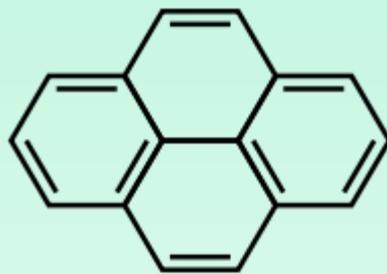


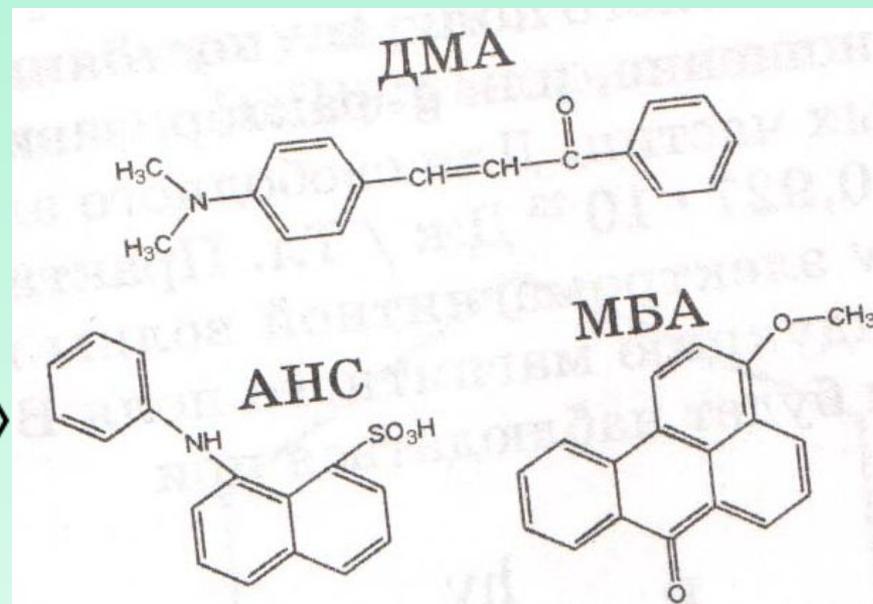
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ДАЕТ ВОЗМОЖНОСТЬ
ИССЛЕДОВАТЬ ПОДВИЖНОСТЬ ФОСФОЛИПИДОВ В
МЕМБРАНЕ, ОЦЕНИТЬ МИКРОВЯЗКОСТЬ МЕМБРАН

ПРИМЕРЫ
ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ
ЗОНДОВ



пирен



Измерение флуоресценции зондов

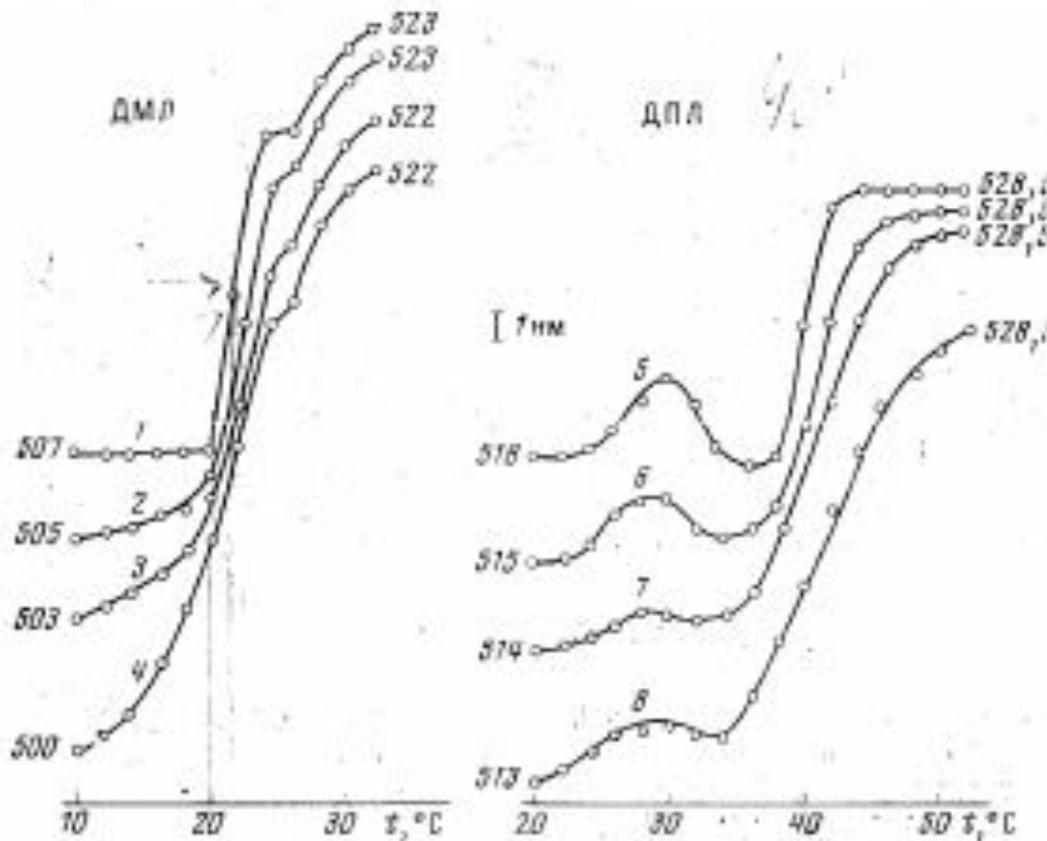


Рис. 8.26. Кривые плавления, измеренные с помощью флуоресцентного зонда МБА.

Цифры слева от кривых обозначают исходное положение максимума флуоресценции, справа — конечное. В этом опыте липосомы были сформированы из ДМЛ (слева) и ДПЛ (справа).

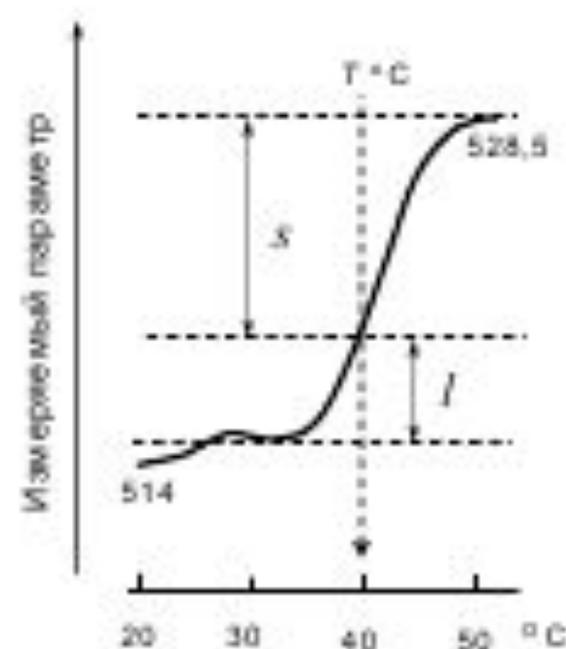


Рис. 8.30. Способ расчета кривых плавления по экспериментальным данным. Для расчета взята одна из кривых на рисунке 8.26). Отношение величин l/s показывает соотношение жидкой и твердой фаз в системе.

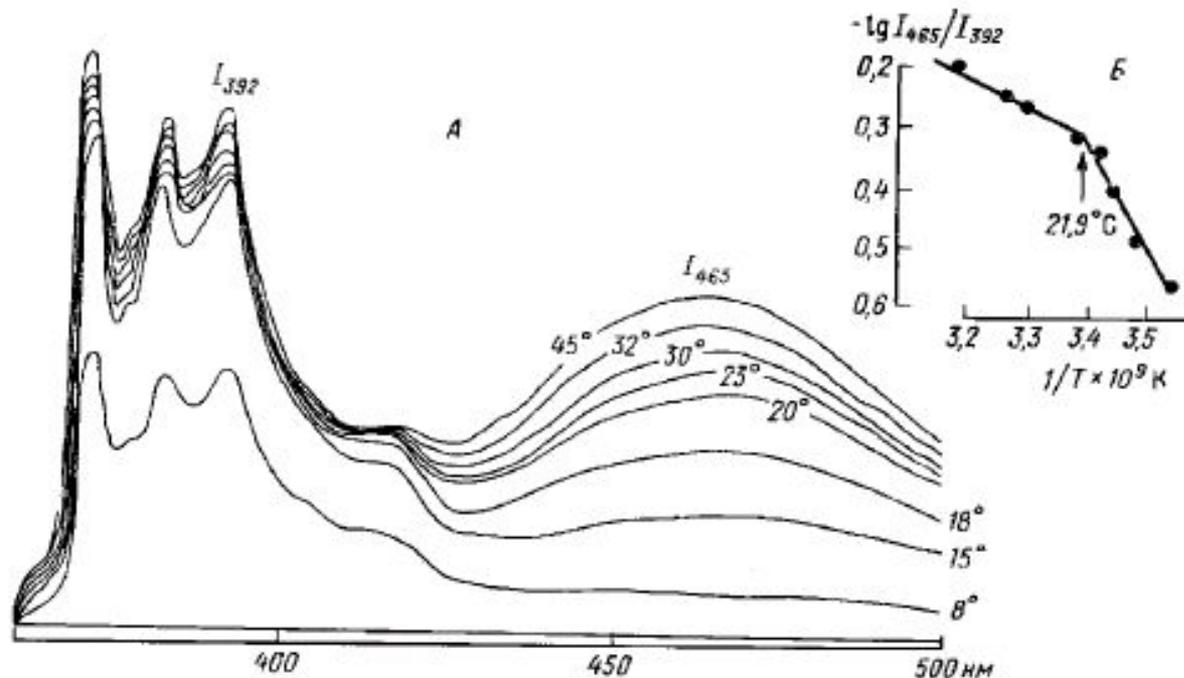
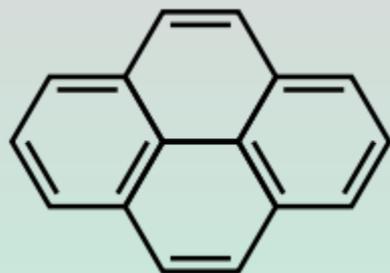
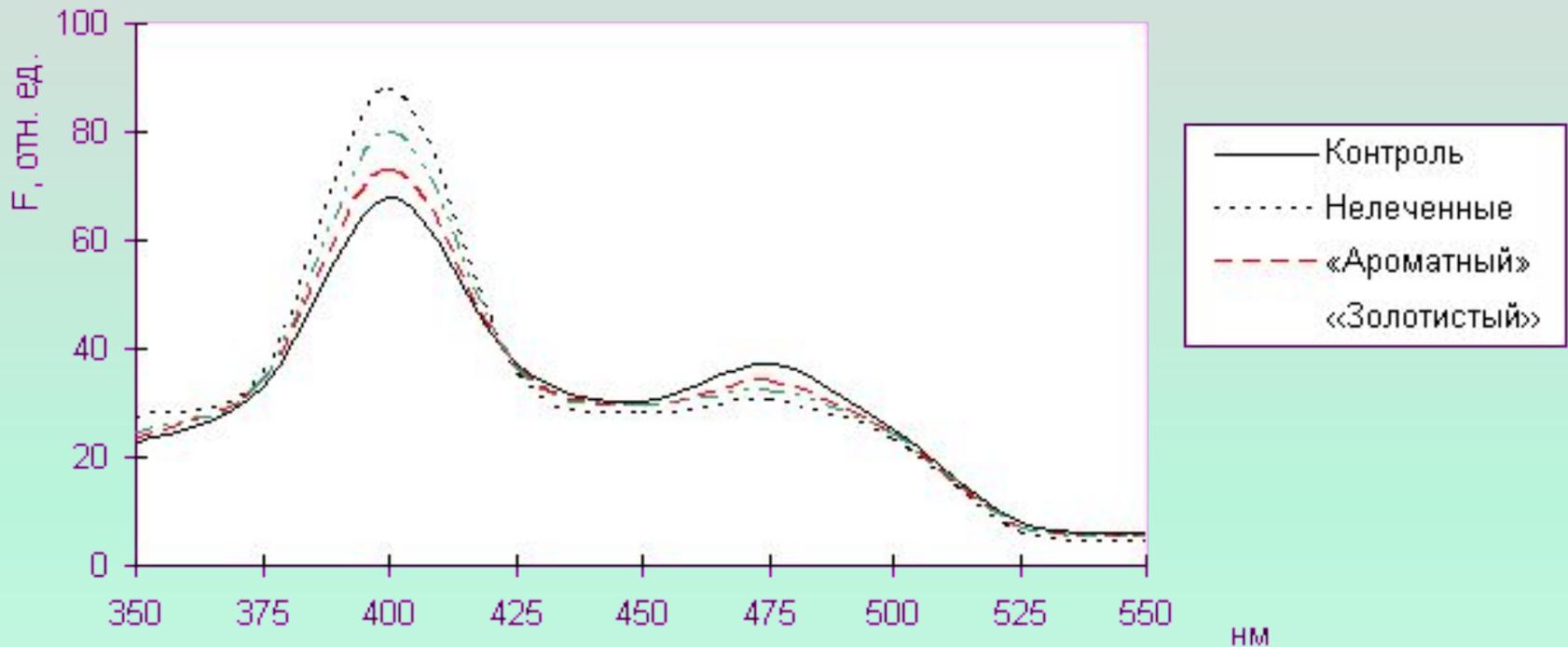


