

УДК 577.352.42

Исследование калиевых каналов в нервной клетке с помощью комплекса «квантовая точка–блокатор»

Т.А. Казакова, М.Г. Карлова, О.С. Соколова, Г.В. Максимов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1, стр. 12

E-mail: brindikova@gmail.com

Поступила в редакцию: 23.01.2014

Принята в печать: 18.12.2014

Для исследования топологии локализации потенциалозависимых K^+ -каналов предложено использовать комплекс, состоящий из квантовой точки кадмий теллур (CdTe) и блокатора K-канала – аджитоксина (AgTx–CdTe). Доказано, что распределение каналов (типа K_{v1x}) в нейронах пиявки, а также в миелиновых и немиелиновых нервных волокнах лягушки не равномерно. С помощью конкурентного связывания комплексов в присутствии ТЭА и 4-аминопиридина доказаны специфичность и обратимость связывания комплекса с каналами на поверхности клеточной мембраны *in vivo*. Установлено, что данная методика позволяет исследовать топологию распределения каналов как на изолированном нейроне, так и на нейроне, находящемся в окружении других клеток. Предположено, что неоднородное распределение калиевых каналов на поверхности нервных волокон обусловлено особенностями их морфологии и функционирования.

INVESTIGATION OF POTASSIUM CHANNEL IN NEURONS AND NERVE FIBERS USING «QUANTUM DOTS–POTASSIUM CHANNEL BLOCKER» COMPLEX

The fluorescent complex comprising semiconductor nanocrystals (quantum dots CdTe) and potassium channel blocker agitoxin (AgTx) was proposed for investigation of potassium channels (such as K_{v1x}) allocation in neurons and myelinated and unmyelinated nerve fibers. It was shown irregular spreading of potassium channels (K_{v1x}) on neuron membrane as well as on myelinated and unmyelinated nerve fibers. Through competitive binding of AgTx–CdTe complex and other potassium channel blockers was proved that complex binding with potassium channels on neuron membrane is reversibly and specifically. This method allows to investigate allocation of channels on isolated neuron membrane as well as on membrane of neuron connected with other neurons *in vivo*. The inhomogeneous allocation of potassium channels due to their morphological features and functioning was suggested.

ВВЕДЕНИЕ

Ионный канал является молекулярной основой формирования биоэлектрической активности нервных и мышечных клеток, а изменения активности канала или их распределения – факторы развития патологии (эпилепсия, склероз, аритмия). Для исследования распределения каналов на поверхности клетки часто используются комплексы типа «блокатор–флуоресцентные зонды», которые селективно связываются с характерными участками белка-канала. Предполагается, что для повышения эффективности в исследованиях топологии K-каналов на поверхности мембраны можно использовать не только комплексы блокаторов с флуоресцентными зондами, но и с квантовыми точками, которые по ряду свойств (величина сечения поглощения света, зависимость флуоресценции от размера, фотостабильность и т.д.) лучше органических молекул обеспечивают возможность исследования функционирующей нервной клетки в режиме реального времени [В.А. Олейников, 2007].

Мы предложили использовать комплекс блокатора канала – аджитоксина (AgTx) скорпиона, с квантовой точкой для исследования распределения потенциалозависимых K^+ -каналов как в изолированной нервной клетке (нейрон и аксон), так и в условиях, когда нервная клетка находится в окружении других клеток (нейроны ганглия). Квантовые точки не могут использоваться как «маркеры» для исследования молекул или процессов, так как они не имеют специфичного связывания с какими-либо молекулами и интенсивность их флуоресценции не зависит от изменений окружающей среды. Поэтому мы предложили использовать квантовые точки в качестве компонента в комплексе с не флуоресцирующим «маркером» потенциалозависимого K-канала. В настоящей работе в качестве «маркера» K^+ -каналов мы использовали блокатор калиевых каналов аджитоксин (AgTx) в комплексе «квантовая точка–несколько молекул токсина» (AgTx–CdTe). Основной задачей исследования было доказать, что в случае

