

ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России
Кафедра химии

Транспорт веществ через биологические мембраны

Д.б.н. Сгибнев А.В.

Связь: строение – среда - функции

Первичная химическая
структура

Факторы среды –
 t° , pH, P, $h\nu$, др.

Пространственная конформация
(форма молекул)

Свойства молекул

Функции молекул

Функции
биологических
мембран

Клеточная мембрана

- Ограничивает клетки и клеточные органеллы
- Жидкостно-мозаичная модель
- Фосфолипидный бислой – голова – полярная/гидрофильная
хвосты – неполярные/гидрофобные
- Белки
 - Интегральные – переносчики и каналы
 - Периферические – рецепторы и антигены, например.

Функции клеточной мембраны

- **Действует как полупроницаемый барьер - (селективный)**
 - Поддерживает разницу в составе вне- и внутриклеточного содержимого и содержимого различных органелл
 - Защищает клетку от токсичных веществ
 - Выведение продуктов жизнедеятельности
 - Транспорт питательных веществ
- **Принимает сигналы извне**
 - Химические сигналы
 - Электрические сигналы
- **Сайты для прикрепления соседних клеток**

Мембранный транспорт: общие положения, термины

Мембранный транспорт (транспорт веществ через липидный бислой): пассивный и активный.

Пассивный мембранный транспорт – по (электро)химическому градиенту, не требует энергетических затрат: диффузия или облегченная диффузия.

Активный мембранный транспорт – против (электро)химического градиента, т.е. необходимы энергетические затраты (сопряжение с энергетически выгодным процессом): первичный и вторичный.

Источники энергии для активного мембранного транспорта: гидролиз АТФ, свет, окислительно-восстановительные реакции, (электро)химический градиент.

Энергия для **первичного активного** транспорта поступает из источника, отличного от уже имеющегося (электро)химического градиента (**транспорт протонов в ЭТЦ?**).

Источником энергии для **вторичного активного** транспорта служит предсуществующий (электро)химический градиент.

Мембранный транспорт: общие положения, термины

Классификация транспортных систем (в соответствии с рекомендациями IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology):

1. Каналы и поры

2. Переносчики (carriers, porters)

3. Транспортёры первичного активного транспорта (primary active transporters): системы, использующие гидролиз фосфодиэфирных связей, декарбоксилирование, перенос метильных групп; окислительно-восстановительные реакции; энергию света

4. Трансферазы (group translocators)

5. Переносчики электронов

Транспорт через мембрану

механизм транспорта

пассивный

активный

- Простая диффузия
- Облегченная диффузия
- фильтрация
- осмос
- диализ
- Первичный активный транспорт
- Вторичный активный транспорт
- Эндо/Экзоцитоз

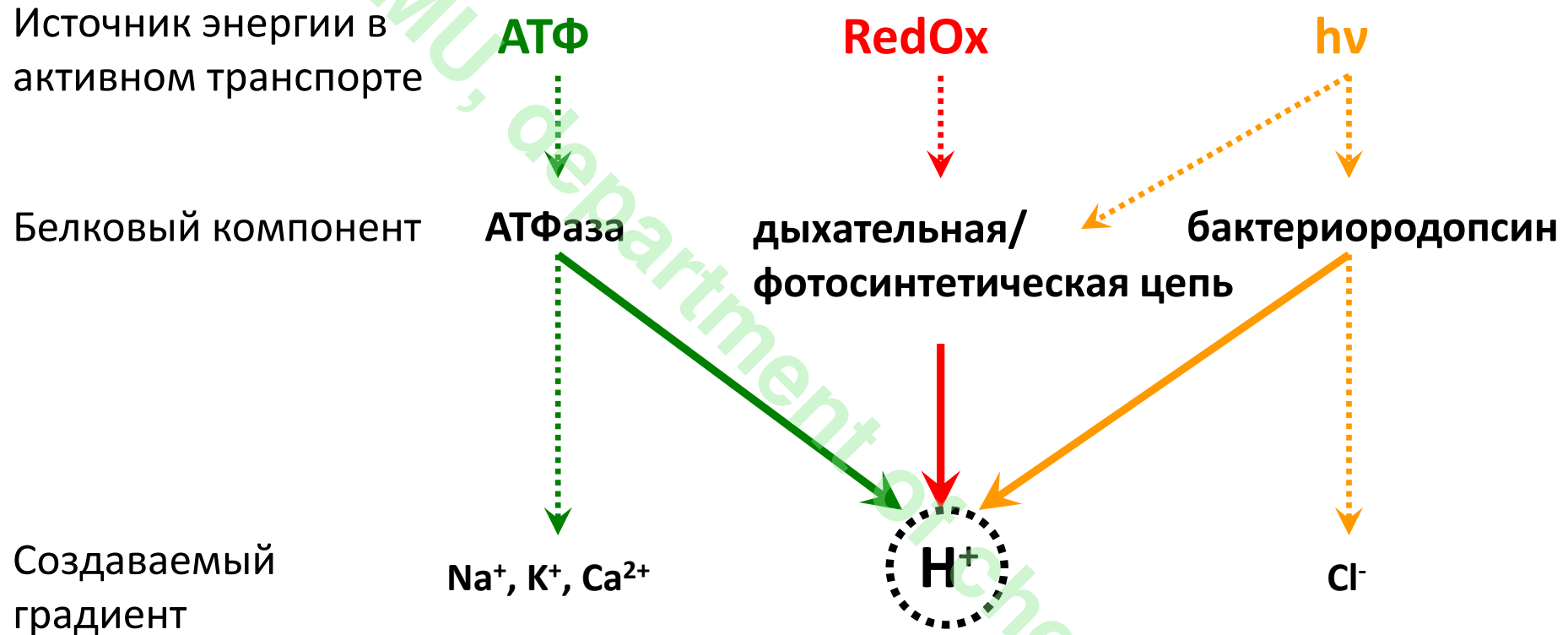
Пассивный транспорт

- Без затрат энергии
- Происходит всегда по градиенту концентраций, электроградиенту и градиенту давления.
- Переносчик может потребоваться, а может и не потребоваться
- Скорость транспорта пропорциональна разнице концентраций

Активный транспорт

- Необходима энергия
- Может происходить против градиента концентраций.
- Всегда требуется переносчик
- Скорость транспорта пропорциональна доступности переносчика и энергии (V_{\max}).

Мембранный транспорт: общие положения, термины



Пассивный транспорт

- Зависит от проницаемости клеточной мембраны

- 3 основных типа:

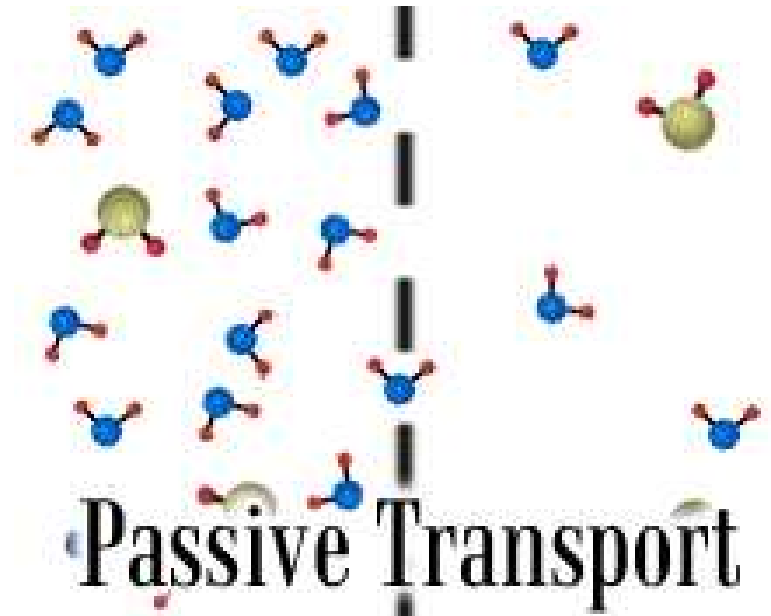
Диффузия (простая диффузия)

Облегченная диффузия

Осмос

- Пример:

Газообмен (O_2 в клетку, CO_2 из клетки)



Относительная проницаемость фосфолипидного бислоя для различных веществ

Тип вещества	Примеры	Проницаемость
Газы	CO ₂ , N ₂ , O ₂	Проницаемый
Маленькие незаряженные полярные молекулы	Мочевина, вода, этанол	Проницаемый, полностью или частично
Большие незаряженные полярные молекулы	глюкоза, фруктоза	Не проницаемый
Ионы	K ⁺ , Na ⁺ , Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻	Не проницаемый
Заряженные полярные молекулы	АТФ, аминокислоты, глюкозо-6-фосфат	Не проницаемый

Факторы, влияющие на скорость диффузии

Растворимость в липидах

Размер молекул и вес

Температура

Толщина мембраны

Площадь поверхности

Градиент концентрации

Градиент давления

Электрический градиент

Молекулярные

**Связанные со
свойствами
мембраны**

Градиенты

Простая диффузия

- Пассивный транспорт
- Для малых молекул
- Переносчик не требуется
- Скорость транспорта прямо пропорциональна градиенту концентраций
- Примеры –
растворимые в липидах – O₂, CO₂, этанол
не растворимые в липидах –
мочевина, Na⁺, K⁺

Облегченная диффузия

- Пассивный транспорт
- Для больших молекул
- Нужен переносчик
- Изначально скорость пропорциональна градиенту концентраций до V_{\max} (насыщение переносчиков)
- Примеры –
глюкоза, аминокислоты

Диффузия может происходить через: Фосфолипидный бислой

Растворимые в липидах вещества - O_2 , CO_2 ,
стероиды и т.д.

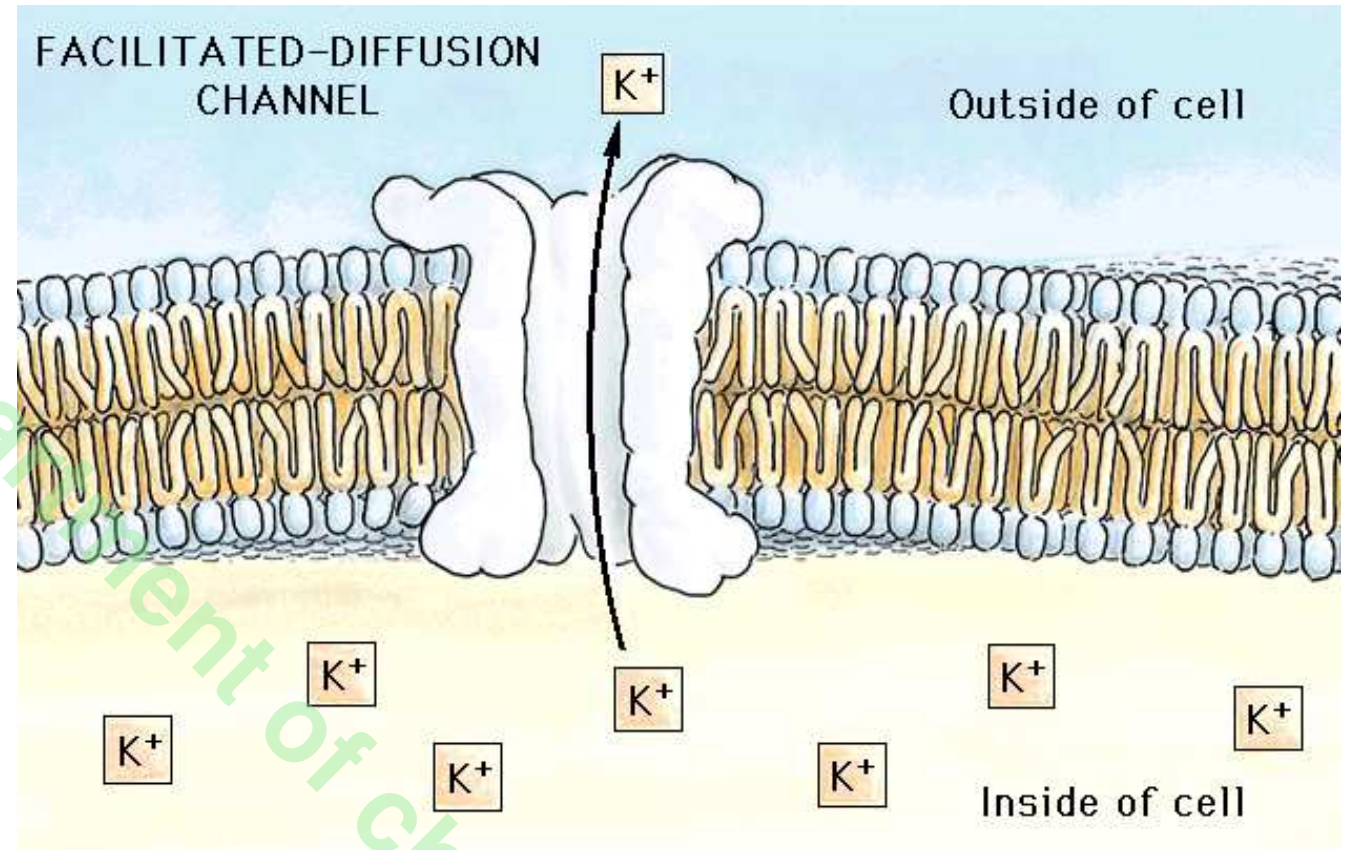
Нерастворимые в липидах – вода и т.п. (через
пространство между молекулами липидов(кинки))

Электролиты, полярные молекулы – не проходят

И...

...через мембранные каналы

Заряженные молекулы
и ионы (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-)
не способны проходить
через липидный бислой
путем простой
диффузии, тем не
менее, они проникают
через мембрану,
благодаря наличию в
ней особых
каналообразующих
белков, формирующих
различные каналы.

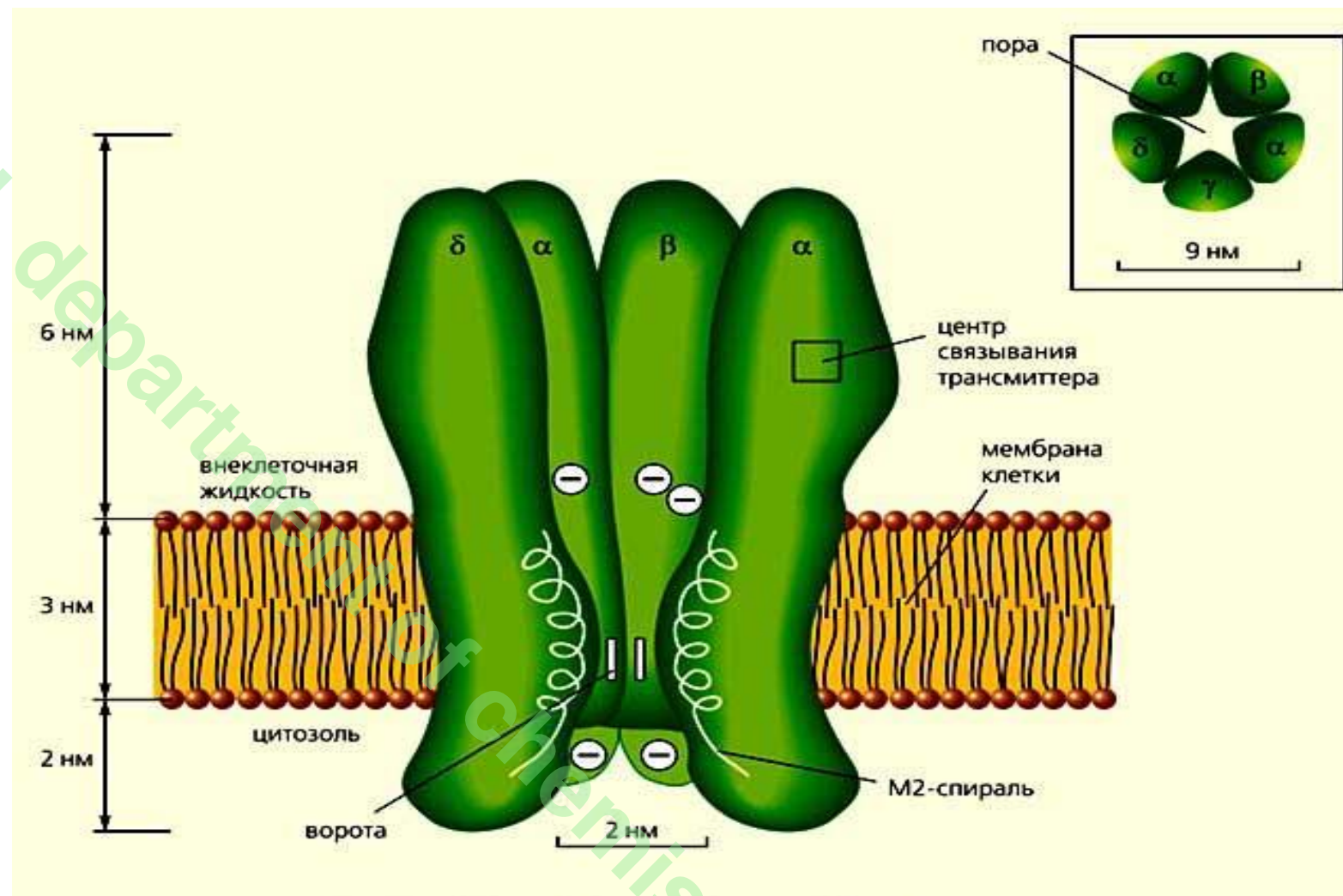


Белки-каналы (белковые каналы) - тип транспортного белка, действует как пора в мембране, которая быстро пропускает молекулы воды или небольшие ионы. Белки водного канала (аквапорины) позволяют воде очень быстро диффундировать через мембрану. Белки ионных каналов позволяют ионам диффундировать через мембрану

- Белки-каналы создают гидрофильное отверстие, в котором небольшие водорастворимые молекулы могут проходить внутрь или из клетки.
- Щелевые контакты и порины образуют очень большие отверстия
- Ионные каналы очень специфичны в отношении размера пор и заряда перемещаемых ионов.
- Перемещают в основном Na, K, Cl и Ca

- Сложные трансмембранные белковые структуры, пронизывающие клеточную мембрану поперёк в виде нескольких петель и образующие пору;
- Канальные белки состоят из нескольких субъединиц, в которых имеются дополнительные молекулярные системы: открытия, закрытия, избирательности, инактивации, рецепции и регуляции.
- ИК могут иметь не один, а несколько сайтов для связывания с управляющими веществами (лигандами).

Ионные каналы



Функции ионных каналов

- **Главная функция ИК** - обеспечивать управляемое перемещение ионов через мембрану.
- Регуляция водного обмена клетки: объём и тургор.
- Регуляция pH: закисление и защелачивание.
- Регуляция ионного обмена (обмен солей): изменение внутриклеточного ионного состава и концентрации.
- Создание и изменение мембранных потенциалов: потенциал покоя; в возбудимых клетках - локальные потенциалы, потенциал действия.
- Проведение возбуждения в возбудимых клетках: обеспечение движения нервных импульсов.
- Трансдукция в сенсорных рецепторах: преобразование раздражения (стимула) в возбуждение.
- Управление активностью клетки: за счёт обеспечения потоков вторичного мессенджера - Ca^{2+} .

Ионные каналы

Обладают селективностью по отношению к ионам - пропускают одни ионы и ограничивают прохождение других в зависимости от размера пор и зарядов на внутренней «стенке» канала.