Рис. 39. Спектры флуоресценции пирена в мембранах микросом почек при разных температурах с указанием максимума флуоресценции мономерной (I_{392}) и эксимерной (I_{465}) форм (А) и график Аррениуса для эксимеризации пирена в исследуемом образце (Б)

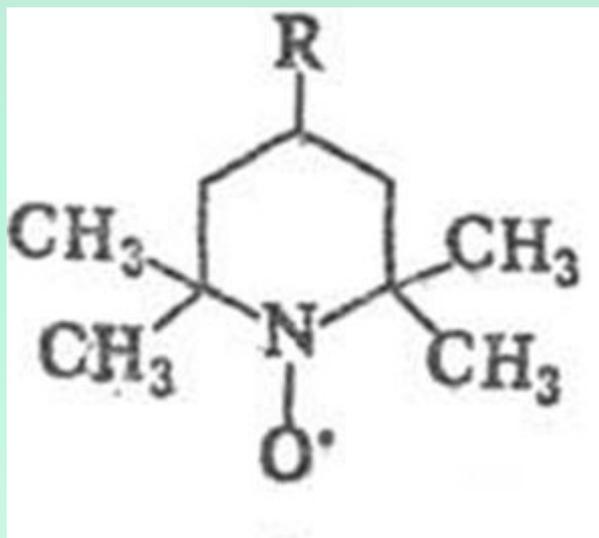
Область перегиба на графике соответствует температуре фазового перехода.



Влияние препаратов на спектры флуоресценции пирена в мембранах эритроцитов

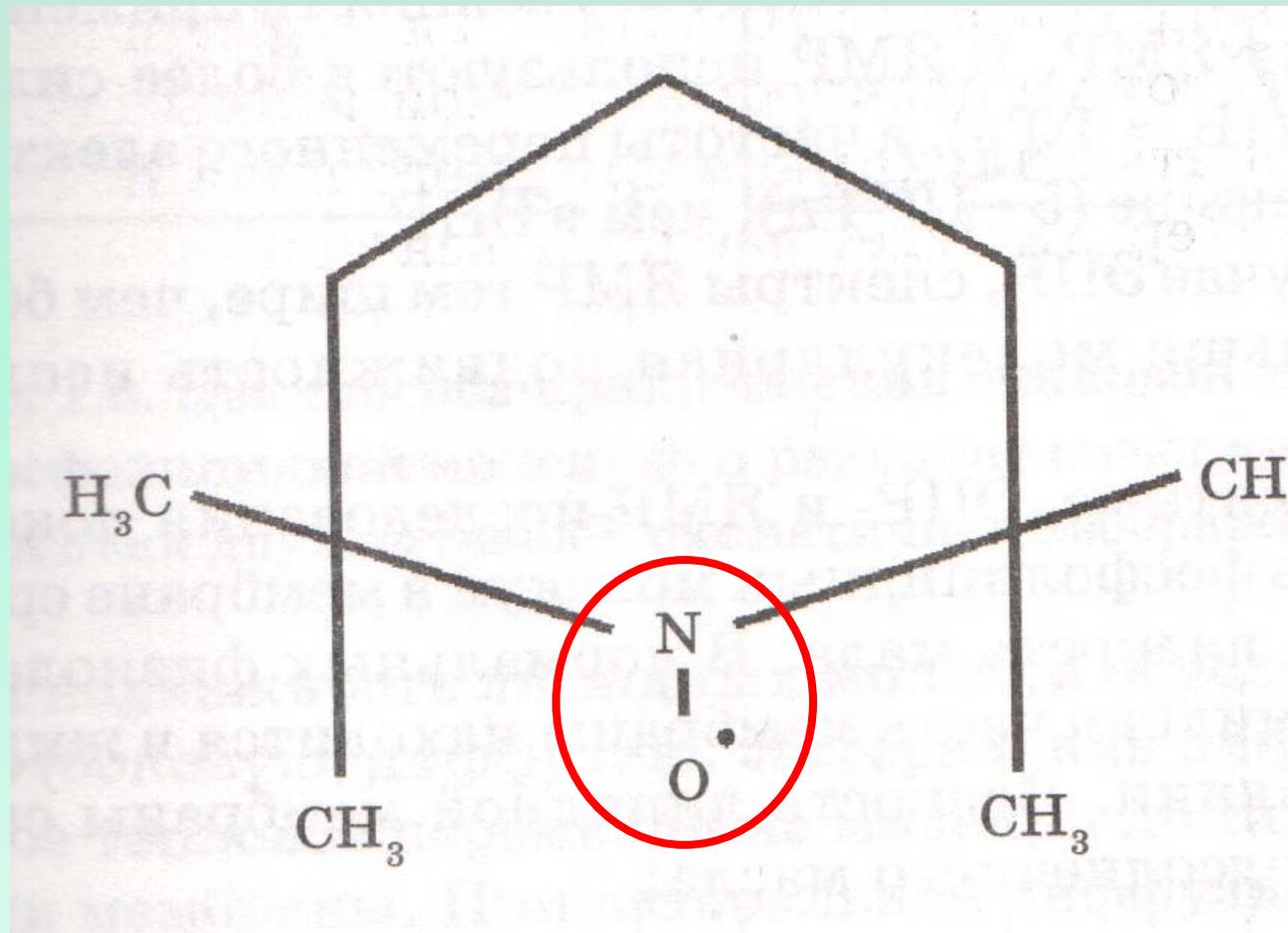
СПИНОВЫЕ ЗОНДЫ

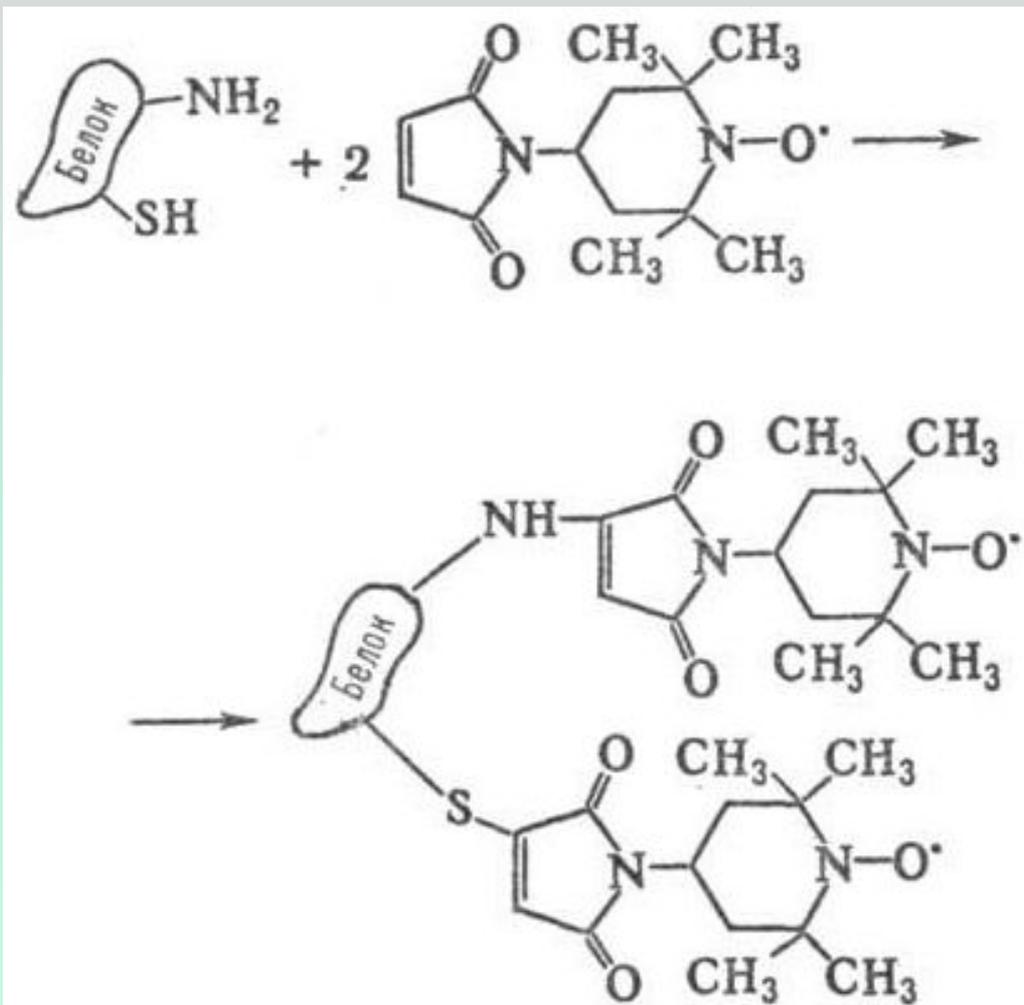
НИТРОКСИЛЬНЫЕ РАДИКАЛЫ



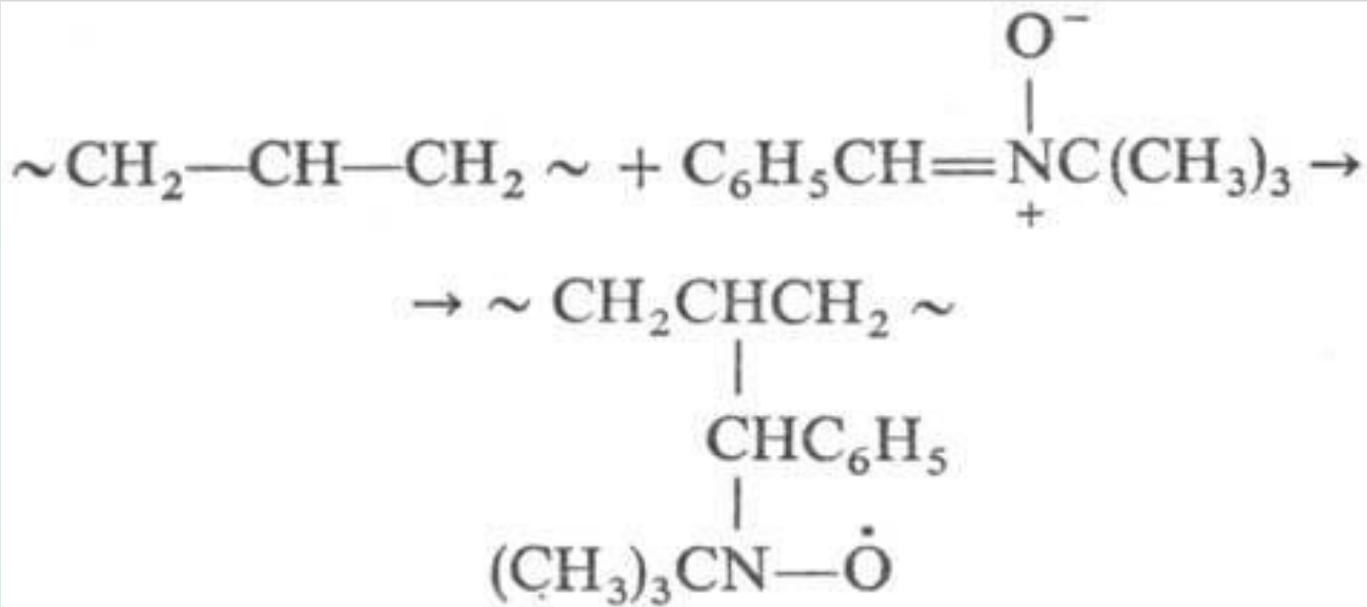
- устойчивы в широком интервале температур (до 100-200 °С)
- способны вступать в хим. реакции без потери парамагнитных свойств
- хорошо растворимы в водных и органических средах.

