

УДК 576. 57. 016.7

ТРАНСПОРТ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ ЧЕРЕЗ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ

А. В. Фетисова, С. А. Иларионов

Пермский государственный национальный исследовательский университет
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15
E-mail: annavfe@rambler.ru

В статье рассмотрены различные пути транспорта ионов металлов через цитоплазматическую мембрану, показано их многообразие.

Ключевые слова: транспорт; металлы; цитоплазматическая мембрана

Введение

Многие металлы играют важную роль в метаболизме клетки. Они входят в состав простетических групп многих ферментов, участвуют в регуляции клеточного осмотического давления, стабилизируют структуру ферментов и участвуют в их активации. Некоторые соединения токсичных металлов синтезируются для применения в медицине. Кроме того, многие тяжелые металлы в настоящее время являются опасными загрязнителями окружающей среды, они способны проникать в многоклеточные организмы с водой и пищей, подчас подавляют развитие экологически необходимых микроорганизмов в составе природных объектов: микориза, зоопланктон и т. д.

Виды мембранного транспорта

Цитоплазматическая мембрана ограничивает внутриклеточное пространство, отделяя цитоплазму от периплазматического компартмента или от внеклеточной среды, если клетка не имеет клеточной стенки или наружной мембраны. У большинства организмов цитоплазматическая мембрана состоит из

двойного липидного слоя и белков, различным образом связанных с липидным слоем.

Цитоплазматическая мембрана выполняет в клетке множество функций, одна из которых – обеспечение поступления различных веществ внутрь клетки или выведение их наружу. Различные вещества по-разному преодолевают цитоплазматическую мембрану. Некоторые низкомолекулярные вещества, такие как одноатомные и многоатомные спирты, мочевины, антибиотики, флуоресцентные красители, детергенты, гидрофобные ионы, ионы Na^+ или Cl^- , вода могут диффундировать через слой липидов, который является достаточно хорошим барьером для гидрофильных ионов. Такой путь транспорта называется *простой диффузией*. Диффузия происходит по градиенту концентрации переносимого вещества [4, 7].

Перенос молекул и ионов может по градиенту концентрации происходить и через *мембранные каналы* – сложно организованные белково-липидные комплексы. Каналы также могут образовывать различные ионофоры: валиномицин, амфотерицин, кальциймицин и др., относящиеся к краун-эфирам, криптандам, подандам, макроциклам [8]. Валиномицин образует канал, переносящий K^+ селективно по отношению к Na^+ , что давно использует-

ся в производстве К-селективных электродов [2]. Для подтверждения способности антибиотика Lasalocid A проявлять свойства ионофора был проведен экстракционный эксперимент. Раствор антибиотика в хлороформе экстрагирует Со (II) из его аммиачных растворов. Во всех экспериментах с отсутствием исследуемого соединения в органической фазе экстракция не происходила [10].

Каналы обеспечивают прохождение через мембрану многих гидрофильных веществ, таких как Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , γ -аминомасляная кислота, глицерин, АТР и АДФ, глюкоза, арабиноза, ксилоза и др. моносахара и т. д. [9]. По существующим представлениям ион при входе в мембрану дегидратируется благодаря большому сродству к группам, выстилающим канал, чем к воде. В канале одновременно находится только одна молекула субстрата [8].

Некоторые вещества переносятся через мембрану путем *активного транспорта*. Активный транспорт обеспечивается специальными белками-переносчиками, для обозначения которых используют также термины «пермеазы» и «транслоказы». Активный транспорт является энергозависимым процессом. Энергия при этом затрачивается на изменение конфигурации белка, в результате чего происходит перемещение соответствующей молекулы на противоположную сторону. Энергия в систему активного транспорта поставляется двумя путями: в виде трансмембранного электрохимического потенциала гидрофильных ионов либо в виде химического потенциала макроэргических фосфатных связей соединений-фосфогенов. Пермеазы, использующие энергию гидролиза молекулы АТФ, относят к семейству АВС-пермеаз [7]. Пермеазы обладают свойствами ферментов: насыщенность, зависимость от условий среды, к ним применима теория переходного состояния Эйринга [4].

Клетки эукариот, в отличие от прокариотических клеток, способны к эндоцитозу. Для введения внутрь клетки материала, который не может быть перенесен через мембрану иным путем, клетка формирует вокруг него

окруженный мембраной пузырек, который и переносит субстрат в цитоплазму клетки [1].

