

Биофизика мембранных процессов и мембранного транспорта

Программа курса (2020/2021)

Электродные методы в биологии. Электроды сравнения (Ag/AgCl), капиллярные микроэлектроды, ион-селективные электроды, амперометрическое определение O₂, устройства для электропорации, вибрирующие электроды.

Модельные мембр. системы. Осциллятор Теорелла. Липидные модели: монослои, мицеллы, плоские БЛМ, липосомы, нанотрубки. Поверхностное натяжение (расчет σ воды для кубической модели расположения молекул). ПАВ, поверхностное давление монослоя. Давление под искривленной поверхностью (в капле воды). Роль кривизны поверхности в формировании плоских БЛМ. Форма молекул липидов и их связь с дефектами в БЛМ. Оптич. и электродные показатели формирования БЛМ. Деформации мембран: изгиб, растяжение, сжатие (электрострикция). Оценка радиуса нанотрубок с учетом σ и модуля изгиба.

Электрохим. потенциал. Взаимодействия иона с р-рителем: энергия иона в воде и неполярной фазе (ф-ла Борна). Профили энергии иона в мембране. Физ. механизмы действия ионофоров. Переносчики (валиномицин), липофильные к-ты. Каналообразующие ионофоры (грамицидин А). Ионное равновесие между растворами, разделёнными мембраной. Ур-ие Нернста; равновесные потенциалы для K⁺ и Na⁺. Равновесие Доннана. Равновесие в двойном эл слое (ДЭС). Уравнения Пуассона и Пуассона–Больцмана. Приближение Дебая: изменение потенциала в ДЭС. Длина экранирования λ поверхностного заряда, её зависимость от конц-ии электролита. Эксперим. определение внутримембр. эл. поля в БЛМ (потенциодинамические измерения).

Двойной эл. слой. Отсутствие электронейтральности в ДЭС. Теория Гуи-Чэпмена: исходные положения и вывод ф-лы. Зависимость поверхн. потенциала от конц-ии электролита. Эл. емкости ДЭС и БЛМ. Взаимодействие ДЭС при сближении мембран. Расчет сил эл-стат. отталкивания. Дополнение к теории Гуи-Чэпмена: сдвиги σ при связывании ионов с мембраной. Ионное равновесие на границе фаз “вода–масло”. Распределение конц-ий ионов и разность эл. потенциалов (РЭП) между водой и неполярным р-рителем. Вклад в межфазную РЭП скачков потенциала в водной и неполярной фазах. Зависимость межфазной РЭП от толщины неполярной фазы; её отсутствие в тонких мембранах (БЛМ).

Электродиф. теория транспорта ионов. Ур-ие Нерста-Планка. Связь коэф. диффузии с подвижностью иона. Особенности диффузии в воде катионов щел. металлов. Диф. потенциал на крупнопористой мембране и в области жидкостного контакта (ур-ие Планка-Гендерсона). Теория постоянного поля: исходные постулаты и ур-ие для потока ионов. Проницаемость P_j . Анализ ур-ия Гольдмана-Ходжкина-Катца (Г-Х-К) для потока ионов. Выпрямляющие св-ва м-ны, вольт-амперная х-ка (ВАХ). Редукция ур-ия Г-Х-К до ур-ий Нернста и диффузии при $I = 0$ и $\phi = 0$, соответственно. Проводимость мембран (проводимость g при равных конц-иях иона снаружи и внутри клетки). Эквив. схема возбудимой мембраны (по Ходжкину–Хаксли). Ионные токи в покое (при разомкнутой внешней цепи) и при фиксации потенциала. Зависимость мемб. потенциала от эдс и проводимостей потенциалобразующих ионов (K⁺ и Na⁺). Соотношение Уссинга.

Вывод ур-ия Г-Х-К для мемб. потенциала на основе электродиф. теории. Описание транспорта ионов (в каналах) на основе теории скоростей р-ций. Потенциалозависимая и независимая компоненты энергии активации. Ур-ие для потока ионов. Сравнение дискретного и непрерывного (эл-диф) описаний: ВАХ, проницаемость, ф-ла Уссинга. Профили энергии в Na-канале (по Хилле). Взаимодействия ионов в каналах: эффекты насыщения и блокировки

проводимости. Функции состояния канала: кинетические ур-ия для описания переходов между разными состояниями канала.

