

УДК 581.1

## ДЕЙСТВИЕ ДНК НА КАТИОННЫЕ КАНАЛЫ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

А.И. Соколик, Н.М. Колекиров, О.В. Чижик\*,  
О.В. Молчан, Ю.М. Константинов\*\*, В.М. Юрин

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

\* Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

\*\* Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

### Введение

Проблема взаимодействия ДНК с плазматическими мембранами растительных клеток имеет несколько аспектов. Прежде всего, при атаке растения грибными патогенами часть ДНК, выходящая из разрушающихся клеток грибов, может взаимодействовать с клеточной мембраной растений и способствовать формированию как условий, способствующих проникновению гриба в симпласт, так и инициации защитных реакций клетки [1]. С другой стороны, в основе многих методов генной инженерии лежит доставка чужеродных нуклеиновых кислот в интактные клетки. Несмотря на широкое разнообразие используемых методов, поиск и изучение новых путей доставки ДНК в про- и эукариотические клетки является актуальной задачей. В этой проблеме практически неисследованным является механизм взаимодействия чужеродной ДНК с мембранами растительной клетки.

Известно, что на плазматической мембране клеток растений и, в частности, пресноводной водоросли *Nitella flexilis* функционируют катионные каналы нескольких видов. В первую очередь, это  $K^+$ -каналы, избирательно пропускающие ионы калия и неселективные, через которые проходят практически все основные катионы [2, 3]. Этими каналами обеспечивается транспорт всех необходимых клетке катионов.

Установлено, что практически у всех растительных клеток имеется калиевые каналы двух основных типов, которые различаются по виду мгновенных вольтамперных характеристик (МВАХ) и потенциалзависимости [4]. К первому типу относят каналы, проводимость которых существенно возрастает в диапазоне мембранного потенциала, по величине меньшего калий-равновесного значения (в обычных ионных условиях -150 мВ) – т.е. в области деполяризации. Это каналы «наружу направленного выпрямления» [5, 7], по которым ионы калия преимущественно выходят из клетки (НВКК). Второй тип представляют каналы с противоположным видом МВАХ – каналы «внутри направленного выпрямления» (ВВКК). Их проводимость возрастает при напряжении, превышающем по величине калий-равновесный потенциал (гиперполяризация мембраны). Соответственно, по этим каналам ионы калия преимущественно входят в клетку. Кроме того, что нормальное функционирование этих каналов весьма важно для обеспечения жизнедеятельности клетки, их состояние является эффективным индикатором наличия либо отсутствия какой-либо модификации мембраны в целом. Будучи белковыми комплексами, они могут быть мишенями действия молекул, находящихся в среде.

Таким образом, целью настоящей работы было выявление мембранотропного действия молекул ДНК по электрофизиологическим характеристикам катионных каналов плазматической мембраны растительной клетки.

### Методы исследования

В качестве объекта исследования использовали интернодальные клетки пресноводной харовой водоросли *Nitella flexilis*. Водоросль выращивали в лабораторных условиях [6]. При проведении исследований использовали стандартную микроэлектродную технику и метод фиксации потенциала. Регистрировали токи при фиксации на мембране импульсов деполяризующего напряжения с исходного уровня – 180 мВ с шагом 20–30 мВ длительностью до 3–5 минут. При этом можно было получать временные параметры активации НВКК и характеристики их потенциалзависимости. Кроме того, получали

мгновенные вольт-амперные характеристики плазматической мембраны для каналов обоих типов. Методика выделения проводимости соответствующих калиевых каналов описана нами ранее [7].

Используемые образцы ДНК были представлены препаратом плазмиды pcDNA-TCSi размером 6,5 кбаз (Институт химической биологии и фундаментальной медицины, СО РАН, Новосибирск). pH поддерживали на необходимом уровне с помощью буферных систем МЕС и ТРИС, среда содержала также  $10^{-6}$  моль/л кальция и  $10^{-5}$  моль/л ЭГТА. Для выделения токов калиевых каналов в среде создавали повышенный до  $3 \times 10^{-3}$  моль/л уровень калия (контрольный раствор); в эксперименте к этому раствору добавляли ДНК в концентрации 0,5 мкг/л. Влияние ДНК на неселективные каналы плазматической мембраны исследовали, регистрируя мгновенные вольтамперные характеристики на фоне повышенного до  $3 \times 10^{-3}$  моль/л уровня калия и при полном блокировании входящего тока калиевых каналов ионами цезия в концентрации  $3 \times 10^{-3}$  моль/л.

