Поры (каналы), переносчики
ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Транспорт большинства растворимых молекул через биологические мембраны опосредуется переносчиками или канальными белками. Каналы облегчают транспорт ионов через мембрану, и перенос через них осуществляется очень быстро (10—10^8 ион/с на один канальный белок). Такие высокие скорости транспорта ионов связаны с тем, что канальные белки не претерпевают конформационных изменений при переносе иона с одной стороны мембраны на другую. Столь быстрый транспорт ионов обусловливает такую высокую мембранную проводимость, что удается измерить ионный ток через отдельный канал. В отличие от этого переносчики, которые участвуют в транспортном цикле, претерпевают конформационные изменения. При этом место связывания переносимого вещества бывает обращено сначала к одной, а затем к противоположной стороне мембраны. Как правило, опосредованный переносчиками транспорт веществ через мембрану происходит на несколько порядков медленнее, чем транспорт по каналам.

Пассивные переносчики просто облегчают диффузию веществ через мембрану, в то время как активные используют энергию для транспорта веществ против концентрационного градиента. Известны активные переносчики, сопрягающие транспорт вещества с переносом электронов, гидролизом АТР или фосфоенолпирувата, поглощением света или совместным транспортом иона.

Существуют группы каналов и переносчиков, которые объединяют функционально различающиеся белки, имеющие сходное строение. Близость их аминокислотных последовательностей позволяет предположить, что, несмотря на различия в субстратной специфичности, каналы и переносчики одной группы могут фукнционировать по сходному механизму. По-видимому, белковые комплексы образуют в мембране пору, находящуюся в центре белкового кластера, который содержит несколько (от трех до восьми) копий одинаковых или близкородственных полипептидов или доменов одного полипептида. Эти поры могут открываться или закрываться в ответ на химический или электрический сигнал.

Ясно, что фосфолипидный бислой является очень эффективным барьером для множества небольших растворимых молекул. Тем не менее через плазматическую мембрану, а также через мембраны, ограничивающие различные органеллы (например, митохондрии), постоянно транспортируются полярные вещества и ионы. Этот транспорт целиком опосредован белками, и для объяснения механизма переноса растворимых веществ через мембрану было предложено много моделей. В этой главе мы поставили перед собой задачу суммировать все данные, относящиеся к механизму проникновения вещества через биомембрану. В следующей главе рассматривается вопрос о передаче информации через мембрану; в ней также затрагиваются проблемы клеточной коммуникации, поверхностных рецепторов и преобразования сигналов. Материал этих двух глав взаимосвязан. Например, ответ на определенные сигналы (скажем, связывание молекулы с поверхностным рецептором клетки) быстро изменяет проницаемость мембраны к специфическим ионам, в результате чего изменяется трансмембранный потенциал и/или внутриклеточная концентрация ионов. Однако прежде чем обсуждать эти и другие возможные механизмы передачи сигналов, необходимо выяснить механизмы регуляции высвобождения и накопления молекул в различных компартментах.

Здесь будет полезно ввести несколько терминов, использующихся для характеристики белков или структур, участвующих в трансмембранном транспорте. **В таблице** дается классификация транспортных белков. Прежде всего их подразделяют на *каналы* (или *поры)* и *переносчики.* Поры и каналы часто изображают в виде туннелей через мембрану, в которых места связывания транспортируемых растворимых веществ доступны с обеих сторон мембраны одновременно. Канальные белки не претерпевают никаких конформационных изменений в процессе переноса растворимых веществ с одной стороны мембраны на другую. Напротив, конформация переносчиков в процессе транспорта различных веществ изменяется.

Переносимое вещество связывается с одной стороны мембраны, и для высвобождения его с другой стороны в переносчике должно произойти определенное конформационное изменение. При этом в любой момент времени место связывания вещества доступно только

с одной стороны мембраны.

Каналы и поры также претерпевают конформационные изменения, однако последние регулируют лишь их открывание и закрывание и не касаются самого процесса переноса. Две основные группы каналов, приведенные в таблице, разделяются на каналы, работа которых регулируется изменением *напряжения электрического поля* или *химическим путем.* Каналы первого типа открываются или закрываются в ответ на изменение трансмембранного потенциала;
наиболее изученными из них являются каналы электровозбудимых клеток, например нервных или мышечных. Каналы второго типа отвечают на действие специфических химических агентов; наиболее детально изученные из них — каналы, связывающие нейро-медиаторы, например ацетилхолин. Так, никотиновый ацетилхоли-новый рецептор при связывании с ним нейромедиатора переходит в открытую конформацию и пропускает одновалентные катионы.

