

Список литературы / References:

1. Холявка М.Г. *Исследование структурно-функциональных свойств гомогенных и гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы*. Воронеж, 2010, 178 с.
2. Бочаров К.В., Марукович Н.И., Куксин А.Ю. *Методы статистического и динамического рассеяния света для исследования наночастиц и макромолекул в растворе*. М.: МФТИ, 2016, 40 с.
3. Schroer M.A, Roseker W. *Dynamic Light Scattering Employing One- and Two-Dimensional Detectors and Different Time-Correlation Approaches*. Ralf Klemt University of Heidelberg Germany, 2015, pp. 5-11.
4. Albert A. *Selective toxicity*. 2nd ed. L.: Chapman and Hall, 1973, 630 p.

СВОЙСТВА ИОН-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫСЫТаланов Е.Ю.¹, Мосенцов А.А.², Миронова Г.Д.¹¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ

e-mail: evg-talanov@yandex.ru

²Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина

пл. Свободы, 4, г. Харьков, 61077, Украина

Аннотация. В настоящей работе с помощью метода водно-этанольной экстракции из микросом печени крысы выделен и очищен ион-транспортующий белок-канал. Изучены его электрофизиологические и регуляторные свойства. Показано, что минимальная величина канала составляет 10pS. При реконструкции в БЛМ данного белка, формируются каналы с многоуровневой проводимостью. Проводимость данного белка может распадаться на различные уровни. Величина проводимости кластеров кратна величине проводимости одиночного белка - канала. Вольтамперная характеристика (ВАХ) полученная в диапазоне напряжения от -100 mV до 100 mV свидетельствует о потенциал - чувствительности обнаруженного микросомального белка-канала. Полученные данные свидетельствуют о том, что белок выделенный из микросом не является селективным по K⁺, что возможно связано с местом его локализации и его участия в процессах опосредованных не только транспортом калия но и других одновалентных ионов. Обнаруженные эффекты АТФ и АДФ на выделенный из микросом гепатоцитов крысы канал, позволяют относить его к семейству АТФ- чувствительных белков. Ингибирование изучаемого белка-канала 5-ГД, указывает на то, что митоK_{АТФ} подобные белки, помимо митохондрий могут быть локализованы и в эндоплазматическом ретикулуме.

Ключевые слова: митохондрии, микросомы, БЛМ, K_{АТФ}-каналы, 5- ГД.**PROPERTIES OF THE ION TRANSPORTING PROTEIN ISOLATED FROM RAT LIVER MICROSOMES**Talanov E.Iu.¹, Mosentsov A.A.², Mironova G.D.¹¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences

Institutskaya st., 3, Pushchino, 142290, Russian Federation

e-mail: evg-talanov@yandex.ru

²V.N. Karazin Kharkiv National University

Svobody sq., 4, Kharkiv, 61077, Ukraine

Abstract. In this work, an ion transporting channel protein has been isolated and purified from the rat liver microsomes by using the water-ethanol extraction method. The electrophysiological and regulatory properties of the protein were studied. It was shown that the minimum conductance value of the channel is 10pS. When reconstructed into the BLM, the protein formed ion channels with a multilevel conductance. The conductance of this channel protein is divided into different levels. The conductance value of clusters is a multiple of that of the single protein channel. Volt-ampere characteristics (VAC) recorded in the voltage range from -100mV to 100mV indicates the potential-sensitivity of the microsomal channel protein. The data obtained suggest that the protein isolated from microsomes is not selective for K⁺ ions, which may be due to its localization and its participation in processes mediated by transport of not only potassium, but also other monovalent ions. The observed effects of ATP and ADP on activity of the channel isolated from microsomes of rat hepatocytes make it possible to classify it as a member of ATP-sensitive protein family. The inhibitory effect of 5-hydroxydecanoate on the studied channel protein indicates that mitoK_{АТФ} like proteins, in addition to mitochondria, can also be localized in the endoplasmic reticulum.

Key words: mitochondria, microsomes, black lipid membranes, ATP-dependent potassium channels, 5-hydroxydecanoate.

