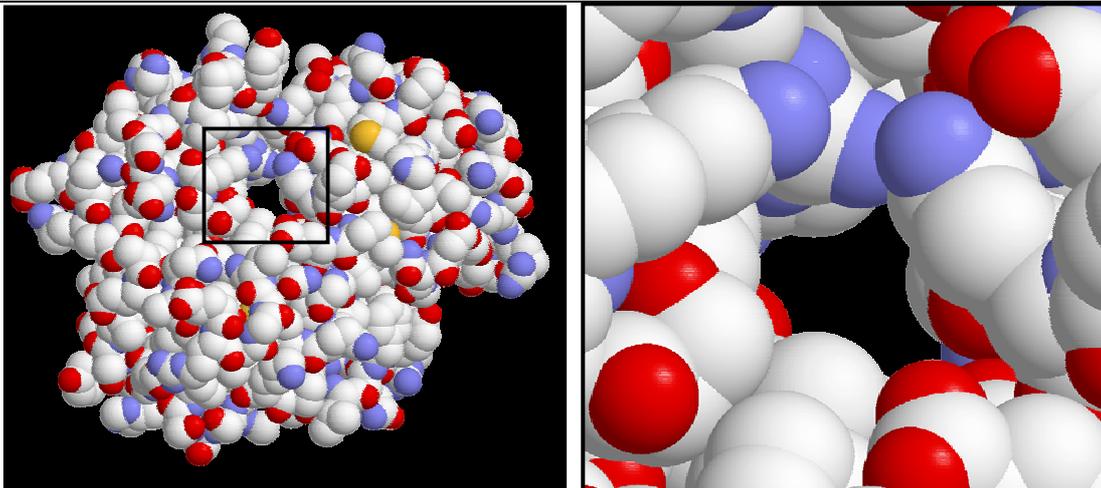


## 10. Ионные каналы (поры) в мембранах

Ионные каналы позволяют клетке регулировать проницаемость мембран для тех или других ионов, а это лежит в основе возбудимости клеток и ионной регуляции внутриклеточных процессов. Природные каналы в клеточных мембранах – белковые структуры, и их изучение в настоящее время проводится такими биофизическими методами, как рентгеноструктурный анализ, ЯМР-спектроскопия высокого разрешения и компьютерное моделирование структуры.

Основной метод изучения работы ионных каналов – это измерение ионных токов через мембрану при определенном мембранном потенциале и известных концентрациях ионов по обе стороны мембраны. Этот метод первоначально использовался в работе с мембранами электровозбудимых клеток (гигантский аксон кальмара, гигантский нейрон улитки, мембраны харовых водорослей и др.), а затем стал применяться и при изучении искусственных мембран, преимущественно бислойных (плоских) липидных мембран (БЛМ), в которые встраивались каналообразующие соединения и комплексы.

Изолирование, очистка, а главное – кристаллизация белков, образующих ионные каналы биологических мембран, связаны с большими трудностями, и данных по их структуре, полученных прямым методом белковой рентгеновской кристаллографии очень мало. На рис. 10.1 приведена структура фрагмента потенциал-зависимого калиевого канала ( $\beta$ -субъединица T-1), аналогичного тому, который имеется в цитоплазматической мембране клеток мозга млекопитающих. На этом рисунке видна плотная упаковка атомов, вообще типичная для белков, в которой, однако, виден довольно глубокий и узкий (диаметром в размер иона калия) просвет (канал), практически прямой на протяжении всей толщины мембраны. Проводимость этих каналов (в том числе калиевого потенциал-зависимого канала на рис. 10. цвет-1) зависит от мембранного потенциала, а при изменении потенциала изменяется во времени по определенному закону. Работу этих каналов мы рассмотрим в следующей главе.



А

Б

Рис. 10. цвет-1. А - потенциал-зависимый калиевый канал (часть молекулы срезана). Б – увеличенное изображение области канала.

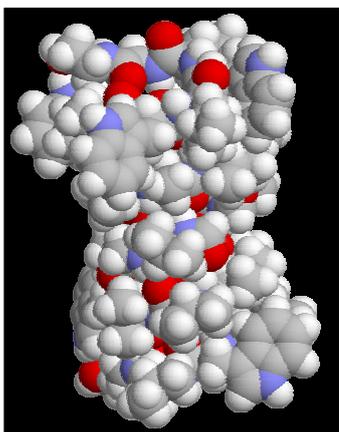
В последнее время широко изучаются каналы, формируемые в мембранах некоторыми антибиотиками, например, грамицидином А, амфотерицином В или аламецитином. Свойства этих каналов во многих отношениях сходны со свойствами каналов электровозбудимых мембран. В то же время строение этих каналов гораздо лучше изучено, поэтому их исследование полезно для выяснения связи структуры канала с его ионной проницаемостью.

### 10.1. Каналы, образуемые грамицидином А

Грамицидин А представляет собой линейный полимер, составленный из 15 L и D аминокислот:

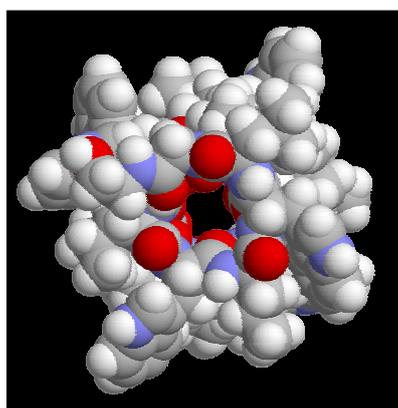
$\text{HCO-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ .

Пространственная структура молекулы грамицидина дана на рис. 10. цвет-2.



А

Вид в плоскости мембраны



Б

Вид со стороны  
поверхности мембраны

Рис. 10. цвет 2. Структура молекулы грамицидина А.

В липидном бислое молекула грамицидина формирует спираль, гидрофобную снаружи и выстланную полярными группами внутри (модель  $\alpha$ -спирали по Урри, 1971 г.), см. рис. 10.2. Длина такой спирали примерно 3 нм, просвет канала внутри 0,4 нм. Две спирали, находящиеся в монослоях липидного бислоя мембран, могут соединиться вместе "голова к голове" (т.е. N-концами), образуя сквозной канал в мембране (рис.10.1).

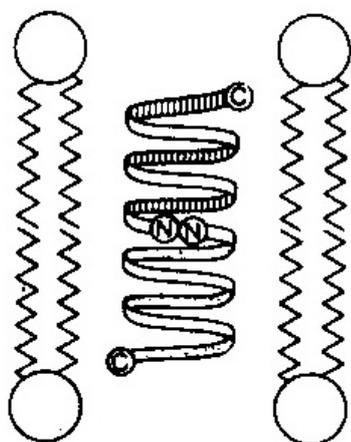


Рис. 10.1. Схема строения грамицидинового канала в мембране.

Просуществовав некоторое время, канал распадается на два "полуканала" и молекулы грамицидина расходятся.

2 мономера  $\rightarrow$  димер

Подтверждением такого механизма образования и распада грамицидиновых каналов является квадратичная зависимость числа каналов (а следовательно, проводимости мембраны) от концентрации грамицидина А в мембране:

$$K = \frac{k_2[M]^2}{k_1[D]} \quad (0.1)$$

где  $K$  – константа диссоциации канала,  $k_1$  – константа скорости формирования каналов,  $k_2$  – константа скорости их распада,  $[M]$  и  $[D]$  – концентрации мономеров и димеров грамицидина в мембране, соответственно.

Важным шагом в изучении свойств индивидуальных каналов была разработка метода изучения флуктуаций тока через мембрану, обусловленных открыванием и закрыванием (появлением и исчезновением) одиночных каналов на мембране.

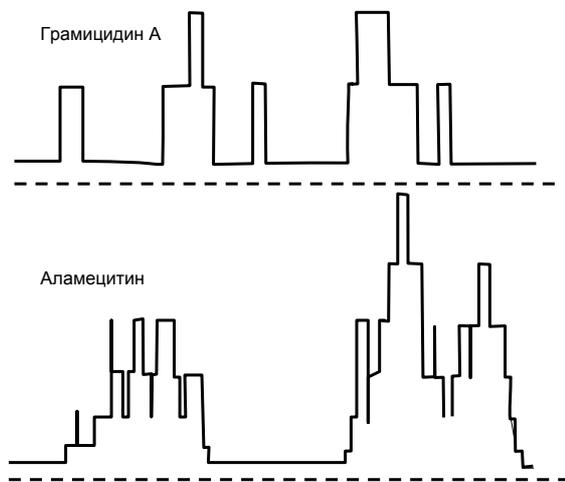


Рис. 10.2 Одиночные ионные каналы в искусственных липидных мембранах (БЛМ). Схематическое изображение записи тока при фиксированном напряжении.

На рис. 10.2 приведены записи тока через БЛМ, к которым добавлены антибиотики: грамицидин А (а), амфотерицин (б) и аламецитин (в). Четко видно (особенно в случае (а)), что изменения тока происходят ступеньками с высотой  $h$ ,  $2h$  и  $3h$ . Наиболее простое объяснение такого факта заключается в том, что ток обусловлен появлением каналов. Если на мембране открыт один канал наблюдается одна ступенька тока, если открыто сразу два канала – ступенька будет двойной ( $2h$ ), если три – тройной ( $3h$ ). Измерив ток, соответствующий амплитуде ступеньки, и разделив его на приложенное к мембране напряжение, получаем проводимость одиночного канала. Эта величина для грамицидиновых каналов составляет 43 пСм в 1М КСl. Проводимость каналов из других антибиотиков дана в таблице 10.1. Для сравнения приведены проводимости одиночных каналов клеточных мембран (табл. 10.2).

