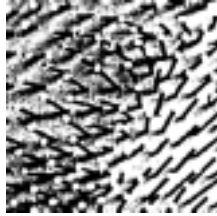


Биофизика процессов гормональной рецепции



§ 1. Передача сигнала от гормонов и медиаторов внутрь клетки

Существование высокоорганизованного многоклеточного организма животного и человека невозможно без постоянного обмена информацией, командами и сигналами между клетками. Эта стройная, тонко отлаженная система обуславливает взаимодействие множества клеточных ансамблей, позволяющее многоклеточному организму функционировать как единому целому.

Известно 3 варианта химической коммуникации клеток внутри животного организма, различающиеся по расстояниям, на которых они действуют: 1) эндокринная и 2) паракринная сигнализация, а также 3) синаптическая передача. В первом случае выделяемые эндокринными клетками сигнальные молекулы-гормоны разносятся током крови по всему организму и достигают самых удаленных клеток-мишеней; во втором случае из-за быстрой инактивации и/или связывания клетками-мишенями сигнальные молекулы-медиаторы диффундируют на расстояния порядка миллиметра; наконец, при синаптической передаче диффузия ограничивается расстояниями около 0,05 м. Во всех случаях диффузия сигнальной молекулы должна завершаться ее связыванием с особым белком клетки-мишени — рецептором.

Если рассматривать понятие химической коммуникации (сигнализации) шире, включая и сигналы, которые воспринимаются животным организмом из внешней среды, то сюда войдет также обонятельная и вкусовая рецепция, обеспечивающая восприятие сигнальных молекул, «обладающих» запахом или вкусом. Как показали исследования последнего десятилетия, молекулярные механизмы обонятельной и вкусовой рецепции имеют много общего с таковыми во внутриклеточной химической коммуникации. Поскольку последняя изучена значительно более подробно, то мы остановимся именно на этом наиболее наглядном примере.

Известно, что эндокринной регуляции свойственна высокая степень иерархичности. Так, стимул, поступивший от нервной клетки головного мозга к нейросекреторным клеткам гипоталамуса (или подбугорья — участка головного мозга), вызывает выход в кровь пептидных гормонов двух классов: 1) либеринов, или рилизинг-факторов, и 2) статинов. Оба этих класса веществ воздействуют на расположенный рядом гипофиз, однако, если либерины стимулируют секрецию гормонов гипофиза, то статины подавляют ее. Причем секреция большинства гипофизарных гормонов предназначена для стимуляции других, периферических эндокринных желез, выделяющих третьи гормоны. Эта цепочка может быть прослежена на следующем примере: первый гормон — кортиколиберин (гипоталамус) вызывает секрецию в кровь

второго гормона — кортикотропина, или адренкортикотропного гормона (АКТГ, передняя доля гипофиза), а тот в свою очередь стимулирует в коре надпочечников синтез и выход кортизола (третий гормон). Видно, что гипоталамус, находясь на вершине этой «иерархической пирамиды», регулирует эндокринную систему.

Во всех случаях сигнальная молекула — гормон, локальный медиатор, нейромедиатор — для того чтобы вызвать эффект у клетки-мишени, должна связаться со специфическим рецептором этой клетки. Рецепторы для большинства сигнальных молекул находятся на плазматической мембране; стероидные гормоны (гидрофобные молекулы) имеют внутриклеточные рецепторы.

Мембранные рецепторы подразделяются на 3 класса:

- 1) рецепторы факторов роста,
- 2) рецепторы, сопряженные с G-белками, и
- 3) каналобразующие рецепторы (например, рецепторы нейромедиаторов ацетилхолина, ГАМК), являющиеся ионными каналами, открывающимися в результате связывания нейромедиатора (об ионных каналах см. главу XXI).

Рецепторы факторов роста (например, фактора роста эпидермиса, тромбоцитарного фактора роста) участвуют в регуляции клеточного деления и роста. На своем внеклеточном N-конце они содержат участок связывания фактора роста, затем следует трансмембранный домен, а цитоплазматический C-конец имеет домен с ферментативной, обычно протеинкиназной активностью, т. е. способностью катализировать перенос *g*-фосфатной группы от АТФ к белку-субстрату. Эти трансмембранные пептиды диффундируют в плазматической мембране. Связывание фактора роста со своим рецептором способствует димеризации рецепторов ($R + R \rightarrow 2R$) в плазматической мембране, фосфорилированию киназного домена одной рецепторной молекулы протеинкиназой другой молекулы и активации фосфорилированного домена. В результате фосфорилированными и активированными оказываются оба домена у димера, что обеспечивает интенсивное фосфорилирование соответствующих внутриклеточных белковых субстратов — передачу сигнала вовнутрь клетки.

Рецепторы, сопряженные с G-белками, опосредовано, через эти мембранные белки стимулируют или ингибируют особые эффекторные ферменты плазматической мембраны (например, аденилатциклазу) или ионные каналы плазматической мембраны. Из нескольких классов G-белков следует выделить два: стимулирующие G_s и ингибирующие G_i . Такие гормоны как, например, тиреотропный, лютеинизирующий, глюкагон, связавшись со своими рецепторами, способствуют их взаимодействию с G_s -белками, которые, активировавшись после этого, стимулируют аденилатциклазу. Адреналин, например, может взаимодействовать с несколькими адренорецепторами — *a* и *b*, причем *b*-адренорецепторы активируют G_s -белки и, тем самым, стимулируют аденилатциклазу, тогда как *a*₂-адренорецепторы (подтип *a*-адренорецепторов) активируют G_i -белки и поэтому подавляют ее активность.

Процесс протекает следующим образом. После связывания лиганда (гормона) конформация рецептора изменяется так, что открывается его участок для взаимодействия с G-белком (рис. XXVI.1); за счет латеральной диффузии в липидном бислое плазматической мембраны происходит образование комплекса рецептор–G-белок, что позволяет заменить GDP на GTP. В результате этого α -субъединица G-белка диссоциирует, у нее появляется участок для взаимодействия с аденилатциклазой, и она образует с ней комплекс, активируя ее. Аденилатциклаза синтезирует

цАМФ; а в результате гидролиза субъединиц возвращается в исходное неактивное состояние: комплекс с $\beta\gamma$ -субъединицами.

Во всех перечисленных случаях действие гормонов сводится к усилению или ослаблению производства аденилатциклазой внутриклеточного посредника этих гормонов — циклического АМФ (цАМФ). Последний служит активатором протеинкиназы А.

