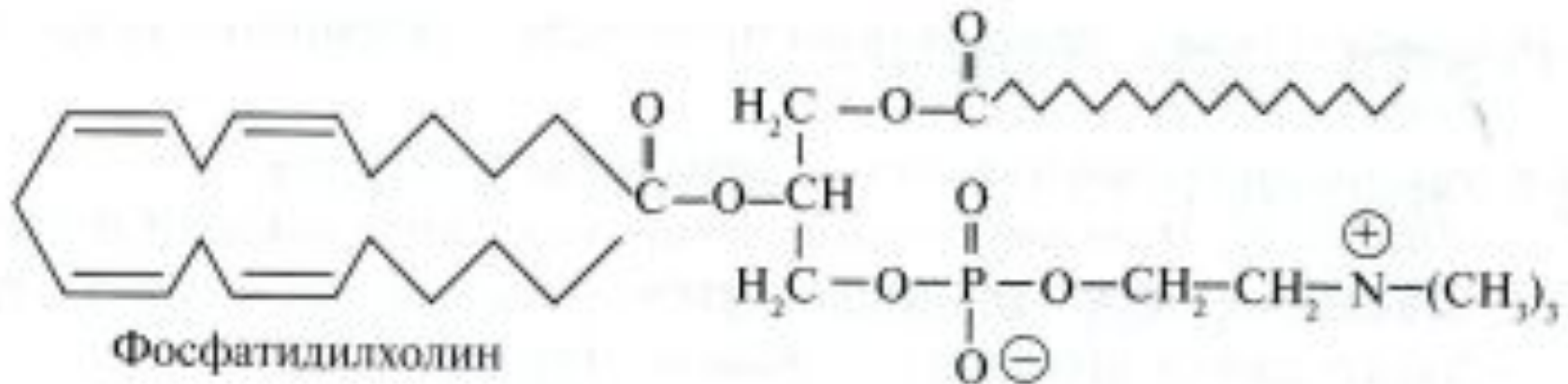
(7) Заякоривание с помощью ковалентно связанного липида

1. Связывание с белками, погруженными в бислой. Примеры: F_1 -часть Н-АТФазы, которая связывается с F_0 -частью, погруженной в мембрану; некоторые белки цитоскелета.
2. Связывание с поверхностью бислоя. Это взаимодействие имеет в первую очередь электростатическую природу (например, основной белок миелина) или гидрофобную (например, поверхностно-активные пептиды и, возможно, фосфолипазы). На поверхности некоторых мембранных белков имеются гидрофобные домены, образующиеся благодаря особенностям вторичной или третичной структуры. Указанные поверхностные взаимодействия могут использоваться как дополнение к другим взаимодействиям, например к трансмембранному заякориванию.
3. Связывание с помощью гидрофобного "якоря". Эта структура обычно выявляется как последовательность неполярных аминокислотных остатков (например, у цитохрома b_5). Некоторые мембранные белки используют в качестве якоря ковалентно связанные с ними жирные кислоты или фосфолипиды.
4. Трансмембранные белки. Одни из них пересекают мембрану только один раз (например, гликофорин), другие - несколько раз (например, лактопермеаза, бактериородопсин).

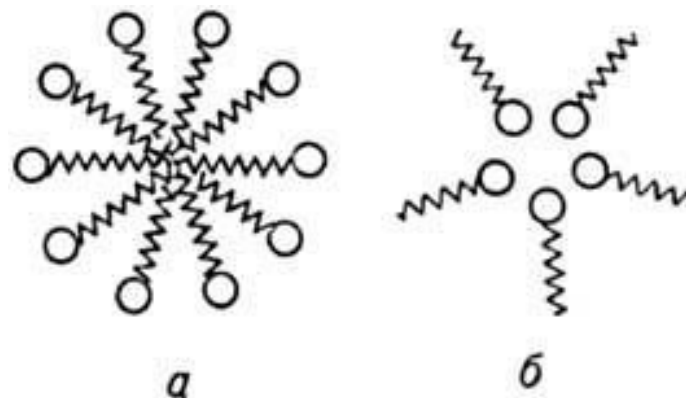
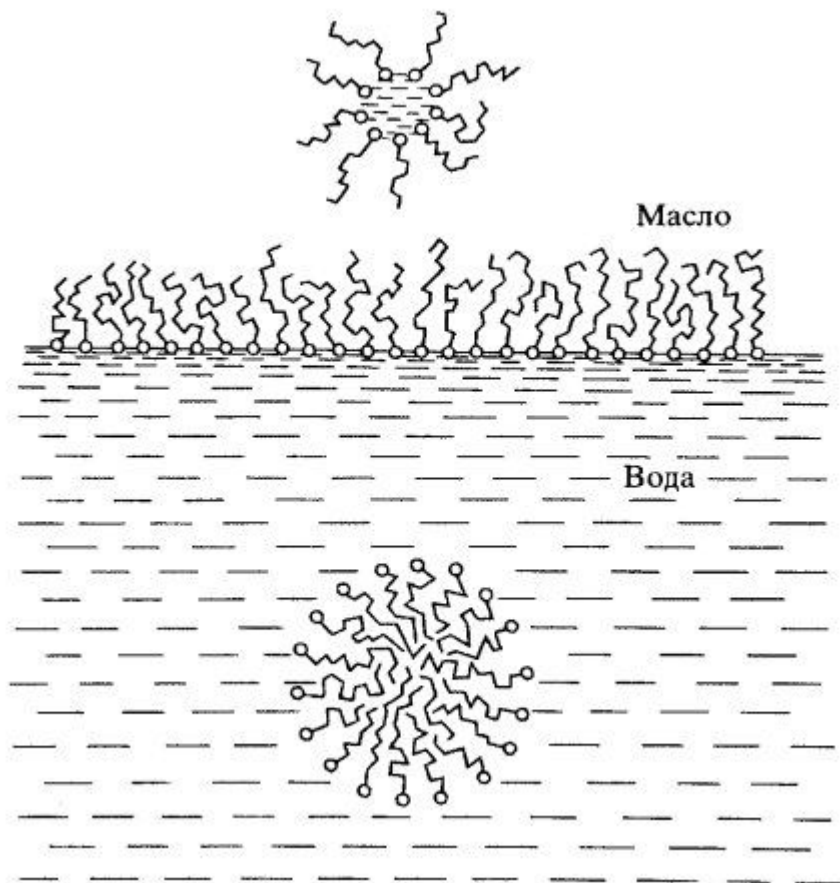
Физическое состояние липидных мембран