Влияние эл полей на липидные и клет. мембраны. Деформации клеток в эл поле. Сила, действующая на клетку в эл поле (максвеллово напряжение). Сжатие клетки в низкочастотном поле и растяжение клетки по полюсам на высоких частотах. Электростимулируемое слияние мембран. Вытягивание клеточных отростков в эл поле. Электрофорез: баланс сил при движении частиц. Влияние гликокаликса на ЭФ подвижность. Диэлектрофорез (ДЭФ). Зависимость от напряженности поля. Поляризация клетки при разных частотах эл. поля. Положит и отриц ДЭФ. Частота перехода от отриц. к положит. ДЭФ. Электровращение клеток и липосом. Импеданс: активная и реактивная составляющие для параллельного соединения емкости и резистора; зависимости этих составляющих от частоты, модуль импеданса.

Устойчивость мембран в эл поле. Электромех. модель эл пробоя (Кроули). Баланс сил эл. сжатия и силы упругости. Графическое решение балансного ур-ия. Критическое сжатие м-ны. Эл пробой мембран как следствие образования–залечивания сквозных пор (Чизмаджев). Изменения энергии мембраны при образовании поры. Влияние эл потенциала на зависимость энергии поры от её радиуса. Зависимость критич. радиуса и критич. энергии активации от мембр. потенциала и геометрии липидных м-л. Стадии эл пробоя: образование гидрофобной и гидрофильной поры. Обратимый и необратимый эл пробой плоских БЛМ (метод изучения пробоя БЛМ). Эл пробой клеток и везикул во внешнем эл поле. Набухание клеток при эл пробое. Слияние мембран (биол. примеры). Гидратные силы, стимуляция электрослияния при осмотическом обезвоживании контакта м-н и при действии эл поля. Этапы слияния и диаграмма изменений энергии при слиянии мембран.

Эл. поля в фотосинт м-нах. Влияние ΔpH на транспорт электронов и тушение возбужд состояний в ФС2. Электрохромные изменения поглощения каротиноидов как показатель генерации эл потенциала $\Delta\phi$. Фотоактивация переноса электронов на акцепторной стороне ФС1. Влияние эл поля на энергию ионов в мембране. Расположение доноров и акцепторов в мембране в области ФС2. Влияние эл. поля на разделение и рекомбинацию зарядов в ф-синт мембране. Модель обратимой радикальной пары. Влияние локального эл поля, создаваемого зарядом на акцепторе Q_A , на энергию состояния с разделенными зарядами P^+G . Эксп подтверждения влияния эл поля на фл-ию Хл. Оценки вклада $\Delta\phi$ и ΔpH в эл-хим градиент H^+ по изменениям сигнала ΔA_{515} в ответ на выключение света. Зависимость знака диф. потенциала, устанавливающегося в первые моменты после затенения, от преобладания проводимости для H^+ или K^+ . Электролюминесценция. Вклад фотосистем ФС1 и ФС2 в замедленное свечение, стимулируемое эл полем.

Течение цитоплазмы как механизм внутриклеточного и межклеточного транспорта метаболитов и дальней сигнализации. Сравнительная эффективность диффузии и конвекции для внутриклеточного переноса веществ на сантиметровые расстояния. Числа Пекле и Рейнольдса. Взаимодействия актина и миозина как основа движения цитоплазмы. Эксперим. изучение дальней метаболической регуляции фотосинтеза и транспорта протонов через плазматическую мембрану. Проницаемость плазмодесм для фотометаболитов и её обратимые сдвиги при изменениях осмотического давления среды.

Особенности мембр процессов в клетках и органеллах: удельная поверхность (S/V), pH в малых объемах (тилакоиды), гетерогенность мембран (рафты, кластеризация каналов, *Chara*, *Chlamydomonas*). Механизмы транспорта: диффузия через липидный бислой, правило Овертона, взаимодействия углеродных наночастиц с м-нами. Каналы и переносчики: время переноса и количество переносимых ионов. Искусственные ионные насосы: фотоперенос редокс-активных катионов (феназинметосульфат, тетрафенил-п-фенилендиамин) в хлоропластах растений и хроматофорах бактерий. Конкуренция путей электронного

транспорта, опосредованного природными переносчиками и редокс медиатором. Светозависимый активный транспорт Ca^{2+} в модельной м-не. Модификаторы проницаемости.

Функции проницаемости: осмотическая регуляция у растительных клеток (клетки устьиц, галофильные водоросли). Регуляция объема животных клеток (клетки эпителия). Системы регуляторного уменьшения и увеличения объема. Локальные изменения объема при миграции клеток; изменения объема при апоптозе и некрозе. Флуоресцентные методы оценки проницаемости липосом: маркеры слияния, лизиса и пермеабиллизации м-н.