Таблица 10.1

**Некоторые параметры каналов, образуемых антибиотиками с известной структурой молекул (Ермишкин..., 1982)**

Параметр	Амфотерицин	Нистатин	Грамицидин	Аламецитин
Диаметр поры, нм	0,7	0,65	0,4	1,5
Проводимость в 1М КСl, (пСм)	3,0	1,5	43	1000
Селективность, (мВ)	-43	-45	+58	+20
Число ОН-групп на канал	112	112	0	0
Число >C=O групп на канал	16	16	30	108

Таблица 10.2.

Амплитуда элементарных ступенек проводимости мембран (Е. Неер, 1982)

Мембрана, канал	Проводимость, (пСм)	Избирательность
Na <sup>+</sup> -канал аксона кальмара	4	Na <sup>+</sup>
K <sup>+</sup> -канал аксона кальмара	12	K <sup>+</sup>
Na <sup>+</sup> -канал перехвата Ранвье	8	Na <sup>+</sup>
K <sup>+</sup> -канал перехвата Ранвье	4	K <sup>+</sup>
Активируемый ацетилхолином канал концевой пластинки лягушки	25	катионная
Внесинаптическая мембрана лягушки, активация ацетилхолином	15	катионная
Концевая пластинка диафрагмы крысы	34	катионная
Внесинаптическая мембрана диафрагмы крысы	25	катионная
ДЛМ + грамицидин в 0,1 М NaCl	6	катионная

Из этих таблиц видно, что проводимость канала, образуемого грамицидином, близка к проводимости ионных каналов в электровозбудимых мембранах.

Поведение каналов, образованных другими антибиотиками из нескольких молекул отличается большей сложностью, и мы их рассматривать не будем.(см. Л. Ермишкин,1982 г.).

Анализ флуктуаций тока, изображенных на рис. 10.5 позволяет получить ряд важных характеристик одиночных каналов.

Частота появления каналов равна в случае грамицидина  $A K_2 M$ , где  $K_2$  – бимолекулярная константа образования димера (канала), а  $M$  – концентрация антибиотика в мембране.

Средняя длительность существования каналов (протяженность ступенек проводимости) есть величина, обратная константе скорости диссоциации каналов  $K_D$ .

Зависимость амплитуды ступенек  $i$  от мембранного потенциала  $\varphi_m$  (вольтамперная характеристика) позволяет делать некоторые заключения о механизме проводимости каналов. Эта характеристика имеет различную крутизну в растворах разных ионов, (т.е. каналы имеют разную проводимость), что указывает на избирательную проницаемость канала для ионов.

С учетом такого рода данных можно уже в настоящее время сделать ряд заключений о том, как устройство поры влияет на ее ионную проводимость, а следовательно, и на ионную проницаемость мембраны в целом.

## 10.2. Проводимость одиночных каналов

Как уже говорилось ранее (см. уравнения (9.84)), проницаемость мембраны  $P$  пропорциональна проводимости  $G$ . Это же относится и к одиночному каналу, для которого уравнение (9.84) выглядит так:

$$G_n = P_n C z^2 F^2 / RT \quad (0.2)$$

где  $G_n$  – проводимость поры в расчете на единицу площади ее просвета, а  $P_n$  связана с коэффициентом диффузии иона в поре  $D_n$ , коэффициентом распределения  $K_n$  иона в системе: просвет поры – вода и длиной поры  $l$  обычным соотношением:

$$P_n = D_n K_n / l \quad (0.3)$$

В эксперименте измеряют либо проводимость мембраны в целом  $G$ , либо проводимость одиночного канала  $g$ . Соотношение между этими величинами очевидно:

$$G = ng \quad (0.4)$$

где  $n$  – число пор на единицу площади мембраны. Соотношение между  $G$  и  $g$  тоже достаточно ясно:

$$g = G_n \pi r^2 \quad (0.5)$$

где  $\pi r^2$  площадь поры, а  $r$  – ее радиус.

Окончательно выражение для проводимости ионного канала можно получить, сопоставив уравнения (0.2), (0.3) и (0.5):

$$g = \frac{D_n K_n z^2 F^2}{l RT} C \pi r^2 \quad (0.6)$$

При длине канала  $l = 6$  нм, коэффициенте диффузии в воде  $D = 2 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$  (эта цифра относится к ионам  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^+$ ) и температуре  $25^\circ\text{C}$ :

$$g = 3948 K_n C r^2 \quad (0.7)$$

В 1М КСl проводимости амфотерициновой, нистатиновой, грамицидиновой и аламецитиновой пор (радиусы 0,35; 0,325; 0,04 и 0,75 нм, соответственно) рассчитанные по уравнению (0.7) при условии  $K_n = 1$  имеют такие значения (пСм) (табл. 10.3):

Таблица 10.3.

Проводимость пор, образуемых некоторыми каналоформерами

Каналоформер	$g$ (рассчитано), $K_n = 1$	$K_n = \frac{g_z}{g_l}$
Амфотерицин	484	1,21
Нистатин	417	1,0425
Грамицидин	158	0,395
Аламецитин	2220	

Сравнение рассчитанных значений проводимости одиночных каналов и найденных в опыте показывает, что движение иона через канал происходит медленнее, чем можно было ожидать, оно чем-то затруднено.

Рассмотрим две возможные причины такого явления.

Торможение движения ионов из-за их взаимодействия со стенками канала. Для наиболее широких аламецитиновых каналов проводимость зависит от удельной электропроводности электролита  $\sigma$  по уравнению:

$$g = \sigma(A - A_0)/l \quad (0.8)$$

Здесь  $A$  – площадь поперечного сечения канала,  $A_0$  – площадь поперечного сечения, которая не проводит электрический ток. По-видимому, это слой электролита, примыкающий к стенкам. Он оказался равным 0,38 нм для растворов КСl. Наличие пристеночных слоев электролита эквивалентно уменьшению радиуса канала.

Изменение энергии иона в просвете канала по сравнению с водным раствором, которое приводит к уменьшению концентрации ионов в канале. . Следует учитывать как влияние диэлектрических свойств среды, так и действие фиксированных зарядов.

Расчет (который мы здесь приводить не будем) изменения энергии электрического поля иона радиусом 0,2 нм из водной ( $\epsilon = 80$ ) в мембранную фазу ( $\epsilon = 2,5$ ) требует затраты очень большой энергии (порядка  $70 kT$ ). Перенос иона, окруженного гидратной оболочкой, требует меньшей энергии из-за увеличения радиуса заряженной частицы (ион + гидратная оболочка) при том же заряде, но все равно равна минимум  $50 kT$  (считая новый радиус равным 2,7 нм). Внутри поры ион лишь частично окружен водой, а частично – гидрофобной зоной мембран. Расчет показывает, что энергия иона в середине канал радиусом 0,3 нм выше на  $6 kT$  того же иона в чисто водном окружении. Такая энергия соответствует коэффициенту распределения  $K_n = e^{-6} = 2,5 \cdot 10^{-3}$ . Умножив на эту величину значения проводимости, полученные для амфотерицинового и нистатинового каналов, получаем цифры 1,21 и 1,04, вполне сопоставимые с экспериментальными (см. табл. 3.8.3). Для грамицидинового канала проводимость в эксперименте оказывается значительно выше величины, рассчитанной таким способом. Причину этого мы рассмотрим в следующем разделе.

Существует еще одна причина изменения концентрации ионов в канале по сравнению с водным раствором неэлектролита – наличие фиксированных зарядов в канале. В результате изменяется как общая проводимость канала, так и его катион–анионная селективность.

### 10.3. Взаимодействие ионов в канале

Простейший расчет показывает, что ионов в канале немного. В качестве примера рассмотрим грамицидиновый канал, который имеет радиус 0,2 нм и длину 6 нм (табл. 10.1). Заметим, что природные каналы биологических мембран имеют размеры того же порядка величины (табл. 10.1). На объем  $V = \pi r^2 l = 7,5 \cdot 10^{-28} \text{ м}^3$  приходится  $CVN_A$  ионов, т.е.  $0,45C$  ионов, где  $C$  – молярная концентрация, а  $N_A$  – число Авогадро. Таким образом, если даже не учитывать факта снижения концентрации ионов в канале по сравнению с водным раствором (см. выше), видно, что в небольшом канале типа грамицидинового даже при высокой концентрации электролита в растворе  $C = 1$  моль/л одновременно находится либо 1 анион либо 1 катион ( в среднем 0,45 аниона и 0,45 катиона). В более широких каналах ионов может быть больше, но зато физиологическая концентрация ионов ниже 1 моль/л; так или иначе, ионы в канале встречаются по одиночке.

К этому надо добавить сильное электростатическое отталкивание ионов одного знака. Попав в канал, ион создает поле, препятствующее вхождению других ионов, что эквивалентно снижению проводимости канала. Этот эффект сильнее проявляется при более высоких концентрациях ионов в растворе, что приводит к искривлению

вольтамперных характеристик, создавая впечатление эффекта "насыщения". Впрочем, так оно и есть: канал занят одним ионом и другим там пока не место.