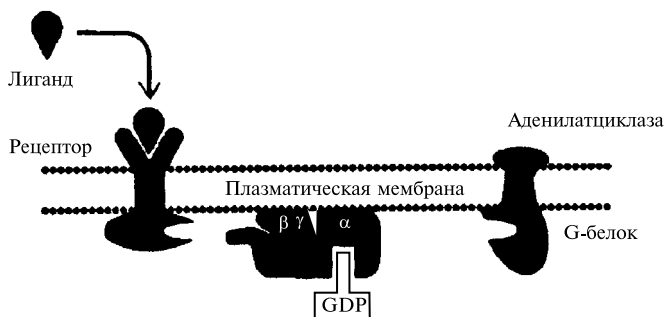


Рис. XXVI.1.
Схема активации аденилатциклазы (по Албертсу и др., 1994)

Сходная цепь событий происходит при активации соответствующих рецепторов такими гормонами и медиаторами, как вазопрессин и ацетилхолин, только эффекторным ферментом является фосфоинозитид — специфическая фосфолипаза С. Ею начинается фосфоинозитидный каскад, так как она образует из мембранного фосфолипида фосфатидинозит-1,4-бисфосфата два продукта: 1) диацилглицерин, активирующий протеинкиназу С, и 2) инозит 1,4,5-трифосфат, освобождающий еще один внутриклеточный посредник Ca^{2+} из внутриклеточных депо, который активирует Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы.

Таким образом, переработка сигнала в процессах гормональной рецепции происходит по общей схеме: доставка сигнальной молекулы → связывание—узнавание → преобразование сигнала → функциональные изменения.

§ 2. Общие закономерности рецепции гормонов и медиаторов

Расстояния, преодолеваемые сигнальными молекулами в организме, могут измеряться метрами; перемещения на такие большие расстояния обусловлены не диффузией, а различными видами конвекции, например, движением крови. Однако вблизи клетки, на расстояниях порядка микрометра от ее поверхности, молекулы достигают рецепторных мембранных структур уже путем диффузии. Г. Адам и М. Дельбрюк (1968) показали, что существование рецепторных структур на мембране клетки при определенных условиях резко ускоряет взаимодействие сигнальной молекулы с рецептором. Было рассчитано среднее время диффузии τ молекулы к мишени радиуса a в области пространства радиуса b и размерности i , если коэффициент диффузии молекулы $D^{(i)}$. Оказалось, что τ^i есть функция от отношения b/a , зависящая от размерности пространства:

$$\tau^{(i)} = (b^2/D^{(i)})f^{(i)}(b/a). \quad (\text{XXVI.2.1})$$

Так, в одномерном пространстве ($i = 1$)

$$\tau^{(1)} = b^2/D^{(1)}(1 - a/b)^2/3. \quad (\text{XXVI.2.2})$$

При $b \gg a$

$$\tau^{(1)} = b^2/3D^{(1)}. \quad (\text{XXVI.2.3})$$

В двумерном пространстве при $b \gg a$

$$\tau^{(2)} = (b^2/2D^{(2)}) \ln(b/a), \quad (\text{XXVI.2.4})$$

а в трехмерном при $b \gg a$

$$\tau^{(3)} = b^3/3aD^{(3)}. \quad (\text{XXVI.2.5})$$

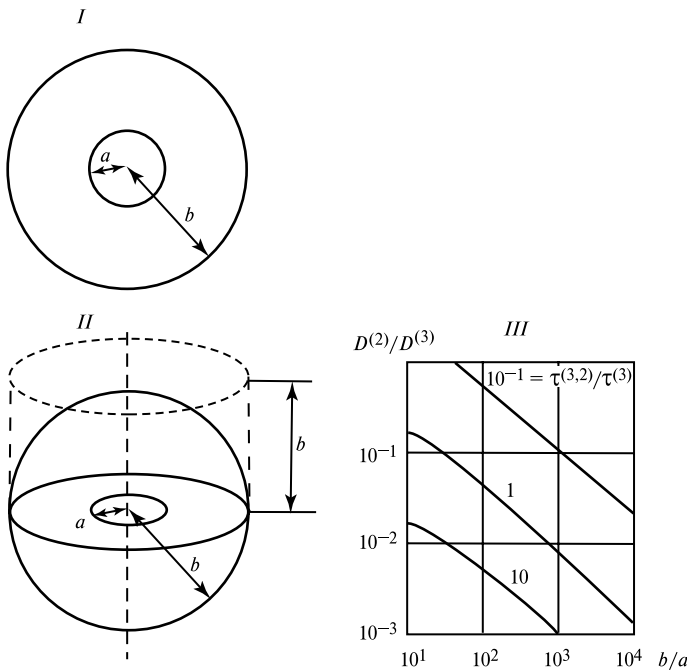


Рис. XXVI.2.
К выводу формулы
(XXVI.2.6). Пояснение
см. в тексте

Расположение рецепторов на мембране, куда вначале попадают сигнальные молекулы, диффундирующие затем непосредственно к рецептору, может способствовать ускорению взаимодействия этих молекул с рецепторами. На рис. XXVI.2, I показан случай обычной трехмерной диффузии в большой сфере радиуса b к «рецептору» — малой концентрической сфере радиуса a , которая захватывает попавшие в нее диффундирующие молекулы. На рис. XXVI.2, II дана иллюстрация другого

случая, когда частица, двигаясь в цилиндре высоты b и радиуса b , попадает в экваториальную «рецепторную» мембранную плоскость, и уже по ней диффундирует к «рецептору» — диску радиуса a . В этом случае трехмерная диффузия заменяется комбинированной двухстадийной диффузией: вначале сигнальная молекула за счет диффузии в цилиндре попадает на его основание, а затем, диффундируя по нему, — на диск-«рецептор». Расчеты показывают, что соотношение времен трехмерной диффузии $\tau^{(3)}$ [см. (XXVI.2.5)] и такой комбинированной $\tau^{(3,2)}$ диффузии зависит от отношения b/a и $D^{(2)}/D^{(3)}$. Для многих реальных для клетки ситуаций, можно использовать приближенную формулу

$$\tau^{(3,2)}/\tau^{(3)} \approx (a/b)(D^{(3)}/D^{(2)}) \cdot 10. \quad (\text{XXVI.2.6})$$

Графики зависимостей $\tau(3,2)/\tau^{(3)}$ от b/a и $D^{(2)}/D^{(3)}$ даны на рис. XXVI.2, III. На нем незакрашенная область соответствует $\tau(3,2)/\tau^{(3)} < 1$. Вполне очевидны преимущества двухстадийной диффузии перед одностадийной трехмерной в случае больших b/a и малых $D^{(2)}/D^{(3)}$. Таким образом, существование рецепторных областей на мембране способствует ускорению взаимодействия сигнальных молекул с рецепторами.