СПИНОВЫЙ ЗОНД ТЕМПО



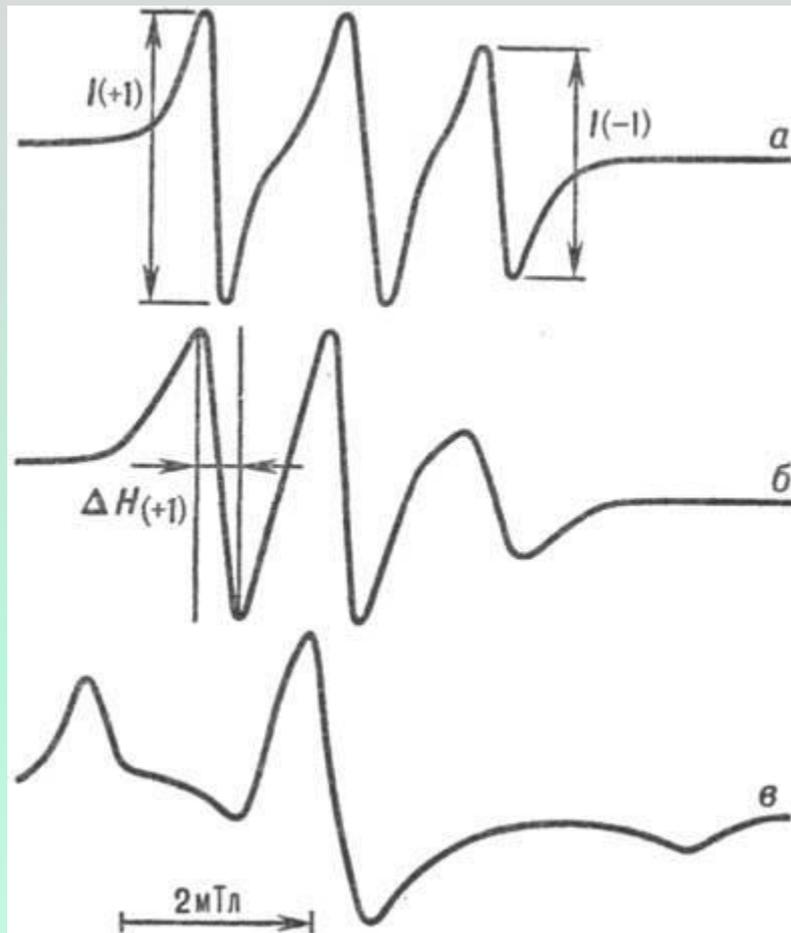


Химическая "прививка" метки к макромолекулам с реакционно способными группами



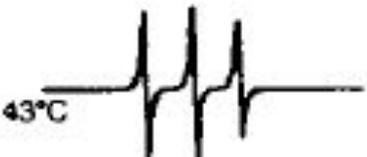
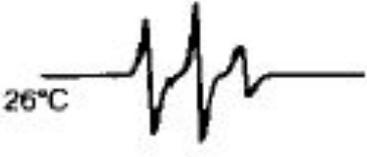
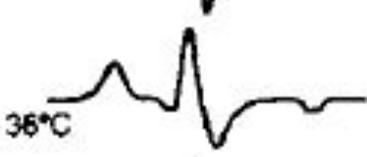
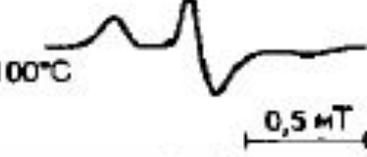
Реакции макромолекул с бирадикалами и спиновыми ловушками.

Спиновая ловушка - соединение, образующее стабильные радикалы при взаимодействии с активными радикалами.



Спектры ЭПР

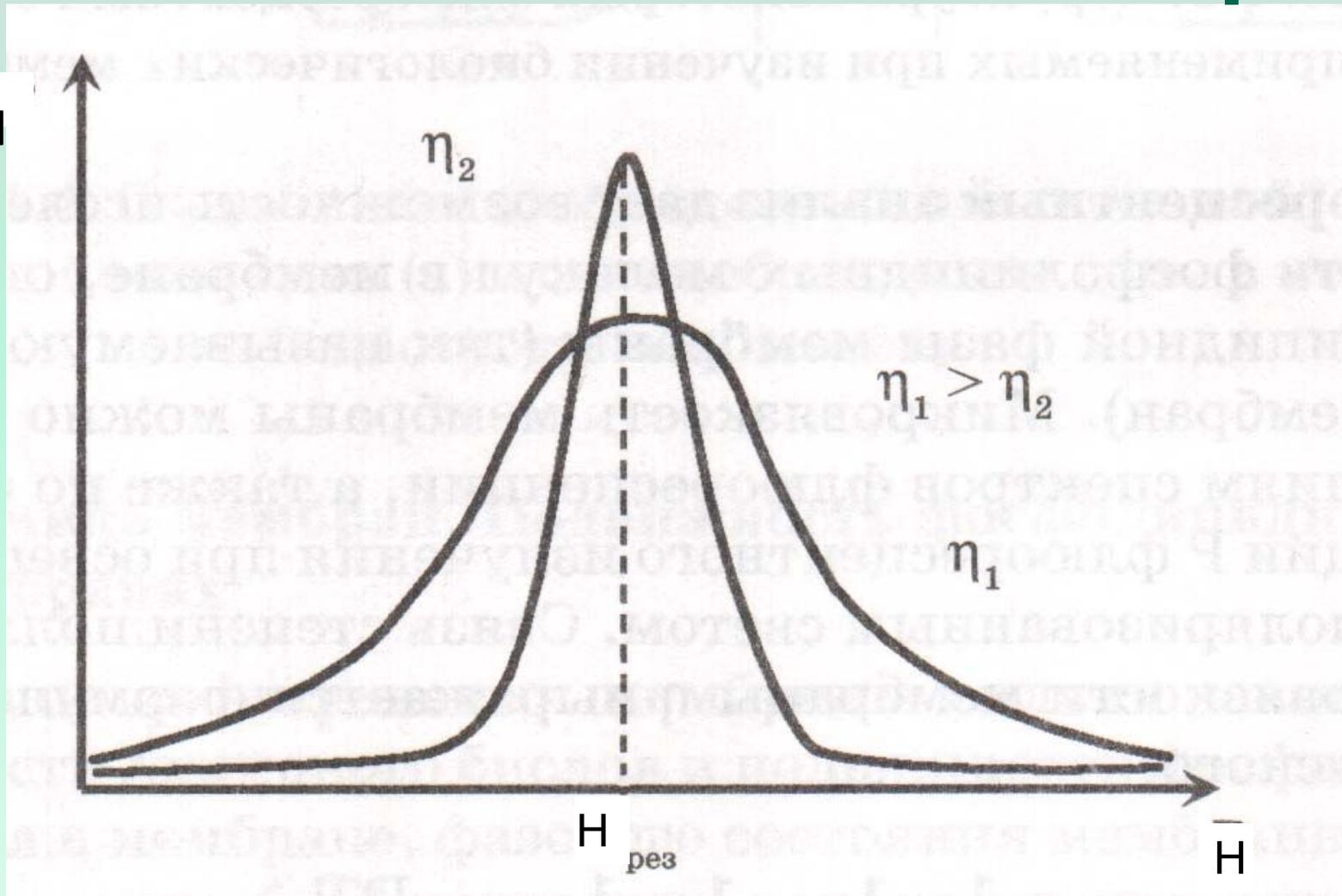
Спектры ЭПР
нитроксильных
радикалов в вязких
средах при временах
корреляции
вращения
 $5 \cdot 10^{-10}$ с (а)
 $2 \cdot 10^{-9}$ с (б)
 $1 \cdot 10^{-7}$ с (в).

Вид сигнала	Характер движения	Характерные времена движения, нс
 43°C	<i>Свободное движение</i>	0,1
 26°C	<i>Слабая иммобилизация</i>	0,6
 9°C	<i>Средняя иммобилизация</i>	2,5
 0°C		5,0
 -36°C	<i>Сильная иммобилизация</i>	~300
 -100°C	<i>Стекло или порошок</i>	>300

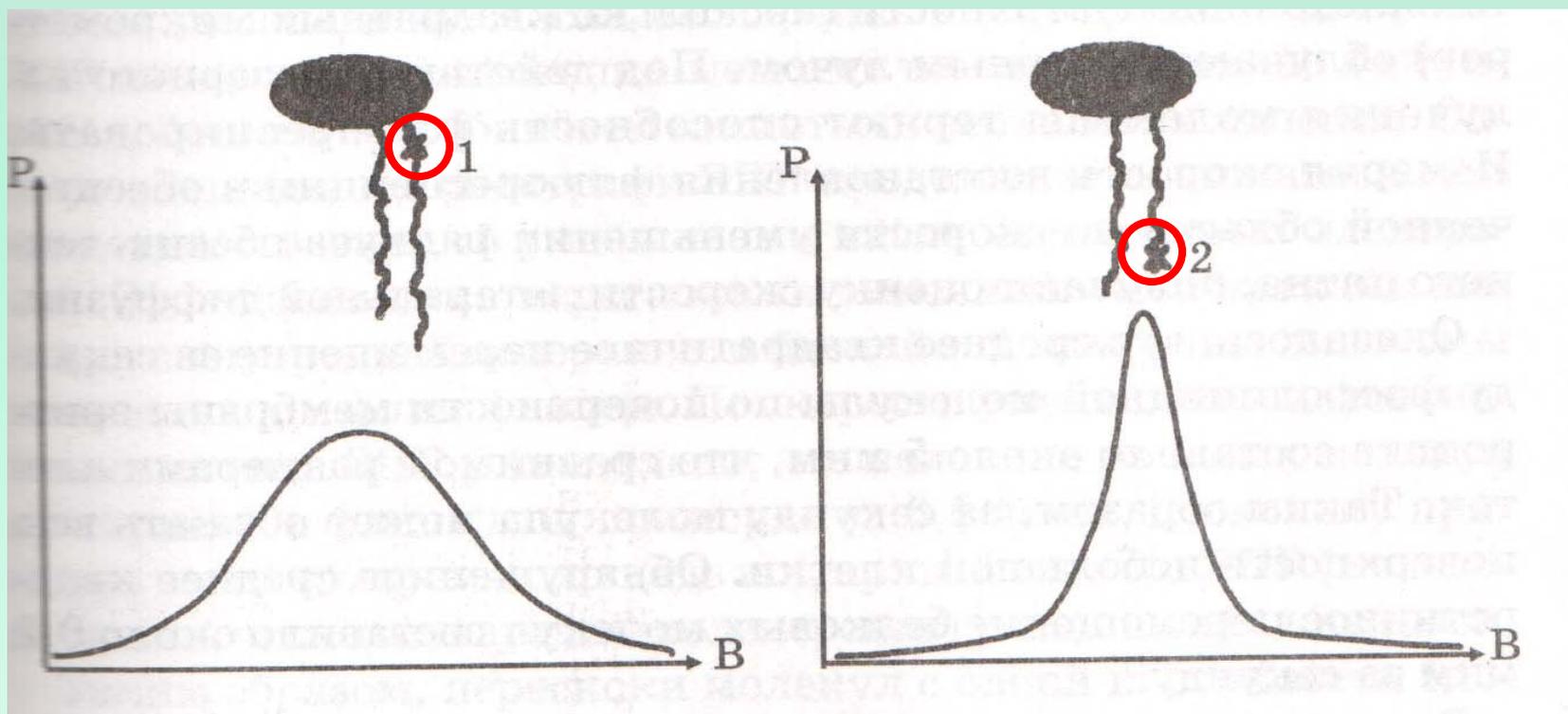
0,5 мТ

Рис. 34. Зависимость ЭПР-спектров нитроксидной спиновой метки от скорости молекулярного вращения