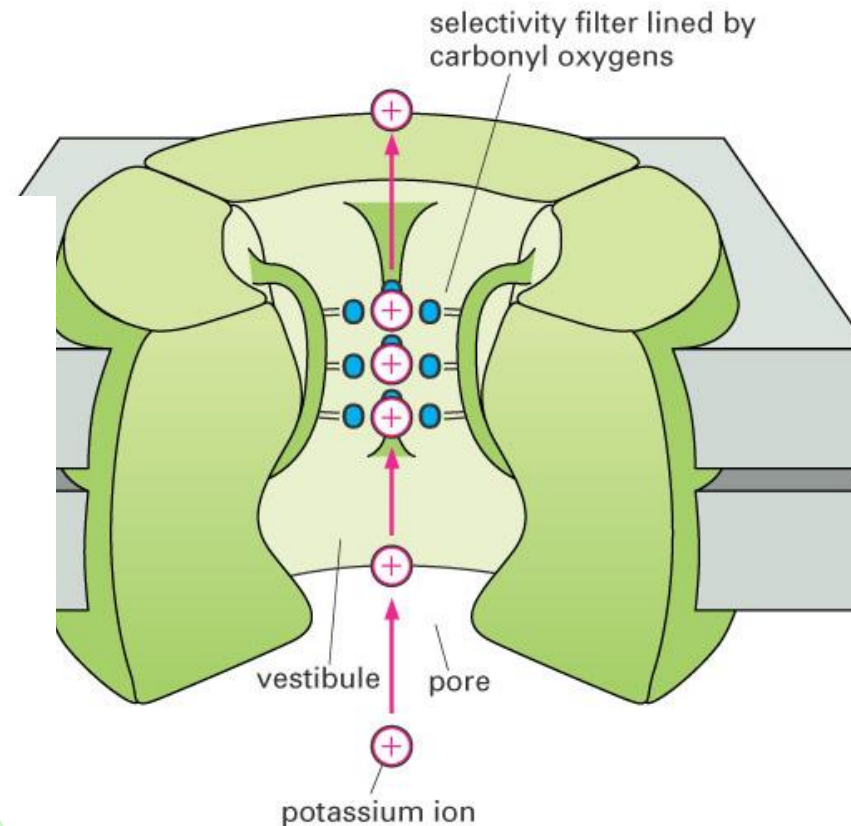
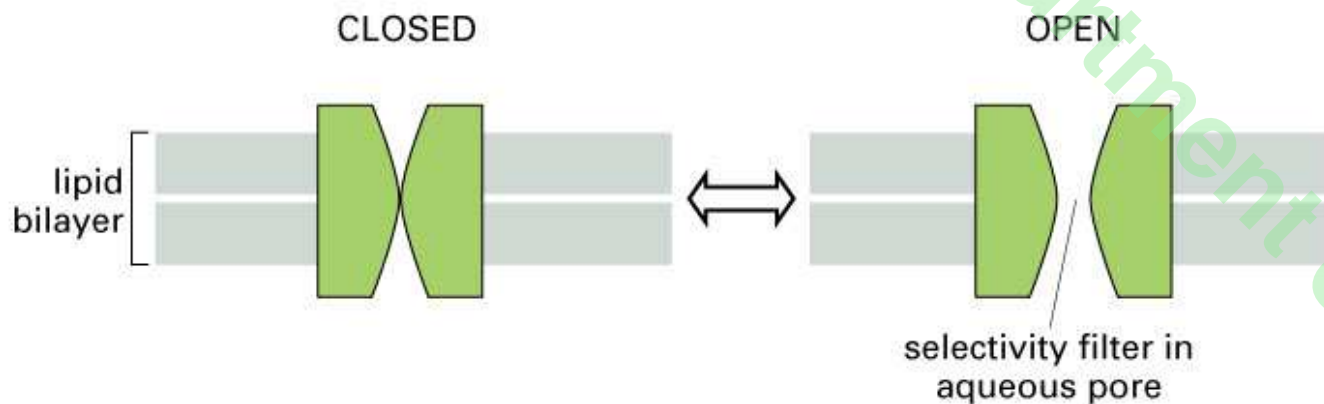
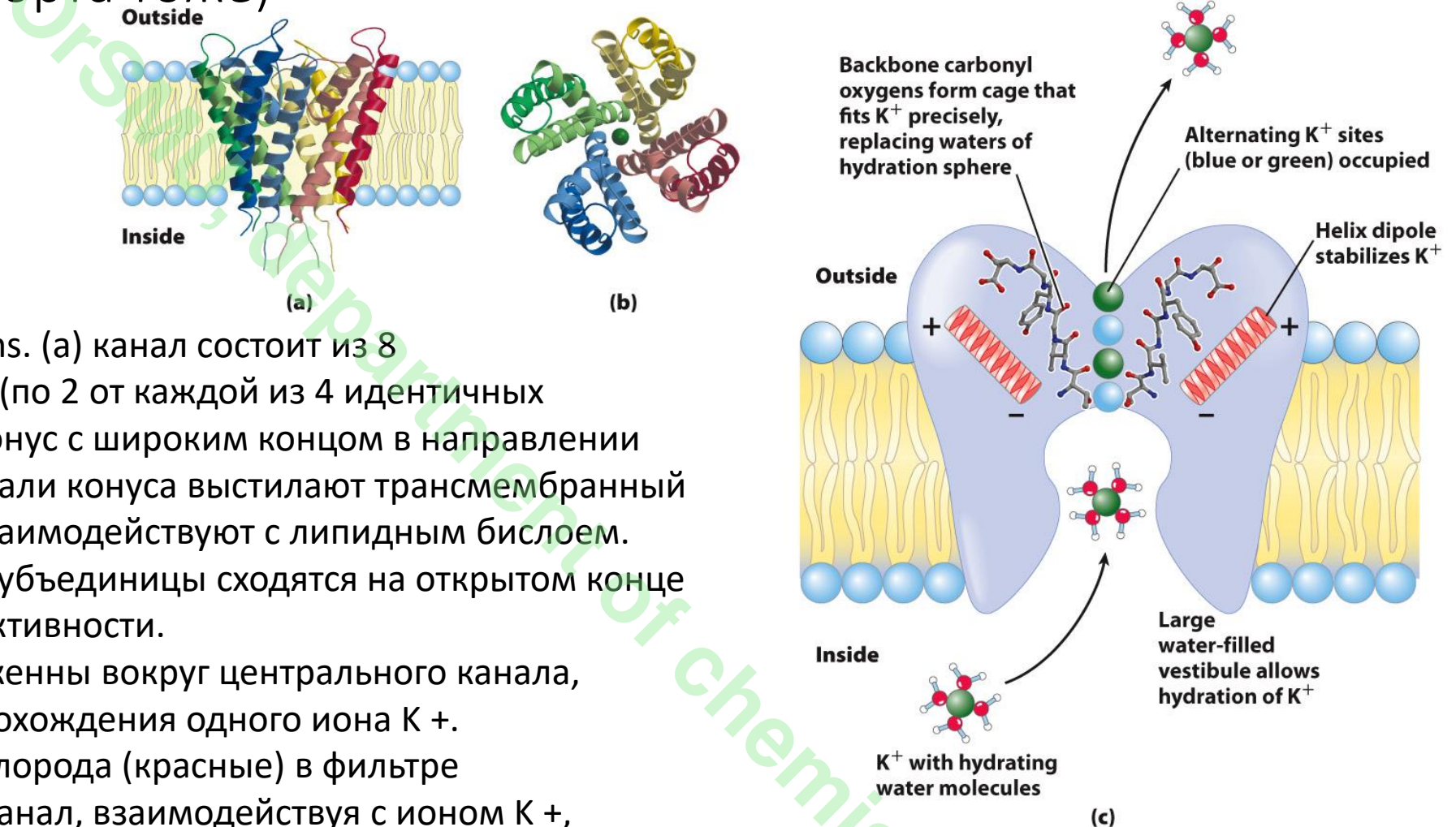


Figure 12-20, 2/e. (© 2004 Garland Science)

Каналы либо открыты, либо закрыты

Ионные каналы селективны и участвуют в поддержании градиентов (и для активного транспорта тоже)



K⁺ канал *Streptomyces lividans*. (a) канал состоит из 8 трансмембранных спиралей (по 2 от каждой из 4 идентичных субъединиц), образующих конус с широким концом в направлении вне клетки. Внутренние спирали конуса выстилают трансмембранный канал, а внешние спирали взаимодействуют с липидным бислоем. Короткие сегменты каждой субъединицы сходятся на открытом конце конуса, образуя фильтр селективности.

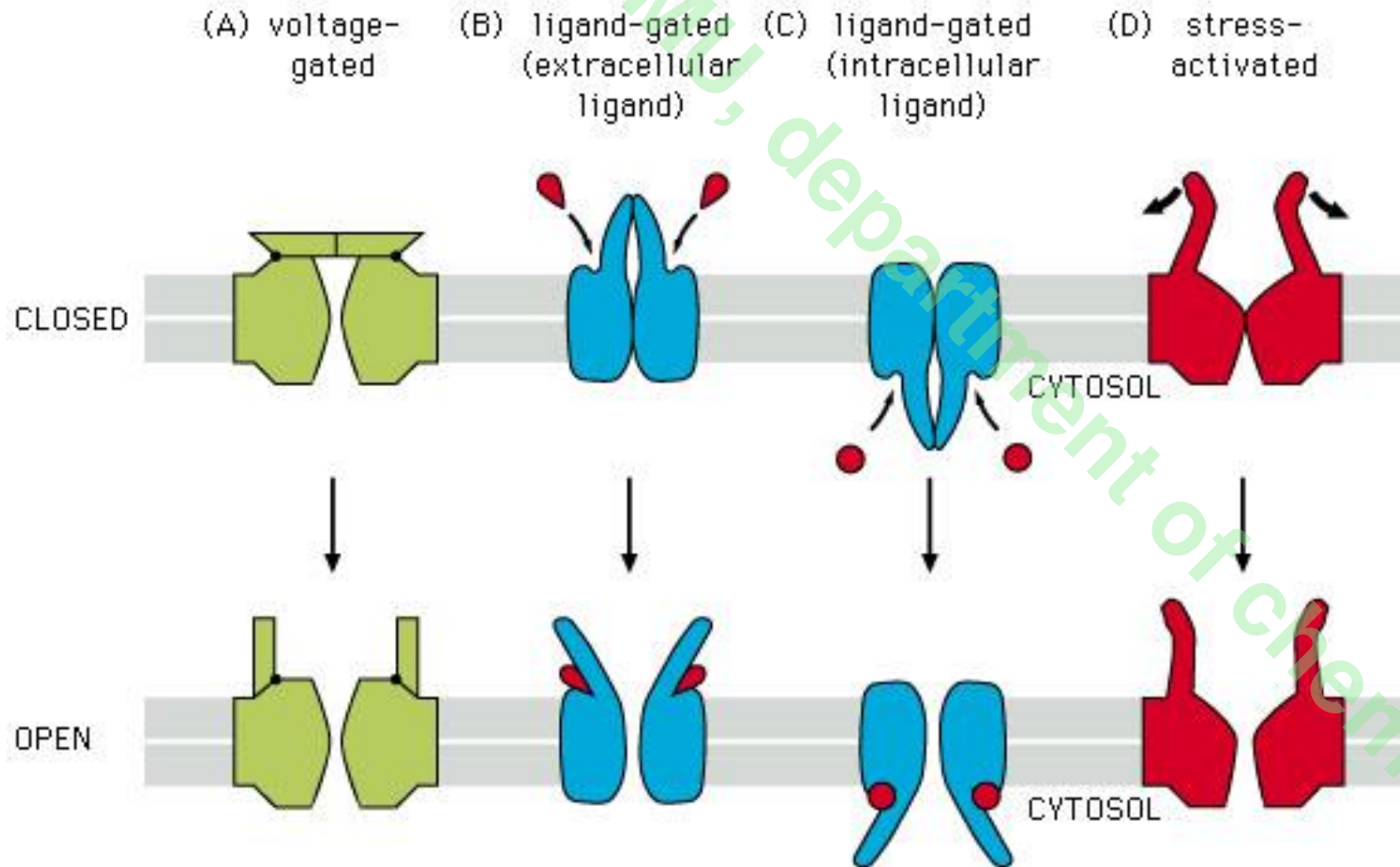
(b) 4 субъединицы, расположенны вокруг центрального канала, достаточно широкого для прохождения одного иона K⁺.

(c) Карбонильные атомы кислорода (красные) в фильтре селективности выступают в канал, взаимодействуя с ионом K⁺, проходя через него, и стабилизируя его. Эти лиганды идеально подходят для взаимодействия с каждым из четырех ионов K⁺, но не с более мелкими ионами Na⁺. Это предпочтительное взаимодействие с K⁺ является основой ионной селективности.

Типы ионных каналов в мембране: управляемые и неуправляемые

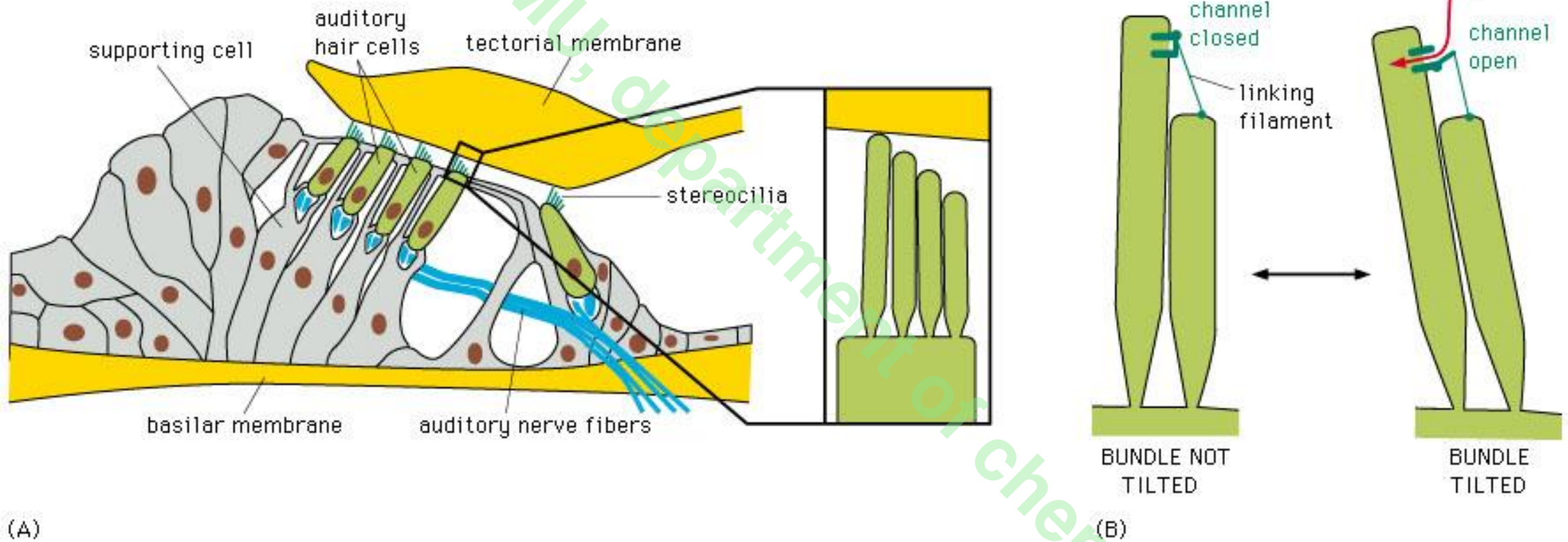
- ❖ Пассивные каналы или каналы утечки - всегда открыты
- ❖ Каналы, управляемые химически (лигандом), открываются при связывании определенного лиганда (напр., нейромедиатора)
- ❖ Потенциал-зависимые каналы - открываются и закрываются в ответ на изменения мембранного потенциала.
- ❖ Каналы с механическим управлением - открываются и закрываются в ответ на физическую деформацию рецепторов.

3 типа управляемых ионных каналов



- Потенциал-зависимые - контролируются мембранным потенциалом
- Управляемые лигандами - контролируются связыванием лиганда с мембранным белком (снаружи или внутри)
- активируемый стрессом - управляемый механической силой на клетку

Ионные каналы с механическим управлением в волосковых клетках (рецепторы слуховой системы и вестибулярного аппарата у всех позвоночных)



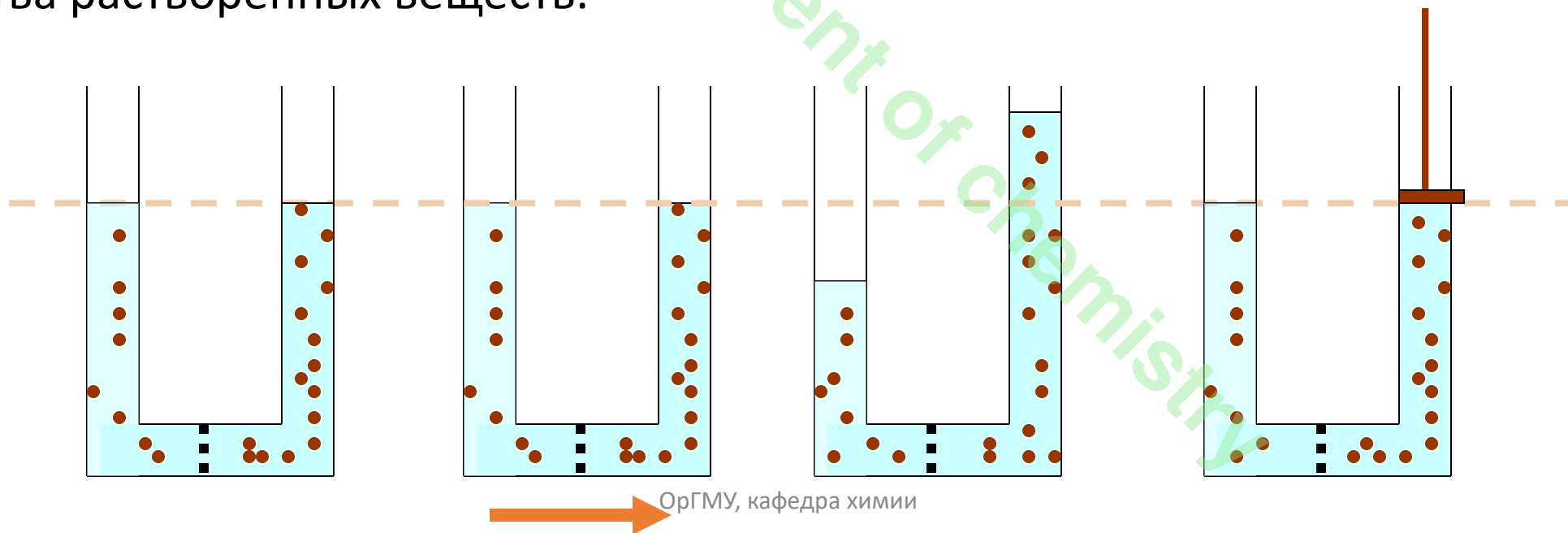
©1998 GARLAND PUBLISHING

- колебания текториальной мембраны заставляют стереоцилии наклоняться, и это заставляет каналы открываться и передавать сигнал в мозг.

Осмоз – тоже диффузия (осмотическое давление)

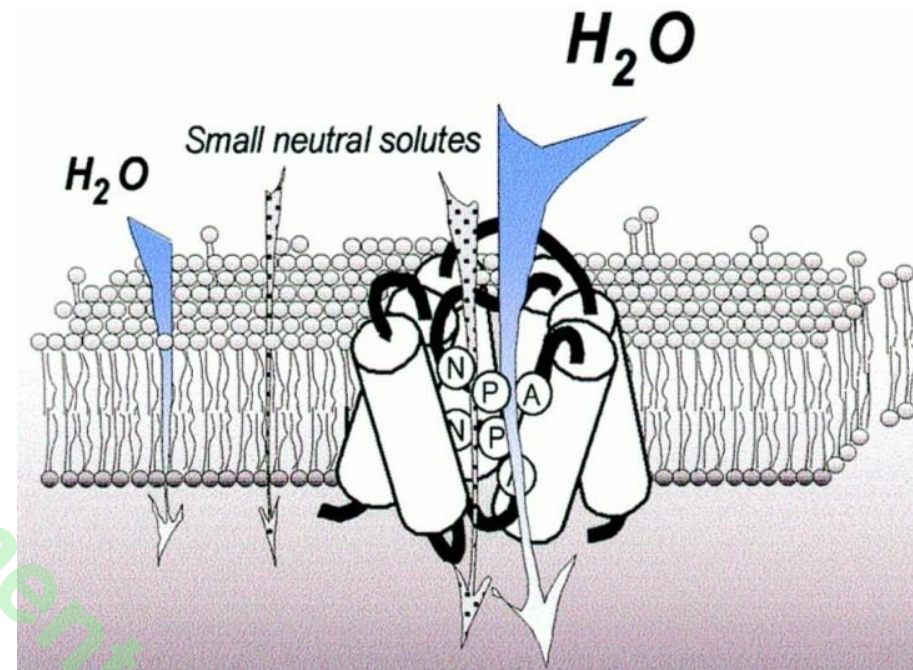
Когда два раствора разной концентрации разделены полупроницаемой мембраной (непроницаемой для растворенных веществ и проницаемой для воды), молекулы воды диффундируют из раствора, имеющего меньшую концентрацию в раствор, имеющий более высокую концентрацию.

Осмотическое давление - это минимальное давление, прилагаемое к раствору с высокой концентрацией, которое предотвращает осмос - зависит от общего количества растворенных веществ.



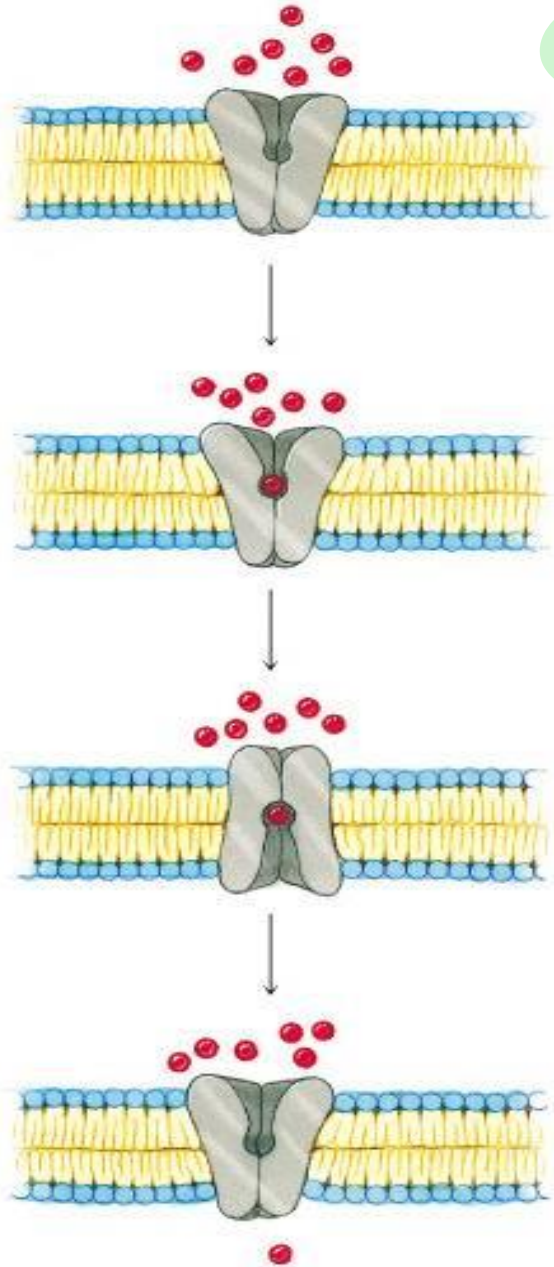
Транспорт воды через мембрану: 2 типа

Диффузию воды через мембраны называют **осмосом**. Вода, очень быстро проникает через липидный бислой. Это объясняется тем, что ее молекула мала и электрически нейтральна.



