

ЛАТЕРАЛНАТА КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЯ НА БИОЛОГИЧНИТЕ МЕМБРАНИ КАТО ЕСТЕСТВЕН НАЧИН ЗА ОРГАНИЗИРАНЕ НА СПЕЦИФИЧНИТЕ КЛЕТЪЧНИ ФУНКЦИИ

ВАЛЕРИ КОЧЕВ, АНДРЕЙ ПОПАТАНАСОВ
Катедра "Атомна физика", група "Медицинска физика",
Физически факултет, Софийски университет „Св. Климент Охридски

Валери Кочев, Андрей Попатанасов. ЛАТЕРАЛНАТА КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЯ НА БИОЛОГИЧНИТЕ МЕМБРАНИ КАТО ЕСТЕСТВЕН НАЧИН ЗА ОРГАНИЗИРАНЕ НА СПЕЦИФИЧНИТЕ КЛЕТЪЧНИ ФУНКЦИИ

В тази работа е направен преглед на съвременното състояние на проблемите свързани с взаимовръзките между структура и функции при биомембраните. Огромният интерес в наши дни към тяхното латерално устройство е породен от редица открития, навеждащи на мисълта, че многоравнищна подредба в мембранната архитектура може да е отговорна за организацията на множество клетъчни процеси при нормални и патологични условия. Еволюцията в разбиранията ни за структурата на мембраните след модела на Сингер и Николсън доведе до схващането, че мембраните притежават високо динамична и въпреки това подредена структура. В близкото минало беше недвусмислено показано, че клетъчните мембрани са хетерогенни образувания от липиди и белтъци и че това може да бъде предпоставка за някои от функциите им. В тази връзка е изтъкната появата и развитието на концепцията за «липидните салове». Съзряването на схващанията ни за латералната диференциация на мембраните, отразяващо съвместното съществуване на области с различен състав, фазово поведение и пространствено-времеви скали е разгледано от гледна точка новите експериментални средства и идеи. Разгледана е и връзката на мембранната нехомогенност и по-специално свързаната с нея хипотеза за саловите с някои патологични състояния.

Valery Kochev, Andrey Popatanasov. THE LATERAL COMPARTMENTALIZATION OF BIOLOGICAL MEMBRANES AS A NATURAL WAY OF ORGANIZING SPECIFIC CELL FUNCTIONS

The work is devoted to one of the hot issues, concerning the structure-function relationships in biomembranes. The tremendous present day interest in their lateral construction is provoked by numerous findings, pointing to the fact that multilevel ordered membrane architecture might be responsible for the organization of many cellular processes in normal and pathological conditions. Evolution of the insights about the membranes' structure after the model of Singer and Nicolson led us to the realization, that membranes possess highly dynamic yet ordered nature. In the near past, it was unambiguously shown that cell membranes are heterogeneous assemblies of lipids and proteins and this could be a prerequisite for some functions. In this respect, the emergence and development of the "lipid rafts" concept is highlighted. The growing and maturation of the viewpoint of membrane lateral differentiation, reflecting the coexistence of domains with different content, phase behavior and spatio-temporal scales, is considered with regard to recent new experimental tools and ideas. Some pathological implications of membrane inhomogeneity, connected with rafts hypothesis are briefly discussed.

Keywords: biomembrane lateral heterogeneity, lipid rafts, cholesterol, lipid phases, raft-dependent processes.

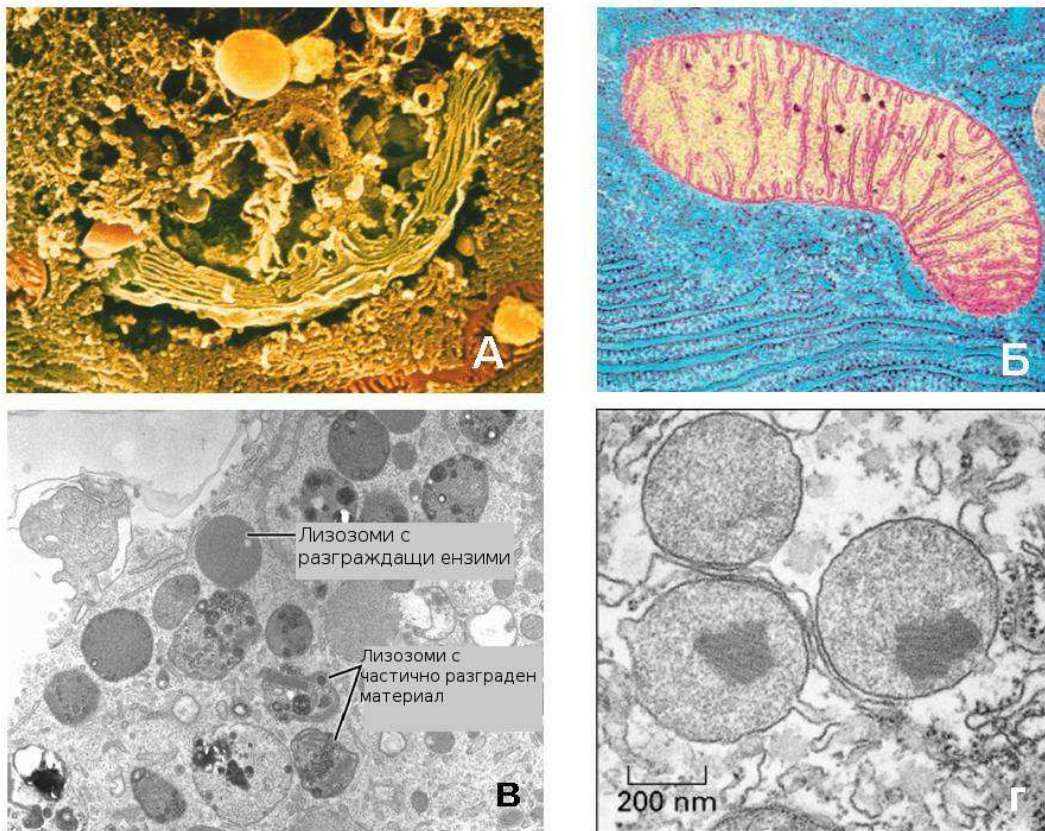
PACS numbers: 87.14.Cc, 87.15.Kg, 87.16.-b, 87.19.La

За контакти: Валери Кочев, Катедра „Атомна физика, Физически факултет, Софийски университет “Св. Климент Охридски”, бул.“Джеймс Баучър”, 5, София -1164, тел.: +359 2 8161317, факс: (+359 2) 962 5276; Андрей Попатанасов, email: and_atanasov@abv.bg.

1. ВЪВЕДЕНИЕ – БИОМЕМБРАНИ И МОРФОЛОГИЧНИ ОСНОВИ НА КЛЕТКАТА

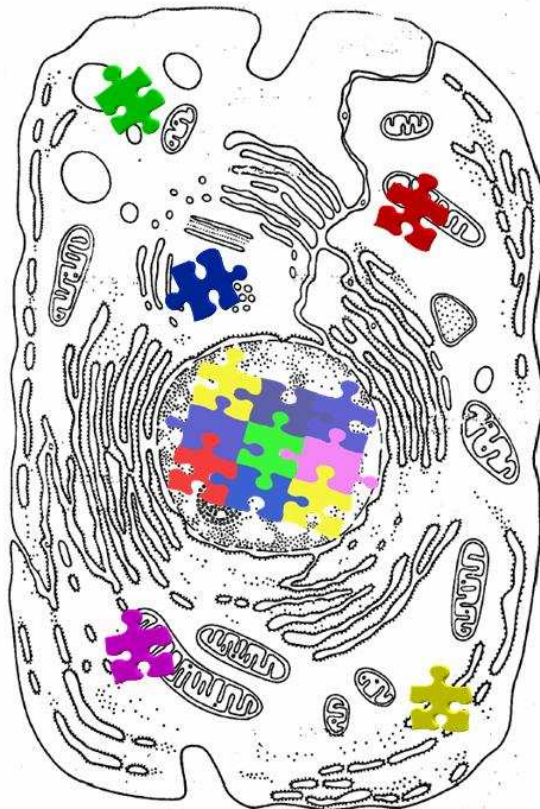
Много години след първоначалните микроскопски наблюдения на клетките през XVII в., след епохалната клетъчна теория на Матиас Шлайден и Теодор Шван [1-2], след признаването им за "кванти" на биоматерията [3], днес става ясно, че от топологична гледна точка, Природата е боравила доста свободно с архитектурата им по време на еволюцията. Не по-малко впечатляващи са и времевите мащаби на процесите в тях. Те се простират от пикосекунди до часове, дни и години, а в еволюционен план дори и до хилядолетия [4]. Освен разделянето на вътреклетъчния обем на отсеци (3D компартменти), за клетките са характерни и двумерни (2D) и едномерни (1D) обособени области. Това топологично разнообразие, разбира се, не е каприз на филогенезата. То отразява непрекъснатото усъвършенстване и усложняване на дейностите с развитието на живата материя. Целта на настоящата кратка обзорна студия е да насочи вниманието по-конкретно към съвременното състояние на проблемите свързани с деликатните отношения между структурата и функциите на биомембраните, които понастоящем се радват на един интензивно възобновяващ се интерес [5].

Зараждането на живота естествено е свързано с появата на първите клетки, акомодирани в себе си един доволно прецизен апарат не само за синтезиране, но и за развитие на основните биополимери. Две предпоставки са абсолютно необходими за такова събитие – 1) възникване на самосъгласуван механизъм (например на основата на автокаталитична химична кинетика [6]) за обмен и натрупване на информация между полинуклеотидите и полипептидите и 2) обособяването на реакционни области, отделени от външната среда и помежду си посредством подходящи фазови граници [7]. Докато за първото условие са се погрижили нуклеиновите киселини, закодирани в гените един огромен набор от пептиди и белтъци осигуряващ функционалното многообразие на клетките, то за второто голямата отговорност се е паднала на липидите. Благодарение на своята двойствена физикохимична същност (амфибилност), те са се оказали много удобни молекулни строителни елементи за изграждането на мембрани, изолиращи от околността затворени реакционни пространства. Няма да е пресилено ако се каже, че именно липидните мембрани определят клетката като завършена единна система. Извън съмнение е тяхната доминираща роля в клетъчната морфология. Те задават както инфраструктурата (особено при еукариотите), така и цялостния облик на клетките. Един бегъл поглед върху първата попаднала ни електронно-микроскопска снимка е достатъчен да ни убеди, че клетката буквално е "изтъкана" от техни представители (Фиг.1).



Фиг.1. Електронно-микрографски снимки на субклетъчни органели контактуващи с цитозола чрез мембранны структури: А) Апарат на Голджи; Б) Ендоплазмен ретикулум; В) Лизозоми съдържащи разграждащи ензими; Г) Peroxisoми с ензими участващи в катаболизма на мастните киселини [4].