Диффузия: перенос неэлектролитов через мембрану, перенос ионов на малые расстояния, транспорт в перемешиваемых слоях. Формула Стокса-Эйнштейна. Связь коэффициента диффузии иона с подвижностью и зарядом иона. Первый и второй законы Фика для случая одномерной диффузии. Нормальное распределение диффундирующего вещества (распределение Гаусса) и его изменение во времени. Кинетика изменений конц-ии диффундирующего вещества на разном удалении от источника. Диффузия веществ из среды в клетки и мембр. везикулы. Кинетика изменения конц-ии во внутреннем объеме. Характерные времена диффузии τ и $t^{1/2}$.

Диффузия в перемешиваемом слое (НС). Градиенты рН в НС. Изменения конц-ии на границе с мембраной при изменении состава среды. Связь между коэф. диффузии, толщиной НС и характерным временем диффузии τ (и $t^{1/2}$). Регистрация рН на границе с БЛМ с помощью рН-электродов и по изменениям $\Delta\phi$ в присутствии протонофоров. Профили конц-ии диффундирующего в-ва в НС и мембране (лимитирующие стадии). Эффективный коэф. диффузии (влияние НС). Полусферическая диффузия из точечного источника (БЛМ малой площади) в объем раствора: профиль конц-ии на разном удалении от БЛМ.

Радиальная диффузия ионов в корнях и клетках харовых водорослей. Расчет трансмембр. потока ионов по измерениям конц-ий на разном удалении от клетки. Определение времени диффузии методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Латеральная диффузия H^+ в искусств. и энергосопрягающих мембранах. Диффузия H^+ в присутствии иммобилизованного и подвижного буфера. Эффективный коэф. диффузии с учетом влияния неподвижного буфера. Трансмембр. поток H^+ в присутствии подвижного буфера.

Проницаемость клеток для воды и неэлектролитов. Осмос. Уравнение Вант-Гоффа. Осмотическое поднятие воды. Клетка как осмометр; неосмотический объем. Роль аквапоринов в осмотич. изменениях объема. Поднятие воды в растениях. Капиллярное поднятие воды. Течение воды в капиллярах: вывод уравнения Пуазейля. Перепад давлений, необходимой для поднятия воды в растении.

Водный потенциал, осмотич. потенциал, осмотич. давление; методы определения. Уравнения для потока воды. Гидравлическая проводимость, коэфф. отражения. Внутриклет. датчики давления. Изменения внутриклет. давления в гидростатических и осмотических опытах. Определение мех свойств клеток и мембран методом внутриклет датчиков давления. Определение модуля объемной упругости, гидравлической проводимости и коэфф. отражения. Аномальный осмос (на примере клеток *Chara* в норме и при повреждении аквапоринов).

Электроосмос, электрофорез, электрокинет. явления. Двойной эл слой, электрокинет. дзета потенциал, сравнение с поверхностным потенциалом. Вывод уравнения Смолуховского. Биол. примеры. Электроосмотич. процессы в модели плоскопараллельного контакта двух БЛМ. Оценка скорости электроосмотич. сближения и расхождения БЛМ. Потенциал течения.

Проникающие ионы. Примеры (тетрабутиламмоний, DDA^+ , TFB^- , TFF^+). Использование для оценки мембр. потенциала (МП). Влияние неспецифического (электростатич) связывания с фиксирован. зарядами мембран. Выбор заряда зондов в зависимости от полярности МП. Оценки дипольного потенциала мембран. Метод компенсации 2-ой гармоники емкостного

тока. Биол. эффекты поверхн. заряда и потенциала. Влияние на рН у поверхности, сдвиг рК, стэкинг и агрегацию. Уравнение Гуи-Чэпмена. Определение поверхн. заряда по изоэфф-ым конц-иям одно- и двухвалентных ионов. Определение плотности фиксир. зарядов по скорости реакций, протекающих с участием заряженных редокс медиаторов на поверхности мембран. Зависимость скорости реакции от концентрации фонового электролита.

Способы оценки распределения проникающих ионов. Цианиновые флуоресцентные зонды. Определение мембр. потенциала методом нулевой точки. Оксооловые и мероцианиновые зонды. Электрохромизм каротиноидов хлоропластов и хромофоров бактерий. Зависимость спектр. сдвига от напряженности поля, дипольного момента молекул и их поляризуемости.

Транспорт слабых к-т и оснований через мембраны. Уравнение Гендерсона-Хассельбалха. Относительное содержание CO_2 , HCO_3^- и CO_3^{2-} в уравновешенных с воздухом водных р-рах при разных рН. Продольные профили рН в клетках харовых водорослей. Их влияние на уровень Ca^{2+} в примемб областях. Буферная емкость воды и растворов слабых к-т (оснований). Распределение аминов в мембр системе (метиламин, 9-аминоакридин). Разобщающее действие аминов, объемные изменения хлоропластов. Амины как зонды ΔpH . Определение ΔpH , создаваемого H^+ насосом в мембранных везикулах, с помощью флуоресцентных зондов. Зонды для определения ΔpH . Смещение рН цитоплазмы с помощью слабых кислот (бутират) и оснований (аммоний).