Среди всего разнообразия ион-транспортующих белков, особое место занимают АТФ-зависимые калиевые каналы, играющие важную роль при сердечно сосудистых заболеваниях [1]. В зависимости от типа ткани, типов клеток, K_{АТФ} каналы обладают различными биофизическими и регуляторными свойствами, а так же имеют различия в молекулярной композиции канала [2-6]. Известно, что данные каналы локализованы в плазматической мембране, ядре, во внутренней мембране митохондрий. В эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) локализуется ряд известных каналов и обменников, которые могут участвовать в транспорте калия через мембрану ретикулума. К ним относятся

тримерный внутриклеточный катионный канал (TRIC канал) проницаемый для калия, Ca^{2+} -активируемый калиевый канал (K_{Ca}) и калий-водородный обменник (КНЭ), помимо этого рианодиновый рецептор (RYR) и инозитол 1,4,5-трифосфат (IP3R), отвечающие за выход кальция из ЭР, потенциально проницаемы для ионов калия. За исключением TRIC каналов, которые обнаружены только в ЭР, функциональная роль калиевых каналов в ЭР остается неясной [7-9].

Недавно, в 2015 году, группой исследователей [10] было показано, что в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов крысы присутствуют калиевые каналы высокой проводимости (509 пСм), и как полагают авторы, данные каналы относятся к $\text{K}_{\text{АТР}}$ -зависимым белкам. Это предположение было выдвинуто на основе влияния модуляторов данного типа каналов, а именно АТР, толбутамида и глибенкламида. Конкретная функциональная роль обнаруженного канала в ретикулуме не известна. Авторы считают, что K^+ и Cl^- каналы работают как противоположно – транспортирующие системы во время высвобождения и поглощения Ca^{2+} эндоплазматическим ретикулумом, тем самым способствуют сохранению электронейтральности и поддержанию электрохимической движущей силы, необходимой для Ca^{2+} транспорта. Высокая проводимость (509 пСм), обнаруженная группой исследователей у белка-канала, выделенного из шероховатого ретикулума гепатоцитов крысы не является типичной для $\text{K}_{\text{АТР}}$ – каналов. Как известно проводимость данного типа канала различна и варьирует в диапазоне от 10 пСм до 100 пСм в зависимости от ткани и внутриклеточной локализации, исключением являются каналы эндотелия, где величина проводимости составляет порядка 150 пСм [11].

Ранее в нашей лаборатории из митохондрий печени крысы был выделен белок – канал с молекулярной массой 57 кДа, который при встраивании в бислойную липидную мембрану (БЛМ), формировал АТР-зависимые K^+ -каналы, с проводимостью кратной 10 пСм [12]. MS MALDI TOF/TOF анализ показал, что структура изучаемого белка – канала схожа с предшественником кальретикулина – белка эндоплазматического ретикулума [13]. Возник вопрос, могут ли подобные каналы быть локализованы в эндоплазматическом ретикулуме? В предыдущих наших работах с использованием электронной микроскопии и антител к изучаемому нами митохондриальному белку было показано, что подобные белки локализуются и в эндоплазматическом ретикулуме [14]. Выше сказанное послужило основой для проведения исследований, по изучению электрофизиологических свойств белка выделенного из эндоплазматического ретикулума гепатоцитов крысы.

Используя метод водно – этанольной экстракции, ранее разработанный в нашей лаборатории, из микросом печени крыс был выделен и очищен белок, обладающий схожим молекулярным весом с митохондриальным белком, выделяемый нами из внутренней мембраны митохондрий. Ион – транспортирующие свойства данного белка-канала изучались путем измерения электрических характеристик бислойных липидных мембран (БЛМ), модифицированных исследуемым белком.

Очищенную фракцию микросомального белка, обладающего схожим молекулярным весом с митохондриальным, реконструировали в бислойную липидную мембрану. Раствор, омывающий мембрану содержал 100 mM KCl, 20 mM TRIS – HCl (pH – 7.4). Фракцию, содержащую белок, добавляли с одной стороны мембраны в концентрации 1-3 мкг/мл. Минимальная проводимость белка выделенного из микросом при 100 mM KCl с обеих сторон мембраны составляла 10 пСм (см. рис.1). Данный белок-канал имеет пачечный характер активности, т. е. одиночные импульсы тока объединяются в серии (пачки) импульсов. В пределах пачек ток через каналы осциллирует, однако, осцилляции далеко не всегда сопровождаются полным закрыванием или открыванием канала.



Рисунок 1 – Проводимость одиночного канала выделенного из микросом, встроенного в БЛМ.