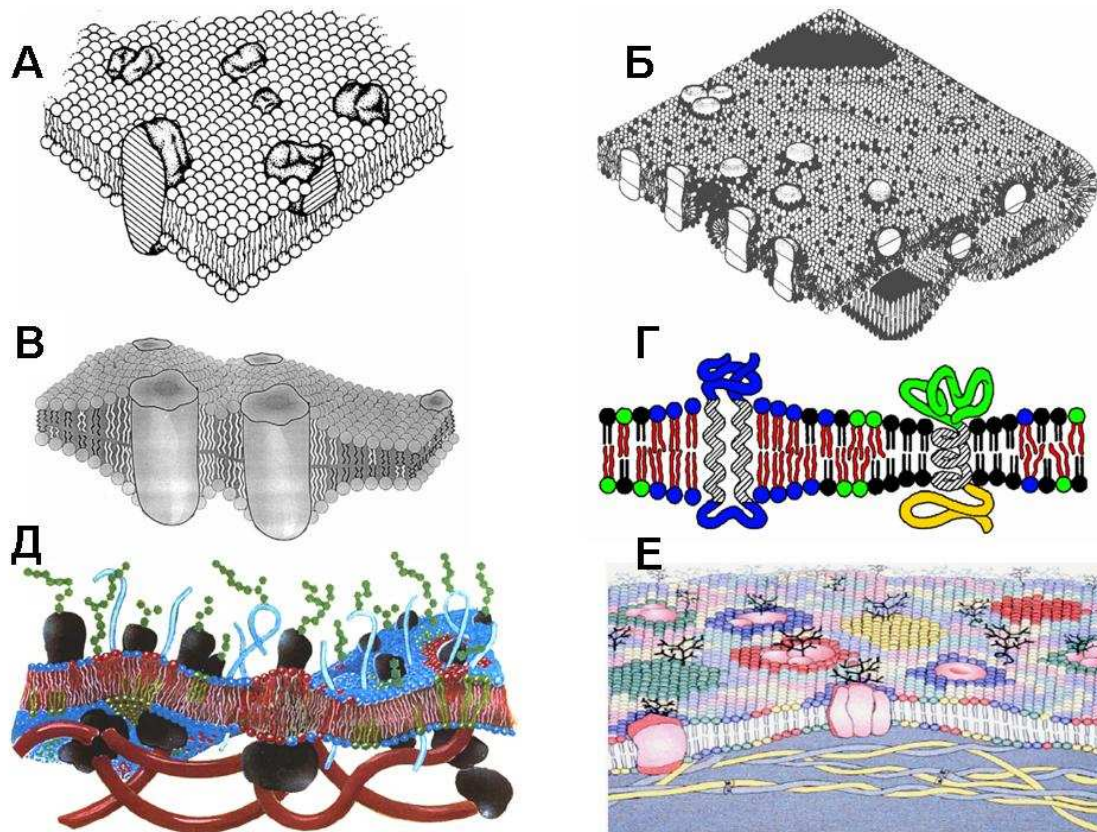
Човешкото тяло например, се състои приблизително от 10^{14} клетки с обща мембранна площ около 100 km^2 . На практика едва ли съществува субклетъчна структура която да няма отношение към плазмената или към някакви други вътрешни мембрани (Фиг.2). Така, цитоплазмата би могла да се уподоби в пряк и преносен смисъл на ребус, главоблъсканица, загадка от мембрани които непрекъснато поставят все нови и нови въпроси пред изследователите.



Фиг.2. Скица на животински еукариот [6], илюстрираща мембрания "puzzle" на клетката. Дали скоро ще успеем да подредим цялата картина?

Тази привидна "бъркотия" обаче, не бива да ни заблуждава. Мембраните не са с произволна форма и не са хаотично разположени. Нещо повече, много от тях имат обща генеалогия. Мембранното "обзавеждане" на клетката въобще не е случайна приумица на еволюцията. То, както споменахме, е изцяло подчинено на разнообразните ѝ активности. Като олеофилни прегради за протолитите, основната задача на липидните мембрани естествено е да отграничават и обособяват различни области. Обемната (3D) компартиментализация на вътрешното клетъчно пространство е залог за висока специализация на дейностите по място и оттам за голяма ефективност на биохимичните реакции. Задълбочените изследвания на нативни и моделни мембранни системи в последните десетилетия обаче, разкриха една доста по-сложна и интригуваща картина, представяща задълженията на биомембраните в нова светлина, далеч отвъд една пасивна структурна и бариерна роля.

Макар отдавна да беше известно, че са съставени от липиди и белтъци, именно основополагащата работа на Гортер и Грендел [8] недвусмислено показва, че поради амфифилната си природа, липидите в биомембраните са подредени във формата на бислои. В него те са насочени едни към други с хидрофобните си вериги, а полярните им глави са ориентирани навън към водата. Към това "скеле" по различен начин са прикрепени множество полипептидни видове. Почти половин век по-късно се появи моделът на Сингър и Никълсън, който постулираше флуидитета и динамичността на мембранните структури. До ден днешен този модел не престава да се осъвременява (Фиг.3).



Фиг.3. Развитие на моделите за биомембрана архитектура в последните 40 години. (А) Флуидо-мозаичен модел на Сингер и Николсън [9]; (Б) Подобрение на модела от Я.Израелашвили, вземащо под внимание специфичната геометрия на мембраната в отделните ѝ участъци, което улеснява адекватното куплиране на мембранните белтъци. Отчитат се също локалните деформации, порообразуването, хетерогенността и вариациите в дебелината на бислоя [10-12]; (В) В "матрачния модел" на О.Моуритсен и М.Блуум [13] се предполага липид-медирано взаимодействие на трансмембранните полипептиди заради хидрофобното несъответствие [14]; (Г) Схематична илюстрация на хипотезата на Е.Закман за влиянието на липидния състав върху конформацията и действието на интегралните белтъци [15]; (Д) Друго подобрение на модела, направено от Р.Липовски и Е.Закман [16], подчертава важноста на асиметричното разпределение и организация на молекулите в двата монослоя на мембраната. Плазматичната мембрана е представена като «сандвич» съставен от гликокаликса (на външната ѝ повърхост), от вътрешна (цитоплазмена) еластична мрежа, изградена от цитоскелетни полимеризирани белтъци, и от липидния бислой разположен между тях [5]; (Е) Компонентите на мембраната се разглеждат като асоциирани в динамични латерални нехомогенности с различен състав, дебелина, структура и подвижност [17].

Най-често срещаните упростени скици и рисунки създават погрешното впечатление, че биомембраните са изключително плоски. Обратно на тази представа, в клетката се откриват в нативно състояние мембранни образувания с твърде сложна морфология. Различните органели на еукариотните клетки имат разнообразен липиден състав, който определя формата им. Те съдържат множество липиди с конична геометрия, т.е. предпочитат неламеларни структури. Нещо повече, понастоящем дори се налага гледището, че кривината на бислоя, осигуряваща се от тези неламеларни липидни видове и поддържаща се от присъствието на холестерол, е залог за наличието на по-гъвкави мембрани необходими за специфичните клетъчни дейности. "Нецилиндричните" липиди (Фиг.4) по дефиниция не са склонни към самосборка в плосък бислой. Това означава, че за да се осигури стабилността на ламеларните биомембрани липидният пул в тях е корелиран както по отношение на своя състав, така и спрямо присъстващите полипептиди, напр. посредством селективното генериране на латерални макромолекулни ансамбли и трансверзални бислойни асиметрии [18]. Както ще видим по-надолу, относно структурната изява на стеролите пък, съществуват сериозни хипотези за извънредната им роля в еволюцията на мембраните и оттам за прехода от прокариоти към еукариоти. В основата им лежи схващането, че едва с инкорпорирането в липидния бислой на появилите се (преди около 2-2.5 млрд. години) в аеробна среда холестерол, са възникнали

предпоставки за образуването на силно разгърната вътреклетъчна мембранна система [19-21, 5]. Изобщо „арогантното” многообразие от липиди, които клетката демонстрира, се счита за една от главните все още нерешени докрай загадки в тази област [22]. В естествени условия в мембраните се срещат стотици различни мастни съединения, а теоретични оценки категоризират клетъчния липидом като съставен от близо 10^4 глицерофосфолипиди, над 10^5 сфинголипиди, хиляди неутрални мазнини (моно- ди- и триглицериди) и многобройни варианти на мастни киселини и стероли [23]. Едва в последно време, благодарение на многогодишните усилия на десетки изследователски екипи, стана възможно това внушително липидомно богатство да бъде съотнесено към изобилието от форми и латерални структури на бислоя, детерминиращи биологичната значимост на мембраните. Забележителното на тяхната липидна архитектура е, че за разлика от другите три типа основни биомолекули – нуклеинови киселини, белтъци и въглехидрати, те не представляват традиционни полимери, изградени от множество ковалентно свързани по-прости единици. Подредбата на флуидоподобния бислой изцяло се крепи на слаби, нековалентни взаимодействия. Така в макроскопичен план, мембраните се явяват динамични образувания от течни филми променящи интензивно състава си, но запазвайки същевременно близкия и далечен порядък [24, 25]. Въпреки че те, както и другите части на клетката, са съставени от елементи с точно дефинирана химична природа, способността им да се самоасоциират им позволява да възпроизвеждат молекулни агрегати чиято структура не е отнапред експлицитно зададена в генома [5]. В този смисъл, бихме могли да считаме бислоя като някакъв нековалентен “полимер”, зараждащ се от безпорядъка за сметка на ентропийно задвижвани процеси и създаващ подходящо обкръжение за останалите мембранни компоненти. Организираните липиди обаче не се задоволяват само с това, а са се „нагърбили” да изпълняват и редица други важни функции – да бъдат сензори на външни въздействия, модулатори на метаболитна активност или на различни сигнални системи, да сортират и насочват новосинтезирани полипептиди, дирижирайки цитозолния трафик и т.н. Събраният до момента огромен експериментален материал решително оборва доскоро битуващите възгледи за бислоя единствено като матрица-носител или просто “разтворител” за мембранно свързаните белтъци.

2. ФИЗИКОХИМИЧНИ СВОЙСТВА НА ЛИПИДИТЕ В ХИДРАТИРАНО СЪСТОЯНИЕ. ХИДРОФОБЕН ЕФЕКТ И САМОАСОЦИАЦИЯ. ГЛАВНИ ТИПОВЕ МЕЗОФАЗИ

За изработването на адекватни представи относно морфологията и поведението на нативните биомембрани, очевидно от особена важност е познаването на основните термодинамични принципи от които зависи структурирането и стабилността на липидния бислой. Както казахме, химичната структура на липидите е отговорна за специфичното им поведение в различни разтворители. Техните молекули притежават както хидрофилни области (в зоната на полярните глави), така и хидрофобни участъци (по протежение на ацилните вериги). Такива вещества, наречени амфипатични, проявяват афинитет и към полярни и към неполярни фази, като разпределението им между тях се определя от съотношението на различните части в молекулата, което понякога се изразява с т.нар. *число на хидрофилно-липофилния баланс* (англ. hydrophilicity lipophilicity balance, HLB, [26]). Това обстоятелство, дължащо се на *хидрофобния ефект* [27], напълно задава и ориентацията им – с главите към водното обкръжение и с въглеводородните опашки към олеофилната фаза.

В хидратирано състояние липидите приемат много разнообразна микро- и макроскопична подредба. Дори двукомпонентните системи от вода и само един чист липид са способни да образуват повече от един вид структури. Отдавна е известно, че във водни разтвори те са склонни да се самоасоциират като мицели, бимолекулни слоеве, везикули и т.н. По същите причини, те изграждат монослоеви на граничната повърхност между две среди. Този полиморфизъм [28] дълги години е обект на внимание и изследването на много водно-липидни системи позволи да се идентифицират десетки фази, чиято специфична организация бе точно определена [29-31]. Впечатляващо е, че такава многообразие от форми не се среща за никое друго химично съединение и още от самото начало то бе свързвано с физиологичните процеси в които мембраните участват [32]. Независимо, че в тази насока все още много въпроси очакват своето изясняване, категорично се оформя мнението, че мембранните липиди не са само пасивни структурни елементи. Преходите от една към друга фаза най-вероятно осигуряват

адаптация към промените във външните условия, така че да се запази нормалната функционална активност на мембраните и свързаните с тях клетъчни процеси.