нативной конформации токсина, канала и клетки (изолированная клетка, клетка в окружении других клеток) комплекс связывается специфически с K^+ -каналами клетки, а распределение интенсивности флуоресценции комплекса может характеризовать наличие и распределение каналов в плазматической мембране нервной клетки. Мы использовали AgTx, который эффективно блокирует потенциалозависимый K^+ -канал из группы K_{v1x} [R.R. de la Vega, 2004; C. Quinn, 2006]. Этот тип каналов относится к семейству потенциалозависимых каналов с шестью трансмембранными спиральями [C. Miller, 2000]. Связывание AgTx с белком осуществляется за счет слабых электростатических взаимодействий между положительно заряженными карбоксильными группами токсина и отрицательно заряженными группами белка. Известно, что один из аминокислотных остатков молекулы токсина взаимодействует с внешним сайтом связывания K^+ (селективный фильтр) и закрывает пору, несколько аминокислотных остатков белка также взаимодействуют с токсином на экстраклеточном участке канала [M.A.L. Eriksson, 2002].

Для определения селективности связывания комплекса с каналом мы использовали другие блокаторы K^+ -канала и исследовали конкуренцию их связывания с данным каналом. Коротко остановимся на некоторых характеристиках этих блокаторов. Известно, что K_{v1x} -канал обесценивает медленный, выходящий калиевый ток I_k [J.L. Weiss, 1999], который полностью блокируется тетраэтиламмонием (ТЭА) и на 20 % блокируется 4-аминопиридином (4-АП). ТЭА является неспецифичным блокатором K-каналов типа K_v и K_{cs} , связывается с четырьмя субъединицами канала на экстраклеточном участке канала [Q. Tan, 2012], а также в гидрофильном кармане открытого канала [C.M. Armstrong, 1966; Y. Zhou, 2001]. Для 4-АП обнаружены два сайта связывания на K^+ -канале, один из которых находится на экстраклеточной, а другой на цитоплазматической стороне плазматической мембраны [T. Kiss, 2002]. Блокатор связывается с K-каналом

преимущественно в открытом состоянии и инактивирует канал [T.W. Claydon, 2007; С.М. Armstrong, 2001].

Задачей работы было использование флуоресцирующего комплекса CdTe–AgTx для исследования наличия и распределения калиевых каналов на поверхности функционирующей нервной клетки.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили нейроны и немиелиновые волокна пиявки *Hirudo medicinalis*, а также миелиновые нервные волокна лягушки *Rana temporaria*. В работе использовали как нейроны, локализованные в изолированном ганглии, так и выделенные одиночные нейроны и нервные волокна. В работе использовались следующие растворы:

среда 1: 115 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 1.8 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES (pH 7.4) [J.D. Angstadt, 1996];

среда 2: 115 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 1.8 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES (pH 7.4), BSA (бычий сывороточный альбумин) 1 г/л (для предотвращения неспецифического связывания с белками);

среда 3: 115 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 1.8 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES (pH 7.4), BSA 1 г/л, AgTx–CdTe 1 нМ;

среда 4: 115 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 1.8 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES (pH 7.4), BSA 1 г/л, AgTx–FITS 1 нМ;

среда 5: 115 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 1.8 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES (pH 7.4), BSA 1 г/л, 4-АП (4-аминопиридин) 10 мМ;

среда 6: 115 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 1.8 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES (pH 7.4), BSA 1 г/л, ТЭА (тетраэтиламмоний) 25 мМ.

•ПОЛУЧЕНИЕ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК CdTe

Исходными веществами для синтеза квантовых точек CdTe являлись перхлорат кадмия (Cd(ClO₄)₂ · 6H₂O), тиогликолевая кислота (HSCH₂COOH) и гидроксид натрия (NaOH). Препаратор для синтеза квантовых точек CdTe получали путем пропускания газообразного H₂Te в водном растворе Cd(ClO₄)₂ и тиогликолевой кислоты (pH = 10), при перемешивании. После этого проводили термальную обработку раствора, путем кипячения раствора прекурсоров с обратным холодильником в круглодонной колбе при перемешивании. В результате получали квантовые точки CdTe размера от 2 до 4 нм, стабилизированные тиогликолевой кислотой. H₂Te получали электролизом с теллуровым электродом, в качестве электролита использовалась 50% серная кислота.