Раствор, омывающий мембрану, содержит 20 mM TRIS-HCl, 100 mM KCl, pH-7.4, напряжение, подаваемое на мембрану 50 mV

Многоуровневая проводимость характерна для большинства ионных каналов различных мембран клеток. На сегодняшний день из литературы известны три основные модели многоуровневой проводимости: флуктуации эффективного диаметра поры, кластеризация в специфических мембранных областях за счет пептид-пептидных и пептид-липидных взаимодействий и третья модель, предложенная Гелетюком и Казаченко в 1982 году, это кооперативное функционирование каналов в кластере за счет общего воротного механизма. В настоящем исследовании обнаружено, что при реконструкции в БЛМ микросомального белка, формируются каналы с многоуровневой проводимостью. Проводимость данного белка – канала может распадаться на различные уровни. Величина проводимости кластеров кратна величине проводимости одиночного белка – канала (см. рис.2). Сформированные микросомальным белком каналы – кластеры с многоуровневой проводимостью, согласуются с моделью кластерной организации каналов предложенной Гелетюком и Казаченко.

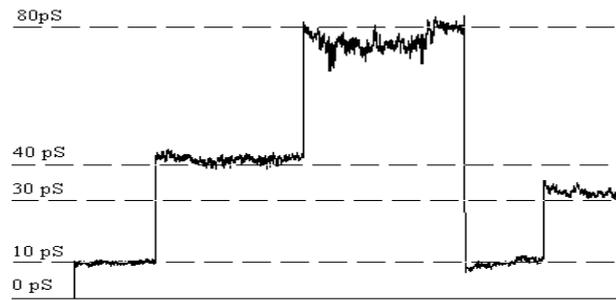


Рисунок 2 – Каналы-кластеры образованные белком, выделенным из микросом.
Раствор, омывающий мембрану, содержит 20 mM TRIS-HCl, 100 mM KCl, pH-7.4

Вольтамперная характеристика (ВАХ) получена в диапазоне напряжения от -100 mV до 100 mV (см. рис.3). Растворы омывающие мембрану были симметричны (100 mM KCl, 20 mM TRIS – HCl pH – 7.4). Выяснилось, что при напряжении от 30 до 90 mV, а так же от -100 до -30 mV каналы находятся в открытом состоянии. Увеличение напряжения выше 50 mV в большинстве случаев приводит к образованию кластеров, тогда как при напряжении 25-35 mV чаще регистрируются одиночные или 2-3-х кратные каналы. Подобное мы наблюдаем и в отрицательном диапазоне напряжения. При увеличении напряжения выше 90 mV происходит снижение канальной активности. Данный тип ВАХ свидетельствует о потенциал - чувствительности обнаруженного белка-канала.

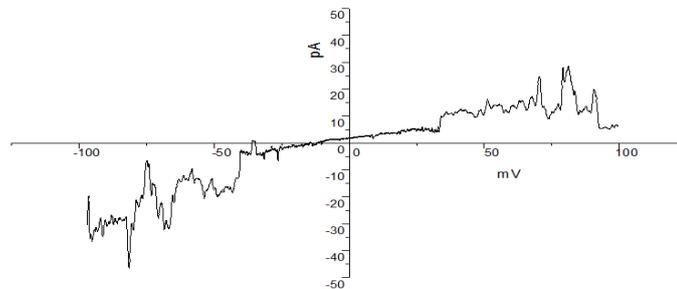


Рисунок 3 – ВАХ микросомального белка в симметричном растворе

При изучении селективности микросомального белка - канала было установлено что, создание на БЛМ 2-х кратного градиента концентрации KCl (100mM:200mM), приводит к возникновению калиевого потенциала, который уравнивается подачей напряжения 18 mV, что очень близко к теоретическому значению потенциала Нернста для данных условий (см. рис.4). В случае, когда ионы калия были заменены на ионы натрия и создан 2-х кратный градиент концентрации NaCl (100mM:200mM), возникал натриевый потенциал, который уравнивался таким же напряжением - 18mV, как и в экспериментах с калием. Полученные данные свидетельствуют о том, что белок выделенный нами из микросом не является селективным по K^+ , что возможно связано с местом его локализации и его участии в процессах опосредованных не только транспортом калия но и других одновалентных ионов. В последнее время в литературе стала обсуждаться локализация K_{ATP} подобных каналов в эндоплазматическом ретикулуме и его возможным участии в Ca^{2+} регуляции. Данные высказывания позволяют предположить что и выделенный нами из микросом белок-канал в силу своей не селективности по K^+ , может участвовать в регуляции Ca^{2+} .

