

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Том 24

(ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК)

3

МОСКВА · 1977

УДК 581.175.

**ДЕЙСТВИЕ РАЗОБЩИТЕЛЯ
КАРБОНИЛЦИАНИДФЕНИЛГИДРАЗОНА
НА МЕМБРАННЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ И ВЕЛИЧИНУ рН
ВАКУОЛЯРНОГО СОКА КЛЕТОК NITELLA.
КОСВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ рН ЦИТОПЛАЗМЫ**

М. ДЕНЕШ, В. К. АНДРИАНОВ, А. А. БУЛЫЧЕВ, Г. А. КУРЕЛЛА

*Кафедра биофизики биологического факультета
Московского университета им. М. В. Ломоносова*

Проведены одновременные измерения разности электрических потенциалов на плазмалемме и тонопласте клеток *Nitella*, а также величины рН вакуолярного сока при действии разобщителя фосфорилирования карбонилцианидхлорметоксифенилгидразона (КХФ) в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М. Показано, что действие КХФ сопровождается изменением потенциала плазмалеммы и тонопласта, а также смещением рН вакуолярного сока в щелочную сторону на 0,5—1,2 единицы за 15—30 мин. Изучено влияние рН наружного раствора в области 4—9 на величину смещения мембранныго потенциала, индуцируемого КХФ. Полученные результаты находятся в соответствии с представлением, что КХФ повышает проницаемость цитоплазматических мембран для H^+ . Сделан вывод, что при слабощелочных значениях рН среды КХФ является эффективным индуктором H^+ -проводимости на тонопласте и менее эффективен на плазмалемме. Согласно расчетам, величина рН в цитоплазме в норме и после добавления в среду КХФ составляет 6,47 и 5,6 соответственно.

Вопрос о транспорте и распределении H^+ в растительной клетке вызывает большой интерес в связи с гипотезами об участии H^+ в механизме клеточного электрогенеза и регуляции клеточного обмена [1—6]. В последнее время для изучения мембранных транспорта и генерации электрического потенциала широкое применение находят индукторы транспорта протона, такие, как 2,4-ДНФ, карбонилцианидхлорметоксифенилгидразон (КХФ) и другие. В большинстве случаев действие этих веществ на мембранный потенциал и транспорт H^+ объясняют подавлением активных транспортных систем в результате энергетического разобщения в митохондриях или хлоропластах. Однако при интерпретации эффектов разобщителей на целых клетках необходимо учитывать непосредственное действие этих веществ на плазматические мембранные — плазмалемму и тонопласт. Из данных, полученных на искусственных липидных мембранах, а также на митохондриях и хлоропластах, известно, что липидорастворимые слабые кислоты, такие, как 2,4-ДНФ, КХФ, специфически повышают протонную проводимость мембран [7—10]. При действии протонофоров на интактные клетки специфическое повышение проводимости для H^+ должно сопровождаться изменением мембранныго потенциала и перераспределением H^+ между отдельными компартментами клетки.

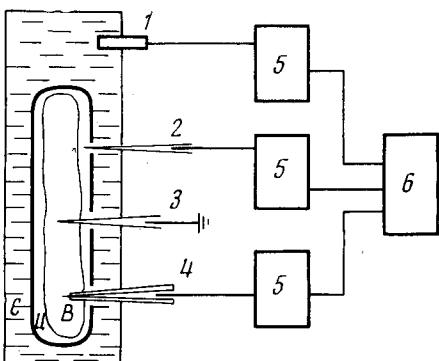
В данной работе описано действие КХФ на разность электрических потенциалов между цитоплазмой и средой (потенциал плазмалеммы), между вакуолью и цитоплазмой (потенциал тонопласта) и рН вакуолярного сока.

МЕТОДИКА

В работе использовали интернодальные клетки водоросли *Nitella flexilis* длиной 3—5 см и диаметром 700—800 мкм. Предварительно изолированные клетки выдерживали в темноте в течение двух суток в растворе, содержащем KCl, NaCl и CaCl₂ в концентрации 0,1, 1 и 0,5 мМ соответственно, pH 5,5—5,6. Измерения проводили на клетках, помещенных в исходный раствор с различным значением pH. Значения pH среды меняли в интервале от 4 до 9 посредством добавления соответствующих количеств HCl, трика или гидроксиэтилпиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES-буфер).