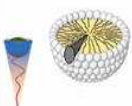





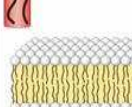


Макар водно-липидните системи да се разглеждат също като колоидни, те се различават съществено от "обикновените" колоидни разтвори по това, че съставлящите ги елементи не са "твърди" частици. Амфифилните молекули формиращи структурите са гъвкави и се свързват помежду си чрез слаби (хидрофобни, електростатични, вандерваалсови), а не ковалентни (квантовомеханични) взаимодействия, т.е. самите агрегати представляват флуидоподобни образувания. Това е една тяхна много важна черта, тъй като всяка промяна в параметрите на средата (температура, рН, йонна сила, вискозитет на разтвора и т.н.) оказва драстично влияние не само върху взаимодействията между асоциатите, но и върху межумолекулните сили вътре в самите тях. Такива промени неминуемо водят до модификации в техните форми и размери, а оттам естествено и до изменения в свойствата на системата като цяло. Ето защо, от фундаментален интерес е да бъдат открити факторите от които зависят процесите на самоасоциация и физичните принципи на които те се базират. Наистина, оказва се че е възможно въз основа на най-общи термодинамични съображения да се изведат уравнения, даващи задоволително описание на процесите на самосборката. Като следствие, от тях количествено могат да бъдат определени редица физикохимични характеристики на възникващите структури, без да е необходимо детайлното познаване на твърде сложните близкодействащи межумолекулни сили [12].

В основни линии, самосборката на амфифилите в строго подредени структури се управлява от два типа взаимодействия – хидрофобно *привличане* на границата въгледородни опашки/вода и хидрофилно *отблъскване* между полярните глави (електростатично и/или дължащо се на стерични ефекти). Първото тласка молекулите към асоцииране заради хидрофобния ефект, докато второто изисква по-близък контакт с водата. Така естествено изплува концепцията за "*противодействащите сили*" [33] – едните стремящи се да намалят, а другите да увеличат интерфейлната повърхност a падаща се на една молекула. Силите на привличане произхождат от межумолекулното напрежение γ действащо върху граничната повърхност хидрофобна/хидрофилна зона. То представлява интерфейлната свободна енергия за единица площ (която за повечето въгледороди е от порядъка на $20 - 50 \text{ mJ/m}^2$) така, че тези сили могат да бъдат зададени чрез γ и техният принос към химичния потенциал е пропорционален на ефективната площ a на молекулата. Поради различните си съставки, силите на отблъскване са твърде сложни за експлицитно формулиране. В първо приближение обаче, те се представят като обратно пропорционални на площта a и в крайна сметка свободната енергия за една молекула в агрегат се дава с израза [34-36]:

$$\mu = \gamma a + K/a$$

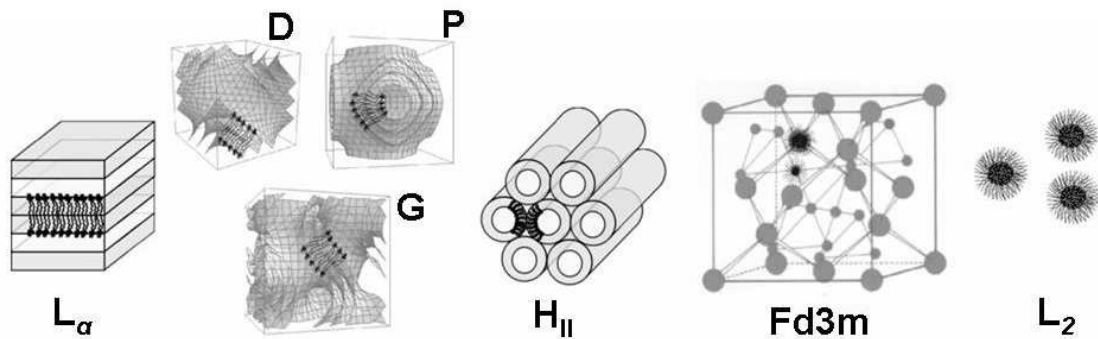
който има минимум за някаква оптимална площ $a_o = (K/\gamma)^{1/2}$, съответстваща на механичното равновесие.

Така или иначе, молекулната опаковка и близкият порядък в пространствената организация на агрегатите ще се определят преди всичко от специфичната форма на амфифилите, която е отразена в трите геометрични параметъра на молекулата – оптимална площ a_o на главата, обем v на въгледородните вериги (които се предполагат в "течно" състояние) и критична дължина l_c . Последната величина е полуемпирична и дава представа за границата до която хидрофобните опашки могат да се считат за флуидоподобни. Критичната дължина на веригите все пак е по-малка, но от същия порядък както максималната им дължина. Споменатите характеристики позволяват да се въведе един безразмерен параметър, известен като *параметър на опаковане* - $v/a_o l_c$, с помощта на който може да се прогнозира видът на агрегатите [37]. В таблицата на Фиг.4. са посочени някои характерни примери на амфифилни молекули и агрегатите които образуват в зависимост от ефективната си форма.

Амфифили	Параметър на опаковане $v/a_c l_c$	Ефективна форма	Структура
едноверижни, голяма площ а на полярните глави NaDoS в слаби електролити	$< 1/3$		сферични мицели 
едноверижни, малка площ а на полярните глави NaDoS, СТАВ в силни електролити нейонни липиди	$1/3 - 1/2$		цилиндрични мицели 
двоверижни, голяма площ а на полярните глави фосфатидилхолин фосфатидилсерин фосфатидилглицерол фосфатидилинозитол фосфатидна к-на сфингомиелин	$1/2 - 1$		огънат бислой, везикули 
двоверижни, малка площ а на полярните глави анионни липиди в силни електролити, наситени вериги фосфатидил етаноламин фосфатидилсерин + Ca^{2+}	~ 1		плосък бислой 
двоверижни, малка площ а на полярните глави нейонни липиди полиненаситени вериги Фосфатидил етаноламин кардиолипин + Ca^{2+} холестерол галактолипиди	> 1		обърнати мицели 

Фиг.4. Параметър на опаковане, средна форма и предпочитана структура за някои амфифилни съединения [12].

Над дадена критична концентрация на мицелообразуване (англ. critical micellar concentration, СМС), разтворените във водна среда липиди спонтанно се самоасоциират, образувайки дисперсна фаза. Формата, големината и разпределението на агрегатите в нея зависят от потенциала на межумолекулните взаимодействия, който се определя от структурата на участващите химични видове. В зависимост от техния състав (т.е. параметъра на опаковане $v/a_c l_c$) и концентрация, както и от условията на околната среда (рН, температура, осмотично налягане, йонна сила, и т.н.), хидратираните липиди могат да диспергират в *изотропна течна фаза* (англ. fluid isotropic, FI phase [38]), или да се обособят в няколко главни типа лиотропни мезофази (Фиг.5, [39-40]). Класификацията на тези фази се базира на следните техни главни свойства – организация от далечен порядък (т.е. вид кристална решетка, 1D, 2D или 3D периодична); състояние на веригите (течно, произволно ориентирани или гел, опънати плътно подредени); кривина на липидния слой (нормален или обърнат). По-надолу са изброени най-често срещаните липидни фази, а една по-подробна класификация е дадена в обзора на Седон и Темплър [41].



Фиг.5. Схематично представяне на най-общите липидни фази които се появяват в реда на нарастване (от ляво надясно) на параметъра на опаковане над единица: плоска течна ламеларна фаза L_α ; трите биконтинуални кубични фази G, D и P (пространствени групи $Ia3d$, $Pn3m$ и $Im3m$); обърната хексагонална фаза H_{II} ; дискретна кубична фаза, съставена от мицели (група $Fd3m$) и обемен разтвор на обратни мицели L_2 [42].

- *Ламеларна гел фаза*, L_β – съществува при ниски температури за липиди с параметър на опаковане ~ 1 . Подреждането на молекулите наподобява кристалната (нехидратирана) L_c фаза, т.е. плътно една до друга с изправени ацилни (или алкилни) вериги. При по-големи полярни глави веригите са наклонени, което се отбелязва с L_β' (с прим). Фосфатидилхолините (PC) например, са разположени под ъгъл от 30° спрямо нормалата на бислоя, докато фосфатидилетаноламините (PE) нямат наклон;

- *Ламеларна течна-кристална фаза*, L_α – това е базисната форма в която се намира бислойът на нативните биомембрани. За разлика от L_β тя е с по-малка плътност. Независимо че се запазва макроскопичната планарна форма, порядъкът в нея намалява, а хидрофобните опашки са в течно състояние, случайно ориентирани, с голяма конформационна свобода;

- *Нормална хексагонална фаза*, H_I – при тази форма липидите са организирани в цилиндрични структури с полярните глави “навън” в контакт с водния разтвор и опашките “навътре” едни към други. Цилиндриците следват 2D периодична хексагонална опаковка;

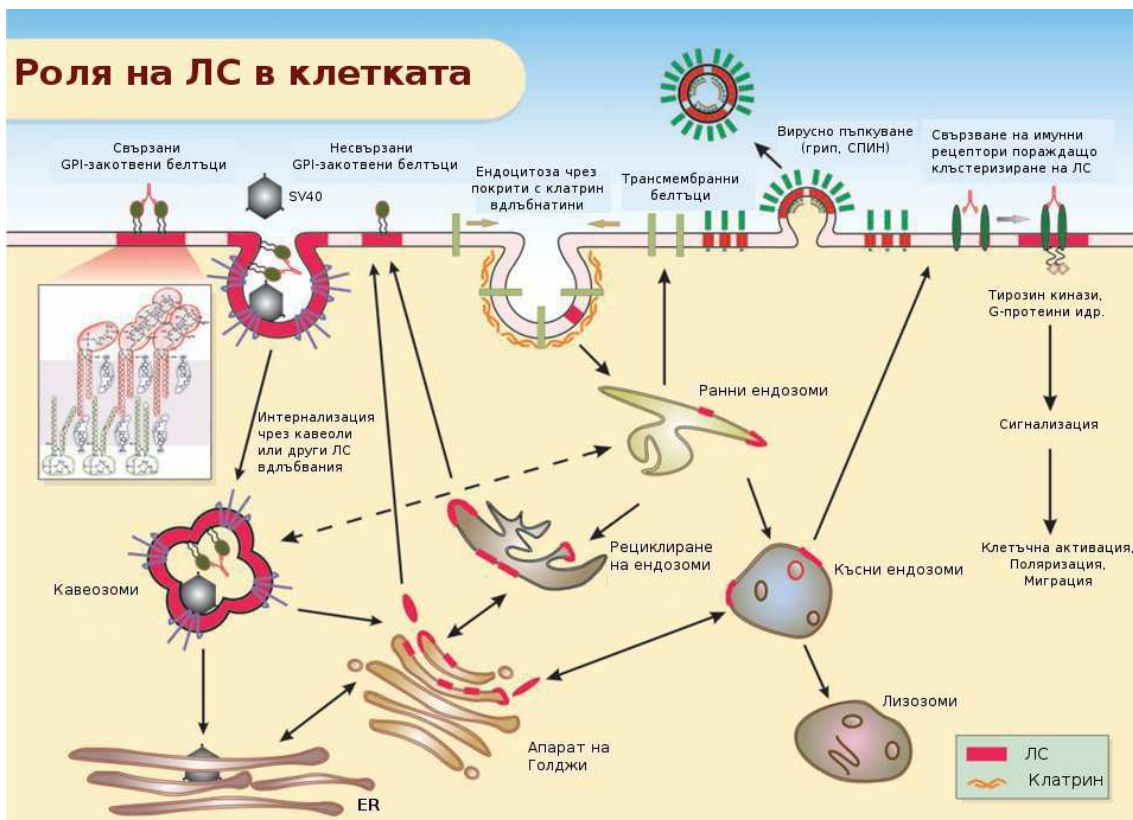
- *Обърната хексагонална фаза*, H_{II} – тя има същата макроскопична подредба като H_I , но липидните молекули в цилиндриците са ориентирани обратно, т.е. с главите “навътре”, разбира се пак към водата, която в случая е вътре в цилиндъра (Фиг.5), [30];

- *Кубична фаза*, Q – тази фаза се извява с най-голямо разнообразие от форми [41,43-46]. В макроскопичен план тя проявява определена трансляционна 3D симетрия и може да бъде представена както от дискретни агрегати подредени в кубична решетка [47-50], така и от различни биконтинуални периодични структури [51] (Фиг.5). Счита се, че в тях и полярните и хидрофобните области са едносвързани, а амфибилните молекули образуват бислой във формата на еднолистовата хиперболична повърхност, разпростираща се периодично в тримерното пространство. Предложени са за пръв път от Скрийвен [52]. Такива непресичащи се повърхности, чиято средна кривина във всяка точка е нула са познати в математиката като *безкрайни периодични минимални повърхности* (англ. Infinite Periodical Minimal Surfaces, IPMS) [53-54]. Измежду всички тях като най-важни от биологично гледище се считат: 1) ротационен тип (Gyroid), *G-повърхност* която не съдържа праволинейни участъци, с пространствена група на симетрия $Ia3d$; 2) *D-повърхност*, (пространствена група $Pn3m$), в която водните канали от двете страни на повърхността образуват ромбична (Diamond) решетка; 3) примитивна (Primitive) Шварцова *P-повърхност* (пространствена група $Im3m$), разделяща водни глобули свързани помежду си с канали по протежение на трите взаимно перпендикулярни оси (Фиг.5). За много амфибилни съединения (напр. моноолеин [55-56]), отдавна е известно, че (в зависимост от температурата и водното съдържание) са в състояние да се подреждат именно в такива биконтинуални форми с полярните глави разположени навън, от двете страни на повърхността.