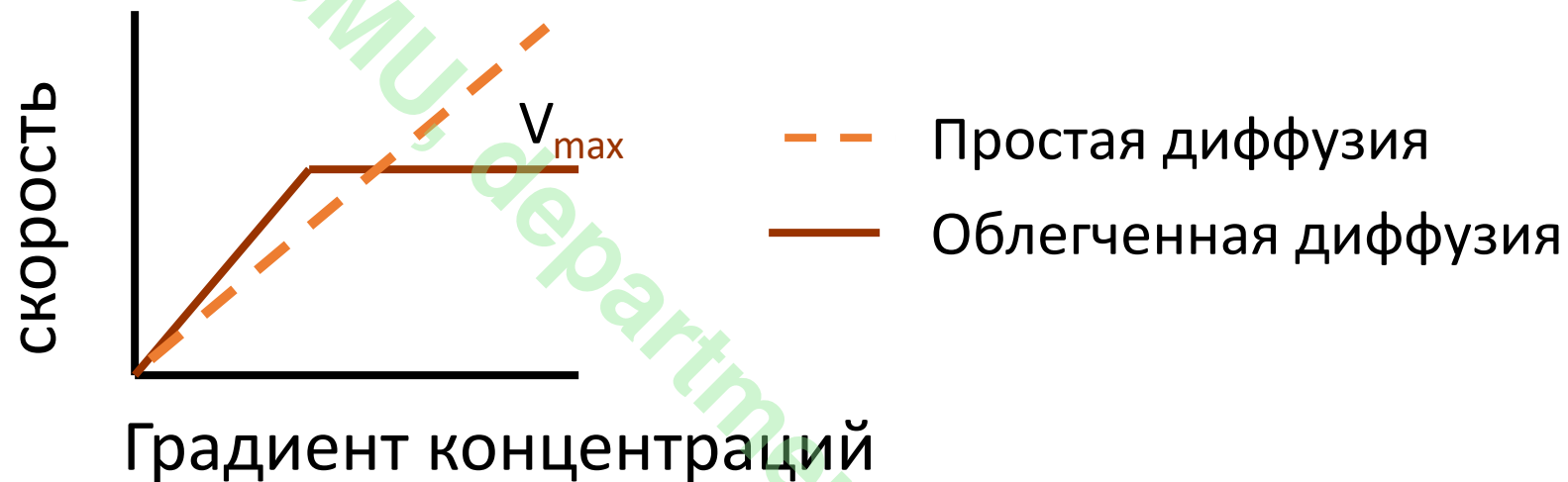
Существуют и **аквапорины** – белки, обеспечивающие быстрое прохождение воды через мембрану.

Облегченная диффузия



- транспорт веществ с помощью специальных транспортных белков, каждый из которых отвечает за транспорт определенных молекул или групп родственных молекул.
- Они взаимодействуют с молекулой переносимого вещества и каким-либо способом перемещают ее сквозь мембрану.
- Таким образом в клетку транспортируются сахара, аминокислоты, нуклеотиды и многие другие полярные молекулы.

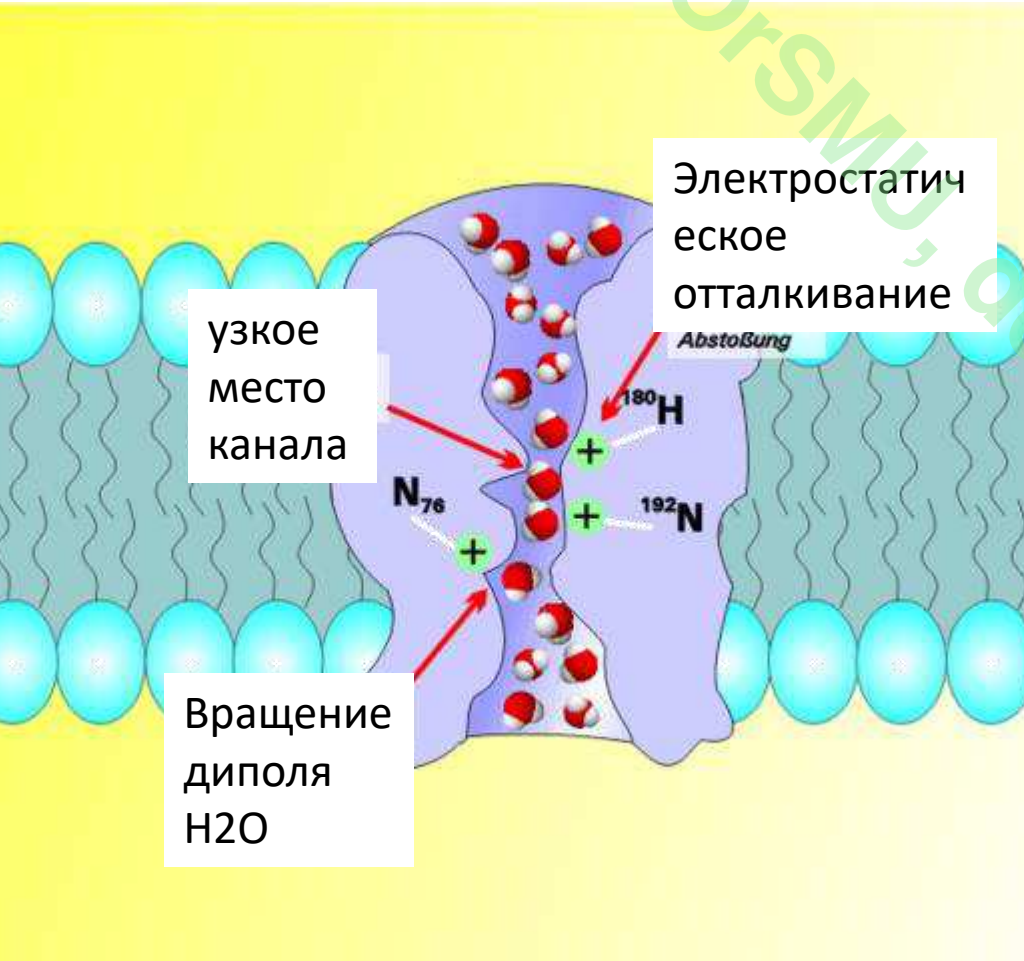
Скорость транспорта через мембрану – V_{max}



Первоначально скорость **прямо пропорциональна** градиенту концентраций, пока не достигнет максимальной (ограничение из-за количества переносчиков и скорости конформационных изменений).

Гормональная регуляция путем изменения количества переносчиков.

Аквапорин 2, как пример регулируемого гормонами переносчика

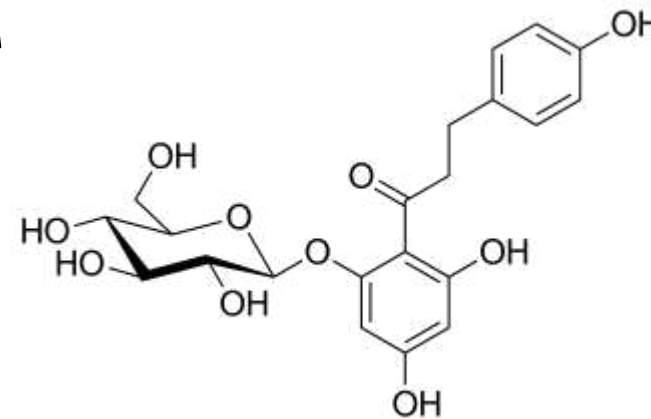
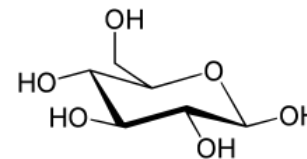


Единственный аквапорин, регулируемый вазопрессином. Основная задача - реабсорбировать воду из мочи. Аквапорин 2 находится в эпителиальных клетках почек и обычно находится в спящем состоянии в мембранах внутриклеточных везикул. Когда это необходимо, вазопрессин связывается с рецептором вазопрессина на поверхности клетки, тем самым активируя сигнальный путь, который заставляет везикулы, содержащие аквапорин 2, сливаться с плазматической мембраной. Этот аквапорин регулируется двумя способами пептидным гормоном вазопрессином :

- кратковременная регуляция (минуты) за счет доставки везикул AQP2 в апикальную область, где они сливаются с апикальной плазматической мембраной
- долгосрочное регулирование (дни) за счет увеличения экспрессии гена AQP2.

Пример облегченной диффузии: GLUT2

- Примером облегченной диффузии является абсорбция глюкозы клетками через переносчик глюкозы 2 (GLUT2) в организме человека.
- Глюкоза представляет собой большую молекулу, ей необходим специальный канал для облегчения ее проникновения через плазматические мембраны в клетки.
- При диффузии в клетку через GLUT2 движущей силой, которая перемещает глюкозу в клетку, по-прежнему остается градиент концентрации.
- Основное различие между простой диффузией и облегченной диффузией состоит в том, что для облегченной диффузии требуется транспортный белок, который «облегчает» или способствует прохождению вещества через мембрану.



флоридзин

Зачем нужны системы активного транспорта?

- Для поддержания нормального функционального состояния клеток в их мембранах локализованы **транспортные системы**, восстанавливающие ионные градиенты по обе стороны мембраны путем переноса различных ионов **против их концентрационных градиентов**.
- Кроме транспорта ионов в клетках организма имеются транспортные системы, переносящие через мембраны (в т.ч. и через мембраны клеточных органелл) различные **метаболиты** – аминокислоты, сахара, нейромедиаторы и проч.

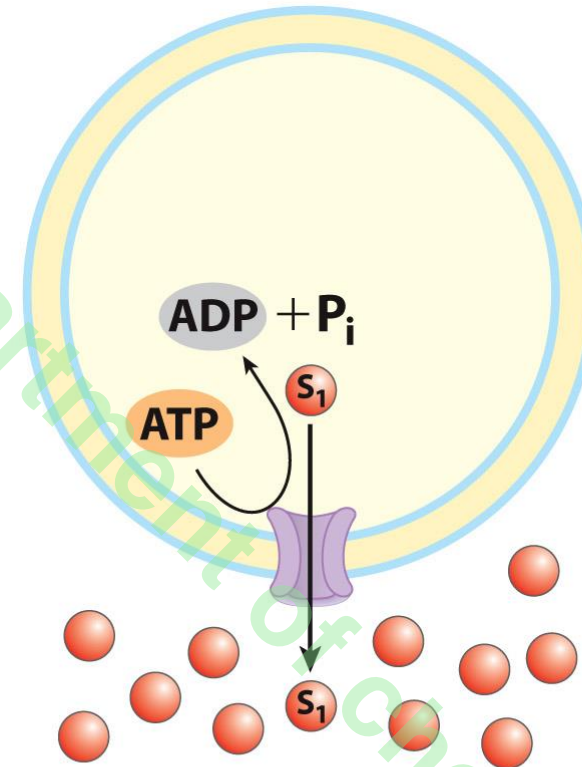
Table 12-2 Some Examples of Carrier Proteins

CARRIER PROTEIN	LOCATION	ENERGY SOURCE	FUNCTION
Glucose carrier	plasma membrane of most animal cells	none	passive import of glucose
Na ⁺ -driven glucose pump	apical plasma membrane of kidney and intestinal cells	Na ⁺ gradient	active import of glucose
Na ⁺ -H ⁺ exchanger	plasma membrane of animal cells	Na ⁺ gradient	active export of H ⁺ ions, pH regulation
Na ⁺ -K ⁺ pump (Na ⁺ -K ⁺ ATPase)	plasma membrane of most animal cells	ATP hydrolysis	active export of Na ⁺ and import of K ⁺
Ca ²⁺ pump (Ca ²⁺ ATPase)	plasma membrane of eucaryotic cells	ATP hydrolysis	active export of Ca ²⁺
H ⁺ pump (H ⁺ ATPase)	plasma membrane of plant cells, fungi, and some bacteria	ATP hydrolysis	active export of H ⁺ from cell
H ⁺ pump (H ⁺ ATPase)	membranes of lysosomes in animal cells and of vacuoles in plant and fungal cells	ATP hydrolysis	active export of H ⁺ from cytosol into vacuole
Bacteriorhodopsin	plasma membrane of some bacteria	light	active export of H ⁺ out of the cell

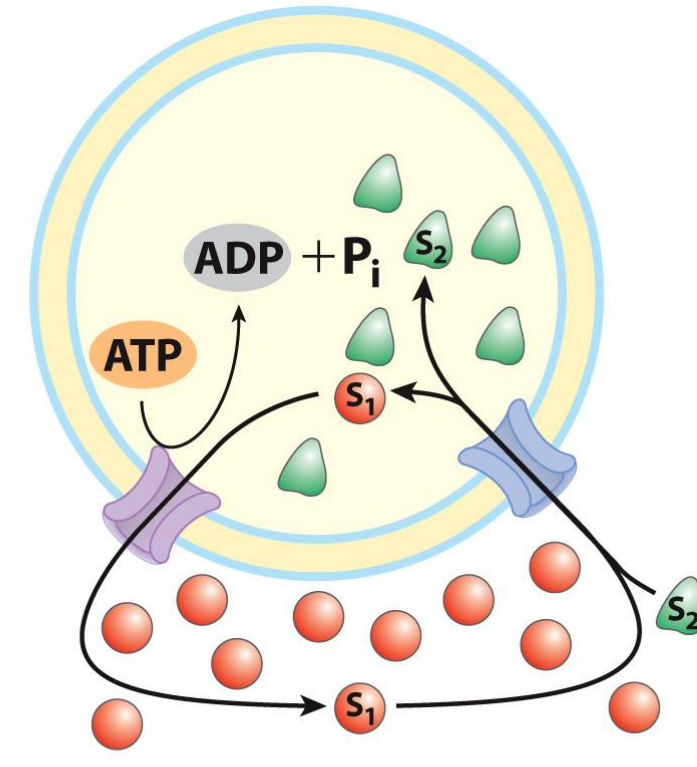
Два механизма активного транспорта

Известны два механизма активного транспорта:

- системы **первичного активного транспорта (ионные насосы)** с использованием энергии гидролиза АТФ
- системы **вторичного активного транспорта (ионные обменники)**, работающие за счет энергии электрохимических градиентов некоторых ионов (например, Na^+ и K^+), накопленной в результате работы первичного активного транспорта.



(a) Primary active transport



(b) Secondary active transport

Figure 11-33
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition
© 2017 W. H. Freeman and Company

Механизмы первичного активного транспорта

- Системы первичного активного транспорта используют энергию гидролиза **АТФ**.

В настоящее время известно четыре типа **АТФаз**

- 1) P-,
 - 2) V-,
 - 3) F-
 - 4) и АТР-binding cassette–типа),
- выполняющих разнообразные функции в клетках организмов.

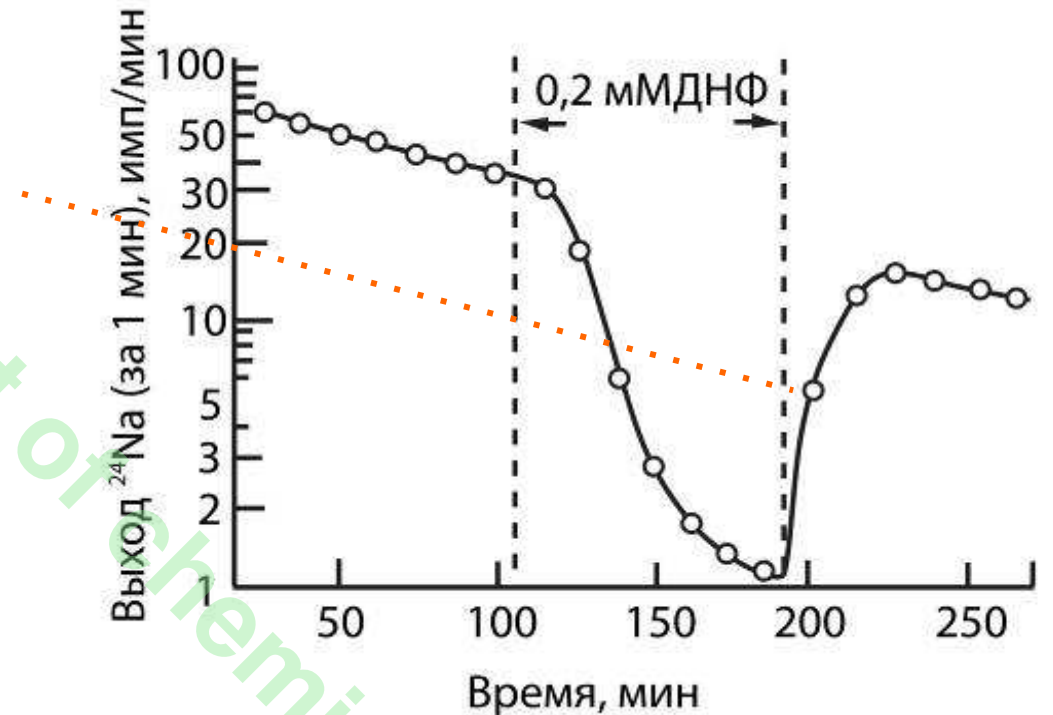
- Например, в нервных клетках механизм первичного активного транспорта обеспечивает транспорт ионов через мембрану против их пассивного потока по электрохимическому градиенту, поддерживая тем самым трансмембранную разность потенциалов, определяющую ПП.

Натрий-калиевый насос как пример АТФаз Р-типа: история

- В начале 1950-х г.г., исследуя действие локальных анестетиков на ионную проводимость нерва краба, **Йенс Скоу (Jens Christian Skou)** установил, что **фермент АТФаза**, встроенный в клеточную мембрану, наиболее эффективно активируется при действии определенной комбинации концентраций ионов Na^+ , K^+ и Mg^{2+} .
- Используя метод измерения теплопродукции, **Й. Скоу** также показал при, что нерв краба в состоянии покоя утилизирует энергию **АТФ**, что косвенно свидетельствовало о протекании реакции окислительного фосфорилирования с участием **АТФазы**.
- **НО Й. Скоу** лишь высказал неопределенное предположение, что этот фермент каким-то образом связан с транспортом ионов через мембрану и не выдвинул **АТФазу** на роль непосредственного переносчика ионов.

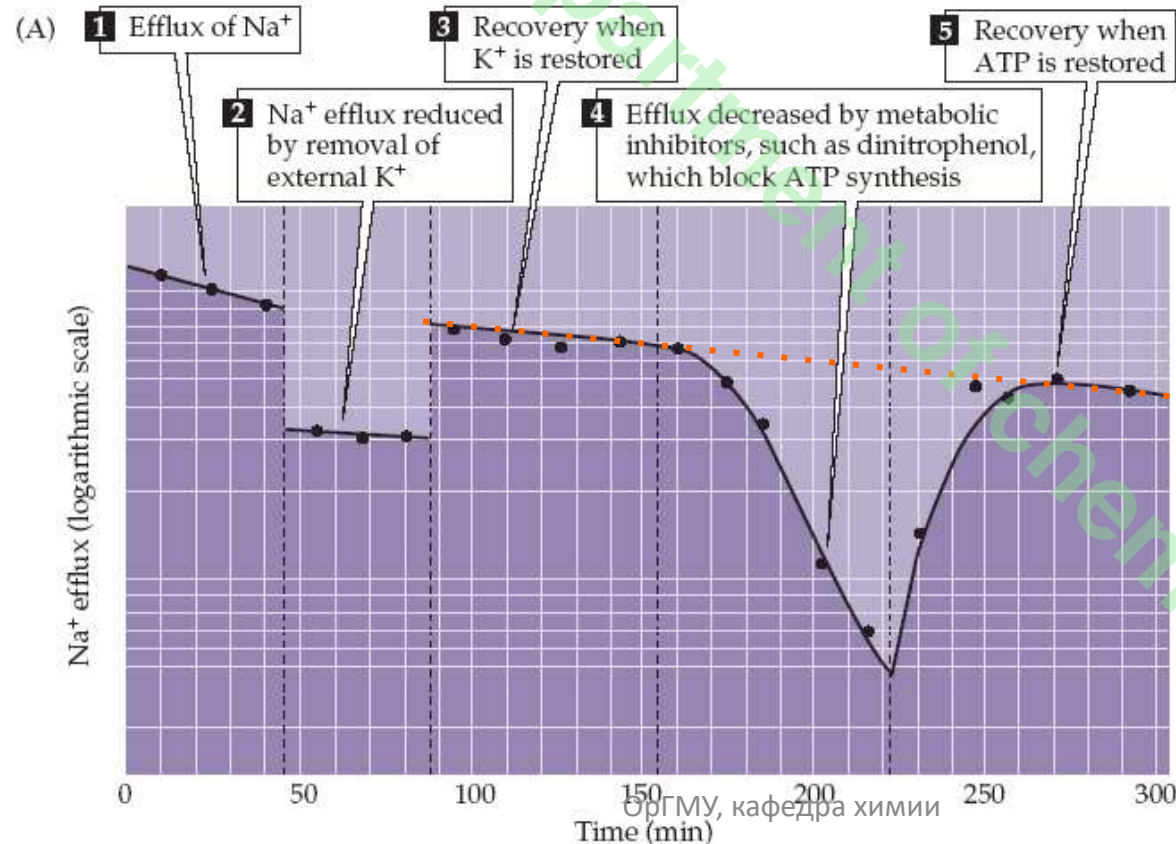
Натрий-калиевый насос как пример АТФаз Р-типа: история

- Позже *P. Кейнс (Richard Keynes)* с соавторами, используя радиоактивный $^{24}\text{Na}^+$, впервые непосредственно измерил энергозависимый выход этого иона из аксоплазмы толстого аксона каракатицы *Sepia*.
- После длительной стимуляции аксона, погруженного в раствор с радиоактивным $^{24}\text{Na}^+$, измеряли выход этого иона из аксона.
- При действии блокатора реакции окислительного фосфорилирования (с участием фермента **АТФазы**) **динитрофенола (ДНФ – разобщитель ОФ)** выход $^{24}\text{Na}^+$ резко снижался.
- После того, как препарат отмывали от блокатора, выход $^{24}\text{Na}^+$ возобновлялся.