Рис. 1. Схема установки для одновременной регистрации потенциалов плазмалеммы и тонопласта и величины pH в вакуолярном соке клеток *Nitella*

Ц — цитоплазма, В — вакуоль, С — наружная среда, 1 — каломельный электрод сравнения, 2, 3 — стеклянные микроэлектроды, веденные в цитоплазму и вакуоль, 4 — стеклянный H⁺-специфический микроэлектрод, 5 — электрометрические усилители, 6 — трехканальный самописец



Для регистрации потенциала плазмалеммы и тонопласта использовали стандартные микроэлектроды, наполненные 2,5 М раствором KCl. Измерения pH вакуолярного сока осуществляли стеклянными H⁺-специфичными микроэлектродами с диаметром кончика 2—3 мкм и длиной рабочей части 100—150 мкм [1]. Регистрацию мембранных потенциалов и величины pH вакуолярного сока проводили одновременно на трехканальном самопишуемом потенциометре. О локализации микроэлектродов в цитоплазме и вакуоли судили по ранее описанным критериям [11]. Схема измерений представлена на рис. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Разность электрических потенциалов между вакуолью и средой (потенциал покоя) для большинства клеток составляла —(100—120) мв, потенциал тонопласта + (10—30) мв (цитоплазма отрицательна). Потенциал плазмалеммы, вычисленный по разности между потенциалом покоя и потенциалом тонопласта, составлял соответственно —(110—150) мв. Значение pH вакуолярного сока составляет 4—4,5 и в контрольных условиях опыта поддерживается на постоянном уровне. Добавление КХФ в среду до концентрации 2 · 10⁻⁶ М при pH среды < 6 приводит к возрастанию потенциала покоя и к подщелачиванию вакуолярного сока. Как видно из рис. 2, а, добавление КХФ приводит к некоторой деполяризации плазмалеммы в течение 5—10 мин и изменению электрической полярности тонопласта. Потенциал тонопласта изменялся от исходного уровня + (10—30) мв до значений — (20—30) мв, амплитуда изменений потенциала тонопласта достигала 60 мв. Во всех случаях амплитуда изменений потенциала на тонопласте заметно превышала амплитуду изменений потенциала на плазмалемме. Через 5—10 мин после добавления разобщителя наблюдалось более медленное смещение потенциала тонопласта в сторону исходного уровня.

Изменения pH в вакуолярном соке в щелочную сторону, индуцируемые действием разобщителя, составляют 0,5—1,2 единицы и продолжаются в течение 20—30 мин. Как видно из рис. 2, изменения pH в вакуоли

начинаются с некоторым запозданием по сравнению с изменениями разности электрических потенциалов на обеих мембранах. Действие повышенных концентраций КХФ (10^{-5} М) приводит к увеличению скорости и сокращению латентного периода изменений pH; при этом величина существенно не меняется.

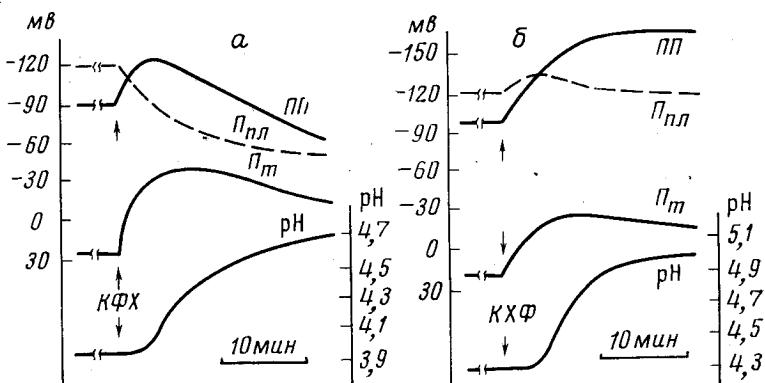


Рис. 2. Изменения потенциала покоя (Π_P), потенциала тонопласта (Π_t), потенциала плазмалеммы (Π_{pl}) и pH вакуолярного сока при действии $2 \cdot 10^{-6}$ М карбонилициандхлорметиоксифенилгидразона (КХФ)

a — при pH среды 4,2, *б* — при pH среды 8,5. Стрелкой показан момент добавления КХФ

По кинетическим кривым изменений pH были рассчитаны скорости переноса H^+ из вакуоли через тонопласт. Как видно из рис. 3, после добавления КХФ поток H^+ из вакуоли достигает максимального значения, а в дальнейшем скорость переноса H^+ постепенно снижается.