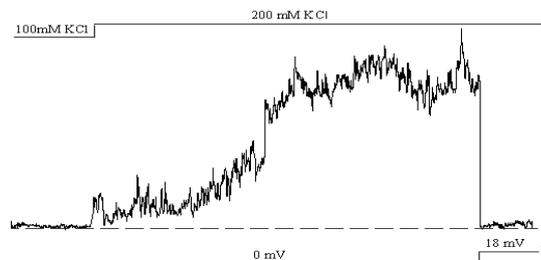


Рисунок 4 – Селективность микросомального белка. А – создание двукратного градиента KCl;
Б – запись трансмембранного тока; В – напряжение, подаваемое на мембрану

В настоящем исследовании мы так же изучили влияние основных модуляторов АТР-зависимых каналов на микросомальный белок-канал. На сегодняшний день известно, что K_{ATP} канал ингибируется физиологическими

концентрациями АТФ, однако в литературе встречаются противоречивые данные относительно действующих концентраций и необходимости присутствия двухвалентных катионов. При реконструкции микросомального белка в БЛМ (см. рис.5), значительное снижение активности наблюдалось при добавлении 4,5 mM АТФ, полное ингибирование наступало в присутствии 9 mM АТФ. Для полного ингибирования данного белка-канала, необходима больше чем в два раза концентрация АТФ, по сравнению с известными K_{ATP} белками. Это свидетельствует о меньшем сродстве изучаемого белка с АТФ. Отсутствие необходимости ионов Mg^{2+} , требующихся для гидролиза АТФ, говорит о том, что ингибирование белка, выделенного из микросом, осуществляется за счет связывания с АТФ, а не за счет фосфорилирования белка.

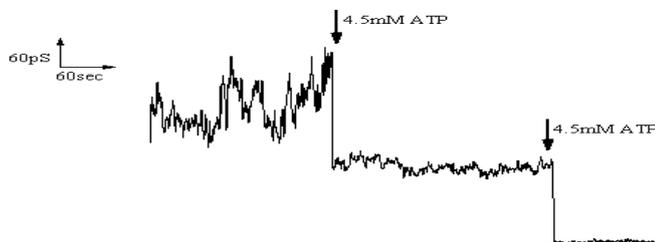


Рисунок 5 – Ингибирующее влияние АТФ на микросомальный белок, реконструированный в БЛМ. Раствор, омывающий мембрану, содержал 20 mM TRIS-HCl, 100 mM KCl, pH-7.4, напряжение подаваемое на мембрану 50 mV. Пунктирной линией показан нулевой ток

Нами обнаружено, что АТФ в концентрации 1 μ M, способен восстанавливать проводимость микросомального белка-канала после наступления rundown (см. рис. 6). Мы предполагаем, что АТФ в малых концентрациях оказывает прямое активирующее действие при связывании с данным белком.

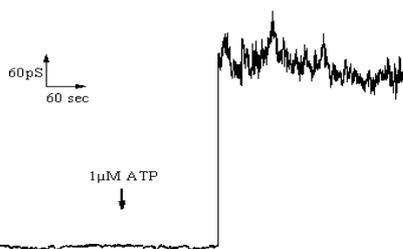


Рисунок 6 – Активирующее влияние АТФ на микросомальный белок, реконструированный в БЛМ

При изучении влияния ADP на белок, выделенного из микросом, было выяснено, что данный нуклеотиддифосфат в небольших концентрациях (до 100 μ M) увеличивает канальную активность изучаемого белка. Обнаруженные эффекты АТФ и ADP на выделенный нами из микросом гепатоцитов крысы белок-канал, позволяет относить его к семейству АТФ-чувствительных белков.

Из литературы известно, что 5-гидроксидеканоат (5-ГД) является селективным ингибитором митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала. Мы изучили влияние данного вещества, на исследуемый нами белок-канал. Как видно из рисунка (см. рис. 7), 5-ГД в концентрации 100 μ M приводил к увеличению проводимости изучаемого белка реконструированного в БЛМ, тогда как в концентрации 300 μ M ингибировал работу данного белка выделенного из микросом.

