

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ
ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ

ЛИШКО В. К., ГИММЕЛЬРЕЙХ Н. Г.

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

Рассмотрены литературные данные о взаимодействии натриевых каналов возбудимых мембран с различными группами нейротоксинов и использовании этих нейротоксинов в качестве специфической метки для выделения и очистки натриевого канала. Обсуждены вопросы химического состава и субъединичной структуры, а также биогенеза каналообразующих белков. Проанализированы данные экспериментов по реконструкции солюбилизованных препаратов на везикулированных и плоских липидных мембранах.

В настоящее время общепринятой является концепция, согласно которой ионные электроуправляемые каналы представляют собой трансмембранные белки, которые образуют в плазматической мембране возбудимых клеток ионселективные поры. Еще сравнительно недавно основной техникой при исследовании ионных каналов была регистрация изменений мембранной проводимости. Благодаря электрофизиологическим методам были установлены такие важные характеристики ионных каналов, как ионная селективность, потенциалзависимая активация и инактивация, воротные токи и т. д. Однако эти методы не давали информации о структуре каналов и молекулярных механизмах их функционирования.

Развитие исследований химического состава и структуры ионных каналов стало возможным в связи с открытием целого ряда различных по своей природе и структуре соединений, взаимодействующих с ионными каналами с высоким сродством и оказывающих специфическое влияние на функционирование этих мембранных структур. Использование их в качестве специфических зондов ионных каналов обеспечило быстрый прогресс биохимических исследований по идентификации, выделению и очистке компонентов ионных каналов.

Важным этапом в изучении молекулярных механизмов функционирования ионных каналов явились работы по восстановлению функциональной активности выделенных белков с использованием искусственных липидных мембран.

Настоящая статья посвящена обзору работ по очистке и реконструкции потенциалзависимого натриевого канала.

Натриевый канал. Взаимодействие с токсинами. Различают четыре основные группы нейротоксинов, которые взаимодействуют со структурными элементами натриевых каналов с высокой специфичностью: 1) водорастворимые нейротоксины—блокаторы натриевой проницаемости, к числу которых относят тетродотоксин и сакситоксин; 2) липорастворимые нейротоксины—грайанотоксины и алкалоиды вератридин, батрахотоксин и аконитин, влияющие на процессы активации и инактивации натриевых каналов, а также на их селективность; 3) полипептидные токсины морских актиний и североафриканских скорпионов (α -токсины), которые замедляют процессы инактивации натриевых каналов и, аллостерически взаимодействуя с центрами связывания токсинов второй группы, усиливают влияние алкалоидов на натриевую проницаемость; 4) токсины американских скорпионов (β -токсины), которые также, как и α -токсины, изменяют кинетику активации канала, однако связываются с каналом в другом месте [1—3].

Токсины, блокирующие натриевые каналы, являются сложными гетероциклическими соединениями. Тетродотоксин (ТТХ) содержит одну положительно заряженную гуанидиновую группу, а молекула сакситоксина (СТХ) содержит две гуанидиновые группы, хотя только одна из них активна [4, 5]. По-видимому, гуанидиновая группа имитирует гидратированный ион натрия и конкурирует с ним, проникая в устье натриевого канала. Связывание токсинов не зависит от мембранного потенциала и не изменяет зависимости процессов активации и инактивации натриевых каналов от потенциала. Это дало основание предполагать, что рецепторный центр этих токсинов не связан с потенциалчувствительным компонентом канала и, по-видимому, локализован у наружного устья поры [3, 6]. Полагают, что высокоспецифическое связывание катионных форм нейротоксинов обеспечивается электростатическими взаимодействиями между гуанидиновыми группами ТТХ и СТХ и карбоксильной группой канала [6]. Для СТХ характерно более быстрое взаимодействие с натриевым каналом, что, возможно, обусловлено большей гибкостью молекулы этого токсина [7].

Среди агентов, влияющих на ионную проницаемость, большой интерес представляют те, которые вызывают перестройку работы воротных механизмов ионных каналов. К ним относится группа липорастворимых токсинов и полипептидные токсины скорпионов и морских актиний [8].

Деполаризация возбудимых мембран под влиянием липорастворимых токсинов происходит за счет избирательного увеличения натриевой проницаемости. Эксперименты с фиксацией напряжения показали, что деполаризация является следствием двух эффектов—активации натриевых каналов при более отрицательных значениях потенциала и элиминации нормальной инактивации натриевых каналов [9]. Деполаризация, вызываемая грайанотоксином, полностью обратима, эффект вератридина мало обратим, а действие батрахотоксина и аконитина, в основном, необ-

ратимо [10—12]. Способность токсинов активировать натриевый ионифор убывает в ряду батрахотоксин > грайанотоксин > ператридин > аконитин [13]. По-видимому, батрахотоксин является полным агонистом, а то время как остальные токсины — лишь частичными [13, 14].

Под влиянием алкалоидных токсинов происходит изменение селективности натриевых каналов, но не изменяется их чувствительность к ТТХ. Этот факт дает основание полагать, что селективный фильтр и рецептор ТТХ пространственно разделены [11].

К группе токсинов, замедляющих процесс инактивации натриевых каналов и не влияющих на процесс активации, относятся α -токсины скорпионов и токсины морских актиний. α -Токсины скорпионов представляют собой низкомолекулярные основные белки, состоящие из одной полипептидной цепи и содержащие по четыре дисульфидных мостика, присутствие которых и объясняет значительную стабильность к тепловой денатурации, а также к действию мочевины [15, 16]. Токсины актиний также небольшие полипептиды, содержащие около 50 аминокислот и два-три дисульфидных мостика [17, 18].