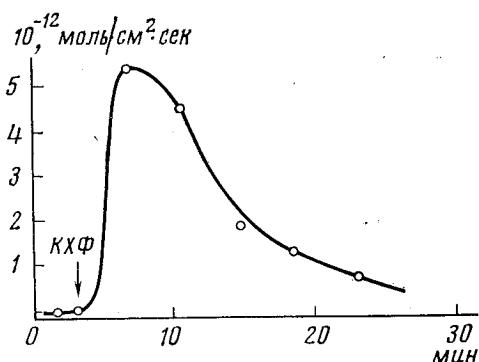


Рис. 3. Кинетическая кривая потока H^+ из вакуоли через тонопласт при действии $2 \cdot 10^{-6}$ М КХФ
pH среды 8,0. Стрелкой показан момент добавления КХФ

Амплитуда изменений pH вакуолярного сока и амплитуда изменений потенциала на тонопласте практически не зависят от pH среды. Однако изменение pH среды существенно сказывается на амплитуде индуцированных действием КХФ изменений потенциала на плазмалемме. При смещении pH среды от исходного значения $\sim 5,5$ в сторону подщелачивания наблюдается уменьшение амплитуды изменений потенциала плазмалеммы (рис. 2, б). При pH ~ 8 добавление КХФ практически не вызывает изменений потенциала. Существенно, что при повышении pH среды до 8,5 добавление КХФ приводит в ряде случаев к небольшой гиперполаризации плазмалеммы. Смещение pH среды от кислых в сторону щелочных значений приводит также к снижению скорости индуцированных действием КХФ изменений потенциала на плазмалемме и тонопласте.

ОБСУЖДЕНИЕ

При интерпретации эффектов КХФ на мембранный потенциал и транспорт H^+ в растительной клетке необходимо учитывать по крайней мере три возможных пути его действия. Наиболее ранним проявлением должно быть повышение протонной проводимости плазматической мембраны. Более поздним во времени эффектом является, по-видимому, нарушение систем энергообеспечения клетки и подавление активного транспорта ионов на клеточных мембранных. Кроме того, нельзя исключать возможности изменения мембранных потенциала вследствие индуцирования проводимости плазматической мембраны для анионов КХФ. Однако такой эффект можно ожидать только при высокой концентрации КХФ и высоких значениях рН в среде и различных компартментах клетки.

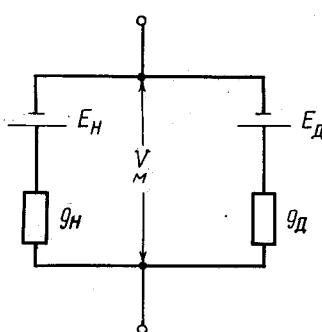


Рис. 4

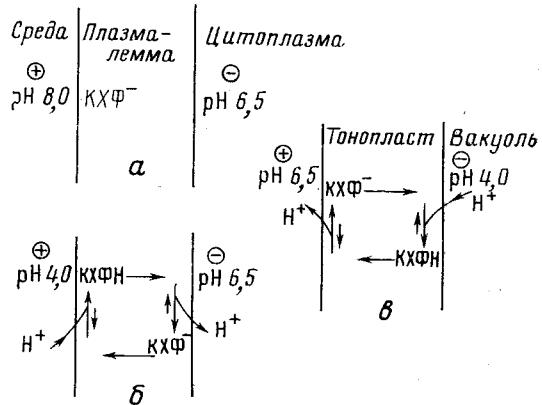


Рис. 5

Рис. 4. Эквивалентная схема пассивных проводящих путей мембраны
Объяснение в тексте

Рис. 5. Схема переноса H^+ через плазмалемму и тонопласт в присутствии КХФ
при различных значениях рН среды

а и *б* — механизм переноса H^+ через плазмалемму при рН среды 8,0 и 4,0, соответственно,
в — перенос H^+ через тонопласт