3. СЕГРЕГАЦИЯ НА ЛИПИДИТЕ И ФАЗОВИ РАЗСЛОЕНИЯ В БИСЛОЯ. РАЗВИТИЕ НА ВЪЗГЛЕДИТЕ ЗА СТРОЕЖА НА БИОЛОГИЧНИТЕ МЕМБРАНИ С ИДЕЯТА ЗА ДИНАМИЧНИ ЛАТЕРАЛНИ НЕХОМОГЕННОСТИ. “САЛОВЕ” В ЛИПИДНИЯ ОКЕАН. ДИКТАТИТЕ НА ХОЛЕСТЕРОЛА

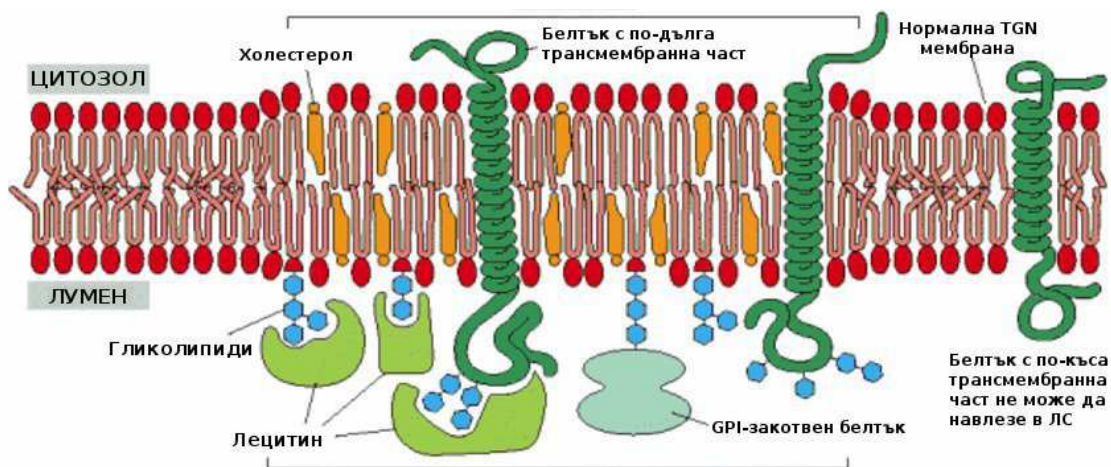
Моделът на Сингър-Никълсън, даващ представа за основната структура и свойства на клетъчните мембрани, имаше много висока евристична стойност по отношение на вижданията за тяхната топология. Много скоро след появата му обаче, започнаха да никнат доказателства, че биомембраните са доста по-сложни образувания с висока степен на подреденост на различни нива и, че за това не малка роля има самият липиден бислой [57-58]. Стана очевидно, че неговата многочастична същност твърдо предразполага както към макроскопично фазово устройство, така и към някакъв микро- и наноскопичен порядък [22]. Експериментални данни от изследване на топлинни ефекти върху мембранни липиди показваха, че фазовото поведение на липидната смес би могло да предизвиква колективно агрегиране и така да поражда латерална организация на друго ниво [59]. Нееднородности в бислоя бяха наблюдавани с най-различни методи [60-62] и се затвърди убеждението, че те трябва да съществуват и в естествени условия. Биомембраните не можеха повече да бъдат разглеждани като хомогенна флуидна среда с равномерно разпределени белтъци и липиди и се отбелязваше, че в тях съществуват и области от “липиди в по-подредено състояние” [63]. Концепцията за обособени липидни домени беше ясно формулирана от Карновски и сътр. [64], които забелязвайки различия във времената на живот за флуоресценцията на дифенилхексатриена (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, DPH) в липидна, среда стигнаха до извода, че това се дължи на сепарацията на различни фази. Авторите завършват статията си с няколко ключови въпроса, които след 30 години звучат все още актуално: 1) дали специфичните липидни области се обитават от специфични мембранни белтъци и могат ли техните структура и функции да се влияят от промени в липидното им обкръжение; 2) дали някои липофилни молекули и лекарства не се разпределят по-скоро в определени домени отколкото в обемната липидна фаза и какви са евентуалните функционални ефекти от това; 3) тъй като от самата идея за обособени области се подразбира, че те са обкръжени от съответните граници, каква е биологичната значимост на тези интерфейси; 4) кои са силите обуславящи образуването, поддържането и флукуациите на домовете. По-надолу ще се опитаме да проследим какви успехи и проблеми са съпътствали досега усилията да се отговори на тези важни въпроси.

Концепцията за хетерогенността на бислоя достигна кулминационната си точка в края на 80-те години, когато няколко различни експериментални доказателства по естествен начин се сляха за да дадат път на една нова работна хипотеза [65-66]. Наблюдавайки изменения в липидния състав на различните части от плазмалемата на епителни клетки по време на поляризацията им, Саймонс и ван Меер [67] заключиха, че повишеното съдържание на холестерол и сфингомиелини в апикалната ѝ част (в сравнение с базолатералната), се дължи на активно насочване и разделяне на липидите, съпроводено от сортиране на мембранните белтъци. Същевременно, устойчивостта на същите фракции мембранни липиди и белтъци (т.нар. detergent-resistant membranes, DRMs) към студена екстракция с нейонни детергенти, напр. Triton X-100, говореше в подкрепа на нееднородното им латерално разпределение [68]. Така се роди гледището за домени със структурно и функционално установен липидно-белтъчен състав. То бе обобщено като принцип на мембранна субкомпартиментализация, ангажирана не само в пост-Голджи трафика, но също така в ендоцитозата, сигнализацията и много други мембранни функции (Фиг.6). Домените получиха завладяващото наименование “салове” (англ. rafts) за да се подчертае картината на отделени области, “плуващи” в 2D обемния липиден океан [69].



Фиг.6. Схема на някои от клетъчните процеси в които се предполага, че участват липидните салове [65].

Хипотезата за липидните салове (ЛС) силно раздвижи духовете (та кой ли не беше чел Даниел Дефо и други приключенски романи) и в следващите две десетилетия се появи голямо количество публикации на тази тема – почти 4000 от които около 700 обзорни работи [58]. Терминът “липидни салове” получи небивала популярност (по мнението на някои автори понякога дори недотам критична [70]) не само измежду липидолозите, но и в много други области на науките за живота. Огромен брой клетъчни дейности бяха свързани с техните физикохимични и биохимични свойства и бяха представени като “салово-зависими” [71-72]. Причината за този бум донякъде се крие във факта, че дълги години, особено през френетичната “постгеномна епоха”, мембраните бяха “забравени” от специалистите по молекулярна и клетъчна биология, а липидите се считаха за пасивен разтворител без особена значимост за клетъчното поведение и физиологията на живите организми [17]. Като резултат от това, техните интересни вътрешно присъщи свойства станаха достойни предидимно на физикохимици и биофизици, които оставиха след себе си една изтънчена и усложнена терминология, в повечето случаи трудно разбираема за биолози. Ето защо, появата на ЛС хипотезата ентусиазира специалистите от науките за живота и те преоткриха и прецениха голямата роля на клетъчните мембрани, дължаща се преди всичко на изключително раздвижената им и динамична архитектура.

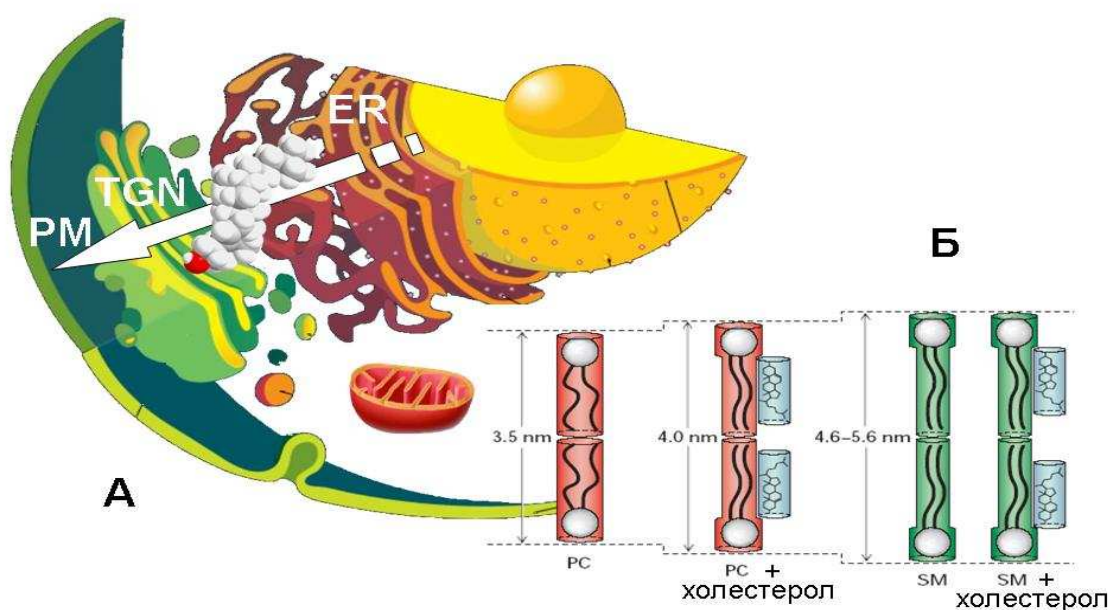


Фиг.7. Модел на липиден "сал" в мембрани от транс-Голджи мрежата (TGN) [7].

Най-ранните дефиниции и описания за ЛС наблягаха на тяхното обогатено съдържание на холестерол и сфинголипиди и резистентността им към разтворимост от детергенти. В първоначалните схеми те бяха обрисувани като области със значителни размери от порядъка на 100-500 nm в диаметър, поддържани най-вече от липид-липидни взаимодействия, с присъствието на белтъци които имат съответния афинитет към необичайния липиден състав (фиг. 7) [73]. Натрупващите се експериментални данни постепенно промениха картината и се видя, че ЛС не са единични монолитни структури, а разнообразна колекция от домени с различаващи се липидни и белтъчни компоненти и богата гама от времена на живот. Преразгледана бе и ролята на полипептидите за организацията и стабилността им. Разбра се, че нещата са доста комплицирани и ние сме едва в началото на изясняването на проблема за хетерогенността на мембраните в живите клетки. Това положение не изглежда толкова странно ако се вземе предвид огромното многообразие от липиди в нативните биомембрани което все по-ясно се разкрива благодарение на развитието на липидомните методи. Засега подробно е изучено фазовото поведение на малка част от тях и то само за дву- и три-компонентни моделни системи [74-75]. Неимоверно трудно е тази информация да се интерпретира по отношение на естествените мембрани, тъй като един редуциционистки подход може да се окаже напълно неадекватен за осмисляне на колективните явления в тях [22]. Изобилието от мембранни протеини е другата голяма пречка по пътя на изучаването на ЛС структурите. В допълнение към фазовото разделяне, невероятното големият брой белтъци, с чувствителното си влияние върху липидите, съвсем сигурно се намесва в детерминирането на мембранната организация.