- Газ
- Жидкость
- Твердое тело
- Плазма

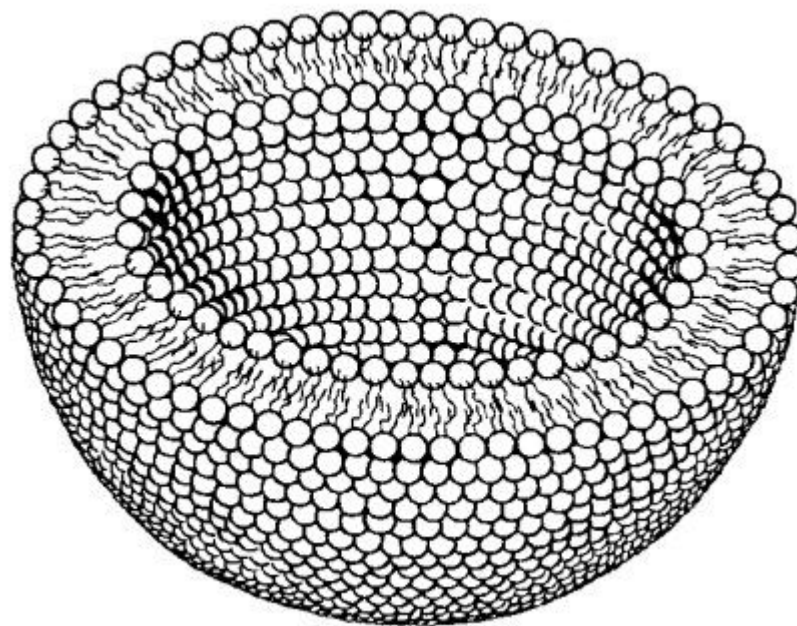
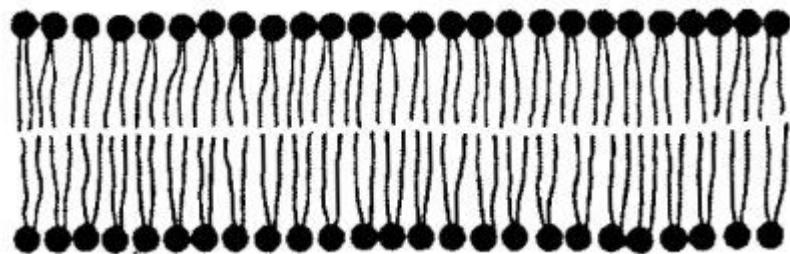
БМ – жидкокристаллическое агрегатное состояние



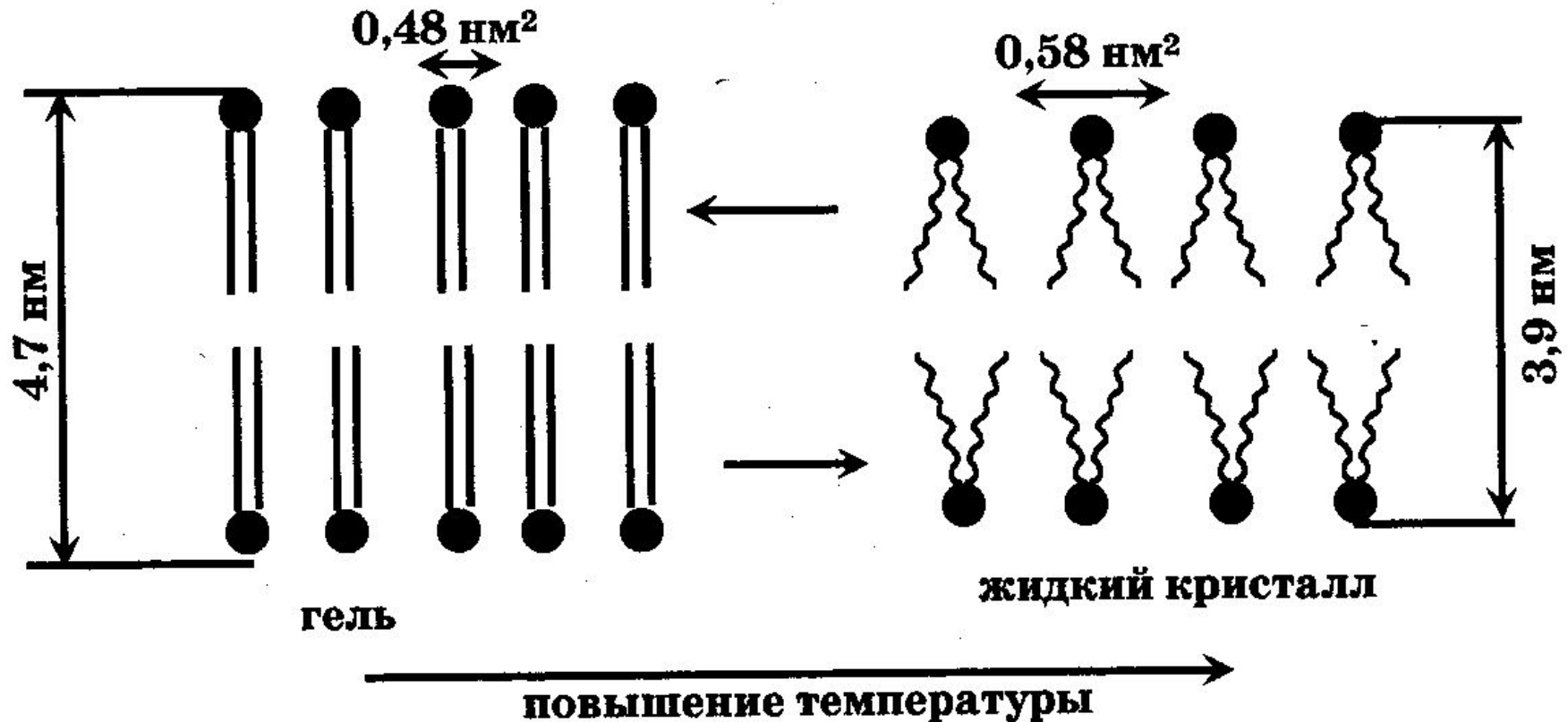
Химическое строение одного из мембранных фосфолипидов - лецитина. Внизу показаны структуры, образуемые молекулами фосфолипидов в воде в результате самосборки



