

УДК 577.352:616—006.487

ТРАНСПОРТ КАТИОНОВ И ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
В КЛЕТКЕ НЕЙРОБЛАСТОМЫ С 1300 С РАЗЛИЧНЫМ
СОДЕРЖАНИЕМ ХОЛЕСТЕРИНА
В ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ

ВОЛКОВ Г. Л.

Институт биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

В исследованиях на клетках мышечной нейробластомы С1300 N18 с измененным липидным составом установлено, что базальный входящий поток одно- (Na^+ , Rb^+) и двухвалентных (Ca^{2+} , Mg^{2+}) катионов не зависит от концентрации холестерина в плазматической мембране.

Транспорт в клетку органических соединений (глицин, лизин, ацетат, глюкоза, тимидин) снижается, как и активность ряда мембраносвязанных ферментов (Na^+ , K^+ -АТФазы, щелочной фосфатазы, АХЭ) при отклонении содержания холестерина от уровня нормы в плазматической мембране клеток. Предполагается, что влияние холестерина на транспорт катионов компенсируется специальными механизмами липидного обмена в мембране, которые не затрагивают окружающего интегральный белок специфического липидного монослоя.

Важнейшей функцией биологических мембран является обеспечение избирательного полупроницаемого барьера, и, следовательно, организация уникального химического состава липидного бислоя. Изменения в содержании липидов мембраны могут привести к серьезным нарушениям ее функции путем снижения или повышения микровязкости липидного бислоя.

Являясь одним из основных липидных компонентов биологических мембран, холестерин признан и одним из главных модуляторов ее микровязкости [1]. Он изменяет пассивную проницаемость для ионов, глюкозы, незлектролитов и воды [2—6], может стимулировать или ингибировать мембраносвязанные ферменты и рецептор-эффекторные системы [5, 7]. Однако в последние годы нами [8—9] и рядом других авторов [10—11] показано, что значительные изменения в содержании холестерина не вызывают нарушений микровязкости плазматической мембраны живой клетки. Кроме того, нами было установлено, что базальный выход одновалентного катиона из предварительно нагруженных клеток не изменялся при модуляции содержания холестерина [12].

Настоящее исследование предпринято с целью выяснения зависимости транспорта неорганических и органических соединений и активности мембраносвязанных ферментов от липидного состава плазматической мембраны живой клетки.

Жизнеспособные клетки мышинной нейробластомы C1300 № 18 с измененным содержанием холестерина получали ранее описанными методами. Сравнительный анализ липидов также приведен в указанных работах [13—18].

Контрольные и опытные клетки после отмывки липосом заливали 5 мл среды Игла, содержащей радиоактивные неорганические катионы или органические соединения в концентрации менее 5 нмоль. Через определенные интервалы времени (указаны на рисунках) среду сливали, клетки трижды промывали 5 мл среды, затем разрушали 1 н. раствором NaOH и аликвоты вносили в счетные флаконы, содержащие 10 мл ЖС-8; другие аликвоты использовали для определения содержания белка по Lowry и соавт. [19] для пересчета на количество клеток [13—18]. В исследованиях использовали $^{86}\text{Rb}^+$, $^{22}\text{Na}^+$, $^{45}\text{Ca}^{2+}$, $^{54}\text{Mg}^{2+}$, $2[^{14}\text{C}]$ ацетат Na, $2[^{14}\text{C}]$ глицин, D, L-1- $[^{14}\text{C}]$ лизин, $2[^{14}\text{C}]$ глюкозу, тимидин-5-метил [$^3\text{H}_2$] (все отечественного производства).

Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике «1214 Rackbeta Flexival LSC» («Pharmacia», Швеция) с учетом гашения и выражали в расч./мин 10^6 клеток.

Плазматические мембраны клеток выделяли разработанным нами методом [20]. Активность ферментов измеряли, как описано ранее [20].

