

ТРАНСПОРТ БОЛЬШИХ ОРГАНИЧЕСКИХ АНИОНОВ ЧЕРЕЗ СИРИНГОМИЦИНОВЫЕ КАНАЛЫ В МЕМБРАНАХ, СОДЕРЖАЩИХ ДИПОЛЬНЫЕ МОДИФИКАТОРЫ

© С. С. Ефимова,^{1,*} О. С. Остроумова,¹ В. В. Малев,^{1,2} Л. В. Щагина¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
и ² С.-Петербургский государственный университет;
* электронный адрес: ssefimova@mail.ru

В работе показано влияние дипольного потенциала мембран (ϕ_d) на проводимость и равновесное число функционирующих каналов, образованных циклическим липодепептидом сирингомицином Е (СМЕ) в бислоиных липидных мембранах из фосфотидилхолина в 0.4 М растворах аспартата, глюконата или хлорида натрия. Величину ϕ_d варьировали введением в мембраноомывающие растворы флоретина, уменьшающего ϕ_d , или RH 421, увеличивающего ϕ_d . Установлено, что во всех изученных системах увеличение дипольного потенциала мембран вызывает уменьшение стационарного числа открытых каналов. При этом в системах, содержащих аспартат (Asp) или глюконат (Glc) натрия, изменения числа функционирующих каналов на порядок меньше, чем в системах, содержащих хлорид натрия. В то же время проводимость одиночных каналов (g) в мембранах, омываемых растворами NaCl, возрастает с увеличением ϕ_d , а в системах, содержащих NaAsp или NaGlc, не зависит от ϕ_d . Последнее обусловлено отсутствием катион-анионной селективности СМЕ-каналов в этих системах. Различная каналообразующая активность СМЕ в изученных системах определяется воротным зарядом каналов и коэффициентом распределения дипольных модификаторов между липидной и водной фазами.

Ключевые слова: бислоиные липидные мембраны, одиночные ионные каналы, дипольный потенциал мембран, каналообразующие токсины, большие органические анионы.

Принятые сокращения: БЛМ — бислоиные липидные мембраны, ФХ — 1,2-дифитанол-ил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, ФЭ — 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин, ФС — 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин, СМЕ — сирингомицин Е, Asp — аспартат, Glc — глюконат.

Циклический липодепептид сирингомицин Е (СМЕ) продуцируется бактериями *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* и обладает противогрибковой и антибактериальной активностью (Sorensen et al., 1996; Lavermissa et al., 1997; Buber et al., 2002; Takemoto et al., 2003). На бислоиных липидных мембранах (БЛМ) показано, что одностороннее введение СМЕ в водные растворы хлоридов щелочных металлов вызывает формирование потенциалзависимых ионных каналов преимущественно анионной селективности, включающих в себя как элементарные каналы, так и каналы-кластеры (Feigin et al., 1996; Щагина и др., 1998; Kaulin et al., 1998; Malev et al., 2002; Остроумова и др., 2006). Каналы-кластеры являются результатом одновременного функционирования нескольких элементарных СМЕ-каналов.

Элементарный СМЕ-канал представляет собой асимметричную пептид-липидную пору конической формы, малое устье которой образовано молекулами токсина, а большое — молекулами мембранных липидов (Malev et al., 2002; Ostroumova et al., 2007a). Показано увеличение проводимости элементарных СМЕ-каналов и уменьшение каналообразующей активности липопептида (стационарного числа открытых каналов) при увеличении дипольного потенциала мембраны (ϕ_d) в липидных бислоях, омываемых растворами NaCl (Ostroumova et al., 2007b; Остро-

умова и др., 2008). Дипольный потенциал мембран, положительный внутри углеводородной части бислоя относительно границы раздела фаз мембрана/раствор, возникает в результате определенной взаимной ориентации диполей мембранных липидов и воды (Andersen et al., 1976; Franklin, Cafiso, 1993; Brockman, 1994; Ermakov, Sokolov, 2003; Sokolov, Mirsky, 2004). Очевидно, уменьшение ϕ_d должно сопровождаться уменьшением проводимости мембраны для анионов и ее увеличением для катионов. Величину ϕ_d можно варьировать с помощью дипольных модификаторов, амфифильных соединений, молекулы которых обладают большим дипольным моментом. Флоретин, встраиваясь в мембрану, уменьшает (Andersen et al., 1976), а RH 421 увеличивает дипольный потенциал мембран (Franklin, Cafiso, 1993; Malkov, Sokolov, 1996). При оценке токсичности СМЕ для клеток-мишеней необходимо учитывать влияние дипольного потенциала клеточной мембраны на транспорт как малых, так и больших органических ионов.

Целью данной работы являлось установление эффекта дипольного потенциала мембран на проводимость и стационарное число функционирующих СМЕ-каналов в липидных бислоях, когда в омывающих их растворах содержится большие органические анионы (аспартат и глюконат).

Материал и методика

Таблица 1

Величины дипольных потенциалов мембран в растворах хлоридов щелочных металлов

Дипольный модификатор	Липид	ϕ_d , мВ	Источник литературы
Флоретин, 20 мкМ Контроль	ФХ	140 ± 20	Cseh et al., 2000
	ФХ	250 ± 40	Picar, Benz, 1978; Cseh, Benz, 1998; Peterson et al., 2002; Starke-Peterkovic et al., 2005
RH 421, 10 мкМ	ФХ/ФЭ	230 ± 40	Pickar, Benz, 1978; Fellewell, Hubbell, 1986; Cseh, Benz, 1998
	ФХ	350 ± 40	Passechnik, Sokolov, 2001; Schagina et al., 2003

В работе использовали следующие реактивы: NaCl, MOPS, пентан, этанол, хлороформ, гексадекан, флоретин и RH 421 (Sigma, США); аспартат натрия (NaAsp) и глюконат натрия (NaGlc) (Fluka, США); 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ФХ), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин (ФЭ) и 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ФС) (Avanti Polar Lipids, США). Эквивалентная смесь ФС и ФЭ далее обозначена как ФС/ФЭ. Сирингомицин Е (СМЕ) был выделен и очищен, как описано в литературе (Bidwai et al., 1987), и любезно предоставлен д-ром Д. Такемото (Utah State University, США).