Химическая схема производства:

$Cd(ClO_4)_2 \cdot 6 H_2O + SHCH_2COOH + H_2Te \xrightarrow{T^C} \text{гидрофильные нанокристаллы CdTe, стабилизированные тиогликолевой кислотой.}$

•ЭКСПРЕССИЯ И ОЧИСТКА AgTx

Плазмидный вектор *pCSP105*, содержащий гибридную конструкцию AgTx 2 с сульфидной группой, был любезно предоставлен проф. Кристофером Миллером (Brandeis University, США). Нарработку плазмиды *pCSP105* проводили в штамме *E. coli* TG1. Для выделения плазмиды использовали набор HiSpeedPlazmidMaxiKit (QIAGEN, Голландия). [М.Г. Карлова, 2011]. Масс-спектрометрическое исследование очищенного AgTx 2 проводилось на базе НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН по методике, описанной в работе [Е.И. Гоуфман, 2006].

Для получения комплекса AgTx с флуоресцентным красителем FITS (Biotium) навеску красителя 0.1 мг растворяли в 100 мкл DMSO. Аджитоксин переводили в фосфатный буфер. К 2 мл раствора белка (с концентрацией 0.1 мг/мл)

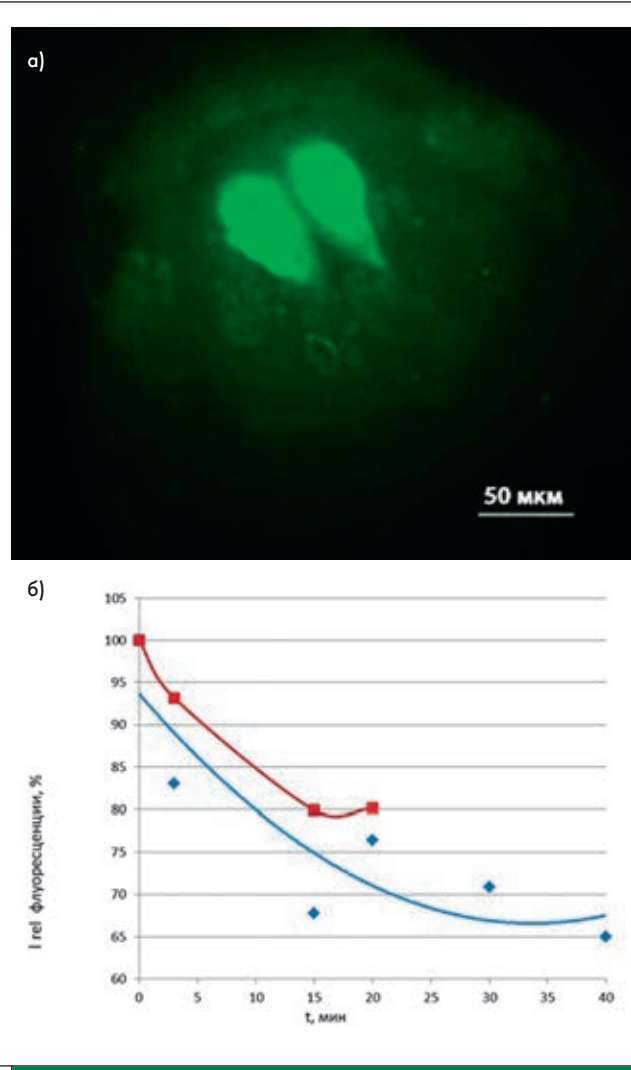


РИСУНОК 1 | а) Фотография ганглия пиявки после инкубации в среде с комплексом AgTx–FITS. Большие клетки по центру – Retzius-нейроны, видны также более мелкие нейроны. б) Кинетика флуоресценции R-нейронов со встроенным комплексом AgTx–FITS в ганглии при действии 4-аминопиридина (10⁻² М, синий цвет) и тетраэтиламмония (10⁻² М, красный цвет). За 100 % принято значение флуоресценции R-нейронов со встроенным комплексом AgTx–FITS. За 100 % принята интенсивность флуоресценции ганглия, окрашенного комплексом AgTx–FITS до введения тетраэтиламмония или 4-аминопиридина

добавляли 200 мкл 1 М карбонатного буфера и 70 мкл красителя, растворенного в DMSO, инкубировали в течение часа. Избыток красителя удаляли с помощью мембранных фильтров 3УМ Microcon.

