Cytoplazmatická membrána a jej fluidita

Marcela Morvová Jr.[1]

Libuša Šikurová[2]

[1,2]Katedra jadrovej fyziky a biofyzika
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky
Univerzita Komenského v Bratislave
Mlynská dolina F1, 842 48 Bratislava
Slovensko

[1]Marcela.Morvova2@fmph.uniba.sk
[2]sikuroval@gmail.com

Cytoplasmatic membrane and its fluidity

Abstract

The article shows the effect of cytoplasmic cell membrane composition on membrane fluidity. It also highlights the role of membrane fluidity and discusses the possibilities of its evaluation.

Key words

Membrane, fluidity

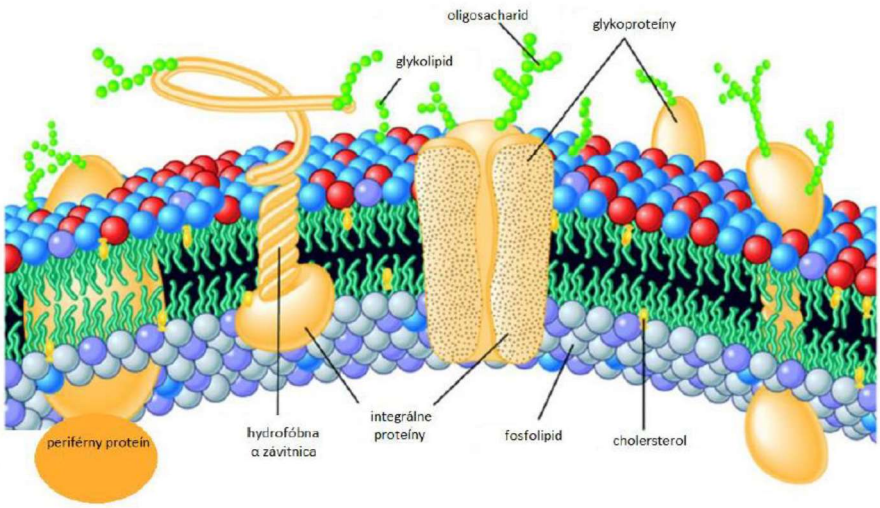
Úvod

Biologická membrána umožňuje existenciu života ako ho poznáme. Tvorí semipermeabilnú bariéru medzi bunkou (resp. organelou) a vonkajším prostredím, čím umožňuje komunikáciu bunky s okolitým prostredím a tým kontroluje zloženie bunky. Pojem biologická membrána zahŕňa jednak cytoplazmatickú (bunkovú membránu), ako aj membrány jednotlivých organel (ako napríklad endoplazmatického retikula, obalu jadra, Golgiho apartátu či mitochondrií). Cytoplazmatická (bunková) membrána slúži ako bariéra oddeľujúca vnútorné prostredie bunky od okolia, a preto jej funkčný stav je rozhodujúcim faktorom pre prežitie bunky. Je dôležitou bunkovou štruktúrou, na ktorej sa odohrávajú mnohé signalizačné, biochemické a metabolické procesy vyžadujúce kontrolované prostredie. Vlastnosti membrány závisia najmä od jej zloženia a je preto prirodzené, že si bunky zloženie svojej membrány prísne regulujú. Zároveň je však aj cieľovou štruktúrou pre mnohé liečivá využívané v terapii patologických stavov a aj mnohé mechanizmy ich účinku súvisia práve s cytoplazmatickou membránou a jej fyzikálnymi vlastnosťami. Medzi významné fyzikálne vlastnosti patrí membránová fluidita.

Bunková membrána

Cytoplazmatická membrána je dvojvrstva lipidových molekúl, približne 5 nm široká, ktorá oddeľuje vnútorné prostredie bunky od vonkajšieho. Dôležitá je preto regulácia jej zloženia, ktorá slúži ako odpoveď na zmeny teploty, pH a ďalších faktorov. Je dlho známe, že okrem funkcie selektívnej bariéry, biologické membrány zohrávajú fundamentálnu rolu pri plnení fyziologických úloh. Väčšina biochemických a biofyzikálnych procesov v bunke sa odohráva na membráne. Typická membrána sa skladá z lipidov, ktoré tvoria jej základnú štruktúru, bielkovín, ktoré tvoria transportné mechanizmy, a sacharidov, ktoré tvoria rozpoznávacie molekuly (Obr. 1).

