

# МЕМБРАННАЯ БИОЛОГИЯ: ОТ ЛИПИДНЫХ БИСЛОЕВ ДО МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАШИН

Ю. А. ЧИЗМАДЖЕВ

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

## MEMBRANE BIOLOGY: FROM LIPID BILAYERS TO MOLECULAR DEVICES

Yu. A. CHIZMADZHEV

*Structure of biomembranes and different models (starting from lipid bilayers) are described. Electrochemistry of membrane – solution interface and induced ion transport are considered. The mechanisms of different molecular devices, especially electroactivated ion channels are discussed.*

*Описана структура биомембран, различные их модели, начиная с липидных бислоев. Рассмотрены электрохимия границы раздела бислоем – раствор электролита, а также разные варианты индуцированного ионного транспорта. Изложено состояние исследований механизмов действия различных молекулярных машин, в первую очередь электроуправляемых ионных каналов.*

[www.issep.rssi.ru](http://www.issep.rssi.ru)

## ВВЕДЕНИЕ

Мембраны ответственны за выполнение многих важнейших функций живой клетки. Их главная роль, признанная давным-давно, — служить барьером и поддерживать неравновесную концентрацию веществ в цитоплазме. С тех пор мы узнали много нового. Мембрана — это плотина, в которую вмонтированы различные молекулярные машины белковой природы. Мембраны способны избирательно пропускать заряженные частицы — ионы и электроны. Этот селективный транспорт делает возможным рождение и распространение нервного импульса, он поддерживает производство клеточного горючего — АТФ, он заставляет вращаться гребной винт бактерий. Среди разнообразных молекулярных машин есть и насосы, которые осуществляют активный транспорт ионов, потребляя энергию АТФ. В мембранах расположены многочисленные рецепторы, которые поддерживают контакты клетки с окружающей средой. В мембране непрерывно идут разнообразные биохимические реакции. Мембрана для клетки — основа ее существования. Это и ограда, и защита от врагов, и межклеточный телеграф, и энергетическая станция, и многое другое.

## СТРОЕНИЕ МЕМБРАН

Хитроумная Природа сконструировала разнообразные классы макромолекул на все случаи жизни. Нужны генетический код и система самовоспроизведения — получите молекулы ДНК, нужны молекулярные машины — вот вам всевозможные белки, хотите отгородиться от окружающего пространства и поддерживать порядок в неравновесных условиях — получите амфифильные молекулы фосфолипидов, способные к самосборке. Эти молекулы состоят из двух совершенно разных частей: полярной головки и гидрофобного хвоста. Такая молекула из-за непримиримых внутренних противоречий несчастна в любой среде — и в водном, и в органическом растворе. Хорошо, если можно расположиться на границе раздела таких растворов, но это не всегда возможно. С

амфифильными соединениями мы знакомы с детства, когда с увлечением пускали мыльные пузыри. Стенка мыльного пузыря — это по сути та же клеточная мембрана, только устроено в ней все наоборот. Пузырь живет на воздухе, поэтому гидрофобные хвосты торчат из него наружу, а гидрофильные головки мыльных молекул направлены в водную пленку. Клеточная же мембрана окружена водой, поэтому гидрофобные хвосты слагающих ее амфифильных молекул должны прятаться внутрь, а гидрофильные головки выставлены наружу. Вот и вся разница, если не считать того обстоятельства, что мембраны сложены из других молекул — фосфолипидов. Однако амфифильность присуща и этим молекулам, что делает возможной самосборку мембран [1].

Когда в растворе находится немного липидных молекул, то они рассеяны по всему объему, редко встречаются друг с другом и страдают от воды в одиночку. При более высокой концентрации липидные молекулы сталкиваются чаще. И тут выясняется, что вместе им лучше, чем по отдельности: можно прижаться друг к другу гидрофобными хвостами и тем самым хотя бы частично защитить их от воды. Говоря более строго, такое объединение молекул энергетически выгоднее, чем раздельное пребывание в воде. Поэтому, будучи смешанными с водой, липидные молекулы быстро образуют агрегаты так, чтобы хвосты были упрятаны внутрь, а гидрофильные головки выставлены наружу, в воду. Агрегаты принимают разные формы, например цилиндров, шариков и т.п. Это свойство амфифильных молекул называется полиморфизмом.