Для получения комплекса CdTe–AgTx аджитоксин переводили в фосфатный буфер. К 70 мкл раствора квантовых точек CdTe добавляли 200 мкл 1 М карбонатного буфера и 2 мл раствора аджитоксина с концентрацией 0.1 мг/мл. Инкубировали в течение часа. Избыток квантовых точек удаляли с помощью мембранных фильтров 3УМ Microcon.

Перед началом эксперимента регистрировали собственную флуоресценцию нейрона (в среде 2), а затем клетки инкубировали в течение 5 мин в среде 4. Препарат несколько раз промывали в среде 2 и регистрировали флуоресценцию от нейронов, инкубированных в среде 5 или в среде 6. Аналогично проводили эксперименты, в которых в качестве маркера К-каналов использовали комплекс AgTx–CdTe (среда 3).

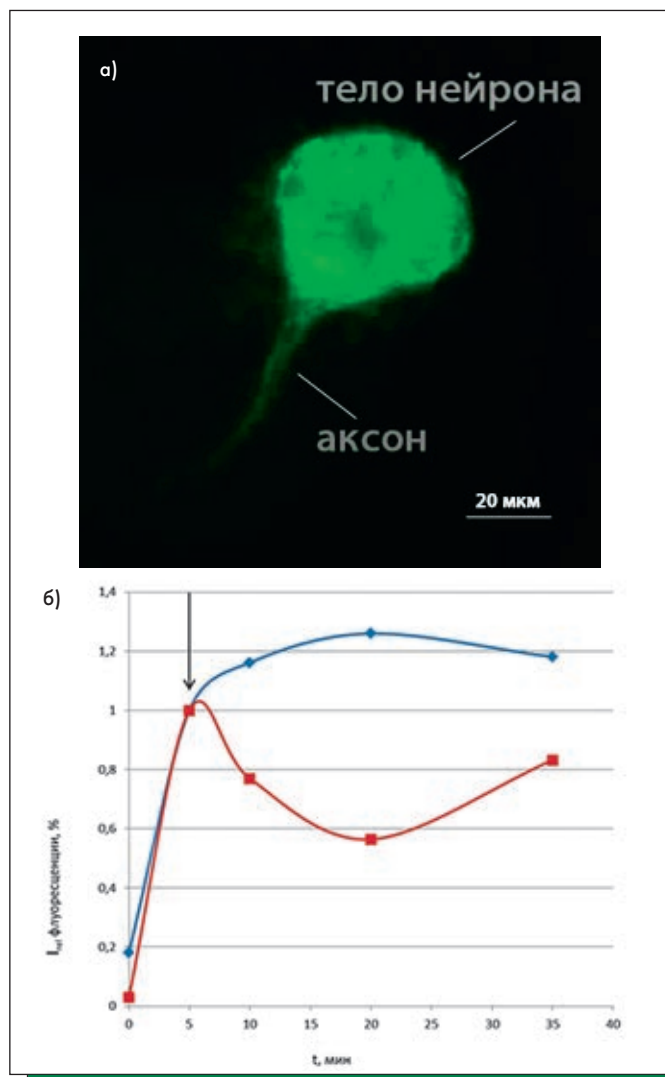


РИСУНОК 2 | а) Фотография изолированного Retzius-нейрона, окрашенного комплексом AgTx–CdTe. б) Изменение флуоресценции изолированных R-нейронов после инкубации с AgTx–CdTe при добавлении тетраэтиламмония (красным) и при добавлении 4-аминопиридина (синим). Стрелкой обозначен момент добавления в систему альтернативного блокатора (тетраэтиламмония или 4-аминопиридина). За 100 % принята интенсивность флуоресценции ганглия, окрашенного комплексом AgTx–CdTe до введения тетраэтиламмония или 4-аминопиридина