Формирование БЛМ проводили по методу Монтала и Мюллера (Montall, Mueller, 1972) путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстии в тефлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два (*cis*- и *trans*-) отделения. Объем каждого отделения составлял 1.5 мл, толщина тефлоновой пленки — 10 мкм, диаметр отверстия — около 50 мкм. Перед началом процесса формирования БЛМ отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали гексадеканом. Монослои формировали на границе вода—воздух из раствора 1 мг/мл липида в пентане. Измерения проводили при комнатной температуре.

Поскольку проводимость СМЕ-каналов в мембранах, омываемых растворами NaGlc, мала (Остроумова и др., 2009), использовали 0.4 М концентрацию электролитов, близкую к пределу растворимости NaGlc. Эксперименты проводили при одинаковом ионном составе водных растворов электролита (0.4 М NaCl, 0.4 М NaAsp или 0.4 М NaGlc), разделяемых мембраной. Кислотность растворов (рН 6) поддерживали буферной смесью 5 мМ MOPS/NaOH. СМЕ добавляли к водной фазе *cis*-отделения камеры из водного раствора 1 мг/мл (рН 3) до конечной концентрации 1—5 мкМ. Флоретин и RH 421 вводили в мембраноомывающие растворы из миллимолярных растворов в этаноле. Для уменьшения дипольного потенциала мембран использовали двустороннюю добавку флоретина до концентрации 20 мкМ, для увеличения ϕ_d — 10 мкМ RH 421. Очередность введения дипольного модификатора (флоретина или RH 421) и СМЕ в мембраноомывающие растворы различных электролитов не влияла на проводимость каналов. Оценку ϕ_d для мембран в растворах хлоридов щелочных металлов проводили на основании данных из литературы (табл. 1).

Измерения токов, протекающих через БЛМ, осуществляли в режиме фиксации потенциала. Для подачи трансмембранного потенциала и отведения сигнала с мембраны использовали хлор-серебряные электроды, соединенные с растворами камеры через мостики, содержащие 1.5 % агарозы в растворе 2 М KCl. Положительным считали потенциал, вызывающий поток катионов из *cis*- в *trans*-отделение камеры.

Регистрацию трансмембранных токов проводили с помощью операционного усилителя с дискретным диапазоном сопротивлений обратной связи от 10^7 до 10^{10} Ом. Сигнал с выхода усилителя подавали через АЦП на вход компьютера. Наблюдения проводили с помощью специально созданной программы ARMEX.

Обработку записей трансмембранных токов осуществляли с использованием программного пакета Clampfit 9.0 (Axon Instruments, США). Для статистического анализа данных использовали программу Origin 7.0 (OriginLab, США). Проводимость каналов (g) определяли как отношение протекающего через элементарный СМЕ-канал

тока (i) к трансмембранной разности потенциалов (V). Для построения гистограмм значения проводимостей определяли по изменениям их амплитуды при открывании (или закрывании) элементарных СМЕ-каналов. По оси ординат откладывали относительную частоту n/N , где n — число флуктуаций проводимости, отвечающих величине g в заданном на оси абсцисс диапазоне, N — общее число измеренных флуктуаций (от 10 до 500). Распределение g аппроксимировали плотностью нормального распределения и получали средние значения g . Для количественного анализа влияния ϕ_d на проводимость элементарных СМЕ-каналов использовали проводимость каналов при трансмембранных потенциалах, близких к нулю: $V \rightarrow 0$ ($g(V \rightarrow 0) = g^0$). Погрешность величин g^0 оценивали, используя минимальную погрешность измерения проводимости каналов в системе.

Число независимых измерений для каждой экспериментальной системы было не менее трех.

При измерении катион-анионной селективности каналов на ФХ-мембране создавали градиент концентрации электролита (NaCl, NaAsp или NaGlc): *cis*-отсек экспериментальной камеры содержал 0.4 М раствор, а *trans*-отсек — 0.04 М. Число переноса для анионов (t^-) рассчитывали согласно уравнению Гендерсона (Morf, 1977):

$$V^* = (RT/F) (1 - 2t^-) \ln(C_{cis} / C_{trans}), \quad (1)$$

где V^* — потенциал реверсии, соответствующий нулевому трансмембранному току при градиенте концентрации проникающих ионов на мембране; R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура; F — число Фарадея.

Выражение для равновесного числа открытых СМЕ-каналов при варьировании ϕ_d имеет вид (Остроумова и др., 2008):

$$\ln N_{op}(V, \infty, \phi_d) = \ln \rho'(\phi_d) + 6 \ln C + \ln [1 + m(\phi_d)S(\phi_d)/(1 - S(\phi_d))] - \Delta U_{str}(\phi_d)/kT + q(\phi_d)eV/kT, \quad (2)$$

где $\rho'(\phi_d)$ — параметр, характеризующий коэффициент распределения токсина между липидной и водной фазами и агрегацию молекул СМЕ на поверхности мембраны; C — концентрация липопептида в растворе; $m(\phi_d)$ —