Натрий-калиевый насос как пример АТФаз Р-типа: история

- После длительной стимуляции аксона, погруженного в раствор с радиоактивным $^{24}\text{Na}^+$, измеряли выход этого иона из аксона.
- При действии блокатора реакции окислительного фосфорилирования (с участием фермента АТФазы) **динитрофенола** выход $^{24}\text{Na}^+$ резко снижался.
- После того, как препарат отмывали от блокатора, выход $^{24}\text{Na}^+$ возобновлялся.
- Выход $^{24}\text{Na}^+$ также снижался при удалении внешнего K^+



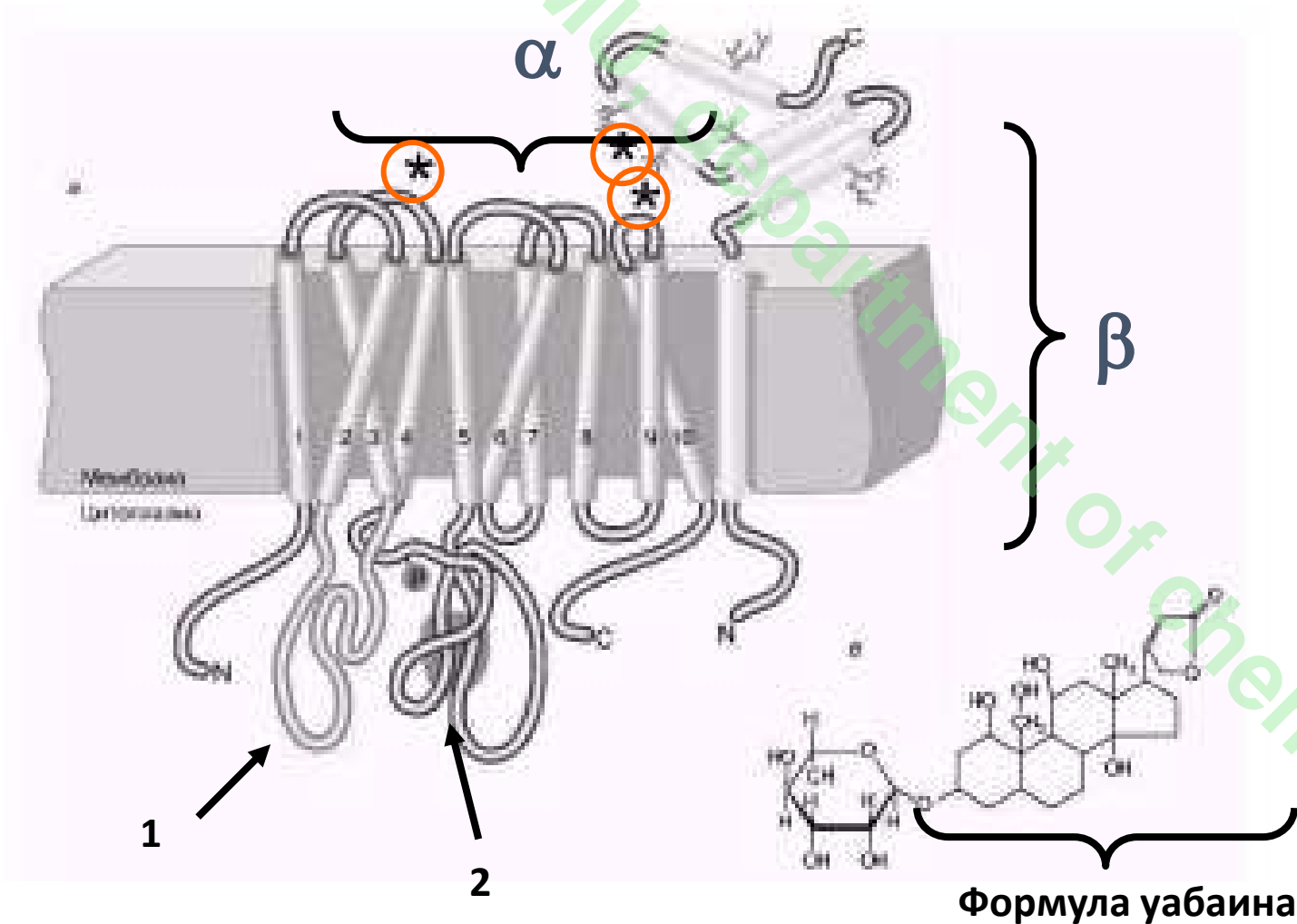
Натрий-калиевый насос как пример АТФаз Р-типа: история

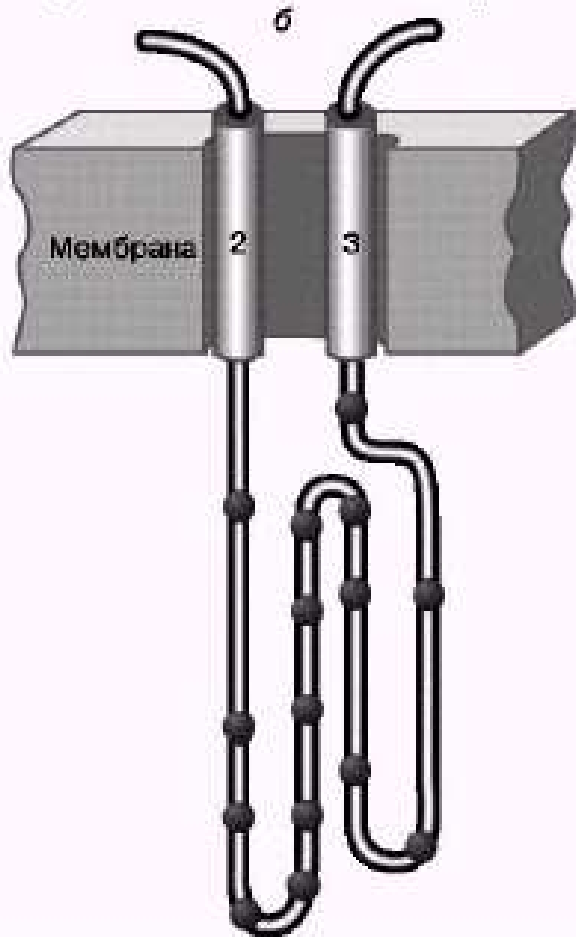
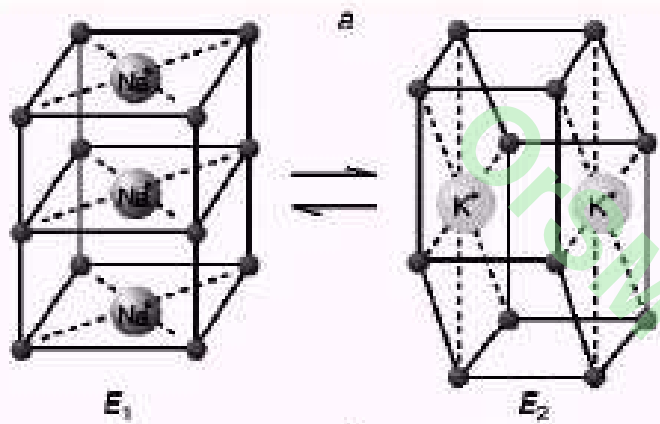
- Затем в экспериментах с использованием радиоактивного K^+ , было показано, что выходящий Na^+ -поток ассоциирован с одновременным **АТФ-зависимым** входом K^+ внутрь аксона.
- Все эти эксперименты окончательно доказали, что фермент **АТФаза** в мембране аксона выполняет роль энергозависимого **Na^+/K^+ -насоса**.

АТФазы Р типа

Все ионные насосы Р-класса независимо от того, какие ионы они перекачивают через мембрану, имеют подобное строение. Во всех таких насосах происходит **фосфорилирование аспартата**, трансмембранные α-домены всех насосов Р-класса имеют приблизительно одинаковый молекулярный вес и одинаковую "конструкцию" из α-спиралей. Всё это говорит о происхождении всех Р-насосов от общего предка, хотя и с течением времени эти насосы эволюционно приспособились транспортировать различные ионы.

СТРУКТУРА Na/K АТФазы: состоит из 2 полипептидных цепей α и β

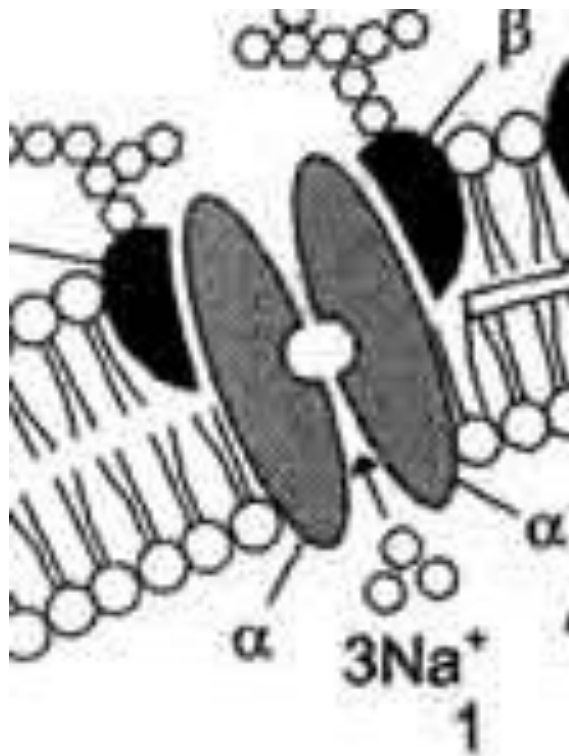




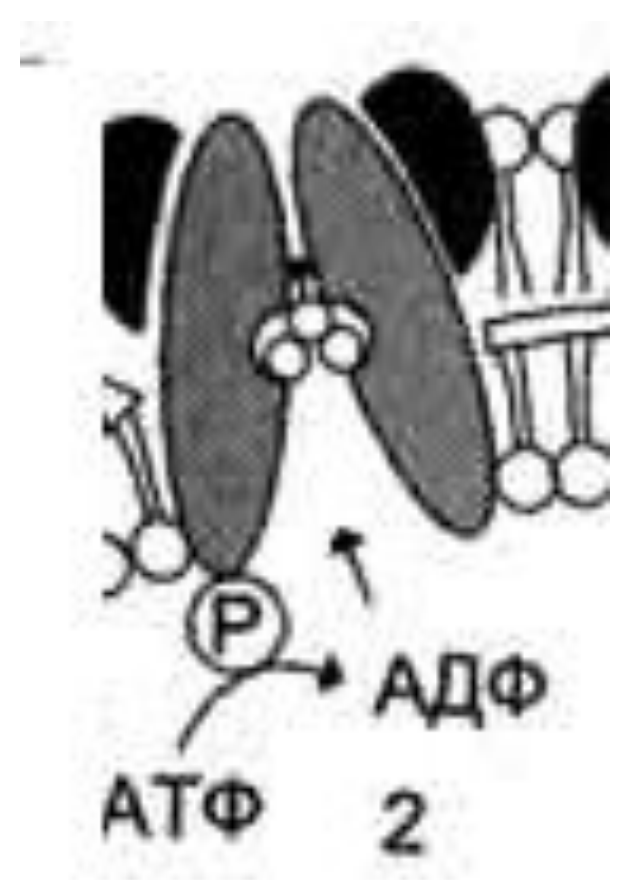
СВЯЗЫВАНИЕ ИОНОВ НАТРИЯ И КАЛИЯ В ИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФЕРМЕНТА

а – кристаллическая решетка, которая создается 12 кислородными атомами дикарбоновых аминокислот в конформации, соответствующей связыванию 3 ионов Na или 2 ионов K

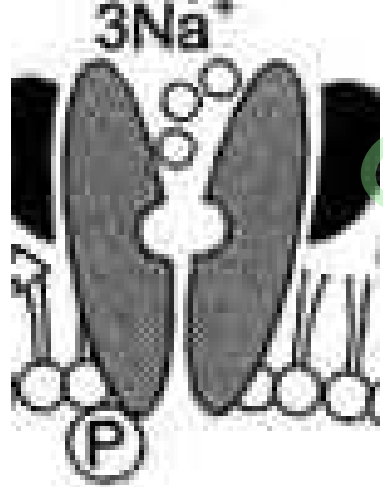
б – петля α -субъединицы, участвующая в формировании ионного центра; точками указана локализация дикарбоновых аминокислот



1 - три иона натрия
связываются
специфическим центром
транслоказы;

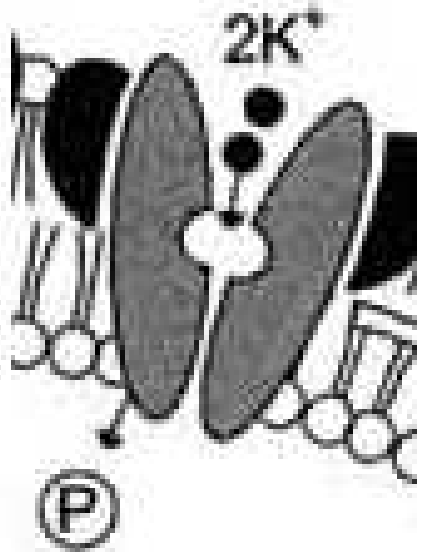


2 - изменение конформации транслоказы, вызванное присоединением 3Na^+ , приводит к активации каталитической субъединицы и увеличению сродства активного центра к субстрату (АТФ). Протекает реакция аутофосфорилирования по карбоксильной группе аспарагиновой кислоты;



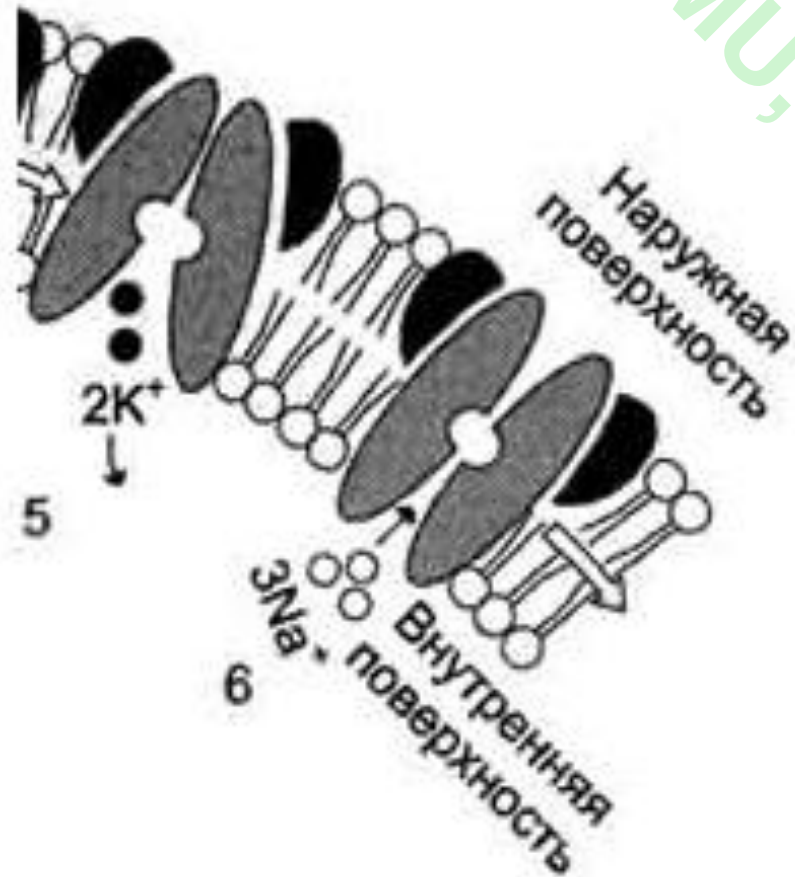
3

3 - аутофосфорилирование изменяет заряд и конформацию транслоказы, она закрывается с внутренней стороны мембраны и открывается с наружной, уменьшается сродство к ионам натрия и они диссоциируют от переносчика;



4

4 - Na^+ , K^+ -АТФ-аза открытая с наружной стороны мембраны имеет специфический центр связывания для 2K^+ ; Присоединение двух ионов калия к фосфорилированной транслоказе вызывает изменение конформации и появление аутофосфатазной активности. Протекает реакция аутодефосфорилирования;



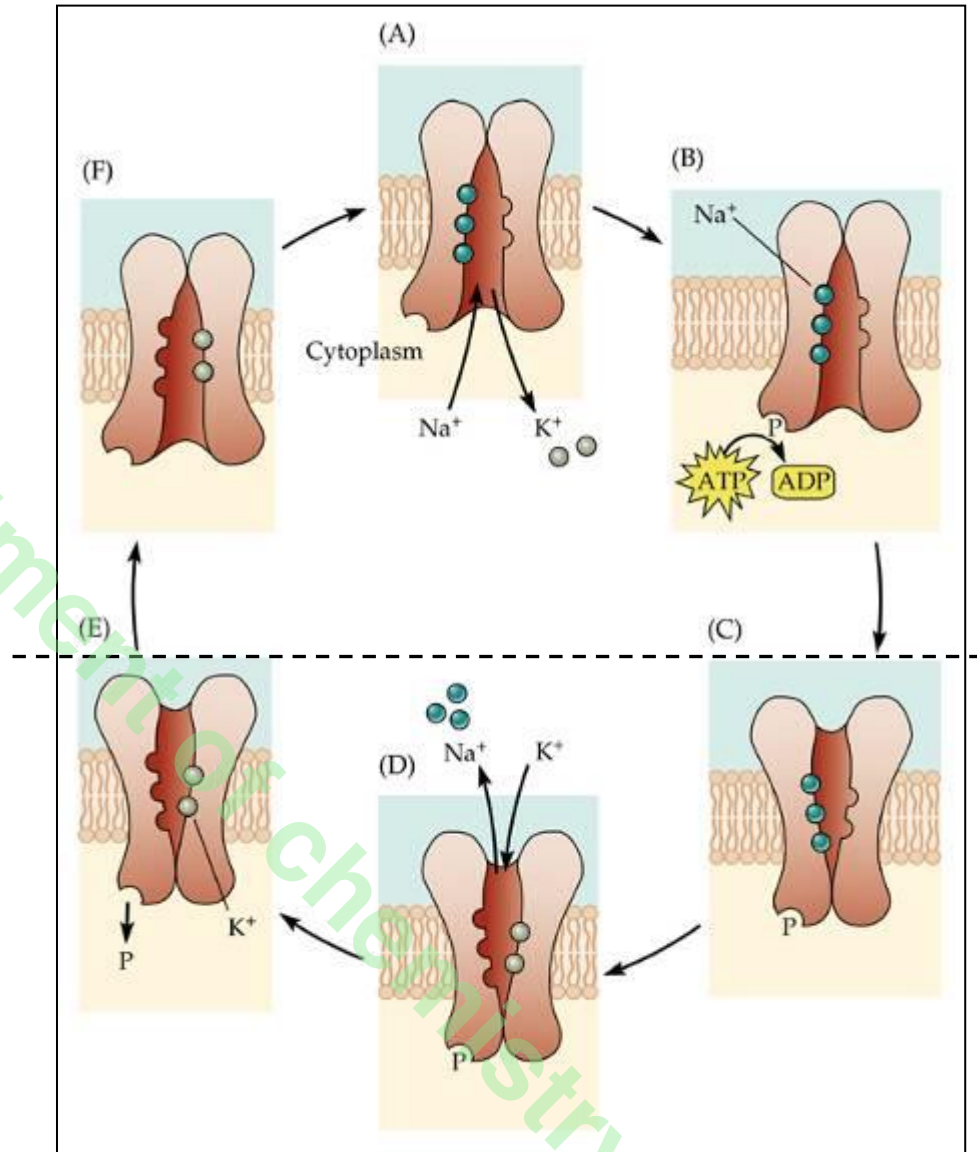
5 - дефосфорилирование изменяет заряд и конформацию транслоказы, она закрывается с наружной стороны мембраны и открывается с внутренней, уменьшается сродство к ионам калия и они диссоциируют от Na⁺, K⁺-АТФ-азы;

6 - АТФ-аза возвращается в первоначальное состояние.

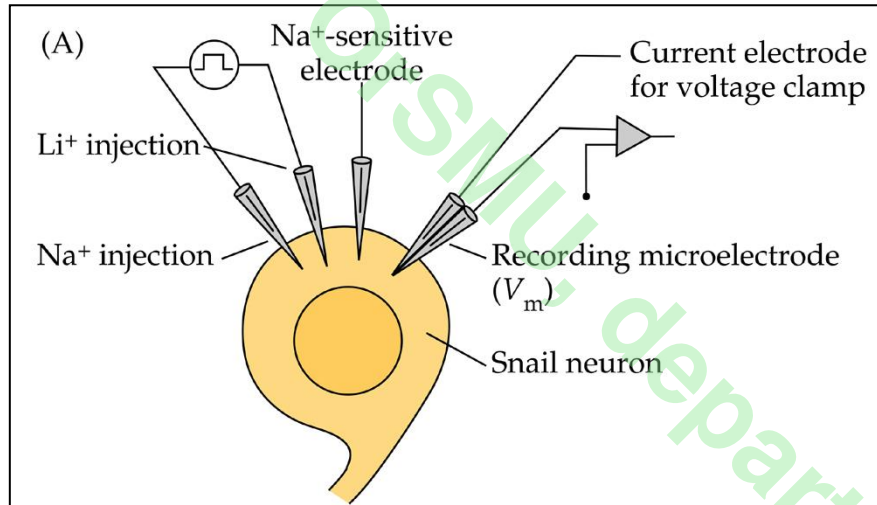
Принцип работы Na^+/K^+ -насоса (Na^+/K^+ -АТФазы),

ИТОГ

- На **внутренней** стороне мембраны переносчик расщепляет АТФ, связывается с остатком фосфата и тремя ионами Na^+ и переносит их наружу.
- На **внешней** стороне мембраны переносчик теряет остаток фосфата, связывается с двумя ионами K^+ и переносит их внутрь клетки.