Фиксированные заряды внутри канала (или вблизи его просвета) также влияют на энергию иона в канале, а вместе с тем на проводимость канала во внешнем электрическом поле.

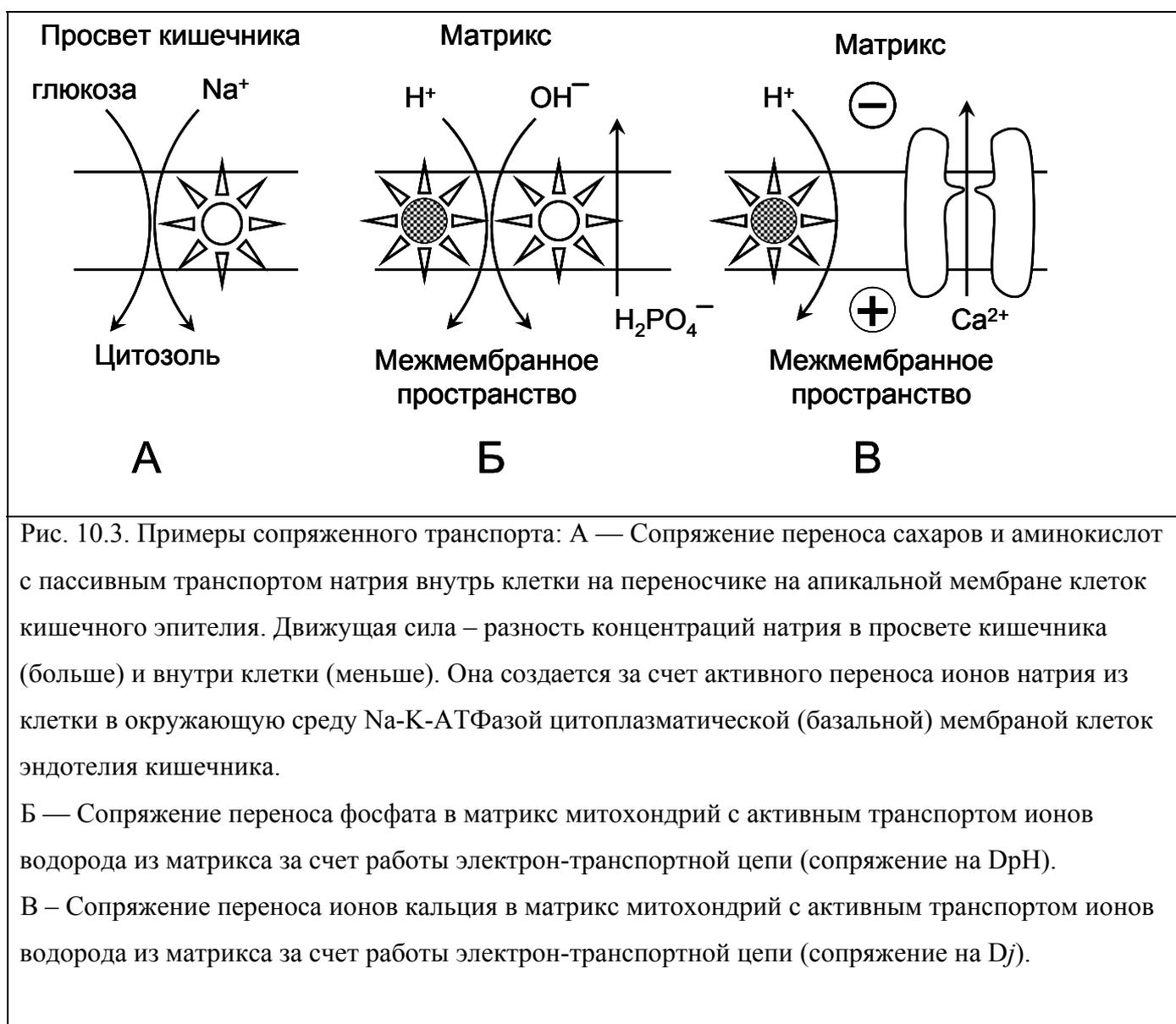
В узком канале движение иона не может не отразиться на движении других молекул, включая молекулы воды. Зрительный образ, который обычно возникает, когда говорят о движении ионов через канал – это скопление заряженных шариков в узкой трубке, причем они разделены незаряженными шариками (молекулы воды). Вся эта система бусинок начинает двигаться при наличии потенциала на мембране, тем быстрее, чем выше потенциал. В некоторых отношениях такая картина соответствует истине. Так показано, что при переносе одного иона через грамицидиновый канал одновременно происходит перенос 6-7 молекул воды (электроосмос). Это примерно соответствует числу молекул воды в грамицидиновом канале. Ион, как поршень проталкивает всю воду, чтобы пройти самому. Не следует однако думать, что это происходит всегда только под влиянием электрического поля: прохождение иона может быть результатом теплового движения молекул, т.е. диффузии.

#### **10.4. Сопряженный транспорт**

Число систем, обеспечивающих процесс транспорта веществ и ионов через клеточные мембраны, несоизмеримо больше, чем число "молекулярных насосов", отвечающих за первичный ионный транспорт. Например, во внутренней мембране митохондрий дыхательная цепь и  $H^+$ -АТФаза обеспечивают при своей работе перенос одного иона – протона, что приводит к появлению разности электрохимических потенциалов этого иона по сторонам мембраны. В дальнейшем перенос катионов в матрикс: кальция, стронция, в некоторых условиях – калия, синтетических проникающих катионов, – осуществляется, в сущности, пассивно: за счет электрофореза, т.е. движения под действием электрического поля в мембране. Перенос проникающих кислот: уксусной, угольной, фосфата, жирных кислот осуществляется по градиенту концентрации этих соединений в недиссоциированной форме, т.е. тоже пассивно, за счет диффузии. В целом процесс переноса, скажем, кальция или фосфата в митохондрии является активным процессом, т.к. идет против диктуемого законами термодинамики уменьшения концентрации веществ в результате переноса. Но этот процесс на самом деле состоит из активной стадии, обеспечиваемой первичным ионным транспортом (в данном случае протона), и пассивной стадии, облегчаемой чаще всего наличием переносчика в мембране. Такой транспорт

ионов и веществ, как уже говорилось, называется *сопряженным* (или *вторичным активным*) транспортом.

Рассмотрим несколько примеров вторичного активного транспорта (рис.10.3).



#### 10.4.1. Сопряжение на переносчике

Сопряжение на переносчике характерно для процесса транспорта сахаров и аминокислот внутрь клетки из окружающей среды. Перенос сахаров и аминокислот в тонком кишечнике сопряжен с транспортом ионов натрия, и это сопряжение осуществляется непосредственно на переносчике (рис. 10.3 А). В пользу этого говорят два факта. С одной стороны, такой перенос происходит с значительной скоростью лишь в присутствии ионов натрия. При этом транспорт сахаров и аминокислот из просвета кишки может

осуществляться против их концентрационного градиента при наличии достаточного градиента электрохимического потенциала ионов натрия.

#### ***10.4.2. Сопряжение через изменение рН***

Сопряжение через изменение рН (рис. 10.3 Б) имеет место при транспорте фосфата внутрь энергизованных митохондрий. Белковый переносчик фосфата на внутренней мембране митохондрий осуществляет процесс обмена  $\text{OH}^- \leftrightarrow \text{H}_2\text{PO}_4^-$ , так что в целом перенос фосфата не сопровождается переносом заряда и с точки зрения стехиометрии эквивалентен диффузии через мембрану недиссоциированной фосфорной кислоты. Направление диффузии этой кислоты определяется градиентом концентрации водородных ионов, так как фосфорная кислота диссоциирует при нейтральных рН, и ее перенос через мембрану означает перенос протонов. Процесс этот происходит из области большей в область меньшей концентрации  $\text{H}^+$ . Получается, таким образом, что в конечном счете причина транспорта фосфата внутрь митохондрий – это движение протонов наружу при энергизации митохондрий. При этом сопряжение транспорта фосфата и протонов опосредовано появлением градиента рН на мембране.

#### ***10.4.3. Сопряжение транспорта ионов через мембранный потенциал***

При работе дыхательной цепи митохондрий происходит выброс протона из матрикса в окружающую среду, сопровождающийся появлением на мембране перепада электрохимического потенциала протона  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ . Такие "энергизованные" митохондрии обладают способностью накапливать ионы кальция и ортофосфата, что связано с наличием электрического потенциала ( $\Delta\phi$ ) и перепада рН ( $\Delta\text{pH}$ ) на мембране, а также с тем, что мембраны митохондрий проницаемы для иона кальция и ортофосфата. Ионы кальция идут при этом внутрь митохондрий под влиянием разности электрических потенциалов (внутри энергизованных митохондрий знак потенциала "минус"). Получается, что процесс переноса кальция сопряжен с активным транспортом протонов через мембранный потенциал (рис. 10.3 В). Повреждение митохондриальных мембран приводит к снижению потенциала на мембране, прекращению аккумуляции ионов кальция митохондриями и даже выходу этих ионов из матрикса в протоплазму.