мицелла



Фазовые переходы в липидных мембранах

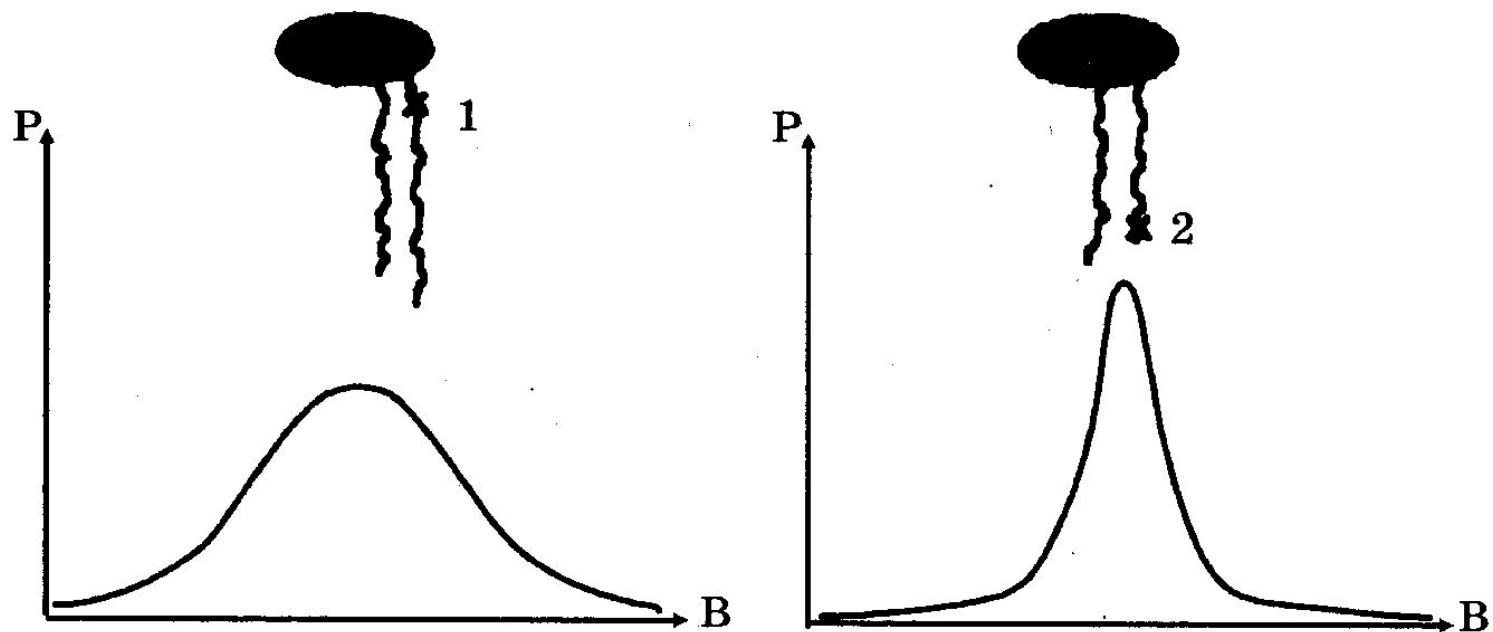


Методы изучения БМ (состав, структура, строение)

- Электронная микроскопия
 - а) оптический микроскоп: отдельные части клетки
 - б) электронный микроскоп
 - внутреннее строение, клеточные органеллы, детали строения БМ
- «Замораживание-скол-травление»
- ЭПР, ЯМР, флуоресцентные методы: динамические характеристики БМ

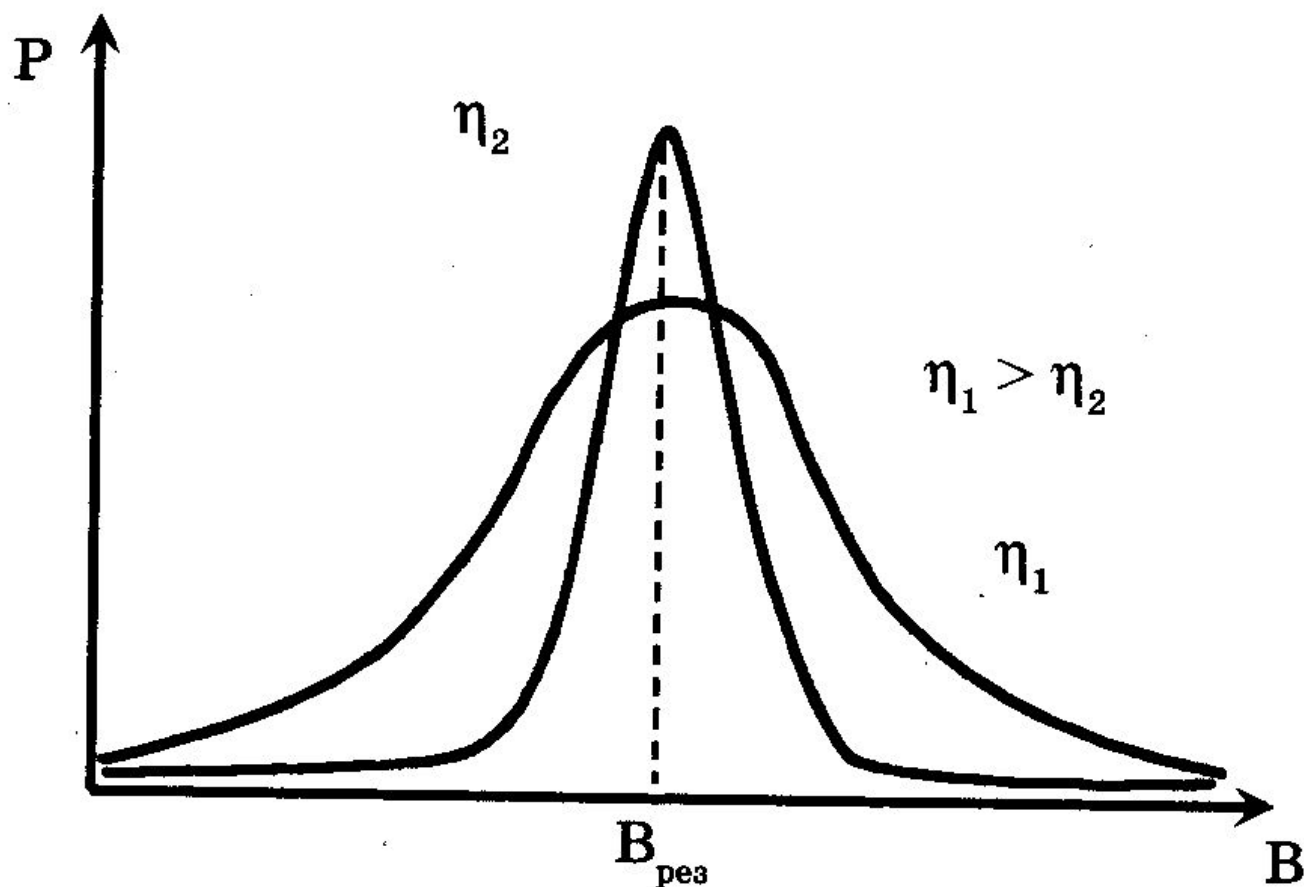
$$\lambda = \frac{h}{mV} \cong 0,1 \text{ нм}$$

ЭПР



- Различия в спектрах ЭПР в зависимости от способа прикрепления спиновой метки к фосфолипидной молекуле

Изменение спектров ЭПР при увеличении подвижности (уменьшении вязкости)