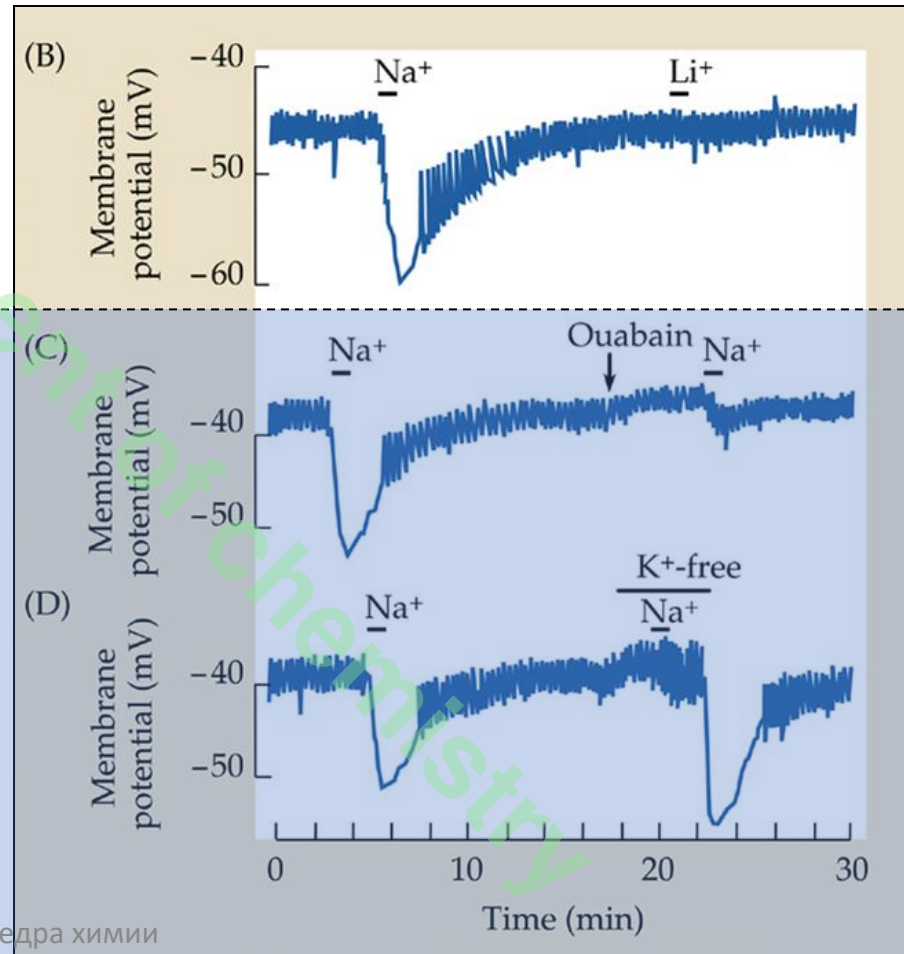


Электрогенность Na^+/K^+ -насоса



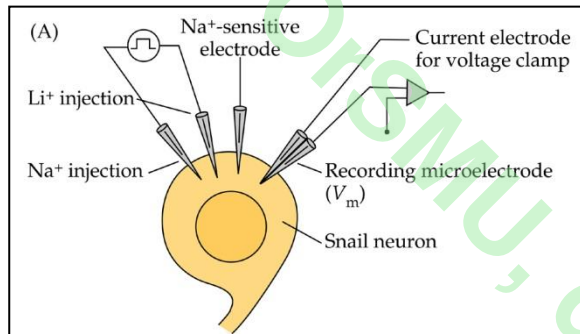
(A) Схема эксперимента

- (B) При инъекции Na^+ **Na^+/K^+ -насос** выводит из клетки три иона Na^+ и вводит в нее два иона K^+ , что приводит к гиперполяризации мембраны.
- Инъекция Li^+ не сопровождается гиперполяризацией.



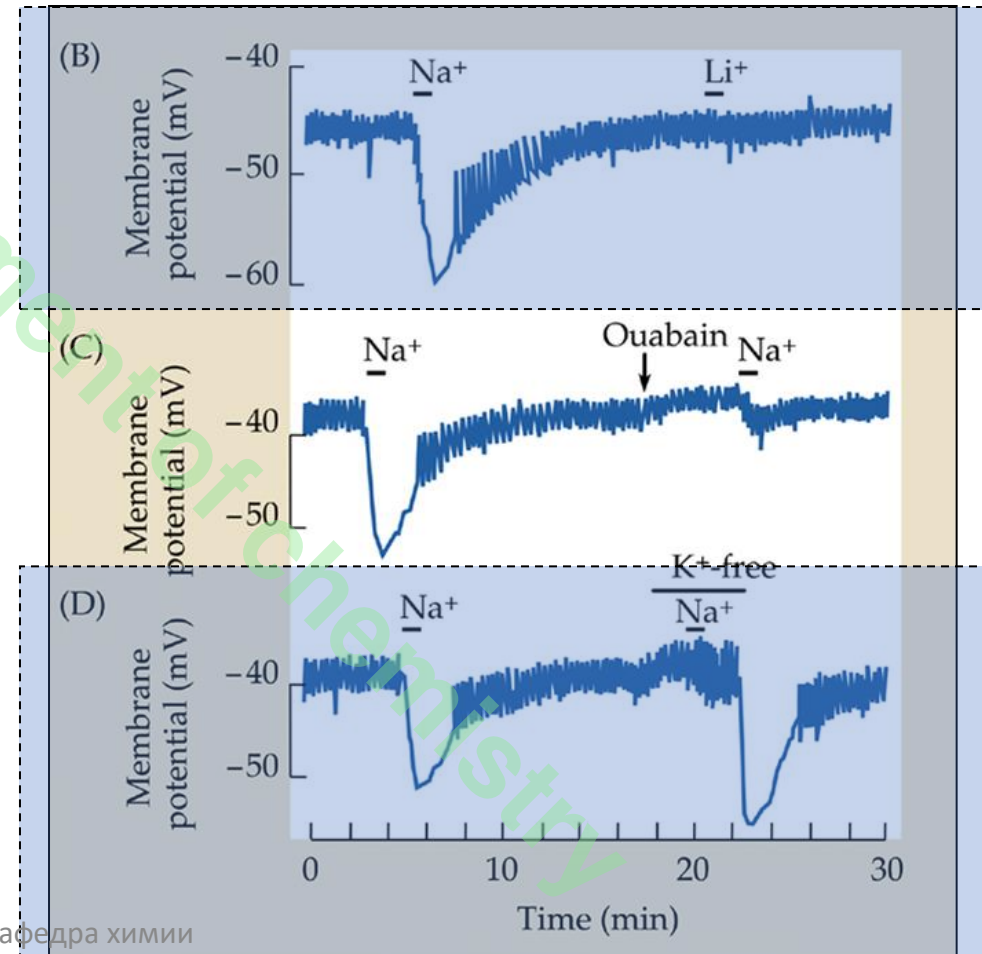
Гиперполяризация — это изменение мембранного потенциала клетки, которое делает его более отрицательным

Электрогенность Na^+/K^+ -насоса



(A) Схема эксперимента

- (C) При действии **уабаина** (гиперполяризация существенно ослабляется).



Ca²⁺-насос (Ca²⁺-АТФаза)

является **АТФазой Р-типа**, выводящей Ca²⁺ из цитоплазмы. Эта АТФаза (наряду с Na⁺/Ca²⁺-обменником) выполняет главную функцию по поддержанию низкого уровня внутриклеточного Ca²⁺, необходимого для обеспечения внутриклеточных путей сигнализации.

Существуют **две** разновидности Ca²⁺-АТФаз

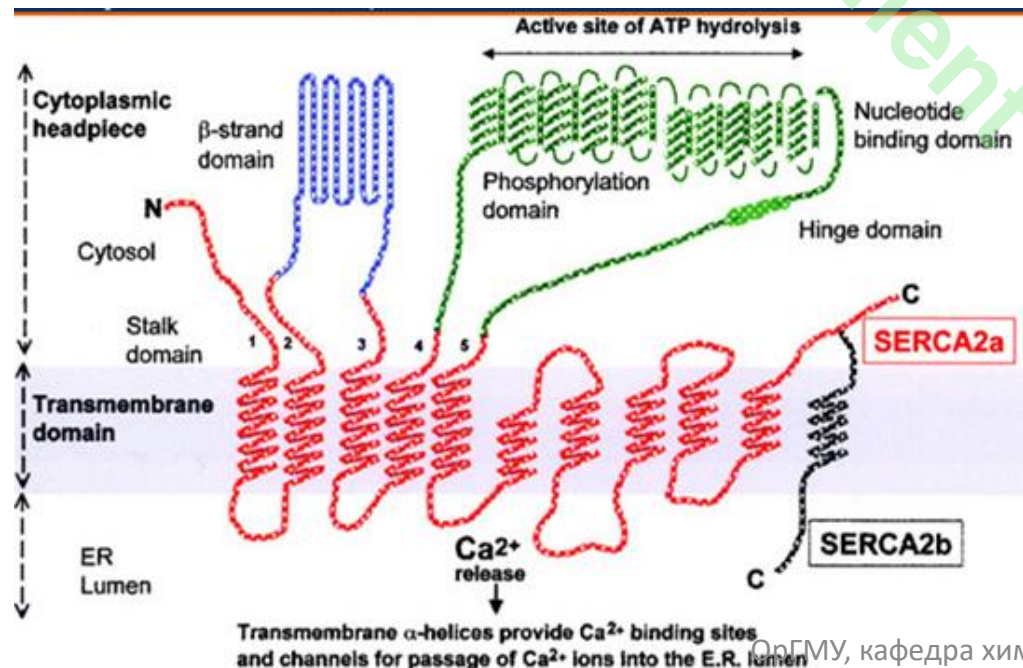
Ca²⁺-АТФазы плазматической мембраны при фосфорилировании переносят **один ион Ca²⁺** во внеклеточное пространство.

Ca²⁺-насос (Ca²⁺-АТФаза)

Существуют **две** разновидности Ca²⁺-АТФаз

Ca²⁺-АТФазы эндоплазматического (в нейронах) и **саркоплазматического** (в мышечных клетках) ретикулумов, а также митохондрий при фосфорилировании переносят **два иона Ca²⁺** из цитоплазмы (саркоплазмы) в перечисленные внутриклеточные мембранные структуры.

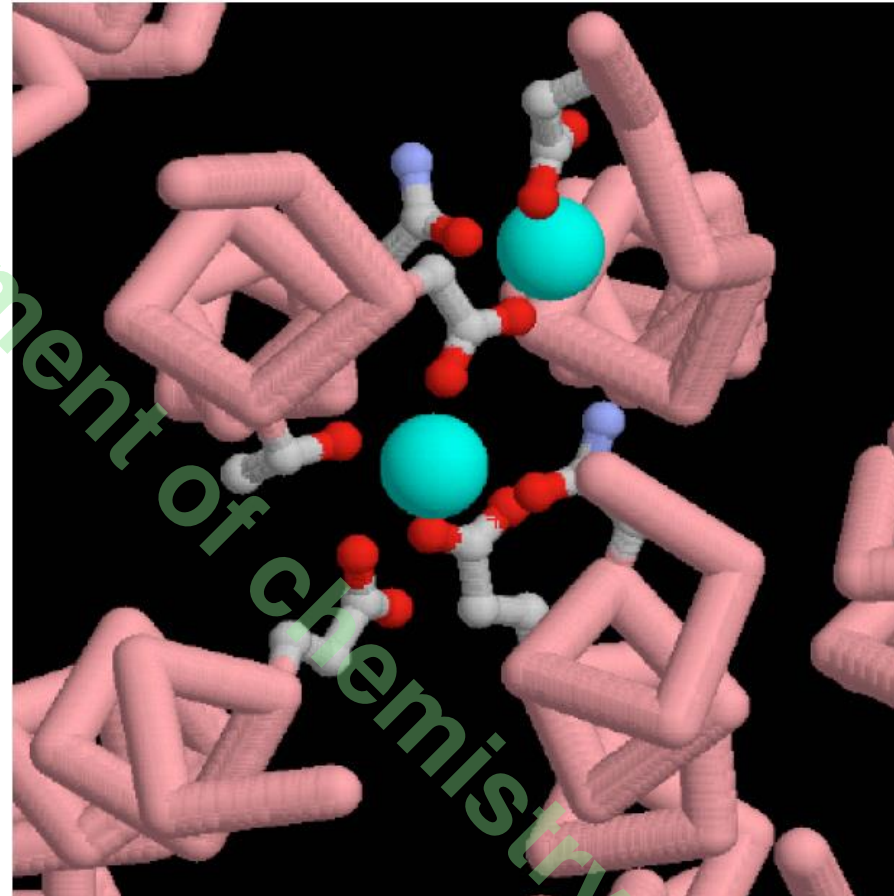
SERCA - Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase



Ca²⁺-насос (Ca²⁺-АТФаза)

Ca²⁺-АТФазы эндоплазматического (в нейронах) и саркоплазматического (в мышечных клетках) ретикулумов, а также митохондрий при фосфорилировании переносят **два иона Ca²⁺** из цитоплазмы (саркоплазмы) в перечисленные внутриклеточные мембранные структуры.

- Сайт связывания кальция находится в туннеле, образованном четырьмя альфа-спиралями, которые проходят прямо через мембрану.
- На этой иллюстрации показан вид сверху вниз по спирали. Два иона кальция (сине-зеленые сферы) удерживаются набором аминокислот, показанных в виде шариков и палочек, которые координируют его со всех сторон.
- Если эти ионы кальция удалить, белок становится гораздо менее стабильным.



Ca²⁺-насос (Ca²⁺-АТФаза)

Существуют **две** разновидности Ca²⁺-АТФаз

! Еще одно отличие.

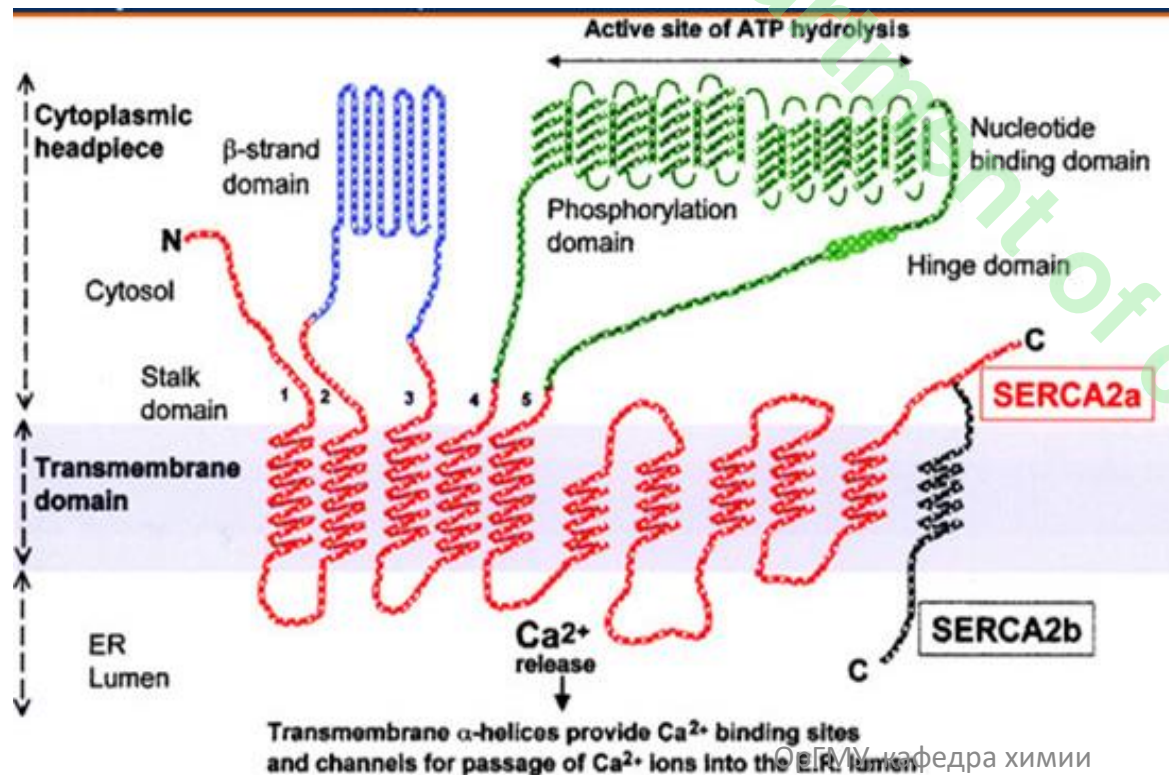
Ca²⁺-АТФаза плазматической мембраны регулируется внутриклеточным комплексом Ca²⁺/калмодулин (Ca²⁺-активируемый белок), который связывается со специальным участком на внутриклеточной петле насоса.

Такая регуляция обеспечивает быструю активацию Ca²⁺-АТФазы плазмалеммы при увеличении внутриклеточной концентрации Ca²⁺.

Ca²⁺-насос (Ca²⁺-АТФаза) строение

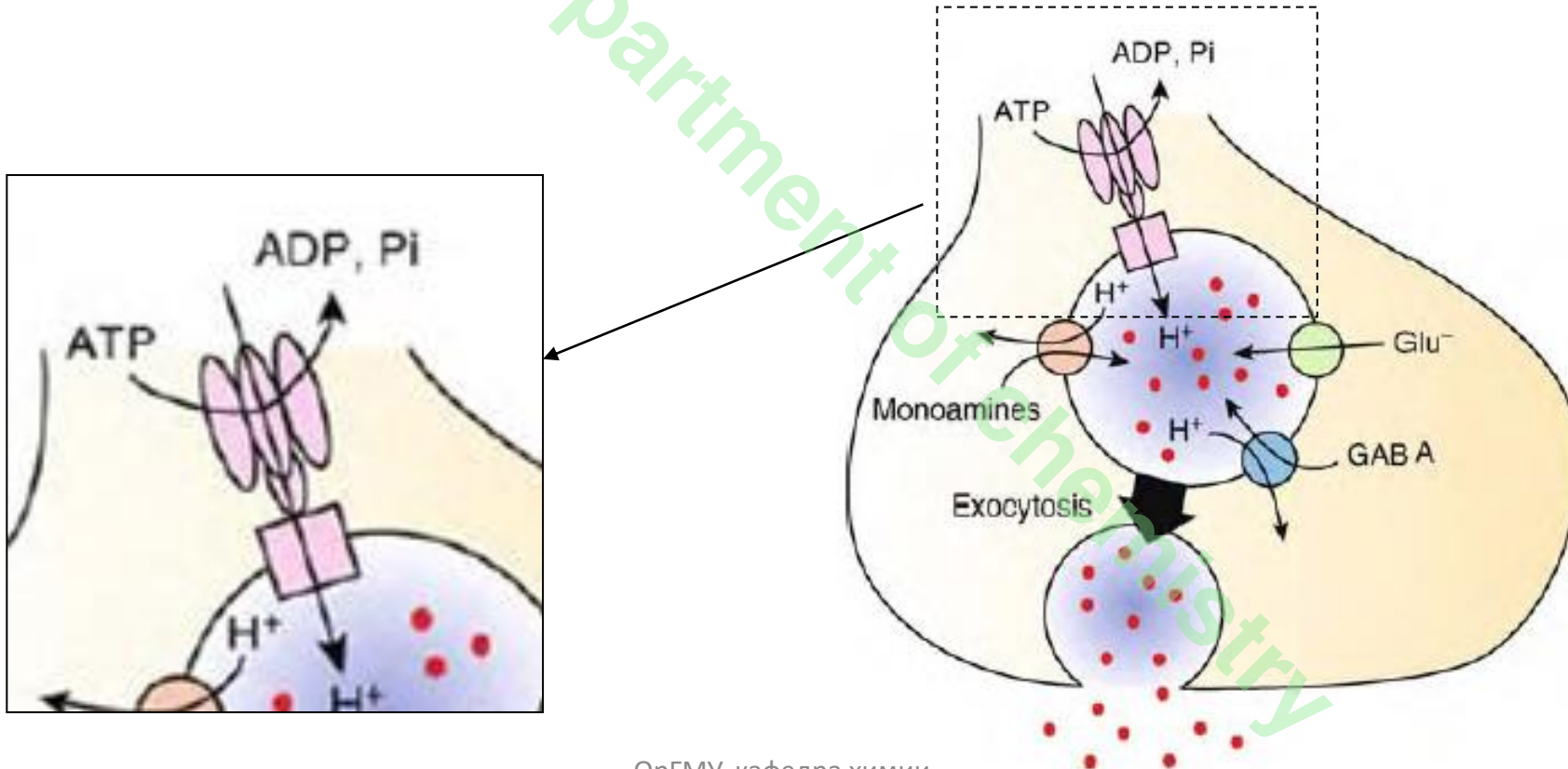
Обе формы Ca²⁺-АТФазы (плазматическая и «органелльная») представлены одиночной полипептидной цепочкой с молекулярной массой около 100 кД, которая сходна по своей структуре с α -субъединицей Na⁺/K⁺-АТФазы.