Результаты и обсуждение

При использовании метода, направленного на изменение содержания холестерина в клетках нейробластомы C1300 № 18 с помощью фосфатидилхолиновых и фосфатидилхолестеринных липосом, через 30 мин инкубации (концентрация липосом по фосфатидилхолину 5,0 мкмоль/1 мл взвеси) наблюдается заметное изменение концентрации стерина при высокой жизнеспособности клеток [13—18, 21]. Таким образом, в приводимых экспериментах по изучению транспорта катионов и органических соединений использовали жизнеспособные клетки с повышенным ($26,43 \pm 0,66$ нмоль на 10^6 клеток или 381 ± 20 нмоль на мг белка мембраны) или пониженным ($13,82 \pm 0,49$; 71 ± 4) содержанием холестерина по сравнению с контрольными клетками ($17,55 \pm 0,84$; 271 ± 9).

Результаты исследования базального потока внутрь клеток одного двухвалентных катионов представлены на рис. 1. Как следует из приведенных данных, значительное изменение содержания холестерина в плазматической мембране клеток (повышение на 70 и снижение на 74%) совершенно не оказывает влияния на базальный входной поток исследованных катионов.

Данные по изучению транспорта органических соединений в клетку нейробластомы представлены в рис. 2. Обращает на себя внимание тот факт, что и повышение концентрации холестерина, и ее снижение существенно тормозят вход в клетку всех исследованных органических

соединений. Так, избыток холестерина в мембране на 70% снижает накопление в клетке ацетата на 28%, глицина—на 45%, лизина—на 34%, тимидина—на 36% и глюкозы—на 45%. В то же время недостаток холестерина на 74% снижает указанные показатели на 26, 30, 20, 12 и 25% соответственно.

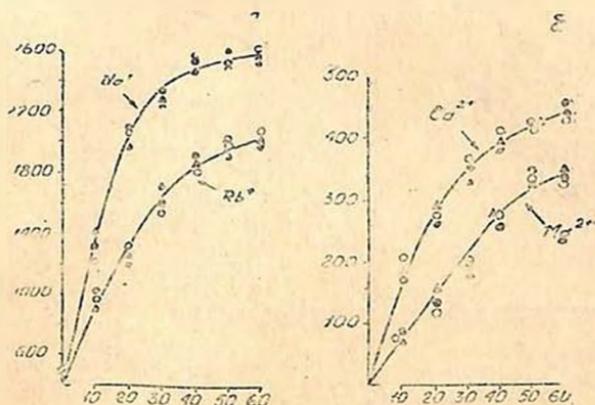


Рис. 1. Накопление одновалентных (а) и двухвалентных (б) катионов в клетках нейробластомы С1300 № 18 с различным содержанием холестерина в плазматической мембране (во всех случаях различия не достоверны): $\circ-\circ-\circ$ —контрольные клетки, $\bullet-\bullet-\bullet$ —клетки с пониженным содержанием холестерина, $\blacktriangle-\blacktriangle-\blacktriangle$ —клетки с повышенным содержанием холестерина. По оси абсцисс—время инкубации с изотопом (мин), по оси ординат—расп. мин $^{-1} \cdot 10^{-6}$ клеток

Изучение активности мембраносвязанных ферментов в плазматической мембране клеток (рис. 3) показало, что в обоих случаях при пониженной и повышенной концентрации холестерина активность ферментов ингибируется в той или иной степени. Причем незначительное снижение содержания холестерина (через 15 мин инкубации, на 30—40%), как и ожидалось [6], приводит к временному повышению активности Na^+ , K^+ -АТФазы.

Важно подчеркнуть, что как в случае для транспорта органических соединений [10—11, 22], так и активности ферментов [10—11, 23], наши данные практически полностью совпадают с данными литературы.

Отмеченное нами противоречие, заключающееся в ингибировании активности мембраносвязанных ферментов и транспорта органических соединений, связанных с изменением концентрации холестерина в плазматической мембране и отсутствием влияния этого фактора на базальный вход катионов находит свое объяснение в современных концепциях липид-белкового взаимодействия.