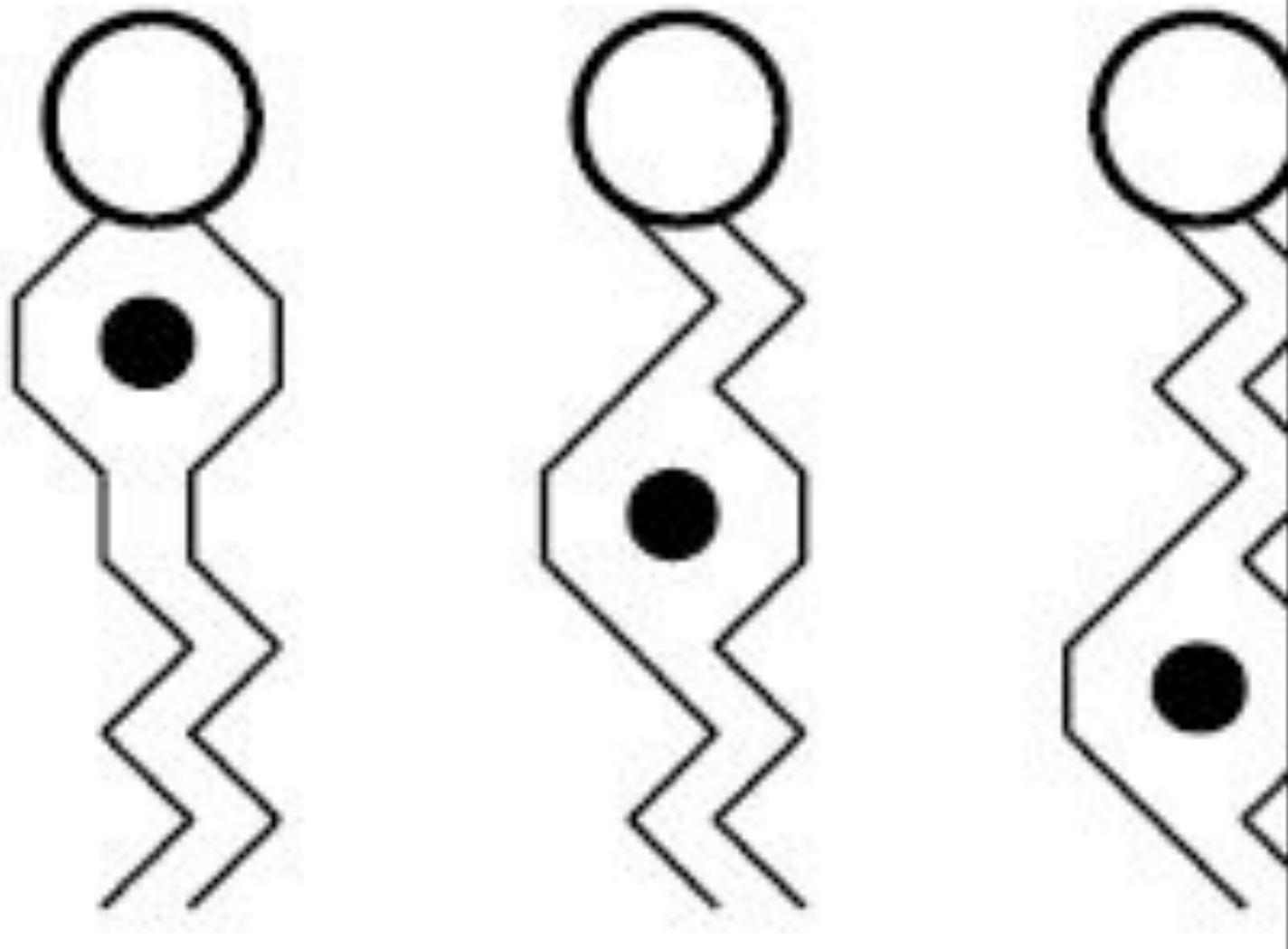


Физические свойства мембран

Подвижность молекулярных компонентов в мембранах

- **Вращательная подвижность.** Время поворота липида вокруг своей оси на 1 рад $\sim 10^{-9}$ с
- **Латеральная диффузия** - перемещение молекул липидов **вдоль** слоя.
- Коэффициент латеральной диффузии $D \sim 10^{-7} - 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$

Передвижение иона в липидном слое мембран



Трансбислойное движение: флип-флоп-переход

Время движения в БМ:

- -БМ электрического органа угря 3-7 мин
- -БМ эритроцитов 20-30 мин
- Модельные везикулярные мембраны 10 - 20 ч и более

Константы латеральной диффузии мембранных белков

Клетки	Белки	$D, \text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	Темпе- рату- ра, °C	Метод
Гетерокарионты (мышь — человек)	Поверхностные антигены	$2 \cdot 10^{-10}$	37	Слияние мембран
Мышечное волокно	Поверхностные антигены	$(1 \div 3) \cdot 10^{-9}$	25	Флуоресцентная метка
«Тени» эритроцитов	Интегральные белки	$4 \cdot 10^{-11}$	37	Слияние
Мышца эмбрионов	Рецепторы конканавали- на А	$(4 \div 7) \cdot 10^{-10}$	22	Электрофорез
Наружные сегменты палочек сетчатки	Родопсин	$(2 \div 6) \cdot 10^{-9}$	20	ЭПР
Миобласты	Ацетилхолиновые рецеп- торы	$(4 \div 5) \cdot 10^{-11}$	22	ЭПР
Фибробласты	Рецепторы гормонов	$(3 \div 5) \cdot 10^{-10}$	23	ЭПР

Микровязкость углеводородной области липидного бислоя в искусственных и природных мембранах, маслах и жидкостях

