

Г. Н. БЕРЕСТОВСКИЙ, О. М. ЖЕРЕЛОВА, В. З. ЛУНЕВСКИЙ

ОПТИЧЕСКИЙ СПЕКТР ИНАКТИВАЦИИ ХЛОРНЫХ КАНАЛОВ ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК ВОДОРОСЛИ *NITELLOPSIS OBTUSA*

(Представлено академиком Г. М. Франком 18 VII 1974)

Результаты изучения действия облучения оптического диапазона на катионные каналы нервных волокон свидетельствуют о наличии в системе канала белковой компоненты (¹⁻⁴).

Мембраны гигантских клеток харовых водорослей, являющиеся удобным объектом для изучения молекулярных механизмов ионной проницаемости, имеют анионные (хлорные) возбудимые каналы (⁵). Комплексы

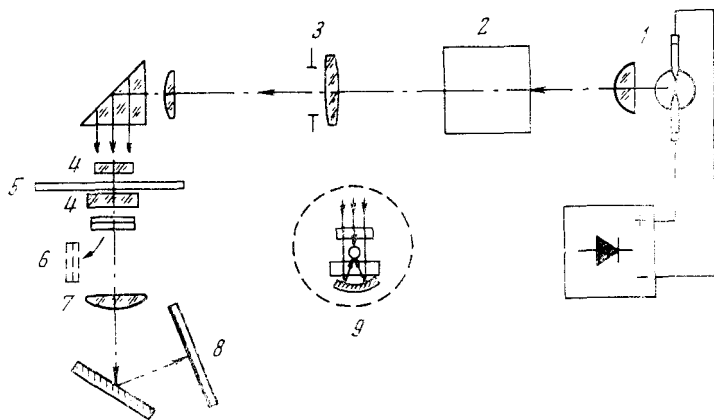


Рис. 1. Оптическая схема изучения спектра действия на клетках водоросли *Nitellopsis obtusa*. Вся оптика кварцевая. 1 — дуговая лампа ДРШ-250-2, питаемая постоянным током, 2 — монохроматор, 3 — апертурная диафрагма, 4 — кварцевые окна в камере из оргстекла, 5 — объект, 6 — откидное цилиндрическое зеркало с внешним напылением, 7 — объектив, 8 — люминесцентный экран в плоскости изображения объекта, 9 — схема двухстороннего освещения объекта.

анионных каналов содержатся и в протоплазме этих клеток. Это позволяет встраивать каналы в бимолекулярные фосфолипидные мембраны и изучать их на модельных системах (⁶). В настоящей работе исследовалось действие облучения в интервале 250–800 нм на хлорные токи возбужденной плазмалеммы в условиях фиксации напряжения и непрерывной внутриклеточной перфузии. Относительная эффективность разных длин волн использовалась для характеристики молекулярного комплекса канала.

Исследуемые клетки помещали в камеру, состоящую из трех отсеков. В центральном рабочем отсеке участок клетки 4 мм длиной омывался раствором 0,1 мМ KCl, 1 мМ NaCl и 0,1 мМ CaCl₂; в крайних отсеках концы клеток отрезали и в один из них вводилась канюля, через которую осуществляли внутреннюю перфузию вакуоли раствором 100 мМ KCl, 50 мМ NaCl и 10 мМ CaCl₂. В рабочем отсеке фиксировали напряжение между вакуолью и наружной средой (⁷). Оптическая схема установки (рис. 1) позволяла облучать клетки с двух сторон, что исключало эффект экранировки мембраны протоплазмой. Световые потоки 250–800 нм фотометрировались и их интенсивность регулировалась апертурной диафрагмой.