Все полипептидные токсины воздействуют на воротную систему натриевого канала, но не влияют на селективный фильтр [19], их рецепторы расположены на наружной поверхности возбудимой мембраны [20]; эти рецепторные участки отличны от таковых алкалоидных токсинов [19]. Электрофизиологические данные свидетельствуют о том, что из двух конформационных состояний, соответствующих открытому и закрытому натриевому каналу, предпочтительным для взаимодействия с полипептидными токсинами является состояние, соответствующее открытому каналу. Структуры, образующие воротную систему канала, по-видимому, расположены на обеих сторонах мембраны, так как они доступны для полипептидных токсинов, добавленных во внеклеточную среду, и для проназы, введенной в цитоплазму [20].

При сравнении связывания токсинов скорпионов и морских актиний обнаруживаются существенные различия. Связывание первых сильно зависит от мембранного потенциала: деполяризация от -41 мВ до 0 увеличивает концентрацию токсина скорпиона, необходимую для полумаксимальной активации в 70 раз. При этих же условиях для токсина актиний она увеличивается только в 5 раз [21, 22].

Предполагают, что токсины актиний и α -токсины скорпионов связываются с рецепторными участками натриевого канала, которые могут существовать в двух конформациях (с высоким и низким сродством): переходные состояния между этими двумя конформациями обратимы и потенциалзависимы [21].

Токсины американских скорпионов (мексиканского *Centruroides suffusus* и бразильского *Tityus serrulatus*), β -токсины связываются с одним типом не взаимодействующих участков [23, 24]. Конкуренции за связывающие участки между α - и β -токсинами скорпионов не наблюдалось, участков связывания β -токсинов в 6—10 раз больше, чем α -токсинов и, по-видимому, столько же, сколько для ТТХ [25]. Связывание

β -токсинам с мембранами синантосом не зависит от величины мембранного потенциала. Действие β -токсина обусловлено блокированием ранней фазы входящего натриевого тока [26]. Высокое сродство β -токсина (К_d γ -токсина *Tityus seignatus* $4,0-5,5 \times 10^{-12}$ М) и независимость действия от мембранного потенциала делают весьма перспективным использование этой группы токсинов для изучения структуры и молекулярной организации натриевых каналов [27, 28].

Солюбилизация и очистка компонентов натриевого канала. Биохимический анализ рецепторов стал возможным благодаря получению радиоактивных, флуоресцентных и фотоактивных производных нейротоксинов. Особенно широко с этой целью были использованы производные ТТХ и СТХ, так как связывание этих нейротоксинов с натриевыми каналами наиболее специфично (величина К_d для различных электровозбудимых мембран колеблется от 2 до 10 нМ [29, 30]) и не зависит от мембранного потенциала.

Исследованиями, проведенными на электрическом органе *Electrophorus electricus*, аксонах камчатского кальмара и ткани мозга млекопитающих было установлено, что несмотря на разнообразие объектов, условия солюбилизации ТТХ-рецептора, при которых он сохраняет способность специфически взаимодействовать с токсинами, чрезвычайно сходны. Хорошие результаты дало применение неионных детергентов—луброла-РХ [31—34] и бриджа—96 [34]. При их использовании условия, обеспечивающие максимальную солюбилизацию мембранных белков, совпадают с условиями, дающими максимальный выход ТТХ (СТХ)-связывающих компонентов. Обычно эти детергенты солюбилизируют 60—80% мембранных белков и 50—70% ТТХ-связывающей активности.

Время полужизни при 0° солюбилизированных из различных источников ТТХ-связывающих компонентов колеблется в достаточно широком интервале—2 ч для рецепторов из аксональной мембраны камчатского краба [34] и 3—5 дней—из электрического органа *Electrophorus electricus* [32]. Стабилизации ТТХ-связывающего компонента в детергентных растворах, особенно при фракционировании, можно достичь, добавив фосфолипиды. Чаще всего используют фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин или смесь соевых липидов. Существенным при этом является соотношение детергента и фосфолипида в экстракте. Холестерин и фосфатидилинозитол не оказывают стабилизирующего действия. Также совершенно неактивны как стабилизирующие агенты синтетические фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, содержащие только насыщенные жирные кислоты [32]. Допускают, что влияние состава мицелл на стабильность солюбилизированного ТТХ-связывающего компонента заключается в том, что белок (или белки), формирующий ТТХ-рецептор, имеет множество центров для связывания молекул липидов и детергентов. Последние конкурируют между собой за центры связывания. Образующийся липид-белковый комплекс существенно стабильнее детергент-белкового [32].

Исследование свойств солюбилизованного ТТХ-рецептора, выделенного из электрического органа, а также из нервной ткани различных животных, показало сходство по ряду характеристик с мембраносвязанным натриевым каналом. Солюбилизованные препараты имеют лишь несколько большую вариабельность K_d . Для них показана та же зависимость связывания ТТХ от величины рН: угнетение при протонировании группы с pK_a 5,2; ингибирующее влияние реагентов, ковалентно взаимодействующих с карбоксильными группами; возможность предотвращения ингибиторного влияния ионов алкилоксония при введении в среду низких концентраций ТТХ; та же чувствительность к протеазам и липазам; высокая термолabileность, сохраняющаяся даже при стабилизации фосфолипидами ТТХ-связывающего компонента [33].

Фракционирование методом гель-фильтрации детергентных экстрактов из электрического органа, аксональной мембраны краба и мозга млекопитающих показало, что ТТХ-связывающий компонент ведет себя как аномально большой глобулярный белок с радиусом Стокса 10—12 нм [34, 35]. Подвижность при хроматографии не могла быть использована для определения величины M_r ТТХ-связывающего компонента, так как солюбилизованная частица состоит не только из белка, но и детергента и липида. О высоком содержании фосфолипида в солюбилизованной частице свидетельствует парциальный удельный объем—0,98 cm^3/g (для растворимых белков—в среднем 0,74 cm^3/g), а также поведение при центрифугировании в градиенте плотности [36].