Obr. 1: ***Štruktúra bunkovej membrány*** *(upravené podľa Karp 2010)*



Lipidové zložky membrány sú najmä fosfolipidy, sfingolipidy a steroly. Prevahu majú fosfolipidy, skladajúce sa z hydrofilnej časti napojenej prostredníctvom fosfátovej skupiny na hydrofóbne reťazce mastných kyselín. Molekuly s takýmto usporiadaním, hydrofilnou aj hydrofóbnou časťou, sa nazývajú amfipatické (Alberts et al. 1998). Podobne aj steroly a glykolipidy, ktoré sa tiež nachádzajú v membránach, majú túto vlastnosť. Vytváranie lipidových dvojvrstiev vo vodnom prostredí je následok práve amfipatického charakteru lipidových molekúl. Hydrofilné časti sa natáčajú smerom do vodného prostredia, zatiaľ čo hydrofóbne reťazce sú orientované k sebe vo vnútri membrány. Takéto usporiadanie je pre obidve časti z energetického hľadiska najvýhodnejšie. Toto správanie zároveň zabezpečuje dvojvrstve samozaceľovaciu schopnosť v prípade vytvorenia trhliny – každá trhlina tvorí voľné rozhranie s vodou, čo je energeticky nevýhodné, a preto sa molekuly dvojvrstvy samovoľne preusporadúvajú, aby voľné rozhranie odstránili. Nemožnosť vytvárať voľné rozhrania má u dvojvrstvy konečných rozmerov za následok vytváranie hraničných plôch okolo uzavretého priestoru, čo je podmieňujúci faktor pri tvorení bunky (Alberts et al. 1998).

Okrem lipidov, významnú úlohu v cytoplazmatickej membráne zohrávajú aj proteíny, ktoré sa podieľajú na selektívnom transporte, enzymatickej aktivite a imunitných procesoch. Všeobecne prijímaný model membránovej štruktúry je tzv. model tekutej mozaiky, ktorý opisuje membránu ako „more lipidov, v ktorom plávajú proteíny“. Tieto môžu byť buď viazané na povrch membrány (periférne proteíny), alebo sú viazané súčasne na hydrofóbne vnútro aj na polárny povrch (integrálne proteíny) (Bittman 1997). V porovnaní s lipidovou dvojvrstvou sú, vo všeobecnosti, proteíny málo stlačiteľné, zaberajú objem asi 50 – 100 fosfolipidov. Predpokladá sa, že tepelný pohyb lipidov v blízkosti proteínov je značne brzdený a je spojený s lokálnym nárastom v mikroviskozite. Rozsah tohto efektu klesá s narastajúcou vzdialenosťou od proteínu, a preto by celkový efekt na lipidovú mikroviskozitu mal narastať s pribúdajúcim počtom proteínov v membráne (Shinitzki 1984).

Lipidové zloženie membrány

Lipidy tvoria základ štruktúry membrány, preto je ich zloženie prísne regulované. V membráne sa nachádzajú rôzne typy lipidov, pričom všetky musia mať amfipatickú štruktúru. Existujú tri hlavné druhy lipidov v membránach: fosfolipidy, sfingolipidy a steroly. Fosfolipidy obsahujú naviazané dve karboxylové kyseliny. Za fosfátovou skupinou majú naviazaný buď cholín, etanolamín, serín alebo inozitol. Sfingolipidy sa skladajú zo sfingozínu a naviazanej karboxylovej kyseliny. Steroly sú orientované malou hydroxylovou skupinou k povrchu membrány a zvyšok molekuly smeruje do vnútra dvojvrstvy (Karp 2010). V Tabuľke 1 uvádzame príklady lipidového zloženia vybraných membrán.

Tab. 1: ***Lipidové zloženie vybraných membrán*** *(upravené podľa Karp 2010)*

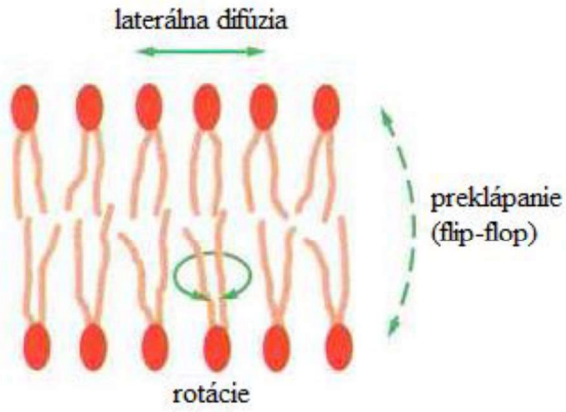
Lipid	Ľudský erytrocyt	Ľudský myelín	Mitochondria zo srdca kravy	*E. coli*
Kyselina fosfatidová	1,5	0,5	0	0
Fosfatidylcholín	19	10	39	0
Fosfatidyletanolamín	18	20	27	65
Fosfatidylglycerol	0	0	0	18
Fosfatidylserín	8,5	8,5	0,5	0
Kardiolipín	0	0	22,5	12
Sfingomyelín	175	8,5	0	0
Glykolipidy	10	26	0	0
Cholesterol	25	26	3	0