Во время эксперимента на мембранах клетки фиксировалось напряжение на уровне потенциала покоя, а затем оно смещалось последовательно

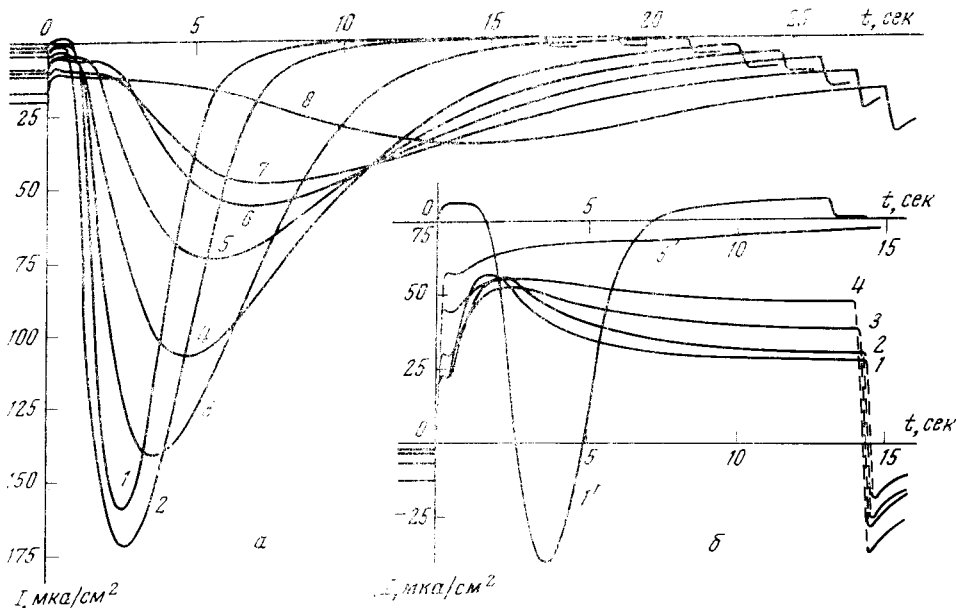


Рис. 2. Изменение во времени токовых кривых клеток водоросли при облучении светом с длиной волны 280 нм. Кривые входящих токов (а и одна на рис. 2б) получены при фиксации деполаризующего скачка напряжения 60 мв относительно потенциала покоя (а — 120 мв, б — 105 мв), на б — кривые выходящих токов при деполаризующем скачке 240 мв. Кривые 1 и 1' сняты перед самым началом облучения, остальные — во время облучения. Все кривые сняты последовательно с интервалом в 2,5 мин, а и б — две разные клетки. На б для сравнения с клеткой а приведена одна кривая входящего тока клетки б (нуль отсчета для нее — верхняя абсцисса). Слева от осей ординат линиями отмечены токи утечки, текущие перед началом каждого импульса. Интенсивность облучения 10^{13} фотонов/мм²·сек

на два исследуемых уровня. При одном из них (−60 мв) по возбужденным хлорным каналам ионы хлора выходили из клетки (входящие токи), а при другом (−120 мв) ионы хлора входили в клетку (выходящие токи). После нескольких контрольных записей тока клетку начали облучать и регистрировали кинетику развития хлорных токов после облучения разными дозами. Так как в описываемых экспериментах фиксация напряжения осуществлялась на двух мембранах последовательно (плазмалемма и тонопласт), то специальными опытами с использованием микроэлектрода в протоплазме было показано, что ошибка измерения токов плазмалеммы 20%.

Типичные осциллограммы токов при непрерывном облучении клетки 280 нм приведены на рис. 2. Изменения токов при облучении в диапазоне длин волн 250–365 нм выглядели аналогично. Свет с длинами волн более 365 нм при интенсивности, в сотни раз превышающей таковую для волны 280 нм, достоверного воздействия не оказывал. Под действием у.-ф. облучения входящие токи сначала несколько возрастали (на 10–30%), а затем спадали вплоть до гибели клетки. Одновременно, примерно в той же пропорции, как падала амплитуда токов, возрастали длительности фаз нарастания и спада. Процесс был необратим, после выключения света наблюдалось некоторое время продолжение спада тока. Действие облучения на выходящие токи отличалось тем, что почти не наблюдалась начальная фаза увеличения амплитуды и фаза последствия была менее выражена.