Расчет показал, что липид составляет 46% величины M_r солюбилизованной частицы. M_r очищенного аффинной хроматографией STX-связывающего компонента мозга крысы составляет 316 ± 63 кД [35].

Установлено также, что STX-связывающий компонент является гликопротеином [37]. Он количественно взаимодействует с иммобилизованным агглютинином из зародышей пшеницы и конканавалином А, а также частично с гемагглютинином из чечевицы и агглютинином из клеверины. При удалении концевых остатков сиаловой кислоты нейраминидазой значительно снижается связывание с иммобилизованным агглюотином из зародышей пшеницы, но в то же время демаскируются центры, способные взаимодействовать с лектинами, специфическими для галактозы и N-ацетилглюкозамина. Не оказывают влияния на взаимодействие солюбилизованного токсинсвязывающего компонента с агглюотином из зародышей пшеницы β -N-ацетилглюкозаминидаза и фосфолипаза С.

Таким образом, STX-связывающий компонент является гликопротеином, содержащим терминальный остаток сиаловой кислоты и экранированные остатки маннозы, галактозы, N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина. Пространственно токсинсвязывающие центры отделены от центров, взаимодействующих с лектинами: свободные лектины—конканавалин А и агглютинин из зародышей пшеницы не изменяют ни количества, ни средства токсинсвязывающих центров.

По-видимому, гликопротеидная природа токсинсвязывающего центра компонента—одна из причин аномального поведения белка при электрофорезе и гель-хроматографии.

К настоящему времени разработаны эффективные методы получения высокоочищенных компонентов натриевого канала из нервной ткани [38, 39] и мембран электрического органа электрических рыб [40], в том числе препаративные.

Солюбилизованный в детергенте с добавлением фосфолипидов и 10 мМ Ca^{2+} ТТХ-рецептор очищают последовательной хроматографией на ДЭАЭ-сефадексе, гидроксилапатите, сефарозе с иммобилизованным лектином из зародышей пшеницы с последующим центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Полученные препараты связывают ТТХ (STX) до 3000 пмоль/мг белка [38, 39]. Предполагая, что 1 моль натриевого канала связывает 1 моль ТТХ, теоретически связывающая активность для очищенного натриевого канала равна 3200 пмоль STX/мг белка.

Препараты из мозга крыс, соответствующие очищенному на 90% ТТХ-рецептору натриевого канала, при электрофорезе в присутствии ДДС-Na обнаруживают при полипептида: α — 270 ± 10 , β_1 — 39 ± 2 и β_2 — 37 ± 2 кД [35]. В настоящее время достаточно убедительно доказано, что β_1 - и β_2 -субъединицы не являются продуктами деградации α -субъединицы. Исследования в присутствии возрастающих концентраций меркаптоэтанол показали, что α - и β_2 -субъединицы связаны ковалентной дисульфидной связью, в то время как β_1 -субъединица связана с комплексом нековалентными связями [41, 42]. Все три субъединицы рецептора ТТХ являются кислыми белками. В результате анализа общего аминокислотного состава субъединиц определено отношение полярных аминокислот к гидрофобным. Для α -, β_1 - и β_2 -субъединиц оно составляет 1,13, 1,14 и 1,35, соответственно. Анализ N-концевых аминокислот не выявил ни в одной из субъединиц свободных α -аминогрупп [38].

Выделенный и очищенный до гомогенного состояния α -пептид был исследован методом электронной микроскопии. Было показано, что в солюбилизованном состоянии α -пептид имеет вид стопки дисков размером 4×20 нм. По данным кругового дихроизма, в смеси с детергент-фосфолипидными мицеллами он представляет собой конформационно гибкую молекулу, имеющую, в основном, β -структуру.

При реконструкции на фосфолипидных мембранах он переходит в конформацию, на 65% состоящую из α -спирали [43]. Путем химического анализа показано, что α -субъединица представляет собой гликозилированный полипептид [44]. Углеводы составляют 31% массы α -субъединицы, при этом сиаловые кислоты—50% общих углеводов [43]. Для β -субъединиц натриевого канала сиалогликопротеидная природа впервые доказана Гришным и соавт. [38].

Сиалогликопротеидная природа субъединиц натриевого канала явилась основанием для заключения о том, что все три субъединицы натриевого канала частично экспонированы на наружной поверхности плазматической мембраны. Способность же α -субъединицы к селективному фосфорилированию эндогенной сАМР-зависимой протеникиназой свидетельствует о том, что фрагменты молекулы натриевого канала расположены на цитоплазматической стороне мембраны [45, 46].

В результате разработки методов селективного удаления β_1 - и β_2 -субъединиц из состава солиubilизированного детергентом ТТХ-рецептора мозга крыс было установлено, что необходимым условием для поддержания ТТХ-связывающего центра в конформации с высоким сродством к ТТХ является связь α -субъединицы с β_1 -субъединицей. Отделение β_1 -субъединицы от комплекса α - β_2 приводит к полной потере ТТХ(STX)-связывающей активности [47]. Связи между количеством β_2 -субъединицы в канальном комплексе и ТТХ-связывающей активностью не обнаружено. Интересно отметить, что при взаимодействии синапсом с фотсактивным производным α -токсина скорпиона *Leiurus quinquestriatus* метка обнаруживается в полипептидах, величина M_r которых соответствует α - и β_1 -субъединицам ТТХ-связывающего рецептора. При этом с β_2 -субъединицей метка почти не связывается [48]. Полипептиды с M_r , идентичной α - и β_1 -субъединицам, также взаимодействовали с токсином четвертой группы— β -токсином скорпиона *Centruroides suffusus* [49, 50]. Предполагается, что рецепторные центры третьей и четвертой групп нейротоксинов лежат в области контакта α - и β_1 -субъединиц.