Термины *пора* и *канал* обычно взаимозаменяемы, однако под порой чаще понимают некие неселективные структуры, которые Различают вещества главным образом по размеру и пропускают все достаточно малые молекулы. Под каналами чаще всего понимают ионные каналы, которые, как теперь известно, широко распространены во многих типах клеток, отличных от нервных и мышечных (например, в эпителиальных клетках).

Переносчики можно разделить на две группы: *пассивные* и *активные.* Мы будем использовать термин *пассивный переносчик* в том случае, когда при его участии осуществляется перенос через мембрану единственного типа веществ. Переносчики-унипортеры только увеличивают поток вещества, идущий без потребления энергии, т. е. по градиенту электрохимического потенциала. Такой процесс называется *облегченной диффузией.* Наиболее полно изученным пассивным переносчиком является переносчик глюкозы в эритроцитах.

Активные переносчики осуществляют перенос веществ через мембрану с затратами энергии, в результате эти вещества накапливаются с одной стороны мембраны. При этом транспорт вещества должен быть сопряжен с другим, запасающим свободную энергию процессом. Почти все *первичные активные переносчики* являются ионными насосами, в которых перемещение иона прямо сопряжено с поставляющей энергию химической или фотохимической реакцией. Примером ионного насоса является бактериородопсин, который для переноса протонов через мембрану использует энергию фотонов видимого света. В большинстве случаев ионные насосы являются *электрогенными:* при работе первичного насоса осуществляется перемещение заряда, в результате чего происходит разделение электрических зарядов и на мембране создается напряжение.

Первичные активные переносчики генерируют напряжение и создают трансмембранные ионные градиенты. *Вторичные активные переносчики* используют такие градиенты в качестве движущей силы для транспорта растворимых веществ. Наиболее полно охарактеризованным примером такого рода является белок — переносчик лактозы (лактозопермеаза) из *Escherichia coli.* Этот переносчик использует протонный электрохимический градиент, генерируемый дыхательной электронтранспортной цепью, в качестве движущей силы для накопления лактозы в клетке. Это пример *симпорта,* когда через мембрану одновременно переносятся два разных вещества (например, протоны и лактоза). *Антипортеры* осуществляют транспорт веществ в противоположных направлениях. Так, например, белок полосы 3 эритроцитов осуществляет сопряженный транспорт $C1^-$ и НСОз в противоположных направлениях через эритроцитарную мембрану.

Термины *перемеаза, транслоказа* и *переносчик,* являющиеся синонимами, часто используют по отношению к транспортным белкам, отличным от первичных активных переносчиков. Обычно термин «пермеаза» применяют при описании бактериальных транспортных белков. Термин «переносчик», по-видимому, лучше использовать по отношению к ионофорам или сходным с ними структурам, которые связываются с ионами и переносят их через бислой в составе комплекса.

Классификация транспортных белков, представленная в таблице, основана главным образом на энергетике и механизме транспорта растворимых веществ. Однако по мере установления аминокислотной последовательности все большего числа белков появляется возможность разработать другой принцип классификации транспортных белков — на основе их структурного сходства. В следующей таблице показано несколько структурно

родственных групп каналов и транспортных белков. При этом белки, входящие в состав одной группы, могут выполнять разные фукнции. В качестве примера рассмотрим переносчик глюкозы млекопитающих и переносчик H^+-арабинозы бактерий. Первый является унипортером, который может катализировать только облегченную диффузию глюкозы, в то время как второй способен сопрягать перенос ионов H^+ по протонному электрохимическому градиенту с активным транспортом другого вещества, арабинозы. Ясно, что природа может приспособить одну и ту же структуру для выполнения разных функций.

ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЙ НАТРИЕВЫЙ КАНАЛ

Рисунок. Некоторые модели натриевого канала.

1. Гипотетическая организация шести спиралей каждого домена, образующих центральный канал (вид сверху).

2. Гипотетическая модель узкого «селективного фильтра», определяющего высоту барьера С. Гидратированный ион должен последовательно пройти через положения А, В, С и D, и высота кинетического барьера будет зависеть главным образом от соотношения между расстоянием от карбоксильной группы до карбонильной и размером иона.

Потенциалзависимый натриевый канал обеспечивает быстрое увеличение натриевой проводимости, ответственное за фазу деполяризации при развитии потенциала действия в нервных и мышечных клетках. Этот канал был очищен до гомогенного состояния из нескольких источников, в частности из мозга крысы, скелетных мышц млекопитающих, сердца цыпленка и электрического органа ската *Electrophorus electricus.*

Очищенные каналы из *Elektrophorus electricus* и сердца цыпленка содержат единственную гликопротеиновую субъединицу с мол. массой —260000, в то время как каналы, выделенные из тканей млекопитающих, содержат еще одну или две меньшие субъединицы с мол. массой от 33000 до 38000. Большую часть из этих очищенных препаратов каналов удалось встроить в плоские мембраны, при этом они сохраняли присущие им in vivo электрофизиологические и фармакологические характеристики. Для успешной реконструкции канала, выделенного из тканей млекопитающих, необходим по меньшей мере один из небольших ассоциированных белков.