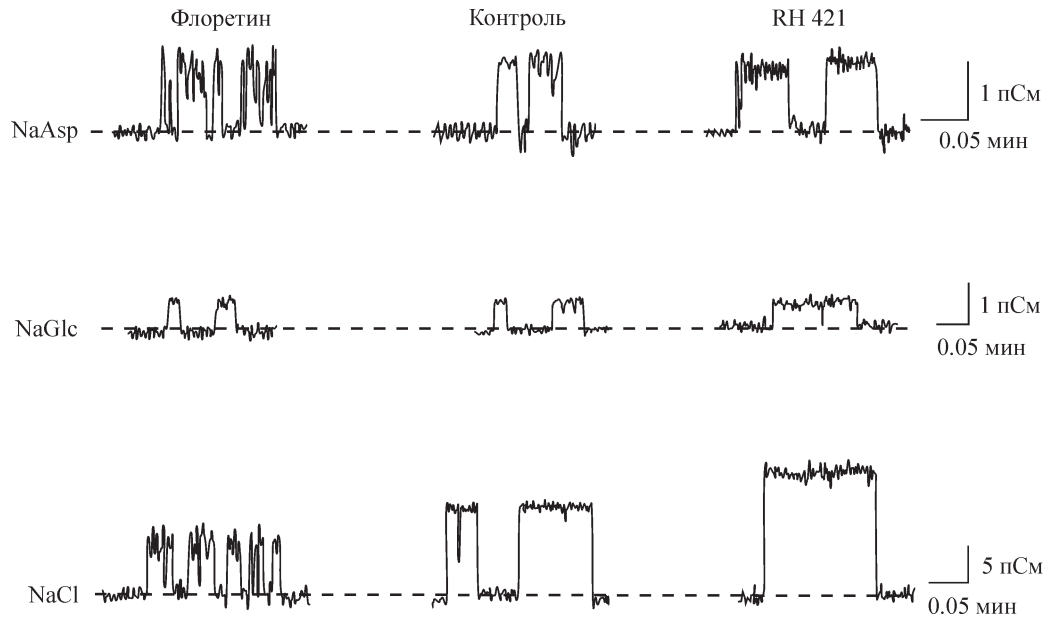


Рис. 1. Проводимость элементарных СМЕ-каналов при изменении φ_d введением дипольного модификатора в 0.4 М растворы NaAsp, NaGlc или NaCl, омывающие ФХ-мембраны.

Левая панель — в присутствии 20 мкМ флоретина; средняя панель — в отсутствие дипольного модификатора (контроль); правая панель — в присутствии 10 мкМ RH 421. Трансмембранный потенциал $V = -50$ мВ. Штриховые линии соответствуют 0 пСм.

среднее нормированное число элементарных каналов, кооперативно функционирующих в составе кластера (Ostroumova et al., 2005, 2007b; Остроумова и др., 2006); $S(\varphi_d)$ — относительное число кластеров в общем пуле каналов (Остроумова и др., 2005); $\Delta U_{str}(\varphi_d)$ — химическая составляющая работы образования СМЕ-поры; $q(\varphi_d)$ — воротный заряд СМЕ-канала, характеризующий смещение зарядов и диполей молекул СМЕ и липидов при его открывании (Hille, 2002; Malev et al., 2002; Schagina et al., 2003). Уравнение (2) можно переписать, выделив потенциалнезависимую и зависимую компоненты:

$$\ln N_{op}(V, \infty, \varphi_d) = A(\varphi_d) + q(\varphi_d)eV/kT, \quad (3)$$

где $A(\varphi_d) = \ln p'(\varphi_d) + 6 \ln C + \ln[1 + m(\varphi_d)S(\varphi_d)/(1 - S(\varphi_d))] - \Delta U_{str}(\varphi_d)/kT$. На этом основании для определения $q(\varphi_d)$ и $A(\varphi_d)$ строили зависимости натурального логарифма равновесного числа открытых каналов от безразмерной разности потенциалов на мембране и аппроксимировали полученные зависимости прямыми линиями. В этом случае параметры линейной зависимости, отсекаемый отрезок по оси ординат и коэффициент наклона прямой равны $A(\varphi_d)$ и $q(\varphi_d)$ соответственно. Поскольку $A(\varphi_d)$ зависит от концентрации липопептида в растворе, сравнение $A(\varphi_d)$ проводили до и после введения дипольного модификатора в раствор, омывающий тот же бислой, т. е. при одинаковой концентрации СМЕ. Вклад воротного заряда СМЕ-каналов в изменение равновесного числа открытых каналов при варьировании дипольного потенциала мембраны от φ_{d1} до φ_{d2} рассчитывали как $\exp\{[|q(\varphi_{d1})| - |q(\varphi_{d2})|]e|V|/kT\}$.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены примеры записей флуктуаций проводимости СМЕ-каналов в ФХ-мембранах, омываемых 0.4 М растворами NaAsp, NaGlc или NaCl, до и после

введения дипольного модификатора (флоретина или RH 421), изменяющих φ_d . На рис. 1 видно, что проводимость элементарных СМЕ-каналов в отсутствие дипольмодифицирующих агентов зависит от размеров проникающих анионов — хлора, аспартата или глюконата. Наблюдаемые различия обусловлены различной подвижностью анионов Asp⁻, Glc⁻ и Cl⁻ в СМЕ-канале (Остроумова и др., 2009). Из рисунка также видно, что проводимость элементарных СМЕ-каналов в мембранах, омываемых 0.4 М растворами NaAsp или NaGlc в отсутствие дипольного модификатора (контроль) и в присутствии флоретина или RH 421, практически одинакова. В то же время проводимость каналов в мембранах, омываемых 0.4 М растворами NaCl, существенно изменяется в присутствии дипольного модификатора.