Концентрацию катионов калия и натрия в рабочих растворах до и после внесения в них ДНК, определяли с помощью стеклянных ион-чувствительных электродов.

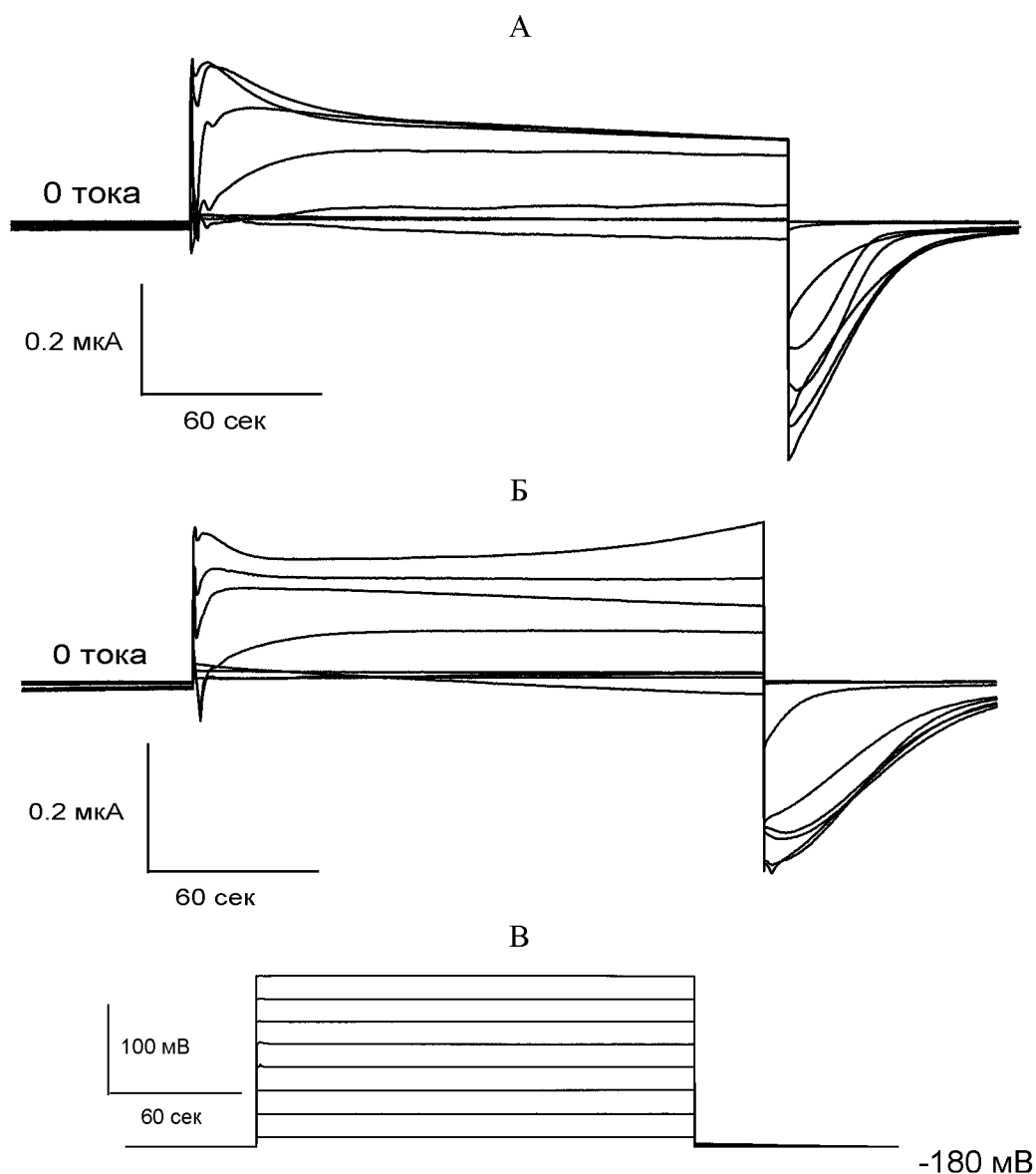
### Результаты и обсуждение

Следует отметить, что молекула ДНК, являясь полианионным комплексом, содержит большое количество центров связывания катионов, доступность которых для ионов зависит от конформации молекулы и условий среды – в основном кислотности и ионной силы [8]. В связи с этим молекула ДНК в некотором смысле представляет собой катионообменную структуру и, таким образом, присутствие нуклеиновых кислот в растворе может изменять концентрацию катионов как в сторону увеличения, так и уменьшения. Для оценки этих эффектов была проведена специальная серия экспериментов, в которых измеряли концентрацию катионов калия и натрия в рабочих растворах до и после внесения в них ДНК в концентрациях, используемых в электрофизиологических экспериментах.