След първоначалното ѝ възникване, идеята за ЛС претърпя различни модификации в съзвучие с непрекъснато обновяващите се експериментални данни [76]. Решителен напредък в изясняването и унифицирането ѝ бе отбелязан на симпозиума по "Липидни салове и клетъчни функции", състоял се през 2006 година в Кийстон. По време на тази среща бе изработена и приета с консенсус нова дефиниция която гласеше: "Липидните салове са малки (10-200 nm), хетерогенни, силно динамични, стерол- и сфинголипид-обогатени области, които компартментализират клетъчните процеси. Понякога, малки салове могат да бъдат стабилизиращи за да образуват по-широки платформи посредством протеин-протеин и протеин-липидни взаимодействия" [77]. Трябва да се каже, че това определение звучи вероятно по-близо до онова което са имали предвид Карновски и сътр., отколкото до ранните дефиниции от началото на 90-те. Освен това, то решително изключва идентичността на саловите с DRM, за което имаше и предишни индикации [78-79]. Според него ЛС са специфични липид-протеинови нано-ансамбли в метастабилно състояние на покой, които при активиране могат да се сливат и урупняват (коалесцират) под действие на силите между липидните и белтъчните компоненти. Счита се, че освен стероли в тях преобладават липиди с по-наситени и по-дълги вериги и с хидроксилиран церамиден гръбнак [18]. Точният им състав *in vivo* обаче, не може да бъде твърдо установен и зависи както от конкретния образец, така и от използваните липидомни техники [57].

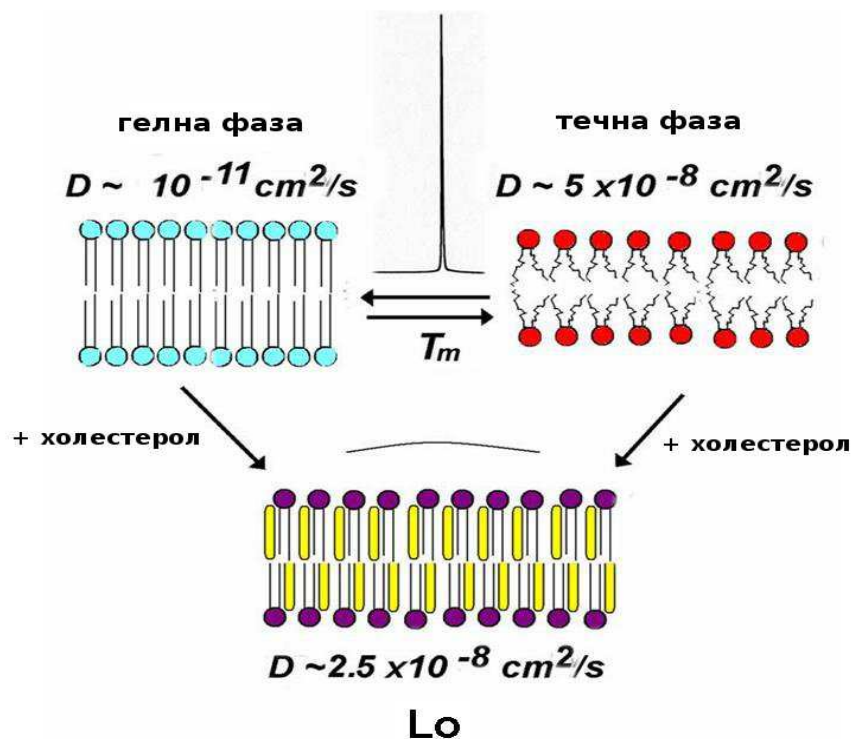
Липидното фазово поведение, както казахме, дава физичната основа от която тръгват всички разглеждания на мембранната хетерогенност. Възможностите на липидите да формират домени се дължи на ограничената им разтворимост едни в други и сегрегацията им при многокомпонентни смеси. Непълното смесване води до обособяването на отделни фракции, което се вижда от изследване на фазовите диаграми за различни моделни системи [74-75,80]. В тази връзка, холестеролът, един “невзрачен” на пръв поглед липиден вид, се оказва в центъра на вниманието на този тип проучвания. Като най-изобилно срещащата се липидна молекула в плазмалемата (до 30mol%, а в някои случаи и повече), старият въпрос за неговата роля в регулирането на мембранните структури изведнъж се яви в нова светлина [21]. Оказа се, че този въпрос е неразривно свързан с фазовата сепарация в изкуствените и евентулно нативните мембрани заради уникалната способност на холестерола да медира между среди с различна степен на подреденост. Неговият силен афинитет и към твърдите и към флуидните липидни фази отрано го определи като сериозен кандидат който да задава правилата на играта в мембранната латерална организация [22].



Фиг.8. Количествено разпределение и дислокация на холестерола в мембраните. (А) Съдържанието на холестерол в клетъчните мембрани се увеличава от ендоплазмения ретикулум (ER), през транс-Голджи мрежата (TGN) към плазмалемата (PM); (Б) Поради особеностите на химичната си структура, холестеролът предизвиква изпъване и плътно нареждане в опашките на фосфатидилхолина (PC) и се вгражда лесно между по-дългите вериги на сфингомиелина (SM) [4].

Като резултат от хетерополярното влечение на холестерола към реда и бъркотията, т.е. предпочитанието му към подредени ацилни вериги (характерни за гелната $L\beta$ или *твърдо-подредена* фаза) и в същото време добрата му разтворимост в течни фази, се наложи да бъде въведена нов тип липидна фаза – L_o , или т.нар. *течно-подредена* (англ. liquid-ordered) фаза [81]. На базата на експериментални данни от ЯМР (ядрено-магнитен резонанс) и калориметрия на холестерол-лецитинови смеси, тя бе първоначално предложена като термодинамично следствие от симетрията на бинарната система с две фази в течно състояние, различаващи се само по начина на опаковане на въглеродородните вериги [82]. Нормалната $L\alpha$, или сега наречена *течно-неподредена* (безпорядъчна, англ. liquid-disordered, L_d) фаза, както знаем, се характеризира с висока флуидност и голяма ротационна свобода на опашките. С намаляване на температурата под точката на топене (T_m), веригите застиват в подредената гелна $L\beta$ фаза с много ограничена свобода на движение. По подобие на нея, в индуцираната от холестерола L_o

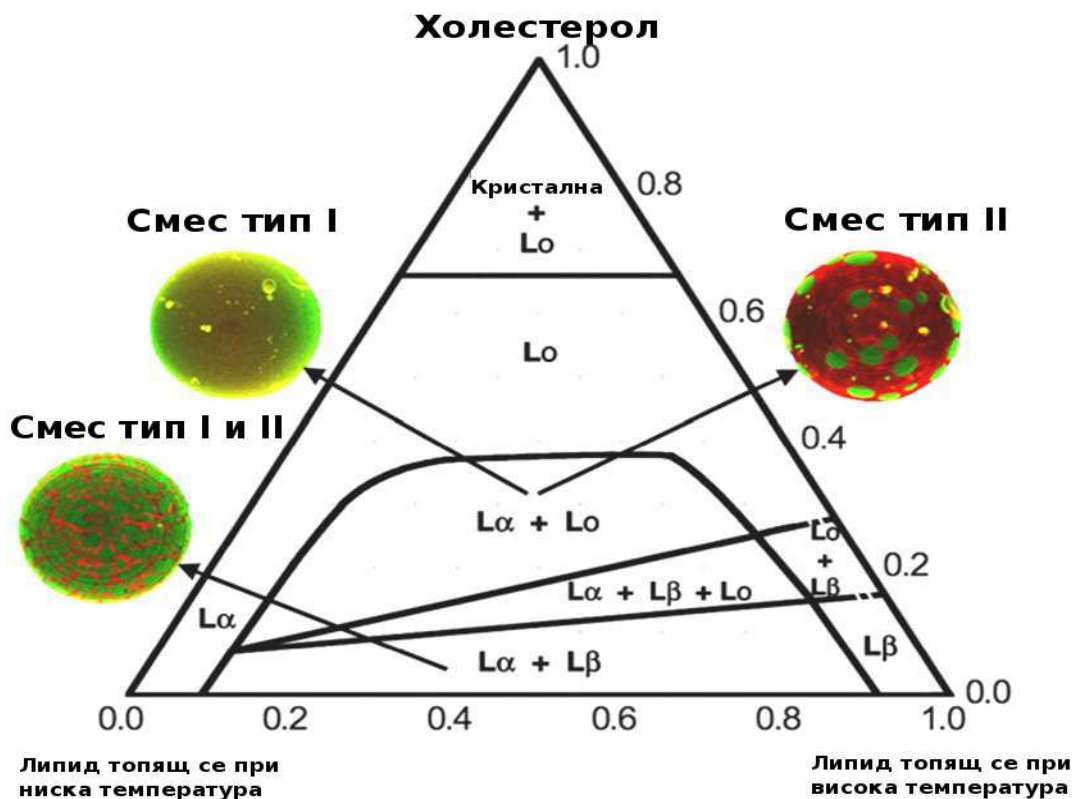
фаза, веригите са опънати и подредени (Фиг.8Б,9), но липидните молекули като цяло имат по-голяма подвижност в бислоя. Така, тази междинна фаза се явява по-подредена от гледна точка на молекулната конформация и едновременно по-неподредена по отношение на латералната структура. Тези нейни свойства я окачествиха като много привлекателна за малко по-късно формулираната ЛС хипотеза [22].



Фиг.9. Фазови състояния на липидите. В зависимост от температурата, хидратираният бислой може да съществува в гелна и течна фаза. За гелната са характерни слаби вътрешно- и междумолекулни движения с коефициент на дифузия $D < 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, докато при течната ротационната и латерална дифузия е голяма и дебелината на бислоя съответно намалява.

Преходът между двете фази за чисти липиди е стръмен и може да се проследи чрез диференциална сканираща калориметрия (DSC). С добавянето на холестерол острият пик в точката на топене T_m изчезва и бислоят преминава в L_o фазата, при която веригите са подредени, но се запазва високата латерална подвижност [83].

Един удобен начин за онагледяване на поведението на различни смеси са т.нар. фазови диаграми. В случая на моделни липидни системи много често се използват композиционните диаграми, т.е. тези които илюстрират изменението във фазовите състояния в зависимост от съдържанието на сместа. От практически съображения размерността на т.нар. композиционно пространство, над което се изследва фазовото поведение на сместа е ограничена и диаграмата се свежда до известния триъгълник на Гибс, по страните на който се отчита относителната концентрация на компонентите. Ето защо, макар естествените мембрани да са изградени от хиляди липиди и белтъци, засега се проучват фазовите състояния на моделни мембрани съставени от три липида (в случая на саловете единият от тях задължително е холестерол). Независимо от това неудобство, методът дава не малко информация за изследваната система като например преходите между отделните фази, границите между тях, областите на съвместно съществуване на две и три фази и т.н.



Фиг.10. Типична композиционна фазова диаграма на три-компонентна бислойна смес, съдържаща холестерол и два други липида, съответно с ниска и висока точка на топене. Точното разположение на фазовите граници зависи от конкретната химична природа на използваните липиди [75].