Натриевые каналы взаимодействуют с различными токсинами, в частности с тетродотоксином, сакситоксином и а-токсином скорпиона, которые очень прочно связываются с канальными белками и могут использоваться при количественных биохимических измерениях. Присутствие этих токсинов очень важно как для биохимической очистки каналов, так и для изучения их работы in vivo. Как и канал концевой пластинки (nAChR), натриевые каналы распределены в плазматической мембране не равномерно, а собраны в кластеры. В мышечных клетках Na-каналы сконцентрированы в районе концевой пластинки вместе с nAChR-каналами.

Нума с соавторами клонировали гены, кодирующие белки натриевых каналов из *Electrophorus* и главную субъединицу канала из мозга крысы, и определили их нуклеотидную последовательность. Было показано, что белок натриевого канала из *Electrophorus* содержит 1820 аминокислотных остатков, организованных в четыре повторяющиеся гомологичные единицы. По мнению разных авторов, каждый гомологичный участок содержит 4, 6 или 8 трансмембранных а-спиралей. Некоторые из этих предполагаемых трансмембранных спиралей (сегменты S4) амфифильны и аналогичны постулированным для nAChR-канала (см. предыдущий раздел). Имеются экспериментальные данные о том, что карбоксильный конец полипептидной цепи локализован на цитоплазматической поверхности; сообщалось также, что амфифильная 54-спираль является внецитоплазматической. Однако никакой дополнительной информации, позволяющей подтвердить предложенные топологические модели, не существует. Нет также данных о том, какие участки полипепти-да непосредственно вовлечены в образование поры. Различные модели натриевого канала концептуально близки к моделям канала концевой пластинки в том отношении, что канал per se состоит из кластера а-спиралей, образующих центральную пору. В этом случае, однако, вместо пяти различных субъединиц мы имеем четыре гомологичных домена единственной субъединицы. По всей вероятности, специфичные группы организованы в канале таким образом, что образуется «селективный фильтр».

Предельные размеры канала можно оценить, используя метод «молекулярного сита»,

однако при этом нельзя объяснить селективность канала по отношению к достаточно малым ионам. На рис. 8.10 приведен профиль свободной энергии для диффузии ионов Na^{+} через канал. Если лимитирующей стадией является дегидратация, то параметром, определяющим высоту энергетического барьера, будет геометрия тех компонентов, которые временно заменяют воду. Для K^{+} положение соответствующих групп не будет оптимальным, поскольку этот ион несколько больше по диаметру, а потому энергетический барьер будет выше. Напротив, для K^{+} -селективных каналов соответствующий энергетический барьер будет минимален именно для ионов K^{+}.

В последнее время было построено также много моделей, описывающих регуляцию работы канала при помощи трансмембранного потенциала. В регуляции, без сомнения, участвует изменение заряда белка в ответ на наложение электрического поля. Однако никаких данных о том, какие именно участки полипептида образуют ворота или отвечают на изменение напряжения, не существует.

Данные об аминокислотной последовательности натриевого канала свидетельствуют о том, что он относится к группе потенциал-зависимых каналов. В эту же группу входят калиевый канал из *Drosophila* и дигидропиридиновый калиевый канал из скелетных мышц кролика. Все эти белки содержат амфифильный положительно заряженный сегмент, аналогичный сегменту натриевого канала. Это еще раз подтверждает вывод о том, что данный сегмент участвует в регуляции работы канала, отвечая на изменение напряжения на мембране. Отметим, что как натриевый канал из тканей млекопитающих, так и кальциевый канал имеют субъединицы, функции которых неизвестны.

КАЛЬЦИЕВЫЙ КАНАЛ

Ca^{2+}-селективные каналы очень широко распространены в возбудимых клетках — нервных и мышечных, а также в большинстве других типов клеток. Некоторые Ca^{2+} -каналы отвечают на изменение напряжения на мембране, а работа других регулируется опосредованно с помощью рецепторов. Обычно концентрация ионов Са в цитоплазме не превышает 10^{-7} М, что в 10000 раз ниже, чем концентрация ионов Са вне клетки. Из-за этих условий и в отличие от Na-и К-каналов открывание Са -канала может приводить к значительным изменениям концентрации этого иона в цитоплазме, что в свою очередь индуцирует разнообразные биохимические события. Например, потенциалзависимое увеличение концентрации ионов Са в цитоплазме приводит к высвобождению нейромедиаторов (таких, как ацетилхолин из пресинаптической мембраны).