Изолированный нативный ТТХ-связывающий белок (2200 пмоль ТТХ/мг белка), выделенный из электрического органа *Electrophorus electricus*, по-видимому, лишен низкомолекулярных пептидов—только один большой полипептид с M_r 260 кД соочисляется с ТТХ-связывающим рецептором [51]. Считают, что этот полипептид аналогичен большой субъединице очищенного канала мозга крыс.

Работы по функциональной реконструкции натриевого канала из электрического органа показали, что для восстановления свойств канала достаточно только большого полипептида [52, 53]. Norman и соавт. [54], используя для очистки γ -токсин скорпиона *Tityus serrulatus*, выделили из электрического органа также только один большой полипептид с M_r 270 кД, идентичный ТТХ-связывающему компоненту [52]. Очевидно, полипептид с M_r 260 кД содержит связывающие центры как для ТТХ, так и для β -токсинов скорпионов.

Для белка натриевого канала из *Electrophorus electricus* на основе анализа последовательности мРНК установлена полная аминокислотная последовательность. Белок содержит 1820 аминокислотных остатков с общей величиной M_r 208,321 кД. Если считать, что углеводный компонент натриевого канала составляет 29,55% общего веса, то M_r гликозилированного канала должна быть равна 295,491 кД. Белок натриевого канала содержит 10 аспарагиновых остатков, которые потенциально являются центрами гликозилирования. В структуре белка установлены четыре повторяющихся гомологичных последовательности, содержащих приблизительно по 260 аминокислотных остатков. В каждой такой последовательности можно выделить пять гидрофобных сегментов. Авторы предполагают, что каждая из четырех гомологичных структурных единиц пересекает мембрану четыре раза, формируя таким образом структуру ионного канала. Согласно этой модели, N- и C-концы этого белка находятся на цитоплазматической поверхности мембраны. В последовательности обна-

соединены также четыре сегмента отрицательно заряженных аминокислот. Допускают, что эти сегменты принимают участие в формировании ворсинчатых структур канала [55].

По-видимому, предложенная модель натриевого канала будет подвергаться модификациям по мере накопления информации о химическом составе и структуре белков натриевого канала из других тканей.

О биогенезе натриевых каналов. Выделение и очистка натриевого канала сделали возможным изучение биогенеза этого важнейшего мембранного компонента.

Еще в 1982 году Doyle и соавт. [62] сообщили, что из фракции цитоплазматических белков сердечной мышцы лягушки можно выделить высокомолекулярный белок (M_r —140—200 кД, радиус Стокса 5,2 нм), который связывает STX со столь же высоким сродством, что и плазматическая мембрана ($K_d=5$ нМ). Расчет показал, что в цитозоле находится 43% центров, связывающих STX. Белок, взаимодействующий с нейротоксином, почти полностью осаждается сульфатом аммония при его насыщении на 70%.

Существование внутриклеточного пула компонентов натриевого канала в клетках нейробластомы было показано в лаборатории Cattell [57]. Было обнаружено, что разрушенная клетка связывает STX значительно больше, чем можно было предположить, исходя из количества связывающих центров на поверхности мембраны. Кроме того, был установлен факт довольно быстрого обновления структур натриевого канала (время полужизни канала—26 ч; за 4 дня обновляется 90% каналов).

Внутриклеточный пул натриевых каналов был обнаружен и в развивающихся клетках головного мозга крысы [58]. Белки этого пула были выявлены с помощью специфической антисыворотки, полученной против высокоочищенного натриевого канала. Так же, как и мембранный натриевый канал, взаимодействующий с антителами, белок был гликозилирован, фосфорилировался в присутствии cAMP-зависимой протеинкиназы. Его величина M_r была равна 260 кД. Авторы считают, что этот белок представляет собой «свободную» α -субъединицу натриевого канала, которая в отличие от зрелой α -субъединицы не связана с β_2 -субъединицей и не проявляет высокого сродства к STX. «Свободные» α -субъединицы составляют 67—77% от общего количества иммунореактивных α -субъединиц в развивающемся мозгу и лишь 20% в мозговой ткани взрослых животных. Полагают, что этот внутриклеточный пул α -субъединиц служит резервом в период активного биогенеза компонентов поверхности мембраны.

Дальнейшие исследования по изучению биосинтеза и процессинга α -субъединицы натриевого канала показали, что ранним предшественником этой субъединицы является коровый полипептид с M_r 203 кД. Последний котрансляционно гликозилируется до величины M_r , равной 224 кД. Котрансляционное гликозилирование корового полипептида является необходимым этапом дальнейшего процессинга, ведущего к изменению M_r до 249 кД. Изменение M_r от 224 до 249 кД происходит в один

этап, однако механизм этого этапа процессинга еще не изучен. В дальнейшем происходит постепенное увеличение количества терминально связанных остатков сериновой кислоты. По-видимому, образование дисульфидной связи в комплексе $\alpha\beta_2$ является наиболее поздним событием в биосинтезе канала. Около 80% субъединиц клеточной поверхности мембраны представлено комплексом $\alpha\beta_2$. Время полужизни «свободной» α -субъединицы и $\alpha\beta_2$ комплекса составляют 30 и 50 ч соответственно. Полагают, что «свободная» α -субъединица является метаболически стабильным предшественником $\alpha\beta_2$ комплекса клеточной поверхности [59].

Изучение цитоплазматического пула натриевых каналов позволило обнаружить в возбудимых тканях популяцию растворимых ТТХ-связывающих каналообразующих белков [60—66]. В этих исследованиях было показано, что встраивание указанных белков в липосомы увеличивает натриевую проницаемость образованных протеолипосом. Эффект усиливался вератрином и блокировался ТТХ, введенным по обе стороны мембраны протеолипосом.

Дальнейшие исследования по очистке растворимого белка, индуцирующего ТТХ-чувствительную натриевую проницаемость в мембране липосом, показали, что это кислый белок с M_r более 300 кД. После денатурации в восстанавливающих условиях основная масса белка оказывалась в зоне 55 кД. Очищенные препараты этого белка, находясь в растворе, не связывали ТТХ, однако способность взаимодействовать с токсином восстанавливалась при реконструкции на липосомной мембране [65].