Транспорт ионов щелочных и щелочноземельных металлов

Na^+/K^+ -АТФ-аза относится к ферментам E_1E_2 -типа. Это название означает, что белок имеет две конформации, обладающие разным сродством к K^+ и Na^+ , а также различным отношением к мягкому протеолизу. Форма E_1 обращена центрами связывания катионов металла в сторону цитоплазмы и обладает высоким сродством к катионам натрия. После присоединения трех катионов натрия фермент фосфорилируется молекулой АТР и изменяет свою конформацию. Фосфорилированная форма E_2 обращена центрами связывания ионов металлов в межклеточную среду и обладает высоким сродством по отношению к катионам калия и низким к катионам натрия. После диссоциации комплекса и присоединения к ферменту двух ионов калия происходит быстрое дефосфорилирование – конформация комплекса меняется, центры связывания катионов металлов оказываются обращенными в цитоплазму. После этого цикл повторяется [4].

В цитоплазматической мембране клеток имеются ферменты РМСА или цитоплазматические Ca^{2+} -АТФ-азы, активно переносящие ионы кальция из цитоплазматического пространства в окружающую среду, способные переносить ионы кальция против тысячекратного градиента концентрации. Выведение кальция из цитоплазмы способствует ослаблению мышечных клеток. Помимо цитоплазматической мембраны активные переносчики кальция обнаружены в мембранах эндоплазматического ретикулума (SERCA), где ионы Ca^{2+} накапливаются во время релаксации клетки, а также в некоторых других органеллах. Как и Na^+/K^+ -АТФ-аза, РМСА имеет две конформации: фосфорилированную и нефосфорилированную. Все Ca^{2+} -АТФ-азы состоят из одной полипептидной цепочки, несколько различающейся по молекулярной массе для различных ферментов. РМСА имеет

10 трансмембранных доменов, достаточно крупную цитоплазматическую часть и малую, расположенную на наружной поверхности клетки. Достаточно подробно изучены способы регуляции активности РМСА: ауторегуляция, при помощи протеолиза, белка кальмодулина, кислых фосфолипидов и т. д. Помимо РМСА за выведение кальция из клетки ответственен также $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (NCX). Для разных клеток организма характерно разное соотношение количества ионов кальция, выводимого NCX и РМСА.

Помимо систем активного переноса на транспорт щелочных и щелочноземельных металлов влияет наличие ионофоров в мембране [3, 6].

Транспорт тяжелых металлов

Тяжелые металлы, т. е. те металлы, атомная масса которых более 50 дальтон, по отношению к клетке делят на четыре класса. Металлы класса А необходимы для жизни клетки и присутствуют в ней в больших концентрациях. Металлы класса В не являются необходимыми и в малых количествах не оказывают токсического воздействия, к ним относятся лантан, стронций и некоторые другие металлы. К классу С относят металлы, в малых количествах совершенно необходимые клетке, так как они входят в состав простетических групп ферментов. Это медь, кобальт, молибден и, возможно, хром. Класс D представлен металлами, которые не выполняют в клетке жизненно важных функций и являются токсичными даже в очень малых концентрациях. В этот класс входят ртуть, свинец, уран.

Отмечено, что ионы металлов класса С поступают в клетку достаточно селективными путями [14]. Определена структура человеческого белка-транспортера меди 1 (hCTR 1). Показано, что он имеет три трансмембранных домена, С-концевой фрагмент локализован в цитоплазме, а N-концевой фрагмент – снаружи клетки [16, 17].

Установлено, что у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* имеется по крайней мере четыре белка-переносчика цинка в клетку. Основным

из них является белок Zrt 1, обладающий чрезвычайно высоким сродством к цинку и действующий в условиях его низкой концентрации. В клетках некоторых других организмов также были обнаружены переносчики этого металла. [13].

Ионы металлов класса D переносятся через мембраны неселективно и часто по каналам, которые при их отсутствии используются для транспорта ионов металлов класса С. Так, Cd может поступать в клетку через кальциевый канал [14]. Известно, что соединение, образуемое катионом метилртути с аминокислотой цистеином, может перемещаться через мембрану как аминокислота метионин. Это происходит благодаря их структурному сходству и является одним из примеров молекулярной мимикрии между соединениями, образуемыми ионами тяжелых металлов с природными лигандами, и нормальными клеточными субстратами. Нугауама показал, что транспорт ртути в клетки мозга происходит в составе комплекса с цистеином по аминокислотному пути. Скорость транспорта в составе комплекса с L-цистеином выше, чем в составе комплекса с D-цистеином. Нейтральные аминокислоты, такие как лейцин и фенилаланин, уменьшают скорость переноса ртути через мембрану. Соединение метилртути с цистеинглицином проявляет мимикрию по отношению к ацилглицину, соединение метилртути или неорганической ртути с глутатионом – по отношению к присущим клетке соединениям глутатиона и окисленного глутатиона. Некоторые исследования были посвящены транспорту тиоловых соединений других металлов: меди, цинка, мышьяка. Оксанионные формы тяжелых металлов, такие как молибдат, арсенат, хромат, вольфрамат, проявляют мимикрию по отношению к фосфату и сульфату [11].