Иногда в смеси возникают плоские слои, в которых все молекулы выстроены одинаково. Какой же смысл в таком объединении, если хвостам молекул контакт с водой противопоказан? Оказывается, есть простой способ избежать этого контакта. Надо прижать к одному слою молекул другой слой — прижать гидрофобными поверхностями друг к другу. Получится двойной слой липидов с гидрофильными головками, торчащими в противоположные стороны. Такой бислой образуется сам по себе, без постороннего вмешательства. Просто молекулам энергетически выгодно расположиться именно так. В этом и состоит самосборка липидных бислоев мембран. Именно так в лабораторных условиях удается воспроизвести процесс, который уже миллионы лет происходит в живой природе.

Первую искусственную бислоевую липидную мембрану получили американский ученый Мюллер и другие около 30 лет тому назад. Вот как это сделано. В двухкамерную ячейку с перегородкой, в которой есть небольшое отверстие, наливают электролит. Липид, предварительно растворенный в каком-нибудь органическом растворителе (это может быть, например, декан

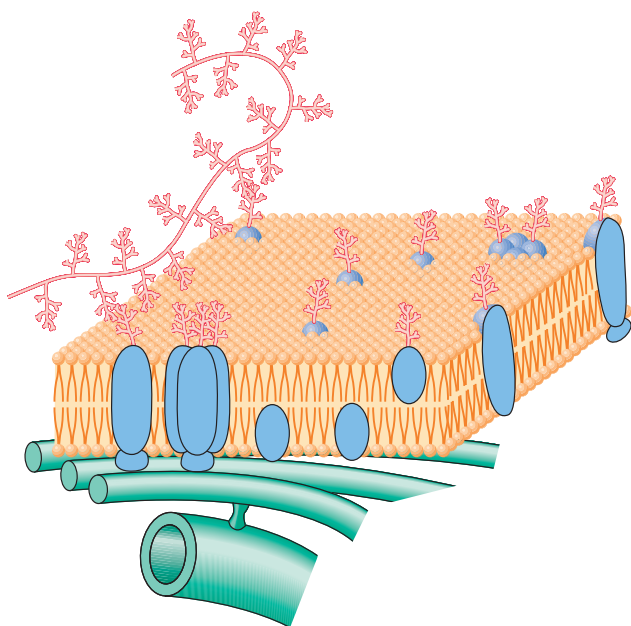
или гептан), набирают в пипетку или на кисточку и наносят на отверстие в перегородке. Под действием тяжести и поверхностных сил капелька липидного раствора постепенно растекается и утончается. Когда ее толщина приближается к длине волны видимого света, мембрана расцветается всеми цветами радуги подобно пленке масла, пролитого на воду. Цветные полосы медленно плывут по поверхности пленки, появляются и исчезают, переходят одна в другую. Но вот на пленке возникает черное пятно. Оно растет, расширяется и постепенно захватывает почти всю поверхность. Пленка становится черной. Это слово несет для экспериментатора особый смысл. Оно говорит не только о цвете, но и, что особенно важно, о толщине возникшей структуры. Если толщина слоя вещества меньше длины волны света, то такой слой уже не отражает света и кажется черным. Это справедливо и для липидных мембран. Когда измерили толщину почерневшей мембраны, то оказалось, что она составляет примерно  $50 \text{ \AA}$ , что намного меньше длины волны видимого света, и равно длине двух липидных молекул.

Бислоевые липидные мембраны (БЛМ) плоской формы или замкнутые в сферические везикулы (липосомы) сыграли огромную роль в развитии науки о мембранах. Конечно, они не могут воспроизводить сложные функции клеточной мембраны, поскольку в них нет нужных для этого белков. Но простейшие задачи, например разделение двух растворов, им, несомненно, под силу. Проверить такую способность служить барьером можно измеряя электрическое сопротивление БЛМ. Оказалось, что сопротивление БЛМ очень велико: оно равно примерно  $10^7$ – $10^8 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$ . Заметим, что слой раствора электролита такой же толщины (например, KCl в концентрации 0,01 М) имел бы сопротивление всего  $10^{-4} \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$ . Отличие в  $10^{12}$  раз! Следовательно, бислоевая липидная мембрана — очень хороший изолятор, она идеально отделяет растворы один от другого, не давая им смешиваться. Почему же тончайшая липидная пленка толщиной всего  $50 \text{ \AA}$  так успешно противостоит электрическому току? Причину опять-таки надо искать в амфифильности липидных молекул. Спрятав внутрь мембраны свои хвосты, они создают внутри бислоя гидрофобную сердцевину. На языке физики это значит, что в таком слое очень низка диэлектрическая проницаемость — здесь она составляет примерно 2, тогда как в воде равна 80. В такую мембрану не хотят заходить заряженные частицы. Когда по соседству находятся две среды, одна с низкой диэлектрической проницаемостью (липид), а другая с высокой (вода), то присутствующие в системе ионы, несомненно, предпочитают воду. Предпочтение это очень явно выражено. Концентрации ионов в водной и липидной фазах отличаются в  $10^{12}$  раз. Иными словами, если концентрация ионов в