Антисыворотка, полученная к очищенному тетродотоксичувствительному белку, была способна реагировать с антигенными детерминантами, представленными в мембранной фракции головного мозга быка, на синапсомах крысы и на клетках мышечной перевиваемой линии нейробластомы, что свидетельствует о существовании общих антигенных детерминант для мембранных каналов и ТТХ-чувствительных цитоплазматических белков [66].

Как видно из изложенного, данные по вопросу о биогенезе натриевого канала немногочисленны. Однако они позволяют думать, что в процессинге компонентов натриевого канала важным этапом является создание пула цитоплазматических предшественников.

Реконструкция натриевого канала на везикулированных и плоских липидных мембранах. Единственным характерным свойством, позволяющим тестировать препараты натриевого канала в детергентном растворе, является связывание различных групп нейротоксинов. Этот тест однако является недостаточным, чтобы ответить на вопросы о структурной и функциональной сохранности очищенных белков. Оценить устойчивость различных элементов натриевого канала в процессе очистки, а также выяснить условия, необходимые для восстановления функционально активной структуры натриевого канала можно лишь при реконструкции выделенных белков на липидных мембранах—везикулированных и плоских.

Реконструкция на везикулированных липидных мембранах—липосомах обеспечивает удобную систему для изучения свойств больших популяций каналов во временном интервале, намного превосходящем скорость открывания и закрывания натриевого канала *in situ*. Эта система используется для определения количества активных каналов при реконструкции и связанного лиганда, изучения влияния нейротоксинов на ионные потоки. Одним из основных методических приемов в этих исследованиях является измерение потоков ^{22}Na .

Система плоского липидного бислоя дает возможность измерить с высоким временным разрешением ионные потоки через одиночный канал или малое количество каналов, а также провести детальное измерение потенциалзависимости, кинетических констант и селективности одиночного канала. Хотя в этой системе практически невозможно измерить связывание нейротоксинов, эффекты нейротоксинов и их концентрационные зависимости могут быть легко изучены.

Реконструкция на липосомах. Для экспериментов по реконструкции натриевого канала были использованы очищенные хроматографическими методами препараты рецептора ТТХ из головного мозга [67, 68] и электрического органа угря [69].

При реконструкции интегральных мембранных белков натриевого канала из мозга крысы была использована, в основном, процедура формирования липосом путем медленного удаления детергента в присутствии фосфолипидов. Липосомы формировали из яичного фосфатидилхолина или из смеси яичного фосфатидилхолина и липидов мозга 40:60% соответственно. Судя по результатам гель-фильтрации, в суспензии фосфатидилхолиновых везикул можно выделить две популяции—со средними размерами $85 \pm 3,5$ и 230 ± 5 нм. Среднее количество рецепторов ТТХ на везикулу колебалось от 0,75 до 2,1 [70]. Как и нативный натриевый канал, очищенный реконструированный рецептор ТТХ обладал одним типом связывающих ТТХ (STX) центров с $K_d = 2$ нМ. Эта величина хорошо согласуется с $K_d = 2,3$ нМ, установленной для натриевого канала синапсом мозга [71, 72].

Очищенный в 250 раз препарат из мозга крысы обладал гораздо большей термостабильностью при включении в фосфатидилхолиновые везикулы, чем в солюбилизованном виде. Начальная скорость входа натрия в везикулы увеличивалась в 3—4 раза вератридином. Это увеличение проницаемости на 70% блокировалось ТТХ, добавленным во внешнюю среду, и могло быть полностью заблокировано при введении ТТХ также внутрь везикул. Необходимо отметить, что концентрация вератридина, вызывающая полумаксимальную активность—11 мкМ и константа ингибирования для ТТХ—10 нМ идентичны соответствующим величинам для синапсом мозга [67].

При использовании препаратов мозга более высокой степени очистки каналы, реконструированные в фосфатидилхолиновых везикулах и в везикулах из 40% фосфатидилхолина и 60% липидов мозга, увеличивают натриевую проницаемость под влиянием вератридина в 8—15 раз [68].

Весь стимулируемый вератридином вход натрия блокировал ТТХ, добавленный по обе стороны мембраны везикул. Активированный вератридином транспорт сохранял катионную специфичность, характерную для натриевых каналов, модифицированных этим алкалоидом. Соотношение проницаемости $\text{Na} : \text{Rb} : \text{Cs} = 1 : 0,25 : 0,12$.

Чувствительным биохимическим показателем функционального состояния натриевого канала является способность связывать α -токсин скорпиона. При реконструкции компонентов натриевого канала на фосфатидилхолиновых липосомах способность связывать токсин скорпиона *Leirus quinguestriatus* утрачивается. При этом процесс солибилизации *per se* не вызывает денатурации рецептора α -токсина [73]. При анализе возможных причин утраты натриевым каналом способности взаимодействовать с α -токсином, было выдвинуто предположение о существенном значении для этого процесса липидного окружения. Компоненты натриевого канала были реконструированы на липосомах из смеси фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина. Это привело к восстановлению способности связывать α -токсин скорпионов. Оптимальная стимуляция связывания токсина *Leirus quinguestriatus* наблюдалась при соотношении указанных выше фосфолипидов 50:35:15.

В фосфатидилхолин-фосфатидилэтаноламинных липосомах (65:35) K_d для этого токсина была равна 1,9 нМ при -90 мВ (для синапсом эта величина равна 1,5 нМ при потенциале покоя). Связывание токсина в этой системе сохраняет зависимость от потенциала—при деполяризации от -60 — -50 мВ до 0 связывание токсина снижается в 3—4 раза [74, 75]. Натриевые каналы синапсом мозга транспортируют Na^+ со скоростью $1,4 \cdot 10^6$ ионов/мин на один СТХ-связывающий центр [72]. Реконструированный канал транспортирует 1×10^6 ионов/мин/СТХ-связывающий центр. Эти данные свидетельствуют о том, что реконструированные каналы транспортируют Na^+ со скоростью, сравнимой со скоростью натриевого канала *in situ*.