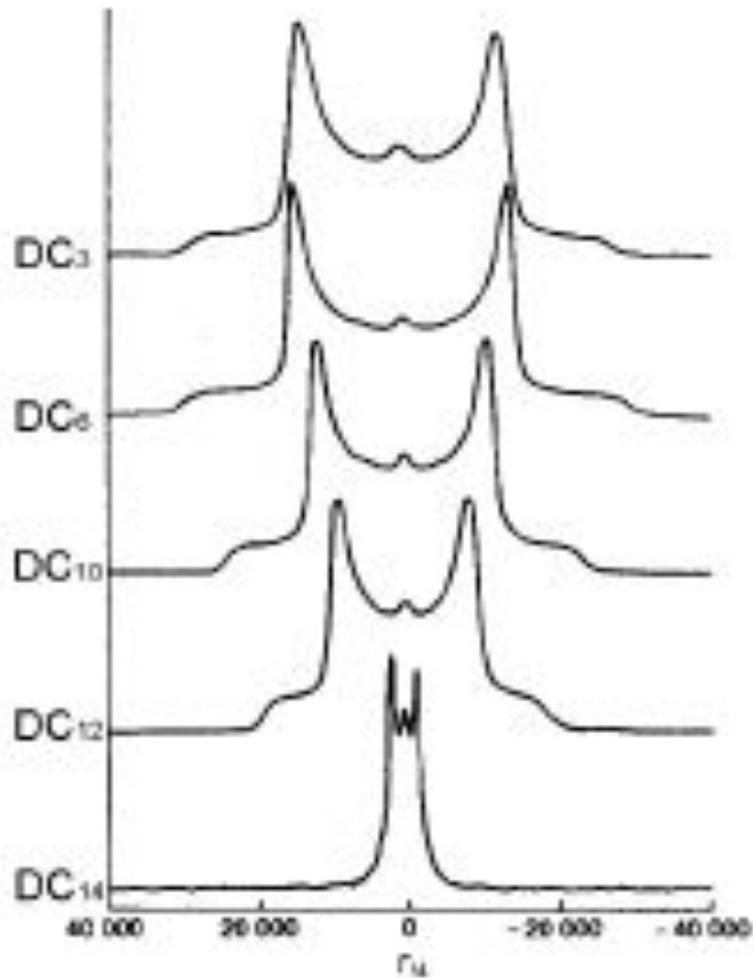
ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА ЭПР ПРИ УМЕНЬШЕНИИ МИКРОВЯЗКОСТИ η



ДВА СПОСОБА ПРИКРЕПЛЕНИЯ СПИНОВОЙ МЕТКИ К МОЛЕКУЛЕ ФОСФОЛИПИДА И РАЗЛИЧИЕ СПЕКТРОВ ЭПР



ЯМР

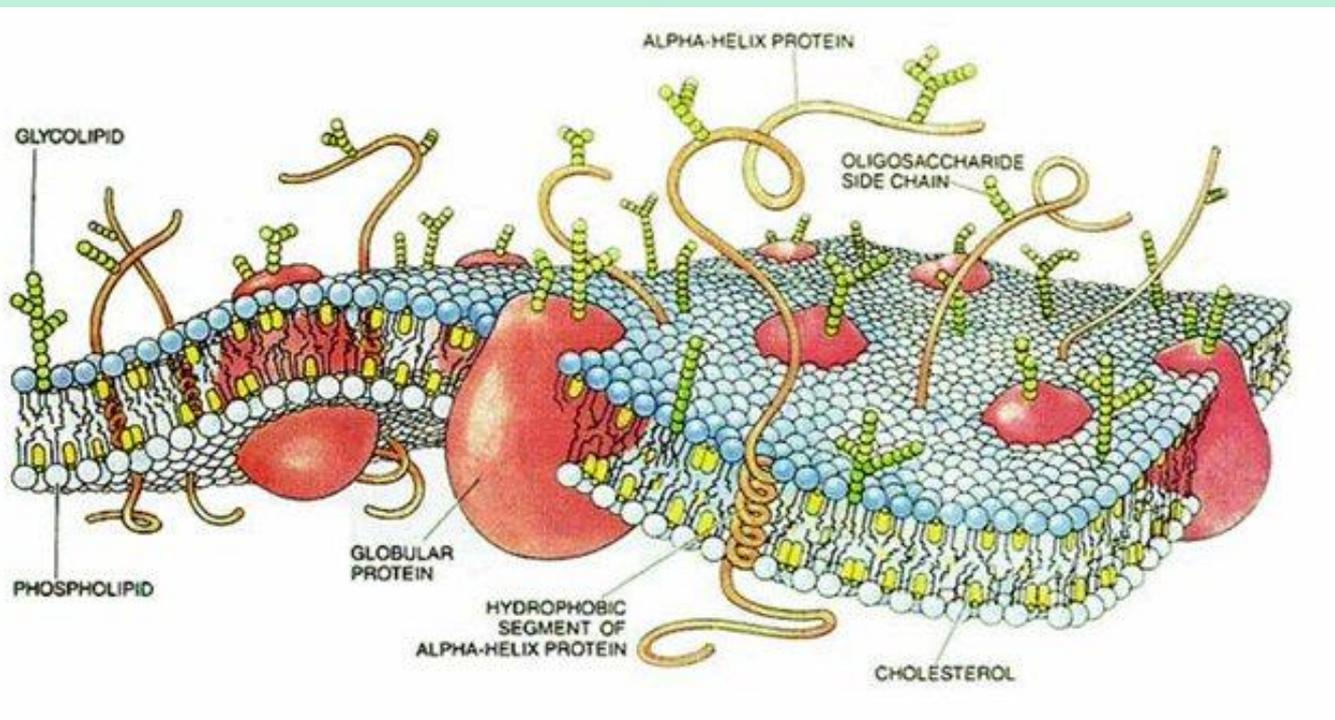


Спектры ^2H -ЯМР
димиристоилфосфатидилхолина,
дейтерированного по разным
положениям ацильной цепи

T_1	Структурная формула фосфолипида	
3,3	CH ₃	CH ₃
1,8	CH ₂	CH ₂
1,1	CH ₂	CH ₂
0,6	(CH ₂) ₁₀	(CH ₂) ₁₀
0,2	CH ₂	CH ₂
0,1	CH ₂	CH ₂
	C=O	C=O
	O	O
0,1	CH ₂	CH
		CH ₂
		O
		-O-P=O
		O
0,3		CH ₂
0,3		CH ₂
0,7		N(CH ₃) ₃ ⁺

Величины подвижности T_1 для различных атомов углерода в молекуле фосфатидилхолина в составе мембраны при температуре выше критической (рассчитаны по данным ЯМР-спектроскопии)

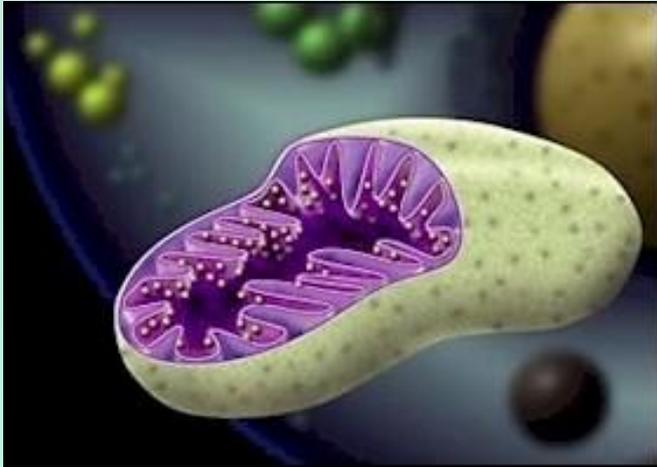
БЕЛКИ МЕМБРАН



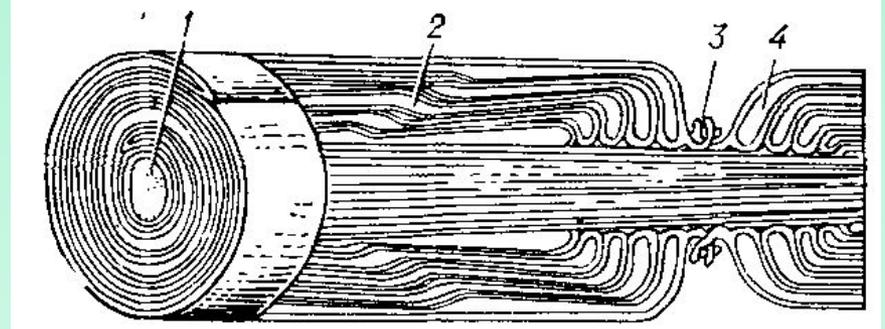
1. СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ В МЕМБРАНЕ
2. КЛАССИФИКАЦИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ
3. ПОДВИЖНОСТЬ БЕЛКОВ В МЕМБРАНЕ
4. БЕЛОК – ЛИПИДНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
5. ФУНКЦИИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ В МЕМБРАНАХ

МЕМБРАНЫ СОДЕРЖАТ ОТ 20 ДО 80% БЕЛКА ПО ВЕСУ. В РАЗНЫХ МЕМБРАНАХ СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА РАЗЛИЧНО.



В МЕМБРАНАХ МИТОХОНДРИЙ БЕЛКА ДО 75%



В МИЕЛИНОВОЙ ОБОЛОЧКЕ ОКОЛО 25%

КЛАССИФИКАЦИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

**Топологическая
классификация**



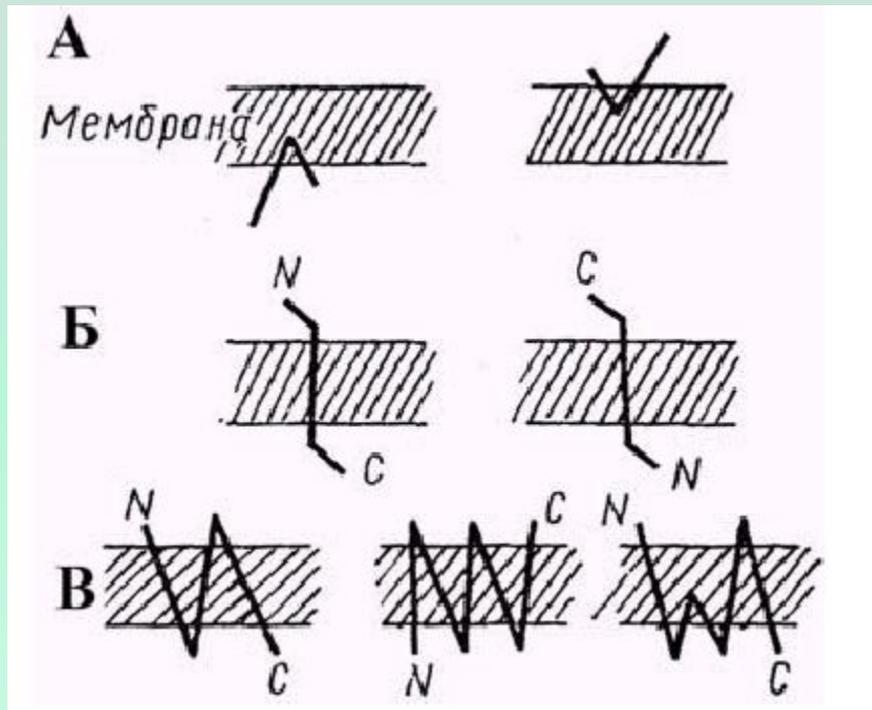
основана на локализации белка по отношению к липидному бислою