Было установлено, что добавление ДНК к раствору приводит к некоторому (до 30%) снижению измеряемой концентрации калия и одновременно практически вдвое (с  $1 \times 10^{-3}$  до  $2 \times 10^{-3}$  моль/л) увеличивает концентрацию натрия. Последнее обстоятельство связано с тем, что при стандартном выделении ДНК используется среда с высокой ионной силой (порядка десятых долей моль/л), создаваемой за счет ацетата натрия и NaOH. Таким образом, можно заключить, что изменения концентраций катионов, вызванные добавлением ДНК, не слишком велики и ими можно пренебречь при интерпретации результатов электрофизиологических экспериментов.

Наиболее полную информацию о влиянии ДНК на активационные характеристики калиевых каналов плазматической мембраны дает регистрация токов (рисунок 1 А и Б), протекающих через мембрану при фиксации на ней достаточно длительных импульсов деполяризующего напряжения от одного и того же исходного уровня до значений, постепенно возрастающих в направлении деполяризации (рисунок 1 В).

Временные изменения токов отражают потенциалзависимые активационные процессы наружу выпрямляющих калиевых каналов. Видно, что по мере деполяризации мембраны выходящий ток (положительного направления) начинает нелинейно возрастать, что связано с активацией, так называемых, «быстрых» наружу выпрямляющих калиевых каналов. Затем, по достижении некоторого уровня деполяризации, первоначальное возрастание сменяется медленным самопроизвольным снижением тока до некоторого стационарного значения. Эта картина отражает ранее установленное существование на мембране двух подтипов НВКК [9]. Это быстрые НВКК, которые активируются за несколько десятков миллисекунд, и медленные НВКК, скорость активации которых увеличивается с ростом деполяризации. Именно медленные каналы после достижения максимальной активации самопроизвольно инактивируются, и стационарный ток определяется уже быстрыми каналами.



А – контроль, Б – аналогичные кривые при добавлении ДНК в среду  
 А и Б – Типичные токовые кривые, полученные на фоне повышенного до 3 ммоль/л уровня калия в среде при фиксации сдвигов напряжения на плазматической мембране, показанных на части В

Рисунок 1 – Влияние ДНК на активационные процессы калиевых каналов плазматической мембраны клеток *Nitella*

После возврата на уровень исходного напряжения, регистрируется первоначально большой входящий (отрицательный) ток, который затем экспоненциально убывает. Максимальное значение тока при этом отвечает стационарной проводимости «быстрых» каналов, т.е. уровню их активации при напряжении, с которого проводился сброс на исходное напряжение. Это, так называемые, «tail currents», хвостовые токи, иначе – токи сброса. Убывание тока со временем здесь соответствует потенциалзависимой деактивации «быстрых» каналов. Рисунок 2 А представляет зависимости степени активации быстрых каналов от напряжения, полученные по токам сброса.

Добавление ДНК в среду практически не меняет наклона и положения кривой на оси напряжений (рисунок 2). При действии ДНК снижается только максимальный уровень активации каналов. Для этих же каналов не отмечено действие ДНК на скорость деактивации – длительность токов сброса не обнаружила достоверных изменений при действии ДНК по сравнению с контролем.