одном растворе равна 0,1 М, то в липидной фазе она должна упасть до  $10^{-13}$  М. Ясно, что при такой ничтожной концентрации заряженных частиц проводимость мембраны должна быть чрезвычайно низкой. Это и наблюдается на опыте.

Биологическая мембрана по своему составу и строению сложнее описанного выше липидного бислоя. По весу примерно половина бислоя приходится на различные фосфолипиды, половина — на белки. Площадь, приходящаяся на одну фосфолипидную головку, составляет примерно  $60 \text{ \AA}^2$ . Белки значительно крупнее, их молекулярный вес в среднем на два порядка больше, чем у липидов. Это значит, что концентрация белков на два порядка ниже, чем концентрация липидов. Снаружи мембрана, как правило, имеет слой гликокаликса (рис. 1), а внутри она связана с мембранным или цитоскелетом. При физиологических температурах мембрана — это анизотропный жидкий кристалл. В нормальном к поверхности направлении она ведет себя как твердое тело, а в латеральном — как липидная жидкость, инкрустированная белками. Коэффициент латеральной диффузии липидов лежит в интервале  $10^{-7} - 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$ , тогда как для белков он составляет примерно  $10^{-10} \text{ см}^2/\text{с}$ .

Возвращаясь к модельному липидному бислою, отметим, что он является идеальной матрицей, на которой можно последовательно реконструировать и изучить всевозможные мембранные системы. Сама по себе БЛМ открывает огромные возможности для изучения



**Рис. 1.** Схематическое изображение плазматической мембраны (подробности в тексте)

тех свойств мембран, которые обусловлены прежде всего липидным матриксом. Например, можно исследовать электрохимические свойства границы раздела БЛМ — раствор электролита, строение двойного электрического слоя, адсорбцию заряженных частиц, изучить механические свойства системы, устойчивость бислоев в электрических полях и механизм их разрушения. Наконец, система двух БЛМ оказалась особенно продуктивной для изучения молекулярного механизма слияния мембран.

## ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПИДНЫХ БИСЛОЕВ

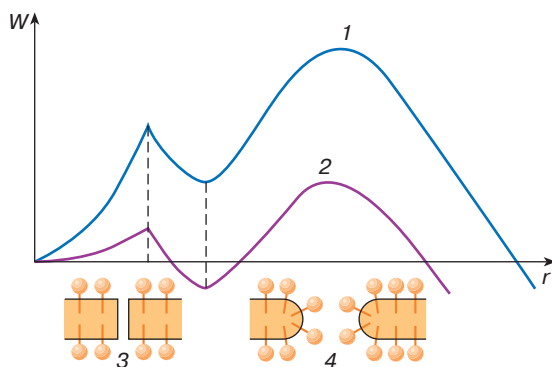
**Распределение потенциала.** Липидная мембрана имеет обычно на обеих поверхностях электрический заряд, который обеспечивается полярными головками фосфолипидных молекул. Этот заряд экранируется противоположно заряженными ионами электролита, которые, находясь в броуновском движении, формируют диффузную обкладку двойного электрического поля. В результате образуется поверхностный скачок потенциала, величина которого зависит в первую очередь от поверхностной плотности заряда на мембране и концентрации электролита. При поляризации мембраны внешним полем или создании несимметричных по концентрациям электролита условий в окружающих растворах возникает трансмембранный скачок потенциала.

Если мембрана проницаема только по отношению к одному типу ионов, который присутствует в разных концентрациях по обе стороны мембраны, то устанавливается хорошо известный потенциал Нернста. В этом случае мы имеем дело с термодинамическим, равновесным потенциалом. Любая клетка, как известно, живет в неравновесных условиях, так что потенциал уже не является термодинамической величиной, он обусловлен метаболизмом и зависит от активности всевозможных транспортных систем, функционирующих в мембране.