#### ***10.4.4. Условия сопряжения***

Таким образом, можно считать, что во всех случаях сопряженный транспорт осуществляется благодаря наличию в мембране переносчиков (как правило, каналов белковой природы), которые обеспечивают движение нейтральных молекул или ионов в

направлении уменьшения электрохимического потенциала. Сопряжение же ионных потоков (или потоков ионов и нейтральных молекул) обеспечивается либо:

1. Свойствами переносчика, который может осуществлять перенос одного компонента только в обмен на второй компонент ("сопряжение на переносчике").
2. Требованием сохранения электронейтральности суммарного процесса; если электронейтральность не соблюдается, то происходит быстрое изменение мембранного потенциала, которое приостанавливает ионный поток (мы это назвали "сопряжением на потенциале").
3. Требованием сохранения кислотно-основной нейтральности: если имеет место суммарный перенос не соли, а кислоты или основания, то создается градиент pH, останавливающий поток. Мы это назвали "сопряжением на  $\Delta pH$ ".

В везикулярных системах, к которым относятся клетки и органеллы, перенос ионов и веществ, регистрируемый в эксперименте и имеющий значение для жизнедеятельности клетки, всегда сопряженный и протекает с учетом требований 2 и 3. В то же время свойства переносчика не всегда соответствуют пункту 1, хотя внешне может дело выглядеть таким образом, будто процесс сопряжения происходит именно на переносчике. Например, хорошо известно, что через мембраны эритроцитов может происходить обмен анионами:  $Cl^-$  на  $OH^-$  или  $Cl^-$  на  $HCO_3^-$ . Механизм всего процесса легче всего представить себе как обмен на переносчике: слева направо переносчик переносит хлор, справа налево – гидроксил и бикарбонат. В действительности, перенос происходит, по-видимому, через одни и те же каналы, причем по каждому каналу в любом направлении, но с разной скоростью, могут переноситься все названные ионы. Сопряжение же обеспечивается принципом электронейтральности (см. пункт 2).

### 10.5. Эффекты насыщения

Во всех рассмотренных до сих пор случаях однонаправленные потоки пропорциональны концентрации ионов в мембранной фазе на границе мембрана/вода. В самом деле из уравнений (9.18), (9.47) и (9.78) следует, что:

Для неэлектролитов:

$$J = \frac{D}{l} C_m \quad (0.9)$$

Для ионов:

$$J = -\frac{D}{l} C_m \frac{\Delta\psi}{e^{\Delta\psi} - 1} \quad (0.10)$$

Однobarьерная модель:

$$J = \frac{D}{l} C_m e^{-z\psi} \quad (0.11)$$

При сравнительно небольших концентрациях  $C$  вещества в водной фазе, омывающей мембрану, между величинами  $C_m$  и  $C$  существует прямая пропорциональность, и вполне оправдано использование коэффициента распределения  $K = C_m / C$ , которым мы пользовались до сих пор и который, в частности, входит в величину коэффициента проницаемости (см. уравнение)

Однако, опыт показывает, что зависимость величин однонаправленных потоков от концентрации проникающего вещества по одну сторону мембраны перестает быть линейной при более высоких концентрациях этого вещества, постепенно приближаясь к плато. Наиболее простое объяснение этого факта – ограниченность числа центров связывания в мембране.

Связывание веществ с ограниченным количеством связывающих центров может быть описано химическим уравнением обратимой реакции

Свободное вещество + Центры связывания  $\xrightleftharpoons[2]{1}$  Комплекс.

Константа равновесия для этой реакции (константа связывания) равна

$$K_c = \frac{a}{C(N-a)}, \quad (0.12)$$

Где  $C$  – концентрация вещества в водной фазе,  $a$  – концентрация связанного вещества; в нашем случае  $a = C_m$ ,  $N$  – концентрация центров связывания,  $N - a$  – концентрация свободных (незанятых) центров связывания.

Нас интересует зависимость концентрации иона в мембране ( $S_m = a$ ) от его концентрации в воде  $C$ . Найдем эту величину, преобразовав предыдущее уравнение

$$a = \frac{K_c C N}{1 + K_c C} \quad (0.13)$$

При низких концентрациях вещества в растворе  $KC \ll 1$ , а потому

$$a \approx K_c C N \quad (0.14)$$

Это выражение совершенно эквивалентно уравнению

$$C_m = K_m C \quad (0.15)$$

Понятно теперь, почему при низких концентрациях вещества потоки линейно зависят от концентрации вещества в водной фазе. Связывающие центры (или каналы) еще не заняты. Но при высоких концентрациях вещества ( $KC \gg 1$ ) уравнение (0.13) приобретает иной вид

$$a \approx N \quad (0.16)$$

Это тоже понятно: все центры связывания теперь заняты веществом, и поток через мембрану будет определяться исключительно концентрацией переносчиков ионов или каналов, ( $C_m \rightarrow N$ ), а не концентрацией ионов в растворе. Это явление называется насыщением, а перенос ионов по такому механизму получил название *насыщаемого* (*saturable*) транспорта.

Мы просим студентов самих нарисовать график зависимости потока ионов от концентрации вещества с одной стороны мембраны.

## 10.6. Кальций-транспортные АТФазы

Ионные насосы работают по сходному механизму, а кальций-транспортная АТФаза – довольно простой по устройству ионный насос. Поэтому мы расскажем о ее работе более подробно.

В цитоплазме клеток концентрация ионов кальция составляет всего 50–100 нмоль/л ( $5 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-7}$  М), тогда как в окружающей клетки среде она равна примерно 3 ммоль/л ( $3 \cdot 10^{-3}$  М). Поддерживает эту разницу в концентрации (на четыре порядка величины!) система активного транспорта ионов кальция, главную роль в которой играет кальциевый “насос” – фермент кальциевая АТФаза, сокращенно Са-АТФаза. Точнее говоря, не один фермент, а группа кальциевых АТФаз, различающихся по локализации в клетке, строению и способу регуляции. Но все эти ферменты переносят ионы кальция из клеточного сока во внеклеточную жидкость или во внутриклеточные депо кальция – пузырьки эндоплазматического ретикулума за счет энергии гидролиза АТФ, поддерживая тем самым низкую концентрацию ионов кальция в цитоплазме.

Поддержание низкой концентрации ионов кальция в цитоплазме покоящихся клеток создает возможность регуляции клеточных функций путем увеличения проницаемости клеточных мембран для  $\text{Ca}^{2+}$ : входя в клетку, эти ионы активируют великое множество различных внутриклеточных процессов. Яркий пример – сокращение мышцы, которое начинается с выхода ионов кальция из саркоплазматического ретикулума и его взаимодействия с сократительными белками. Последующее удаление  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы и накопление его в ёмкостях эндоплазматического ретикулума осуществляется Са-АТФазой и приводит к расслаблению мышцы. В других клетках ионы кальция, входя

пассивно через открывающиеся каналы, связанные с различными рецепторами, также играют роль посланников, дающих приказы включить ту или иную внутриклеточную систему. После исполнения приказа “посланников” надо выпроводить из цитоплазмы, что и делают Са-АТФазы, а также Na/Ca-обменники (см. рис.10.4).

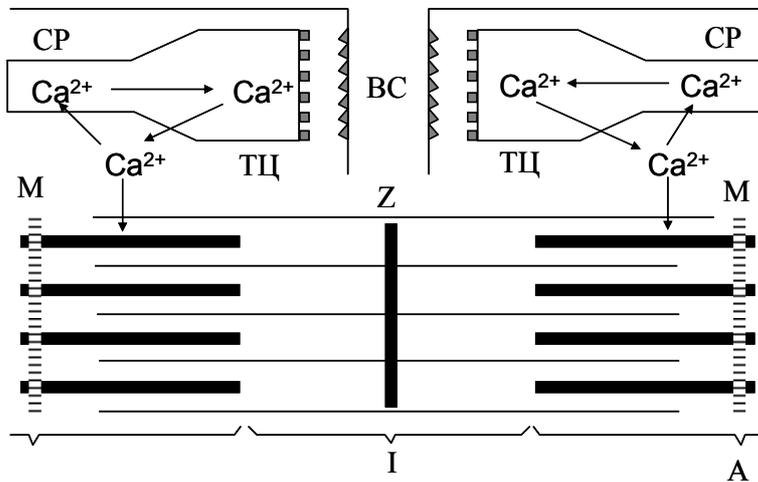


Рис. 10.4. Ионы кальция как регуляторы цикла сокращение — расслабление в поперечнополосатых мышцах: ТЦ — терминальные цистерны саркоплазматического ретикулума (СР), ЛТ — продольные (латеральные) трубочки, ВС — внутренний синапс, ТТ — Т-система, Ц — цитоплазматическая мембрана (плазмалемма), А — миозиновые нити, I — актин, Z — Z-пластинка, М — М-полоса.

Кальциевые АТФазы, входящие в состав цитоплазматических мембран и внутриклеточных мембран, различаются по ряду свойств. Все Са-АТФазы представляют собой мономерные белки, т. е. состоят из единственной полипептидной цепи, но несколько различаются по молекулярной массе. Так, Са-АТФаза саркоплазматического ретикулума имеет молекулярную массу 108 кД, а плазматическая Са-АТФаза – 120 кД. Лучше всего изучена Са-АТФаза саркоплазматического ретикулума поперечно-полосатых мышц, и именно ее строение и работу мы рассмотрим подробно в этом разделе.