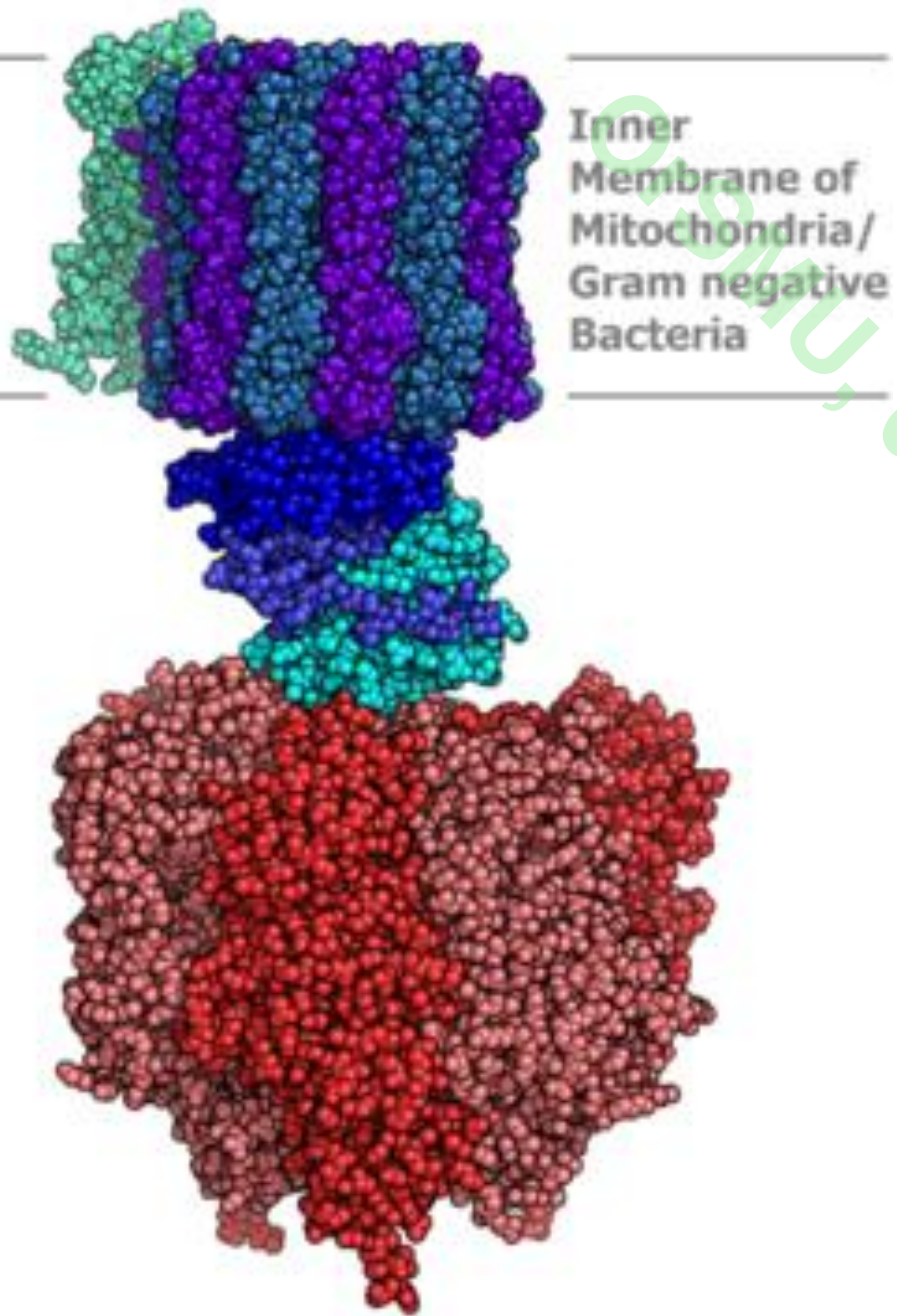
Системы первичного активного транспорта Ca²⁺ являются **высокоаффинными** (высокая степень связывания катиона), но относительно **медленными** по сравнению с системой вторичного активного транспорта этого катиона.



Протонный насос

В мембранах клеточных органелл (лизосом, эндосом, а также синаптических везикул) протонный насос **H⁺-АТФаза V-типа** (от англ., *Vacuolar*) с использованием энергии гидролиза АТФ переносит внутрь органелл H⁺, поддерживая в них низкий уровень рН. Протонный градиент, направленный из синаптических везикул в цитоплазму, используется для транспорта молекул медиаторов внутрь везикул.





Протонный насос

Кроме того в мембранах митохондрий содержится **H⁺-АТФаза F-типа**, работающая в «обратном» направлении: этот фермент синтезирует АТФ из АДФ и остатка фосфата при движении протонов по концентрационному градиенту из матрикса митохондрий в цитоплазму.

АТФазы в других клетках

Магниевый насос

В мембранах эритроцитов выделена **Mg²⁺-АТФаза Р-типа**, которая с использованием энергии АТФ выводит наружу ионы Mg²⁺.

Протон-калиевый насос

- В мембранах эпителиальных клеток желудка выделена **H⁺/K⁺-АТФаза Р-типа**. По своей структуре она сходна с Na⁺/K⁺-АТФазой.
- В отличие от последней эта АТФаза не является электрогенной, поскольку выводит один ион H⁺ наружу и один ион K⁺ - внутрь клетки, не нарушая при этом баланс зарядов по обе стороны мембраны.

АТФазы в других клетках

Хлорный насос

Хлорная АТФаза, переносящая ионы Cl^- из цитоплазмы во внеклеточное пространство, является представителем группы разнообразных АТФаз четвертого типа, называемых в англоязычной литературе **ATP-binding cassette transporters** (переносчики с АТФ-связывающей кассетой).

Кроме транспорта Cl^- эти насосы выполняют разнообразные функции:

- обеспечивают проницаемость гликопротеинов через мембраны;
- выводят из клеток токсические метаболиты, обеспечивая тем самым, например, устойчивость раковых клеток при химиотерапии;
- запускают иммунный ответ клеток против чужеродных белков, осуществляя антиген-пептидный транспорт из цитозоля в эндоплазматический ретикулум.

Хлорные АТФазы обнаружены в культуре клеток мозга, что указывает на возможность существования первичных механизмов транспорта хлора. Однако до настоящего времени такие транспортные системы пока еще не найдены в нервной ткани.

Транспорт других катионов

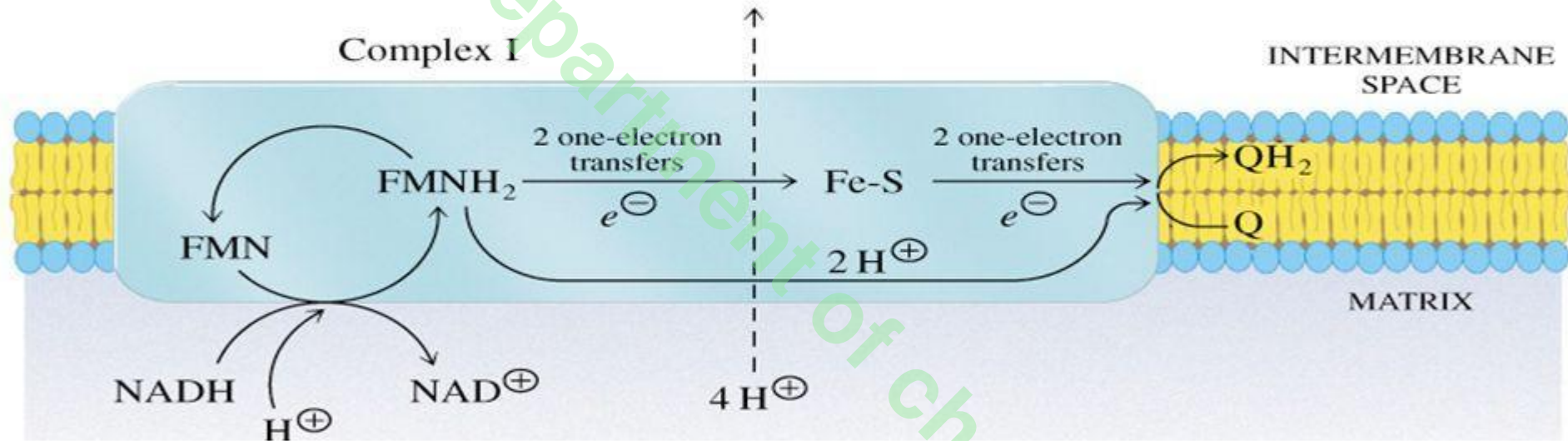
Среди группы **P-АТФаз** также известны насосы, переносящие через мембраны клеток другие катионы:

- Ag^+ и Ag^{2+} ,
- Zn^{2+} ,
- Co^{2+} ,
- Pb^{2+} ,
- Ni^{2+} ,
- Cd^{2+} ,
- Cu^+ и Cu^{2+} .

Комплекс I (НАДН-убихинон оксидоредуктаза)

Состоит из:

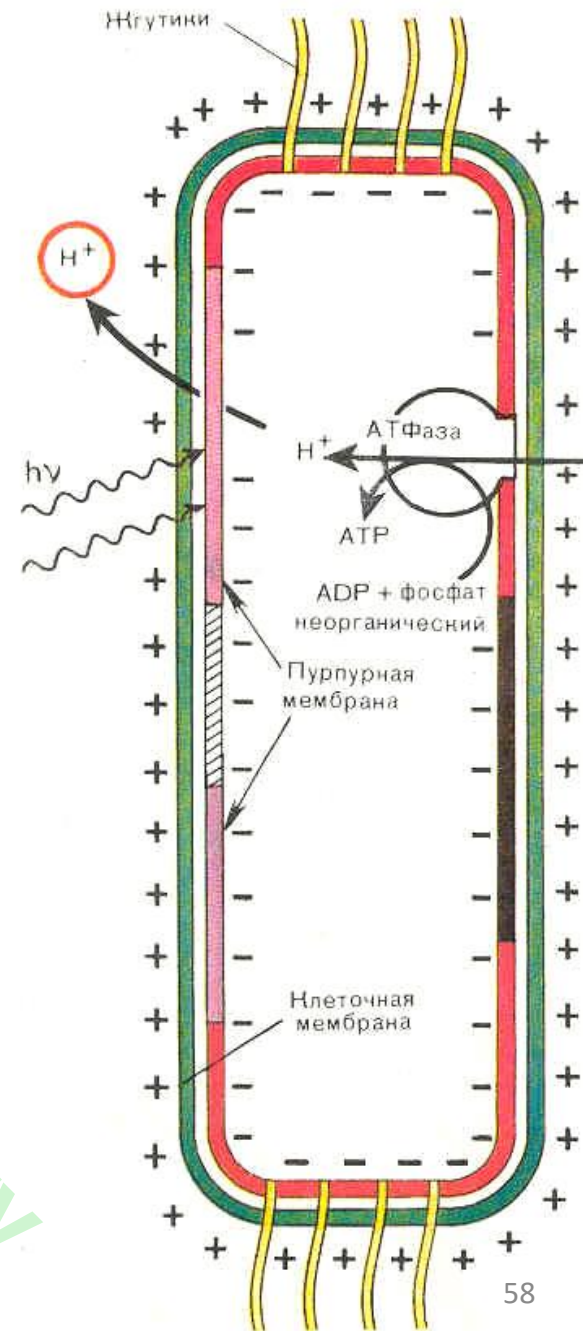
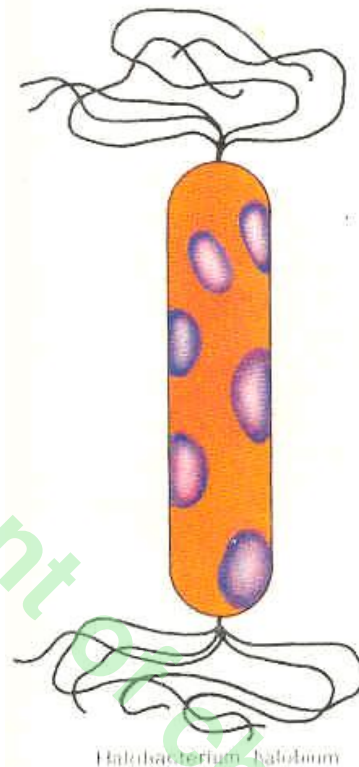
- фермента НАДН дегидрогеназы (ФМН - прост. группа)
- Fe-S.



Транспорт двух электронов от НАДН к коэнзиму Q приводит к переносу 4 ионов H из матрикса в межмембранное пространство

Немного экзотики: безхлорофильный фотосинтез

- Наипростейший вариант фотосинтеза
- Отсутствие электронтранспортной цепи
- Два фермента – светозависимая протонная помпа и АТФ-синтаза
- **Галоархеи** – уникальнейшие археи, умеющие существовать в среде с концентрацией соли до 30%

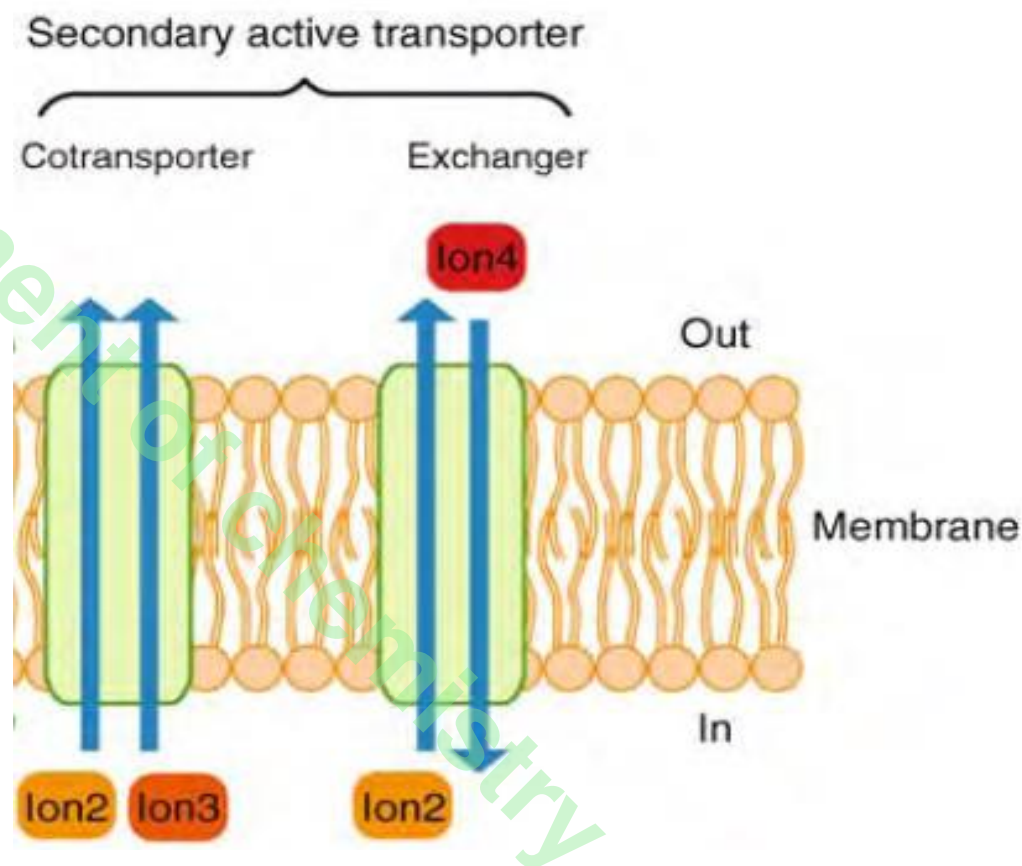


Механизмы вторичного активного транспорта

- Переносят некоторые ионы и низкомолекулярные соединения (например, медиаторы) против их концентрационных градиентов, используют энергию электрохимических градиентов других ионов (например, K^+ и Na^+), аккумулированную в результате работы первичного активного транспорта.
- Подразделяют на **ко-транспортеры** и **ионные обменники**:
- **Ко-транспортеры** обеспечивают перенос одних ионов против их концентрационного градиента в том же направлении, в котором движутся другие ионы по своим концентрационным градиентам.
- **Обменники** обеспечивают перенос одних ионов против их концентрационного градиента за счет движения других ионов (по их концентрационному градиенту) в противоположном направлении. Такой механизм вторичного активного транспорта называют также **антипортом** (antiport).

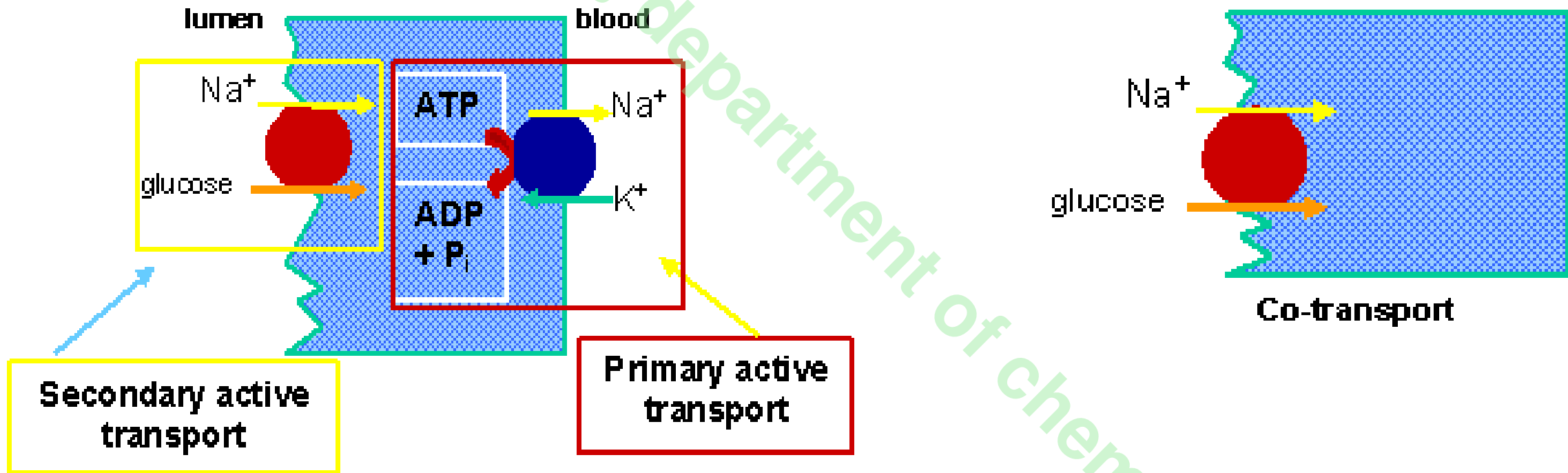
Ко-транспортеры и ионные обменники

- **Ко-транспортеры (cotransporter)** обеспечивают перенос одних ионов против их концентрационного градиента в том же направлении, в котором движутся другие ионы по своим концентрационным градиентам.
- **Обменники (exchanger)** обеспечивают перенос одних ионов против их концентрационного градиента за счет движения других ионов (по их концентрационному градиенту) в противоположном направлении.



Ко-транспортеры и ионные обменники

- Ко-транспортеры** (*cotransporter*) обеспечивают перенос одних ионов против их концентрационного градиента в том же направлении, в котором движутся другие ионы по своим концентрационным градиентам.



Rules:

Both Na^+ and Glucose must be bound
 Na^+ gradient must be present

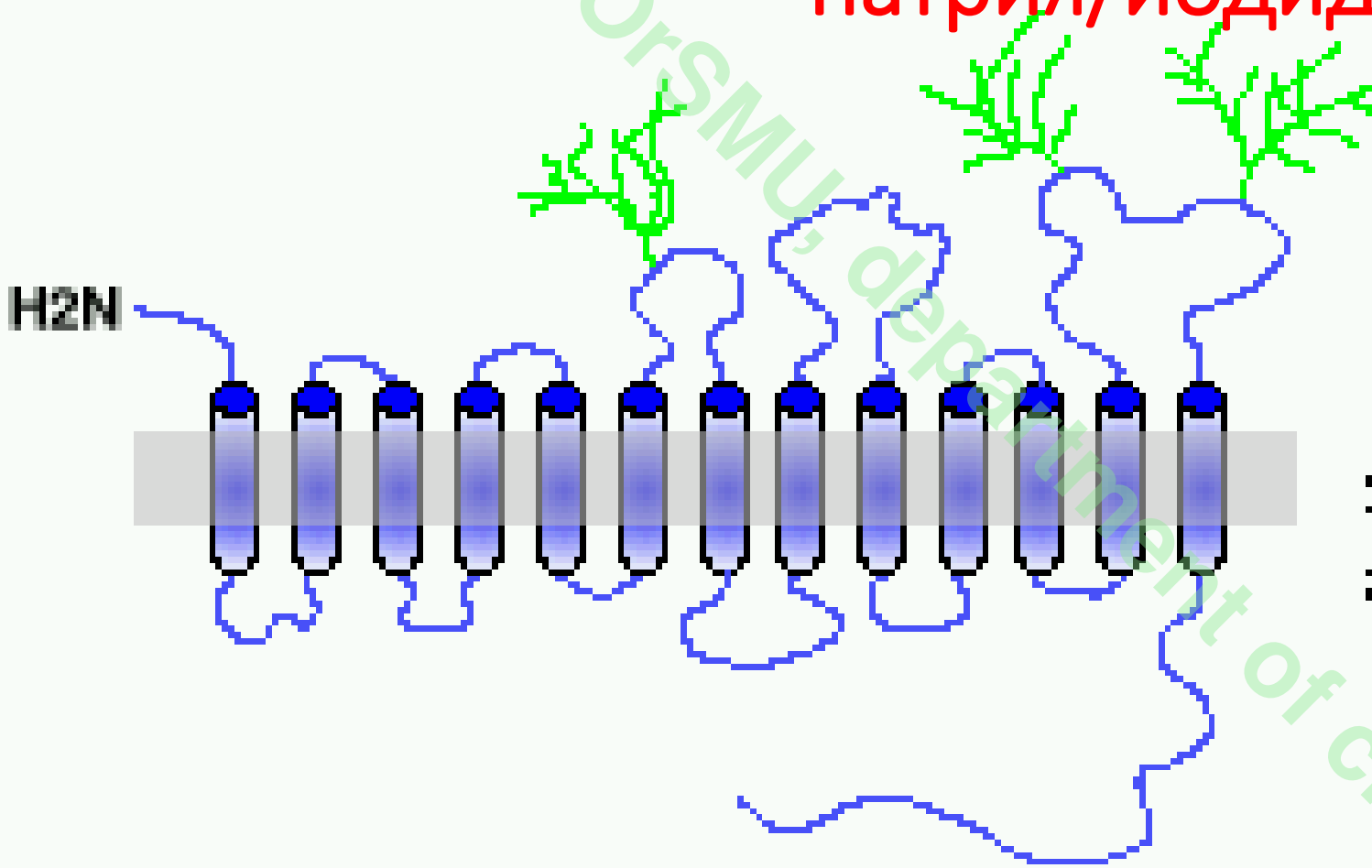
Йодид-натриевый симпортер

Способность щитовидной железы концентрировать **йодид** из крови абсолютно необходима для синтеза гормонов щитовидной железы (**тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3)**).