Следующим этапом рецепции является связывание молекулы лиганда — гормона, нейромедиатора — с рецептором, ведущее к восприятию сигнала. В результате взаимодействия лиганда с рецептором образуется лиганд-рецепторный комплекс, формально аналогичный фермент-субстратному комплексу (см. гл. XIV):



Здесь L — лиганд, R — рецептор, K — константа сродства ($K = I/K_{\text{дисс}}$, где $K_{\text{дисс}}$ — равновесная константа диссоциации).

Константы сродства гормон-рецепторных комплексов лежат в интервале 10^8 – 10^{11} M^{-1} , что намного больше сродства фермент-субстратных комплексов. Собственно «узнавание» соответствующего лиганда заключается в связывании его специфическим рецептором; чуждое для этого рецептора вещество, не имеющее к нему сродства, не связывается и тем самым остается «неузнаваемым».

Рассмотрим наиболее общую ситуацию, когда n лигандов взаимодействуют с m классами участков связывания (рецепторы), причем в рассматриваемой системе отсутствуют какие-либо другие вещества, способные взаимодействовать как с этими лигандами, так и с участками связывания. Помимо этого примем, что: 1) между лигандом и связывающим участком возможна только одна обоатимая реакция; 2) все реагирующие компоненты системы одновалентны, а образующийся комплекс не выходит из реакции и не включается в другие реакции; 3) каждая реакция связывания независимо от остальных приходит к равновесию в соответствии с кинетикой реакции второго порядка; 4) нет кооперативных эффектов и аллостерического связывания.

Поскольку i -й лиганд может существовать в состоянии, связанном с j -м участком B_{ij} (от англ. bound — связанный), и в свободной форме F_i (от англ. free —

свободный), то общая концентрация i -го лиганда $[L_i]$ будет равна:

$$[L_i] = [F_i] + \sum_{j=1}^m [B_{ij}], \quad i = 1, \dots, n. \quad (\text{XXVI.2.8})$$

Аналогично, общая концентрация j -х участков связывания R_j складывается из концентрации незанятых участков r_j и участков, связавших лиганды:

$$[R_j] = [r_j] + \sum_{i=1}^n [B_{ij}], \quad j = 1, \dots, m. \quad (\text{XXVI.2.9})$$

Константа сродства K_{ij} при равновесии ($F_i + r_j \rightleftharpoons B_{ij}$) равна

$$K_{ij} = \frac{[B_{ij}]}{[F_i][r_j]}, \quad i = 1, \dots, n; \quad j = 1, \dots, m. \quad (\text{XXVI.2.10})$$

Подставляя значения для B_{ij} из этого уравнения в уравнения (XXVI.2.8) и (XXVI.2.9), получим

$$[L_i] = [F_i] + \sum_{j=1}^m K_{ij}[r_j][F_i], \quad i = 1, \dots, n, \quad (\text{XXVI.2.11})$$

$$[R_j] = [r_j] + \sum_{i=1}^n K_{ij}[r_j][F_i], \quad j = 1, \dots, m. \quad (\text{XXVI.2.12})$$

Найдем из уравнения (XXVI.2.12)

$$[r_j] = \frac{[R_j]}{1 + \sum_{i=1}^n K_{ij}[F_i]}, \quad j = 1, \dots, m. \quad (\text{XXVI.2.13})$$

и, подставив в (XXVI.2.11), получаем

$$[L_i] = [F_i] + \frac{\sum_{j=1}^m K_{ij}[R_j][F_i]}{1 + \sum_{a=1}^n K_{aj}[F_a]}, \quad i = 1, \dots, n. \quad (\text{XXVI.2.14})$$

Это уравнение с учетом (XXVI.2.8) можно преобразовать так, чтобы охарактеризовать отношение k_i концентраций связанного и свободного i -го лиганда (Н. А. Feldman, 1972):

$$k_i = \frac{\sum_{j=1}^m [B_{ij}]}{[F_i]} = \frac{[L_i]}{[F_i]} - 1 = \frac{\sum_{j=1}^m K_{ij}[R_j]}{1 + \sum_{a=1}^n K_{aj}[F_a]}, \quad i = 1, \dots, n. \quad (\text{XXVI.2.15})$$

Рассмотрим ряд характерных случаев.

1. Один лиганд ($i = 1$) и один участок связывания ($j = 1$). Здесь можно отбросить подстрочные индексы. Из (XXVI.2.15)

$$k = \frac{K[R]}{1 + K[F]}, \quad (\text{XXVI.2.16})$$

а так как $[F] = [B]/k$, то

$$k = [B]/[F] = K[R] - K[B] \quad (\text{уравнение Скэтчарда}). \quad (\text{XXVI.2.17})$$

График этого уравнения в координатах $([B]/[F], [B])$ представляет собой прямую. Экспериментальные данные по связыванию радиоактивных лигандов часто представляют именно в координатах Скэтчарда, полагая, что $[L] \gg [R]$, т. е. $[F] \approx [L]$. Параметры равновесного связывания получают, продолжая прямую до пересечения с осями: на оси абсцисс отсекается отрезок, равный $[R]$, на оси ординат $K[R]$, тангенс угла наклона соответствует K .

Однако часто связывание одного лиганда не описывается в координатах Скэтчарда. В отсутствие отрицательной кооперативности это бывает обусловлено наличием более одного участка связывания.

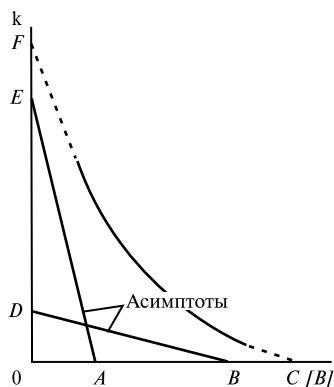


Рис. XXVI.3.