Определение внутриклеточного рН с помощью производных флуоресцеина. Спектры возбуждения при разных рН; диапазон измеряемых значений рН. Загрузка зондов. Нефотоким тушение фл-ции хлорофилла в фотосинт системах как показатель ΔpH тилакоидов. Метод насыщающих световых импульсов. Вывод формулы для определения квантового выхода фотохим процессов. Факторы, определяющие нефотоким тушение: pH_{in} (образование ΔpH). Определение рСа с помощью флуоресцентных зондов.

Транспорт ионов и ионная проницаемость м-н. Эксп. и теор основы для анализа эл-физиол. данных. Оценка проводимости мембран и водных растворов. Измерения мембр. потенциала хлоропластов. Интерпретация кинетических кривых фотопотенциала в норме и при действии хим. агентов. Метод фиксации тока в изучении эл. свойств биомембран. Эквив. схема измерений. Постоянная времени м-ны τ . Определение проводимости м-н хлоропластов по кинетике релаксации МП после вспышки. Оценка проводимости сопрягающего фактора CF_0 по данным о влиянии света и ингибиторов на кинетику темновой релаксации потенциала. Кабельные свойства волокон; постоянная длины λ . Зависимость λ от радиуса волокна. Особенности фиксации тока в клетках цилиндрической формы.

Метод фиксации напряжения. Эквив. схема измерений. Временное разрешение в методах фиксации тока и потенциала. Точность фиксации напряжения. Два метода определения сопротивления мембраны (хордовое сопротивление по Ходжкину-Хаксли и сопротивление, определяемое по углу наклона вольт-амперной кривой). Влияние последовательного сопротивления на отриц сопротивление возбудимой мембраны. Ионные каналы раст. клеток. Проникновение чужеродных катионов (метилвиологен) при возбуждении клетки.

Метод пэтч-кламп. Конфигурации измерений. Межклеточные контакты. Строение и проницаемость плазмодесм. Определение сопротивления межклеточных контактов для пары контактирующих клеток. Входное сопротивление, коэффициент межклеточной эл. связи. Проявления межклеточной связи в зеленых клетках растений.

Свойства открытых каналов. Вольт-амперные характеристики (ВАХ). Сравнение ВАХ в моделях Гольдмана и Эйринга (3х-барьерная модель). Основы ионной селективности. Проницаемость и константа связывания иона в канале. Зависимости тока открытых каналов

от концентрации проникающего иона. Определение селективности каналов по амплитуде тока при активации каналов, по сдвигу потенциала реверсии. Влияние блокаторов на проводимость канала: определение числа участков связывания (уравнение Хилла и его линеаризация).

Воротные свойства каналов. Простейшая кинетич. модель. Вероятность открытого состояния как функция мембр. потенциала. Постоянные времени активации и инактивации (связь с константами открывания и закрытия каналов). Кинетич. модель с тремя состояниями канала: $N_0 \leftrightarrow N_1 \leftrightarrow N_2$. ВАХ в системе с большим числом каналов. Условие появления участка отриц. сопротивления. Определение заряда воротных частиц. Кинетич. модель транспорта ионов с участием нейтрального переносчика (с учетом потенциал-независимых и зависимых стадий). ВАХ мембраны с переносчиком.

Активный транспорт: бактериородопсин, цитохромоксидаза, транспортные АТФазы и др. Активный транспорт H^+ в простой хемиосм. системе. Термодинам. соотношения для обратимого АТФ-зависимого H^+ насоса. Регуляция H^+ -АТФазы плазмалеммы (роль 14-3-3 белков, действие фузикокина, влияние изменений $[Ca^{2+}]$ при потенциале действия). Модель активации H^+ -АТФазы хлоропластов электрохим. градиентом протонов (в предположении, что вклад $\Delta\phi$ в $\Delta\mu_{H^+}$ незначителен). Зависимость доли активных АТФаз θ от величины $\Delta\mu_{H^+}$. H^+ -АТФаза сопрягающих мембран: строение, вращение γ субъединицы, роль электростатич. взаимодействий в направлении вращения при синтезе и гидролизе АТФ. Na,K-насос. Схема Поста-Альберса. Методы исследования (реконструир. системы, флуоресцентные зонды).

Транспорт белков через биомембраны. Импорт белков в хлоропласты. Транзитные пептиды. Строение транслокационного комплекса. Роль ГТФ, АТФ, 14-3-3 белков. Ионные каналы внутренней мембраны оболочки хлоропласта, связанные с транслокационным комплексом.