**Биохимическая
классификация**



основана на прочности взаимодействия белка с мембраной

ТОПОЛОГИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

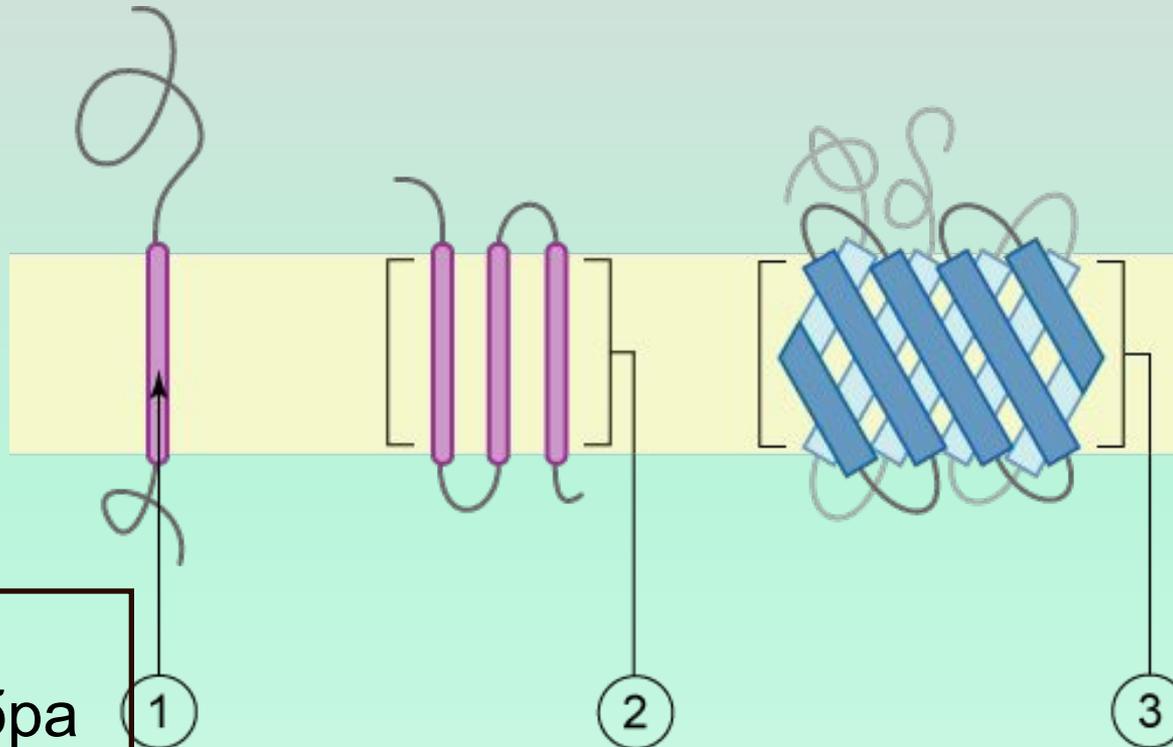


А- МОНОТОПИЧЕСКИЕ
БЕЛКИ

Б – БИТОПИЧЕСКИЕ

В - ПОЛИТОПИЧЕСКИЕ

Связывание белков с мембраной за счёт



1
единичной
трансмембра
нной альфа-
спирали

2
множественных
трансмембранных
альфа-спиралей

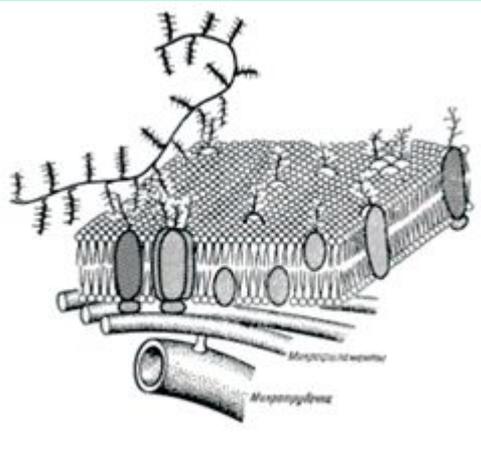
3
бета-складчатой
структуры

БИОХИМИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ

БЕЛКИ МЕМБРАН

ИНТЕГРАЛЬНЫЕ

ГЛУБОКО
ПРОНИКАЮТ В
БИСЛОЙ



ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ

ИМЕЮТ МЕНЬШУЮ
ГЛУБИНУ
ПРОНИКНОВЕНИЯ,
БОЛЕЕ СЛАБО
СВЯЗАНЫ С
БИСЛОЕМ, ЧАСТО
ГЛИКОЗИЛИРОВАНЫ

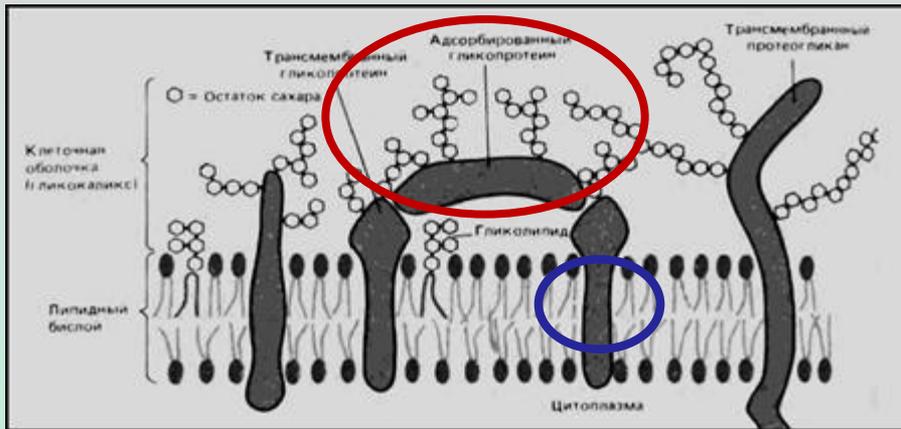
АМФИПАТИЧЕСКИЕ

МЕНЯЮТ СВОЙ СТАТУС,
ПРИКРЕПЛЯЯСЬ К МЕМБРАНЕ
НА ОПРЕДЕЛЕННОЕ ВРЕМЯ
СПЕЦИФИЧЕСКИЕ СИГНАЛЫ
СТИМУЛИРУЮТ ИХ
АССОЦИАЦИЮ С
МЕМБРАНОЙ, НАПРИМЕР,
ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

ДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ НА **ИНТЕГРАЛЬНЫЕ** И **ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ** ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ

- СТРУКТУРОЙ
- КОЛИЧЕСТВОМ И РАСПОЛОЖЕНИЕ ГИДРОФОБНЫХ ОСТАТКОВ



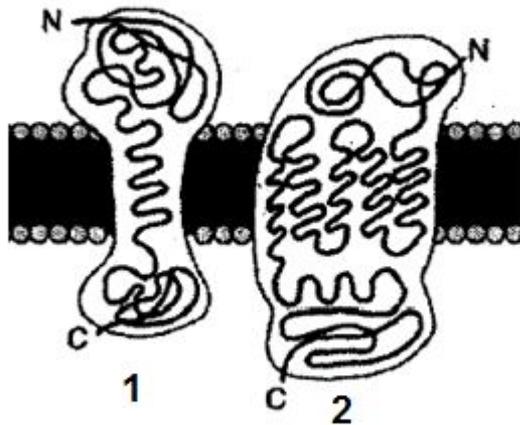


МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ СОСТОЯТ ИЗ ДВУХ ЧАСТЕЙ:

- УЧАСТКИ, **БОГАТЫЕ ПОЛЯРНЫМИ АМИНОКИСЛОТНЫМИ ОСТАТКАМИ**, ОБРАЩЕННЫЕ ВО ВНЕКЛЕТОЧНУЮ СРЕДУ ЧАСТО ГЛИКОЗИЛИРОВАНЫ, ЧТО УВЕЛИЧИВАЕТ ИХ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ПРОТЕОЛИЗУ
- УЧАСТКИ, **ОБОГАЩЕННЫЕ НЕПОЛЯРНЫМИ ОСТАТКАМИ АМИНОКИСЛОТ**

ИНТЕГРАЛЬНЫЕ БЕЛКИ

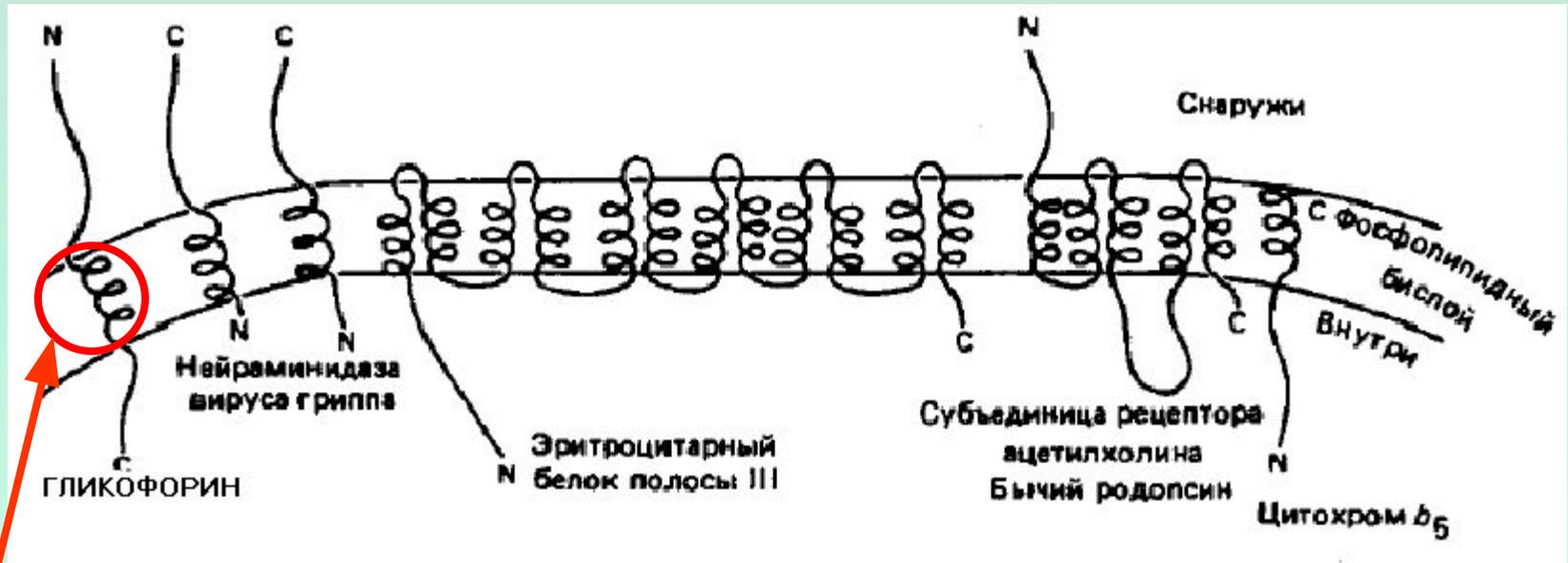
Наружная поверхность мембраны



1- ГЛИКОФОРИН,
2 – РЕЦЕПТОР АДРЕНАЛИНА

Внутренняя поверхность мембраны

ПРИМЕРЫ ИНТЕГРАЛЬНЫХ БЕЛКОВ, СОДЕРЖАЩИХ ОТ 1 ДО 12 ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ



С БИСЛОЕМ КОНТАКТИРУЮТ НЕПОЛЯРНЫЕ
УЧАСТКИ БЕЛКОВ

ОСОБЕННОСТИ ИНТЕГРАЛЬНЫХ БЕЛКОВ

1. КОЛИЧЕСТВО ГИДРОФИЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ ПРИМЕРНО ТАКОЕ ЖЕ, КАК И В ОБЫЧНЫХ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКАХ, НО **В ВОДЕ ОНИ РАСТВОРЯЮТСЯ ОЧЕНЬ ПЛОХО.**

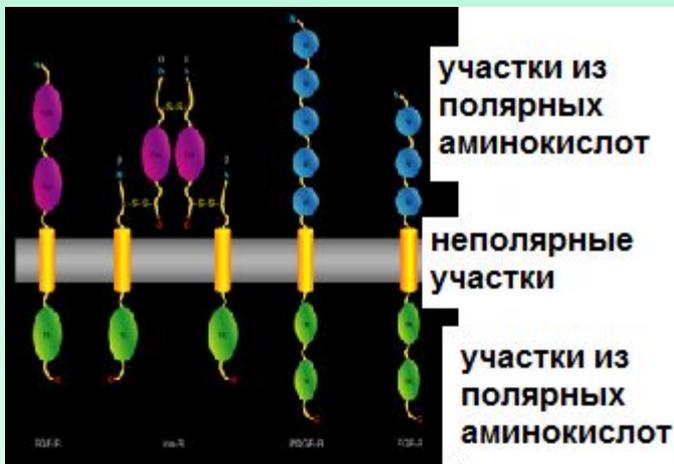
ПРИЧИНА:ГИДРОФОБНЫЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ОСТАТКИ СКОНЦЕНТРИРОВАНЫ В ГИДРОФОБНЫЕ ДОМЕНЫ, А НЕ РАССЕЯНЫ ВДОЛЬ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ.

