

РЯД КАТИОННОЙ СЕЛЕКТИВНОСТИ КАНАЛОВ, ФОРМИРУЕМЫХ ПЕРОКСИРЕДОКСИНОМ-6 В БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

© 2022 г. П.А. Григорьев

Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пущино Московской области, Институтская ул., 3

E-mail: greegorjev@mail.ru

Поступила в редакцию 30.11.2021 г.

После доработки 10.12.2021 г.

Принята к публикации 12.12.2021 г.

Пероксиредоксин-6 — фермент, защищающий клетку от действия пероксидов, а также, в зависимости от локализации в клетке, участвующий в метаболизме фосфолипидов клеточных мембран. Также было показано, что пероксиредоксин-6 формирует катионные каналы в липидных бислойных мембранах. В данной работе изучена сравнительная проницаемость этих каналов для одно- и двухвалентных катионов. Полученный ряд проницаемостей имеет вид: $P_{Ca^{2+}} : P_{K^{+}} : P_{Na^{+}} = 8.5 : 5.0 : 1.0$.

Ключевые слова: пероксиредоксин-6, ионные каналы, катионная селективность.

DOI: 10.31857/S000630292202089

Пероксиредоксины защищают клетки от пероксидов и участвуют во внутри и внеклеточной сигнализации. Особый интерес представляет пероксиредоксин-6 (Prx6), который восстанавливает гидроперекиси и обладает фосфолипазной активностью [1].

При изучении взаимодействия Prx6 с бислойной фосфолипидной мембраной было показано, что этот фермент формирует в мембране катион-селективные ионные каналы, и было предположено, что механизм клеточной активности Prx6 включает функцию формирования ионных каналов в липидном матриксе клеточных мембран (рис. 1) [2]. Определенный интерес представляет дальнейшее изучение свойств этих каналов. В предлагаемой работе представлены результаты исследования ряда катионной селективности Prx6-каналов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Был использован рекомбинантный пероксиредоксин-6 человека, методика выделения которого детально описана в работе [2].

Бимолекулярные липидные мембраны формировали на круглом, диаметром 0.3 мм, отверстии в тефлоновом цилиндрическом стаканчике.

Сокращение: Prx6 — пероксиредоксин-6.

Был применен раствор фосфатидилхолина (Sigma, США) в гептане (10 мг/мл).

Токи мембран измеряли в режиме фиксации напряжения электрометром, собранным на основе микросхемы K544УД1А.

Для оцифровки, записи и анализа сигнала с выхода электрометра использовали цифроаналоговый преобразователь NI USB-6009 (National Instruments, США) и программу Strathclyde Electrophysiology Software WinEDR v. 3.2.3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характерное возрастание тока мембраны при встраивании в нее Prx6-каналов в растворах KCl и CaCl₂ показано на рис 1. Наблюдаемое неравенство амплитуд последовательных токовых ступенек объяснимо тем, что встраиваемые кластеры каналов содержат разное количество одиночных ионных каналов.

Приведенные ниже уравнения Нернста для мембранного потенциала одновалентных ионов (1) и двухвалентных ионов (2) показывают, что Prx6-каналы проницаемы только для катионов. Действительно, потенциал нулевого тока, равный –25 мВ при трехкратной трансмембранной разнице концентраций KCl, соответствует идеальной селективности каналов для катионов K⁺ (рис. 2а), тогда как при двукратном градиенте

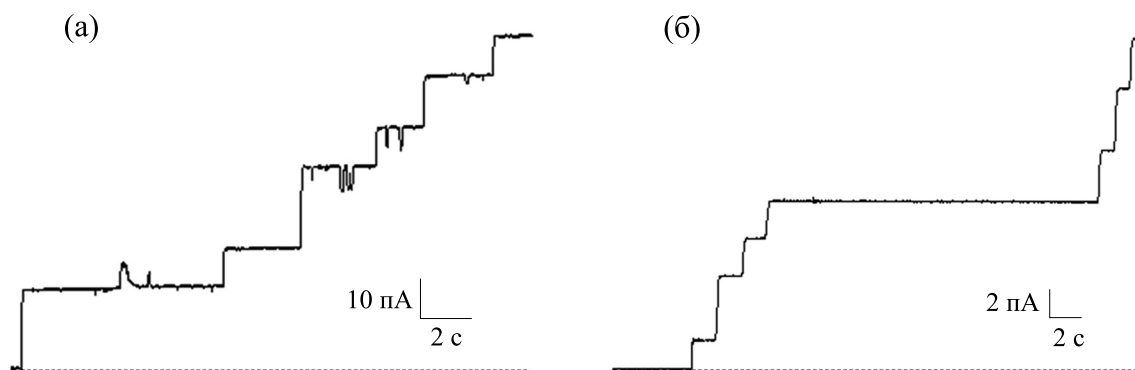


Рис. 1. Нарастание тока мембраны с Rgx6-каналами. Условия: (а) – 200 мМ KCl (по обе стороны мембраны), $V = 30$ мВ, калибровки: 10 пА и 2 с; (б) – 10 мМ CaCl₂ (по обе стороны мембраны), $V = 30$ мВ, калибровки: 2 пА и 2 с.