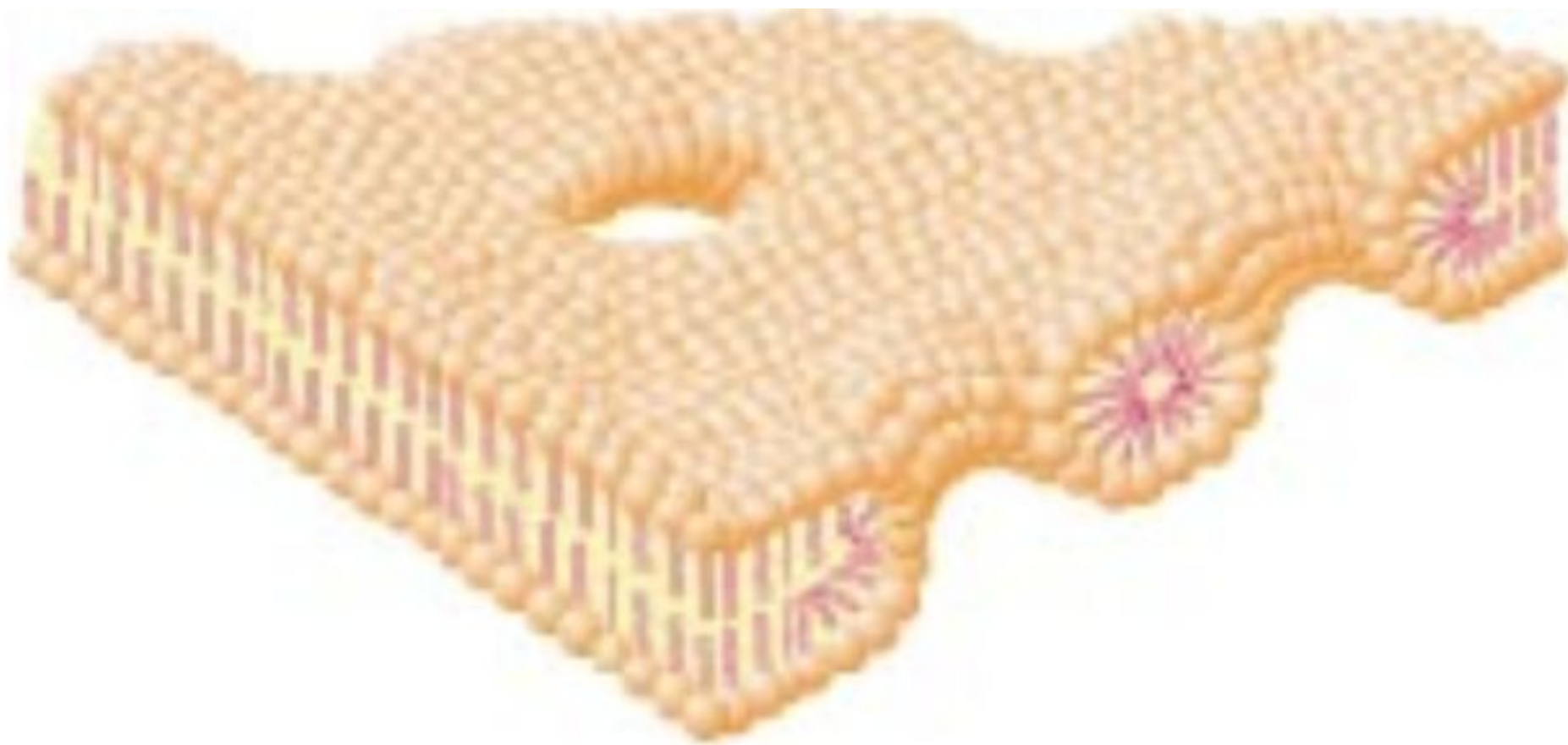
$$\eta = \frac{k_6 T}{6\pi D r}$$

Объект	Вязкость, П	Температура, °С	Метод измерения
Эритроциты человека	2,5	37	Флуоресцентный зонд
«Тени» эритроцитов	3,8	37	То же
Липиды, экстрагированные из «теней» эритроцитов	3,4	37	»
Мембраны <i>E. coli</i>	2,5	Температура роста	ЭПР-спиновый зонд
Липиды, экстрагированные из мембран <i>E. coli</i>	1,8–1,9	То же	То же
Яичный лецитин	0,73	37	Деполяризация флуорес- ценции перилена
То же + холестерин (3 : 2)	6,4	37	То же
Дипальмитоиллецитин	3,9	37	»
То же + холестерин (6 : 1)	11	37	»
Льняное масло	0,331	30	—
Оливковое масло	0,84	30	—
Касторовое масло	9,86	30	—
Глицерин	8,3	30	—
Вода	0,0106	30	—

Сквозная пора – критический дефект

- Тепловые флуктуации
- Электрический пробой
- Замораживание
- Действие ПАВ
- Осмотическое давление
- Др

Поры в БМ



Размер поры

$$R < R^*$$

(КРИТИЧЕСКИЙ РАДИУС ПОРЫ)



- Пора залечивается

$$R > R^*$$

(КРИТИЧЕСКИЙ РАДИУС ПОРЫ)



- Необратимое разрушение мембраны - гибель

**Для изучения свойств
индивидуальных липидов
и липидных смесей были
созданы многочисленные
модельные мембранные
системы.**

Мицеллы представляют собой простейшие агрегаты, которые образуют липиды в объемной фазе растворителя.



Использование мицелл в мембранологии, например, связано с изучением вторичной и третичной структуры мембранных белков методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения – данные белки заключают в смешанные мицеллы из липидов и детергентов для моделирования их мембранного окружения и регистрируют их спектральные характеристики.

Мономолекулярные слои на границе раздела фаз воздух-вода.

Многие молекулы с четко выраженными неполярными свойствами адсорбируются на границе раздела фаз воздух-вода, образуя слой толщиной всего в одну молекулу. Такой монослой можно исследовать либо непосредственно на границе раздела, либо после его переноса на какую-либо подложку. Фосфолипиды и другие амфифильные молекулы образуют ориентированные монослои, в которых полярные группы контактируют с водной фазой, а углеводородные цепи обращены в воздух.

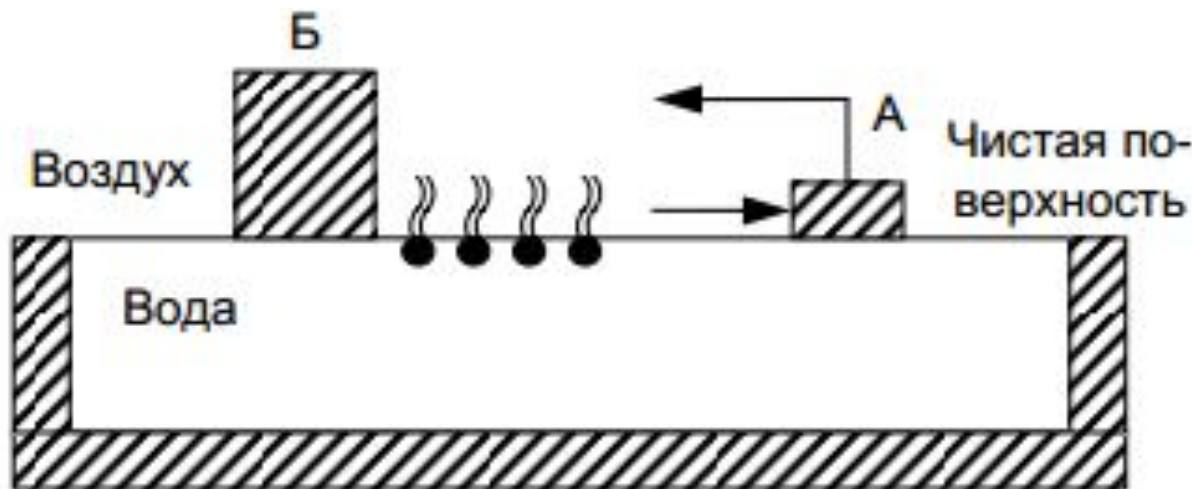
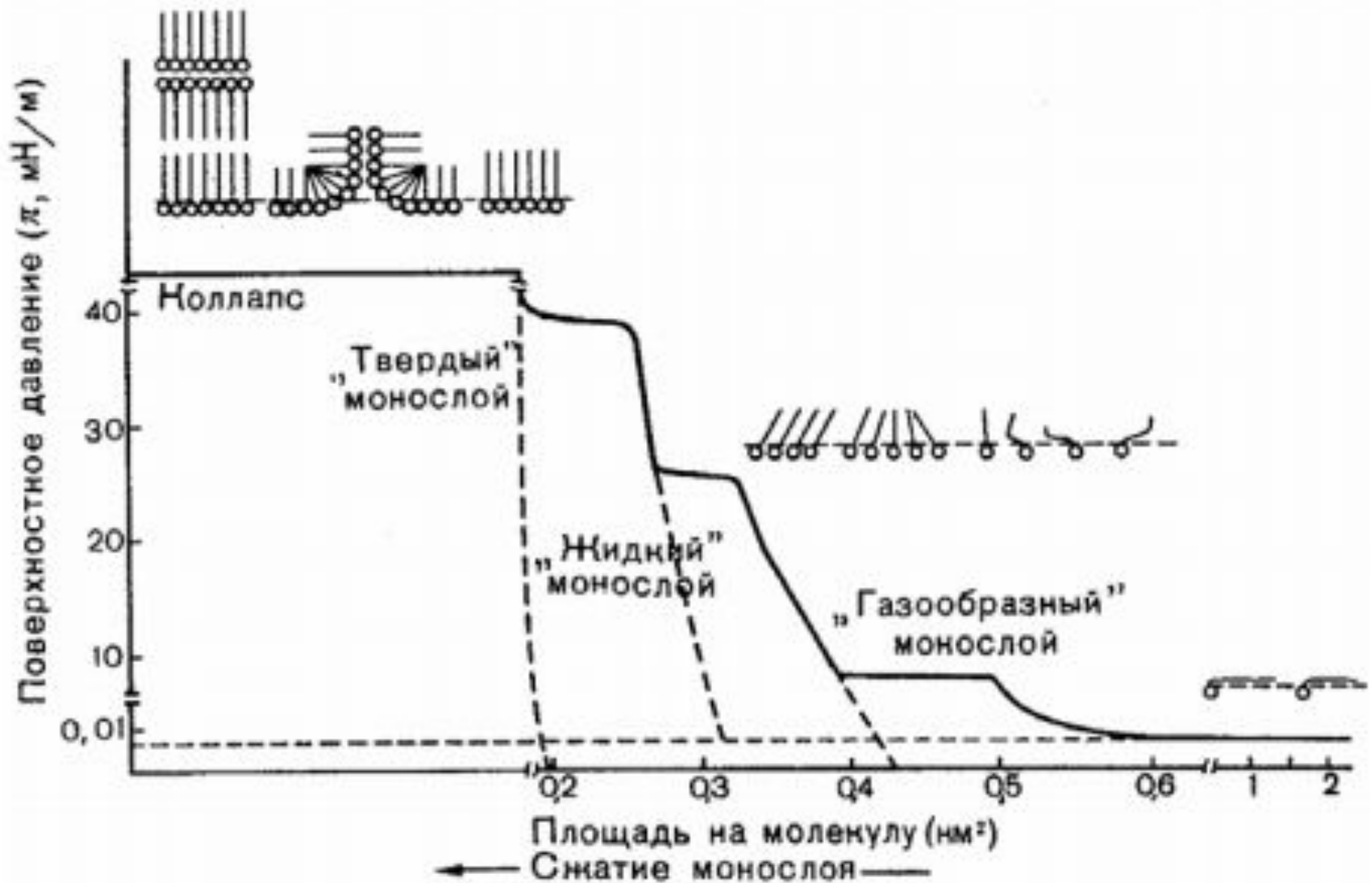