Исходя их фармакологических данных, была проведена классификация Са-каналов. Для очистки и дальнейшей харктеристики каналов очень полезными оказались органические блокирующие агенты с высоким сродством к каналам. Единственный класс Са-каналов, охарактеризованных биохимически, — это потенциалзави-симые каналы, которые блокируются различными органическими соединениями, в частности производными дигидропиридина. Эти каналы были выделены из сердечной и скелетной мышц и оказались одинаковыми. Они состоят как минимум из двух субъединиц с мол. массой 140000 и 30000. Большая субъединица была клонирована и секвенирована и оказалась структурно близка к потенциалзависимому натриевому каналу.

Появляется все больше данных, свидетельствующих о сходстве структуры различных каналов и пор. В основе всех этих систем лежит заполненная водой пора, выстланная изнутри полярными группами. Пора может быть образована или альфа-спиральными, или вета-структурными элементами. Чтобы транспорт осуществлялся с высокой скоростью, в канале не обязательно должны присутствовать места связывания, обладающие высоким сродством к переносимым веществам, поскольку селективность определяется высотой энергетических барьеров, а не глубиной впадин. Селективность каналов можно в большинстве случаев объяснить тем, что в нескольких ключевых местах располагаются специфические аминокислотные остатки, определяющие характер тех веществ, которые могут проходить через канал.

Несколько примеров пор и каналов

В последнее время достигнуты большие успехи в определении строения пор и каналов на

молекулярном уровне. Выявляются некоторые общие структурные элементы этих образований. Анализ аминокислотных последовательностей соответствующих молекул указывает на существование структурно родственных групп ионных каналов. Общим структурным мотивом для этих белков может быть цилиндрический канал, формируемый несколькими амфифильными а-спиралями разных субъединиц или отдельными доменами одной субъединицы. Важным исключением из а-спирального семейства каналов являются порины, поскольку они формируют поры из бета-слоев, а не с помощью альфа-спиралей.

ЩЕЛЕВЫЕ КОНТАКТЫ

Щелевые контакты — это кластеры мембранных каналов, которые соединяют содержимое соседних клеток в тканях. Через такие каналы проходят небольшие молекулы — метаболиты и неорганические ионы. Диаметр каналов в клетках млекопитающих составляет от 12 до 20 А. Через них осуществляется перенос из клетки в клетку ионов и химических веществ. Таким образом, эти каналы соединяют две плазматические мембраны. Опыты по клонированию и биохимической реконструкции показали, что канал образован олигомером единственного пептида, мол. масса которого для клеток печени составляет 32000. Исходя из данных об аминокислотной последовательности, можно предположить, что в каждой субъединице имеются четыре трансмембранные а-спирали. К настоящему времени охарактеризованы белки щелевых контактов (или коннексины) из нескольких тканей; по-видимому, они образуют обширную группу родственных белков. Эти каналы обычно находятся в открытом состоянии, но закрываются, когда понижается скорость метаболизма. Первичным *сигналом* для закрывания канала является, по всей вероятности, повышение концентрации Ca^{2+}, хотя при изменении трансмембранного потенциала или закислении среды также наблюдается закрывание канала. Возможно, эффект Ca^{2+} является опосредованным. Другим способом регуляции работы канала может быть фосфорилирование.

Основная модель, описывающая строение и возможный механизм работы канала, представлена в работе. Для выяснения структуры канала авторы использовали электронную микроскопию. Каждый канал состоит из 12 субъединиц, по шесть от каждой клетки. Канал представляет собой гексамерную структуру с центральной порой. Каждая субъединица имеет форму стержня, пронизывающего бислой. Два гексамерных комплекса соседних мембран соединены конец к концу и образуют протяженный канал, объединяющий обе мембраны. Структура канала щелевого контакта зависит от наличия ионов Са. В присутствии Са субъединицы расположены параллельно центральной оси канала, а в отсутствие этих ионов они несколько наклонены (открытое состояние). Это наводит на мысль, что открывание и закрывание канала происходит аналогично работе ирисовой диафрагмы фотоаппарата; субъединицы скользят друг относительно друга в ответ на сигнал к открыванию или закрыванию. Однако точный механизм этого процесса далеко не ясен.

ЯДЕРНЫЕ ПОРОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Ядерная оболочка состоит из двух мембран. Ядерные поровые комплексы участвуют в транспорте веществ между ядром и цитоплазмой. Эти поры, аналогично каналам щелевых контактов, пронизывают две мембраны. По данным электронной микроскопии высокого разрешения, ядерная пора имеет октагональную симметрию, но устроена сложнее, чем канал щелевого контакта. Ядерная пора представляет собой два октагональных цилиндра (по одному в каждой мембране), соединенных вместе наподобие канала щелевого контакта. Полипептидный состав поры ядерной оболочки окончательно не установлен.