**Насколько устойчива бислоенная липидная мембрана?** Вопрос этот вполне закономерен, так как отношение ее радиуса ( $\sim 1 \text{ м}$ ) к толщине составляет примерно  $2 \cdot 10^5$ ! Казалось бы, самые малые возмущения могут разрушить бислой. Кроме геометрических соображений можно привести энергетические. Действительно, БЛМ находится в контакте с мениском, натяжение ее составляет примерно 1 дин/см. Если ее площадь равна  $\sim 3 \cdot 10^{-2} \text{ см}^2$ , то избыточная поверхностная энергия составляет  $\sim 3 \cdot 10^{-2}$  эрг, которую можно сэкономить, если ликвидировать мембрану и отправить весь материал в область мениска. Опыт говорит о том, что БЛМ живет, значит, она находится в метастабильном состоянии, которое отделено достаточно высоким барьером

от основного состояния, характеризующегося более низкой энергией. Иными словами, мембрана хочет, но не может разрушиться. Эксперименты показали, что ей можно помочь, понизив барьер, например, с помощью достаточно высокого электрического напряжения. Сегодня признано, что разрушение бислоя идет через образование и расширение локальных структурных дефектов — липидных пор. В результате латеральных флуктуаций плотности в начале образуются малые поры с гидрофобными стенками, которые, как правило, быстро захлопываются. Однако существует определенная вероятность превращения гидрофобной поры в гидрофильную в результате переориентации липидных молекул (рис. 2).

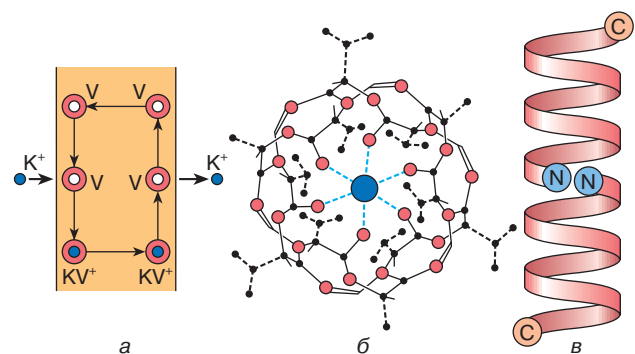
Из рис. 2 следует, что энергия гидрофильной поры зависит от ее радиуса, причем она вначале растет, а потом падает. Иными словами, на кривой этой зависимости имеется энергетический барьер. Если поры узкие, то их расширение невыгодно, поскольку требует дополнительной энергии. Однако если за счет тепловых флуктуаций возникает широкая пора, отвечающая максимальной энергии, то дальше она будет расширяться самопроизвольно. Это приводит в конце концов к разрушению мембраны. При наложении электрического поля высота барьера существенно понижается (рис. 2, 2), а значит, уменьшается и время жизни бислоя. Явление электропорации нашло множество интересных приложений в медицине и биотехнологии [2].



**Рис. 2.** Энергия липидной поры  $W$  как функция ее радиуса  $r$ . Случай 1 — при отсутствии поля, случай 2 — после наложения поля. Левая восходящая ветвь отвечает гидрофобной поре, показанной на 3, а остальные ветви — гидрофильным порам (4)

**Ионный транспорт.** Как уже отмечалось выше, БЛМ — это хороший изолятор, то есть плотина на пути ионного транспорта, обеспечивающая барьерную функцию. Следуя по пути реконструкции разнообразных свойств клеточных мембран, хотелось бы наделить ее

проводящими свойствами. Естественно было бы начать с решения модельной задачи и попытаться разобраться с механизмами переноса, осуществляемого сравнительно простыми соединениями. Уже первые эксперименты показали, что добавление в ячейку с БЛМ жирорастворимых кислот приводит к переносу через мембрану протонов, которые сами по себе через мембрану не идут. А добавление в систему антибиотика валиномицина делает БЛМ проницаемой для ионов калия. Молекула валиномицина напоминает бублик, в дырке которого уютно чувствует себя ион калия [3]. Иными словами, валиномицин образует комплексы с ионами калия (рис. 3, б). В то же время он хорошо растворяется в липидной фазе, так как внешняя поверхность “бублика” гидрофобна, а внутренняя гидрофильна. Картина переноса ионов выглядит следующим образом. К левой границе мембраны, к которой приложено электрическое поле, подходит ион калия и перескакивает на свободную молекулу валиномицина. Этот заряженный комплекс под действием поля мигрирует через мембрану к другой границе. Там ион калия соскакивает в раствор, а свободная молекула валиномицина возвращается обратно (рис. 3, а). Можно сказать, что в мембране вертится карусель, то есть ионы транспортируются с помощью подвижных переносчиков [4]. В случае протонной карусели роль переносчика играет анион жирорастворимой кислоты. В прошлом предполагалось, что системы переноса калия и натрия в электровозбудимых клетках могут действовать по типу подвижных переносчиков. Впоследствии оказалось, что это не так, перенос ионов осуществляется через специализированные каналы. На рис. 3, в показана структура антибиотика грамицидина, который образует канал.