Обычно поступление тяжелых металлов в клетку происходит несколькими путями, так, только треть общего количества кадмия, поглощенного гепатоцитами, попадает в них по кальциевым каналам. При этом наблюдается конкурентное ингибирование транспорта кадмия ионами кальция, цинка и некоторых

других металлов. Известно также, что витамин D, стимулируя поглощение Са клетками, не оказывает подобного эффекта по отношению к Cd [14].

Во многих случаях способность иона металла преодолевать цитоплазматическую мембрану зависит от присутствия во внеклеточном растворе других ионов или молекул. Широко известные производные ртути – метилртуть и диметилртуть – гораздо опаснее ее атомарной формы, так как помимо летучести они обладают высокой липофильностью, и клеточные мембраны не являются для них препятствием [5]. Исследование переноса ртути через искусственную бислойную мембрану из яичного лецитина показало, что при малых концентрациях хлорид-ионов в системе способность ртути проникать через мембрану сильно ограничена, в то время как концентрации хлорид-ионов, близкие к их концентрациям в крови, значительно повышают ее. Проницаемость мембраны при этом ограничивается лишь скоростью диффузии в непроницающемся слое. Ртуть переносится через мембрану в неионизированной форме: HgCl_2 , HgOHCl , $\text{Hg}(\text{OH})_2$ [15].

Исследование бактерицидного действия комплексного соединения Cu (I) с 2, 9 – диметил – 1, 10 – фенантролином показали, что его летальное воздействие на *Mycoplasma gallisepticum* обусловлено воздействием не лиганда, а меди. При этом диссоциация комплекса происходит в цитоплазме, то есть, образование комплексного соединения определенного состава способствует переносу иона меди через двойной липидный слой [20].

Связывание ионов металлов с белками плазмы крови препятствует их выведению почками [14].

При изучении активной и пассивной аккумуляции Cd и Zn бактерией *Cytophaga johnsonae*, обычным обитателем почв и холодных вод, было обнаружено, что при низких концентрациях металлов происходит небольшое увеличение их поглощения при добавлении в культуральную среду глюкозы. При высоких концентрациях металлов такой эффект не наблюдался. Авторы предположи-

ли, что при высоких концентрациях металлов проникновение металла внутрь клетки маскируется его сильной адсорбцией клеточной стенкой и накоплением в периплазматическом компартменте. Была также отмечена зависимость накопления клетками металлов в зависимости от ионной силы и pH [12].

Известно, что микроорганизмы, находясь в среде с недостаточным содержанием доступных форм железа, вырабатывают специальные соединения – сидерофоры, которые, хелатируя железо, способствуют его проникновению в клетку. Среди изученных сидерофоров есть представители различных классов соединений, таких как катехолы, пептиды, гидроксаматы, гидроксикарбоксилаты [7, 9].

Интересны результаты, полученные группой исследователей, которые изучали скорость транспорта кадмия и свинца через искусственный фосфолипидный бислой в присутствии валиномицина и кальцимицина, образующих в структуре мембраны каналы соответствующих диаметров. Так как в природных средах тяжелые металлы чаще всего входят в состав комплексных соединений с различными лигандами, в растворе присутствовали анионы щавелевой и лимонной кислоты. В отсутствие ионофоров ионы металлов не проходили через мембрану. Было отмечено также, что скорость диффузии ионов кадмия через мембрану увеличивается в присутствии ионов кальция. Авторы отмечают, что удовлетворительного объяснения последнему факту найдено не было [18].

Прохождение веществ через мембрану зависит и от свойств самой мембраны, таких как ее толщина, величина диэлектрической проницаемости, наличие фиксированных зарядов на ее поверхности, наличия специфических транспортных систем [8]. В различных экспериментах исследовались транспортные системы мембран гепатоцитов, эритроцитов, легочного эпителия, почечных канальцев, клеток грибов, бактерий и некоторых других [14].