Размер поры ядерной оболочки весьма велик, радиус ее функциональной части составляет ~ 90 А; через нее могут проходить как небольшие растворимые вещества, так и многие крупные молекулы. Существуют специальные механизмы транспорта макромолекул внутрь ядра и из ядра в цитоплазму, однако до сих пор о них мало что известно.

ПОРИНЫ

Порины образуют поры, которые функционируют как молекулярные сита, опосредуя диффузию небольших гидрофильных молекул через наружную мембрану грамотрицательных бактерий. Исследование более чем сорока различных поринов

позволило выявить некоторые их общие особенности. Мол. масса поринов варьирует от 28000 до 48000. В мембране они обычно присутствуют в виде тримеров. Для поринов характерно высокое (до 60%) содержание *бета-слоев*. Наиболее полно к настоящему времени охарактеризованы порины из *E. coli:* OmpF (порин матрикса), OmpC, PhoE и LamB (мальтопорин). Их основной особенностью является то, что они образуют наполненный водой трансмембранный канал, причем этот канал образован в основном бета-структурными элементами. На рис. представлена одна из возможных моделей образования поринового канала из амфифильных бета-цепей. Порины прочно связаны с липопо-лисахаридами и с пептидогликаном, однако эти вещества не являются необходимыми для функционирования поринов как трансмембранных пор.

Образуемые порином каналы сильно различаются как по размерам (диаметр от 6 до 23 А), так и по селективности (от трехкратной для анионов до сорокакратной для катионов). Селективность связана с наличием внутри канала или около входа в канал заряженных аминокислотных остатков. Измерения проводимости одиночных каналов и проницаемости пор, а также электронно-микроскопические исследования указывают на то, что строение пор не одинаково для разных поринов. В одних случаях тримеры порина образуют один большой канал, в других — три независимых канала. Канал OmpF имеет три входа с наружной стороны клетки, которые затем сливаются, образуя единый выход в периплазму.

Три из четырех поринов *E. coli* имеют много общих структурных особенностей, а их аминокислотные последовательности в значительной степени гомологичны. Эти порины образуют поры диаметром 10—12 А (OmpF, OmpC и PhoE). Четвертый порин, LamB (мальтопорин), значительно отличается от трех предыдущих, хотя его аминокислотная последовательность обнаруживает некоторое сходство с ними. Он тоже образует главным образом бэта-складчатые структуры. LamB является частью системы транспорта мальтозы и обладает сродством к производным мальтозы. В отсутствие мальтозы LamB образует небольшие каналы, которые целиком блокируются при связывании мальтозы. Главной функцией LamB является стимуляция накопления мальтозы, а не работа в качестве Диффузионной поры для небольших растворимых веществ. Топографию LamB исследовали с помощью различных методов, включая генетические. В результате была построена детальная модель этого канала, пронизывающего мембрану.

Предположение о том, что порины являются воротными каналами и, значит, могут находиться в закрытом состоянии, подвергалось всесторонней проверке. In vitro работа поринов (например, OmpF) может регулироваться напряжением на мембране (открывание — закрывание), однако физиологическая значимость этого явления остается неясной.

И наконец, следует отметить, что из наружной мембраны мито-хондрий были выделены порины, работа которых регулируется напряжением на мембране. Они называются потенциалзависимыми анионселективными каналами.

В заключение отметим, что порины представляют особый интерес, поскольку они показывают, что трансмембранные каналы могут образовываться не только из а-спиралей, но и из бета-слоев.

СТРУКТУРА ПОРИНОВ

Порины — это основной класс белков, обнаруженных в наружной мембране кишечных бактерий. У *E. coli* и *Salmonella typhimurium* выявлены три порина: OmpF, OmpC и PhoE. Эти белки имеют мол. массу примерно 35 000 и гомо-логичные аминокислотные последовательности. Порины экстрагируются из наружной мембраны с помощью ДСН в виде стабильных тримеров; их можно встроить в фосфолипидные бислои с образованием неспецифичных пор, способных пропускать малые (<600 Да) гидрофильные молекулы. По-видимому, именно они придают наружной мембране бактерий свойство молекулярного сита, позволяя питательным веществам проникать внутрь клетки, а отходам — выводиться наружу через неспецифические каналы.