Анализ большого числа аналогичных треков позволил построить зависимости проводимости элементарных СМЕ-каналов от трансмембранного потенциала (в диапазоне от -150 до $+150$ мВ) для ФХ-мембран с различным дипольным потенциалом (рис. 2). Соответствующая интерполяция кривых этого рисунка позволяет определить проводимость каналов в мембранах, омываемых растворами NaAsp, NaGlc или NaCl, при нулевом трансмембранном потенциале в присутствии флоретина, RH 421 и в контроле: $g_{NaAsp}^0 = 1.45 \pm 0.09$ пСм, $g_{NaAsp_флоретин}^0 = 1.43 \pm 0.11$ пСм, $g_{NaAsp_RH\ 421}^0 = 1.46 \pm 0.10$ пСм, $g_{NaGlc}^0 = 0.65 \pm 0.19$ пСм, $g_{NaGlc_флоретин}^0 = 0.63 \pm 0.18$ пСм, $g_{NaGlc_RH\ 421}^0 = 0.67 \pm 0.20$ пСм, $g_{NaCl}^0 = 14.02 \pm 0.55$ пСм, $g_{NaCl_флоретин}^0 = 8.14 \pm 0.58$ пСм, $g_{NaCl_RH\ 421}^0 = 20.49 \pm 0.61$ пСм. Эти результаты показывают, что в растворах NaAsp или NaGlc в пределах погрешности измерений отсутствует зависимость проводимости элементарных СМЕ-каналов от величины дипольного потенциала мембран, уменьшенного флоретином или увеличенного RH 421. В то же время для СМЕ-каналов в мембранах, омываемых 0.4 М NaCl, при варьировании φ_d от 140 до 350 мВ наблюдается увеличение величины g_{NaCl}^0 приблизительно в 2.5 раза. Можно предположить, что различный эффект φ_d на проводимость

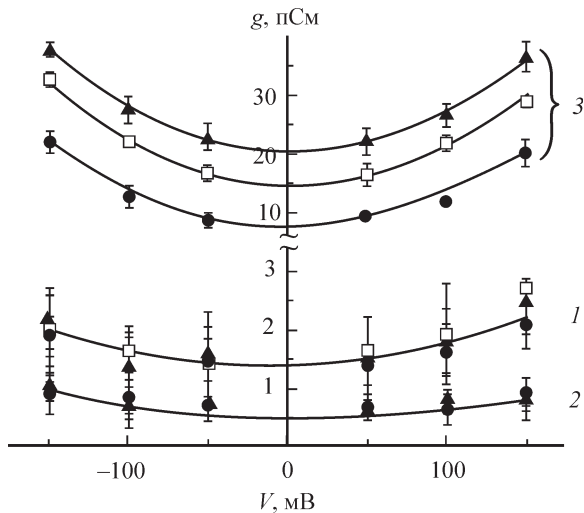


Рис. 2. Зависимость проводимости СМЕ-каналов (g) от трансмембранной разности потенциалов (V) в системах, содержащих различные анионы и дипольные модификаторы.

Бислои сформированы из ФХ и омываются 0.4 М растворами NaAsp (1), NaGlc (2) или NaCl (3). Квадраты — контроль (в отсутствие дипольного модификатора); кружки — 20 мкМ флоретина; треугольники — 10 мкМ RH 421.

СМЕ-каналов в системах, содержащих большие Asp⁻ (или Glc⁻) и малые Cl⁻ анионы, является результатом различной катион-анионной селективности каналов в этих системах.

Для проверки этого предположения была определена катион-анионная селективность СМЕ-каналов в ФХ-мембранах, омываемых растворами NaCl, NaAsp или NaGlc. Рис. 3 представляет один из примеров определения потенциалов реверсии (V^*), позволяющих установить числа переноса анионов для СМЕ-каналов при десятикратном градиенте водных концентраций соответствующих электролитов на мембранах. На рис. 3 видно, что в системе, содержащей NaCl, потенциал реверсии отрицателен ($V_1^* = -40$ мВ), а следовательно, в соответствии с уравнением (1) (см. раздел Материал и методика) число переноса анионов $t^- = 0.90 \pm 0.02$, т. е. СМЕ-канал демонстрирует преимущественно анионную селективность.

Напротив, для СМЕ-каналов в мембранах, омываемых растворами NaAsp или NaGlc, потенциалы реверсии положительны и совпадают в пределах погрешности измерений ($V_2^* = V_3^* = 9 \pm 1$ мВ), а следовательно, $t^- = 0.41 \pm 0.08$, т. е. в пределах погрешности измерений каналы неселективны по отношению к катионам и анионам. Таким образом, замена в омывающих мембраны растворах Cl⁻ на Asp⁻ или Glc⁻ сопровождается потерей преимущественно анионной селективности СМЕ-каналов. В таком случае проводимость канала практически не должна зависеть от ϕ_d . Полученные результаты позволяют понять различное влияние дипольного потенциала мембран на проводимость СМЕ-каналов в растворах, содержащих большие (Asp⁻ или Glc⁻) и малые (Cl⁻) анионы (рис. 1, 2).

На рис. 3 также видно, что введение дипольного модификатора флоретина в омывающие мембраны растворы не изменяет потенциала реверсии. Аналогичные результаты получены при измерении потенциала реверсии в присутствии в мембраноомывающих растворах RH 421 (данные не приведены). Отсутствие зависимости числа переноса каналов от ϕ_d указывает на сохранение структуры селективного фильтра канала при изменении дипольного потенциала мембран.

В то же время во всех исследованных системах рост ϕ_d сопровождается уменьшением равновесного числа функционирующих СМЕ-каналов (N_{op}) (рис. 4). На рис. 4, а видно, что при введении флоретина в мембраноомывающие растворы (0.4 М NaGlc) число N_{op} увеличивается приблизительно в 3 раза, а добавка RH 421 вызывает 3-кратное уменьшение стационарного числа функционирующих СМЕ-каналов (рис. 4, б). Аналогичными изменениями N_{op} сопровождается введение дипольного модификатора (флоретина или RH 421) в омывающие мембраны растворы NaAsp (данные не приведены). Средние значения увеличения (уменьшения) числа N_{op} при указанном способе варьирования ϕ_d составляют 3 ± 1 раз. Изменение с помощью тех же дипольных модификаторов ϕ_d мембран, омываемых растворами 0.4 М NaCl, сопровождается более существенным изменением равновесного числа функционирующих СМЕ-каналов (рис. 4, в, г). N_{op} увеличивается в 110 ± 60 раз при введении флоретина в омывающие мембраны растворы и уменьшается в 30 ± 15 раз при добавке RH 421.