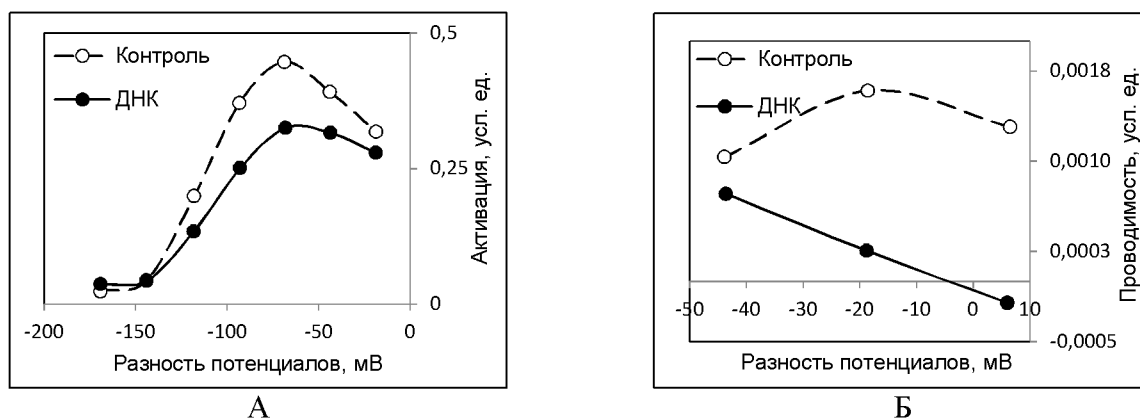


Рисунок 2 – Потенциалзависимость активации «быстрых» (А) и «медленных» (Б) наружу выпрямляющих калиевых каналов плазматической мембраны

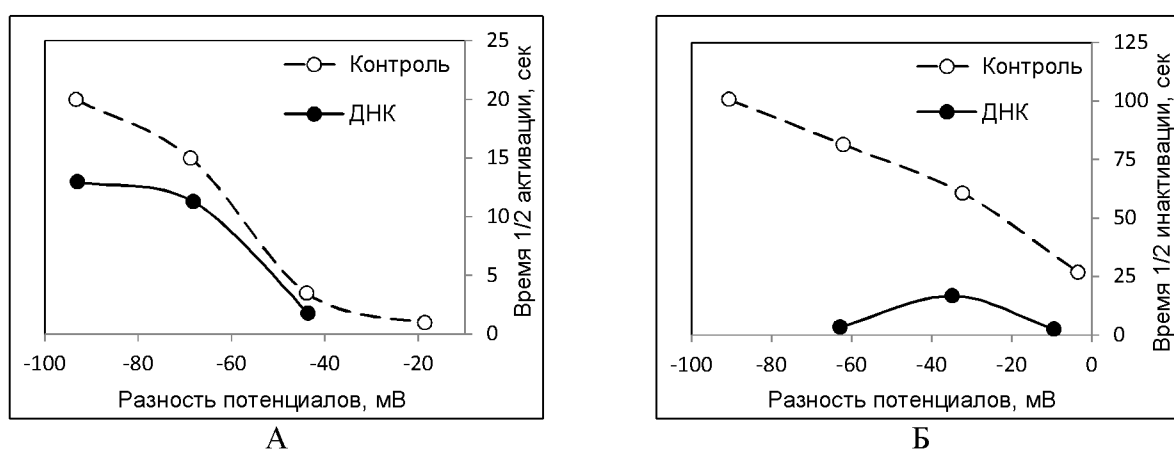
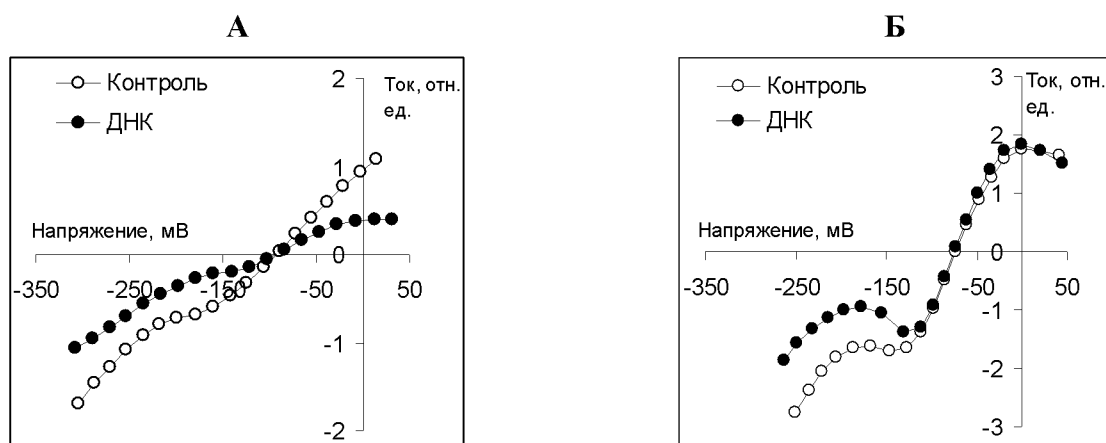


