

УДК 612.014.42:612.31

Влияние факторов, действующих на белки, на натриевый и калиевый токи утечки мембраны секреторных клеток

М. Ю. Клевец

К настоящему времени получены прямые доказательства белковой природы потенциалозависимых ионных каналов [3, 14]. Значительно хуже изучены свойства и структурная организация ионных каналов, определяющих суммарную ионную проводимость мембраны в состоянии покоя, которые названы каналами утечки [8]. Возможно даже, что каналы утечки не являются дискретными образованиями, а связаны с так называемыми динамическими порами, т. е. дефектами упаковки молекул липидов или липопротеидных комплексов [8]. В связи с этим целью нашей работы было изучение изменений натриевого и калиевого токов утечки [6] под влиянием факторов, специфически действующих на белки, для получения доказательств белковой природы натриевых и калиевых каналов утечки.

Методика

Исследования проведены на изолированных секреторных клетках слюнной железы личинки мотыля *Chironomus riposus* с помощью метода фиксации напряжения в условиях внутриклеточной перфузии [7]. Выделение изолированных клеток, растворы и условия получения токов утечки описаны ранее [6]. Токи измеряли при фиксированном потенциале -50 мВ. Получим неизменяющееся максимальное значение натриевого или калиевого тока утечки, наружную или внутреннюю поверхность мембраны подвергали действию различных факторов, действующих на белки: кислой среды (рН 3 и 3,5); протеаз — трипсина (0,5 мг/мл), химотрипсина (0,5 мг/мл), папаина (1 мг/мл) и проназы (0,5 мг/мл); блокаторов SH-групп — Hg^{2+} (0,1, 0,5 и 1 ммоль/л HgCl_2), Cd^{2+} (1 ммоль/л CdCl_2), а также дициклогексилкарбодимида (0,7 ммоль/л).

Результаты и их обсуждение

Влияние кислой среды. Как мы сообщали ранее [4], мембранный потенциал клеток слюнной железы личинки мотыля очень чувствителен к рН среды: снижение рН вызывает резкую деполяризацию мембраны и увеличение ее сопротивления. Для выяснения ионных механизмов деполяризации мы исследовали прежде всего влияние кислой среды на калиевый ток утечки. На рис. 1 видно, что при рН 3 калиевый ток утечки резко уменьшается (в среднем на 73,1 %, $n=10$), что, по-видимому, является следствием снижения проводимости калиевых каналов утечки. Этим и объясняется деполяризация мембраны при снижении рН среды.

Известно, что протоны блокируют потенциалозависимые калиевые каналы нейронов, связываясь с кислотными группами [12]. Поэтому обнаруженная нами чувствительность калиевой проводимости мембраны в покое к снижению рН среды позволяет предположить наличие ионизированных кислотных групп и в калиевых каналах утечки. Поскольку калиевый ток при рН 3 уменьшается более чем на 50 %, рКа этих групп должно быть больше 3. Исходя из этого можно полагать,

что в калиевых каналах утечки функционируют СООН-группы остатков аспарагиновой или глутаминовой аминокислот, поскольку рКа для радикалов этих свободных аминокислот составляет 3,86 и 4,25 соответственно. Однако специфичный этим группам реагент дициклогексилкарбодимид [13] не вызывал никаких изменений калиевого тока. Этот факт может быть обусловлен недоступностью СООН-групп селективного фильтра калиевых каналов для липофильного дициклогексилкарбодимида.