На рис. 3 представлена зависимость изменения относительной амплитуды входящего и выходящего токов от времени облучения (дозы). Оказалось, что для выходящих токов полученные зависимости могут быть аппроксимированы экспонентами и то же самое для входящих токов в области после завершения фазы роста тока. Показатели экспонент α сохранялись достаточно постоянными для разных клеток при облучении светом

одной и той же интенсивности и не отличались для входящих и выходящих токов. Полученная зависимость величины амплитуды от дозы облучения характерна для одноударной модели поражения ⁽⁸⁾ хлорных каналов квантами света. Под поражением канала мы будем понимать результат взаимодействия кванта света с любой компонентой канала, приводящий к существенному уменьшению среднего тока через канал. Для обсуждаемой модели

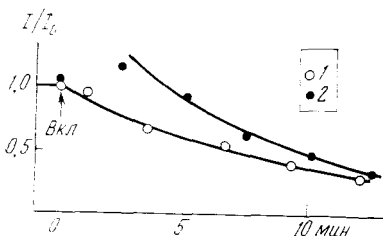


Рис. 3

Рис. 3. Изменение относительной амплитуды тока хлорных каналов от времени облучения. 1 — выходящие токи при облучении с $\lambda=296$ нм и интенсивностью 250 эрг/мм²·сек, 2 — входящие токи при $\lambda=280$ нм и 65 эрг/мм²·сек. Сплошные линии — экспоненты с коэффициентом в показателе $0,09$ мин⁻¹ и $0,14$ мин⁻¹

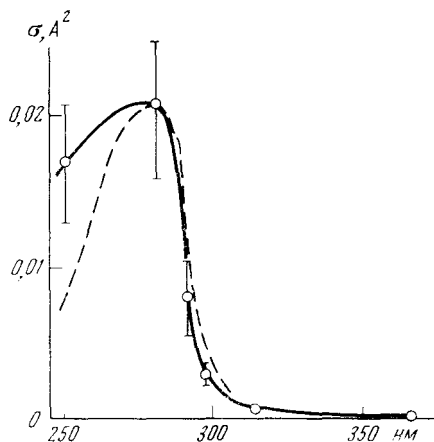


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость поперечного сечения инактивации хлорных каналов от длины волны облучающего света. Пунктиры — спектр поглощения триптофана

$I=I_0e^{-KSPt}$, где I_0 — амплитуда тока до облучения, S — эффективное сечение поглощения света молекулами канала, K — квантовый выход инактивации канала, P — интенсивность светового потока.

Эффективное сечение инактивации $\sigma=KS$ можно рассчитать по экспериментальным данным:

$$\sigma=\alpha/p. \quad (1)$$

Облучение клеток светом 280 нм разной интенсивности показало независимость σ от P . Кроме того, для разных длин волн света интенсивность облучения подбиралась такой, чтобы произведение σP оставалось неизменным. Это позволяло исключить возможные нелинейные эффекты и вычислять σ при разных интенсивностях по выражению (1).

На рис. 4 приведен спектр инактивации хлорных каналов светом. Область наибольшей фотохимической чувствительности лежит в районе 280 нм, наблюдается небольшой спад к 250 нм и крутой спад в длинноволновую сторону. В рассматриваемом интервале длин волн наиболее поражаемы белки и нуклеиновые кислоты. Инактивация белка под действием радиации происходит за счет фотолиза ароматических аминокислотных остатков и цистина. Сечение инактивации белка можно оценить из выражения $\sigma_0=\sum_i m_i \sigma_i$, где m_i — число остатков данной аминокислоты, разрушение которых приводит к инактивации фермента; σ_i — сечение фотолиза аминокислотного остатка. Наибольшей фотохимической чувствительностью в области 250 — 280 нм обладают триптофан и цистин. В ряде случаев квантовый выход фотолиза триптофана не зависит от длины волны и, следовательно, спектр инактивации белка, где главную роль играет фотолиз триптофана, должен быть близок к спектру поглощения триптофана. Из рис. 4, где приведен спектр поглощения триптофана (в относительных единицах), видно, что он достаточно близок к спектру инактивации каналов. Что касается меньшего спада к 250 нм и несколько большей крутизны в длинноволновой области, то это различие может быть связано с вкладом фотолиза цистина. Прикидка показывает, что суммарное сечение инактивации одного

остатка триптофана и одного цистина $\sim 0,02 \text{ \AA}^2$, что примерно соответствует полученной величине сечения инактивации хлорных каналов. Таким образом, сравнение зависимости сечения инактивации хлорных каналов от длины волны и абсолютной величины этого сечения с аналогичными параметрами белков свидетельствует в пользу наличия белка в комплексе возбуждимого хлорного канала плазмалеммы клеток водоросли.