CaCl₂ потенциал нулевого тока равен -8 мВ (рис. 2б), т.е. каналы проницаемы только для ионов кальция.

$$V(\text{мВ}) = 60 \log(K_0^+/K_i^+), \quad (1)$$

$$V(\text{мВ}) = 30 \log(\text{Ca}_0^{2+}/\text{Ca}_i^{2+}). \quad (2)$$

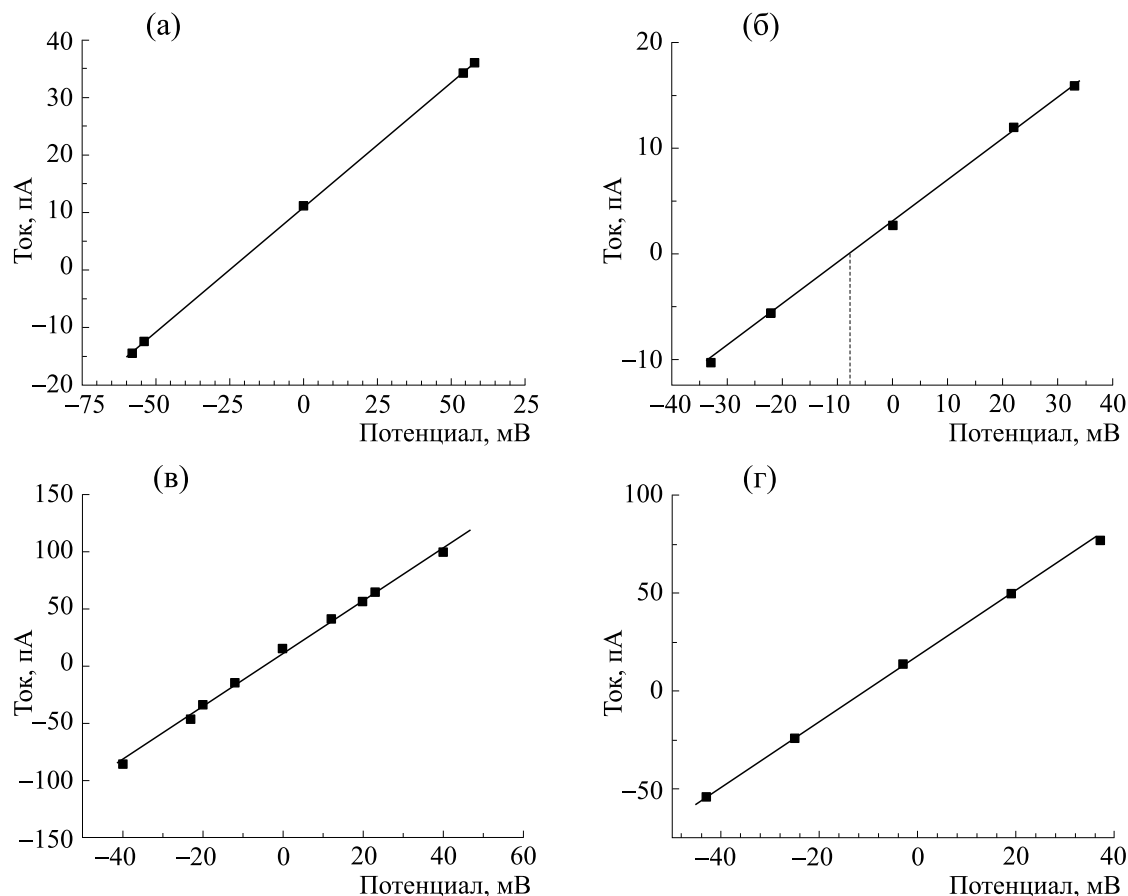


Рис. 2. Вольт-амперные характеристики Rgx6-каналов: (а) – при трехкратном трансмембранном градиенте концентраций KCl (300 : 100 мМ), потенциал нулевого тока равен -25 мВ; (б) – при двукратном градиенте концентрации CaCl₂ (20 : 10 мМ), потенциал нулевого тока равен -8 мВ; (в) – при 100 мМ KCl + 300 мМ NaCl с одной стороны мембраны и 100 мМ KCl – с другой стороны мембраны, потенциал нулевого тока равен -12 мВ; (г) – при 50 мМ KCl + 20 мМ CaCl₂ с одной стороны мембраны и 50 мМ KCl + 37 мМ CaCl₂ – с другой стороны мембраны, потенциал нулевого тока равен -15 мВ.