Выше было упомянуто о том, что в исследованиях, посвященных транспорту различных соединений, важную роль играют искусственные мембраны из фосфолипидов. Со-

временные методики позволяют изучать на таких моделях, как перенос веществ посредством диффузии через липидный бислой, а также транспорт через поры и каналы. Изучение процессов транспорта проводят методами рентгеноструктурного анализа, ЯМР-спектроскопии, компьютерного моделирования структуры каналов, кондуктометрии, вольтамперометрии, электрохимической импедансной спектроскопии и т. д. [8, 19]. Конфигурации ферментов-переносчиков определяют при помощи рентгеновской кристаллографии, атомно-силовой микроскопии [6].

Библиографический список

1. *Биохимия мембран: учеб. пособие для биол. и мед. спец. вузов / под ред. А. А. Болдырева. Кн. 2. Р. Н. Глебов. Эндоцитоз и экзоцитоз. М.: Высш. шк. 1987. 95 с.*
2. *Будников Г.К. Основы современного электрохимического анализа. М: Мир: Бином ЛЗ, 2003. 592 с.*
3. *Владимиров Ю.В. Кальциевые насосы живой клетки // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 3. С. 20 – 28.*
4. *Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции: пер. с англ. М: Мир, 1997. 624 с.*
5. *Леменовский Д.А. Соединения металлов в живой природе // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 9. С. 48 – 53.*
6. *Пестров Н.Б., Дмитриев Р.И., Шахпаронов М.И. Регуляция Ca^{2+} -АТФ-азы плазматических мембран // Успехи биологической химии. 2003. Т. 43. С. 99 – 138.*
7. *Пиневиц А.В. Микробиология. Биология прокариотов: учебник. В 3 т. 2-е изд. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2007. Т. 2. 331 с.*
8. *Рубин А.А. Биофизика. В 2 т. М: Изд.-во МГУ, 2004. Т. 2. 480 с.*
9. *Темиров Ю.В., Есикова Т.З., Кашипаров И.А., Балашова Т.А., Винокуров Л.М., Алахов Ю.Б. Катехольный сидерофор, продуцируемый терморезистентным штаммом *Bacillus licheniformis* VK21 // Биоорганическая химия. 2003. Т. 29, № 6. С. 597 – 604.*
10. *Chia P.S.K., Lindoy L.F., Walker G.W., Everent G.W. Supramolecular transport of metal amine complexes through liquid membranes by the ionophore lasalocid A// Pure and Appl. Chem., 1993, Vol 85, № 3, p. 521 – 526.*
11. *Clarcson T.W. Molecular and ionic mimicry of toxic metals// Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1993, №32, p. 545 – 571.*
12. *Donocik A., Ledin M., Pedersen K., Allard B. Accumulation of zinc and cadmium by *Cytophaga johnsonae*// BioMetals, 1996, Vol 9.*
13. *Eide D.J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc//Biochimica and Biophysica Acta, 2006, № 1736, p. 711 -722.*
14. *Foulkes E.C. Transport of toxic heavy metals across cell membranes// Proc Soc Exp Biol Med - 2000, 234-40.*
15. *Gutknecht J. Inorganic Mercury (Hg^{2+}) Transport through Lipid Bilayer Membranes// J. Membrane Biol., 1981, № 61, p. 61-66.*
16. *Klomp A.E.M., Juijn J.A., L. van der Gun T.M., van der Berg I.E.T., Berger R. The terminus of the human copper transporter 1 (hCTR 1) is localized extracelulary, and interact with itself// Biochem. J., 2003, № 370, p. 881 – 889.*
17. *Navratil T., Sestakova I., Marecek V. Transport of heavy metals across the supported phospholipid bilayers// International journal of energy and environnement. 2011, Vol 5, № 3, p. 337 – 347.*
18. *Navratil T., Šestakova I., Mareček V., Dytrova J. J., Jacl M. Study of charged particles transport across model and real phospholipid bilayers// Wseast transactions of environment and development, 2010, Vol 6, № 3, p. 196 – 207.*
19. *Smit H., Van der Goot H., Nauta W. T., Timmerman H., M. De Bolster W. G., Stouthamer A. H., Vist R. D. Mechanism of Action of the Copper(L) Complex of 2,9-Dimethyl-1,10-Phenanthroline on Mycoplasma gallisepticum/ Antimicrobial agents and chemotherapy. 1982, Vol 21, № 6, p. 881–886.*

TRANSPORT OF METAL IONS BY CITOPLASMIC MEMBRANE

A.V. Fetisova, S.A. Ilarionov

Perm State University. 15, Bukirev st., Perm, 614990

E-mail: annavfe@rambler.ru

The article discussed various ways to request about free transport of metal ions through the cytoplasmic membrane, their variety shows.

Keywords: transport; metals; cytoplasmic membrane