Три-компонентните смеси от холестерол и липиди с различна температура на топене притежават минималния брой съставки необходими за проявата на богато фазово поведение [80]. Натрупаният значителен обем експериментални данни от различни лаборатории и групи позволи да се идентифицират два различни начина на смесване на съставките при тях, означени като “тип I” и “тип II”. Такава характерна диаграма е дадена на Фиг.10. Тя показва, че като цяло фазовото поведение на двата вида смеси е аналогично, с известни различия в разположението на границите в зависимост от конкретните участници, като по-добре смесващите се компоненти дават по-малки участъци в които отделните фази съществуват съвместно. При “обичайното”, или тип II смесване, всички области на съвместно срещашите се фази са с размери от порядъка на микрометри така, че лесно се различават с конфокална микроскопия (Фиг.10, горе вдясно). Тип I смесите, също както и тип II, дават ясно различими области на $(L\alpha + L\beta)$ фазите поради резките ъглови характеристики на гелната фаза (Фиг.10, долу вляво). В районите на $(L\alpha + Lo)$ и $(L\alpha + L\beta + Lo)$ обаче, конфокалните образи на липозомите са с равномерно разпределение на флуоресценцията от маркерите които се вграждат преимуществено в съответните фази (Фиг.10, горе вляво). Същевременно, данните от експериментални техники, които са чувствителни в нано-диапазона, потвърждават наличието на тези съвместно съществуващи фази така, че се налага изводът за техните по-малки размери при тип I смесите, което ги прави малко по-релевантни в изучаването на ЛС структурите [75].

За съжаление, аналогията на ЛС с фазовото разделяне в простите моделни системи от три компонента, съдържащи стероли и сфинголипиди, тотално рухва когато става дума за разпределението в тях на т.нар. рафтофилни, т.е. предпочитащи ЛС областите [79, 84], трансмембранни белтъци. Те обикновено биват изтиквавани от Lo фазата в реконструирани протеолипозоми [85-86]. Съвсем сигурно, протеините имат голям принос в мембранната хетерогенност. Редуцирането на размерността чрез образуването на функционални липид-

белтъчни комплекси твърде вероятно е било едно от привилегированите направления в еволюцията на мембраните. Така, тяхната латерална нееднородност трябва да бъде разглеждана като коопериране между тези два основни вида биомолекули [76]. Клетъчните мембрани са обогатени на белтъци, които имат различно сродство към ЛС домените. Засега обаче, не е известно от какво то се определя. По-ранните индиректни изследвания на базата на DRM образци доказаха своята противоречивост и несъстоятелност. Усъвършенстването на препаративните методики дадоха възможност да се открият някои тенденции в регулацията на рафтофилността. Например палмитоилирането, т.е. ковалентното модифициране на полипептидите с палмитинова киселина закотвяща ги в бислоя, се оказва важно макар и невинаги достатъчно условие за локализацията им в ЛС зоните [86]. За интегралните белтъци от значение са също дължината на трансмембрания участък и първичната аминокиселинна последователност. Друг известен механизъм подпомагащ рафтофилността е свързването с бислоя посредством GPI (гликозилфосфатидилинозитол). В това направление от особен интерес е познаването на клетъчните механизми за поддържане на липидомния баланс. Вече са направени първите стъпки за изясняване на холестеролната хомеостаза [87]. Също така е демонстрирано, че в регулирането на нивото на глицеролипидите участват многобройни обратни връзки по пътищата на синтез и деградация. Натрупват се данни за тясната координация в метаболизма на стеролите и сфинголипидите, което донякъде подкрепя ЛС хипотезата [88].

Напоследък развитието на нови методи за получаване на моделни системи позволиха явленията на фазова сепарация да бъдат изучавани при условия по-близки до естествените. Постигнат е значителен успех с формирането на биологично по-сложни изкуствени бислойни мембрани, имитиращи състава на плазмалемата и едновременно с това преодоляващи проблемите дължащи се на интензивната му подмяна *in vivo*, както и тези свързани с цитоскелетните взаимодействия [76]. Така например, Баумгарт и сътр. показаха, че химично индуцирани гигантски плазмалемни везикули (англ. giant plasma membrane vesicles, GPMV) притежават температурно зависима способност да формират фазово разделяне от вида Lo – Ld, наблюдавано в по-елементарните протеолипозоми с контролирано липид-белтъчно съдържание [89]. Важно е да се отбележи, че зависимостта от температурата говори за намесата на колективно липидно поведение в този процес. Веднага обаче трябва да обърнем внимание, че и GPMV страдат от споменатия недостатък да изключват рафтофилните протеини от подредената и по-плътна опакована мембранна фаза [90]. Отпъпкуването на GPMV от плазмалемата на интактни клетки се предизвиква чрез обработката им в продължение на часове с параформалдехид (PFA) в комбинация с дитиотреитол (DTT). Кръстосаното свързване на полипептидите от PFA сигурно води до затормозяване на латералната им подвижност, а третирането с DTT нарушава палмитоилирането и оттам променя разпределението им във фазите.

Съвсем наскоро, групата на Каи Саймонс предложи нова плазмалемна система при която се спестява химичната обработка с PFA и DTT. С тази методика, чрез набъбване на клетки във фосфатен солеви буфер, се произвеждат т.нар. плазмалемни сфери (PMS) при които подобно на GPMV се избягват проблемите на вариацията в състава и цитоскелетното въздействие. Интересна черта на PMS е, че инкубацията им с пентавалентния холера токсин предизвиква широка холестерол-зависима фазова сепарация при физиологични температури (37°C). Измервания с помощта на багрилото C-laurdan дават любопитния резултат, че Lo фазата в GPMV проявява по-висока степен на подреденост отколкото съответната ѝ фаза в PMS породена от включването на ганглиозида GM1 [91]. Това подсказва въвличането на някаква химична специфичност (вероятно селективни протеинови релации), освен мембрания порядък, в евентуалната ЛС коалесценция. Най-същественото различие на PMS в сравнение с предишните моделни системи обаче е преимуществото им, че те сегрегират избирателно белтъците в различните фази, задържайки рафтофилните в GM1 фазата и изключвайки останалите от нея след агрегацията с холера токсина.

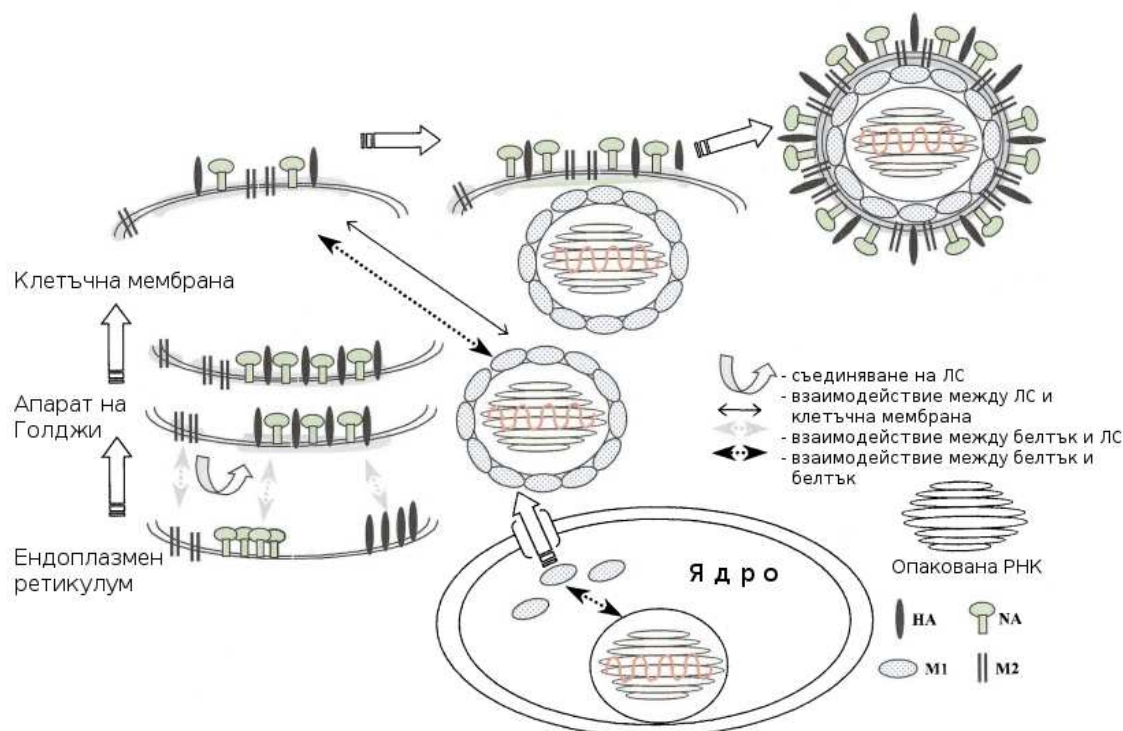
4. ПАТОЛОГИЧНИ ОТКЛОНЕНИЯ В БИОМЕМБРАНИТЕ СВЪРЗАНИ С ЛИПИД-БЕЛТЪЧНИТЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ЛАТЕРАЛНАТА ОРГАНИЗАЦИЯ

Все повече изследователи насочват вниманието си към ролята на ЛС и латералната мембранна компартиментализация при патологичните състояния на организма. Списъкът на заболяванията, при които важна роля заемат ЛС непрекъснато се обновява и расте.

ЛС при вирусни инфекции: Понастоящем се смята, че причинителите на няколко от широкосрещаните вирусни заболявания използват ЛС, за да инфектират клетките на гостоприемника и впоследствие за репликацията си. Към тези вируси се числят причинителите на грипа, хепатит Б и С, СПИН и др.

Сред първите вирусни заболявания, при които е изследвано ролята на ЛС в патологичния процес е грипа (фиг. 11). Грипния вирус съдържа два интегрални гликопротеини – хемаглютинин и невроаминидаза – за които се знае, че са тясно свързани с ЛС при вирусната репликация. Грипния вирус се образува върху богатата на ЛС апикална клетъчна мембрана на епителните клетки.[92]. Допускат се два механизма на вграждане на хемаглютинина в ЛС. Първият е чрез пряко свързване на холестерола към протеина. Вторият е, че самият хемаглютинин посредством трансмембрания си участък способства за формирането на високо подредени мембрани области както се вижда от резултатите при експерименти с моделни мембрани.

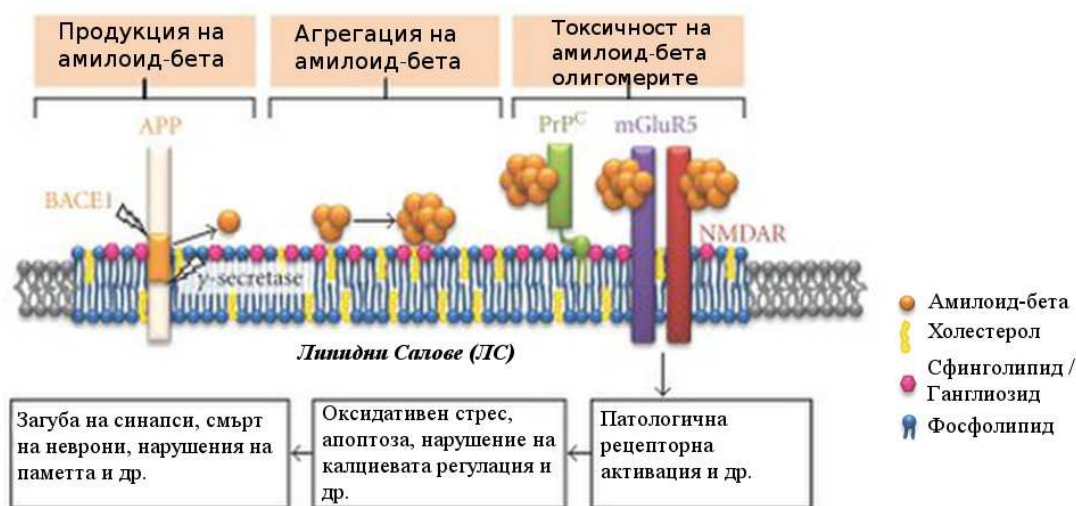
Все още малко се знае за механизмите на вграждане в мембраните и ЛС на другите протеинови части от грипния вирус свързани с тях. Има доказателства, че невроаминидазата също се вгражда в ЛС, към които е свързан хемаглютинина. Въпреки че, матричният протеин М1 не се наблюдава в ЛС, това се променя при едновременно наличие в ЛС на хемаглютинин и невроаминидаза. Счита се, че М1 бива привлечен към ЛС от цитоплазмените опашки на хемаглютинина и невроаминидазата. Протонно-каналният М2 протеин бива откриван по краищата на ЛС и се допуска, че спомага за обединяването на няколко ЛС в по-големи образувания водещи до формирането на зоната на пъпкуване. Взаимодействието на вирусните рибонуклеинови протеини с М1 протеините инициализира пъпкуването и освобождаването на новия вирус. [93].