V tabuľke sú uvedené percentá z celkovej hmotnosti lipidov.

Membránová fluidita

Membránová fluidita predstavuje vlastnosť membrány správať sa ako dvojrozmerná tekutina, čo znamená, že v rámci dvojvrstvy sa môžu lipidy pohybovať a vymieňať si svoje miesta. Tzv. model tekutej mozaiky zdôrazňuje fluiditu daného usporiadania – molekuly lipidov majú značnú voľnosť pohybovať sa laterálne, rotovať a preklápať sa (Obr. 2). Tieto výmeny vedú k rýchlej difúzii v rámci roviny membrány. Laterálna difúzia je pohyb molekúl, kedy si fosfolipidy vymieňajú miesta so susednými molekulami v rámci roviny monovrstvy. Pri rotácií dochádza k rýchlemu otáčaniu molekuly okolo svojej pozdĺžnej osi. Pri preklápaní (angl. flip-flop) dochádza ku prechodu molekuly z jedenej monovrstvy do druhej. Zatiaľ čo laterálna difúzia a rotácia sú bežné tepelné pohyby, ktoré umožňujú rýchlu výmenu lipidov na povrchu bunky, preklápanie je pomerne zriedkavé a vyžaduje si prítomnosť určitých proteínov (Alberts et al. 1998).

Obr. 2: ***Pohyblivosť fosfolipidov***



Skutočnosť, že sa molekuly môžu voľne pohybovať v rovine membrány, z nej vytvára dvojrozmernú tekutinu. Stupeň tekutosti, teda ľahkosť s akou sa môžu molekuly v membráne pohybovať, je určujúci pre funkčnosť membrány a musí byť udržiavaný v náležitých hraniciach (Alberts et al. 1998). Fluiditu membrány ovplyvňujú rôzne faktory. Jednak je to lipidové zloženie membrány, ale napríklad aj teplota.

Vo všeobecnosti platí, že krátke a rozvetvené reťazce, prítomnosť dvojitých väzieb a vysoká polarita hydrofilnej časti molekúl, tekutosť membrány zvyšujú (Lakowicz 2006). Každá dvojitá väzba v nenasýtenom reťazci vytvára nepravidelnosť, ktorá sťažuje prikladanie jedného reťazca k druhému. Preto membrány s vysokým obsahom nenasýtených uhľovodíkových reťazcov majú vyššiu tekutosť ako tie s menším počtom (Alberts et al. 1998). Uvedenie cis-dvojitej väzby do acylového reťazca fosfolipidu zvyšuje vo významnej miere jeho špecifický objem, čo sa prejaví v znížení viskozity prostredia. Dvojitá väzba má najvýraznejší efekt, keď je situovaná v plne saturovanom reťazci. Uvedenie druhej dvojitej väzby do reťazca má už omnoho menší vplyv na znižovanie viskozity. Pri vyšších stupňoch saturácie sa tento efekt stáva postupne menej výrazný (Shinitzki 1984). Stupeň nenasýtenia acylového reťazca fosfolipidov je do značnej miery určený na úrovni membránovej biogenézy, keď v procese biosyntézy fosfolipidov dochádza k selekcii vhodných mastných kyselín. Špeciálne intracelulárne enzýmy (desaturázy) sú schopné upravovať počet nenasýtených väzieb a dĺžku reťazcov v mastných kyselinách, ktoré má bunka k dispozícii (Shinitzki 1984). Bunky, ktoré sa musia prispôsobovať meniacim sa teplotným podmienkam, majú schopnosť regulovať tekutosť svojej membrány takýmto nastavovaním dĺžky a nasýtenia uhľovodíkových reťazcov. Napríklad pri vysokých teplotách bunka produkuje dlhšie reťazce s menším počtom dvojitých väzieb (Alberts et al. 1998).