Полученные данные, с нашей точки зрения, объясняются повышением протонной проводимости плазматических мембран при действии КХФ. Зависимость амплитуды и направления изменений потенциала плазмалеммы при действии КХФ от рН наружного раствора позволяет предполагать, что добавление КХФ вызывает смещение потенциала плазмалеммы в сторону соответствующих значений равновесного потенциала для H^+ . Влияние рН среды на индуцированные КХФ смещения потенциала плазмалеммы можно проиллюстрировать с помощью эквивалентной схемы (рис. 4). Обозначения E_H и E_D соответствуют значениям равновесного потенциала для H^+ и диффузионного потенциала, создаваемого другими ионами, а g_H и g_D означают проводимости мембран для H^+ и других ионов соответственно; V_m — измеряемый мембранный потенциал. Из схемы видно, что повышение протонной проводимости g_H приводит к гиперполяризации или деполяризации плазмалеммы в зависимости от соотношения уровней E_H и V_m . Повышение g_H при действии КХФ не сопровождается изменением V_m только при тех значениях рН, когда H^+ находится в электрохимическом равновесии. Величина рН цитоплазмы клеток Nitella, рассчитанная в этих условиях с помощью уравнения Нернста, составила $6,47 \pm 0,7$ (измерения на 17 клетках). Это значение хорошо согласуется с известными в литературе оценками рН цитоплазмы, проведеными по распределению слабых кислот и оснований и другими методами [12, 13].

Сопоставление равновесного потенциала для H^+ на тонопласте ($E_H = -130$ мВ), рассчитанного из величин рН в вакуоли (рН 4,3) и в цитоплазме (рН 6,5), с измеряемым потенциалом тонопласта ($V_m \sim 20$ мВ) показывает, что в естественных условиях распределение H^+ на тонопласте не соответствует электрохимическому равновесию. Резкое смещение потенциала тонопласта в сторону равновесного потенциала для H^+ и связанное с ним изменение знака потенциала после добавления КХФ свидетельствует, по-видимому, о значительном повышении g_H . Однако в условиях индуцированной H^+ -проводимости протоны все же не становятся единственными потенциалопределяющими ионами; электрохимическое равновесие для H^+ не достигается. Об этом говорит сохранившееся, хотя и уменьшившееся расхождение между потенциалом тонопласта (30 мВ) и равновесным потенциалом для H^+ (130 мВ), а также появление потока H^+ , направленного из вакуоли. Наблюдаемый поток H^+ можно рассматривать как пассивное движение H^+ по градиенту электрохимического потенциала. Поток H^+ прекращается при достижении равновесного распределения H^+ между цитоплазмой и вакуолью. По стационарным значениям потенциала тонопласта и активности H^+ в вакуоли можно рассчитать величину рН в цитоплазме после действия КХФ. Значение рН в цитоплазме через 30 мин после добавления в среду КХФ составляет $5,6 \pm 0,8$ (измерения на 22 клетках).

Обращает на себя внимание тот факт, что изменения потенциала тонопласта, индуцируемые добавлением КХФ, превосходят изменения потенциала на плазмалемме. В связи с этим возникает вопрос об относительной эффективности КХФ как индуктора протонной проводимости на плазмалемме и тонопласте. Как известно, КХФ представляет собой липидорастворимую слабую кислоту, которая в водных растворах диссоциирует: КХФ — $H = KHF^- + H^+$; величина рК составляет 5,3. На рис. 5 представлена схема переноса H^+ через плазмалемму и тонопласт, индуцируемого КХФ, в соответствии с принятым механизмом его действия [9, 10]. Видно, что эффективность КХФ как переносчика H^+ на плазмалемму существенно зависит от рН среды. При $pH > 7$ КХФ находится почти исключительно в анионной форме, проникновению которого через мембрану препятствует электрическое поле. В связи с этим КХФ не может выполнять эффективную роль переносчика H^+ через плазмалемму. При $pH < 5$ ($pH < pK$) КХФ находится преимущественно в протонированной форме и диффундирует по градиенту концентрации через плазмалемму. В цитоплазме равновесие реакции КХФ — $H = KHF^- + H^+$ сдвинуто вправо, так как $pH > pK$ и образующийся анион КХФ⁻ диффундирует по градиенту электрического поля в направлении внешней среды. В этих условиях циклический трансмембранный перенос КХФ по градиенту электрического поля и градиенту концентрации КХФ — H обеспечивает повышение H^+ -проводимости плазмалеммы.