График связывания одного лиганда с двумя участками (в координатах $(k, [B])$):

$$\begin{aligned} OC &= [R_1] + [R_2], & OF &= K_{11}[R_1] + K_{12}[R_2], & OA &= [R_1], \\ OB &= [R_2], & OD &= K_{12}[R_2], & OE &= K_{11}[R_1]. \end{aligned}$$

2. Один лиганд ($i = 1$) и два участка связывания ($j = 2$). Способом, аналогичным предыдущему, можно преобразовать уравнение (XXVI.2.15) для случая $i = 1$, $j = 2$:

$$\begin{aligned} K_{11}K_{12}[B]^2 + (K_{11} + K_{12})k[B] + k^2 - \\ - K_{11}K_{12}([R_1] + [R_2])[B] - (K_{11}[R_1] + K_{12}[R_2])R = 0. \end{aligned} \quad (\text{XXVI.2.18})$$

Графиком этого уравнения в координатах $(k, [B])$ является гипербола, продолжения которой отсекают на оси абсцисс отрезок $[R_1] + [R_2]$, на оси ординат — отрезок $K_{11}[R_1] + K_{12}[R_2]$. Асимптотами гиперболы являются прямые $k = -K_{11}([B] - [R_1])$ и $k = -K_{12}([B] - [R_2])$, отсекающие на оси ординат отрезки $K_{11}[R_1]$ и $K_{12}[R_2]$, а на оси абсцисс $[R_1]$ и $[R_2]$ (рис. XXVI.3). Эти особенности позволяют провести анализ экспериментальных данных и приблизительно (графически) определить параметры равновесного связывания.

3. Два лиганда ($i = 2$) и один участок связывания ($j = 1$). Случай, часто встречающийся на практике, когда есть один меченый лиганд, специфически связывающийся с одним типом рецепторов, и возникает необходимость определить характеристики связывания другого, но уже немеченого лиганда.

Из (XXVI.2.14) и (XXVI.2.8) получаем

$$\sum_{j=1}^m [B_{ij}] = \frac{\sum_{j=1}^m K_{ij}[R_j][F_i]}{1 + \sum_{a=1}^n K_{aj}[F_a]}, \quad i = 1, \dots, n. \quad (\text{XXVI.2.19})$$

При $i = 1$ и $j = 1$ для лиганда 1 (обычно радиоактивного; помечен звездочкой) из (XXVI.2.19) следует

$$[B_1^*] = \frac{K_1[R][F_1^*]}{1 + K_1[F_1^*] + K_2[F_2]}. \quad (\text{XXVI.2.20})$$

Если концентрацию меченого лиганда 1 поддерживать постоянной и изменять концентрацию немеченого лиганда 2, то с увеличением $[F_2]$ будет уменьшаться $[B_1^*]$ из-за «вытеснения» его немеченым конкурентом. Рассмотрим условия, когда $[L_2] \gg [R]$ (рис. XXVI.4). В отсутствие лиганда 2, т. е. когда $[F_2] \approx [L_2] = 0$, связывание меченого лиганда 1 максимально:

$$[B_1^*]_0 = \frac{K_1[R][F_1^*]}{1 + K_1[F_1^*]}. \quad (\text{XXVI.2.21})$$

Можно найти такую эффективную концентрацию лиганда 2 ($EC_{50} = [F_2]' \approx [L_2]'$), которая на 50% «вытесняет» меченый лиганд (рис. XXVI.3), т. е. становится равной $1/2[B_1^*]_0$. Легко рассчитать из (XXVI.2.20) и (XXVI.2.21), что в этом случае

$$K_2 = \frac{1 + K_1[F_1^*]}{EC_{50}}. \quad (\text{XXVI.2.22})$$

4. Число лигандов и участков связывания больше 1 ($i > 1, j > 1$).

Этот случай требует числового решения уравнений (XXVI.2.15), (XXVI.2.16) или (XXVI.2.20), позволяющего найти оптимальные значения j , формы теоретических кривых, а также многие параметры связывания, в том числе и вклад данных j -х участков в общем связывании лиганда. Этим методом была получена подробная информация о рецепторах катехоламинов (адреналин, норадреналин и их аналоги) и других гормонов, о взаимодействии этих рецепторов с регуляторными мембранными белками на начальных стадиях преобразования гормонального сигнала.

§ 3. Особенности внутримембранных процессов рецепции

Рецепторы, G-белки и эффекторные ферменты существуют в плазматической мембране как отдельные и часто независимые интегральные белки. Поэтому их взаимодействие (например, димеризация рецепторов факторов роста, функциони-

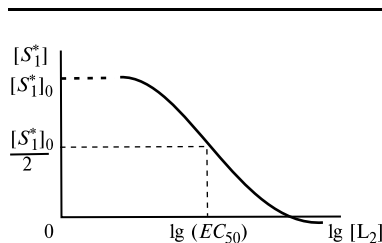


Рис. XXVI.4.

«Вытеснение» лигандом 2 (L_2) меченого лиганда 1: $[L_2] \gg [R]$ (пояснение см. в тексте)

рование рецепторов, сопряженных с G-белками) связано с характером и скоростью их перемещения, на что существенное влияние будет оказывать структура мембраны и, в частности, ее липидного бислоя (см. главы XV, XVI). Неслучайно скорость аденилатциклазной реакции, активируемой гормоном, существенно зависит от физического состояния липидов мембраны — среды, где происходит взаимодействие белков аденилатциклазного комплекса.

Движение рецепторов в плазматической мембране живой клетки может быть экспериментально обнаружено. Так, рецептор можно метить, присоединяя к нему флуоресцирующее соединение (см. § 2 гл. X). Вспышка лазера вызывает фотоокисление и «отбеливание» флуорофора (потеря способности флуоресцировать) на небольшом участке клетки (радиусом 1–2 мкм). Затем происходит восстановление флуоресценции «отбеленного» участка. Процесс восстановления флуоресценции отражает «наплывание» в этот участок «неотбеленных» рецепторов, т. е. свидетельствует об их движении (рис. XXVI.5). По параметрам восстановления флуоресценции можно рассчитывать коэффициенты латеральной диффузии рецепторов.



Рис. XXVI.5.

Кинетика восстановления флуоресценции после «фотоотбеливания» участка клеточной мембраны

Связь коэффициента диффузии рецептора с восстановлением флуоресценции можно пояснить следующим образом. В одномерном случае пространственно-временные изменения концентрации c диффундирующего вещества определяются по второму закону Фика:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}, \quad (\text{XXVI.3.1})$$

где D — коэффициент диффузии, t — время, x — единственная координата диффузии.