Несколько иную процедуру (замораживание-оттаивание-озвучивание) использовали для включения в липосомы ТТХ-рецептор натриевого канала из электрического органа угря. Оптимальный состав фосфолипидной смеси для получения везикул при реконструкции включал фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилхолин при соотношении 5:4:1. При использовании чистого фосфатидилхолина в процессе замораживания-оттаивания происходило образование кластеров из агрегированных мелких липосом. Из азолектина формировались липидные везикулы большого размера, но при этом белковый компонент утрачивал ТТХ-связывающую активность. Размер липидных везикул с реконструированным ТТХ-рецептором определялся, в основном, режимом обработки ультразвуком.

Как и препарат из мозга крысы, ТТХ-связывающий рецептор из электрического органа формировал структуру, по свойствам близкую к нативному натриевому каналу. В реконструированной системе батрахотоксин в концентрации 50 мкМ в 10 раз стимулировал вход Na^+ , а вера-

тридин в концентрации 100 мкМ—в 5 раз. Полумаксимальная стимуляция вератридином наблюдалась при концентрации 18 мкМ [76]. ТТХ, добавленный к везикулам, блокировал приблизительно 65% нейротоксин-активированного входа Na^+ , а при введении ТТХ также и внутрь везикул наблюдалось полное блокирование эффекта алкалоидных токсинов.

Липорастворимые местные анестетики, включая тетракаин и дибукан, полностью блокировали потоки Na^+ при добавлении в наружную среду, в то время как QX-222, положительно заряженное производное лидокаина, обладающее ограниченной способностью проникать в липидную мембрану—только потоки Na^+ через каналы, ориентированные в наружную среду. Параллельные измерения связывания [^3H]ТТХ и блокады входа Na^+ QX-222 выявили положительную корреляцию этих процессов [69].

С помощью чувствительного метода определения транспорта Na^+ , основанного на использовании флуоресцентного хроматофора [77], была уточнена величина K_d для ТТХ в реконструированной системе $4,3 \pm 2,1$ нМ: она аналогична константе для интактного электрического органа.

Таким образом, эти эксперименты показали способность рецептора ТТХ формировать ионный канал, несущий на себе также рецепторы для алкалоидных токсинов и местных анестетиков.

Реконструкция на плоских липидных мембранах. Встраивание интегральных мембранных, формирующих каналы, белков в плоские липидные мембраны проводится, в основном, с использованием метода, основанного на слиянии содержащих каналы везикул с плоской липидной мембраной. Процесс слияния можно разделить на два этапа. Первый этап состоит в адгезии везикул на плоской мембране. Если везикулы или плоская мембрана содержат отрицательно заряженные липиды, то адгезия может достигаться введением с цис-стороны миллимолярных концентраций двухвалентных катионов. Такой же эффект может быть получен при использовании микромолярных концентраций кальция, если включить в белок, несущий центры высокой аффинности к кальцию [78]. На втором этапе происходит истинное слияние везикулярной и плоской мембраны. Необходимым условием слияния является набухание везикул. Последнее чаще всего достигается созданием осмотического градиента на плоской мембране (цис-сторона гипертонична по отношению к трансстороне). Везикулы набухают и при достижении критического давления происходит лизис в области контакта везикулярной и плоской мембраны, ведущий к истинному слиянию. Слияние, индуцируемое осмотическим градиентом, может быть достигнуто и при добавлении везикул с преформированным градиентом.

Таким образом, скорость слияния зависит от ряда параметров: концентрации везикул, величины осмотического градиента, количества заряженных липидов в плоской мембране или в везикулах и концентрации двухвалентных катионов в водной среде.

Наиболее специфическим тестом на встраивание натриевого канала в плоскую мембрану является чувствительность трансмембранных токов к блокирующему действию ТТХ. С помощью этого теста, добавляя

ТТХ в цис- или транскамеры, определяют также ориентацию натриевых каналов в плоской мембране [79].

Важным свойством натриевых каналов, исследуемых при их реконструкции на плоской мембране, является зависимость функционирования воротной системы канала от потенциала и влияние на эту зависимость батрахотоксина, который сдвигает кривую зависимости активации натриевых каналов от мембранного потенциала в сторону гиперполяризации и предотвращает инактивацию натриевых каналов. В присутствии батрахотоксина 50% натриевых каналов синаптической мембраны открыты при -91 мВ [79], для каналов перехвата Ранвье эта величина составляет -90 мВ [80], для клеток нейробластомы — 85 мВ [81]. Средняя величина потенциала, при которой открыто 50% модифицированных батрахотоксином натриевых каналов, реконструированных на плоской липидной мембране, -91 ± 17 мВ [82].

Модифицированный батрахотоксином натриевый канал перехвата Ранвье имеет воротный заряд 3,5, натриевый канал мозга крысы — 4,0 — 6,0, нейробластомы — 4,0 — 5,0. Величина кажущегося воротного заряда для очищенного и реконструированного натриевого канала в присутствии батрахотоксина была равна $3,8 \pm 0,3$.

Совпадение значений воротного заряда и потенциала, при котором 50% натриевых каналов открыты в присутствии батрахотоксина, является веским доказательством того, что воротный механизм в очищенном белке остается функционально интактным.

Одиночный канал, реконструированный в плоском бислое, сохраняет свою селективность для Na^+ . В $0,5$ М NaCl проводимость одиночного канала равна 25,2, в $0,5$ KCl — 3,5, в $0,5$ М RbCl — 1,2 пС [70]. Величина проводимости одиночного канала в растворе NaCl лишь немногим ниже найденной для нативного канала мозга крыс — 30 пС [70].