**Рис. 3.** Индуцированный ионный транспорт: а — транспорт ионов калия через мембрану по схеме переносчиков.  $V$  — подвижный носитель валиномицин,  $KV^+$  — комплекс валиномицина с калием; б — структура комплекса  $K^+$ -валиномицин, вид вдоль оси симметрии; в — структура грамицидинового канала, димер образован из двух мономеров, стыкующихся N-концами

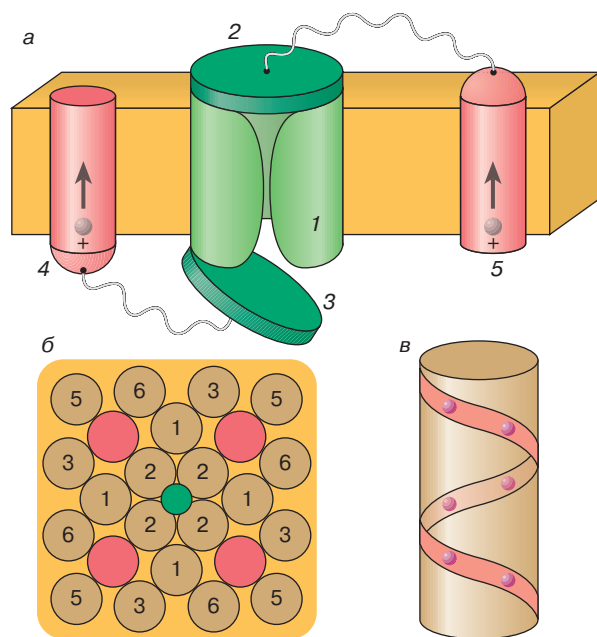
## ЭЛЕКТРОРЕГУЛИРУЕМЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ

Давно выяснилось, что именно мембранный потенциал представляет собой тот язык, на котором разговаривают клетки. На мембране нервного волокна постоянно поддерживается небольшой потенциал покоя порядка  $-40$  мВ. Если сдвинуть внутриклеточный потенциал примерно на  $+20$  мВ, то в клетку устремляются ионы натрия (их много во внеклеточной среде), тем самым еще сильнее сдвигая внутренний потенциал в положительную сторону. Внутриклеточный потенциал приближается к нулю, затем становится положительным и достигает примерно  $50$  мВ. После этого ток в мембране переключается на обратный. Теперь он уже течет наружу, выносит ионы калия, и электрический потенциал внутри клетки постепенно спадает до значения покоя. Всплеск разности электрических потенциалов между внутренней частью клетки и наружной средой носит название потенциала действия. Это и есть, собственно, нервный импульс.

Основные сведения о механизмах электровозбудимости были получены с помощью метода фиксации потенциала, который позволил разделить и измерить парциальные токи натрия и калия как функции времени. При этом измерения проводили на макроскопических участках мембран, так что наблюдалась суммарная активность множества ионных каналов. Многочисленные эксперименты, выполненные Ходжкиным, Хаксли и их последователями [5], дали возможность произвести так называемую функциональную реконструкцию ионных каналов, хотя в те уже далекие 50-е годы можно было только мечтать о выделении и изучении соответствующих белковых молекул. На рис. 4, *a* условно изображен натриевый канал, каким он представлялся на основании электрофизиологических измерений. Под номером 1 находится ионофорная группа, отвечающая за селективность канала и его проводимость в открытом состоянии. Она снабжена парой ворот – активационными (2) и инактивационными (3). Они управляются электросенсорами 4 и 5, которые включают в себя подвижные заряды, перемещающиеся поперек мембраны при изменении мембранного потенциала. В состоянии покоя активационные ворота закрыты, а инактивационные открыты. При деполяризации мембраны, то есть смещении внутриклеточного потенциала в положительную сторону, активационные ворота открываются, а инактивационные закрываются. Этот процесс опосредован перемещением управляющих зарядов в сенсорах 4 и 5, что подтверждено измерением соответствующих переходных (воротных) токов.