Решение этого уравнения для начальных условий, когда при $t = 0$ все вещество c_0 сконцентрировано в начале координаты, будет

$$c/c_0 = (4\pi Dt)^{-1/2} \exp(-x^2/4Dt). \quad (\text{XXVI.3.2})$$

Так как среднее значение пробега $\langle x \rangle$ диффундирующих частиц для любого t будет $\langle x \rangle = 0$, то найдем дисперсию $\langle x^2 \rangle$. Выражение (XXVI.3.2) можно рассматривать как плотность распределения вероятности обнаружения диффундирующего вещества в точке x . Тогда

$$\langle x^2 \rangle = \int_{-\infty}^{\infty} x^2 (4\pi Dt)^{-1/2} \exp(-x^2/4Dt) dx. \quad (\text{XXVI.3.3})$$

Интеграл разбивается на два табличных, и для одномерного случая получаем

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \quad \text{или} \quad D = \langle x^2 \rangle / 2t. \quad (\text{XXVI.3.4})$$

Для двумерного случая (движение в плоскости мембраны)

$$D = \langle x^2 \rangle / 4t, \quad (\text{XXVI.3.5})$$

а для трехмерного

$$D = \langle x^2 \rangle / 6t. \quad (\text{XXVI.3.6})$$

Используя формулу (XXVI.3.5) в несколько преобразованном виде (D. Axelrod et al, 1976), можно рассчитать D по данным «фотоотбеливания»:

$$D = [w^2 / 4\tau_{1/2}] \gamma, \quad (\text{XXVI.3.7})$$

где w — радиус лазерного луча; $\tau_{1/2}$ — время полувосстановления флуоресценции; γ — величина, характерная для используемого лазерного луча и получаемая при точном решении уравнения двумерной диффузии (обычно около 1,3). Величины D для рецепторов, полученные методом восстановления флуоресценции после фотоотбеливания (методом ВФФ), оказываются около 10^{-10} см²/с и менее. Полного восстановления флуоресценции меченых белков (в т. ч. рецепторов) на «отбеленном» участке обычно не происходит (рис. XXVI.4), поэтому методом ВФФ по кривым восстановления флуоресценции можно определить фракции мобильных и «неподвижных» белков.

Существенным фактором, определяющим подвижность рецепторов и взаимодействующих с ними белков (а тем самым и передачу гормонального сигнала в клетку), служит макроструктура мембраны. Мембранные белки образуют агрегаты, которые могут удерживаться цитоскелетом и подмембранными структурами, в состав последних входят белки: фодрин, спектрин или *TW260/240*. Таким образом, движение рецепторов осуществляется не в открытом липидном «море» мембраны, а между «островами» из неподвижных агрегатов белков. Движение белков в мембране осложняется также наличием липидов в фазе геля («твердые» липиды). Следовательно, на скорость передвижения будет оказывать существенное влияние доля площади мембраны η , доступной для движения белков.

Диффузия в среде с препятствиями может быть описана теорией перколяции (от лат. *percolatio* — просачивание) — одним из разделов теоретической физики. Основные понятия этой теории можно проиллюстрировать на примере решеточной перколяции. Представим себе решетку, состоящую из узлов и связей, в которой каждый узел может существовать с вероятностью p (рис. XXVI.6; p можно рассматривать и как концентрацию узлов). Совокупность узлов, связанных друг с другом расстоянием ближайшего соседства, образует кластер. Существует критическая концентрация узлов p_0 (перколяционный порог), выше которой в системе возникает впервые перколяционный кластер, пронизывающий всю решетку (рис. XXVI.7). Основная часть перколяционного кластера без тупиковых ветвей получила название скелета перколяционного кластера.

Перемещение в решетке возможно от узла к узлу по связям, их соединяющим. Таким образом, наличие перколяционного кластера обуславливает возможность перемещения по всей решетке. Отсутствующие узлы (или связи) представляют собой препятствие для перемещения.

Согласно теории перколяции (А. Л. Эфрос, 1982; D. Stauffer, 1985) свойства перколяционного кластера, в том числе диффузия в нем, описываются функциями вида

$$f(p) \sim (p - p_c)^u, \quad (\text{XXVI.3.8})$$

где u — критический показатель, который определяется функцией $f(x)$ и зависит лишь от размерности пространства. Например, для двумерного пространства (к которому можно отнести мембрану),

$$\begin{aligned} P(p) &\sim (p - p_c)^\beta, & \beta &= 0,14, \\ P_B(p) &\sim (p - p_c)^{\beta_B}, & \beta_B &= 0,5, \\ D(p) &\sim (p - p_c)^\mu, & \mu &= 1,16, \end{aligned} \quad (\text{XXVI.3.9})$$

где $P(p)$ — вероятность того, что точка принадлежит перколяционному кластеру, $P_B(p)$ — вероятность того, что точка принадлежит скелету перколяционного кластера, $D(p)$ — коэффициент диффузии вдоль скелета перколяционного кластера.

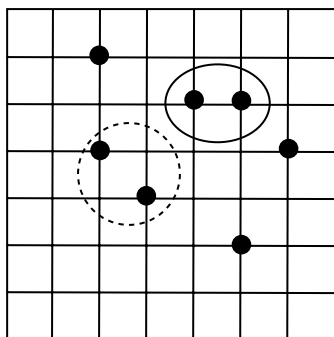


Рис. XXVI.6.

Решетка с узлами и связями. Два узла в сплошном овале образуют кластер, в пунктирном — кластера не образуют

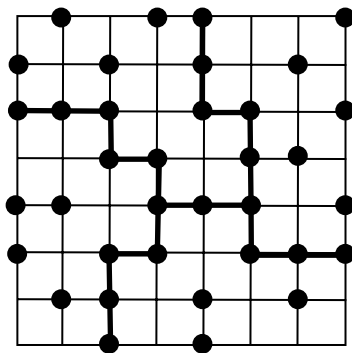


Рис. XXVI.7.

Решетка с перколяционным кластером (жирные линии)

Перемещение в реальных системах, в том числе мембранах, которое часто не имеет ярко выраженного дискретного характера, удобнее рассматривать как непрерывную перколяцию. В этом случае вместо величины p обычно используют величину x — долю пространства, доступного для перемещения. Было показано, что для непрерывной перколяции критические показатели остаются теми же, что и для решеточной, если, конечно, размерность пространства неизменна. Следовательно, какая бы модель ни была избрана — решеточная или непрерывная, — величина критических показателей для данной размерности пространства сохранится. Тогда

выражения (XXVI.3.9) записываются так:

$$P(x) \sim (x - x_c)^\beta, \quad \beta = 0,14, \quad (\text{XXVI.3.10a})$$

$$P_B(x) \sim (x - x_c)^{\beta_B}, \quad \beta_B = 0,5, \quad (\text{XXVI.3.10б})$$

$$D(x) \sim (x - x_c)^\mu, \quad \mu = 1,16. \quad (\text{XXVI.3.10в})$$

Очевидно, что в логарифмических координатах кривые, описываемые этими выражениями, спрямляются, и по наклону их можно определять значения критических показателей.