Vplyv cholesterolu, ale aj iných sterolov, je zložitejší. Za fyziologických podmienok vystupuje cholesterol ako hlavný „stužovač“ v prirodzených membránach. Jeho vplyv sa prejavuje v celkovom náraste mikroviskozity a usporiadanosti lipidov v dvojvrstve. Je však nutné poznamenať, že závisí od aktuálnej teploty a tzv. teploty fázového prechodu T_{fp}. Táto teplota vyjadruje hranicu, pod ktorou sa lipid nachádza v kryštalickom stave a nad ktorou sa nachádza v tekutokryštalickom, resp. tekutom stave. Ak je aktuálna teplota nižšia ako T_{fp}, bude cholesterol tekutosť membrány zvyšovať, pretože jeho aromatická štruktúra narúša pravidelné usporiadanie reťazcov karboxylových kyselín fosfolipidov. Naopak, ak je teplota vyššia ako T_{fp}, cholesterol zapadne do medzier medzi molekulami a stabilizuje tak vrstvu, v ktorej sa nachádza. Cholesterol nad teplotou fázového prechodu znižuje tekutosť membrány.

Vplyv proteínov na lipidovú dynamiku je podobný ako v prípade cholesterolu. Bielkoviny taktiež zvyšujú rigiditu a usporiadanosť tekutých lipidových domén, ale pod lipidovým fázovým prechodom sa správajú opačne (Shinitzki 1984). Významný faktorom je tiež teplota. Pri znížení teploty spôsobí pokles tepelnej energie zníženie rýchlosti pohybu lipidov, v dôsledku čoho sa dvojvrstva stáva menej tekutou.

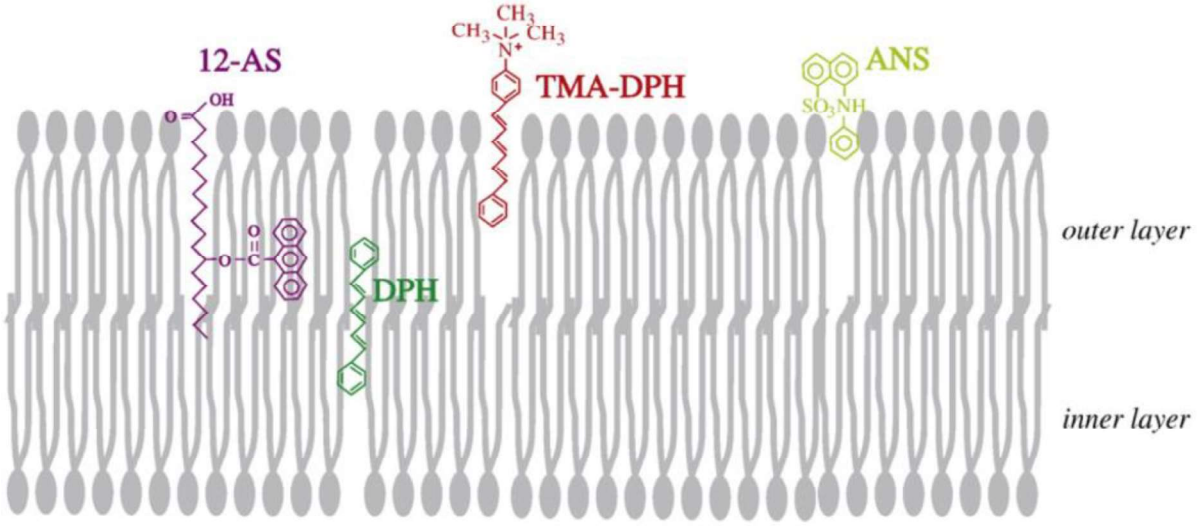
Tekutosť membrány je pre bunku dôležitá z viacerých dôvodov. Umožňuje membránovým proteínom rýchlo difundovať v rovine membrány a interagovať navzájom, čo má význam pri bunkovej signalizácii. Poskytuje jednoduchý spôsob distribúcie membránových lipidov a proteínov z miest, kde boli po svojej syntéze začlenené do membrány, do iných miest v bunke. A taktiež umožňuje membránam vzájomnú fúziu a zmiešanie ich molekúl a zaisťuje rovnomerné rozdelenie membránových molekúl medzi dcérske bunky pri bunkovom delení (Alberts et al. 1998).