Флуоресценцию регистрировали с помощью люминесцентного микроскопа Zeiss Axioplan 2. Флуоресценцию квантовых точек и FITS возбуждали светом с длиной волны 450–490 нм, а регистрировали с помощью видеокамеры AxioCamMRC и интерференционных светофильтров на длине волны 520 нм. Размер квантовых точек составлял порядка 2–4 нм. Результаты обрабатывали статистически с помощью программного обеспечения Fiji компании ImageJ и Origin компании OriginLab Corporation.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Цель работы заключалась в разработке методики оптимального связывания комплекса AgTx–CdTe на плазматической мембране клетки для тестирования топографии распределения К-каналов. В то же время необходимо было получить качественное изображение распределения и связываемости токсина на мембране клетки. Поэтому, для сравнения, мы использовали связывание токсина с флуоресцентным зон-

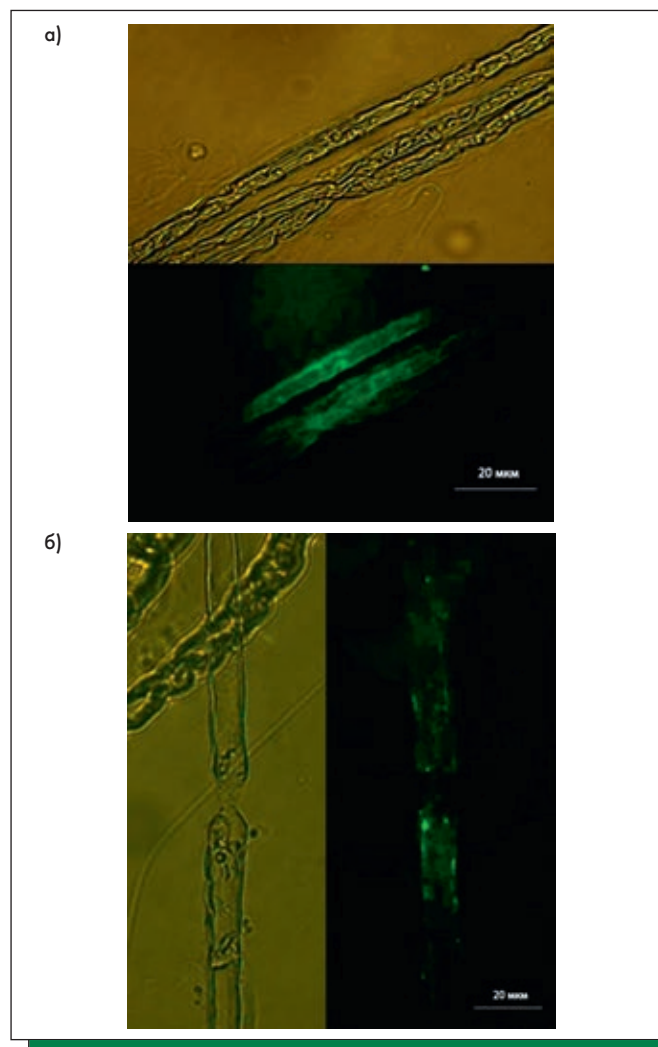


РИСУНОК 3 | а) Участок немиелинового нервного волокна: сверху – в видимом свете, внизу – флуоресценция после введения комплекса AgTx–CdTe. б) Участок нервного волокна из седалищного нерва лягушки, включающий в себя перехват Ранвье. Слева – в видимом свете, справа – флуоресценция после введения комплекса AgTx–CdTe (с вычетом фона)

дом FITS на мембране тех же нервных клеток. Было получено изображение нейронов со связанным с мембраной комплексом AgTx–FITS. В ходе исследования на нейронах, локализованных в ганглии (рис. 1а), установлено, что в течение 30 мин после введения в среду 4-АП, конкурирующего с аджитоксином, флуоресценция R-нейронов за 5–10 мин снижается на 35–40 %. В случае, отдельного нейрона, при действии ТЭА, наблюдается 20 % уменьшение флуоресценции (рис. 1б). Отметим, что изменений флуоресценции в течение времени эксперимента без введения ТЭА и 4-АП нами не обнаружено.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что выделенный токсин связывается с K⁺-каналом и конкурирует за места связывания с классическими блокаторами (4-АП и ТЭА).