Схема измерения поверхностного давления по методу Лэнгмюра



Общий вид диаграммы "давление - площадь"

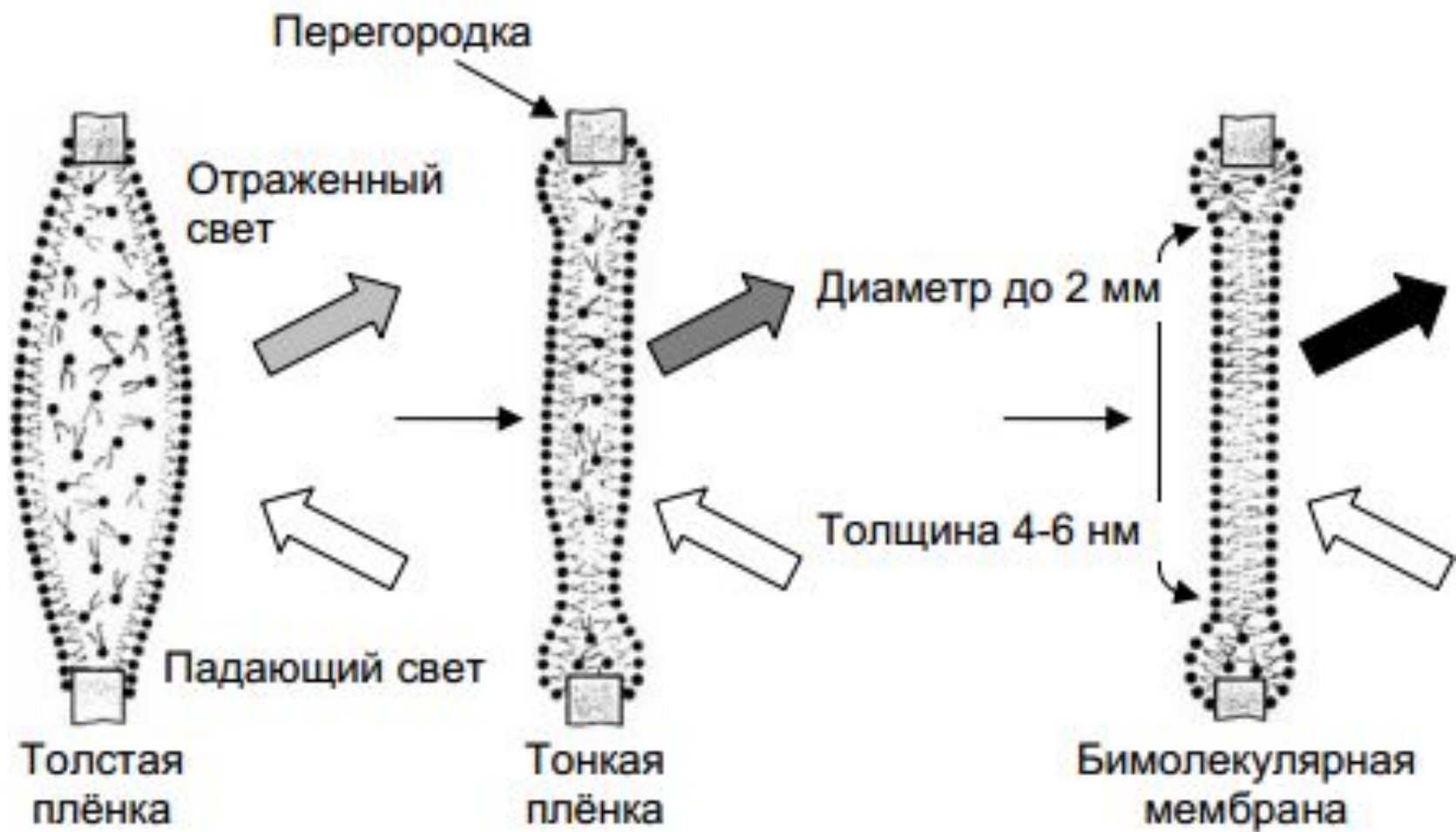
Монослои в настоящее время используют для измерения поверхностных потенциалов, поверхностной вязкости и поверхностной радиоактивности. К достоинствам этой модели относят простоту получения и интерпретации полученных результатов, однако монослои по своей структуре отличаются от биологических мембран, а также не позволяют изучать процессы транспорта через мембраны.

Монослои на твердой подложке.

Монослои, образовавшиеся на границе раздела воздух-вода, можно перенести на твердую подложку, например, на алкилированное предметное стекло. Для этого достаточно просто прикоснуться этим стеклом к монослою (за счет алкилирования поверхность стекла становится гидрофобной). Полярные головки липидов после перенесения монослоя на такое стекло по-прежнему контактируют с водой. Таким образом, можно исследовать монослои, перенесенные на твердую подложку при разных значениях поверхностного давления π . Монослои на твердой подложке позволяют изучать непосредственно липидные монослои, взаимодействие монослоя с белками и другими молекулами, создавать системы антиген-антитело, исследовать мембранные каналы.