В приложении понятий теории перколяции к описанию биологических мембран перколяционный кластер может представлять собой непрерывный путь для диффузии мембранных белков. В таком случае при уменьшении доли пространства, доступного для перемещения белков, ниже порогового, x_c , перколяционный кластер разбивается на мелкие кластеры, не связанные между собой, и, как следствие, диффузия на большие расстояния (в скелете перколяционного кластера) становится невозможной.

Методом ВФФ (А. С. Соболев, 1994, 1995) были определены коэффициенты диффузии и мобильная фракция белков в нативных плазматических мембранах с измененными долями жидких липидов и иммобилизованных конгломератов белков — т. е. с измененными значениями x .

Оказалось, что с уменьшением x снижались как коэффициент латеральной диффузии белков, так и доля мобильной их фракции; это изменение соответствовало предсказаниям теории перколяции — имело порог. Экспериментально определенные критические показатели хорошо совпадали с теоретическими. Рассмотрим это на следующих примерах. Известно, что белки способны к латеральной диффузии лишь в областях мембраны, занятых жидкими (жидкокристаллическими) липидами, следовательно, перколяционный кластер должен представлять собой кластер жидких липидов. Предположим, что в освещаемом участке клетки радиусом ω [см. уравнение (XXVI.3.8)] находится перколяционный кластер. Восстановление флуоресценции после отбеливания на этом участке осуществляется за счет диффузии белков в скелете этого перколяционного кластера. Следовательно, величина мобильной фракции, определяемая методом ВФФ, должна соответствовать $P_B(x)$. Экспериментальные данные (см. рис. XXVI.8) оказались в хорошем соответствии с теоретическими (ср. с уравнением (XXVI.3.10б)).

Если рассматривать обратимую диффузионно-контролируемую реакцию $A + B \rightleftharpoons A \cdot B$, протекающую в среде с препятствиями, причем доля пространства,

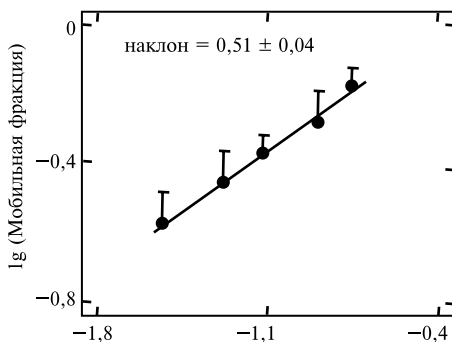


Рис. XXVI.8. Зависимость \lg (мобильной фракции) белков плазматической мембраны, определенной методом ВФФ, от $\lg(x - x_c)$.

доступного для перемещения частиц A и B , равна x , то скорость реакции

$$\frac{d[A \cdot B]}{dt} \sim D(x)[A][B] - K[A \cdot B]$$

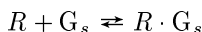
будет равна 0 при равновесии, так что

$$[A \cdot B] \sim D(x)[A][B].$$

Очевидно, что реальная концентрация $[P]$ мембранного белка P будет равна $[P_0/x]$, $x \neq 0$, где $[P_0]$ — концентрация белка при $x = 1$, так как белки нерастворимы в белках и, большинство из них, в твердых липидах. Тогда с учетом (XXVI.3.10в) можно записать

$$[A \cdot B] \sim \frac{(x - x_c)^\mu}{x}. \quad (\text{XXVI.3.11})$$

Если экспериментальные данные (А. С. Соболев и др.) об образовании комплекса рецептор R – G_s -белок



(рис. XXVI.9, А) перестроить в координатах $\lg([R \cdot G_s])$ от $\lg(x - x_c)$ (рис. XXVI.9, Б), то наклон полученного спрямленного графика покажет, соответствует ли он

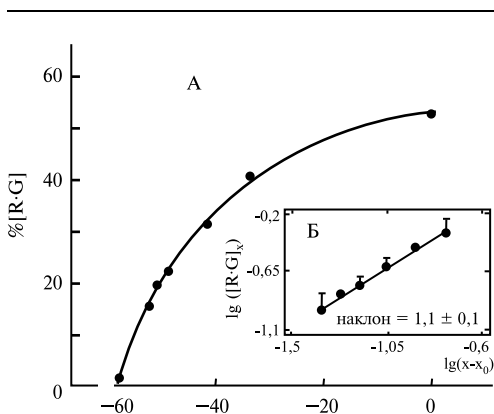


Рис. XXVI.9.

Доля комплекса R – G_s -белок (А) от общего количества рецепторов в мембране при изменении доли пространства, доступно для перемещения белков (доли жидких липидов). Б — то же в логарифмических координатах (по уравнению XXVI.3.11)

теоретически предсказанному [уравнение (XXVI.3.10в)] — диффузии рецептора R и G_s -белка в скелете перколяционного кластера. Как следует из рис. XXVI.9, Б, экспериментальное значение $\mu = 1,1 \pm 0,1$ хорошо соответствует теоретическому [уравнение (XXVI.3.10в)].

Применимость перколяционного подхода к описанию движения и взаимодействия мембранных белков, взаимодействующих с аденилатциклазой, позволяет оценивать размеры мембранного пространства, на котором эти белки взаимодействуют, характеризовать особенности эффектов гормонов при разных долях мембраны, доступных для движения белков, оценивать влияние развития подмембранного цитоскелета в ходе дифференцировки клеток на гормональный ответ.

Кинетика взаимодействия белков в мембране отличается от обычной кинетики реакций в объеме. Если считать, что взаимодействие двух частиц определяется только их диффузией в среде, то стационарная скорость v диффузионно-контролируемой реакции $A + B \rightarrow AB$ будет равна

$$v = c_A/\tau_A + c_B/\tau_B, \quad (\text{XXVI.3.12})$$

где c_A и c_B — концентрации частиц A и B в молях на единицу объема или единицу площади; τ_A — среднее время диффузии, за которое частица A достигает неподвижной частицы B ; τ_B — то же для подвижной частицы B .