НЕКОТОРЫЕ БЕЛКИ УВЕЛИЧИВАЮТ ГИДРОФОБНОСТЬ, КОВАЛЕНТНО СОЕДИНЯЯСЬ С ЛИПИДАМИ МЕМБРАН

2. В СТРУКТУРЕ ИНТЕГРАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ЧЕТКО ВЫДЕЛЯЮТСЯ УЧАСТКИ, ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА ИХ **БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ**.

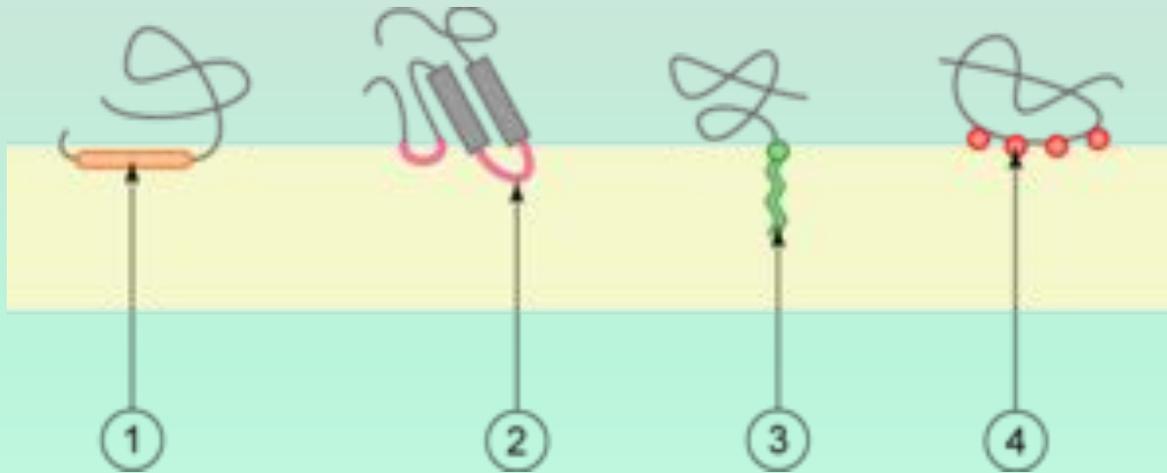
ЭТИ УЧАСТКИ СОСТОЯТ ИЗ ПОЛЯРНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ.

ДОМЕНЫ ИЗ **НЕПОЛЯРНЫХ ОСТАТКОВ** ОБЕСПЕЧИВАЮТ СТРУКТУРНУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ МОЛЕКУЛЫ, ЗАКРЕПЛЯЯ ЕЕ В ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ



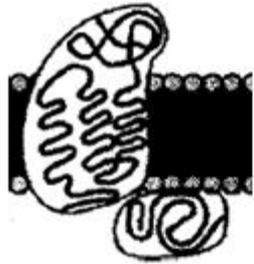
ПОВЕРХНОСТНЫЕ БЕЛКИ

Связывание поверхностных белков с мембраной за счёт



1. амфипатической альфа-спирали, параллельной плоскости мембраны
2. гидрофобной петли (ЦИТОХРОМ b_5)
3. ковалентно соединённого жирнокислотного остатка
4. электростатического взаимодействия (прямого или кальций-опосредованного) (ПРОТЕИНАЗА С).

**Наружная поверхность
мембраны**



5

**Внутренняя поверх:
ность мембраны**

5 – БЕЛКИ, СВЯЗАННЫЕ С ИНТЕГРАЛЬНЫМИ БЕЛКАМИ,

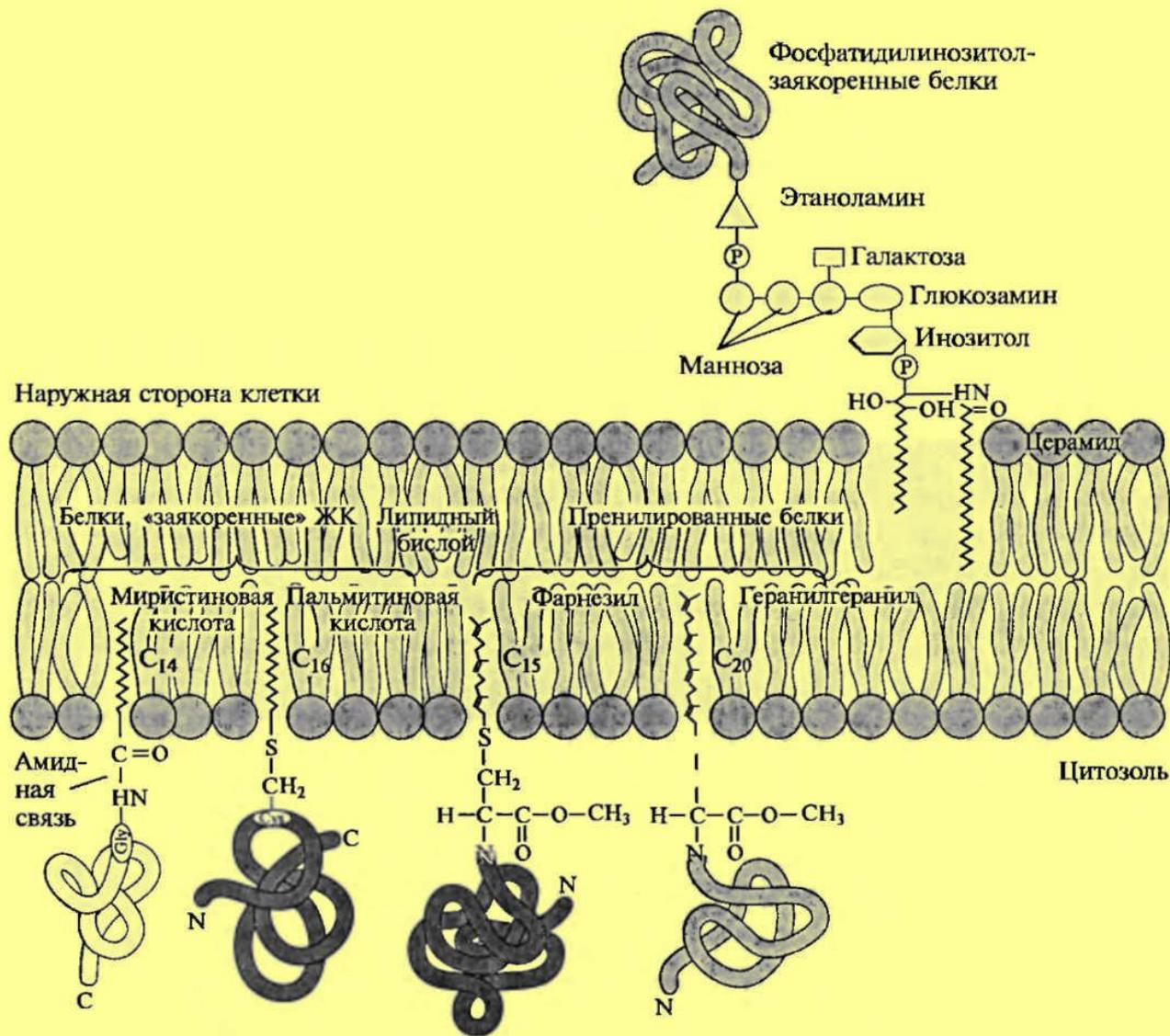
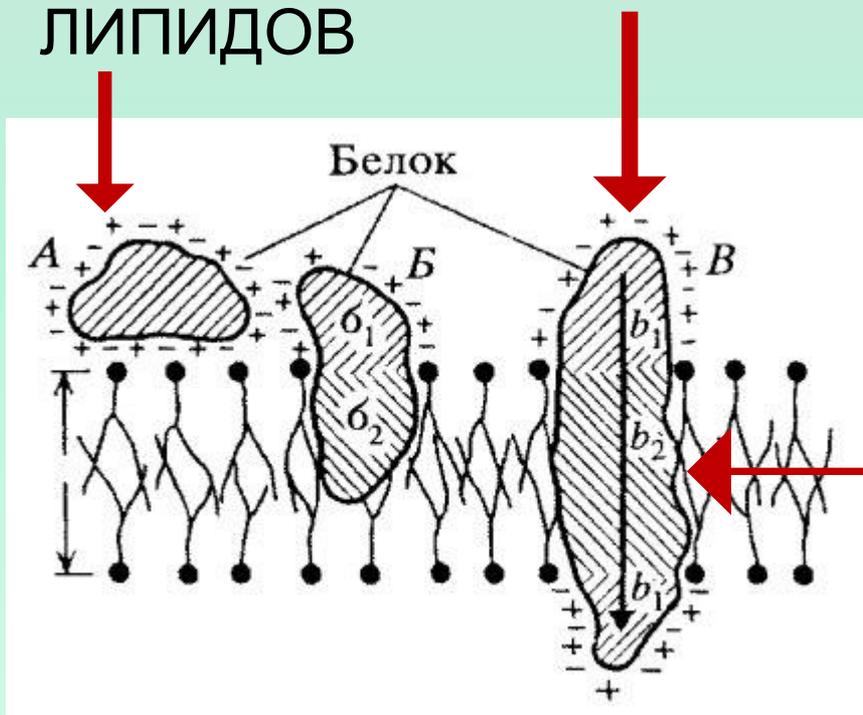


Рис. 1.4. Варианты фиксации «заякоренных» в мембранах белков

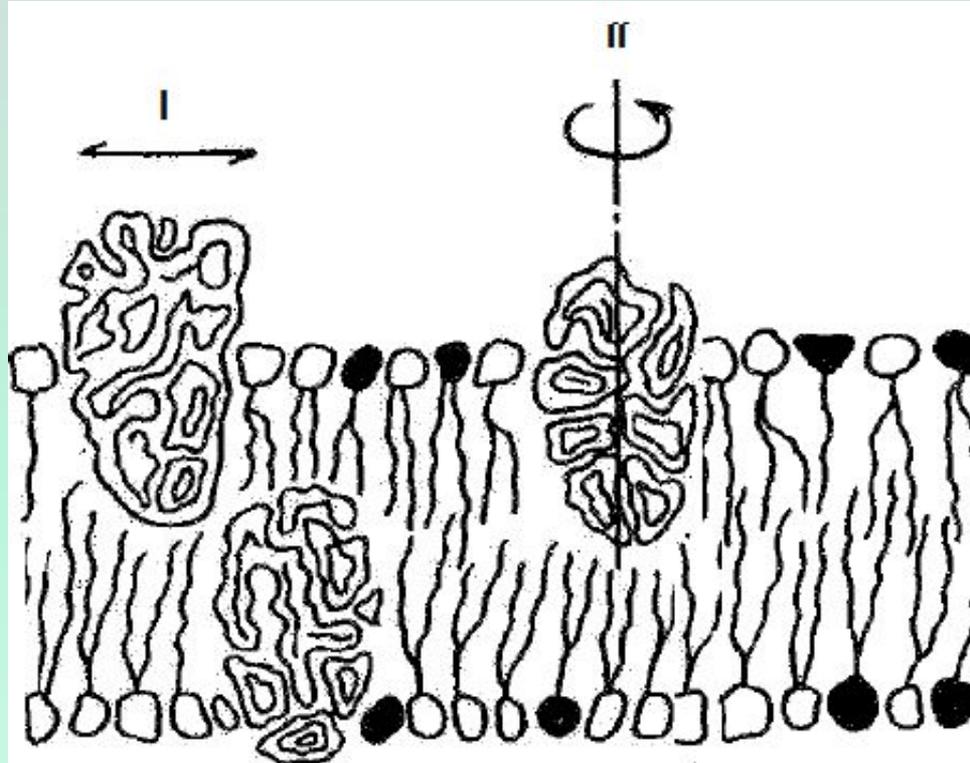
СИЛЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ С ЛИПИДНЫМ БИСЛОЕМ

ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИЕ – НА УРОВНЕ ГОЛОВОК
ЛИПИДОВ