Успехи современной электрофизиологии и молекулярной биологии позволили поставить рядом с

функциональной схемой натриевого канала (рис. 4, *a*) его реальный портрет (рис. 4, *б*). Было показано, что натриевый канал – это одна гигантская молекула, которая содержит 24 трансмембранных домена, которые видны на рис. 4, *б* в сечении, параллельном плоскости мембраны. В центре структуры (рис. 4, *б*) находится ионофорный участок, а красные кружки на портрете натриевого канала – это S4-домены, играющие роль электрических сенсоров, управляющих воротами. На рис. 4, *в* показан один S4-домен, содержащий заряженные аминокислоты. Это удалось установить с помощью разработанного Неером и Сакманом [6] метода пэч-кламп, который произвел революцию в мембранных исследованиях. Они научились отрывать от клеточной мембраны с помощью тонкого стеклянного капилляра маленький кусочек (пэч), площадью примерно  $1 \text{ мкм}^2$ . Если вам повезло, на этом пятячке может оказаться один-единственный ионный канал, который теперь можно спокойно изучать. После всего этого вступила в игру молекулярная биология, которая умеет осуществлять точечные мутации и тем самым заменять любые аминокислоты в белковой цепи. Идея последующих действий проста: давайте варьировать аминокислотный состав и тут же смотреть, как изменятся функциональные характеристики канала, например зависимость его



**Рис. 4.** – Функциональная реконструкция натриевого канала (*a*); вид на сечение канала плоскостью, параллельной поверхности мембраны; каждый кружок – сечение трансмембранного домена (*б*); *в* – один из S4-доменов (вид сбоку), заряженные аминокислоты показаны красными точками (подробности в тексте)

проводимости от потенциала. Если мы хотим найти электросенсор, естественно заменить заряженные аминокислоты на нейтральные. Именно так были найдены S4-домены, управляющие проводимостью натриевых каналов. Аналогично проводился поиск центров селективности в ионофорном участке канала. Так же искали протонную тропу в бактериородопсине, который является светоактивируемым насосом.

Отдавая должное всем этим замечательным исследованиям, надо понимать, что за кадром пока остается важнейший вопрос о механизмах и динамике конформационных изменений белка. Первые попытки в этом направлении делаются, но еще не пришло время рассказывать о них.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ограниченный объем статьи не позволил остановиться на увлекательных примерах, в которых мембраны выступают как важнейшие посредники в энергетических преобразованиях или способствуют движению бактериальной клетки, используя свободную энергию ионных градиентов. Именно мембраны позволяют осуществлять энергопотребляющие процессы, минуя прямое использование АТФ. Особенно ярко это проявляется в ходе передачи импульсов по нервным волокнам, который можно реализовать в течение долгого времени при отсутствии АТФ. Нервное волокно имеет избыточный запас свободной энергии в форме перепада ионных

концентраций, созданный изначально за счет затрат АТФ. Быстрый информационный отклик в виде пачки нервных импульсов возможен именно потому, что волноно все время, на всякий случай, находится под напряжением.

Хотелось бы надеяться, что нам удалось показать, насколько увлекательна наука о мембранах, которая в настоящее время стремительно развивается.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.Ф. Биофизика мембран // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 6. С. 4–12.
2. Антонов В.Ф. Липидные поры: Стабильность и проницаемость мембран // Там же. 1998. № 10. С. 10–17.
3. Антонов В.Ф. Мембранный транспорт // Там же. 1997. № 6. С. 6–14.
4. Маркин В.С., Чизмаджев Ю.А. Индуцированный ионный транспорт. М.: Наука, 1974. 251 с.
5. Ходжкин А. Нервный импульс. М.: Мир, 1965.
6. Регистрация одиночных каналов / Под ред. Б. Сакмана, Э. Неера. М.: Мир, 1987. 448 с.

*Рецензент В.Ф. Антонов*

\* \* \*

Юрий Александрович Чизмаджев, доктор химических наук, профессор кафедры биофизики МГУ, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией биоэлектрохимии Института электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН. Область научных интересов – биофизика мембран. Автор 250 научных трудов и трех монографий.