Для установления механизма наблюдаемого эффекта были проведены измерения равновесного числа СМЕ-каналов в растворах аспартата, глюконата или хлорида натрия при различных значениях трансмембранного потенциала. Наклон линейной зависимости натурального логарифма стационарного числа каналов ($\ln N_{op}$) от безразмерной разности потенциалов ($V\phi_d/RT$) позволяет определить воротный заряд канала ($q(\phi_d)$), а отсекаемый отрезок по оси ординат ($A(\phi_d)$) характеризует коэффициент распределения липопептида между липидной и водной фазами (Malev et al., 2002; Остроумова и др., 2008).

На рис. 5 представлены примеры полученных зависимостей для СМЕ-каналов в ФХ-мембранах, омываемых 0.4 М растворами NaAsp (а) или NaCl (б), до и после введения в околосмембранные растворы флоретина. Как видно на рис. 5, а, добавка флоретина в омывающие мембраны растворы 0.4 М NaAsp приводит к изменению знака

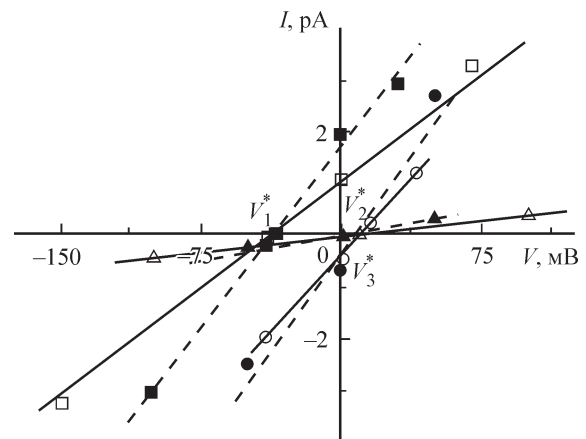


Рис. 3. Определение потенциала реверсии СМЕ-каналов в системах, содержащих различные анионы и дипольные модификаторы.

Вольт-амперные кривые стационарного тока, протекающего через СМЕ-каналы, в отсутствие дипольного модификатора (сплошные линии) через квадраты, кружки и треугольники — NaCl, NaAsp и NaGlc соответственно) и в присутствии 20 мкМ флоретина (штриховые линии) через черные квадраты, кружки и треугольники — NaCl, NaAsp и NaGlc соответственно) в мембраноомывающих растворах. Бислои сформированы из ФХ и омываются с *цис*- и *транс*-сторон 0.4 и 0.04 М растворами соответственно. Потенциал реверсии (V^*) в случае мембран, омываемых растворами NaCl, NaAsp и NaGlc, равен соответственно -40 , 10 и 8 мВ.