Были проведены обширные структурные исследования белка OmpF, известного также под названием «матриксный порин»; в настоящее время осуществляется кристаллографический анализ, который позволит получить его структуру с высоким разрешением. Однако уже сейчас можно сделать вывод, что структура OmpF сильно отличается от структуры как бактериородопсина, так и полипептидов, образующих фотосинтетический реакционный центр. Судя по данным о первичной последовательности, в молекуле нет никаких длинных

гидрофобных участков, которые можно было бы идентифицировать как трансмембранные, и в среднем в ней содержится больше полярных аминокислот, чем неполярных. Однако трехмерная электронно-микроскопическая реконструкция изображения с использованием кристаллических пластинок реконструированного порина показала, что белок пронизывает бислои, причем за пределы мембраны выходят лишь небольшие участки молекулы. Методом негативного контрастирования были выявлены каналы, образуемые тримерами. Отдельные молекулы порина образуют у внутренней поверхности каналы, которые в середине бислоя сливаются в одиночный канал, открывающийся наружу. Есть и другие данные, свидетельствующие о том, что порин, несмотря на отсутствие в его молекуле гидрофобных участков, является трансмембранным белком. Иногда этот белок выполняет роль рецептора для бактериофага (для этого отдельные его участки должны быть экспонированы на наружной поверхности), а также проявляет сродство к компонентам клеточной стенки на периплазматической стороне. Очищенный порин можно встраивать в фосфолипидные бислои с образованием потенциалчувствительных каналов.

Данные инфракрасной спектроскопии, кругового дихроизма и широкоугольной диффузионной рентгеновской дифракции свидетельствуют о том, что две трети длины молекулы образует бета-слой, а на долю а-спиралей приходится небольшая часть длины молекулы. Кроме того, эти исследования показывают, что бета-цепи антипараллельны, ориентированы перпендикулярно плоскости мембраны и имеют среднюю длину 10—12 остатков, которых достаточно для пересечения неполярной области мембраны. Способ укладки бета-цепей можно установить лишь с помощью рентгеновской дифракции. Как показывают модельные исследования, бета-цепи могут быть уложены так, что образуется бета-цилиндр, при этом полярные и заряженные аминокислотные остатки выстилают стенки наполненных водой каналов.

Все известные о структуре порина данные показывают, что гидрофобная а-спираль не является его необходимым трансмембранным элементом. Это означает, что наиболее распространенные способы предсказания структуры трансмембранных белков имеют свои ограничения, поскольку они основываются на предположении, что пересечь бислои могут только гидрофобные сегменты. Точная структура порина до сих пор неизвестна; неясно также, сходна ли она со структурой других мембранных белков. Впрочем, имеются и другие белки наружной мембраны бактерий, которые характеризуются высоким содержанием бэта-структур. Один из них — белок ОтрА, который тоже является рецептором для фагов, но, вероятно, не существует в виде отдельных тримеров и не образует поры. Другой белок такого рода — LamB (мальтопорин), являющийся рецептором бактериофага лямбда; он функционирует как специфичный канал, через который осуществляется диффузия мальтодекстринов.

Предположение о том, что необычная структура поринов связана с уникальной структурой и составом наружной мембраны бактерий, выглядит правдоподобно. Возможно, однако, что она обусловлена Уникальностью способа образования больших водных каналов через бислои.

ИОНОФОРЫ

Основная функция любой биологической мембраны состоит в создании барьера с селективной проницаемостью между разделяемыми ею водными компартментами. Тонкий гидрофобный центральный слой в мембране является очень эффективным барьером для неорганических ионов, но он в той или иной степени проницаем для неполярных веществ. Скорость проникновения неэлектролитов через бислой зависит от растворимости данного вещества в бислое, определяемой исходя из данных о коэффициенте его распределения между водой и органическими растворителями. Проницаемость модельных мембран для воды неплохо согласуется с растворимостью воды в органических растворителях, однако через некоторые биологические мембраны вода может проникать также по трансмембранным каналам белковой природы.

Липидный бислой является довольно хорошим барьером для неорганических ионов, однако проницаемость модельных и биологических мембран для протонов по не совсем понятным причинам необычайно высока.

Органические ионы или органические хелатные комплексы, содержащие неорганические

ионы, могут растворяться в углеводородной области бислоя благодаря своим гидрофобным свойствам и большим размерам. К молекулам такого типа относятся и ионофоры.

Электрические свойства биологических мембран довольно хорошо изучены. Проницаемость биологических мембран для неорганических ионов практически полностью обусловлена работой трансмембранных ионных каналов белковой природы. Образующийся при разделении зарядов трансмембранный потенциал связан с электрической емкостью мембраны, которая практически одинакова для модельных липидных бислоев и биологических мембран. Существование зарядов на поверхности мембраны создает дополнительный поверхностный потенциал, который может весьма существенным образом изменять концентрацию любого заряженного соединения в непосредственной близости от мембраны. Это в свою очередь может сказаться на каталитических свойствах мембраносвязанных ферментов.

