ЛИГАНДЫ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С БИСЛОЕМ

Множество фактов свидетельствует о гетерогенности биологических мембран как в продольном, так и в поперечном направлениях. Трансмембранная асимметрия означает, что разные половины бислоя имеют разный состав. Установлено, что интегральные мембранные белки встроены в мембрану асимметрично и эта асимметрия стабильна. Таким образом, к цитоплазматической и наружной поверхностям мембраны обращены разные белковые домены. Получено множество данных (в первую очередь на эритроцитах) о том, что совершенно разным может быть и фосфолипидный состав двух половин бислоя. Как создается эта липидная асимметрия и за счет чего она поддерживается — пока неясно, хотя имеются данные о существовании АТР-зависимых транслоказ, которые ускоряют перенос липидов через бислой. Другими факторами, определяющими асимметрию мембран животных клеток, являются взаимодействия липидов с цитоскелетом и с внеклеточным матриксом на ее поверхности.

Имеются данные и о латеральной гетерогенности биологических мембран. Это могут быть достаточно обширные специализированные участки мембраны, например апикальная или базолатеральная области плазматической мембраны поляризованных эпителиальных клеток. Примером того, как в пределах одной мембраны соседствуют области с разным составом и функциями, могут служить менее протяженные соприкасающиеся и несоприкасающиеся участки тила-коидной мембраны. Все это показывает, что молекулярная организация мембран гораздо сложнее, чем это следует из жидкостно-мозаичной модели, первоначально предложенной Сингером и Николсоном.

Классы лигандов:

Литература, описывающая взаимодействие низкомолекулярных соединений с биологическими и модельными мембранами, чрезвычайно обширна. Для простоты разделим эти соединения в соответствии с их полярностью на следующие классы: неполярные, амфифильные и ионные. С учетом такой классификации кратко рассмотрим некоторые работы, посвященные взаимодействию лигандов с мембранами.

Класс I: неполярные вещества

Липидный бислой, вообще говоря, можно рассматривать как двумерную жидкость, поэтому определенный интерес представляет способность этой жидкости растворять небольшие неполярные молекулы. Такие данные весьма ценны для понимания того, как гидрофобные домены белков взаимодействуют с бислоем. В качестве примера можно привести исследование раствора гексана в диолеилфосфатидилхолине. Вероятнее всего, в большинстве случаев такие неполярные молекулы, как гексан, локализуются в центре бислоя. Такая локализация для гексана была выявлена с помощью метода нейтронной дифракции, хотя при более высоких концентрациях гексана вполне возможны более сложные варианты взаимодействия.

Класс II: амфифильные молекулы

Это, безусловно, наиболее обширная из исследованных группа молекул. В нее входят многие анестетики, лекарственные препараты (в частности, транквилизаторы), фармакологическая активность которых зависит от их способности взаимодействовать с мембранами. К этой категории также можно отнести целый ряд антибиотиков и другие природные соединения, в частности соли желчных кислот и жирные кислоты. Кроме того, амфифильными свойствами обладают многие используемые для изучения мембран флуоресцентные и спиновые метки. Все эти соединения имеют четко различимые полярные и неполярные части и эффективно взаимодействуют с поверхностью мембраны. Некоторые из таких амфифильных соединений при достаточно больших концентрациях действуют на мембрану как детергенты и разрушают бислой. Показано также, что некоторые амфифильные вещества даже в умеренных концентрациях оказывают на биомембраны повреждающее действие.

Анестетики

Существует много типов анестетиков — от атомарного ксенона до сложных органических гетероциклических соединений. Вообще говоря, фармакологическая активность анестетиков хорошо коррелирует с их коэффициентом распределения в системе масло/вода. Это позволяет предположить, что механизм их действия включает в себя неспецифические взаимодействия с

липидами мембран нервных клеток. Исследованию природы взаимодействия анестетиков с биологическими или модельными мембранами посвящено довольно много работ. Хотя в этих работах и было показано, что анестетики способны нарушать структуру липидного бислоя, механизм(ы) их действия до сих пор остается загадкой. Вполне вероятно, что эффект этих соединений прямо или косвенно связан с влиянием на специфические белки мембран нервных клеток. Методом ЯМР исследовали непосредственное действие на мембраны ряда анестетиков, в частности анестетика общего действия хлоральгидрата, анестетиков местного действия прокаина, тетракаина и дибукаина и стероидных анестетиков. Распределение между мембраной и водной фазами стероидов, обладающих анестезирующим эффектом, не отличается от распределения любых других стероидов, и их влияние на состояние липидного слоя определяется, по-видимому, специфическими структурными особенностями.

Лекарственные препараты

Из лекарственных препаратов лучше всего исследован хлорпромазин. В частности, изучено его проникновение в липидные бислойные везикулы и в мембраны эритроцитов. В обоих случаях коэффициенты распределения в системе мембрана/вода были одинаковы. При введении в эритроциты хлорпромазина в больших количествах происходит существенное изменение структуры бислоя вплоть до его полного разрушения. Максимальное количество проникшего в мембрану хлорпромазина, по оценкам, занимает объем, превышающий объем самого бислоя. Вероятно, при больших концентрациях происходит агрегация незаряженной формы этого препарата в центре бислоя, что приводит к значительному увеличению толщины мембраны. В более умеренных количествах хлорпромазин вызывает образование в мембране пор диаметром ~ 14 А и, как следствие, лизис. Природа формирования пор неясна.