Очевидно, что при рН цитоплазмы и вакуолярного сока 6,5 и 4,3 соответственно КХФ является эффективным индуктором транспорта H^+ на тонопласте. Из цитоплазмы анионы КХФ⁻ свободно движутся по электрическому полю через тонопласт. В вакуолярном соке ($pH \sim 4$) образуется протонированная форма КХФ, которая диффундирует по градиенту концентрации через тонопласт. Таким образом, при слабощелочных значениях рН среды КХФ является эффективным индуктором переноса H^+ через тонопласт, но не через плазмалемму.

Медленное, отставленное во времени уменьшение потенциала тонопласта, коррелирующее с подщелачиванием вакуолярного сока, обусловлено, вероятнее всего, снижением трансмембранного градиента рН. О возможном сопряжении транспорта H^+ с переносом других ионов свидетельствует соответствие величин наблюдаемых потоков H^+ из вакуоли ($3 \cdot 10^{-12}$ моль/см²·с) и трансмембранных потоков K^+ , Na^+ и Cl^- в клетках водорослей [14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрианов В. К., Булычев А. А., Курелла Г. А., Литвин Ф. Ф. Биофизика, 16, 1031, 1971.
2. Лялин О. О., Ктиторова И. Н. Физиол. растений, 23, 305, 1976.
3. Kitasato H. J. Gen. Physiol., 52, 60, 1968.
4. Spanswick R. H. J. Membr. Biol., 2, 59, 1970.
5. Vredenberg W. J. In: Ion Transport in Plants (W. P. Anderson ed.), 153. London, Acad. Press, 1973.
6. Vredenberg W. J., Tonk W. J. Biochim. et biophys. acta, 298, 354, 1973.
7. Маркин В. С., Кришталик Л. И., Либерман Е. А., Топалы В. П., Биофизика, 14, 256, 1969.
8. Маркин В. С., Пастушенко В. Ф., Кришталик Л. И., Либерман Е. А., Топалы В. П. Биофизика, 14, 462, 1969.
9. Скулачев В. П. Преобразование энергии в биомембранах. «Наука», 1973.
10. Mitchell P. Chemi-Osmotic Coupling and Energy Transduction, Glynn Research, Bodmin Cornwall, England, 1968.
11. Бобров В. А., Востриков И. Я., Курелла Г. А., Яглова Л. Г. Цитология, 15, 1165, 1973.
12. Walker N. A., Smith F. A. Plant Sci. Letters, 4, 125, 1975.
13. Smith F. A., Raven J. A. Membrane Transport in Plants. Berlin, 1974.
14. Lannoye R. J., Tarr S. E., Dainty J. J. Exptl Bot., 21, 543, 1970.

Поступила в редакцию
18.VIII.1976

THE EFFECT OF CARBONYL CYANIDE CHLOROMETHOXYPHENYLHYDRAZONE, AN UNCOUPLING AGENT OF PHOSPHORYLATION, ON MEMBRANE POTENTIALS AND pH OF THE VACUOLAR SAP IN NITELLA CELLS: INDIRECT ASSAY OF CYTOPLASMIC pH

M. GYENES, V. K. ANDRIANOV, A. A. BULYCHEV, G. A. KURELLA

*Department of Biophysics, Faculty of Biology
M. V. Lomonosov State University, Moscow*

The effect of carbonyl cyanide chloromethoxyphenylhydrazone (CCCP), an uncoupling agent of phosphorylation, at a concentration of $2 \cdot 10^{-6}$ M on the electrical potential differences at the plasmalemma and the tonoplast as well as on the vacuolar pH values was studied in Nitella cells. The action of CCCP was found to be accompanied by a change in the potential of the plasmalemma and the tonoplast as well as by the alkalinization of the vacuolar sap by 0.5—1.2 pH units within 15—30 min. The effect of the external pH in the range of 4 to 9 on the amplitude of changes in the membrane potential in the presence of CCCP was also determined. The results so obtained are consistent with the interpretation that CCCP increases the conductivity of cytoplasmic membranes for H^+ ions. It has been concluded that, at slightly alkaline pH values of the external medium, CCCP is an effective inductor of H^+ -conductivity at the tonoplast, but it is less effective at the plasmalemma. The calculated cytoplasmic pH values before and after the addition of CCCP were found to be 6.47 ± 0.7 and 5.6 ± 0.8 , respectively.