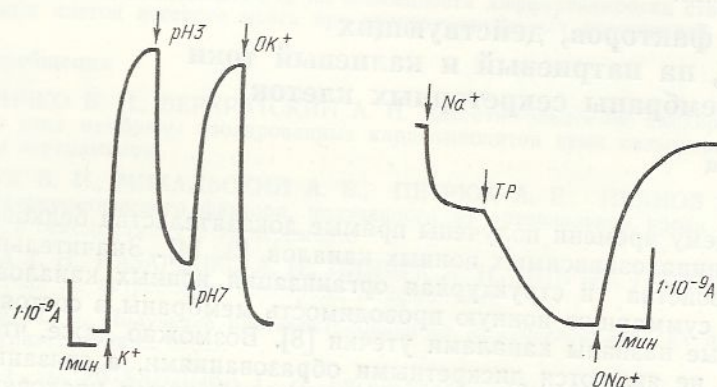


Рис. 1. Влияние снижения pH среды на выходящий калиевый ток утечки.

↑K⁺ — начало внутренней перфузии клетки калиевым раствором: ток появляется; ↓pH 3 — начало наружной перфузии клетки кислым раствором: ток уменьшается; ↑pH 7 — начало наружной перфузии нейтральным раствором: ток восстанавливается; ↓0 K⁺ — начало внутренней перфузии клетки бескалиевым раствором: ток исчезает.

Рис. 2. Влияние трипсина на входящий натриевый ток утечки.

↓Na⁺ — начало наружной перфузии клетки натриевым раствором: ток появляется; ↓TP — начало внутренней перфузии клетки раствором, содержащим трипсин: ток увеличивается; ↑0 Na⁺ — начало наружной перфузии клетки безнатриевым раствором: ток исчезает.

Натриевый ток утечки блокируется в кислой среде примерно так же (при pH 3,5 — в среднем на 60 %), а дициклогексилкарбодимид не изменяет его значения.

Влияние протеаз. В отличие от мембраны аксона кальмара [10] мембрана исследуемых нами клеток чувствительна к протеазам при их наружном воздействии: трипсин (0,5 мг/мл) вызывал быструю и необратимую деполяризацию в среднем на 72 %, проназа (0,5 мг/мл) — на 80 % [5]. С целью выяснения ионных механизмов данной деполяризации мы пытались обнаружить прежде всего изменения калиевого тока утечки под влиянием трипсина. Однако при действии трипсина в течение примерно 5 мин как на наружную, так и внутреннюю поверхности мембраны калиевый ток утечки не изменялся. Напротив, при действии трипсина на наружную поверхность мембраны натриевый ток утечки увеличивался в среднем на 66 % (n=11), а при действии на внутреннюю поверхность (рис. 2) — на 212 % (n=10). Это свидетельствует прежде всего о том, что в основе деполяризации мембраны трипсином лежит увеличение ее натриевой проводимости вследствие гидролиза в белковых компонентах натриевых каналов утечки пептидных связей, в образовании которых принимают участие аргинин и лизин, и нарушения их структурно-функциональной организации.

При действии химотрипсина, характеризующегося более широкой субстратной специфичностью, на наружную и внутреннюю поверхности мембраны калиевый ток утечки также не изменялся. Натриевый ток утечки при действии химотрипсина на наружную поверхность мембраны увеличивался в среднем на 90 % (n=11).

Не вызывали изменений калиевого тока утечки и протеазы весьма широкого спектра действия — папаин (рис. 3) и проназа — при их действии на наружную и внутреннюю поверхности мембраны. Натриевый ток утечки при действии папаина на наружную поверхность мем-

браны увеличивался в среднем на 201 % ($n=8$), а при действии на внутреннюю — на 120 % ($n=9$).

Таким образом, результаты протеолиза свидетельствуют о том, что в покое диффузия натрия в клетки осуществляется через белковые компоненты мембраны, которые должны иметь стабильную структуру. Однако такой вывод нельзя сделать в отношении диффузии калия из клеток, поскольку калиевый ток утечки не изменяется даже под влиянием папаина, гидролизующего практически любые пептидные связи