В следующей серии экспериментов мы использовали в качестве маркера калиевых каналов нейронов комплекс AgTx–CdTe. Было получено изображение распределения связанного с каналом комплекса AgTx–CdTe на мембране нейрона (рис. 2а). Установлено, что конкурентное связывание данного комплекса и 4-АП на канале изолированных R-нейронов не приводило к достоверным изменениям флуоресценции, а конкурирование данного комплекса

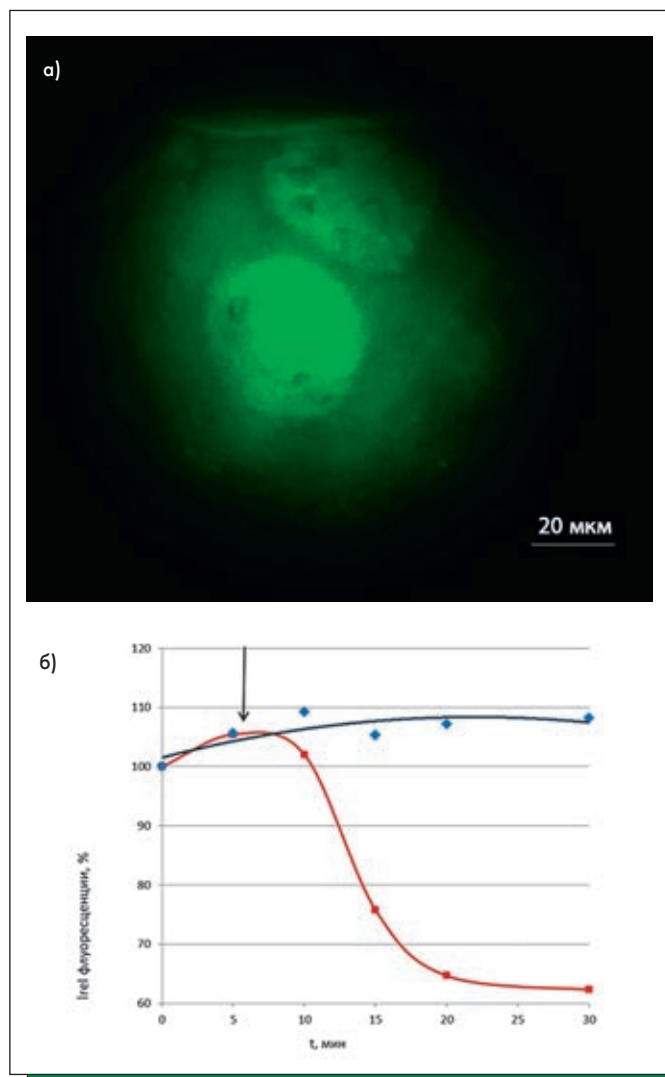


РИСУНОК 4 | а) Фотография ганглиев, окрашенных комплексом AgTx–CdTe. Ганглии предварительно инкубировались в растворе, содержащем комплекс AgTx с квантовыми точками CdTe. Хорошо видны два Retzius-нейрона по центру. б) Кинетика флуоресценции Rz-нейронов со встроенным комплексом AgTx–CdTe в ганглии пиявки при добавлении 4-аминопиридина (синим) и при добавлении тетраэтиламмония (красным). Стрелкой обозначен момент добавления в систему альтернативного блокатора (тетраэтиламмония или 4-аминопиридина). За 100 % принята интенсивность флуоресценции ганглия, окрашенного комплексом AgTx–CdTe до введения тетраэтиламмония или 4-аминопиридина

и ТЭА уменьшало флуоресценцию за 10–15 мин на 20–30 % (рис. 2б). Вероятно, что, в отличие от 4-АП, ТЭА является эффективным блокатором каналов типа K_{v1x} [J.L. Weiss, 1999].

Итак, комплекс CdTe–AgTx может обратимо связываться именно с K^+ -каналами K_{v1x} -типа и служить маркером их наличия и распределения в изолированной клетке.