Выше мы отметили, что на начальном этапе действия облучения наблюдается фаза роста входящих токов, а после прекращения облучения некоторое время продолжается спад тока. Можно предположить, что действие облучения вызывает повышение в протоплазме концентрации каких-либо ионов (например, Ca^{2+}), которые, сорбируясь на мембране, уменьшают энергетический барьер для ионов Cl^- , находящихся в цитоплазме. После прекращения облучения концентрация ионов постепенно восстанавливается. Тогда начальное увеличение амплитуды входящего хлорного тока связано с увеличением проводимости каждого хлорного канала, происходящей наряду с их инактивацией, а последствие — с уменьшением проводимости канала после прекращения облучения. Расчеты на базе электродиффузионной модели показывают, что этот процесс должен существенно слабее сказываться на выходящих токах (входит наружный хлор), что и наблюдается в эксперименте.

Действие у.-ф. облучения на токи утечки покоящейся плазмалеммы при фиксации напряжения на уровне калиевого равновесного потенциала (при этом в наших условиях ток в основном переносится ионами Cl^-) приводит к повышению проницаемости для ионов Cl^- , причем при небольших дозах облучения процесс почти полностью обратим — после прекращения облучения восстанавливается начальная проводимость. Аналогичные результаты получены и в работе (9) для 250 нм. Эти факты также хорошо объясняются приведенной выше гипотезой. Интересно отметить, что спектр действия облучения на проницаемость покоящейся плазмалеммы для ионов Cl^- также оказался подобен спектрам инактивации белков (по относительной эффективности действия разных длин волн).

Мы предприняли попытку определить, не имеют ли белки, действие на которые у.-ф. облучения приводит к уменьшению амплитуды хлорных токов, определенного пространственного расположения по отношению к продольной оси клетки. Для этого клетки облучались поляризованным у.-ф. 280 нм, с электрическим вектором световой волны, параллельным продольной оси клетки в одной серии экспериментов и перпендикулярным ей — в другой. Существенного отличия в действии по-разному поляризованного света обнаружено не было, что свидетельствует об отсутствии преимущественной ориентации поглощающих диполей относительно продольной оси клетки.

Результаты этой работы, как и данные предшествующих подобных исследований, свидетельствуют в пользу наличия белков в комплексах катионных и анионных каналов возбуждимых мембран как животных, так и растительных клеток.

Институт биологической физики
Академии наук СССР
Пуцдино Московской обл.

Получено
11 VII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Р. Г. Любковская, Биофизика, т. 2, 5, 589 (1957). ² E. M. Lieberman, Exp. Cell Res., v. 47, 489 (1967). ³ I. M. Fox, R. Stampfli, Experientia, v. 27, 11, 1289 (1971). ⁴ J. Pooler, J. Membrane Biol., v. 12, 4, 339 (1973). ⁵ Г. Н. Берестовский, О. М. Жерелова, В. З. Луневский, Сб.: Харовые водоросли и их использование в исследовании биологических процессов клетки, Вильнюс, 1973, стр. 260. ⁶ А. А. Александров, Г. Н. Берестовский и др., Тез. докл. симп. Структурная лабильность мембран, Минск, 1974, стр. 3. ⁷ Г. Н. Берестовский, П. Н. Воробьев и др., Сб. Харовые водоросли и их использование в исследовании биологических процессов клетки, Вильнюс, 1973, стр. 243. ⁸ К. Смит, Ф. Хэнеуолт, Молекулярная фотобиология, М., 1972. ⁹ C. I. Doughty, A. V. Hope, J. Membrane Biol., v. 13, 2, 185 (1973).