Фиг. 11. Модел на образуването на грипния вирус и пъпкуването му посредством ЛС. [94]

Вирусът на СПИН подобно на грипния вирус също включва в своята обвивка протеини и липиди от ЛС на клетките на гостоприемника. Освен това той изплзва ЛС за още няколко ключови събития в жизнения си цикъл като: преминаването през лигавицата на гостоприемния организъм; проникването в имунните клетки; понижаване на прага на активация на Т-клетките и др. [95].

ЛС при заболявания на мозъка: *Болезтта на Алцхаймер* се характеризира с агрегация на така наречения амилоид-бета пептид и получаването на фибрилни плаки, което води до патологични изменения в мозъчната тъкан и нейното разрушаване. Самият амилоид-бета пептид е нормално срещан метаболитен продукт през онтогенетичния цикъл, без да е невротоксичен. Освен това скорошни изследвания показват, че неговата мономерна форма има неврозащитна роля в мозъка [96]. Неговите полимерни и по-специално неговите олигомерни форми получавани при агрегацията му са невротоксични. Изследванията сочат, че ЛС са с абнормна структура и състав при това заболяване и имат основна роля за агрегацията на този пептид [97]. Счита се, че ЛС са въввлечени както при синтезирането и олигомеризацията на амилоид-бета, така и при проявата на невротоксичност от страна на неговите агрегати (фиг. 12) [98].



Фиг. 12. Модел на участието на ЛС при продукцията, агрегацията, прилепването към невроните и токсичността на амилоид-бета олигомерите при болестта на Алцхаймер [98]

Два са пътищата по които се разгражда белтъка предшественик (APP) на амилоид-бета пептида: амилоидогенен (20%) и неамилоидогенен (80%). Въпреки, че болшинството от APP е разположен извън ЛС, изследванията сочат, че ензимните комплекси отговорни за амилоидогенната преработка на APP са свързани с ЛС. Наред с това холестерола един от важните компоненти на ЛС може да модулира процеса на агрегация на амилоид-бета като структурно модифицира другите компоненти на ЛС (като гликофинголипидите) към които той прилепва. Като в зависимост от вида на липида холестерола може или да стимулира, или да потисне агрегацията на амилоид-бета.

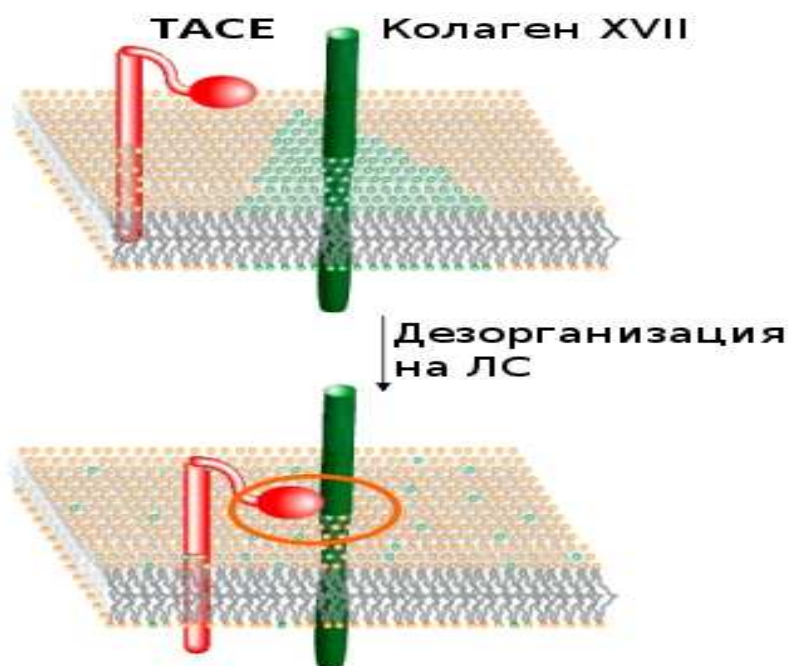
Невротоксичността на амилоид-бета олигомерите е свързана с образуване на комплекси и нарушаване функционирането на някои от синапсните рецептори, които са локализирани в ЛС и имат важна роля в процесите на научаване и запаметяване. Сред тях са N-метил-D-аспартатния рецептор (NMDAR) и метаботропния глутаматен рецептор 5 (mGluR5). Образуването на комплекси на амилоид-бета олигомерите с mGluR5 води до тяхното латерално преразпределение, което бива последвано от нарушена калциева обмяна [98].

ЛС играят роля и при трансмисивните спонгиформни енцефалопатии като болестта на Кройцфелд-Якоб, Куру, синдрома на Герстман-Щрауслер-Шайнкер и др. Понастоящем се знае, че тези енцефалопатии се причиняват от прион протеин с „лоша“ конформация. Прион протеинът (PrP^c) е кодиран в 20-тата хромозома и нормално се среща в невроните и Т-клетките. При тези енцефалопатии PrP^c търпи анормална специфична за болестта конформационна промяна (PrP^{Sc}), което намалява разтворимостта му и редуцира

възможността за неговото разграждане. Въпреки, че все още функцията на PrP(c) е неясна, засега се знае, PrP(c) е GPI-закотвен протеин и че и двете конформационни форми са свързани с ЛС, като се счита, че конформацонната промяна се осъществява именно там.

Интересно е да се отбележи, че ЛС, на които се намират прион протеините имат необикновени свойства – като висока концентрация на ненаситени мастни киселини и хексозилкерамизид в сравнение с другите ЛС [92].

ЛС при дерматологични заболявания: Изследванията сочат, че ЛС играят важна роля при увреди или наследствени заболявания на кожата свързани с появата на мазоли [99]. Стабилното прилепване на епидермиса към лежащата под него базална мембрана се осъществява от хемидезмозомите – специализирани белтъчни комплекси в базалните кератиноцити. При загуба на функцията на хемидезмозомните белтъци поради различни обстоятелства води до слабо прилепване епидермиса към дермата и поява на мазоли. ЛС участват в регулацията на биологичните функции на някои от хемидезмозомните белтъци като колаген XVII. Интегритетът на ЛС регулира накъсването на колаген XVII (фиг.13). Колаген XVII трансмембранен белтък, който основно е интегриран в ЛС, в резултат тази асоциация има ключова роля при смяната на кожата, тъй като се контролира достъпа до него от TACE. TACE е белтък локализиран извън ЛС, поради което той е пространствено разделен от колаген XVII. След разрушаването на ЛС молекулите на колаген XVII (повечето локализирани в ЛС) стават достъпни за ензимното действие на TACE, в следствие на което процеса на смяна на кожата се увеличава.



Фиг. 13. Роля на ЛС в регулацията на накъсването на колаген XVII и последващото образуване на мазоли. [99]

ЛС при алкохолна интоксикация: Все повече доказателства се натрупват за основната роля която играят ЛС в хепатоцитите при алкохолния оксидативен стрес [100]. Алкохолът променяйки структурата на ЛС в хепатоцитите, поражда спонтанно кълстеризиране на ЛС, поради повишена флуидност на мембраните. Допълнително алкохола окислява белтъците свързани с ЛС, индикатор за което е повишеното съдържание а малондиалдеhid-ацеталдеhid (МДА), който е вторичен краен продукт на окислените полиненаситени мастни киселини (ПНМК), които дифузирайки могат да взаимодействат със свободните аминокиселинни групи и липиди. Важно от терапевтична гледна точка е, че тиокарбамида и витамин Е взети превантивно подтискат образуването на МДА в ЛС породено от алкохола. Засега малко се знае за влиянието на хроничната алкохолна интоксикация върху функциите на ЛС в хепатоцитите.[101].

Макар и болшинството изследвания за ролята на ЛС при патологичните процеси в организма да са от това хилядолетие, интересът към тези взаимовръзки постепенно набира скорост. Познаването на тяхната роля в патологични състояния би ни дало ценни идеи за създаване на нови терапевтични средства и прилагането на нови лечебни процедури.

5.ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повече от три века след откритието на клетките науката все още не е отговорила на много въпроси касаещи безбройните им дейности. Каква е материалната база и какви са физичните принципи управляващи техните механизми? Мембраните, може би най-важните компоненти на клетките, не престават да ни удивляват с многообразието от структури и функции които изпълняват. В този кратък обзор направихме опит да отразим съвременното състояние на проблема за латералната организация на техния гръбнак – липидния бислой.

Флуидо-мозаичния модел на Сингър и Никълсън, изграждащ основата на модерните схващания за мембранната архитектура, очевидно се нуждае от корекции. В това отношение вече не малко е направено. Преодоляно е погрешното гледище за пасивната роля на липидите и няма съмнение, че тяхното разнолико фазово поведение е от изключително значение за широката гама от форми които клетъчните мембрани демонстрират в норма и патология. Постепенно се налага и мнението, че този структурен полиморфизъм, управляван донякъде чрез огромното богатство от липидни видове, съвсем не е случаен а е подчинен на специфичните клетъчни функции. Като една от най-възбуждащите теми в тази насока в последно време се очерта въпросът за субструктурата на бислоя в микро- и нано-мащаби. Концепцията за липидните “салове” ЛС разбуди въображението на много изследователи, показвайки за сетен път, че науката не е подчинена само на строгата логика и ледения разум. След първоначалната ѝ поява преди две десетилетия, ЛС хипотезата продължава да търпи развитие и е обект на критични дебати. Може би все още е сламка, а не греда от която да си направим сал, но не може да и се отрече заслугата, че даде силен подтик за всестранни проучвания на клетъчните мембрани и едва ли не стана причина за появата на липидомния бранш. Този духовен стимул беше крайно необходим след еуфорията на “пост-геномната ера”, покрай която интересите към липидите бяха почти замряли.

Както се казва, независимо от постигнатите успехи обаче, засега сме далеч от окончателното разбиране на мембранната хетерогенност на ниво липид-белтъчни взаимодействия и кооперативни ефекти в бислоя, както и относно функционалната им стойност за някои жизнено важни физиологични процеси. Имайки предвид дори само зашеметяващото количество на молекулните участници в тези процеси, не е трудно да си представим неимоверните трудности пред които са изправени специалистите от тази област. Искане ни се да се надяваме, че с непрекъснато усъвършенстващите се експериментални методи и разширяващите се възможности за проследяване *in situ* и *in vivo* на клетъчни реакции, протичащи във все по-малки пространствени и времеви мащаби, в скоро време ще бъдем в състояние да подредим поне част от мембрания puzzle на клетката.