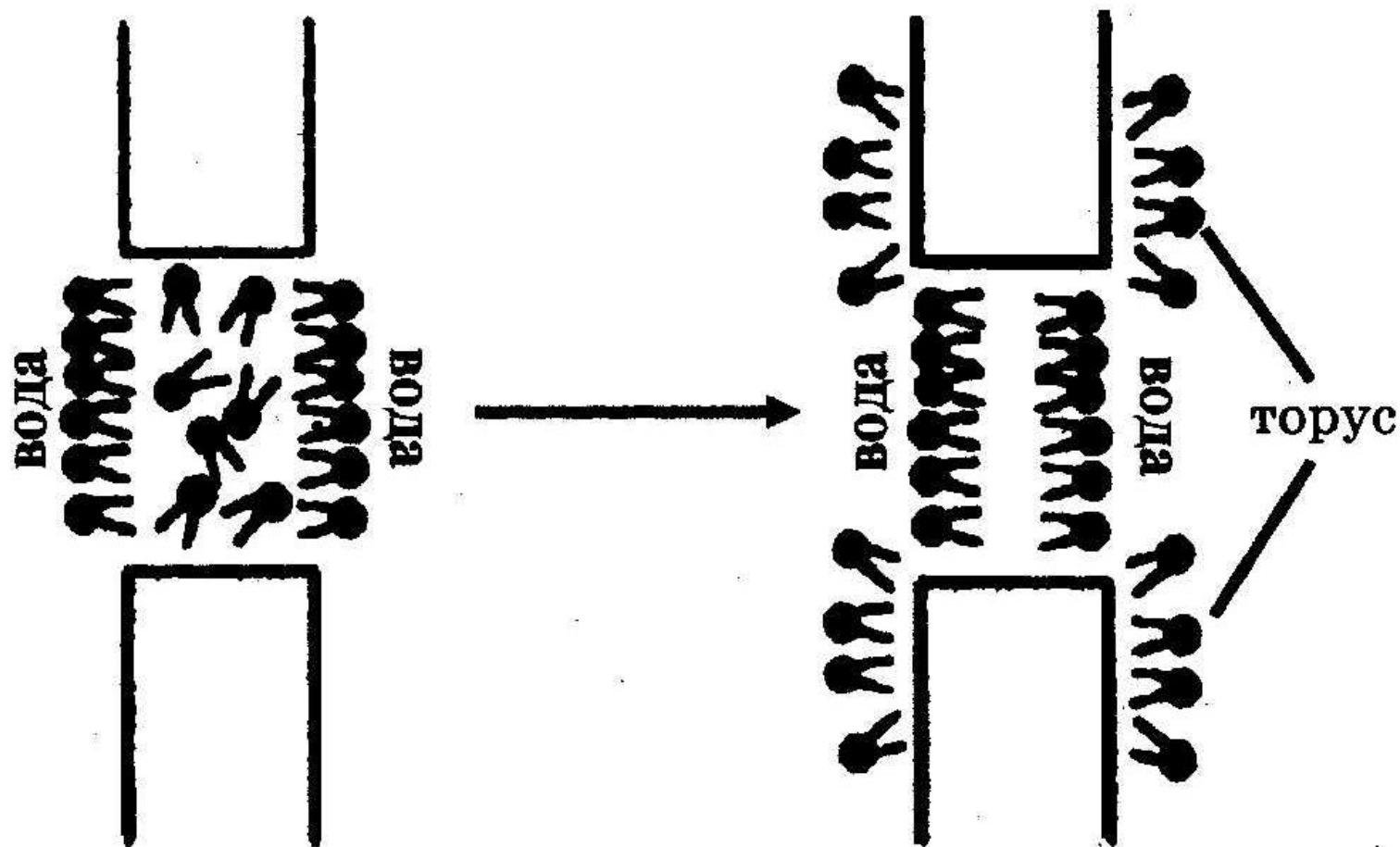
Плоские бислойные мембраны (БЛМ)

Плоские мембраны обычно формируют путем нанесения акварельной кисточкой концентрированного раствора фосфолипида в таких растворителях, как декан, на перегородку из гидрофобного материала (например, из полистирола), в которой имеется небольшое отверстие (диаметром около 1 мм). Перегородка разделяет две камеры, содержащие водные буферные растворы. Большая часть растворителя переходит в воду, а липиды при соответствующих условиях самопроизвольно образуют бислойную пленку, затягивающую это небольшое отверстие



Процесс формирования бислойной мембраны

Образование плоской бислойной липидной мембраны



Важным преимуществом БЛМ является возможность проведения на них электрических измерений. Эта система особенно полезна для изучения пор, каналов или переносчиков, которые облегчают перенос заряда через бислой из одного водного компартмента в другой. В водные камеры помещают электроды, растворы в них можно легко заменять, а измерения тока и/или напряжения являются очень точными и отличаются высокой чувствительностью.

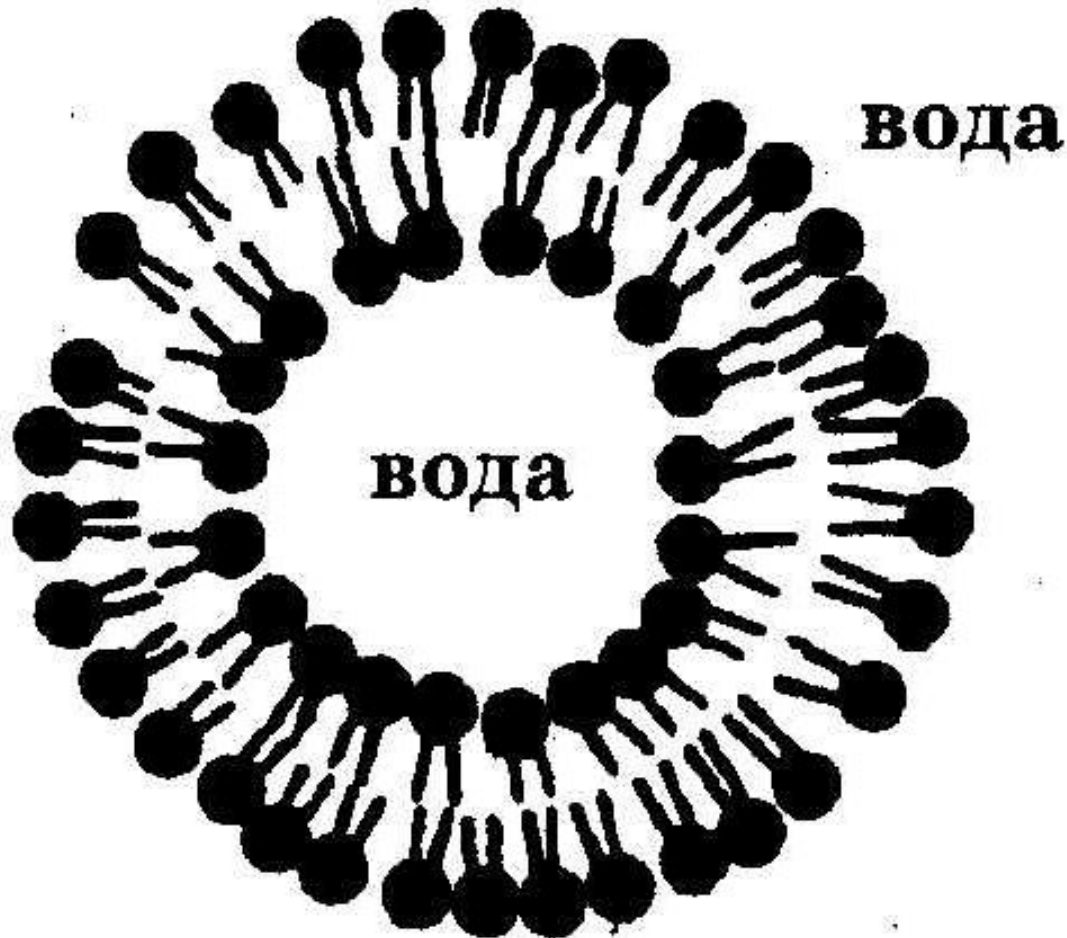
Сравнение свойств искусственных липидных и биологических мембран