### **10.6.1. Выделение и очистка Са-АТФазы**

Изучение механизма транспорта  $Ca^{2+}$  при работе Са-АТФазы проводилось главным образом на изолированных пузырьках саркоплазматического ретикулума, полученных после гомогенизации тканей путем последовательных центрифугирований. Пузырьки

саркоплазматического ретикулума в электронном микроскопе выглядят так же, как и другие мембранные структуры. На сколах замороженных суспензий изолированных пузырьков саркоплазматического ретикулума видны внутримембранные частицы диаметром около 9 нм. Эти глобулярные частицы на поверхности скола образуются вследствие внедрения в гидрофобную зону мембраны участков полипептидной цепи Са-АТФазы.

Анализ белкового состава пузырьков показывает, что основным белком в ретикулуме является Са-АТФаза (70–80% всех белков). Используя различные приемы, можно очистить Са-АТФазу от других белков. Правда, при очистке обычно повреждается мембрана, и изучать транспортную функцию становится невозможным. Но добавив фосфолипиды, удается восстановить целостность везикул и получить прекрасный объект для изучения функции Са-АТФазы: фосфолипидные пузырьки со встроенным в них работающим ферментом.

### 10.6.2. Энергетика транспорта ионов кальция

Используя различные методы, удалось установить, что при гидролизе одной молекулы АТФ Са-АТФаза саркоплазматического ретикулума переносит два иона кальция из окружающей среды внутрь везикул, как это показано на рис. 10.5.

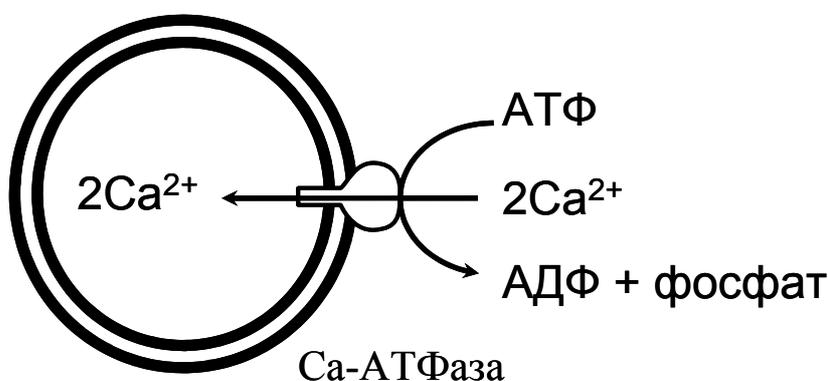


Рис. 10.5. Схематическое изображение везикулы саркоплазматического ретикулума со встроенной молекулой Са-АТФазы: во внешнюю среду (цитоплазму) обращена головка фермента, диаметром около 9 нм, с ней связываются АТФ и ионы кальция; мембрану пронизывает канал, по которому, как полагают, кальций переносится при гидролизе АТФ.

Перенос ионов кальция сопровождается переносом электрических зарядов, но разность потенциалов на мембране не удерживается, потому что мембрана саркоплазматического ретикулума хорошо проницаема для других ионов.

Для того чтобы перенести через мембрану 2 грамм-эквивалента ионов кальция из клеточного сока, где его концентрация  $c_i = 1 \cdot 10^{-7}$  моль/л, во внутреннюю полость

саркоплазматического ретикулума, где концентрация кальция близка к 1 ммоль/л ( $c_o = 1 \cdot 10^{-3}$ ), требуется затратить энергию, равную:

$$\Delta G = 2\Delta\mu = 2[\Delta\mu_o + RT \ln(c_o / c_i) + zF\Delta\varphi] \quad (0.17)$$

Поскольку внутри саркоплазматического ретикулума потенциал равен внутриклеточному ( $\Delta\varphi = 0$ ), а величина  $\mu_o$  примерно одинакова для ионов кальция в водных растворах ( $\Delta\mu_o = 0$ ), можно считать, что изменение свободной энергии при переносе двух молей  $\text{Ca}^{2+}$  равно при 37°C (310°K):

$$\Delta G = 2RT \ln(c_o / c_i) = 47,5 \text{ кДж/моль} \quad (0.18)$$

Это приблизительно равно энергии гидролиза макроэргической связи АТФ при физиологических концентрациях АТФ, АДФ и ортофосфата. Таким образом, транспорт кальция через мембрану саркоплазматического ретикулума осуществляется с высоким коэффициентом полезного действия, без потерь энергии. Помимо прочего, это предполагает обратимость работы Са-АТФазы. И действительно, было показано, что можно получить синтез АТФ из АДФ и фосфата, если нагрузить изолированные везикулы саркоплазматического ретикулума кальцием, а затем убрать кальций из окружающей среды, добавив туда комплексон (этилендиаминтетраацетат) – соединение, связывающее  $\text{Ca}^{2+}$ . Заметим, что обратимо могут работать также и другие транспортные АТФазы: Na, K-АТФаза цитоплазматических мембран и  $\text{H}^+$ -АТФаза митохондрий.

### ***10.6.3. Механизм переноса ионов кальция***

Хотя транспортные АТФазы и называют ионными насосами, от корабельной помпы их отличает то, что они не качают жидкость, а переносят дискретные частицы – ионы. Каждый цикл переноса включает в себя как минимум три стадии: 1) частицу надо захватить с одной стороны мембраны, 2) перенести ее через мембрану (транслоцировать) и 3) выпустить с другой стороны. Осуществление этих стадий сопряжено с расходом энергии и, следовательно, одновременно что-то должно происходить с АТФ. Сама молекула АТФ тоже должна быть захвачена (1) и гидролизована с запасанием энергии и расходом ее на перенос кальция (2), а продукты, АДФ и фосфат, должны перейти из связанного с ферментом состояния в водный раствор (3). В каждом цикле фермент одновременно использует не один, а два субстрата – внутриклеточный кальций и АТФ и образует три продукта: кальций, накопленный внутри везикул эндоплазматического ретикулума, АДФ и ортофосфат.

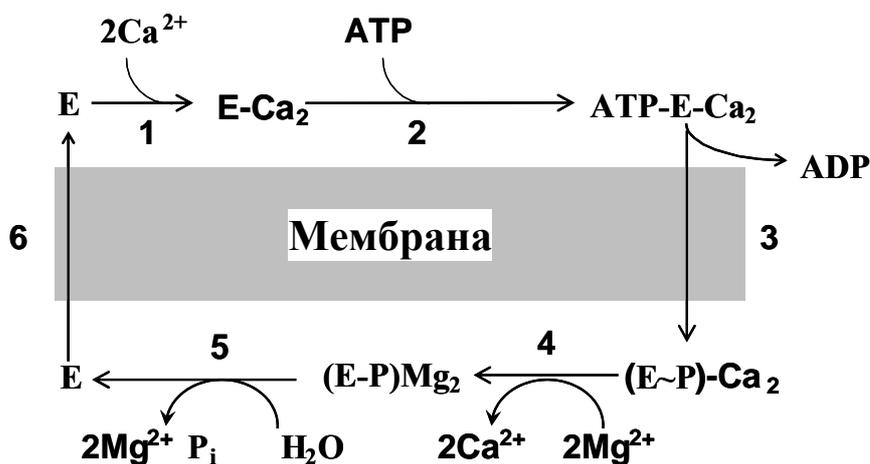


Рис. 10.6. Последовательность стадий работы Са-АТФазы 1 — связывание ионов кальция, 2 — связывание АТФ, 3 — образование фермент-фосфата, 4 — отщепление ионов кальция, 5 — гидролиз фермент-фосфата, 6 — возвращение фермента в исходное состояние.

Усилиями многих ученых была в общих чертах расшифрована последовательность стадий при работе Са-АТФазы (рис. 10.6), которая включает в себя все перечисленные выше этапы и, кроме того, замечательна тем, что стадии “переработки” АТФ как бы чередуются со стадиями переноса  $\text{Ca}^{2+}$ . Вот эти стадии:

1. Связывание двух ионов кальция на поверхности АТФазы, обращенной в цитоплазму (или *наружу* в изолированных пузырьках саркоплазматического ретикулула).
  2. Связывание на той же поверхности молекулы АТФ.
  3. Фосфорилирование белка (образование фосфофермента) и высвобождение АДФ.
  4. Высвобождение ионов кальция с поверхности АТФазы, обращенной *внутри* пузырьков саркоплазматического ретикулула (в обмен на ионы магния).
  5. Гидролиз фосфатной связи и отщепление ионов магния.
  6. Переход молекулы фермента в исходное состояние (центры связывания кальция оказываются опять на поверхности пузырьков саркоплазматического ретикулула).
- Рассмотрим более подробно эти стадии.

#### 10.6.4. Связывание ионов кальция (стадия 1)

Чтобы изучить количественно способность везикул саркоплазматического ретикулула связывать ионы, к суспензии везикул с известной концентрацией АТФазы ( $c_a$ ) добавляют разные количества изучаемых ионов и тем или иным способом измеряют концентрацию связавшегося ( $c_b$ ) и оставшегося в растворе иона ( $c_f$ ). На основе полученных данных рассчитывают два основных параметра связывания: *константу связывания* ( $K_b$ ) и *число мест связывания* ( $n$ ). Константа связывания — это константа равновесия процесса:

$$\text{свободные ионы} + \text{вакантные места связывания} \rightleftharpoons \text{связанные ионы}$$

По определению, константа связывания равна:

$$K_b = \frac{c_b}{c_f \cdot n_f} \quad (0.19)$$

Из уравнения видно, что константа связывания  $K_b$  равна обратной концентрации свободных ионов при такой их концентрации  $c_f$ , когда концентрация связанных ионов  $c_b$  равна концентрации свободных мест связывания  $n_f$ , т.е. когда занята половина всех имевшихся на поверхности фермента мест связывания. Чем выше константа связывания (сродство центров к иону), тем ниже концентрация ионов, при которой белок еще может их связывать.