Антибиотики

Токсичность некоторых антибиотиков обусловлена, по всей видимости, их взаимодействием с мембраной.

1. Полимексин В представляет собой циклический полипептид, состоящий из пяти положительно заряженных аминокислотных остатков и гидрофобной ацильной боковой цепи. Антибиотик специфичен в отношении грамотрицательных бактерий (например, E.coli); его мишенью являются в первую очередь отрицательно заряженные липиды в наружной клеточной и цитоплазматической мембранах. Полимиксин имеет настолько высокое сродство к отрицательно заряженным липидам, что с его помощью можно вызвать латеральное перераспределение разных форм липидов в фосфолипидных везикулах. Взаимодействие клеток E. coli с полимиксином приводит к увеличению проницаемости мембран и выходу цитолазматического материала наружу, что однозначно указывает на нарушение мембраны.

2. Полиеновые антибиотики — амфотерицин В, нистатин и филипин — представляют собой мембраноактивные противогрибковые препараты. Они могут вызывать лизис дрожжевых клеток, эритроцитов и клеток млекопитающих. Предполагают, что литическая активность этих антибиотиков обусловлена их ассоциацией со стероидами в мембране и формированием пор. Образование таких комплексов было обнаружено методом ЯМР; определены константы комплексообразования с различными стероидами, встроенными в фосфолипидные везикулы. Богатые стероидами мембраны выявляли по флуоресценции комплексов филипина со стероидами.

3. Адриамицин по своей структуре относится к антрациклиновым гликозидам. Это противоопухолевый препарат, чье применение, правда, ограничено вследствие его кардиотоксич-ности. Адриамицин специфически связывается с кардиолипином в мембране, и, возможно, именно этим обусловлена его токсичность. С помощью молекулярного моделирования и минимизации энергии пытались рассчитать конформацию адриамицина, связанного с поверхностью бислоя за счет электростатического связывания с фосфатными группами кардиолипина.

Дегергенты

Дигитонин и близкие ему по структуре сапонины имеют высокое сродство к мембраносвязанным стеролам и, по-видимому, связываются в стехиометрии 1:1 с содержащимся в мембране холестеролом. Полиеновые антибиотики, адриамицин и дигитонин, — это необычные примеры амфифильных молекул, обладающих избирательным сродством к определенным мембранным липидам.

Мембранные метки

Часто флуоресцентные и спиновые метки представляют собой амфифильные молекулы. В качестве примера можно привести карбоцианиновые красители, используемые для изучения кинетики восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания. Эта метка связывается с одной стороной мембраны и не может с помощью флип-флоп-перехода попасть на другую сторону и связаться с мембранами внутриклеточных органелл. Такая асимметрия связывания доказана экспериментально. Другой пример—спиновые и флуоресцентные метки, которые могут связываться с мембраной и используются для изучения электрических свойств бислоя.

Класс III: гидрофобные ионы

Это молекулы, в которых заряженная группа находится в окружении неполярных групп, чем они и отличаются от простых амфифильных соединений, у которых полярная и неполярная части молекулы разделены. При связывании амфифильной молекулы с мембраной ее полярная группа оказывается локализованной ближе к водной фазе, а неполярная — погруженной в бислой. В случае же гидрофобных ионов заряженная часть по крайней мере на несколько ангстрем проникает в гидрофобную область мембраны. Примерами могут служить ионы тетрафенилбората и тетрафенилфосфония. Гидрофобными ионами являются и некоторые ионофоры. Более детально свойства этих соединений (в частности, причина относительной легкости, с которой они могут пересекать бислой) будут рассмотрены в этой главе ниже.

Класс IV: ионы

Особый интерес представляют одно- и двухвалентные катионы, поскольку они уравновешивают суммарный отрицательный заряд большинства мембран. Кроме того, многие катализируемые мембраносвязанными ферментами мембранные процессы зависят от pH, поэтому большую роль играет распределение протонов вблизи бислоя.

Многие клеточные процессы катализируются мембраносвязанными ферментами. При этом мембрана может выполнять целый ряд функций. Связав фермент с определенной мембраной или участком на мембране, можно локализовать каталитический центр в определенной части клетки. Существует множество примеров, когда несколько действующих последовательно ферментов организованы подобным образом в некий суперкомплекс, что позволяет увеличить суммарную скорость реакции. Многие мембранные ферменты представляют собой белки, пронизывающие мембрану насквозь, и участвуют в трансмембранном транспорте растворенных веществ или в передаче информации с одной стороны бислоя на другую в форме трансмембранного аллостерического сигнала. Другие ферменты являются периферическими мембранными белками и в некоторых случаях способны связываться с мембраной только в ответ на определенный физиологический сигнал.

Во многих случаях липидный бислой играет пассивную роль в функционировании мембраносвязанных ферментов, являясь лишь средой, в которой происходит взаимодействие фермента с субстратом. Нередко, однако, оптимальное функционирование мембранных ферментов оказывается возможным только в присутствии определенных липидов, хотя абсолютная специфичность конкретного липида в активации фермента встречается крайне редко. Интерпретировать данные по влиянию липидов на активность изолированных мембранных ферментов часто очень непросто. Изучение очищенных мембранных белков in vitro ставит перед исследователем огромное множество совершенно особых проблем, не встречающихся при работе с растворимыми ферментами.