**ГИДРОФОБНЫЕ И
ДИСПЕРСИОННЫЕ** – В
ТОЛЩЕ БИСЛОЯ

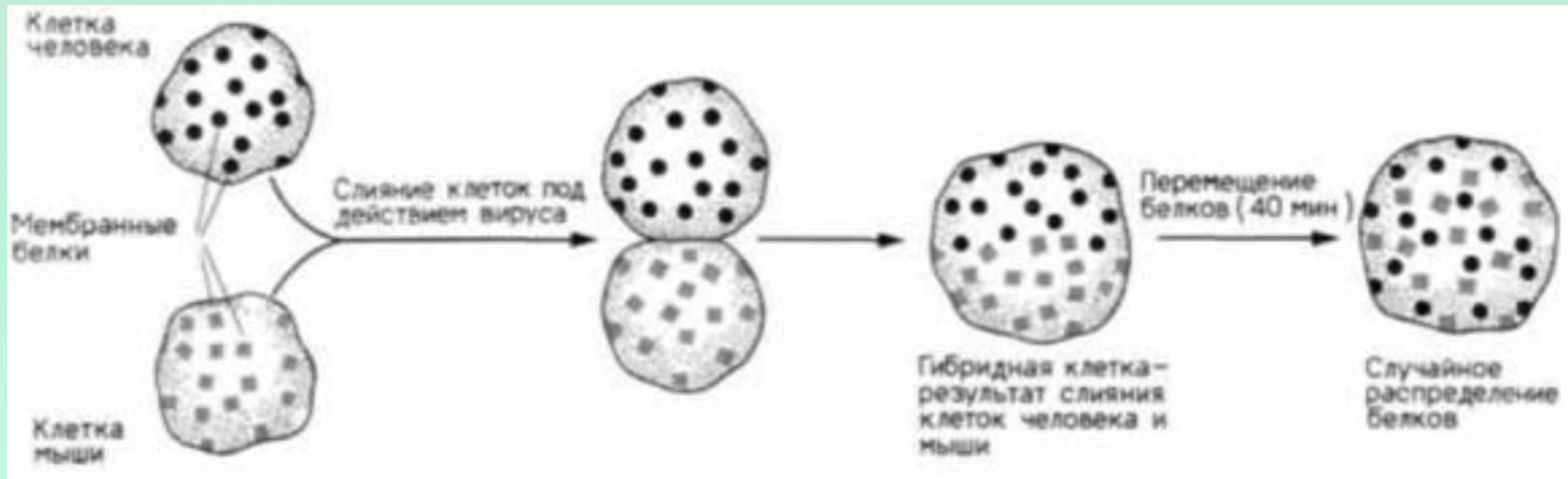
ПОДВИЖНОСТЬ БЕЛКОВ В БИСЛОЕ



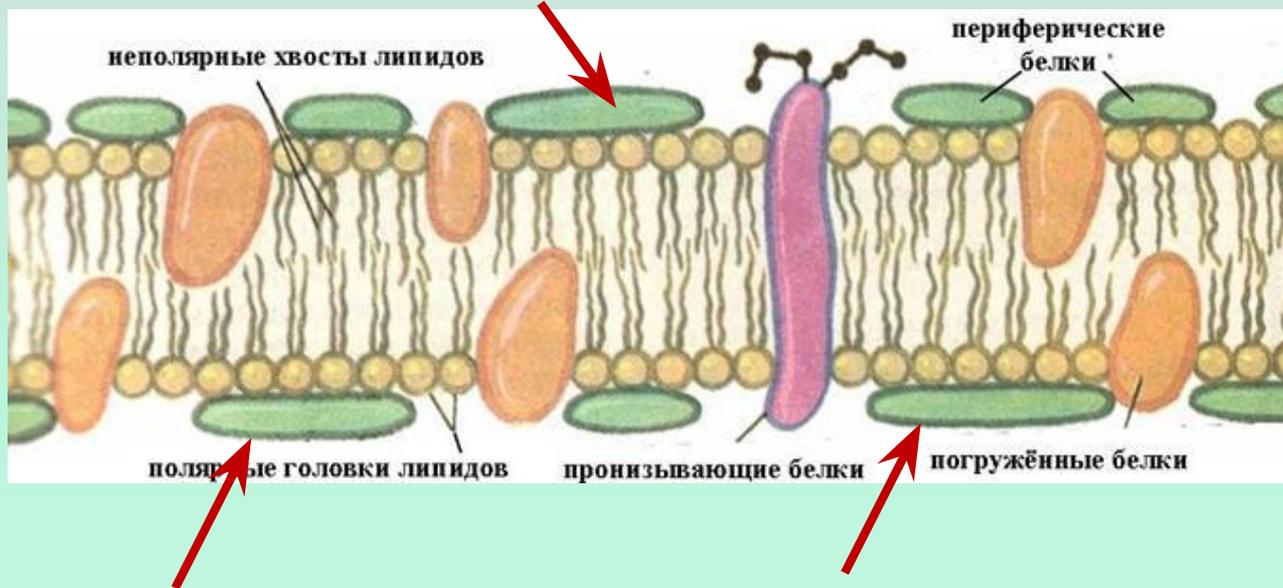
I - ЛАТЕРАЛЬНАЯ ПОДВИЖНОСТЬ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ

II – ВРАЩАТЕЛЬНАЯ ПОДВИЖНОСТЬ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ

Латеральная подвижность мембранных белков, демонстрируемая в эксперименте



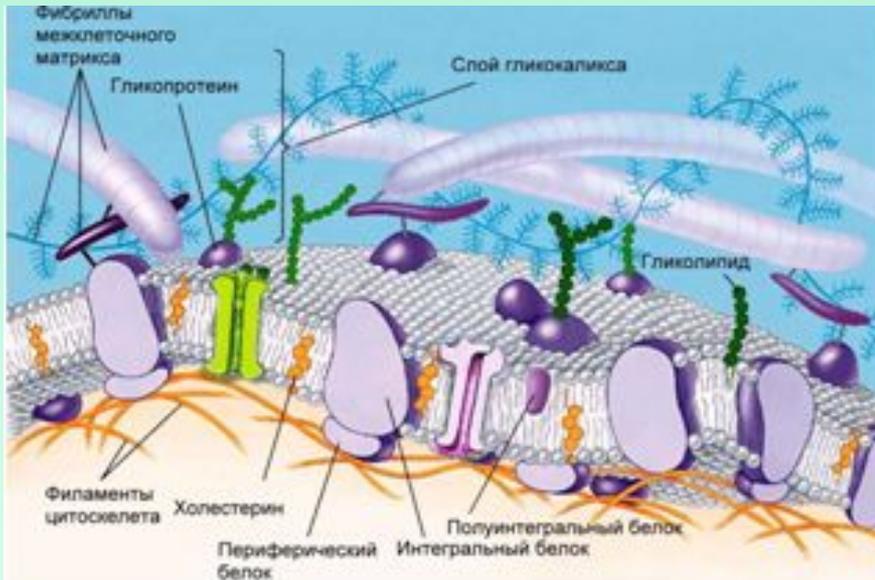
ПОДВИЖНОСТЬ БЕЛКОВ В БИСЛОЕ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ЛИПИДЫ МЕМБРАН



БОЛЕЕ ПОДВИЖНЫМИ ОКАЗЫВАЮТСЯ
ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ БЕЛКИ. ОНИ ОКАЗЫВАЮТ
МЕНЬШЕЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЕ ЦЕПИ
ЛИПИДОВ

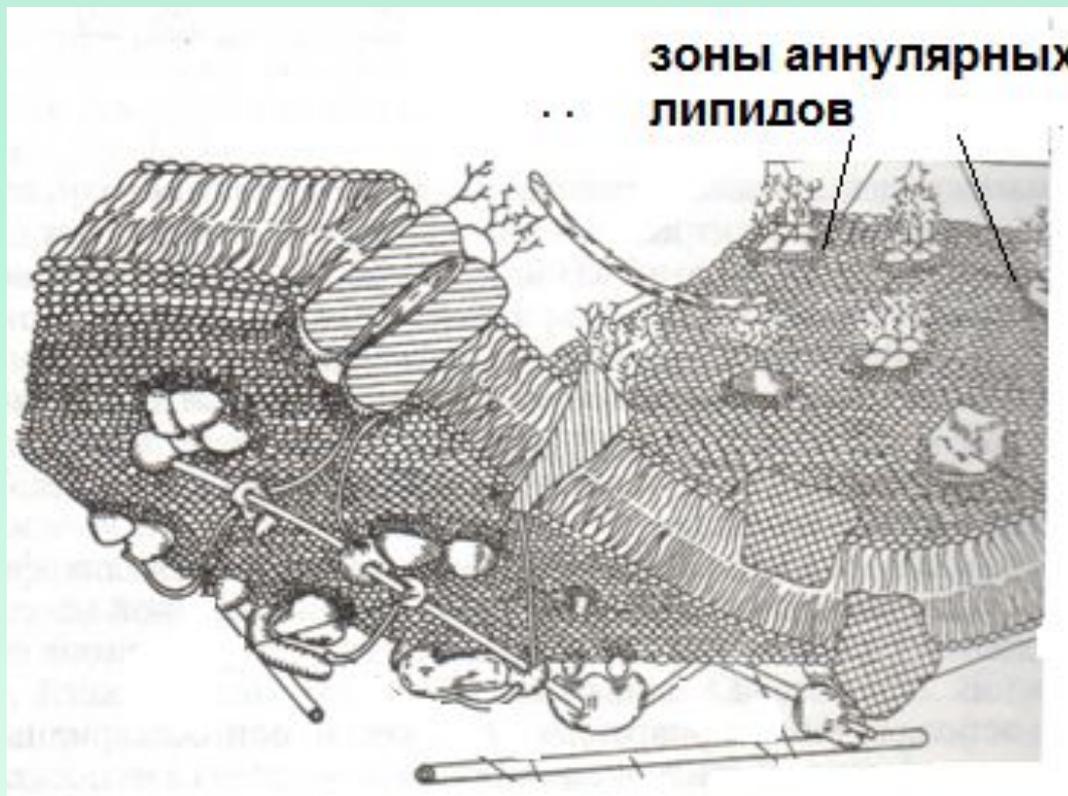
ЛАТЕРАЛЬНАЯ ДИФфуЗИЯ ИНТЕГРАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ОГРАНИЧЕНА ИХ РАЗМЕРАМИ, ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ С ДРУГИМИ БЕЛКАМИ И ЭЛЕМЕНТАМИ ЦИТОСКЕЛЕТА

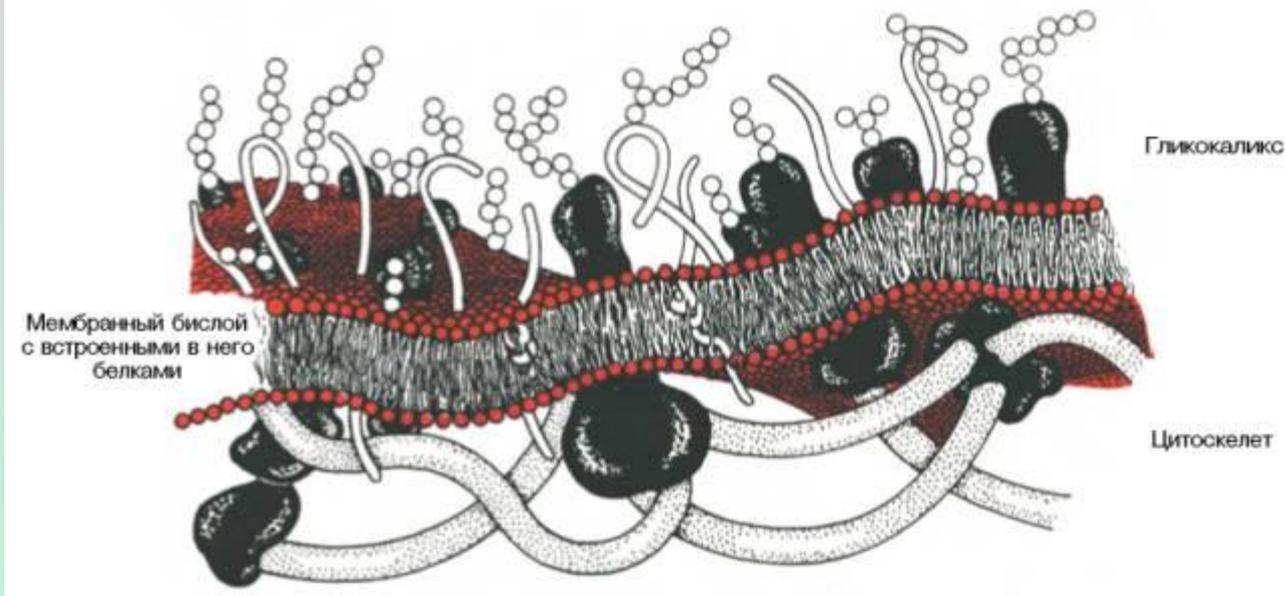
□ Времена **вращательной релаксации** для интегральных белков лежат в диапазоне от **20 до 500 мкс**



□ Коэффициент латеральной диффузии (вдоль бислоя) варьирует от $7 \cdot 10^{-9}$ до $10^{-12} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$.