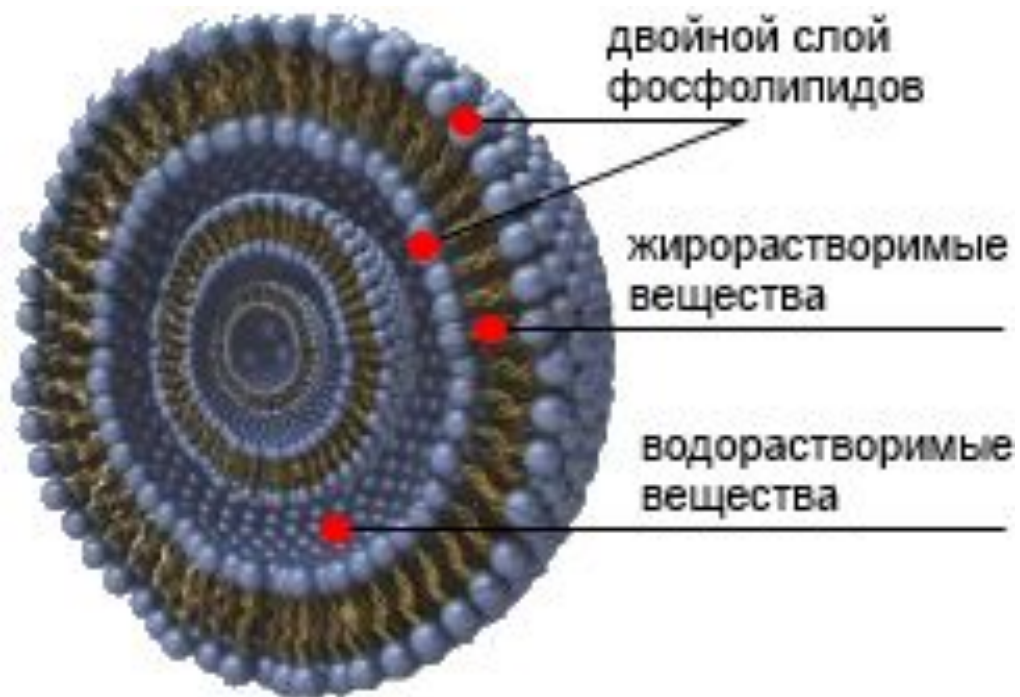
Свойство	Биомембраны	БЛМ
Электронно-микроскопический снимок поперечного среза	Трехслойная структура	Трехслойная структура
Толщина, нм	6,0-10,0	2,5-8,0
Сопротивление, Ом*см ²	10 ² -10 ⁵	10 ⁶ -10 ⁹
Электрическая емкость, мкФ/см ²	0,5-1,3	0,2-1,0
Показатель преломления	1,6	1,56-1,66
Проницаемость для воды, мкм/с	0,5-400	31,7

Липосомы

Термин "липосомы" относится к любым липидным бислойным структурам, имеющим водное содержимое. Многие фосфолипиды при диспергировании в воде самопроизвольно образуют гетерогенную смесь везикулярных структур, состоящих из нескольких бислойных концентрических оболочек. Это были первые липосомы, которые удалось охарактеризовать, и сейчас их называют мультиламеллярными везикулами (МЛВ). Большой интерес представляют моноламеллярные везикулы, т.е. везикулы, образованные одинарным бислоем. Их подразделяют на малые моноламеллярные везикулы (ММВ) с диаметром от 200 до 500 А и большие моноламеллярные везикулы (БМВ) с диаметром от 500 до 5000 А. Можно также приготовить гигантские фосфолипидные везикулы размером с клетку, имеющие диаметр до 300 мкм.

Схема строения однослойной ЛИПОСОМЫ

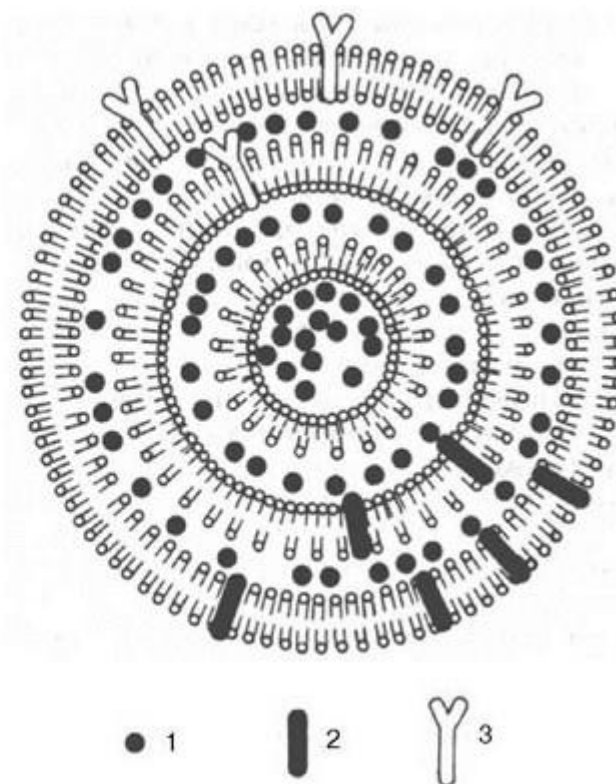




Многослойные ЛИПОСОМЫ

Рис. 11.8. Модель многослойной липосомы с инкапсулированными водо- и жирорастворимыми препаратами (по Грегориадису).

1 - молекулы, растворимые в водном слое; 2 - молекулы, растворимые в липидном слое; 3 - молекулы, растворимые в водном слое с гидрофобными радикалами, проникающими в липидный слой.



Липосомы используют прежде всего как модельные системы, в которые можно встраивать различные белки, а также для создания систем доставки лекарственных препаратов. Важными характеристиками липосом являются их липидный состав, средний диаметр и степень гетерогенности по размерам. О распределении липосом по размеру можно судить по данным:

- 1) гель-проникающей хроматографии;
- 2) светорассеяния;
- 3) ультрацентрифугирования;
- 4) электронной микроскопии.

Особый интерес для тех, кто исследует способность липосом включать в себя различные вещества, представляют такие параметры, как 1) внутренний водный объем, т.е. количество водорастворимого вещества в расчете на моль липида; 2) эффективность включения, или доля водного объема, включенного внутрь везикул. Первый параметр увеличивается с ростом диаметра липосом, а второй прямо пропорционален концентрации липида.

Размеры липидных пор в модельных и клеточных мембранах

Радиус поры r , нм	Объект	Соотношение радиусов пор	Стрессовое состояние
3,0-4,0	Эритроцит	$r_{\text{жк с}} > r_{\text{эп}} \geq r$	Электрический пробой
2,0	То же	$r_{\text{жк с}} > r$	Осмотический гемолиз
1,2	L-клетки	$r_{\text{жк с}} > r_{\text{эп}} \geq r$	Электрический пробой
0,2-2,0	Липосомы	$r_{\text{жк с}} > r$	Осмотический лизис
0,6-0,8	То же	$r_{\text{жк с}} > r_{\text{гель}} \geq r$	Фазовый переход
0,5-2,0	То же	$r_{\text{жк с}} > r_{\text{гель}} \geq r$	Фазовый переход
1,2-1,8	БЛМ	$r_{\text{жк с}} > r_{\text{гель}} > r > r_{\text{эп}}$ гель	Фазовый переход

Разрушение БМ

- Слияние клеток
- Лизис (разрушение)
- Гемолиз (разрушение эритроцитов с выделением гемоглобина)

Липидные мембраны – метастабильные системы

Значительные отклонения параметров БМ от равновесных, приводят к возникновению и накоплению дефектов в структуре