В ходе дальнейшего исследования мы регистрировали распределение K^+ -каналов, локализованных на поверхности нервных волокон позвоночных (миелиновые волокна) и беспозвоночных (немиелиновые волокна). Установлено, что у немиелиновых волокон уровень флуоресценции комплекса AgTx–CdTe равномерен вдоль поверхности всего волокна (рис. 3а), что может свидетельствовать о локализации K^+ -каналов на поверхности Шванновской клетки, окружающей нервное волокно. Однако на миелиновых волокнах было выявлено неравномерное распределение интенсивности флу-

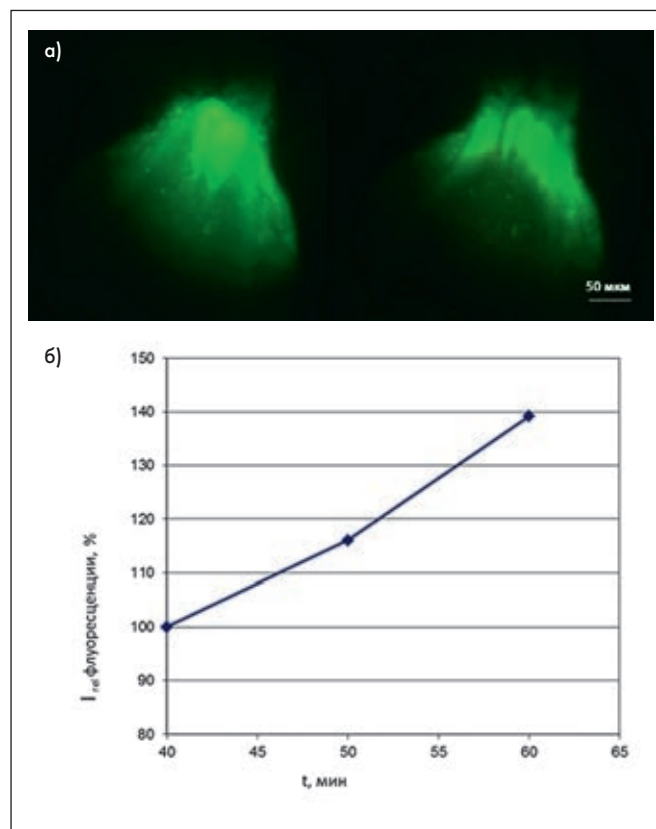


РИСУНОК 5 | а) Изменение флуоресценции в соединительных тканях при введении 4-аминопиридина. На левой картинке показана флуоресценция Rz-нейронов ганглия пиявки, окрашенных комплексом AgTx–CdTe, на правой картинке – через 30 мин после добавления раствора 4-аминопиридина. б) Изменение флуоресценции соединительных тканей при добавлении 4-аминопиридина. За 100 % принято значение флуоресценции R-нейронов, окрашенных комплексом AgTx–CdTe. Соединительные ткани не находились под постоянным облучением возбуждающим светом

оресценции комплекса AgTx–CdTe (рис. 3б). Это, вероятно, обусловлено морфологией волокна, которое состоит из двух основных областей: интернадальной области (миелин) и перехвата Ранвье (область не покрыта миелином). Важно, что в области перехвата Ранвье флуоресценция комплекса нами не обнаружена, а в интернадальной области распределение величины интенсивности флуоресценции по поверхности волокна было неоднородным. Вероятно, это связано с тем, что в области перехвата Ранвье отсутствуют K^+ -каналы типа K_{v1x} , которые связывают AgTx, а в интернадальной области – наличие флуоресценции обусловлено K^+ -каналами Шванновской клетки. Проникновение комплекса под миелин маловероятно из-за размера квантовых точек.

Эффективность использования комплекса AgTx–CdTe была показана также на более сложной гетерогенной биологической системе – ганглии пиявки, включающей в себя несколько сот нейронов и глиальную клетку. В данном случае мы тестировали наличие и распределение каналов в мембране клетки, находящейся в естественном окружении и нормальном функционировании (сохранены все синаптические входы на данный нейрон). Нами было получено флуоресцентное изображение отдельных нейронов, в том числе R-нейронов, на нативном ганглии (рис. 4а). А также зарегистрированы изменения флуоресценции R-нейронов при конкурентном замещении комплекса другими блокаторами K^+ -каналов. Установлено, что только 4-АП, но не ТЭА,

за 5 мин на 30 % уменьшает интенсивность флуоресценции нейронов (рис. 4б).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при исследовании отдельного нейрона в окружении других клеток (в целом ганглии), когда не нарушена связь между нейронами и глиальными клетками, а ганглий окружен плотной соединительно-тканной оболочкой, комплекс AgTx–CdTe проникает сквозь оболочку хуже, чем токсин с флуоресцентным красителем. Вероятно, после отмывки комплекс и остается внутри оболочки ганглия, а так как молекула ТЭА имеет сайт связывания внутри канала, то экстраклеточный участок канала остается свободным для связывания остатков токсина и изменения флуоресценции не наблюдается.