Таким образом, в настоящее время установлено, что очищенный ТТХ-рецептор натриевых каналов из мозга крысы и электрического органа *Electrophorus electricus* при реконструкции в липидных везикулах и плоских липидных бислоях формируют структуры, по свойствам сравнимые с интактными натриевыми каналами. Тот факт, что реконструированные каналы сохраняют способность связывать алкалоидные токсины, местные анестетики, α -токсины скорпиона, сохраняют селективность и характерную зависимость воротного механизма от потенциала, позволяет рассматривать выделенный ТТХ-рецептор как белок, являющийся основной функционально активной структуры натриевого канала.

BIOCHEMICAL APPROACHES TO INVESTIGATION OF POTENTIAL-DEPENDENT SODIUM CHANNELS

LISHKO V. K., HIMMELREICH N. H.

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

Literature data on interaction of sodium channels of excitable membranes with various neurotoxins including those concerning biologically active neurotoxin derivatives as a specific label have been compiled. Subunit structure of the purified preparation of TTX-receptor and biogenesis of channel proteins are considered. Data on reconstitution of solubilized preparations of sodium channels in lipid vesicles or planar bilayers have been analyzed.

ЛІТЕРАТУРА

1. Lazdunski M., Balerna M., Barhanin J., Chlceportiche R. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 358, p. 169-182, 1980.
2. Catterall W. A. Ann. Rev. Pharmacol. and Toxicol., v. 20, p. 15-43, 1980.
3. Narahashi T. Physiol. Revs., v. 54, p. 813-889, 1974.
4. Keynes R. D. Sci. Amer., v. 240, p. 98-107, 1979.
5. Walker S., Kao C. Y. Federat. Proc., v. 39, p. 380-385, 1980.
6. Mozhaeva G. N., Naumov A. P., Khodorov B. I. Gen. Physiol. Biophys., v. 1, p. 221-223, 1982.
7. Kao C. Y. Federat. Proc., v. 40, p. 30-35, 1981.
8. Catterall W. A. Adv. Cytopharmacol., v. 3, p. 305-316, 1979.
9. Khodorov B. I. Toxins as tools in neurochemistry, p. 35-46, Berlin-New York, Walter de Gruyter, 1983.
10. Пузанов Э. М., Ревенко С. Н., Ходоров Б. И., Шишкова Л. Д. Молекуляр. биология, в. 15, с. 42-56, 1976.
11. Можеева Г. Н., Наумов А. П., Нестяев Ю. А. Нейрофизиология, т. 8, с. 152-160, 1980.
12. Huang L. J. M., Moran N., Ehrenstein G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 79, p. 2082-2085, 1982.
13. Catterall W. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 72, p. 1732-1785, 1975.
14. Catterall W. A. J. Biol. Chem., v. 252, p. 8669-8676, 1977.
15. Rochat H., Bernard P., Couraud F. Adv. Cytopharmacol., v. 3, p. 325-334, 1979.
16. Miranda F., Kupceyan C., Rochat H., Lissitzky S. Eur. J. Biochem., v. 16, p. 514-523, 1970.
17. Schweitz H., Vincent J.-P., Barhanin J., Frelin C., Linden G., Hugues M., Lazdunski M. Biochemistry, v. 20, p. 5245-5252, 1981.
18. Rothmayer W. Adv. Cytopharmacol., v. 3, p. 335-344, 1979.
19. Catterall W. A., Beress L. J. Biol. Chem., v. 253, p. 7373-7395, 1978.
20. Romey G., Abita J. P., Schweitz H., Vunderer G., Lazdunski M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 73, p. 4055-4059, 1976.
21. Catterall W. A. J. Biol. Chem., v. 252, p. 8550-8668, 1977.
22. Jover E., Martin-Moutot N., Couraud F., Rochat H. Biochemistry, v. 18, p. 463-467, 1930.

23. Joer E., Couraud F., Rochat H. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 95, p. 1607—1614, 1983.
24. Wheeler K. P., Barhanin J., Lazdunski M. *Biochemistry*, v. 21, p. 5628—5634, 1982.
25. De Vries G. H., Lazdunski M. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 11684—11688, 1982.
26. Jamovich E., Ildesonse M., Barhanin J., Rongier O., Lazdunski M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 79, p. 3896—3900, 1982.
27. Barhanin J., Giglio J. P., Leopold P. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 15553—15558, 1982.
28. Macedo T. M., Gomez M. V. *Toxicon*, v. 20, p. 601—603, 1982.
29. Barnola F. V., Villegas R., Camejo G. *Biochim. et biophys. acta*, v. 298, p. 84—94, 1973.
30. Grunhagen H. H. *Neurochem. Int.*, v. 2, p. 73—80, 1980.
31. Agnew W. S., Levinson S. R., Brahson J. S., Raftery M. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 75, p. 2606—2610, 1978.
32. Agnew W. S., Raftery M. A. *Biochemistry*, v. 18, p. 1912—1918, 1979.
33. Moore A. C., Agnew W. S., Raftery M. A. *Biochemistry*, v. 21, p. 6212—6220, 1982.
34. Коваленко В. А., Пашков В. Н., Гришин Е. В. *Биоорганич. химия*, т. 7, с. 1828—1837, 1982.
35. Hartshorne R. B., Catterall W. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 78, p. 4620—4624, 1981.
36. Golding S. M., Rhoden V., Hess E. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 77, p. 6834—6888, 1980.
37. Miller J. A., Agnew W. S., Levinson S. R. *Biochemistry*, v. 22, p. 462—470, 1983.
38. Гришин Е. В., Коваленко В. А., Пашков В. Н., Шамотисенко О. Т. *Биологич. мембрана*, т. 1, с. 858—867, 1984.
39. Hartshorne R. B., Catterall W. A. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 1667—1675, 1984.
40. Agnew W. S., Levinson S. R., Miller J. A., Ellsman M. H., Rosenberg R. L. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, v. 48, p. 165—179, 1983.
41. Hartshorne R. P., Messner D. J., Coppersmith J. C., Catterall W. A. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 13883—13891, 1982.
42. Hartshorne R. P., Catterall W. A. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 1667—1675, 1984.
43. Elmer L. W., O'Brien B. J., Nutter T. J., Angelides K. J. *Biochemistry*, v. 24, p. 8128—8137, 1985.
44. Miller J. A., Agnew W. S., Levinson S. R. *Biochemistry*, v. 22, p. 462—470, 1983.
45. Costa M. R. C., Casnelli J. B., Catterall W. A. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 7918—7921, 1982.
46. Costa M. R. C., Catterall W. A. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 8210—8218, 1984.
47. Messner D. J., Catterall W. A. *J. Biol. Chem.*, v. 261, p. 211—215, 1986.
48. Shurkey R. G., Beneski D. A., Catterall W. A. *Biochemistry*, v. 23, p. 6078—6085, 1984.
49. Darbon H., Jover E., Couraud F., Rochat H. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 115, p. 415—422, 1983.
50. Darbon H., Angelides K. J. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 6074—6084, 1984.
51. Agnew W. S., Moore A. C., Levinson S. R., Raftery M. A. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 92, p. 860—866, 1980.
52. Rosenberg R. L., Tomico S. A., Agnew W. S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 81, p. 1239—1243, 1984.
53. Rosenberg R. L., Tomico S. A., Agnew W. S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 81, p. 5594—5598, 1984.
54. Norman R. J., Schmid A., Lombet A., Barhanin J., Lazdunski M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 80, p. 4164—4168, 1983.

55. Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi S., Nakayama S., Hayashida H., Miyata T., Numa S. *Nature*, v. 312, p. 121—127, 1984.
56. Doyle D. D., Wong M., Tanaka J., Burr L. *Scienca*, v. 215, p. 1117—1119, 1982.
57. Waechter C. J., Schmidt J. W., Catterall W. A. *J. Biol. Chem.*, v. 258, p. 5117—5123, 1983.
58. Schmidt J. W., Rossie S., Catterall W. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 82, p. 4947—1851, 1985.
59. Schmidt J. W., Catterall W. A. *Cell*, v. 46, p. 437—445, 1986.
60. Лишко В. К., Малышева М. К., Стефанов А. В. Докл. АН СССР, т. 248, с. 1257—1259, 1979.
61. Malysheva M. K., Stefanov A. V., Chagovetz A. M., Lishko V. K. *Biochim. et biophys. acta*, v. 668, p. 548—552, p. 246—250, 1982.
62. Lishko V. K., Malysheva M. K., Stefanov A. V., Chagovetz A. M. *Chemistry of Peptides and Proteins* (ed. W. Voelter, E. Wünsch, Ju. Ovchinnikov, V. Ivanov), Berlin, New York, Walter de Gruyter, v. 1, p. 93—97, 1982.
63. Гиммельрейх Н. Г., Сторчак А. Г., Лишко В. К. *Укр. биохим. журн.*, т. 55, с. 548—552, 1983.
64. Малышева М. К., Лишко В. К., Жукарёва В. А., Лысенко В. В. *Нейрофизиология*, т. 16, с. 716—725, 1984.
65. Малышева М. К., Лишко В. К., Жукарёва В. А., Лысенко В. В., Третьяков А. А. *Нейрофизиология*, т. 19, с. 202—209, 1987.
66. Малышева М. К., Пинчук Г. В., Колчинская Л. И., Жукарёва В. А., Николенко А. Н., Клиничева С. А., Клеринг П. Г. *Нейрофизиология*, т. 19, с. 369—372, 1987.
67. Talvenheimo J. A., Tamkun M. M., Catterall W. A. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 11868—11872, 1982.
68. Tamkun M. M., Talvenheimo J. A., Catterall W. A. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 1676—1688, 1984.
69. Rosenberg R. L., Tomico S. A., Agnew W. S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 81, p. 1239—1243, 1984.
70. Hartshorne R., Tamkun M. M., Montal M. *Ion Channel. Reconstitution* (ed. Ch. Miller), p. 337—358, New York—London, Plenum Press, 1986.
71. Catterall W. A., Morrow C. S., Hartshorne R. B. *J. Biol. Chem.*, v. 254, p. 11379—11387, 1979.
72. Tamkun M. M., Catterall W. A. *Mol. Pharmacol.*, v. 19, p. 78—86, 1981.
73. Tamkun M. M., Catterall W. A. *J. Biol. Chem.*, v. 256, p. 11457—11463, 1981.
74. Feller D. J., Talvenheimo J. A., Catterall W. A. *J. Biol. Chem.*, v. 260, p. 11542—11547, 1985.
75. Tamkun M. M., Talvenheimo J. A., Catterall W. A. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 1676—1688, 1984.
76. Bartels E., Rosenberg T. L. *Biochem. and biophys. acta*, v. 298, p. 973—985, 1973.
77. Tomico S. A., Rosenberg R. L., Emerick M. C., Agnew W. S. *Biochemistry*, v. 25, p. 2162—2174, 1986.
78. Zimmerberg J., Finkelstein A., Cohen F. S. *Science*, v. 210, p. 906—908, 1980.
79. Hartshorne R. D., Keller B. U., Talvenheimo J. A., Catterall W. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 82, p. 240—244, 1985.
80. Khodorov B. I., Revenko S. V. *Neuroscience*, v. 4, p. 1315—1330, 1979.
81. Huang L. M., Moran N., Ehrenstein G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 79, p. 2082—2085, 1981.
82. Frenci R. J., Worley J. F., Krueger B. K. *Biophys. J.*, v. 45, p. 301—310, 1984.

Поступила 26. I. 1985