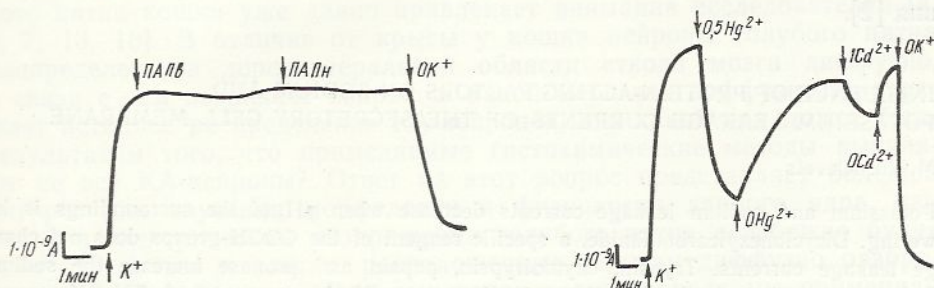


Рис. 3. Влияние папаина (ПАП) на калиевый ток утечки.

↑К⁺ — начало внутренней перфузии клетки калиевым раствором: ток появляется; ↓ПАПв, ↓ПАПн — начало внутренней и наружной соответственно перфузии клетки растворами папаина: ток не изменяется; ↓0 К⁺ — начало внутренней перфузии клетки бескалийным раствором: ток исчезает.

Рис. 4. Влияние блокаторов SH-групп на калиевый ток утечки.

↑К⁺ — начало внутренней перфузии клетки калиевым раствором: ток появляется; ↓0,5 Hg²⁺ — начало наружной перфузии клетки раствором, содержащим 0,5 ммоль/л Hg²⁺: ток уменьшается; ↑0 Hg²⁺ — начало наружной перфузии клетки раствором без катионов ртути: ток восстанавливается; ↓1 Cd²⁺ — начало наружной перфузии клетки раствором, содержащим 1 ммоль/л Cd²⁺: ток уменьшается; ↑0 Cd²⁺ — начало наружной перфузии клетки раствором без катионов кадмия: ток восстанавливается; ↓0 К⁺ — начало внутренней перфузии клетки бескалийным раствором: ток исчезает.

[9], и проназы, которая гидролизует, например, в яичном альбумине 87 % общего числа пептидных связей [9]. По-видимому, белковые компоненты калиевых каналов утечки в нативном состоянии не подвергаются протеолизу, что согласуется с мнением о протеолизе лишь гидрофильных частей мембранных белков, обращенных в водную среду [1].

Влияние блокаторов SH-групп. При изучении изменений калиевого тока утечки оказалось, что Hg²⁺ (0,1 ммоль/л) только в 2 из 9 клеток вызывали незначительное его уменьшение. В концентрации 0,5 ммоль/л Hg²⁺ уменьшали калиевый ток утечки в среднем на 41,9 % ($n=9$), а в концентрации 1 ммоль/л — на 58,8 % ($n=9$). Как видно из рис. 4, уменьшение тока носит обратимый характер. Блокирующий эффект Cd²⁺ значительно слабее (см. рис. 4): в концентрации 1 ммоль/л Cd²⁺ угнетали калиевый ток утечки в среднем лишь на 25,7 %. Изменений натриевого тока утечки под влиянием Hg²⁺ (0,5 ммоль/л) не наблюдали.

Результаты изучения действия блокаторов SH-групп свидетельствуют о том, что диффузия калия из клеток в покое осуществляется также через белковые компоненты мембраны, в состав которых входят остатки цистеина. Не исключены, однако, и другие механизмы блокирования калиевого тока утечки под влиянием Hg²⁺ и Cd²⁺. SH-группы ферментов принято делить на существенные и несущественные [11]. Поскольку блокирование SH-групп в калиевых каналах утечки сопровождается изменением тока, их можно назвать существенными, т. е. определяющими каким-то образом проводимость этих каналов.

Полученные результаты свидетельствуют, что белковые компоненты натриевых и калиевых каналов утечки отличаются биохимически. Однако нет оснований утверждать, что белок натриевых каналов совсем лишен цистеина, поскольку SH-группы здесь могут быть несущественными для определения проводимости. Вместе с тем есть данные о том, что содержание цистеина в белковых субъединицах быстрых натриевых каналов из мозга крыс самое низкое по сравнению с другими аминокислотами [3].