Ключевым игроком в этом процессе является **йодид-натриевый симпортер (ко-транспорт)**, интегральный мембранный белок, который находится в базолатеральной мембране клеток фолликулярного эпителия (тиреоциты) щитовидной железы.

В результате этого активного транспорта концентрация йодида внутри фолликулярных клеток ткани щитовидной железы **в 20-50 раз выше**, чем в плазме.

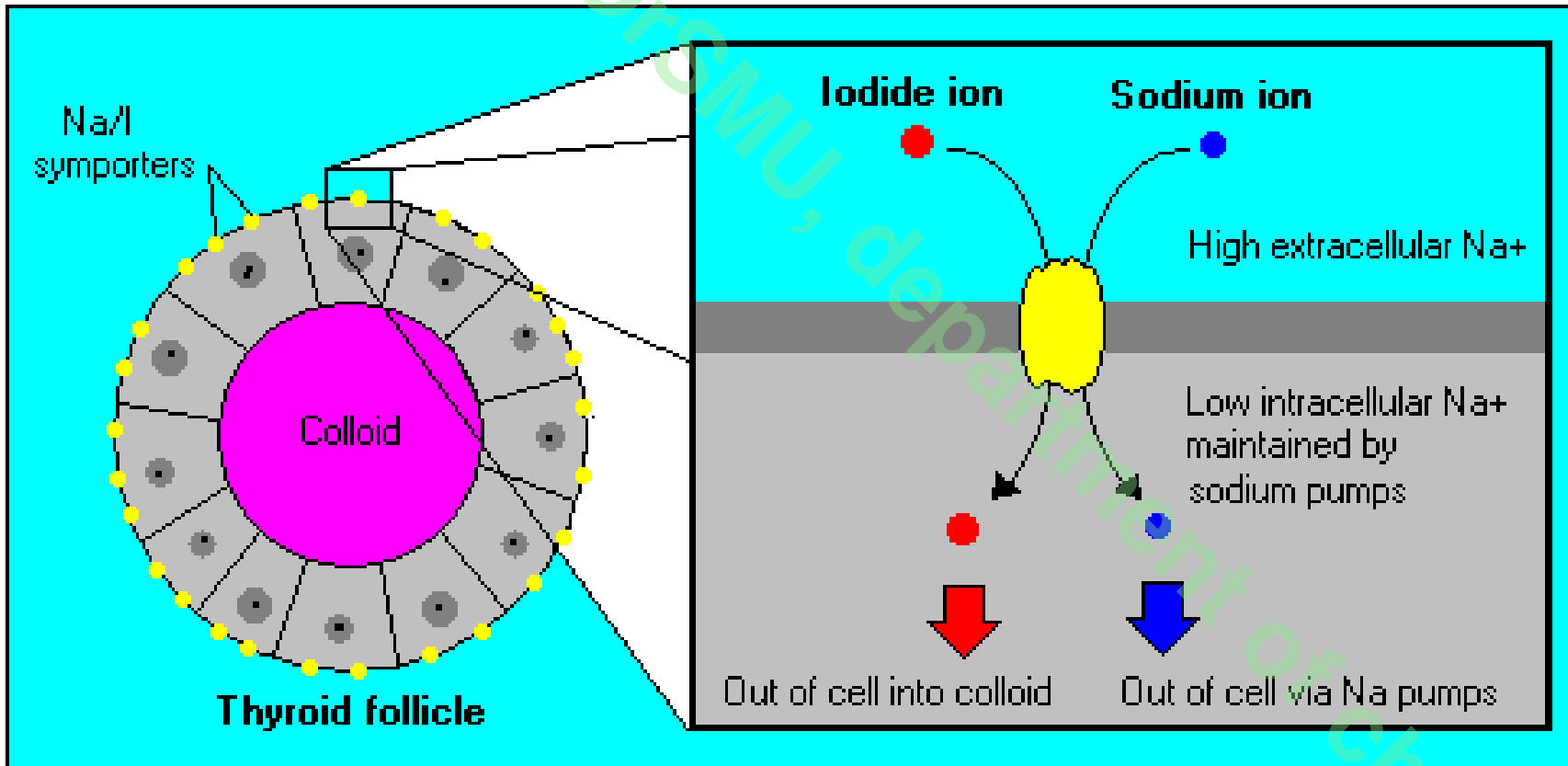
Иодид-натриевый симпортер (NIS, котранспортер натрия/йодида)



Клонирована кДНК для переносчика йодида и натрия у человека. Анализ последовательности белка (643 аминокислоты) :
: показал, что симпортер имеет 13 пересекающих мембрану доменов и содержит внеклеточные N-связанные сайты гликозилирования (3 шт).

Некоторые анионы, такие как перхлорат, пертехнетат и тиоцианат, могут влиять на захват йодида путем конкурентного ингибирования, поскольку они могут использовать симпортер, когда их концентрация в плазме высока, даже если они имеют меньшее сродство к NIS, чем йодид.

Йодид-натриевый симпортер

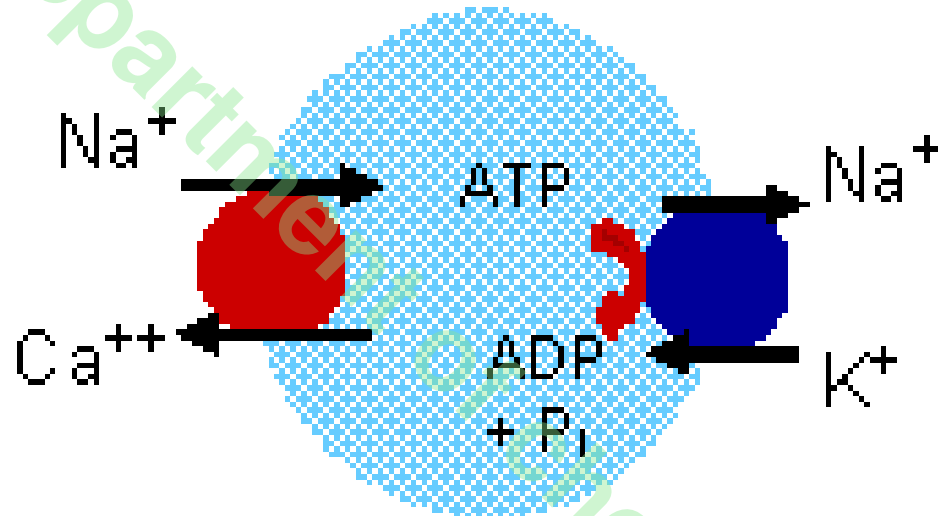
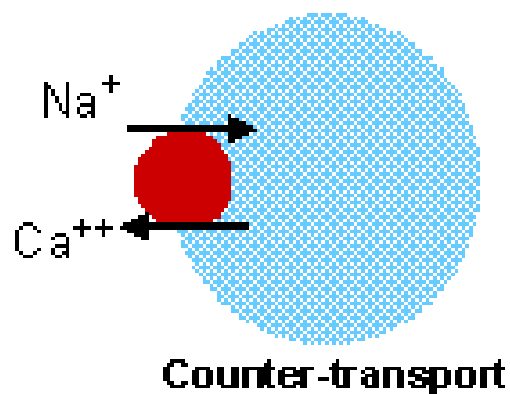


переносит два катиона натрия (Na^+) для каждого йодид-аниона (I^-) в клетку.

Энергия обеспечивается электрохимическим градиентом Na^+ ; внутриклеточная концентрация натрия составляет приблизительно 12 мМ, а внеклеточная концентрация 140 мМ); низкая внутриклеточная концентрация Na^+ поддерживается натриевыми насосами (Na^+ - K^+ -АТФ-азы)

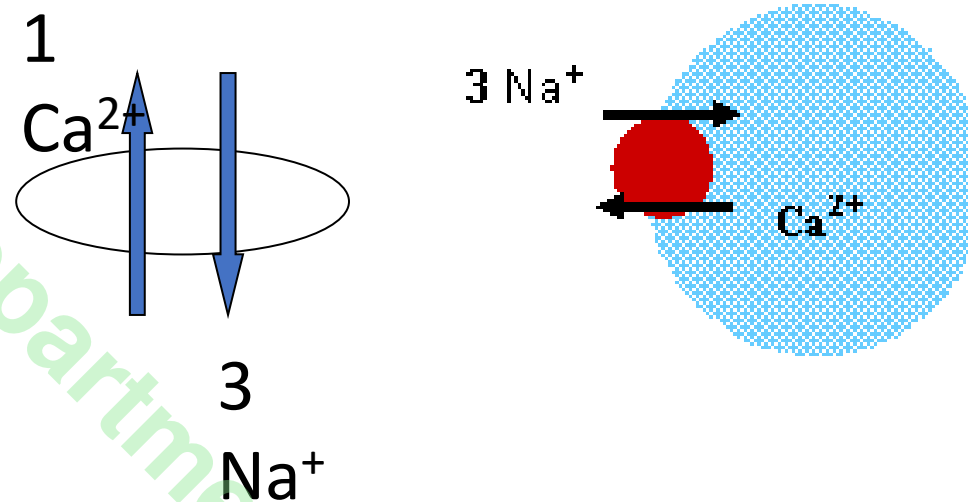
Ко-транспортеры и ионные обменники

- Обменники (*exchanger*)** обеспечивают перенос одних ионов против их концентрационного градиента за счет движения других ионов (по их концентрационному градиенту) в противоположном направлении.

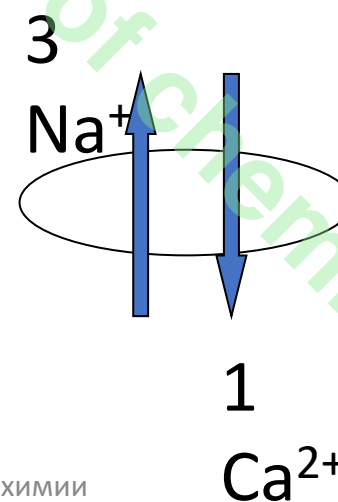


Регуляция внутриклеточной концентрации Ca^{2+}

- $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник

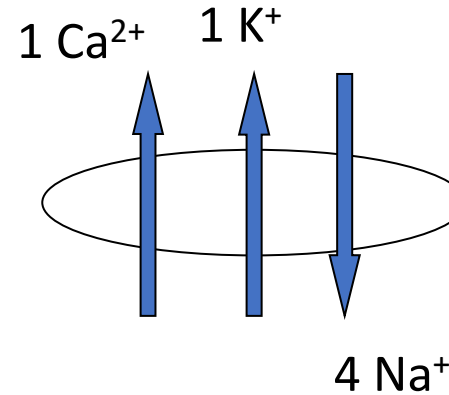
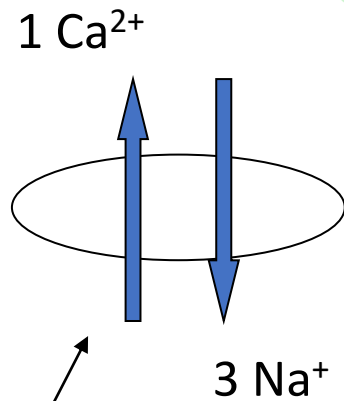


- при значительной деполяризации может работать в противоположном направлении



Регуляция внутриклеточной концентрации Ca^{2+}

- **$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - K^+ -обменник** в мембранах фоторецепторов сетчатки



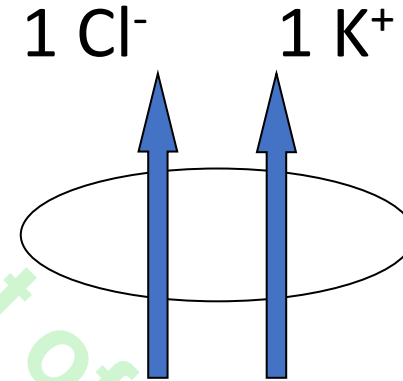
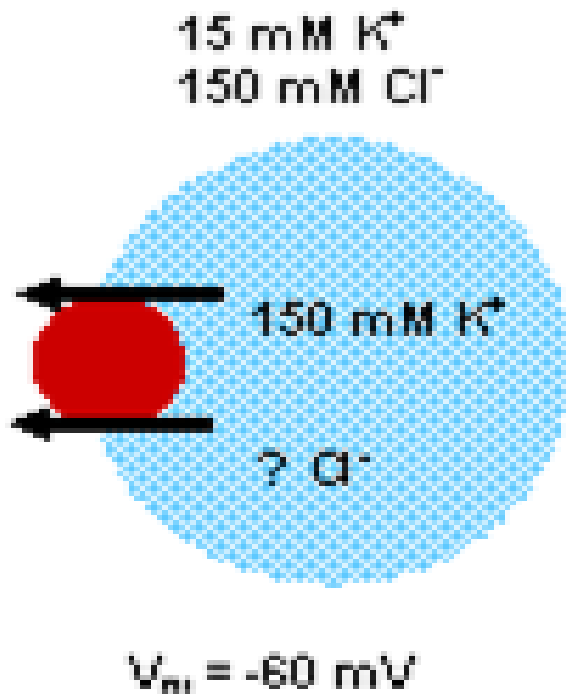
- Благодаря дополнительной энергии градиента для K^+ **$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - K^+ -обменник** может поддерживать в фоторецепторах очень низкий уровень концентрации внутриклеточного Ca^{2+} (**около 1 нМ**) в условиях низкого уровня ПП (-40 мВ).
- Обычный $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник в условиях такого низкого уровня ПП способен снизить уровень Ca^{2+} только до уровня около **400 нМ**.

Регуляция внутриклеточной концентрации Ca^{2+}

- Система вторичного активного транспорта Ca^{2+} является **низкоаффинной** (низкая степень связывания катиона), но относительно **быстрой** по сравнению с системой первичного активного транспорта этого катиона.
- Эффективность этого обменника примерно в 50 раз выше, чем у Ca^{2+} -АТФазы из-за более высокой плотности этих молекул в мембране. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник играет важную роль в условиях массивированного входа в клетку, вызванного повышенной электрической активностью, когда активности Ca^{2+} -АТФазы недостаточно для регуляции концентрации внутриклеточного Ca^{2+} .
- С другой стороны Ca^{2+} -АТФазы активны в условиях низких (меньше 1 мкМ) концентраций внутриклеточного Ca^{2+} , что обеспечивает тонкую регуляцию концентрации Ca^{2+} .

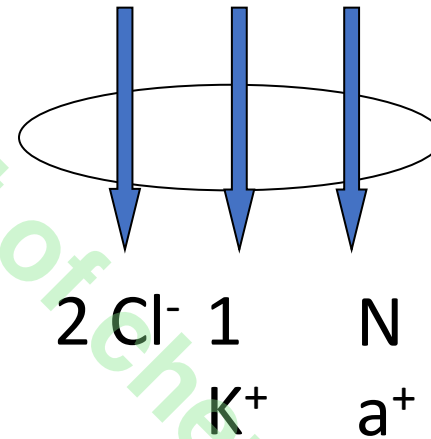
Регуляция внутриклеточной концентрации Cl^-

- K^+/Cl^- -ко-транспортная** система выводит Cl^- из клетки за счет градиента ионов K^+ и не зависит от внеклеточной концентрации Na^+ . Эта транспортная система необходима для восстановления нормальной внутриклеточной концентрации Cl^- в результате постсинаптической гиперполяризации.



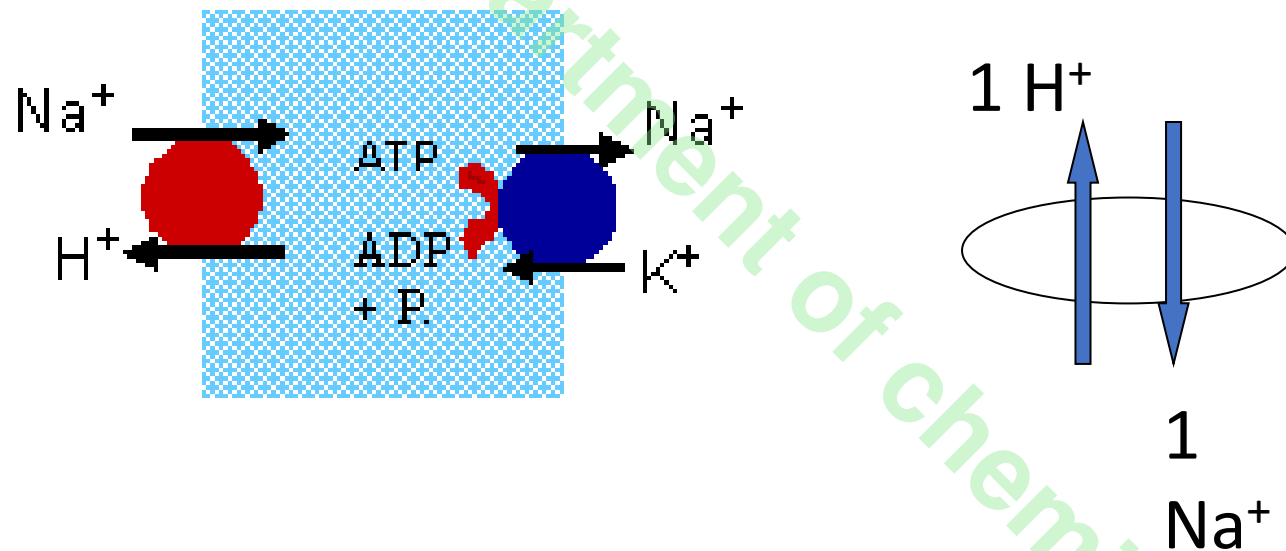
Регуляция внутриклеточной концентрации Cl^- , еще одна система вторичного транспорта

- Высокая концентрация внутриклеточного Cl^- при развитии нейронов поддерживается благодаря работе одной из двух изоформ **$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -ко-транспорта**, переносящего внутрь клетки два иона Cl^- и один ион K^+ за счет градиента ионов Na^+ , направленного внутрь.



Регуляция внутриклеточного уровня рН

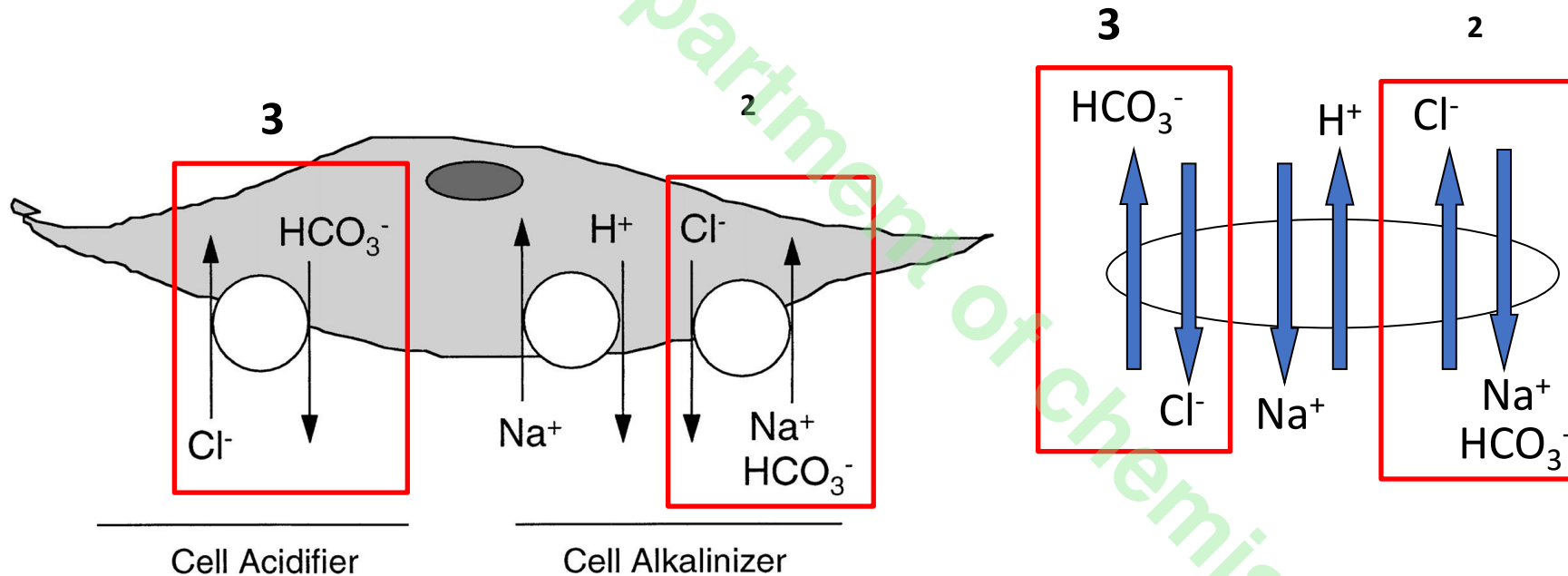
- 1) Внутриклеточный уровень рН поддерживается благодаря **Na⁺/H⁺-обменнику**, транспортирующего через мембрану один ион Na⁺ в цитоплазму (по концентрационному градиенту) один ион H⁺ из цитоплазмы.