Ионофоры — это довольно разнородная группа соединений, увеличивающих проницаемость мембран для ионов. Один ионофоры, например грамицидин А и аламетицин, формируют в бислое каналы, другие (валиномицин, нигерицин, моненсин) образуют стехиометрические комплексы с катионами и тем самым облегчают транспорт этих ионов через липидный бислой. Ионофоры являются весьма полезными инструментами в мембранных исследованиях, особенно при изучении биоэнергетических или иных зависимых от ионного градиента систем. Поскольку такие ионофорно-катионные комплексы могут проявлять довольно высокую специфичность к определенным ионам, с их помощью можно избирательно манипулировать ионными градиентами и электрическим потенциалом на мембране. Некоторые комплексы ионофора и катиона не заряжены, и катион переносится в нейтрализованной форме. Другие комплексы заряжены и диффундируют через бислой подобно уже обсуждавшимся гидрофобным ионам. Ниже кратко охарактеризованы некоторые наиболее часто используемые ионофоры.

СССР (карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон)

СССР и близкий к нему FCCP (карбонилцианид-и-трифторметоксифенилгидразон) представляют собой слабые кислоты. Протонированная форма электронейтральна и, как показано, легко проникает через мембрану (17 см/с), в то время как проницаемость депротонированной (анионной) формы составляет ~ 1 % от проницаемости формы нейтральной. Растворимость анионных форм этих и других протонофоров в гидрофобной области бислоя обусловливается несколькими причинами. Отрицательный заряд этих молекул делокализован, а благодаря большому ионному радиусу уменьшается энергия Борна. Кроме того, потенциал диполей, ориентированных положительным зарядом внутрь бислоя, стабилизирует анионы в мембране. И наконец, ионофор в мембране стабилизируют гидрофобные группы молекулы.

СССР, FCCP и другие слабые кислоты эффективно увеличивают проницаемость мембраны для протонов, что позволяет достичь электрохимически равновесного распределения протонов по обе стороны бислоя.

Валиномицин

Это циклодепсипептид, образующий с одновалентными катионами (предпочтительно с K^+) комплекс со стехиометрией 1:1. Структура комплекса напоминает ячейку, в центре которой находится ион калия, стабилизированный взаимодействием с карбонилами эфирных групп. Комплекс К-валиномицин является гидрофобным ионом и с легкостью проникает через бислой. С помощью этого ионофора можно создавать калиевый диффузионный потенциал на мембране везикул, концентрация K^+ в которых отличается от концентрации снаружи. В системе, где трансмембранный потенциал создается с помощью какого-либо активного процесса, К-валиномицин будет устранять электрическую составляющую, не влияя непосредственно на величину pH.

Нигерицин и моненсин

Это полиэфиры, имеющие одну отрицательно заряженную карбоксильную группу. Как и валиномицин, они образуют комплексы с одновалентными катионами в стехиометрии 1:1, но эти комплексы электронейтральны. Нигерицин селективно связывает K^+, а моненсин —

Na^+ . Эти ионофоры также могут с успехом проникать через бислой в нейтральной протонированной форме, поэтому их используют для ускорения обмена H^+ на Na^+ (моненсин) или H^+ на K^+ (нигерицин) через мембрану. Добавление рассматриваемых ионофоров к везикулам приводит к выравниванию градиентов H и Na (или K). Чаще всего их применяют для рассеивания pH на мембране.

A23187

Этот катионный переносчик содержит заряженную карбоксильную группу и с высокой избирательностью связывает двухвалентные катионы. Обычно A23187 используют как Ca^{2+}-ионофор. Вероятно, при своей работе этот ионофор образует растворимый в бислое нейтральный комплекс, состоящий из двух молекул A23187 и одной молекулы Ca; существование таких комплексов со стехиометрией 2:1 доказано экспериментально.

ТРАНСПОРТ БЕЛКОВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

Шац и др. изучали перенос через мембрану тетрагидрофолатредуктазы, к которой была искусственно присоединена митохондриальная сигнальная последовательность; без этой последовательности белок не мог проникать в митохондрию. После внедрения в матрикс митохондрии сигнальная последовательность удалялась сигнальной пептидазой. Чтобы выяснить, может ли проходить через мембраны митохондрии белок, находящийся в свернутой конформации, измеряли эффективность транспорта в присутствии метотрексата — ингибитора, который с высокой избирательностью связывается с нативной формой тетрагидрофолатредуктазы. Обнаружили, что связывание метотрексата приводит к прекращению транспорта, возможно вследствие того, что ингибитор стабилизирует фермент в компактной форме. Было показано также, что для проникновения в митохондриальный матрикс предшественника бета-субъединицы F1Fo-ATPазы необходимо его развертывание.

НА РИСУНКЕ Рабочая модель посттрансляционного транспорта белков в митохондриальный матрикс. Сигнал или препоследовательность обозначена двумя знаками +. Некоторые этапы могут осуществляться одновременно (3 и 4 или 5, 6 и 7). Этап 5 может отсутствовать, если предшественник свернут не полностью.