При замещении комплекса 4-аминопиридином изменения флуоресценции клетки могут быть обусловлены тем, что, во-первых, блокатор имеет два сайта связывания с K^+ -каналами и при большой концентрации может связываться с сайтом на внешней стороне канала, препятствуя связыванию оставшегося в оболочке токсина. Кроме того, в ганглии блокатор взаимодействует и с каналами других нейронов, что может вызвать изменения состояния и распределения K_{v1x} -каналов в R-нейронах и десорбции комплекса

AgTx–CdTe. Действительно, в этих условиях на 40 % возрастает флуоресценция от комплекса, локализованного в соединительных тканях внутри ганглия (рис. 5). Вероятно, десорбция комплекса из K^+ -каналов приводит к его накоплению в межклеточном пространстве и соединительных тканях ганглия.

Итак, в ходе исследования показано, что комплекс квантовая точка–токсин можно успешно использовать для исследования локализации K^+ -каналов *in vivo*. Показана обратимость связывания комплекса с каналами на поверхности клеточной мембраны нервной клетки. Выявлена неравномерная топология K^+ -каналов на поверхности Шванновской клетки миелинового волокна. Доказана возможность изучения функционального состояния канала и на немиелиновых волокнах, а также его использования на функционирующих, многоклеточных биосистемах (нервный ганглий). Все это позволяет использовать данный комплекс для исследования синтеза или перераспределения K^+ -каналов на мембране отдельной клетки при сохранении входящих и выходящих синаптических связей между отдельными нейронами, оценить фармакологическое воздействие на отдельный нейрон в условиях функционирования нейрональных сетей. ■

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Angstadt J.D., Choo J.J. // *J. Neurophysiology*. 1996. V. 76(3). P. 1491–1502.
2. Armstrong C.M. // *J. Gen. Physiology*. 1966. V. 50(2). P. 491–503.
3. Armstrong C.M., Loboda A. // *Biophysical J.* 2001. V. 81. P. 895–904.
4. Claydon T.W., Vaid M., Rezazadeh S., Kehl S.J., Fedida D. // *J. Pharmacology*. 2007. V. 320. № 1. P. 162–172.
5. Eriksson M.A.L., Roux B. // *Biophysical J.* 2002. V. 83. P. 2595–2609.
6. Kiss T., Laszlo Z., Szabadics J. // *Brain Res.* 2002. V. 927. P. 168–179.
7. Miller C. // *Genombiology*, 2000. V. 1(4). P. 1–5
8. Park C.S., Hausdorff S.F., Miller C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88(6). P. 2046.
9. Quinn C. C., Begeisich T. // *Membrane Biology*. 2006. V. 212. P. 51–60.
10. Tan Q., Ritzo B., Tian K., Gu L.Q. // *J. Gen. Physiology*. 2012. V. 139(4). P. 295–304.
11. de la Vega R.R., Possani L.D. // *Toxicon*. 2004. V. 43. P. 865–875.
12. Weiss J.L., Yang J., Jie C., Walker D.L., Ahmed S., Zhu Y., Huang Y., Johansen K.M., Johansen J. // *J. Neurobiology*. 1999. V. 38(2). P. 287–299.
13. Zhou Y., Morais-Cabral J.H., Kaufman A., MacKinnon R. // *Nature*. 2001. V. 414. P. 43–48.
14. Гоуфман Е.И., Мошковский С.А., Тихонова О.В., Лохов П.Г., Згода В.Г., Серебрякова М.В., Торопыгин И.Ю., Власова М.А., Сафарова М.Р., Макаров О.В., Арчаков А.И. // *Биохимия*. 2006. Т. 71(4). С. 445.
15. Карлова М.Г., Пищальникова А.В., Рамонова А.А., Мойсенович М.М., Соколова О.С., Шайтан К.В. // *Биофизика*. 2011. Т. 56. № 2. С. 243.
16. Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. // *Российские нанотехнологии*. 2007. Т. 2. № 1–2.