Изучение связывания различных ионов мембранными пузырьками саркоплазматического ретикулаума показало, что только для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  имеются центры с высокой константой связывания ( $2 \cdot 10^6$  моль<sup>-1</sup>л); на одну молекулу АТФазы приходится два таких центра.

Подсчитаем, какая доля всех центров связывания кальция будет занята ионами при концентрации свободных ионов в растворе, равной  $1 \cdot 10^{-7}$  моль/л.

Поскольку общее число мест связывания  $n = c_b + n_f$ , то нетрудно найти долю занятых центров связывания:

$$\frac{c_b}{n} = \frac{c_b}{c_b + n_f} = \frac{c_f \cdot K_b}{c_f \cdot K_b + 1} \quad (0.20)$$

Подставив значения  $c_f$  и  $K_b$  в уравнение (0.20), находим:

$$\frac{c_b}{n} = \frac{0,2}{1,2} = \frac{1}{6} \quad (0.21)$$

Таким образом каждый шестой центр связывания на поверхности молекул АТФазы занят ионами кальция при той чрезвычайно низкой (100 нмоль/л) их концентрации, которая типична для внутриклеточного содержимого.

Конечно, сразу возникает вопрос, является ли связывание кальция действительно первой стадией его переноса или перенос и адсорбция кальция – разные и независимые процессы. Было получено много доказательств того, что именно связывание кальция с центрами с высоким сродством есть первая стадия переноса. Одно из них заключается в одинаковой зависимости связывания и переноса от концентрации кальция. С другой стороны, всякое снижение связывания под действием конкурирующих ионов всегда одновременно снижало и перенос кальция через мембраны. Заметим, что присутствие магния мало влияет на связывание кальция АТФазой, поскольку сродство к  $\text{Ca}^{2+}$  у центров связывания в 30000 раз выше, чем к  $\text{Mg}^{2+}$ .

### 10.6.5. Связывание АТФ (стадия 2)

Изучение связывания АТФ с кальциевой АТФазой, встроенной в мембранные везикулы, показало, что АТФ связывается в комплексе с ионами  $Mg^{2+}$  (или  $Mn^{2+}$ ), причем связывание комплекса  $Mg \cdot АТФ$  происходит независимо от  $Ca^{2+}$ . Это означает, что имеются два разных центра связывания для  $Mg \cdot АТФ$  и для  $Ca^{2+}$ . Константа связывания  $Mg \cdot АТФ$  составляет  $2 \cdot 10^5$  моль<sup>-1</sup>л, т.е. сродство активного центра фермента к субстрату довольно велико: половина молекул АТФ связывается при его концентрации 5 мкмоль/л. Наряду с одним центром связывания, обладающим высоким сродством к АТФ, на поверхности молекулы АТФазы есть второй центр связывания с низким сродством, который не участвует в процессе гидролиза АТФ и переноса кальция, но, возможно, имеет значение для регуляции активности фермента.

Итак, на поверхности АТФазы имеются центры связывания для двух ионов кальция и для одной молекулы АТФ, обладающие высоким сродством к субстрату. Они взаимодействуют между собой, так как связывание  $Ca^{2+}$  “запускает” гидролиз АТФ, присоединенного вместе с  $Mg^{2+}$  к своему центру. При этом было показано, что гидролиз АТФ начинается только после того, как *оба* иона кальция присоединятся к своим участкам связывания. Это соответствует стехиометрии переноса  $Ca^{2+}$  и гидролиза АТФ, равной 2, о которой мы уже говорили.

### 10.6.6. Фосфорилирование белка (стадия 3)

Гидролиз АТФ осуществляется Са-АТФазой в три этапа: вначале происходит связывание АТФ, затем – фосфорилирование белка и отщепление АДФ, и наконец – гидролитическое расщепление белок–фосфатной связи и высвобождение ортофосфата. Фосфорилирование осуществляется по карбоксильной группе остатка аспарагиновой кислоты. Стадия эта обратима: добавив к изолированным везикулам эндоплазматического ретикулума, содержащим фосфатофермент (E~P), АДФ в присутствии 1 мМ  $Ca^{2+}$ , можно наблюдать почти полный перенос фосфата с белка на АДФ с образованием АТФ. Таким образом, в мембранах саркоплазматического ретикулума существует равновесие:



где  $K_0$  – константа связывания ионов кальция на АТФазе у наружной поверхности мембранных везикул саркоплазматического ретикулума, а  $K_p$  – константа равновесия реакции фосфорилирования. Последняя величина близка к единице.

Как известно, при гидролизе АТФ высвобождается большое количество энергии, благодаря чему связь между фосфатом и АДФ в молекуле АТФ называют

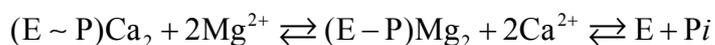
макроэргической (богатой энергией). Обратимость процесса фосфорилирования белка означает, что и связь фосфата с аспарагиновым остатком в фосфорилированном белке (на рис. 10.9 она обозначена знаком “~”) тоже богата энергией, которая высвобождается при ее гидролизе. Ниже мы увидим, что именно эта энергия и тратится на активный перенос ионов кальция.

#### **10.6.7. Гидролиз энзим-фосфатного комплекса (стадия 4)**

Высокоэнергетическая (способная передавать остаток фосфорной кислоты на АДФ) форма фосфорилированной АТФазы стабильна только в присутствии миллимолярных (т. е. сравнительно высоких) концентраций ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . При меньших концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  происходит вытеснение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из Са-связывающих центров фосфатофермента ионами  $\text{Mg}^{2+}$  (которые присутствуют в среде и без которых Са-АТФаза не работает); ионы кальция при этом выходят в окружающий раствор.

Эта стадия работы АТФазы (гидролиз  $\text{E} \sim \text{P}$ ) – важнейшая в цикле переноса ионов кальция и заслуживает пристального рассмотрения.

Вытеснение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из Са-связывающих центров высокоэнергетического фосфопродукта белка ионами  $\text{Mg}^{2+}$  и гидролиз АТФ происходят, как выяснилось, не одновременно, а в два этапа: сначала отщепляется кальций, а только потом – происходит гидролиз фосфатной связи (отщепление неорганического фосфата):



Кальциевый и магниевый комплексы энзим-фосфата принципиально различаются по их способности вступать в реакцию с АДФ с образованием АТФ. Как уже говорилось, комплекс кальция с энзим-фосфатом (существующий при высоких концентрациях кальция) может превратиться в исходную Са-АТФазу с синтезом АТФ (так называемое ионное фосфорилирование). Поэтому мы говорим, что фосфат связан с белком макроэргической связью и обозначаем комплекс как  $\text{E} \sim \text{P}$ . Оказалось, что комплекс энзим-фосфата с магнием *не обладает* способностью передавать фосфат на АДФ: при гидролитическом отщеплении фосфата уже не выделяется достаточной энергии; связь фосфата с белком не макроэргическая (комплекс обозначаем как  $\text{E} - \text{P}$ ).

На что же потрачена энергия фосфатной связи? – Оказывается, она пошла *на изменение константы связывания кальция* с АТФазой. Изучение влияния ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на распад и образование фосфатофермента показало, что при фосфорилировании константа связывания  $\text{Ca}^{2+}$  уменьшается более чем в 1000 раз, т.е. становится меньше  $2 \cdot 10^3$  моль<sup>-1</sup>л. В 0,5 мМ растворе  $\text{Ca}^{2+}$  половина всех связанных ранее ионов кальция после

фосфорилирования белка отрывается от АТФазы и ионы переходят в раствор; при 1 мМ концентрации ионов кальция в среде в связанном состоянии находятся две трети ионов, остальные выходят в раствор. Наличие ионов магния в среде дополнительно уменьшает количество связанного кальция, поскольку у фосфорилированной АТФазы разница в сродстве к  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  не очень велика.

Что же получается? До фосфорилирования АТФаза связывала кальций при низких концентрациях ( $10^{-7}$  моль/л), а после фосфорилирования – только при высоких ( $10^{-3}$  моль/л). Энергия АТФ пошла на то, чтобы АТФаза “вытолкнула” в концентрированный раствор  $\text{Ca}^{2+}$  ионы, которые фермент “выловил” из их разбавленного раствора. Но это еще не все. Дело ведь в том, что АТФаза связывает кальций по одну сторону мембраны, а отщепляется он – по другую.

#### ***10.6.8. Перенос кальция через мембрану (транслокация)***

В везикулах саркоплазматического ретикулума молекулы Са-АТФазы ориентированы строго определенным образом, так что связывание ионов кальция и АТФ происходит с наружной стороны пузырьков, а высвобождение кальция – с внутренней. Изучение связывания ионов кальция на разных стадиях работы Са-АТФазы показало, что в нефосфорилированном состоянии Са-связывающие центры АТФазы доступны для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  только с внешней стороны пузырьков и недоступны с внутренней. После фосфорилирования фермента Са-связывающие центры становятся доступными с внутренней стороны и недоступными с внешней. Таким образом, фосфорилирование приводит к переносу центров связывания кальция через мембрану (транслокации). Поскольку перенос ионов осуществляет белковая молекула, очевидно, что какие-то ее части должны перемещаться, или, как принято говорить, должно происходить изменение *конформации* белковой молекулы. Одновременно, как уже говорилось, происходит изменение сродства центров связывания к ионам кальция. Механика сопряжена с энергетикой.