Регуляция внутриклеточного уровня pH

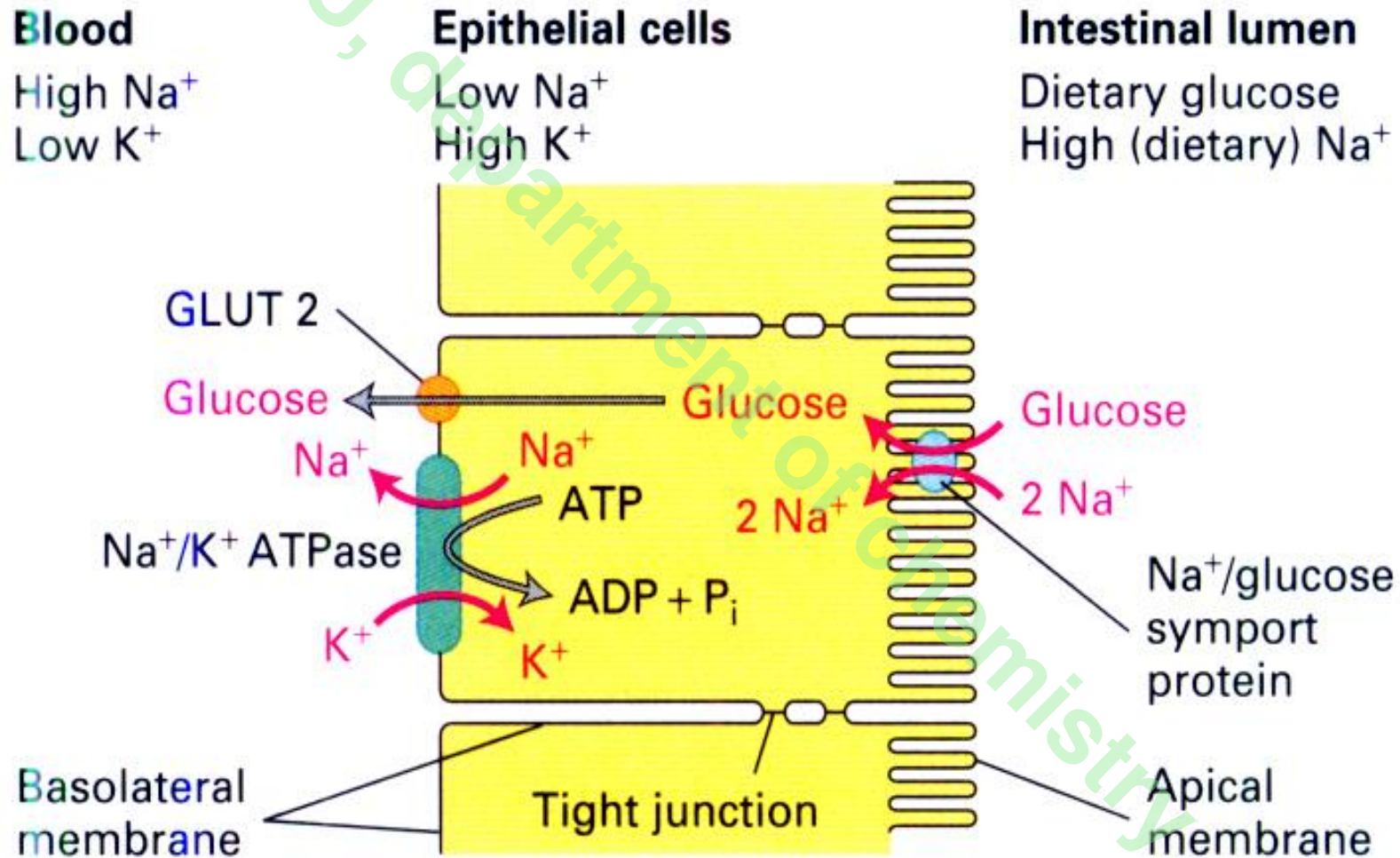
Внутриклеточный уровень pH поддерживается:

- 2) **Na⁺-зависимым Cl⁻/HCO₃⁻-обменником**, который выводит ионы Cl⁻ наружу, а ионы Na⁺ и HCO₃⁻ - внутрь клетки (кроме вклада в регуляцию pH этот обменник также поддерживает низкую концентрацию Cl⁻ в цитоплазме)
- 3) **Na⁺-независимым Cl⁻/HCO₃⁻-обменником**, который выводит ионы HCO₃⁻ за счет градиента Cl⁻ внутрь клетки



Основные механизмы переноса ионов, которые регулируют pH цитоплазмы гладких мышц (pH_c) за счет подкисления (Na⁺-независимый Cl⁻ / HCO₃⁻-обмен) или подщелачивания (Na⁺ / H⁺ и Na⁺-зависимый Cl⁻ / HCO₃⁻-обмен)

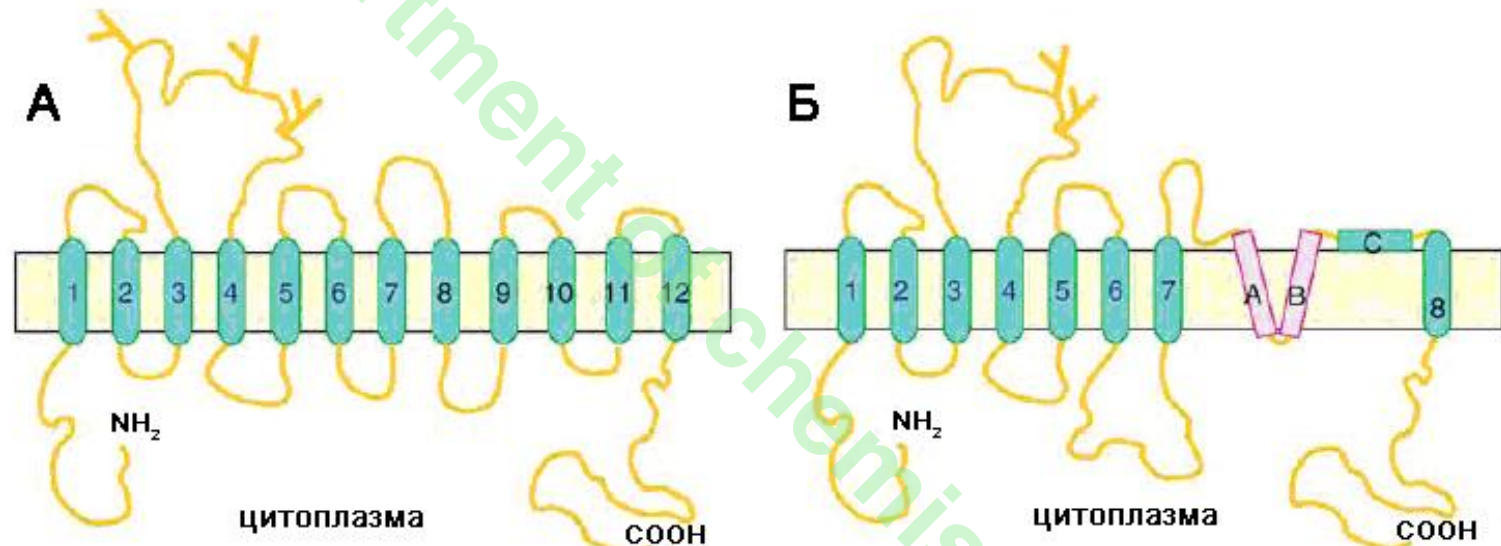
Всасывание **глюкозы** эпителием тонкого кишечника и почечных канальцев обеспечивается совместной работой двух переносчиков – симпортера (SGLT) и унипортера (GLUT)



Транспорт медиаторов из внеклеточного пространства в цитоплазму

- Транспорт медиаторов через мембраны нейронов и глиальных клеток, а также через мембраны клеточных органелл обеспечивается специальными системами вторичного активного транспорта.
 - Транспортёры медиаторов характеризуются высокой аффинностью и способностью быстро переносить молекулы медиаторов.
 - Они представляют собой белки, состоящие из 500-800 аминокислот, и локализованы в пре- и постсинаптических мембранах нейронов, а также в мембранах глиальных клеток – астроцитов.
- Транспортёры медиаторов подразделяются на два семейства (см. табл. На след. сл.):

- 1) **Na⁺/Cl⁻-зависимые** (А)
- 2) и **Na⁺/K⁺-зависимые** (Б)



Транспортеры медиаторов плазматических мембран

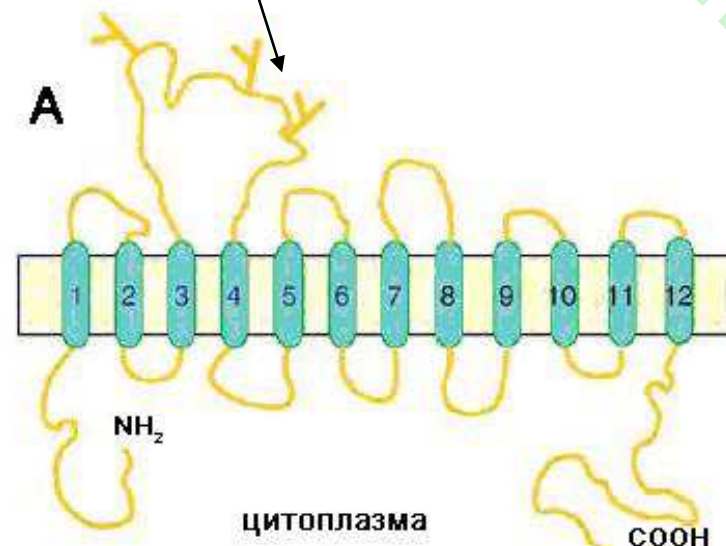
Международная номенклатура транспортера	Субстрат (медиатор)	Сопряженный механизм (ионный градиент)	Размер (число аминокислот)
GLAST	L-Glutamate	Na ⁺ , H ⁺ and K ⁺	543
GLT1	L-Glutamate	Na ⁺ , H ⁺ and K ⁺	572
EAAC1	L-Glutamate	Na ⁺ , H ⁺ and K ⁺	523
EAAT4	L-Glutamate	Na ⁺ , H ⁺ and K ⁺	561
EAAT5	L-Glutamate	Na ⁺ , H ⁺ and K ⁺	559
GAT1	GABA	Na ⁺ and Cl ⁻	598
GAT2	GABA	Na ⁺ and Cl ⁻	614
GAT3	GABA	Na ⁺ and Cl ⁻	602
GAT4	GABA	Na ⁺ and Cl ⁻	627
GLYT1a	Glycine	Na ⁺ and Cl ⁻	633
GLYT1b	Glycine	Na ⁺ and Cl ⁻	637
GLYT2	Glycine	Na ⁺ and Cl ⁻	798
DAT	Dopamine	Na ⁺ and Cl ⁻	619
SERT	Serotonin	Na ⁺ and Cl ⁻	630
NET	Norepinephrine	Na ⁺ and Cl ⁻	617

Транспорт медиаторов из внеклеточного пространства в цитоплазму

Схематичная структурная организация медиаторных транспортеров

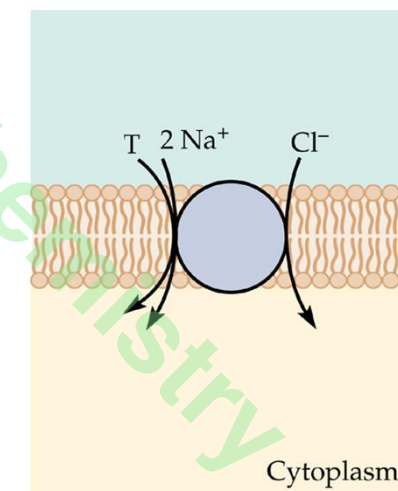
А - схематичная топология **Na⁺/Cl⁻-зависимых транспортеров**, отражающая 12 трансмембранных доменов, соединяющих внутри- и внеклеточные петли. У-образные фрагменты на большой внеклеточной петле между 3-м и 4-м доменами предположительно представляют собой N-гликозилированные остатки аспарагиновой кислоты.

(по Masson J, Sagne C, Hamon M, Mestikawy SEL (1999) Neurotransmitter transporters in the central nervous system. Pharmacol Rev 51:439–464).



ОрГМУ, кафедра химии

(B) Monoamines, GABA, glycine

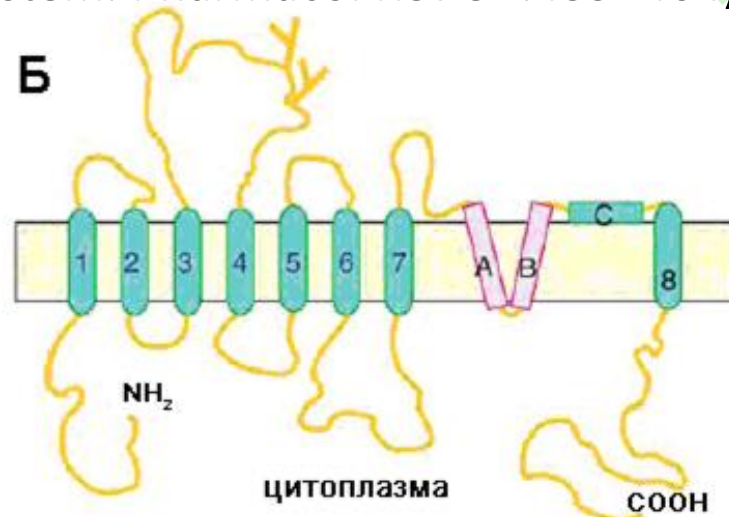


Транспорт медиаторов из внеклеточного пространства в цитоплазму

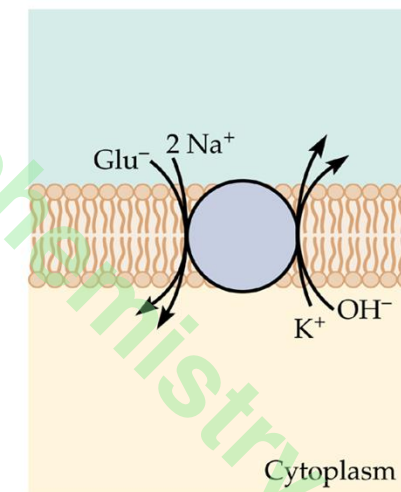
Схематичная структурная организация медиаторных транспортеров

Б - схематичная топология **Na⁺/K⁺-зависимых глутаматных транспортеров**, отражающая 8 трансмембранных доменов, входящую извне шпилькообразную петлю (А и В), которая напоминает ионпроводящую пору ионного канала, фрагмент С соединяет домен 8 с остальной частью молекулы

(по Masson J, Sagne C, Hamon M, Mestikawy SEL (1999) Neurotransmitter transporters in the central nervous system. Pharmacol Rev 51:439–464).



(A) Glutamate



Транспорт медиаторов из цитоплазмы в везикулы

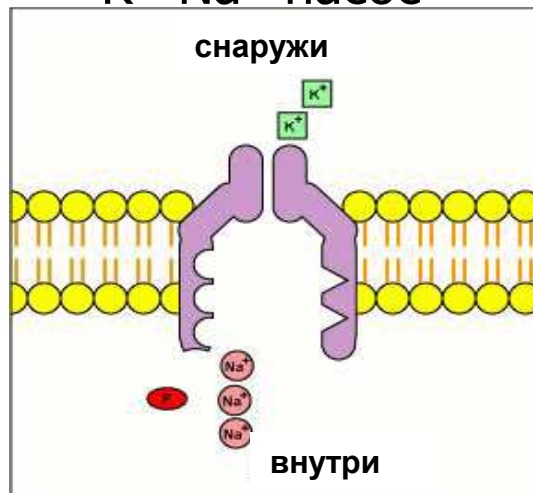
- Транспорт медиаторов в секреторные везикулы обеспечивается специальными системами вторичного активного транспорта – везикулярными транспортерами медиаторов, которые представляют собой белки, состоящие из 500-600 аминокислот.
- Транспорт большинства медиаторов из цитоплазмы внутрь везикул осуществляется с использованием градиента протонов, направленного из везикулы в цитоплазму.
- В свою очередь электрохимический градиент протонов формируется в результате работы **H⁺-АТФазы V-типа**.
- Этот градиент включает **химический** (концентрационный градиент) и **электрический** (разность потенциалов) компоненты.
- В зависимости от транспортера **оба** или только **один** из этих компонентов могут использоваться в качестве источника энергии для транспорта медиатора.

АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ

Первично-активный транспорт ИОНОВ

ИОННЫЕ НАСОСЫ переносят вещества против их градиентов за счёт энергии гидролиза АТФ

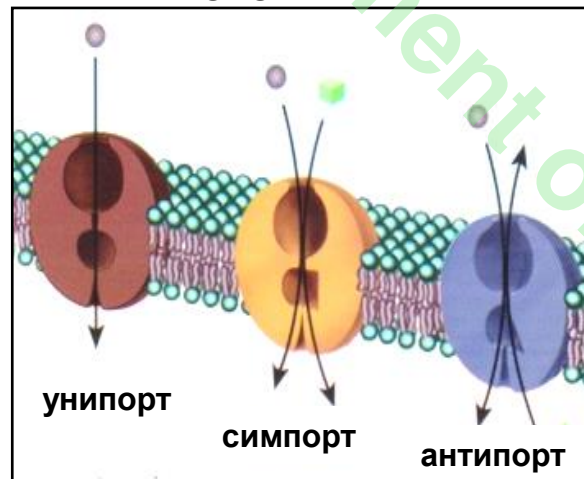
K^+ - Na^+ насос



Кальциевый насос, водородная помпа, йодный насос и др.

Вторично-активный транспорт ИОНОВ

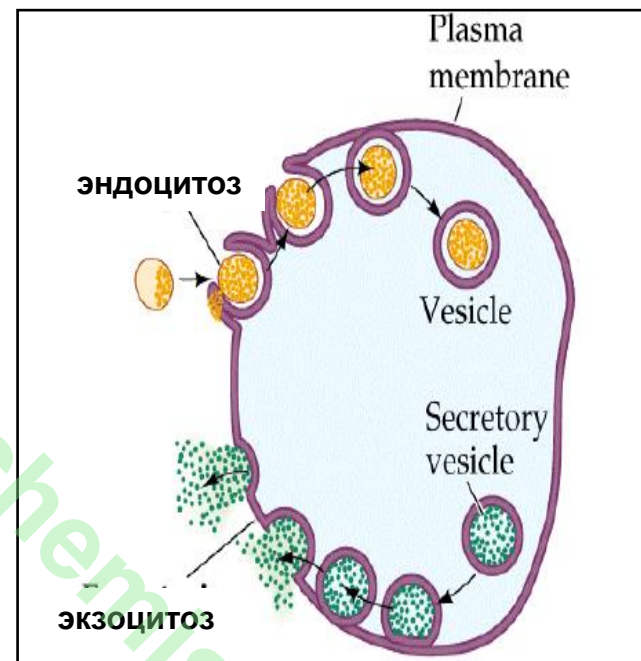
ПЕРЕНОСЧИКИ транспортируют вещества против их градиентов за счёт градиентов других ионов



Натрий-кальциевый обменник, натрий-водородный обменник, перенос сахаров, аминокислот, нуклеотидов в кишечник, мозг.

Эндоцитоз

транспорт макрочастиц внутрь клетки (эндоцитоз) или наружу (экзоцитоз)



Например, транспорт медиаторов в мозге

Вопросы к занятию

- 1. Транспорт веществ через мембрану. Общая характеристика транспортных процессов.
- 2. Микротранспорт: пассивный транспорт (простая и облегченная диффузия), активный транспорт (первичный и вторичный). Унипорт и котранспорт (симпорт и антипорт).
- 3. Макротранспорт: эндоцитоз (пиноцитоз и фагоцитоз) и экзоцитоз.
- 4. Строение и функционирование ионных каналов. Селективность ионных каналов. Понятие электрохимического градиента.
- 5. Молекулярные основы первичного активного транспорта ионов. Отличия первичного активного транспорта от пассивного. Классификация транспортных АТФаз.
- 6. Механизм действия протонной АТФазы, анионной АТФазы, Са-АТФазы и Na/K-АТФазы. Электронейтральный и электрогенный активный транспорт ионов.
- 7. Липосомы как модель биологических мембран и транспортная форма лекарственных препаратов.

Спасибо за внимание!