Изучался транспорт в митохондрии укороченных предшественников тетрагидрофолатредуктазы. Они содержали митохондриальную сигнальную последовательность, но трансляция была прервана до завершения синтеза полипептида. Такие укороченные предшественники не связывали мстотрексат, а возможно, и не могли свертываться в конформацию, подобную нативной. Однако они проникали в митохондрии. Особый интерес представлял тот факт, что транспорт укороченных предшественников в отличие от транспорта полноразмерного белка мог осуществляться в отсутствие ATP. Это еще раз подтверждало тот факт, что ATP необходим для разворачивания полипептида (происходящего до переноса или параллельно ему). На рис. схематически представлена модель процесса переноса белков в митохондрии с указанием стадий, протекающих лишь при наличии трансмембранного потенциала и ATP.

К аналогичным выводам о роли ATP привело исследование транспорта порина в наружную митохондриальную мембрану. Этот белок не имеет отщепляемой сигнальной последовательности, и вся необходимая для транспорта информация закодирована внутри молекулы зрелого белка. Белок был выделен в водорастворимой форме, вероятно частично денатурированной, но и в таком виде был способен к переносу. Перенос водорастворимого предшественника не требовал ATP. Этим он отличался от белка, который проникал в митохондрию сразу по завершении синтеза в системе in vitro. По-видимому, и в этом случае ATP требуется для активного процесса разворачивания белковой молекулы.

Обсуждался и вопрос о том, что, по-видимому, для предотвращения свертывания предшественника в нативную конформацию необходим какой-то растворимый белковый кофактор. Так, был выделен в водорастворимой форме, сходной с порином митохондрии,

предшественник белка наружной мембраны *E. coli* OmpA, который был не способен к эффективному переносу через плазматическую мембрану, если в цитозоле отсутствовал белок, называемый «триггер-фактором». Давно известно, что для переноса белков через мембраны эндоплазматического ретикулума млекопитающих или в эндоплазматический ретикулум необходим растворимый кофактор, а именно — *сигнал-распознающая частица* (СРЧ). Возможно, роль этого фактора состоит в предотвращении сворачивания предшественника полипептида.

ГРУППА МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ПЕРЕНОСЧИКОВ

Гомологичность некоторых транспортных белков внутренней митохондриальной мембраны свидетельствует об их близком родстве: по всей вероятности, они произошли от общего предка в результате дивергентной эволюции. Имеются по меньшей мере три представителя этой группы: 1) ADP/ATP-транслоказа; 2) переносчик фосфата и 3) разобщающий белок. В структуре этих белков имеется много общего, и тем не менее они существенно различаются по субстратной специфичности. ADP/ATP-транслоказа катализирует транспорт ADP и ATP через бислой. При физиологических условиях ATP транспортируется из митохондрий, а ADP переносится в матрикс. Механизм этого процесса, по-видимому, аналогичен таковому для белка полосы 3, за исключением того, что ATP несет на один отрицательный заряд больше, чем ADP, и поэтому обмен зависит от трансмембранного электрического потенциала на митохондриальной мембране. Переносчик фосфата осуществляет одновременно и симпорт H^+, и, во-видимому, механизм его работы сходен с описанным ранее механизмом для H^+-лактозопермеазы из *E. coli*. Этот белок катализирует транспорт фосфата внутрь митохондрий. Благодаря симпорту *H,* процесс в целом является электронейтральным и не зависит от трансмембранного потенциала. Разобщающий белок был обнаружен в митохондриях из клеток бурого жира млекопитающих; его функция заключается в диссипации протонного электрохимического градиента, создаваемого при функционировании дыхательной цепи, в результате чего генерируется тепло. Разобщающий белок может также катализировать транспорт анионов, например C1 , так что, может быть, на самом деле он катализирует транспорт OH^-, который невозможно экспериментально отличить от транспорта H^+. Этот переносчик связывается с нуклеотидами, которые ингибируют транспорт, и его работа может регулироваться жирными кислотами.

Все три переносчика, а возможно, еще и а-кетоглутарат/малат-транслоказа, имеют сходное строение; этот вывод был сделан на основе данных об их аминокислотной последовательности. Все они имеют мол. массу около 33000Да и состоят из трех гомологичных доменов, каждый из которых содержит ~ 100 аминокислот. По всей вероятности, эти три домена образовались в результате утроения единственного гена. Была построена модель, согласно которой каждый из гомологичных доменов дважды пересекает мембрану, а вся субъединица содержит шесть трансмембранных а-спиралей. С этой моделью согласуются данные по химической модификации. Отметим, что такая структура имеет много общего с Na^+-каналом, состоящим из четырех родственных гомологичных доменов. ADP/ATP-транслоказа является димером и, по-видимому, содержит единственный канал, по которому осуществляется транспорт. Такой вывод основывается на результатах исследований по связыванию ингибиторов с высоким сродством (например, карбоксиатрактилозида).