В настоящее время нет сомнений в том, что часть липидов в мембране прочно связана с интегральными белками [10], в том числе и ферментативными [10]. Ряд физико-химических исследований с применением методов спин-электронного резонанса и $[^2\text{H}]$ ЯМР достаточ-

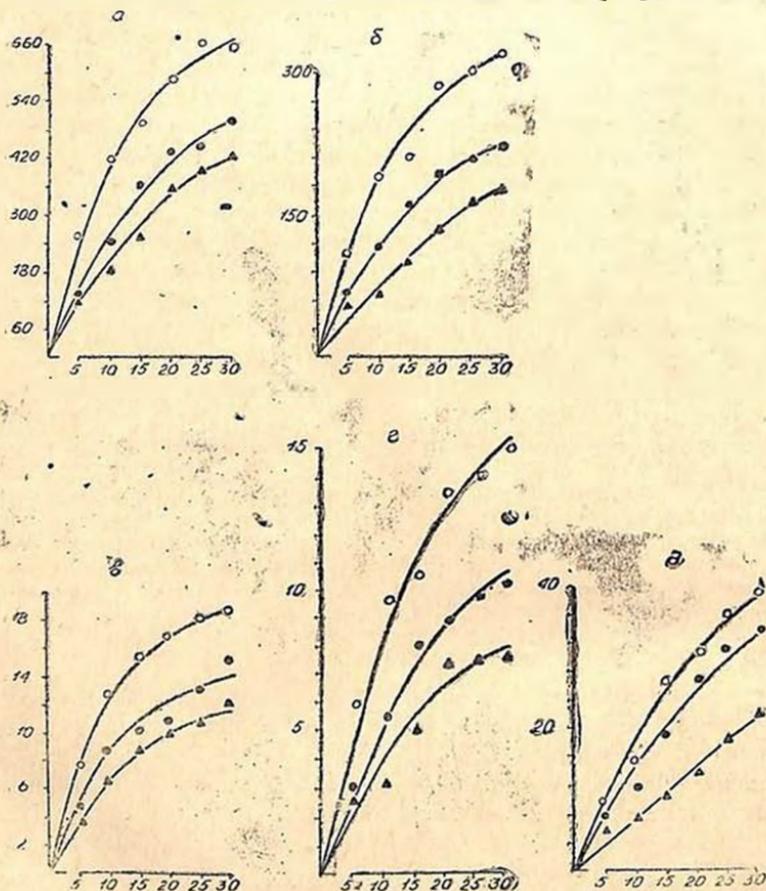


Рис. 2. Накопление $2[^{14}\text{C}]$ ацетата (а), $2[^{14}\text{C}]$ глицина (б), D,L-1 $[^{14}\text{C}]$ лицина (в), $2[^{14}\text{C}]$ глюкозы (г) и тимидина-5-метил $[^3\text{H}_2]$ в клетках нейробластомы С1300 № 18 с различным содержанием холестерина в плазматической мембране: ○—○—○—контрольные клетки, ⊙—⊙—⊙—клетки с пониженным содержанием холестерина, △—△—△—клетки с повышенным содержанием холестерина. По оси абсцисс—время инкубации с изотопом (мин), по оси ординат—радиоактивность клеток, расп. мин $^{-1}$ · 10^{-3} клеток

но убедительно показал, что липиды формируют вокруг интегрального белка как минимум прочносвязанный монослой (так называемый «липидный аннулюс»). Причем скорость обмена липидов аннулюса белка составляет примерно 1 сек^{-1} [10]. Таким образом, липидный

бислою мембраны в упрощенном варианте можно рассматривать как собственно классический липидный бислою и встроенный в него липидный аннулюс, который в свою очередь заключает в себе интегральный белок. По-видимому, регуляция микровязкости [8—9] осуществ-