#### ***10.6.9. Завершение цикла – гидролиз фосфофермента (стадии 5 и 6)***

Магниевый комплекс энзим–фосфата быстро гидролизуется, и фермент приобретает свои исходные свойства. При этом на поверхности фермента, обращенной наружу, вновь появляются центры связывания кальция с высоким сродством. Очевидно, что гидролиз Е-Р (стадия 5) приводит, во первых, к освобождению центров связывания от магния, а во вторых, к их обратной транслокации (стадия 6). При этом на поверхности фермента, обращенной наружу, центры связывания кальция приобретают вновь высокое сродство к этим ионам. Таким образом, дефосфорилирование Е-Р приводит к пространственным

перемещения участка белковой молекулы и к изменениям энергии связывания ионов точно так же, как и фосфорилирование АТФазы, но в противоположном направлении. Цикл работы фермента замыкается.

#### ***10.6.10. Прямые доказательства того, что фермент “шевелится”, когда работает***

Хотя идея о том, что при работе фермента происходит изменение конформации белка, высказана давно, прямые доказательства этого получены далеко не для всех известных ферментативных реакций. В этом отношении транспортные АТФазы – благодарный объект, поскольку эти механохимические машины осуществляют перенос ионов с одной стороны мембраны на другую. Ясно, что такие действия связаны с перемещением в пространстве определенных участков белковой молекулы. Было доказано изменение конформации Са-АТФазы при работе этого фермента методами дифференциальной спектрофотометрии, собственной белковой флуоресценции и спиновых зондов. Однако интереснее всего узнать, на каких именно стадиях работы фермента происходят наиболее заметные изменения конформации белка. Методом спиновых меток было обнаружено резкое увеличение подвижности участка белка, содержащего SH-группу, при присоединении к ферменту Mg•АТФ. Спиновая метка – это химическая группировка, содержащая устойчивый свободный радикал – иминоксил, >NO, сигнал электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) которого зависит от физических свойств той среды, которая окружает иминоксильную (>NO) группу. При увеличении подвижности полипептидной цепи, к которой присоединен иминоксильный радикал, меняется соответствующим образом и сигнал ЭПР. Затем удалось показать изменение конформации фермента (подвижности спиновой метки, присоединенной к SH-группе) как при образовании фосфофермента, так и при его распаде. Таким образом, механические перемещения участка фермента, которые были предсказаны на основании изучения отдельных стадий работы АТФазы, были подтверждены прямыми опытами.

#### ***10.6.11. Физическое состояние липидов и работа Са-АТФазы***

Активность многих мембранных ферментов, включая Са-АТФазу, существенно зависит от вязкости и химической природы окружающих липидов. Так, например, меняя фосфолипидный состав везикул, в которые встроена Са-АТФаза, можно заметно влиять на активность фермента, причем чем выше текучесть (величина, обратная вязкости) липидного бислоя липосом, тем выше скорость гидролиза АТФ. При изменении температуры также параллельно изменяется текучесть липидного слоя в везикулах и активность Са-АТФазы. Было также показано, что при увеличении вязкости липидного

слоя мембран, вызванного окислением фосфолипидов, происходит снижение активности фермента.

Хотя кажется вроде бы очевидным, что активность фермента, плавающего в липидном слое, должна зависеть от вязкости этого слоя, над этим все-таки стоит призадуматься. В самом деле, ведь стадии присоединения субстрата и отщепления продуктов реакции протекают в водной фазе. Поэтому если бы фермент, выполняя свою функцию, не осуществлял никаких механических движений, вязкость вряд ли могла бы влиять на его деятельность. По-видимому, к вязкости липидного окружения чувствительны только те мембранные ферменты, при работе которых происходит изменение их конформации. Продолжая эту мысль, можно полагать, что из всех стадий ферментативной реакции только те будут зависеть от вязкости липидов, на которых происходит изменение конформации белка. И действительно, было показано, что скорость распада фермент-фосфатного комплекса Са-АТФазы уменьшается с ростом вязкости липидов. Это подтверждает, что на этой стадии происходит движение участка фермента, которое, согласно схеме на рис. 10.3 связано с переносом ионов кальция через мембрану. В живых клетках изменения липидного состава мембран, например состава жирных кислот в молекулах фосфолипидов, включение холестерина или окисление мембранных липидов, также могут влиять на микровязкость липидного слоя и тем самым на активность Са-АТФазы. Разумно предположить, например, что повышение вязкости клеточных мембран ввиду избытка холестерина или перекисного окисления липидов может привести к ухудшению работы ферментных систем, осуществляющих выкачивание  $\text{Ca}^{2+}$  из клетки, и в результате этого – к повышению концентрации этих ионов в клеточном соке со всеми вытекающими последствиями.

#### **10.6.12.      *Строение кальциевой АТФазы***

Выражение “о ферментах, как и о людях, судят по их действию” (символ веры первого поколения энзимологов) сейчас уже не так бесспорно. Многие ферменты получены в виде кристаллов, и на основании рентгеноструктурного анализа воссоздана их подробная пространственная структура, а подчас и структура их комплексов с субстратами и ингибиторами. К сожалению, транспортные АТФазы, не растворимые в воде и работающие в составе мембран, не удастся получить в виде настоящих кристаллов. Тем не менее, многое об их структуре все же известно, включая последовательность аминокислот в полипептидной цепи, локализацию мест связывания ионов и АТФ в полипептидной цепи и расположение определенных участков цепи по отношению к мембране.

На рис. 10.9 приведено схематическое изображение Са-АТФазы. Фермент пронизывает мембрану одиннадцатью  $\alpha$ -спиральными участками, большая часть которых соединена снаружи короткими полипептидными цепочками, за исключением двух протяженных гидрофильных (т. е. хорошо растворимых в воде) петель на стороне цитоплазмы. Более короткая петля расположена между  $\alpha$ -спиралями  $M_2$  и  $M_3$ , более длинная – между  $\alpha$ -спиралями  $M_4$  и  $M_5$ . Длинная петля содержит АТФ-связывающий участок, включающий остаток аспарагиновой кислоты, к которому присоединяется фосфат. Связывание ионов  $Ca^{2+}$  происходит на участке, образованном малой петлей (между  $\alpha$ -спиралями  $M_2$  и  $M_3$ ), возможно с участием аминокислотных остатков, прилежащих к спиральям  $M_1$  и  $M_4$ . В местах связывания собрано несколько остатков аспарагиновой кислоты, несущих отрицательные заряды.

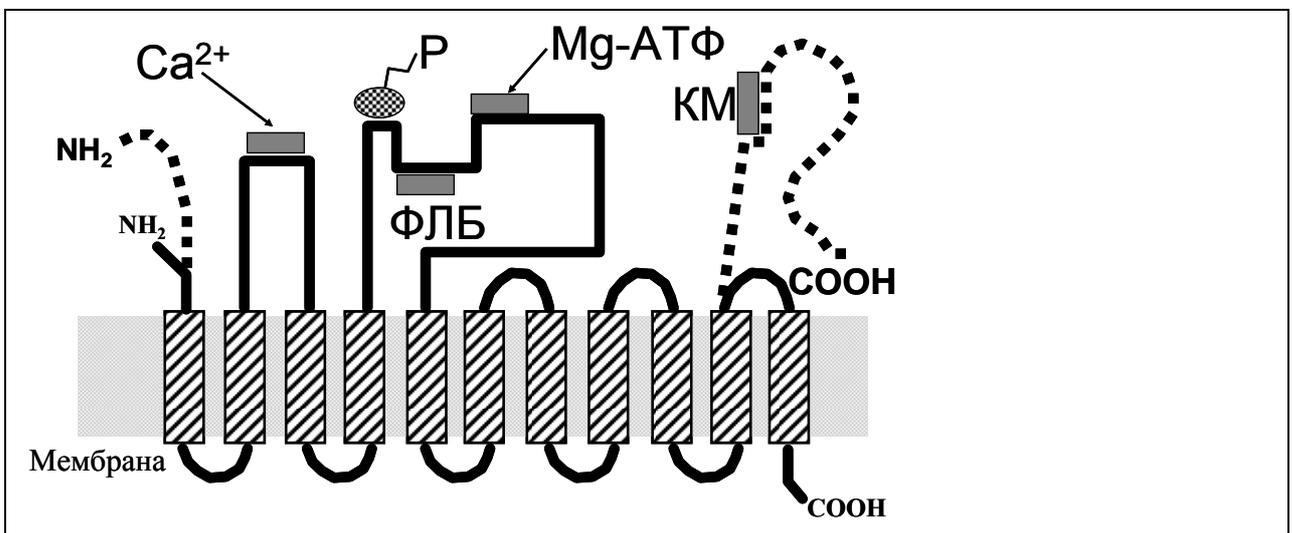


Рис. 10.7. Общая схема строения кальциевой АТФазы: черная линия — полипептидная цепь Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума, пунктирная — участки цепи Са-АТФазы цитоплазматической мембраны, заштрихованные прямоугольники —  $\alpha$ -спиральные участки, пронизывающие мембрану (обозначены в тексте как  $M_1$ ,  $M_2$  и т. д., считая слева направо),  $NH_2$  — N-конец полипептидной цепи,  $COOH$  — С-конец, серые прямоугольники обозначают участки связывания:  $Ca^{2+}$  — ионов кальция,  $Mg-ATP$  — молекулы АТФ,  $PLB$  — фосфоламбана (у Са-АТФазы эндоплазматического ретикулума),  $CM$  — кальмодулина (у цитоплазматической Са-АТФазы),  $P$  — участок фосфорилирования.