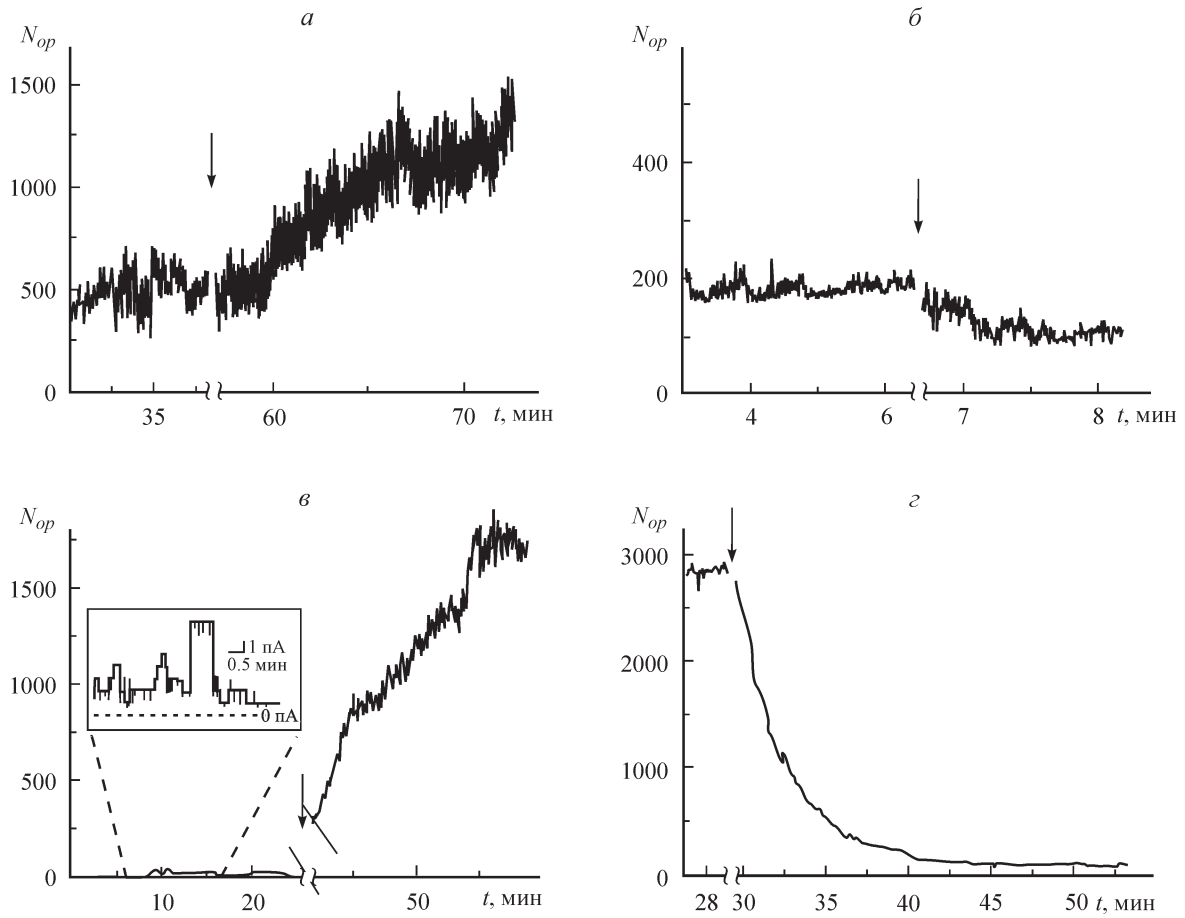


Рис. 4. Влияние дипольмодифицирующих агентов на равновесное число открытых элементарных СМЕ-каналов (N_{op}). Бислои сформированы из ФХ и омываются 0.4 М растворами NaGlc (а, б) или NaCl (в, з). Трансмембранный потенциал $V = 50$ мВ. Стрелками указаны моменты введения дипольных модификаторов: 20 мкМ флоретина (а, в) или 10 мкМ RH 421 (б, з).

$q(\varphi_d)$, хотя абсолютные значения $q(\varphi_d)$ мало зависят от φ_d . При этом отсекаемый отрезок по оси ординат увеличивается при введении флоретина, уменьшающего φ_d . В случае мембран, омываемых растворами NaCl, добавка флоретина вызывает аналогичное изменение знака воротного заряда и более существенное увеличение абсолютной ве-

личины $|q(\varphi_d)|$ (рис. 5, б). Как и в случае растворов NaAsp, отсекаемый отрезок по оси ординат увеличивается с уменьшением φ_d .

В табл. 2 приведены средние значения $q(\varphi_d)$ для всех исследованных систем. Учитывая, что $N_{op}(\varphi_{d1})/N_{op}(\varphi_{d2})$ экспоненциально зависит от $\Delta|q(\varphi_d)|$, на основании приве-

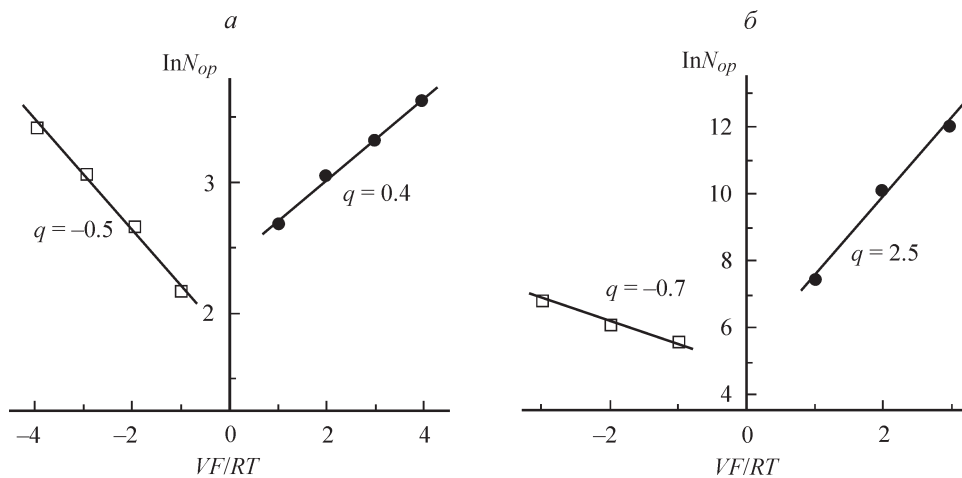


Рис. 5. Зависимость натурального логарифма общего числа открытых элементарных СМЕ-каналов ($\ln N_{op}$) от безразмерной транс- мембранной разности потенциалов (VF/RT).

Бислои сформированы из ФХ и омываются 0.4 М растворами NaAsp (а) и NaCl (б). Квадраты — контроль (в отсутствие дипольных модификаторов), черные кружки — 20 мкМ флоретина.

Таблица 2

Значения воротного заряда ($q(\varphi_d)$) элементарных СМЕ-каналов в ФХ-мембранах, омываемых 0.4 М водными растворами различных электролитов в присутствии и в отсутствие дипольных модификаторов

Дипольный модификатор	Электролит		
	NaAsp	NaGlc	NaCl
Флоретин, 20 мкМ	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	2.6 ± 0.3
Контроль	-0.5 ± 0.1	-0.4 ± 0.1	-0.7 ± 0.1
RH 421, 10 мкМ	-0.4 ± 0.1	-0.4 ± 0.1	-0.7 ± 0.2

денных в табл. 2 данных можно рассчитать вклад воротного заряда СМЕ-каналов в изменение каналаобразующей активности липопептида после введения дипольного модификатора при фиксированном трансмембранном потенциале (см. раздел Материал и методика). Сравнение полученных величин с экспериментально определенным отношением равновесного числа открытых каналов в мембранах до и после добавки дипольмодифицирующих агентов позволяет говорить о различии механизмов влияния дипольного потенциала мембраны на каналаобразующую активность СМЕ в мембранах, омываемых растворами NaCl и NaAsp или NaGlc.

Наблюдаемая близость значений $|q(\varphi_d)|$ в контроле и при введении дипольного модификатора в присутствии больших органических анионов говорит о том, что в этом случае $N_{op}(\varphi_{d1})/N_{op}(\varphi_{d2})$ определяется главным образом $\Delta A(\varphi_d)$, а следовательно, коэффициентом распределения липопептида между липидной и водной фазами, кластерной организацией и химической составляющей работы образования СМЕ-каналов. В случае систем, содержащих в мембраноомывающих растворах NaCl, каналаобразующая активность СМЕ в области $\varphi_d \leq 250$ мВ определяется как $\Delta A(\varphi_d)$, так и $\Delta|q(\varphi_d)|$, а при $\varphi_d \geq 250$ мВ — главным образом $\Delta A(\varphi_d)$. Меньшие изменения стационарного числа открытых СМЕ-каналов после добавки дипольных модификаторов в растворы NaAsp или NaGlc по сравнению с NaCl могут быть обусловлены сорбцией больших органических ионов на ФХ-мембране (Ермаков и др., 1983; Clarke, Lupfert, 1999), что приведет к изменению коэффициента распределения липопептида и (или) дипольных модификаторов между мембраной и водным раствором.