ИНТЕГРАЛЬНЫЕ БЕЛКИ СИЛЬНО ОГРАНИЧИВАЮТ ПОДВИЖНОСТЬ **АННУЛЯРНЫХ ЛИПИДОВ**. ПО СВОЕЙ ПОДВИЖНОСТИ ОНИ ОТЛИЧАЮТСЯ ОТ ОБЩИХ ЛИПИДОВ: АННУЛЯРНЫЕ ЛИПИДЫ ОКАЗЫВАЮТСЯ БОЛЕЕ УПОРЯДОЧЕННЫМИ



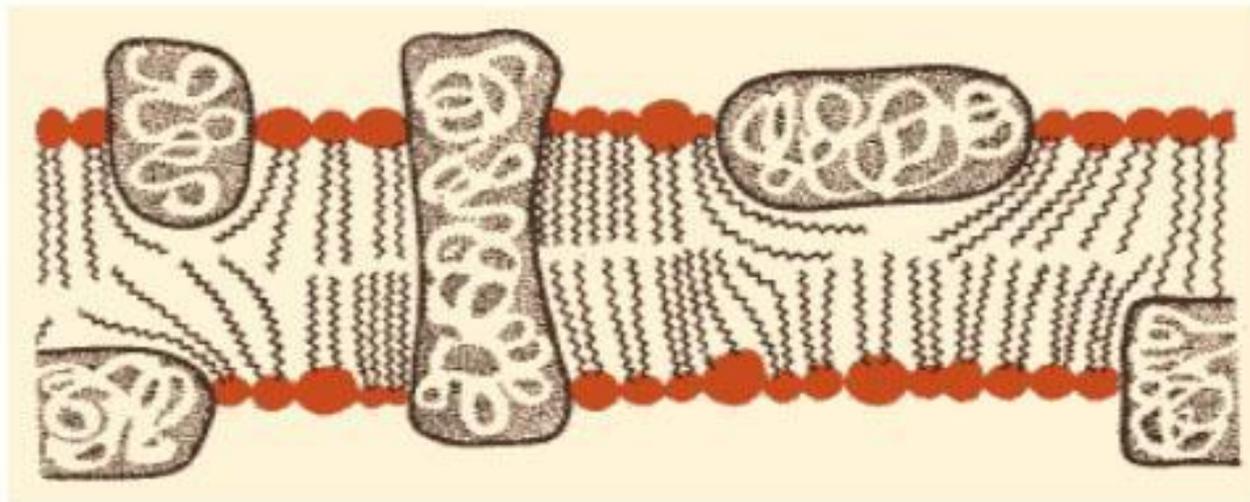


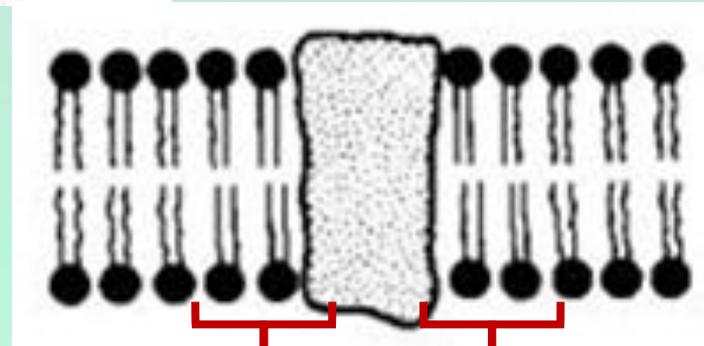
Фазовый переход приводит к увеличению подвижности ацильных цепей в бислое, увеличению угла их наклона и уменьшению плотности упаковки.

Латеральная подвижность мембранных белков после фазового перехода **возрастает**, увеличивается вероятность образования их ассоциатов

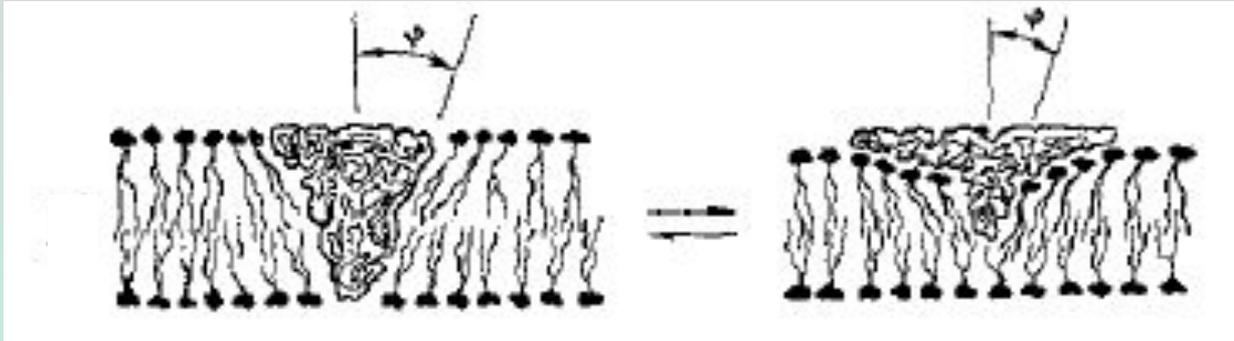
МОДИФИКАЦИЯ БИСЛОЯ БЕЛКАМИ

ВЫДЕЛЯЮТ 4 ОСНОВНЫХ ТИПА БЕЛОК-ЛИПИДНЫХ КОНТАКТОВ

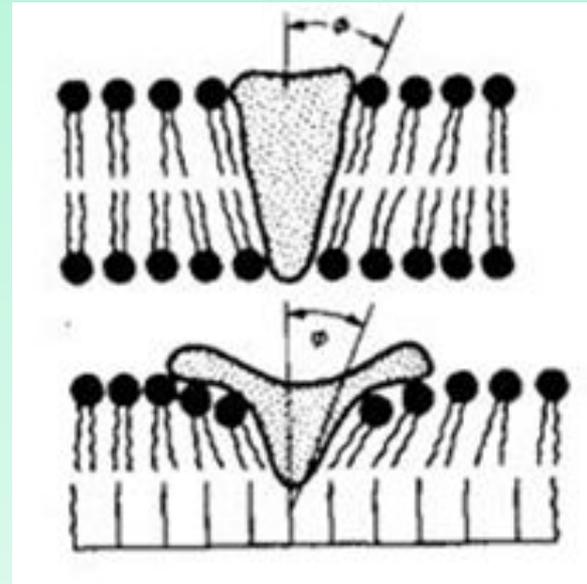


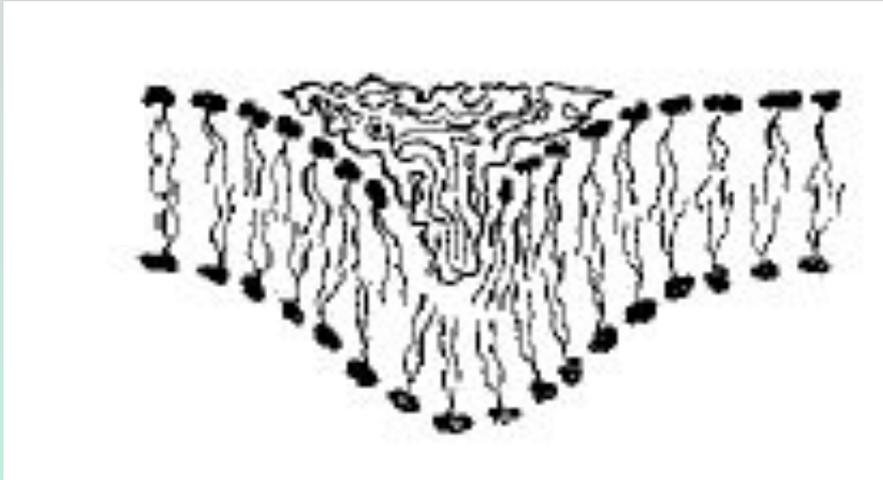


ЛОКАЛЬНОЕ ВОЗРАСТАНИЕ УПОРЯДОЧЕННОСТИ
БИСЛОЯ



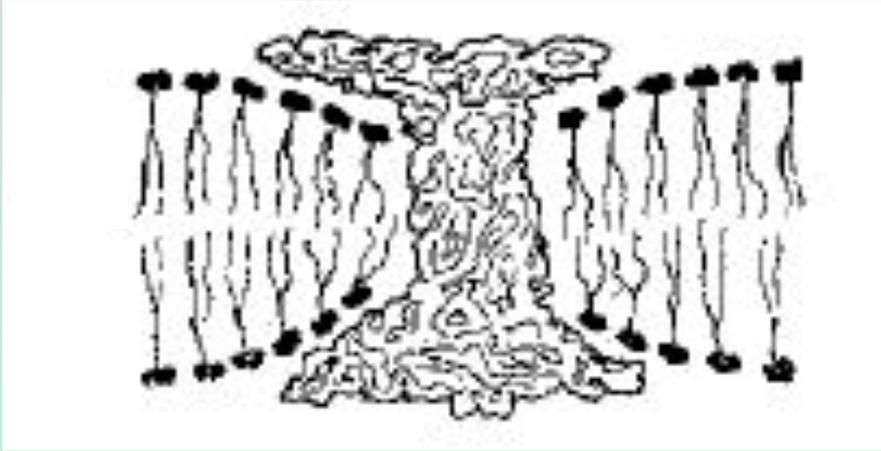
ЭЛАСТИЧЕСКАЯ ДЕФОРМАЦИЯ ОДНОЙ СТОРОНЫ БИСЛОЯ



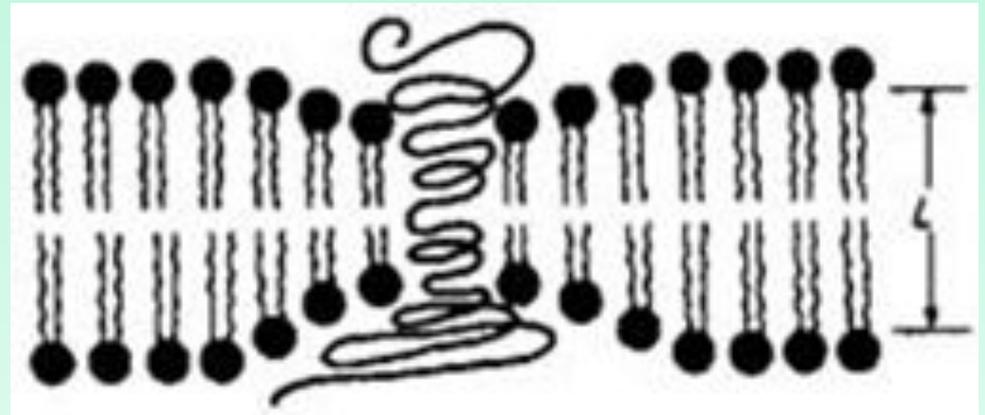


РЕЗКОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ГРАДИЕНТА КРИВИЗНЫ И
ДЕФОРМАЦИЯ БИСЛОЯ





ИЗМЕНЕНИЕ ГЕОМЕТРИИ БИСЛОЯ ВСЛЕДСТВИЕ
НЕСОВПАДЕНИЯ ДЛИНЫ ГИДРОФОБНЫХ УЧАСТКОВ
ЛИПИДНЫХ МОЛЕКУЛ И ВСТРАИВАЕМОГО БЕЛКА



НЕКОТОРЫЕ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ В МЕМБРАНЕ