Все пространство, где происходит реакция, можно разбить на ячейки радиуса b , в центре которого находятся «ловушка» радиуса a . Частицы (допустим, типа A) свободно диффундируют в ячейки, пока не попадут в ловушку радиуса a , где они взаимодействуют с частицей типа B . Размер ячейки радиуса b можно определить, исходя из числа реагирующих частиц в единице объема или единице площади: Nc , где N — число Авогадро. Тогда в трехмерном случае

$$\frac{1}{Nc_B} = \frac{4}{3\pi b_c^3} \text{ — величина ячейки с «ловушкой» в виде частицы } B;$$

$$\frac{1}{Nc_A} = \frac{4}{3\pi b_c^3} \text{ — величина ячейки с «ловушкой» в виде частицы } A.$$

Отсюда, подставляя в (XXVI.2.5) величины b_A^3 и b_B^3 , найдем

$$\tau_A^{(3)} = (4\pi Nac_B D_A)^{-1}, \quad \tau_B^{(3)} = (4\pi Nac_A D_B)^{-1}, \quad (\text{XXVI.3.13})$$

а подставляя (XXVI.3.13) в (XXVI.3.12), получаем

$$v = 4\pi Na(D_A + D_B)c_A c_B. \quad (\text{XXVI.3.14})$$

В двумерном случае, соответственно, имеем размеры «ловушек»

$$\frac{1}{Nc_B} = \pi b_A^2, \quad \frac{1}{Nc_A} = \pi b_B^2. \quad (\text{XXVI.3.15})$$

Решая (XXVI.3.15) относительно b , находим величины τ в выражении (XXVI.2.4), а затем и v в (XXVI.3.12) (Sh. Hardt, 1979):

$$v = 2\pi N \left(\frac{D_A}{\ln[(\pi Nc_B)^{-1/2}/a]} + \frac{D_B}{\ln[(\pi Nc_A)^{-1/2}/a]} \right) c_A c_B. \quad (\text{XXVI.3.16})$$

Выражение (XXVI.3.14) — известная формула Смолуховского. Величина $4\pi Na(D_A + D_B)$, стоящая перед произведением $c_A c_B$, представляет собой константу скорости реакции второго порядка в объеме. Очевидно, зависимость скорости реакции от концентраций c_A и c_B соответствует здесь зависимости, характерной для реакций второго порядка.

В двумерном случае (XXVI.3.16) оказывается, что скорость реакции более сложным образом зависит от концентраций реагентов. С увеличением концентраций c_A и c_B будет увеличиваться значение множителя, стоящего перед $c_A c_B$ в (XXVI.3.16), а с уменьшением концентраций, наоборот, снижаться.

Следовательно, в двумерном случае скорость реакции может дополнительно регулироваться концентрациями реагирующих частиц.

Такая регуляция осуществляется в клетке *in vivo*, в частности, за счет уменьшения или увеличения числа рецепторов, реагирующих с лигандами, это так называемая down- и up-регуляция. В результате значительно изменяется интенсивность внутриклеточной реакции на соответствующий гормон, взаимодействующий с рецептором данного типа.

§ 4. Кинетические особенности системы регуляции внутриклеточными посредниками

После преобразования сигнала гормона в плазматической мембране — в случае рецепторов, сопряженных с G-белками, — в клетке изменяются концентрации внутриклеточных посредников, таких как цАМФ или Ca^{2+} , которые в свою очередь влияют на активность соответствующих протеинкиназ. В результате этой цепи процессов происходит каскадное усиление сигнала от гормона: число молекул на каждом этапе возрастает, так что общее число молекул внутриклеточных посредников значительно превышает число молекул гормона, связавшихся с рецепторами, а число молекул ферментов, фосфорилированных протеинкиназами, на порядки превосходит число молекул посредников.

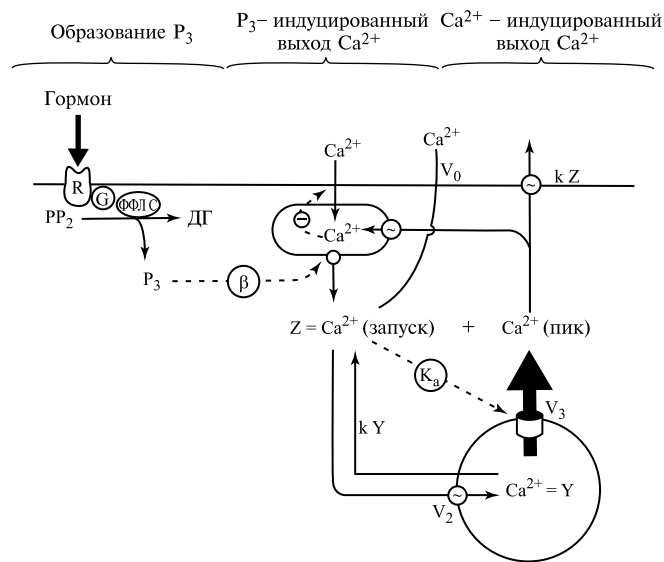


Рис. XXVI.10.

Схема регуляции внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} .

ФФЛС — фосфатидилинозит-специфическая фосфолипаза C, IP_3 — инозит-1,4,5-трифосфат, PIP_2 — фосфатидилинозит-1,4-бисфосфат, ДГ — диацилглицерин

Эта сложная система может обладать своеобразным динамическим поведением. Действительно, оказалось, что для концентрации внутриклеточного посредника, — ионов Ca^{2+} , характерно колебательное изменение в ответ на сигналы гормонов и медиаторов. В клетке наблюдаются осцилляции внутриклеточной концентрации Ca^{2+} с периодами от < 1 до почти 30 мин. Рассмотрим одну из моделей этого явления (Голдбетер). Под влиянием гормона и, соответственно, рецептора R с G-белком активируется фосфатидилинозитспецифическая фосфолипаза C, которая гидролизует фосфатидилинозит-1,4-бисфосфат с образованием инозит-1,4,5-трифосфата IP_3 и диацилглицерина ДГ (рис. XXVI.10). IP_3 воздействует на IP_3 -зависимый внутриклеточный пул Ca^{2+} через свои рецепторы, заполняемые им со степенью β . Скорость индуцированного выхода Ca^{2+} из IP_3 -чувствительного пула, $v_1\beta$, пропорциональна насыщению β рецептора IP_3 . Таким образом, IP_3 регулирует выход в цитозоль ионов Ca^{2+} , которые в свою очередь запускают осцилляционные циклы выброса

Ca^{2+} другим, нечувствительным к IP_3 , путем Ca^{2+} . В модели рассматриваются две переменные: Z — концентрация свободного Ca^{2+} в цитозоле и Y — концентрация ионов Ca^{2+} в IP_3 -нечувствительном пуле, кинетика изменений этих концентраций может быть записана так:

$$\begin{aligned} \frac{dZ}{dt} &= v_0 + v_1\beta - v_2 + v_3 + k_f Y - kZ, \\ \frac{dY}{dt} &= v_2 - v_3 - k_f Y, \end{aligned} \quad (\text{XXVI.4.1})$$

где v_0 и kZ — скорости входа и выхода Ca^{2+} из клетки, соответственно, без гормональной стимуляции; v_2 — скорость АТФ-зависимой накачки Ca^{2+} из цитозоля в IP_3 -нечувствительный пул; v_3 — скорость выхода из этого пула в цитозоль; $k_f Y$ — скорость пассивной утечки из Y в Z ; kZ — скорость выхода цитозольного Ca^{2+} из клетки. Процессы накачки Ca^{2+} в IP_3 -нечувствительный пул и выхода Ca^{2+} из него в цитозоль имеют кооперативную природу, а цитозольный Ca^{2+} сам активирует (автокатализ) выход Ca^{2+} из IP_3 -нечувствительного пула.