Совпадение в пределах погрешности пороговых концентраций СМЕ, необходимых для наблюдения одиночных каналов при $V = |50|$ мВ (1.0 ± 0.4 мкМ), и близость величин воротных зарядов СМЕ-каналов (см. табл. 2) в конкретных растворах NaAsp, NaGlc или NaCl свидетельствуют о независимости коэффициента распределения СМЕ от вида аниона в растворе. Скорее всего, наблюдаемые различия связаны с различием коэффициента распределения молекул дипольных модификаторов в присутствии больших и малых анионов. Вероятно, относительное уменьшение величины дипольного потенциала мембраны после введения флоретина в растворы NaAsp или NaGlc меньше, чем в случае NaCl.

В пользу этих предположений говорят результаты, полученные при измерении и сравнении величин q в заряженных мембранах (ФС/ФЭ), омываемых 0.4 М растворами NaAsp или NaCl. Оказалось, что величины q в отсутствие дипольного модификатора близки к нулю для обеих систем. Введение флоретина приводит к одинаковому росту значения q до 3.5 ± 0.5 . Эти результаты можно трактовать

как отсутствие сорбции больших органических анионов на отрицательно заряженных мембранах. Достаточно низкие величины q в незаряженных мембранах в присутствии больших органических анионов (Asp^- и Glc^-) и флоретина в околосмембранных растворах ($q = 0.5$) можно считать результатом сорбции этих анионов на мембране и уменьшения коэффициента распределения флоретина между липидной и водной фазами по сравнению с системой, содержащей NaCl. Последнее должно привести к меньшему значению φ_d незаряженных мембран после введения флоретина в растворы, содержащие большие органические анионы, по сравнению с растворами, содержащими анионы хлора.

Авторы выражают благодарность Д. Такемото за предоставление сирингомицина Е.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00883), программы президента РФ поддержки ведущих научных школ (проект 3796.2010.4), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и ГК № П1372 (МОН РФ, ФЦП «ННПКИР»).

Список литературы

- Ермаков Ю. А., Черный В. В., Соколов В. С., Татулян С. А. 1983. Граничные потенциалы на липидных мембранах в присутствии ионов 1-анилино-8-нафтален сульфоната. Биофизика. 28 (6) : 1010—1013.
- Остроумова О. С., Гурьев Ф. А., Такемото Д., Щагина Л. В., Малев В. В. 2005. Кинетические характеристики одиночных ионных каналов и стационарная проводимость модифицированных фитотоксинами липидных бислоев. Цитология. 47 (4) : 338—343.
- Остроумова О. С., Ефимова С. С., Щагина Л. В. 2009. Проводимость фитотоксиновых каналов в присутствии больших органических ионов. Цитология. 51 (8) : 670—675.
- Остроумова О. С., Малев В. В., Щагина Л. В. 2006. Кооперативность функционирования ионных каналов, образуемых фитотоксинами, сирингомицином Е и сирингостатином А. Биол. мембр. 23 (5) : 412—419.
- Остроумова О. С., Щагина Л. В., Малев В. В. 2008. Влияние дипольного потенциала липидных бислоев на свойства ионных каналов, образованных циклическим липодепептидом сирингомицином Е. Биол. мембр. 25 (5) : 388—400.
- Щагина Л. В., Каулин Ю. А., Фейгин А. М., Такемото Д., Бранд Д., Малев В. В. 1998. Зависимость свойств ионных каналов, образованных антибиотиком сирингомицином Е в липидных бислоях, от концентрации электролита в водной фазе. Биол. мембр. 15(4) : 433—446.
- Andersen O. S., Finkelstein A., Katz I., Cass A. 1976. Effect of phloretin on the permeability of thin lipid membranes. J. Gen. Physiol. 67 : 749—771.
- Bidwai A. P., Zhang L., Bachmann R. C., Takemoto J. Y. 1987. Mechanism of action of *Pseudomonas syringae* phytotoxin, syringomycin: stimulation of red beet plasma membrane ATPase activity. Plant Physiol. 83 : 39—43.
- Brockman H. 1994. Dipole potential of lipid membranes. Chem. Phys. Lipids. 73 : 57—79.
- Buber E., Stindl A., Acan N. L., Kocagöz T., Zocher R. 2002. Antimycobacterial activity of lipopeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B359. Nat. Prod. Lett. 16 : 419—423.
- Clarke R. J., Lupfert C. 1999. Influence of anions and cations on the dipole potential of phosphatidylcholine vesicles: a basis for the Hofmeister effect. Biophys J. 76 : 2614—2624.