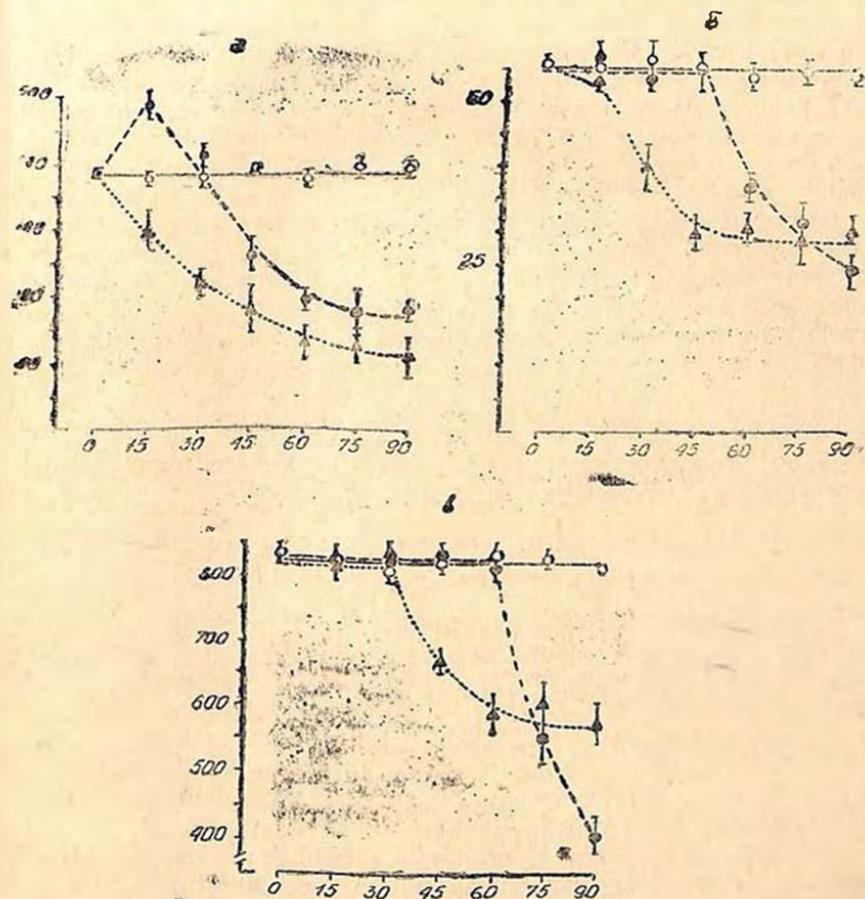


Рис. 3. Зависимость активности Na⁺, K⁺-АТФазы (а), щелочной фосфатазы (б) и ацетилхолинэстеразы (в) плазматической мембраны клеток нейробластомы С1300 № 18 от содержания холестерина: ○—○—○—контрольные мембраны, ●—●—●—мембраны с пониженным содержанием холестерина, ▲—▲—▲—мембраны с повышенным содержанием холестерина. По оси абсцисс—время инкубации с липосомами (мин), по оси ординат—активность фермента (нмоль отщепленного P_i · мин⁻¹ · мг⁻¹ белка)

вляется только в классическом бислое и не затрагивает липидный аннулюс. В то же время нами было показано, что при повышенных или пониженных концентрациях холестерина в клетке наблюдаются

значительные изменения в липидах, прочно связанных с белками [24]. Необходимо также отметить, что базальный вход катионов осуществляется без участия какого-либо переносчика, тогда как это необходимо для транспорта органических соединений.

Следовательно, как в случае классического бислоя, так и липидного аннулюса белка, при изменении концентрации холестерина в плазматической мембране происходят соответствующие изменения состава липидов. Но в бислое они могут быть компенсированы специальными механизмами [8—9], которые отсутствуют в аннулюсе, поэтому может наблюдаться отмеченное нами выше кажущееся противоречие.

Очевидно, что изменения липидного окружения широкой области мембраны, интегрирующей фермент или белок с другими функциями, может оказывать определенное влияние на активность последнего, как это отмечено для Na^+ , K^+ -АТФазы. Однако, с нашей точки зрения, только изменения липидного слоя аннулюса белка вызывают стойкие нарушения его функции.

CATION AND ORGANIC COMPOUNDS TRANSPORT INTO NEUROBLASTOMA C 1300 CELLS WITH ALTERED CHOLESTEROL CONTENT IN PLASMA MEMBRANE

VOLKOV G. L.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Ukrainian Academy of Sciences, Kiev

Using mouse neuroblastoma C 1300 N18 cells with modified lipid composition we proved that the basal entrancing stream of monovalent (Na^+ , Rb^+) and bivalent (Ca^{2+} , Mg^{2+}) cations did not depend on plasma membrane cholesterol concentration. When plasma membrane cholesterol content was altered from normal level, the transport of organic compounds (acetate, glycine, lysine, glucose, thimidine) was decreased as well, as the membrane-bound enzymes activity (Na^+ , K^+ -ATPase, alkaline phosphatase, acetylcholinesterase).