С учетом этого выражение для скорости v_2 входа Ca^{2+} и v_3 выхода Ca^{2+} в цитозоль из IP_3 -нечувствительного пула примут вид:

$$\begin{aligned} v_2 &= v_{M2} \frac{Z^n}{K_2^n + Z^n}, \\ v_3 &= v_{M3} \frac{Y^m}{K_R^m + Y^m} \cdot \frac{Z^p}{K_A^p + Z^p}. \end{aligned} \quad (\text{XXVI.4.2})$$

В этих уравнениях v_{M2} и v_{M3} означают максимальные скорости накачки и утечки Ca^{2+} , соответственно; сами эти процессы описаны уравнениями Хилла, и коэффициенты кооперативности равны n и m ; p — степень кооперативности процесса активирования, а K_2 , K_R и K_A — пороговые константы для накачки, утечки и активации. Уравнения (XXVI.4.1) и (XXVI.4.2) имеют единственное стационарное решение, которое однако не всегда устойчиво. Известно (см. главу II), что когда неравновесное стационарное состояние становится неустойчивым, могут возникать незатухающие колебания на траектории предельного цикла. В рассматриваемой системе они возникают при $29,1\% < \beta < 77,5\%$, если остальным параметрам, v_0 , k , k_f , v_1 , K_2 , K_R , v_{M2} , v_{M3} придать физиологические значения. Вне этого диапазона значений параметров стационарное состояние стабильно и колебания не происходят. Дальнейший теоретический анализ показал, что эффективность фосфорилирования субстратов Ca^{2+} -зависимой протеинкиназой зависит от осцилляций концентрации ионов Ca^{2+} и растет с ростом их частоты.

На рис. XXVI.11 показаны колебания концентрации цитозольного Ca^{2+} (Z) при увеличении параметра β до 30%, индуцированные увеличением IP_3 в ответ на внешний сигнал (верхняя часть, сплошная кривая). Одновременно происходят пилообразные колебания Ca^{2+} во внутриклеточном пуле Y . Колебания концентрации Z цитозольного Ca^{2+} с периодом около 1 с на рисунке соответствуют наблюдаемым в некоторых экспериментах, так же, как и с периодом 1 мин в разных типах клеток. Форма пиков на колебательных кривых может зависеть от природы агонистов.

Так, на клетках печени узкие пики наблюдаются с норэпинефрином, а при использовании вазопрессина они намного шире. Изменение формы пиков являются

следствием дополнительного ингибирующего действия агонистов на процессы накачки и утечки Ca^{2+} . Например, уменьшение константы K от 10 с^{-1} до 6 с^{-1} и, соответственно, скорости kZ утечки цитозольного Ca^{2+} замедляет скорость релаксации амплитуды каждого пика. Это приводит к уширению пиков и увеличению частоты колебаний (рис. XXVI.11, нижняя часть) из-за уменьшения времени, необходимого для триггерного включения оттока Ca^{2+} из внутриклеточного пула. Модель дает возможность найти значения параметров, которые соответствуют наблюдаемым в экспериментах различным колебаниям. Таким образом, условие возникновения колебаний в этой регуляторной системе состоит в автокаталитическом Ca^{2+} -зависимом выходе Ca^{2+} из внутриклеточного пула Y . Колебания являются следствием увеличения концентрации цитозольного Ca^{2+} , вызванного в свою очередь ростом IP_3 при стимуляции клетки гормоном.

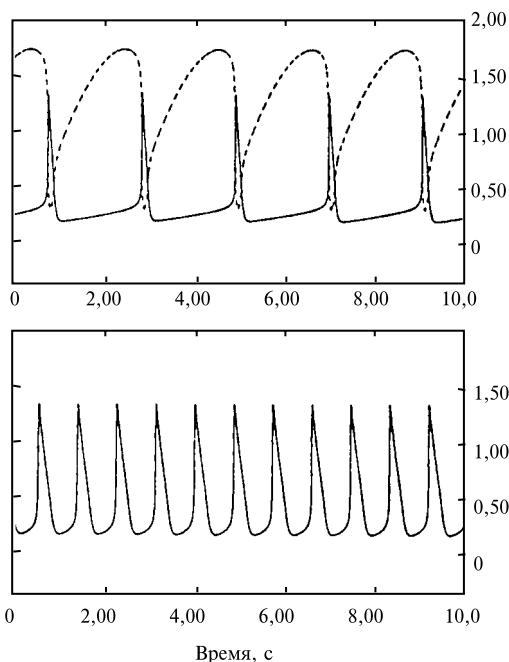


Рис. XXVI.11.
(по Goldbeter et al., 1990)

Верхняя часть: колебания концентрации цитозольного Ca^{2+} (Z , сплошная кривая); колебания концентрации Ca^{2+} в IP_3 — нечувствительном пуле (Y , штриховая кривая).

Нижняя часть: колебания Z при меньшем значении константы K ($K = 6 \text{ с}^{-1}$) выхода Ca^{2+} из клетки (в верхней части $K = 10 \text{ с}^{-1}$). Значения остальных параметров также лежат в физиологическом диапазоне.

В настоящее время обнаружены колебания внутриклеточных концентраций ряда веществ, принимающих участие в регуляции метаболизма.

Отметим колебания значений внутриклеточных концентраций ионов водорода, также играющих важную регуляторную роль.

По-видимому, физиологическая роль такого рода колебаний состоит в возможности дополнительного кодирования передающейся в клетке информации не только по стационарному уровню, но и по частоте и форме колебаний внутриклеточных концентраций сигнальных веществ, играющих ключевую роль в регуляторных системах клетки.