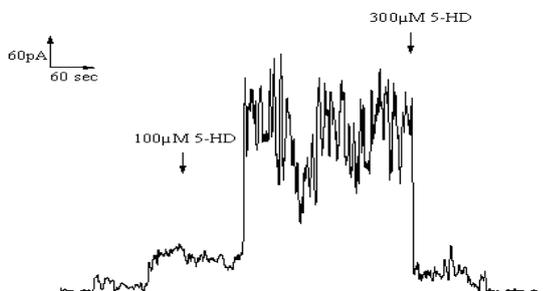


Рисунок 7 – Влияние 5-ГД на работу микросомального белка-канала, реконструированного в БЛМ

Полученные результаты свидетельствуют о двойном эффекте 5-ГД на белок, выделенный нами из ретикулума, а так же позволяют утверждать, что мито K_{ATP} подобные белки структурно схожие с предшественниками кальретикулина, помимо митохондрий могут быть локализованы и в эндоплазматическом ретикулуме.

Список литературы / References:

1. Foster M.N., Coetzee W.A. KATP Channels in the Cardiovascular System. *Physiol Rev.*, 2016, vol. 96, iss. 1, pp. 177-252.
2. Babenko A.P., Gonzalez G., Aguilar-Bryan L., Bryan J. Reconstituted human cardiac KATP channels: functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells. *Circ Res.*, 1998, vol. 83, pp. 1132-1143.
3. Bao L., Kefaloyianni E., Lader J., Hong M., Morley G., Fishman G.I., Sobie E.A., Coetzee W.A. Unique properties of the ATP-sensitive K⁺ channel in the mouse ventricular cardiac conduction system. *Circ Arrhythm Electrophysiol.*, 2011, vol. 4, pp. 926-935.
4. Baron A., van Bever L., Monnier D., Roatti A., Baertschi A.J. A novel KATP current in cultured neonatal rat atrial appendage cardiomyocytes. *Circ Res.*, 1999, vol. 85, pp. 707-715.
5. Inagaki N., Gono T., Clement J.P., Wang C.Z., Aguilar-Bryan L., Bryan J., Seino S. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron*, 1996, vol. 16, pp. 1011-1017.
6. Foster D.B., Ho A.S., Rucker J., Garlid A.O., Chen L., Sidor A., Garlid K.D., O'Rourke B. Mitochondrial ROMK channel is a molecular component of MitoKATP. *Circ Res.*, 2012, vol. 111, pp. 446-454.
7. Kuum M., Veksler V., Kaasik A. Potassium fluxes across the endoplasmic reticulum and their role in endoplasmic reticulum calcium homeostasis. *Cell Calcium.*, 2015, vol. 58, iss. 1, pp. 79-85.
8. Checchetto V., Teardo E., Carraretto L., Leanza L., Szabo I. Physiology of intracellular potassium channels: A unifying role as mediators of counterion fluxes? *Biochim Biophys Acta.*, 2016, vol. 1857, iss. 8, pp. 1258-66.
9. Laskowski M., Augustynek B., Kulawiak B., Koprowski P., Bednarczyk P., Jarmuszkiewicz W., Szewczyk A. What do we not know about mitochondrial potassium channels? *Biochim Biophys Acta.*, 2016, vol. 1857, iss. 8, pp. 1247-57.
10. Salari S., Ghasemi M., Fahanik-Babaei J., Saghiri R., Sauve R., Eliassi A. Evidence for a KATP Channel in Rough Endoplasmic Reticulum (rerKATPChannel) of Rat Hepatocytes. *PLoS One*, 2015, vol. 10, iss. 5, e0125798.
11. Schnitzler M.M., Derst C., Daut J., Preisig-Muller R. ATP-sensitive potassium channels in capillaries isolated from guinea-pig heart. *J Physiol.*, 2000, vol. 525, pp. 307-317.
12. Mironova G., Grigoriev S., Skarga Y., Negoda A., Kolomytkin O. ATP-dependent potassium channel from rat liver mitochondria: inhibitory analysis, channel clusterization. *Membr. Cell. Biol.*, 1997, vol. 10, pp. 583-591.
13. Shigaeva M.I., Talanov E.Iu., Venediktova N.I., Murzaeva S.V., Mironova G.D. A role for calreticulin in functioning of mitochondrial ATP-dependent potassium channel. *Biofizika*, 2014, vol. 59, iss. 5, pp. 887-94.
14. Pavlik L.L., Gritsenko E.N., Moshkov D.A., Mikheeva I.B., Talanov E.Iu., Mironova G.D. Localization in a cell of a protein forming the ATP-dependent potassium-selective channels in the bilayer lipid membrane. An ultrastructural study, *Biofizika*, 2010, vol. 55, iss. 5, pp. 809-13.