- Cseh R., Benz R. 1998. The adsorption of phloretin to lipid monolayers and bilayers cannot be explained by langmuir adsorption isotherms alone. *Biophys. J.* 74 : 1399—1408.
- Cseh R., Hetzer M., Wolf K., Kraus J., Bringmann G., Benz R. 2000. Interaction of phloretin with membranes: on the mode of action of phloretin at the water-lipid interface. *Eur. Biophys. J.* 29 : 172—183.
- Ermakov Yu. A., Sokolov V. S. 2003. Boundary potentials of bilayer lipid membranes: methods and interpretations. In: *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*. Amsterdam: Elsevier. 7 : 109—141.
- Feigin A. M., Takemoto J. Y., Wangspa R., Teeter J. H., Brand J. G. 1996. Properties of voltage-gated ion channels formed by syringomycin E in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 149 : 41—47.
- Flewelling R. F., Hubbell W. L. 1986. The membrane dipole potential in a total membrane potential model. Applications to hydrophobic ion interactions with membranes. *Biophys. J.* 49 : 541—552.
- Franklin J. C., Cafiso D. S. 1993. Internal electrostatic potentials in bilayers: measuring and controlling dipole potentials in lipid vesicles. *Biophys. J.* 65 : 289—299.
- Hille B. 2002. *Ion channels of excitable membranes*. Sunderland: Sinauer. 814 p.
- Kaulin Y. A., Schagina L. V., Bezrukov S. M., Malev V. V., Feigin A. M., Takemoto J. Y., Teeter J. H., Brand J. G. 1998. Cluster organization of ion channels formed by the antibiotic syringomycin E in bilayer lipid membranes. *Biophys. J.* 74 : 2918—2925.
- Lavermicocca P., Iacobellis N. S., Simmako M., Graniti A. 1997. Biological properties and spectrum of activity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* toxins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50 : 129—140.
- Malev V. V., Schagina L. V., Gurnev Ph. A., Takemoto J. Y., Nestorovich E. M., Bezrukov S. M. 2002. Syringomycin E channel: a lipidic pore stabilized by lipopeptide? *Biophys. J.* 82 : 1985—1994.
- Malkov D. Y., Sokolov V. S. 1996. Fluorescent styryl dyes of the RH series affect a potential drop on the membrane/solution boundary. *Biochim. biophys. acta.* 1278 : 197—204.
- Montall M., Muller P. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and study of their electrical properties. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 65 : 3561—3566.
- Morf W. E. 1977. Calculation of liquid-junction potentials and membrane potentials on the basis of the Planck theory. *Analyt. Chem.* 49 : 810—813.
- Ostroumova O. S., Gurnev P. A., Schagina L. V., Bezrukov S. M. 2007a. Asymmetry of syringomycin E channel studied by polymer partitioning. *FEBS Lett.* 581 : 804—808.
- Ostroumova O. S., Kaulin Y. A., Gurnev A. P., Schagina L. V. 2007b. Effect of agents modifying the membrane dipole potential on properties of syringomycin E channels. *Langmuir.* 23 : 6889—6892.
- Ostroumova O. S., Malev V. V., Kaulin Yu. A., Gurnev Ph. A., Takemoto J. Y., Schagina L. V. 2005. Voltage-dependentsynchronization of gating of syringomycin E ion channels. *FEBS Lett.* 579 : 5675—5679.
- Passechnik V. I., Sokolov V. S. 2001. Estimation of electrochromic dyes position in the bilayer through the 2nd harmonic of capacitive current. *Bioelectrochemistry.* 55 : 47—51.
- Peterson U., Mannock D. A., Lewis R. N., Pohl P., McElhane R. N., Pohl E. E. 2002. Origin of membrane dipole potential: contribution of the phospholipid fatty acid chains. *Chem. Phys. Lipids.* 117 : 19—27.
- Pickar A. D., Benz R. 1978. Transport of oppositely charged lipophilic probe ions in lipid bilayer membranes having various structures. *J. Membr. Biol.* 44 : 353—376.
- Schagina L. V., Gurnev Ph. A., Takemoto J. Y., Malev V. V. 2003. Effective gating charge of ion channels induced by toxin syringomycin E in lipid bilayers. *Bioelectrochemistry.* 60 : 21—27.
- Sokolov V. S., Mirsky V. M. 2004. Electrostatic potentials of bilayer lipid membranes: basic research and analytical applications. In: *Ultrathin electrochemical chemo- and biosensors: technology and performance*. Heidelberg: Springer-Verlag. 255—291.
- Sorensen K. N., Kim K. H., Takemoto J. Y. 1996. *In vitro* antifungal and fungicidal activities and erythrocyte toxicities of cyclic lipopeptinonapeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 : 2710—2713.
- Starke-Peterkovic T., Turner N., Else P. L., Clarke R. J. 2005. Electric field strength of membrane lipids from vertebrate species: membrane lipid composition and Na⁺-K⁺-ATPase molecular activity. *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288 : 663—670.
- Takemoto J. Y., Brand J. G., Kaulin Y. A., Malev V. V., Schagina L. V., Blasko K. 2003. The syringomycins: lipopeptide pore formers from plant bacterium *Pseudomonas syringae*. In: *Pore forming peptides and protein toxins*. London: Taylor&Francis. 5 : 260—271.

Поступила 8 XII 2010

TRANSPORT OF LARGE ORGANIC IONS THROUGH SYRINGOMYCIN CHANNELS IN THE MEMBRANES CONTAINING DIPOLE MODIFIERS

S. S. Efimova,^{1,*} O. S. Ostroumova,¹ V. V. Malev,^{1,2} L. V. Schagina¹

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ² St. Petersburg State University; * e-mail: ssefimova@mail.ru

The effect of the membrane dipole potential (φ_d) on a conductance and a steady-state number of functioning channels formed by cyclic lipopeptide syringomycin E (SRE) in bilayer lipid membranes made from phosphocholine and bathed in 0.4 M solution of sodium salts of aspartate, gluconate and chloride was shown. The magnitude of φ_d was varied with the introduction to membrane bathing solutions of phloretin, which reduces the φ_d , and RH 421, increasing the φ_d . It was established that in all studied systems the increase in the membrane dipole potential cause a decrease in the steady-state number of open channels. In the systems containing sodium salts of aspartate (Asp) or gluconate (Glc), changes in the number of functioning channels are in an order of magnitude smaller than in systems containing sodium chloride. At the same time, the conductance (g) of single SRE-channels on the membranes bathed in NaCl solution increases with the increase in φ_d , and in the systems containing NaAsp or NaGlc the conductance of single channels does not depend on the φ_d . The latter is due to the lack of cation/anion selectivity of the SRE-channels in these systems. The different channel-forming activity of SRE in the experimental systems is defined by the gating charge of the channel and the partition coefficient of the dipole modifiers between the lipid and aqueous phases.

Key words: bilayer lipid membranes, single ion channels, membrane dipole potential, channel-forming toxins, large organic anions.