Рисунок 3 – Потенциалзависимость времени половинной активации (А) и инактивации (Б) проводимости «медленных» наружу выпрямляющих калиевых каналов плазматической мембраны

Гораздо чувствительнее к ДНК оказались активационные процессы «медленных» каналов. По данным рисунка 2 Б, на котором представлена проводимость медленных каналов, рассчитанная по разности стационарного и максимального токов (рисунок 1 А и Б), видно, что ДНК заметно снижает степень активации этих каналов. Также ДНК-зависимыми оказались временные параметры. С другой стороны видно, что ДНК значительно ускоряет как активацию, так и инактивацию медленных каналов (рисунок 3).

Таким образом, установлено избирательное действие ДНК на активационные характеристики потенциалзависимых калиевых каналов плазматической мембраны. Добавление в среду ДНК после 15–30 минут экспозиции не меняет временные параметры активации «быстрых» каналов выходящего выпрямления; снижается только степень их максимальной активации. Для кратковременно активирующихся при деполяризации «медленных» калиевых каналов выходящего выпрямления обнаружено, что ДНК существенно снижает их проводимость и ускоряет процессы, как активации, так и медленной инактивации этих каналов.

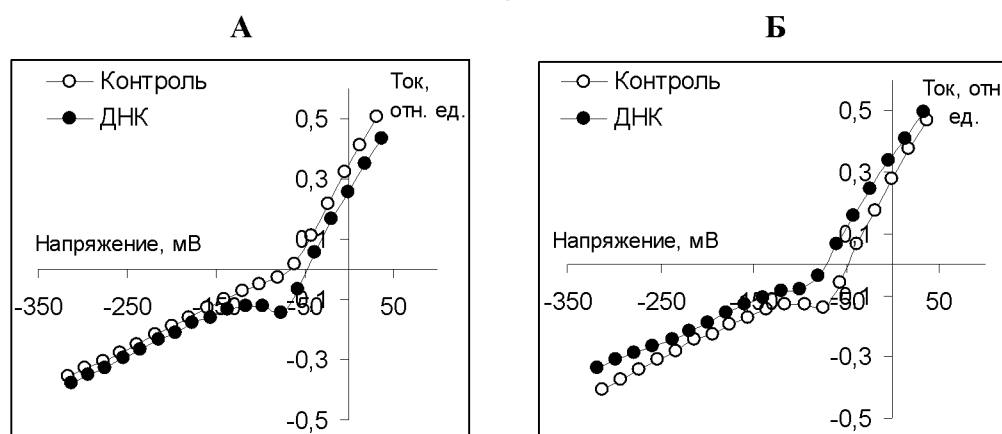
В работе было изучено также влияние ДНК на МВАХ калиевых каналов входящего и выходящего выпрямления (рисунок 4 А и Б). Видно, что ВВКК существенно модифицируются при добавлении в среду ДНК: в равной степени (в среднем на 60%) снижаются как входящие, так и выходящие токи (рисунок 4 А). В то же время в каналах наружу направленного выпрямления (рисунок 4 Б) подавляется только входящий ток, причем степень подавления тока возрастает по мере гиперполяризации мембраны, достигая 70% на удалении 150 мВ от потенциала нулевого тока (реверсии).



А – Типичные мгновенные вольтамперные характеристики мембраны при напряжении -160 мВ (внутри-выпрямляющие калиевые каналы) в отсутствии (контроль) и в присутствии ДНК (0,5 мкг/мл) на фоне повышенного до  $3 \times 10^{-3}$  моль/л уровня калия;

Б – Аналогичные кривые, полученные в том же эксперименте при напряжении -20 мВ (наружу-выпрямляющие калиевые каналы) в тех же условиях

Рисунок 4 – Влияние ДНК на калиевые каналы плазматической мембраны клеток *Nitella flexilis*



А – Типичные мгновенные вольтамперные характеристики мембраны при напряжении -160 мВ в отсутствии (контроль) и в присутствии ДНК (0,5 мкг/мл) на фоне повышенного уровня калия и при полном блокировании входящего тока калиевых каналов ионами цезия;

Б – Аналогичные кривые, полученные в том же эксперименте при напряжении -20 мВ в тех же условиях

Рисунок 5 – Влияние ДНК на неселективные каналы плазматической мембраны клеток *Nitella flexilis*

Была проведена серия экспериментов по изучению влияния ДНК на неселективную ионную проводимость плазматической мембраны *Nitella flexilis*, когда ток через калиевые каналы блокирован ионами цезия, а остающийся ток проходит через неселективные каналы. ДНК практически не влияет (или незначительно увеличивает) величину тока через неселективные каналы мембраны (рисунок 5).