Для определения соотношения проницаемостей канала: $P_{Ca^{2+}} : P_{Na^{+}}$ и $P_{Ca^{2+}} : P_{K^{+}}$ использовали данные, представленные на рис. 2в и 2г, применяя уравнение Гольдмана (3) и формулу (4) из работы [3].

$$V(\text{мВ}) = 60 \log[(P_{K^{+}}[K_0] + P_{Na^{+}}[Na_0]) / (P_{K^{+}}[K_i] + P_{Na^{+}}[Na_i])], \quad (3)$$

$$V_0 = (P_{K^{+}}V_{K^{+}} + P_{Ca^{2+}}V_{Ca^{2+}}) / (P_{K^{+}} + P_{Ca^{2+}}), \quad (4)$$

где $P_{K^{+}}$ — калиевая проводимость канала, $P_{Ca^{2+}}$ — кальциевая проводимость канала, V_0 — потенциал нулевого тока, $V_{K^{+}}$ — калиевый потенциал, $V_{Ca^{2+}}$ — кальциевый потенциал.

На рис. 2в показано, что потенциал нулевого тока при условиях, когда с одной стороны мембраны электролит содержит 100 мМ KCl + 300 мМ NaCl, а с другой стороны мембраны — 100 мМ KCl, равен –12 мВ. Решение уравнения для этих параметров дает отношение $P_{K^{+}} : P_{Na^{+}} = 5.0$.

Значение $P_{Ca^{2+}} : P_{K^{+}} = 1.7$ было определено из формулы (4) для условий, когда с одной стороны мембраны электролит содержал 50 мМ KCl и 20 мМ CaCl₂, а с другой стороны мембраны — 50 мМ KCl и 37 мМ CaCl₂ (одинаковые концентрации для KCl и разные по CaCl₂). Параметры формулы для этих условий равны: $V_0 = 15$ мВ (рис. 2г), $V_{Ca^{2+}} = 8$ мВ и $V_{K^{+}} = 0$ (получены как решения уравнений Нернста (1) и (2)).

В итоге суммарное соотношение проницаемостей Prx6-канала для катионов кальция, калия и натрия имеет вид $P_{Ca^{2+}} : P_{K^{+}} : P_{Na^{+}} = 8.5 : 5.0 : 1.0$

при условии, что $P_{Ca^{2+}} : P_{K^{+}} = 1.7$ и $P_{K^{+}} : P_{Na^{+}} = 5.0$, и нормировке на $P_{Na^{+}} = 1.0$.

Видно, что Prx6-канал является в основном кальциевым каналом. Это особенно интересно в связи с появлением ряда работ, в которых показан синергизм действия кальция и пероксиредоксинов в клеточных реакциях. Так, например, показано, что кальций влияет на олигомеризацию пероксиредоксинов [5] и что пероксиредоксины взаимодействуют с активатором кальциевых каналов — белком STIM1 плазматической мембраны [6].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. Г. Шарапов, В. И. Новоселов и В. К. Равин, Молекуляр. биология **43** (3), 505 (2009).
2. П. А. Григорьев, М. Г. Шарапов и В. И. Новоселов, Биофизика **60** (4), 696 (2015).
3. C. A. Lewis, J. Physiol. **286**, 417 (1979).
4. M. A. B. Morais, P. O. Giuseppe, T. A. C. B. Souza, et al., J. Biol. Chem. **292** (17), 7023 (2017).
5. K. Ch. Tam, E. Ali, J. Hua, et al., Cell Calcium, **74**, 14 (2018).

Cation Selectivity Sequence of Channels Formed by Peroxiredoxin 6 in Membranes Composed of Phospholipid Bimolecular Leaflets

P.A. Grigoriev

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Peroxiredoxin 6 is an enzyme that protects against cellular damage by peroxides and participates in phospholipid metabolism in the cell's membranes depending on its location. It has also been shown that peroxiredoxin 6 forms cation channels in the lipid bilayer membranes. In this study, we evaluated the relative selectivity of these channels for monovalent and divalent cations. The resulted selectivity sequence is $P_{Ca^{2+}} : P_{K^{+}} : P_{Na^{+}} = 8.5 : 5.0 : 1.0$.

Keywords: peroxiredoxin 6, ion channels, cation selectivity