Библиография

- [01] Schleiden, M.J. *Müller's Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.*; 1838, 136.
- [02] Schwann, T. *Mikroskopische untersuchungen über die übereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen.*, Berlin, 1839.
- [03] Jacob, F., *The Logic of Life: A History of Heredity.* New York, 1973.
- [04] Nelson, D.L., M.M.Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed., New York, 2005.
- [05] Mouritsen, O.G., **Life as a Matter of Fat. The Emerging Science of Lipidomics. Heidelberg, 2005.**
- [06] Мусил, Я., О.Новакова, К.Кунц, *Современная биохимия в схемах*, Москва, 1981.
- [07] Alberts, B., A.Johnson, D.Bray, J.Lewis, M.Raff, K.Roberts, P.Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York, 2002.
- [08] Gorter, E. and F.Grendel. *J.Exp.Med.* 1925,**41**, 439.
- [09] Singer, S.J., G.L.Nicolson. *Science*, 1972, **175**: 720.
- [10] Israelachvili, J.N. *Biochim. Biophys. Acta.* 1977, **469**, 221.
- [11] Israelachvili, J.N. In: *Light Transducing Membranes: Structure, Function, and Evolution*, 1978, 91.
- [12] Israelachvili, J.N., *Intermolecular and surface forces*, 2nd ed. London, 1991.
- [13] Mouritsen, O.G., M.Bloom. *Biophys. J.* 1984, **46**: 141.
- [14] Jensen, M.Ø., O.G.Mouritsen. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, **1666**, 205.
- [15] Sackmann, E. In: *Biological Membranes*, 1984, **5**, 105.

- [16] Lipowsky, R., E.Sackmann (Eds), Structure and Dynamics of Membranes. Amsterdam, 1995.
- [17] Kinnunen, P.K.J. *The Open Biol.J.*, 2009, **2**, 163.
- [18] Simons, K., J.L.Sampaio. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011, **3**, 1.
- [19] Yeagle, P.L. *Biochim. Biophys. Acta Biomembrane Rev.* 1985, **822**, 267.
- [20] Bloom, M., O.G.Mouritsen. *Can.J.Chem.* 1988, **66**, 706.
- [21] Mouritsen, O.G., M.J.Zuckermann. *Lipids*, 2004, **39**: 1101.
- [22] Mouritsen, O.G. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, **1798**, 1286.
- [23] Yetukuri, L., K.Ekroos, A.Vidal-Puig, M.Oresic. *Mol. Biosyst.*, 2008, **4**, 121.
- [24] Landh, T. *FEBS Lett.*, 1995, **3691**, 13.
- [25] **Petrov, A.G., The Lyotropic State of Matter. Molecular Physics and Living Matter Physics. New York, 1999.**
- [26] Griffin, W.C. *J.Soc.Cosmetic Chemists* 1949, **1**, 311.
- [27] Kauzmann, W. *Adv. Protein Chem.*, 1959, **14**, 1.
- [28] Frolov, V.A., A.V.Shnyrova, J.Zimmerberg. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.*, 2011.
- [29] Luzzati, V., In: *Biological Membranes*, 1968, 71.
- [30] Seddon, J.M. *Biochim.Biophys.Acta.*, 1990, **1031**, 1.
- [31] Lewis, R.N.A.H., D.A.Mannock, R.N.McElhaney. In: *Lipid Polymorphism and Membrane Properties*, 1997,25.
- [32] Luzzati, V., F.Reiss-Husson, E.Rivas, T.Gulik-Krzywicki. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1966, **137**, 409.
- [33] Tanford, C. The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles & Biological Membranes, New York, 1980.
- [34] Israelachvili, J.N., S.Marcelja, R.L.Horn. *Quart.Rev.Biophys.*, 1980, **13**, 121.
- [35] Cevc, G., D.Marsh, Phospholipid Bilayers. Physical Principles and Models. New York, 1987.
- [36] Marsh, D. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, **1286**, 183.
- [37] Israelachvili, J.N., D.J.Mitchell, B.W.Ninham. *J.Chem.Soc.Faraday Trans.II*, 1976, **72**, 1525.
- [38] Cherezov, V., J.Clogston, Y.Misquitta, W.Abdel-Gawad, M.Caffrey. *J.*, 2002, **83**: 3393.
- [39] Larsson, K., P.J.Quinn. In: *The Lipid Handbook*, 1994.,
- [40] Ladha, S. *Grasas y Aceites*, 2000, **51**, 56.
- [41] Seddon, J.M., R.H.Templer. In: *Handbook of Biological Physics*, 1995, **1**, 3, 97.
- [42] Shearman, G.C., O.Ces, R.H.Templer, J.M.Seddon. *J. Phys.: Condens. Matter*, 2006, **18**, S1105.
- [43] Lindblom, G., L.Rilfors. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, **88**, 221.
- [44] Seddon, J.M., R.H.Templer. *Phil.Trans.R.Soc.Lond.:Phys.Sci.Eng.*, 1993, **344**, 1672, 377.
- [45] Larsson, K. *J.Phys.Chem.* 1989, **93**, 7304.
- [46] Larsson, K. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2000, **5**, 64.
- [47] Charvolin, J., J.F.Sadoc. *J.Phys., France*, 1988, **49**, 521.
- [48] Seddon, J.M., E.A.Bartle. In: *The Structure and Conformation of Amphiphilic Membranes*, 1992, 257.
- [49] Luzzati, V. *J.Phys. II France*, 1996, **6**, 405.
- [50] Luzzati, V. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1997, **7**, 661.
- [51] Charvolin, J. *J.Phys., France, Colloq.*, 1985, **46**, C3, 173.
- [52] Scriven, L.E. Equilibrium bicontinuous structure, *Nature, Lond.* 1976, **263**, 123.
- [53] Hyde, S.T. *Curr. Opin. Solid State Mat. Sci.*, 1996, **1**, 653.
- [54] Larsson, K., F.Tiberg. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2005, **9**, 365.
- [55] Larsson, K., K.Fontell, N.Krog. *Chem. Phys. Lipids*, 1980, **27**, 321.
- [56] Razumas, V., Z.Talaikytė, J.Barauskas, K.Larsson, Y.Miezis, T.Nylander., *Chem.Phys. Lipids*, 1996, **84**, 123.
- [57] Pike, L.J. *J. Lipid Res.*, 2009, **50**, 323.
- [58] Sonnino, S., A.Prinetti. *Front.Physio.* 2010, **1**, 153.
- [59] Lee, A.G., N.J.Birdsall, J.C.Metcalf, P.A.Toon, G.B.Warren. *Biochemistry*, 1974, **13**, 3699.
- [60] Stier, A., E.Sackmann. *Biochim. Biophys..Acta*, 1973, **311**, 400.
- [61] Hui, S.W., D.F.Parsons. *Science Wash. D. C.*, 1975, **190**, 383.
- [62] Klausner, R.D., D.E.Wolf. *Biochemistry*, 1980, **19**: 6199.
- [63] Wunderlich, F., W.Kreutz, P.Mahler, A.Ronai, G.Heppeler. *Biochemistry*, 1978, **17**, 2005.
- [64] Karnovsky, M.J., A.M.Kleinfeld, R.L.Hoover, R.D.Klausner. *J. Cell Biol.* 1982, **94**, 1.
- [65] Rajendran, L., K.Simons. *J.Cell Sci.*, 2005, **118**, 1099.
- [66] Lingwood, D., K.Simons. *Science* 2010, **327**: 46.
- [67] Simons, K., G.van Meer. *Biochemistry*, 1988, **27**, 6197.
- [68] Brown, D.A., J.K.Rose. *Cell*, 1992, **68**, 533.
- [69] Simons, K., E.Ikonen. *Nature*, 1997, **387**, 569.
- [70] Tanner, W., J.Malinsky, M.Opekarova. *The Plant Cell*, 2011, **23**, 1191.
- [71] Simons, K., W.L.Vaz. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2004, **33**, 269.
- [72] Simons, K., M.J.Gerl. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 2010, **11**, 688.
- [73] Pike, L.J. *J. Lipid Res.*, 2003, **44**, 655.
- [74] Goñi, F.M., A.Alonso, L.A.Bagatolli, R.E.Brown, D.Marsh, M.Prieto, J.L.Thewalt. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1781**, 665.
- [75] Feigenson, G.W. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1788**, 1, 47.
- [76] Coskun, Ü., K.Simons. *FEBS Letters*, 2010, **584**, 1685.
- [77] Pike, L.J. *J. Lipid Res.*, 2006, **47**, 1597.
- [78] Lichtenberg, D., Goni, F. M., Heerklotz, H. *Trends Biochem. Sci.*, 2005, **30**, 430.
- [79] Brown, D.A. *Physiology (Bethesda)*, 2006, **21**, 430.
- [80] Veatch, S.L., O.Soubias, S.L.Keller, K.Gawrisch. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 2007, **104**, 45,17650.
- [81] Ipsen, J.H., G.Karlström, H.Wennerström, O.G.Mouritsen, M.J.Zuckermann. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, **905**, 162.
- [82] Heimburg, T. Thermal Biophysics of Membranes. Berlin, 2007.

- [83] Milhiet, P.E., M.C.Giocondi, C.LeGrimellec. *TheScientificWorldJOURNAL*, 2003, **3**; 59.
- [84] Kusumi, A., K.Suzuki. *Biochim.Biophys.Acta*, 2005, **1746**, 234.
- [86] Levental, I., D.Lingwood, M.Grzybek, Ü.Coskun, K.Simons. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,2010, **107**, 22050.
- [85] Sengupta, P., A.Hammond, D.Holowka, B.Baird. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1778**, 20.
- [87] Brown, M.S., J.L.Goldstein. *J. Lipid. Res.*, 2009, **50**, S15.
- [88] Hannich, J.T., K.Umebayashi, H.Riezman, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011, **2011**, doi:10.1101/cshperspect.a004762.
- [89] Baumgart, T., A.T.Hammond, P.Sengupta, S.T.Hess, D.A.Holowka, B.A.Baird, W.W.Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, **104**, 3165.
- [90] Hammond, A.T., F.A.Heberle, T.Baumgart, D.Holowka, B.Baird, G.W.Feigenson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**, 6320.
- [91] Kaiser, H.J., D.Lingwood, I.Levental, J.L..Sampaio, L.Kalvodova, L.Rajendran, K.Simons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009, **106**, 16645.
- [92] Simons, K., R. Eehalt. *J. Clin. Invest.*, 2002, **110**, 597.
- [93] Veit, M., B. Thaa, *Advances in Virology*, 2011, **2011**, doi:10.1155/2011/370606
- [94] Chazal, N., D. Gerlier. *Microbiol. and Mol.Biol. Rev.*, June 2003, 226.
- [95] Fantini, J., N. Garmy, R. Mahfoud, N. Yahi. *Expert Rev. in Mol. Med.*, 2004, **4**, 27.
- [96] Giuffrida M.L., Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, Molinaro G, Pappalardo G, Messina A, Palmigiano A, Garozzo D, Nicoletti F, Rizzarelli E, Copani A. *J Neurosci.*, 2009, **29**, 34, 10582.
- [97] Martín V, Fabelo N, Santpere G, Puig B, Marín R, Ferrer I, Díaz M. *J. Alzheimers Dis.*, 2010, **19**, 2, 489.
- [98] Rushworth, J.V., N.M. Hooper. *Int. J. of Alzheimer's Disease*, 2011, 2011, doi:10.4061/2011/603052
- [99] Zimina, E., L. Bruckner-Tuderman. *The Open Dermat. J.*, 2009, **3**, 173.
- [100] Nourissat P, Travert M, Chevanne M, Tekpli X, Rebillard A, Le Moigne-Müller G, Rissel M, Cillard J, Dimanche-Boitrel MT, Lagadic-Gossmann D, Sergent O. *Hepatology*, 2008; **47**, 59.
- [101] Dolganiuc, A. *World J Gastroenterol*, 2011, **17**, 20, 2520.