Special compensating mechanisms of lipid exchange in plasma membrane are acting against condensing cholesterol effect on lipid bilayer, and as a result cation transport is not disturbed. The lipid annulus of integral protein has not such mechanisms and alterations of annulus lipid normal content are becoming inevitable. This leads to destruction of membrane-bound proteins stable function.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nemezc G., Fontaine R. N., Schroeder F. *Biochim. et biophys. acta*, v. 943, № 3, p. 511—521, 1988.
2. Demel R. A., Bruckdorfer K. R., Van Deenen L. L. M. *Biochim. et biophys. acta*, v. 255, № 1, p. 321—330, 1972.
3. Finkelstein A., Cass A. *Nature*, v. 216, № 18, p. 717—718, 1967.

1. Yeagle P. L., Martin R. B., La'a A. K. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 74, № 11, p. 4924—4926, 1977.
5. Papatadjorajios D., Nir S., Ohki S. Biochim. et biophys. acta, v. 266, № 3, p. 561—563, 1972.
6. Yeagle P. L. Biochim. et biophys. acta, v. 822, № 1, p. 267—287, 1985.
7. Гуляя Н. М., Бездробный Ю. В., Гаврилюк Е. С. Укр. биохим. журн., т. 60, № 3, с 3—10, 1988.
8. Волков Г. Л., Худякова Н. А., Говсеева Н. Н., Гуляя Н. М. Докл. АН УССР, сер. Б, № 4, с. 31—37, 1990.
9. Волков Г. Л. Нейрохимия, т. 9, № 1, с. 55—63, 1990.
10. Yeagle P. L. FASEB J. v. 3, № 7, p. 1833—1842, 1989.
11. Hazel J. R.—in: Physiological Regulation of Membrane Fluidity, p. 149—158 Alan R. Liss, Inc., 1988.
12. Гуляя Н. М., Волков Г. Л., Лишко В. К. Укр. биохим. журн., т. 58, № 1, с. 44—48, 1986.
13. Волков Г. Л., Гуляя Н. М., Говсеева Н. Н., Артеменко Н. П. Цитология, т. 26, № 9, с. 1064, 1984.
14. Гуляя Н. М., Волков Г. Л., Говсеева Н. Н., Артеменко Н. П. Укр. биохим. журн., т. 58, № 1, с. 39—43, 1986.
15. Волков Г. Л., Говсеева Н. Н., Гуляя Н. М., Артеменко Н. П. Укр. биохим. журн., т. 3, № 2, с. 185—190, 1986.
16. Гуляя Н. М., Волков Г. Л., Говсеева Н. Н., Артеменко Н. П. Укр. биохим. журн., т. 59, № 4, с. 64—69, 1987.
17. Волков Г. Л. Укр. биохим. журн., т. 61, № 6, с. 76—80, 1989.
18. Волков Г. Л., Гуляя Н. М., Говсеева Н. М. Укр. биохим. журн., т. 61, № 6, с. 79—75, 1989.
19. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall J. R. J. Biol. Chem., v. 193, № 2, p. 265—275, 1951.
20. Волков Г. Л. Укр. биохим. журн., т. 61, № 5, с. 71—76, 1989.
21. Gulaya N. M., Volkov G. L., Klimashevsky V. M. Neuroscience, v. 34, № 3, p. 785—792, 1990.
22. Madden T. D., Chapman D., Quinn P. J. Nature, v. 279, № 4, p. 538—540, 1979.
23. Craigo M., Eibl H., Barrantes F. J. Biochemistry, v. 21, № 12, p. 3622—3627 1982.
24. Климашевский В. М., Волков Г. Л., Гаврилюк Е. С. и др. Докл. АН УССР, Сер. Б, № 9, с. 60—63, 1989.

Поступила 19. VII 1990