### 10.6.13. *Другие Са-АТФазы*

Даже в одних и тех же клетках поперечно-полосатых мышц содержится не менее двух изоферментов Са-АТФазы, встроенной в мембраны эндоплазматического ретикулула, которые различаются по чувствительности к кофеину. Вообще же можно говорить о целом семействе кальциевых АТФаз. Различают Са-АТФазы *цитоплазматических мембран* и Са-АТФазы *эндоплазматического* ( в том числе саркоплазматического) *ретикулула*. Каждая из них представлена несколькими изоформами. Плазматическая Са-АТФаза, в отличие от саркоплазматической, содержит третью петлю полипептидной цепи, экспонированной в цитоплазму и образуемой С-концом. На рис. 10.9 она обозначена красным цветом. На этом домене имеется центр связывания кальмодулина – регуляторного белка, который, помимо ряда других функций, реактивирует плазматическую Са-АТФазу, о чем будет сказано ниже.

### 10.6.14. *Регуляция активности транспортных АТФаз*

Активность кальциевых АТФаз внутриклеточных депо (например, эндоплазматического ретикулула клеток сердца, печени или эпителия) регулируется особым белком – *фосфоламбаном*, который связывает участок пептидной цепи АТФазы неподалеку от места фосфорилирования (см. рис. 10.7) и тормозит работу фермента за счет уменьшения сродства участков связывания  $Ca^{2+}$  к этому иону. При необходимости, внутриклеточные регуляторные системы “отцепляют” фосфоламбан от АТФазы и ее работа восстанавливается. Это осуществляется за счет фосфорилирования фосфоламбана протеинкиназами. Фосфорилированный фосфоламбан не обладает способностью связываться с Са-АТФазой и снижать ее активность.

Основным регулятором кальциевых АТФаз цитоплазматической мембраны служит другой белок – *кальмодулин*. Его действие как бы противоположно действию фосфоламбана. Дело в том, что цитоплазматическая Са-АТФаза обладает любопытной способностью ингибировать саму себя. Ее С-конец, экспонированный, как уже говорилось, в цитоплазму, загибается и подобно жалу скорпиона поражает Са-АТФазу “прямо в сердце”, блокируя центры связывания кальция. Кальмодулин берет на себя функцию защитника: он связывается с участком вблизи С-конца (см. рис. 10.7) и снимает ингибирование Са-АТФазы, лишая полипептидный хвост способности связываться с активным участком АТФазы. Таким образом, если фосфоламбан ингибирует эндоплазматическую Са-АТФазу, то кальмодулин реактивирует “аутоингибированную” цитоплазматическую Са-АТФазу. Несмотря на противоположное действие, кальмодулин и фосфоламбан – родственники: сравнение аминокислотных последовательностей

показывает, что многие участки полипептидной цепи у них совпадают. Изобретательная природа сумела один и тот же исходный материал (белок-предшественник, как бы пра- кальмодулин) приспособить для выполнения противоположных функций.

### 10.6.15. *Нарушение активности Са-АТФазы в патологии*

У экспериментальных животных, страдающих гипертонией, снижена активность кальциевых АТФаз в гладких мышцах стенок кровеносных сосудов. Это снижение активности приводит к повышению содержания внутриклеточного кальция. А поскольку ионы  $\text{Ca}^{2+}$  запускают механизм мышечного сокращения, тонус сосудистой стенки увеличен, а это приводит к повышению кровяного давления в целом организме.

В числе причин поражения Са-АТФазы у гипертоников называют активацию процессов с участием свободных радикалов. Действительно, в модельных опытах с изолированными везикулами саркоплазматического ретикулула было показано, что Са-АТФаза очень чувствительна к перекисному окислению липидов, при котором происходит окисление SH-групп, входящих в активный центр фермента. Мало того, что “подпорченная” таким образом Са-АТФаза перестает качать ионы кальция, из насоса она превращается в канал для кальция, через который эти ионы начинают переноситься не из цитозоля в ретикулум, как им полагается, а наоборот: из ретикулума, где их концентрация выше, в клеточный сок, где их концентрация ниже (см. рис. 10.8).

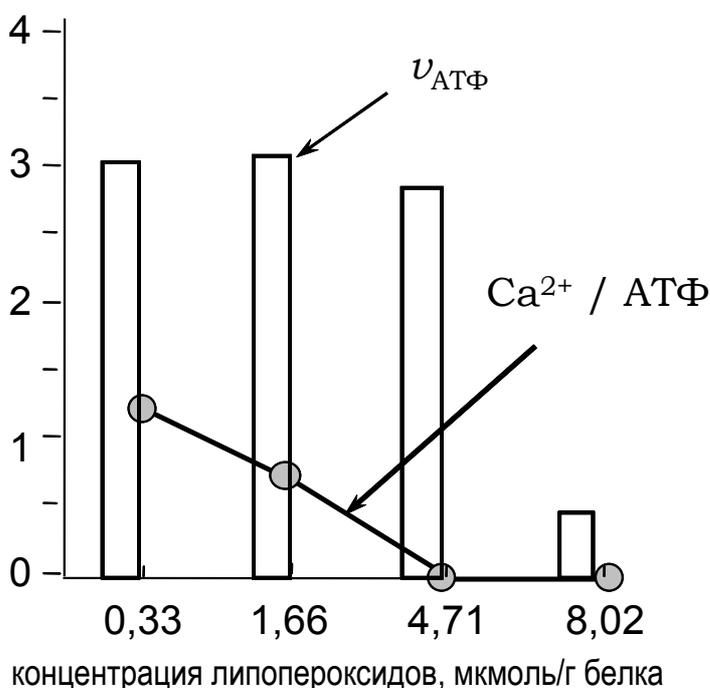


Рис. 10.8. Изменение активности Са-АТФазы при перекисном окислении липидов мембран саркоплазматического ретикулума. По оси ординат отложена скорость гидролиза АТФ и переноса ионов кальция (в отн. ед.) и отношение числа перенесенных внутрь везикул ионов кальция к числу молекул гидролизованного АТФ. Видно, что способность фермента гидролизовать АТФ не изменяется вплоть до концентрации продуктов окисления липидов 4,7 мкмоль/г белка; к этому моменту способность

ретикулума накапливать кальций полностью утрачивается (отношение Ca/АТФ снижается и скорость накопления кальция  $V_{Ca}$  тоже падает).

Превращение Са-АТФазы из помпы в канал предопределено ее структурой. Подобно велосипедному насосу, Са-АТФаза состоит из трубки, поршня и клапанов. Трубка – это ионный канал, состоящий из сравнительно небольшого фрагмента полипептидной цепи, который удалось отделить от остальной части АТФазы обработкой фермента протеазами, выделить и очистить. При встраивании этих фрагментов в липосомы их мембраны становятся проницаемыми для ионов  $Ca^{2+}$ . При перекисном окислении липидов, окружающих АТФазу, ее поршень и клапаны, по-видимому, ломаются, и ионы кальция начинают беспрепятственно течь по трубке в сторону меньшей концентрации (см. рис. 10.9).

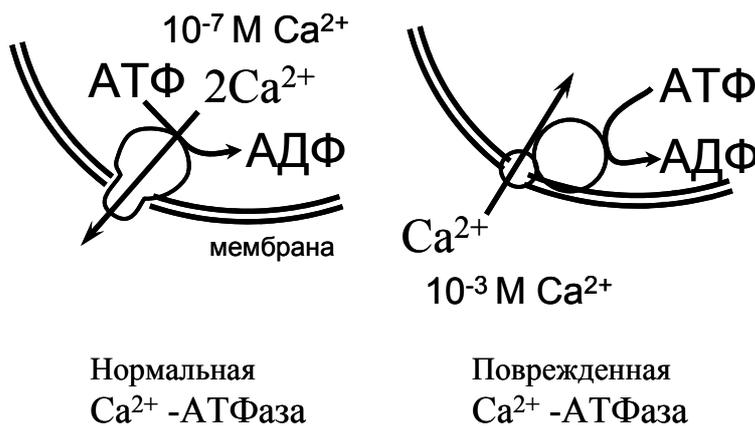


Рис. 10.9. Нарушение работы Са-АТФазы после повреждения фермента под действием процесса перекисного окисления липидов мембран; способность АТФазы гидролизовать АТФ сохраняется, но кальций не накачивается, а наоборот — начинает выходить из ретикулума, как показали специальные опыты, ионный насос превратился в ионный

канал.

Подобного типа повреждение кальциевых насосов, надо думать, происходит нередко. Хорошо известна роль свободных радикалов в развитии широкого круга так называемых дегенеративных болезней, включая рак, многие интоксикации, болезни, связанные с атеросклерозом и иммунными нарушениями. Во многих случаях повреждение Са-АТФаз свободными радикалами может играть не последнюю роль в зарождении и развитии заболеваний.