Все разнообразие выявленных эффектов модификации параметров катионных каналов плазматической мембраны невозможно объяснить как взаимодействием анионных локусов молекул ДНК с поверхностными отрицательными зарядами плазматической мембраны, так и изменениями примембранных концентраций одновалентных катионов за счет связывания последних молекулами ДНК. Наиболее вероятным объяснением может быть взаимодействие молекул ДНК с мембранными белками, образующими ионные каналы.

**Выводы**

Молекулы плазмидной ДНК после 15–30 минут воздействия модифицируют калиевые каналы плазматической мембраны, ингибируя проводимость (или уменьшая число в открытом состоянии) каналов внутрь направленного выпрямления, и потенциалзависимо снижая только входящий ток через эти каналы. При этом ДНК практически не влияет на величину входящего тока через неселективные каналы.

Установлено избирательное действие ДНК на активационные характеристики потенциалзависимых калиевых каналов. ДНК не меняет временные параметры активации «быстрых» каналов выходящего выпрямления. В то же время ДНК существенно снижает проводимость кратковременно активирующихся при деполяризации «медленных» калиевых каналов выходящего выпрямления и ускоряет процессы, как активации, так и медленной инактивации этих каналов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что молекулы плазмидной ДНК проникают через клеточную стенку *Nitella flexilis* и взаимодействуют, скорее всего, избирательно с белковыми молекулами, образующими калиевые каналы.

**Список литературы**

1. Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection / F. Wen [et al.] // Plant Physiology. – 2009. – Vol. 151. – P. 820–829.
2. Demidchik, V. Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from Arabidopsis roots / V. Demidchik, M. Tester // Plant Physiology. – 2002. – Vol. 128. – P. 379–387.
3. Юрин, В.М. Минеральное питание растений: Учеб. пособие для студентов / В.М. Юрин, С.Н. Найдун. – Мн.: БГУ, 2004. – 236 с.
4. Véry, A.-A. Molecular mechanisms and regulation of K<sup>+</sup> transport in higher plants / A.-A. Véry, H. Sentenac // J. of Annual Review of Plant Biology. – 2003. – Vol. 54. – P. 575–603.
5. Hille, B. Ionic channels of excitable membranes / B. Hille. – 2nd ed. Sunderland: Sinauer Ass. Inc., 1992. – 677 p.
6. Юрин, В.М. Перенос ионов через мембраны растительных клеток / В.М. Юрин, М.Н. Гончарик, С.Г. Галактионов. – Минск: Наука и техника, 1977. – 160 с.
7. Юрин, В.М. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток / В.М. Юрин, А.И. Соколик, А.П. Кудряшов. – Мн.: Наука и техника, 1991.
8. McFail-Isom, L. DNA structure: cations in charge? / L. McFail-Isom, C.C. Sines, L.D. Williams // Curr. Opin. Struct. Biol. – 1999. – Vol. 9. – P. 298–304.

**EFFECT OF DNA ON CATION CHANNELS IN THE PLANT CELL  
PLASMA MEMBRANE**

**A.I. Sokolik, N.M. Kolekirov, O.V. Chyzhyk\*,  
O.V. Molchan, Yu. M. Konstantinov\*\*, V.M. Yurin**  
*Belarusian State University, Minsk, Belarus*

\* *Central Botanical Garden of NAS Belarus, Minsk, Belarus*

\*\* *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of the RAS*

This paper presents results of studies of DNA effects on electrophysiological characteristics of *Nitella flexilis* plasma membrane cation channels. It was shown that DNA could inhibit conductance of K<sup>+</sup>-inward rectifying channels without significant changes in the activity of non-selective cation channels. DNA differently affects channel kinetics of quickly and slowly activated K<sup>+</sup>-selective channels, exclusively accelerating the processes of activation and inactivation the latter channel type only.