Ohodnotenie membránovej fluidity

Membránovú fluiditu je možné ohodnotiť využitím fluorescenčných sond. Medzi najčastejšie používané patrí DPH (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrién), TMA-DPH (1-(4-trimetylamóniumfenyl)-6-fenyl-1,3,5,-hexatrién), 12-AS (12-(9-antroyloxy) kyselina stearová) a ANS (1-anilíno-8-naftalén sulfonát). Práve preto, že sú tieto sondy lokalizované v rôznych úrovniach lipidovej dvojvrstvy, umožňujú sledovať zmeny membránovej fluidity v rôznych oblastiach dvojvrstvy, sú teda špecificky vhodné na charakterizáciu odlišných oblastí membrány (Obr. 3). TMA-DPH sa používa na monitorovanie fluidity v blízkosti povrchu bunkovej membrány. Polárna časť tejto sondy je ukotvená na rozhraní lipid-voda, zatiaľ čo uhľovodíková časť vstupuje do hydrofóbnej oblasti dvojvrstvy. Dĺžka hydrofóbnej časti molekuly TMA-DPH je približne ekvivalentná 10 uhlíkovému reťazcu. ANS sa zabudováva takým spôsobom, že aniónová sulfonátová skupina je orientovaná smerom ku hydrofóbnym častiam

lipidov a podáva teda informáciu o interakcii medzi proteínmi a lipidmi a o fluidite povrchu membrány. 12-AS a DPH sa zabudovávajú do hydrofóbnych oblastí lipidovej dvojvrtsvy. Najznámejší spôsob hodnotenia membránovej fluidity využíva polarizovanú fluorescenciu sond, ktorá poskytuje informácie o rotačných pohyboch fluorescenčných sond zabudovaných do membrány, pričom medzi najčastejšie používanú patrí sonda DPH. Molekula DPH má hydrofóbny charakter, absorbuje žiarenie v tej oblasti vlnových dĺžok (absorpčné maximum 360 nm), v ktorej neabsorbujú žiadne iné zložky membrán, zároveň sa neviaže na proteíny a je chemicky stabilná. Po pridaní sondy DPH k izolovaným membránam sa sonda zabuduje do membrány, čo je sprevádzané silným zvýšením jej fluorescencie (fluorescenčné maximum 430 nm) (Mason 1999). Využíva sa pri tom fyzikálny jav anizotropia, spočívajúci v tom, že fyzikálne vlastnosti látky sa menia podľa smeru, v ktorom tieto vlastnosti meriame. Preto sa anizotropia fluorescencie sondy DPH (meraná porarizovaným svetlom) správa ako indikátor štruktúrneho usporiadania hydrofóbneho vnútra membrány, čo je inverzne proporcionálne membránovej fluidite.

Obr. 3: ***Väzba najpoužívanejších fluorescenčných sond na špecifické oblasti lipidovej dvojvrstvy*** *(upravené podľa Marczak 2009).*



Záver

Článok poukazuje na vplyv zloženia cytopazmatickej membrány bunky na tekutosť (fluiditu) membrány. Upozorňuje tiež na úlohu fluidity membrány a diskutuje možnosti jej ohodnotenia.

Literatúra

ALBERTS, B., D. BRAY, A. JOHNSON a J. LEWIS, 1998. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero Publishing. ISBN 80-902906-2-0.

BITTMAN, Robert., 1997. *Cholesterol : its functions and metabolism in biology and medicine*. ISBN 0306454785.

KARP, Gerald., 2010. *Cell and molecular biology : concepts and experiments*. B.m.: John Wiley. ISBN 0470483377.

LAKOWICZ, Joseph R., 2006. *Principles of fluorescence spectroscopy*. ISBN 0387312781.

MARCZAK, Agnieszka, 2009. Fluorescence anisotropy of membrane fluidity probes in human erythrocytes incubated with anthracyclines and glutaraldehyde. *Bioelectrochemistry* [online]. 2009, roč. 74, č. 2, s. 236–239. ISSN 15675394.

MASON, W.T., 1999. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis*. 2nd vyd. London: Academic Press. ISBN 978-0-12-447836-7.

SHINITZKI, Mein, 1984. Membrane Fluidity and Cellular Functions. V: *Physiology of Membrane Fluidity*. Springer, Boston, s. 1–52.

Poďakovanie

Publikácie uverejnené v časopise BECH 2017 boli vytvorené v rámci realizácie a ukončenia projektu *„Centrum excelentnosti pre využitie informačných biomakromolekúl v prevencii ochorení a pre zlepšenie kvality života“*, (ITMS kód: 26240120003) na základe podpory operačného programu Výskum a Vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