Таким образом, диффузный перенос калия и натрия через мембрану в покое осуществляется специализированными системами белковой природы (каналами). Этот перенос имеет функциональный смысл и связан с поддержанием нативного состояния клеток в покое [2], поэтому термины «пассивная утечка» и «каналы утечки» требуют уточнения. Заслуживает внимания функциональное подразделение каналов на две группы: связанные с поддержанием нативного состояния клеток в покое и обеспечивающие реакции клеток на внешние воздействия [2].

INFLUENCE OF PROTEIN-ACTING FACTORS ON SODIUM AND POTASSIUM LEAKAGE CURRENTS OF THE SECRETORY CELL MEMBRANE

M. Yu. Klevets

Potassium and sodium leakage currents decrease when pH of the surroundings is lowering. Dicyclohexylcarbodiimide, a specific reagent of the COOH-groups does not change leakage currents. Trypsin, chymotrypsin, papain and pronase increase the sodium leakage current, not altering the potassium one. Blocking agents of the SH-groups: Hg^{2+} and Cd^{2+} decrease potassium leakage current, without changing the sodium one. Results of the proteolysis testify to that the diffusion of sodium into the cells in repose is accomplished through the protein components of the membrane. The action of the blocking agents of SH-groups points out that the diffusion of potassium from the cells is realized also via the protein components of the membrane.

I. Franko State University, Ministry of Higher and Secondary Special Education of the Ukrainian SSR, Lvov

1. Болдырев А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1985.—208 с.
2. Веренин А. А., Марахова И. И. Транспорт ионов у клеток в культуре.— Л.: Наука, 1986.—291 с.
3. Гришин Е. В., Коваленко В. А., Пашков В. Н., Шамотенко О. Г. Выделение и характеристика компонентов натриевого канала // Биол. мембраны.— 1984.—1, № 8.— С. 858—866.
4. Клевец М. Ю. Влияние кислой среды на потенциал покоя и входное сопротивление секреторных клеток // Нейрогуморальная регуляция клеточных механизмов секреторного процесса.— Львов: Изд-во Львов. ун-та, 1985.— С. 73—78.
5. Клевец М. Ю., Долиба Н. М. Влияние некоторых ферментов на потенциал покоя клеток слюнной железы личинки хирономуса // Актуальные проблемы современной физиологии.— Киев: Наук. думка, 1986.— С. 8—9.
6. Клевец М. Ю. Изучение проводимости ионов плазматической мембраной секреторных клеток в состоянии покоя методом внутриклеточного диализа // Физиол. журн.— 1986.—32, № 2.— С. 224—227.
7. Крышталъ О. А., Пидопличко В. И. Внутриклеточная перфузия гигантских нейронов улитки // Нейрофизиология.— 1975.—7, № 3.— С. 327—329.
8. Лев А. А. Ионная избирательность клеточных мембран.— Л.: Наука, 1975.— 320 с.
9. Мосолов В. В. Протеолитические ферменты.— М.: Наука, 1971.—413 с.
10. Тасаки И. Нервное возбуждение.— М.: Мир, 1971.—222 с.
11. Горчинский Ю. М. Сера в белках.— М.: Наука, 1977.—301 с.
12. Хилле Б. Ионная селективность Na^{+} - и K^{+} -каналов в мембранах нервного волокна // Мембраны: ионные каналы.— М.: Мир, 1981.— С. 25—98.
13. Carlos H. P., Jack H. K. Carbodiimide Inactivation of Na , K -ATPase // J. Biol. Chem.— 1986.—261, N 8.— P. 3632—3639.
14. Noda M., Shimizu S., Tanabe T. et al. Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence // Nature.— 1984.—312.— P. 121—127.

Львов ун-т им. И. Франко
М-ва высш. и сред. спец. образования
УССР

Поступила 30.06.87