

## ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЕ КАТИОННЫЕ КАНАЛЫ, ФОРМИРУЕМЫЕ ПЕРОКСИРЕДОКСИНОМ-6 В ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ

© 2015 г. П.А. Григорьев, М.Г. Шарапов, В.И. Новоселов

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: greedorjev@mail.ru

Поступила в редакцию 21.07.14 г.

После доработки 19.05.15 г.

Впервые экспериментально показано, что антиоксидантный фермент пероксиредоксин-6 образует в липидном бислое из фосфатидилохолина катион-селективные ионные каналы-кластеры. Канал-кластер как олигомерная структура состоит из трех и более субъединиц – каналов с проводимостью около 350 пСм в 200 мМ КС1. Среднее время открытого состояния канала-кластера уменьшается при повышении трансмембранного электрического потенциала. Рассмотрен молекулярный механизм инактивации канала-кластера.

*Ключевые слова:* ионные каналы, липидный бислой, потенциал-зависимая инактивация.

Пероксиредоксины (Prx) – белки с молекулярным весом 20–30 кДа, важные антиоксидантные ферменты, которые широко представлены во всем живом мире. Пероксиредоксины могут иметь различную локализацию в клетке и составлять до 1% от растворимой формы белка в клетке [1]. Пероксиредоксины способны восстанавливать гидропероксиды как органической, так и неорганической природы [2–4]. Кроме пероксидазной активности, некоторые пероксиредоксины проявляют шаперонную и фосфолипазную активность [5].

Пероксиредоксины по числу цистеинов в активном центре и особенностям механизма катализа разделены на три подсемейства: 1-Cys Prx, типичные 2-Cys Prx и атипичные 2-Cys Prx. У млекопитающих обнаружено шесть представителей семейства пероксиредоксинов: Prx1–Prx4 (типичные 2-Cys Prx), Prx5 (атипичные 2-Cys Prx) и Prx6 (1-Cys Prx).

Prx6 – представитель 1-Cys Prx, содержащих единственный активный остаток цистеина (Cys47).

Подобно другим пероксиредоксинам, Prx6 восстанавливает пероксиды различной природы, но помимо H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, пероксинитрита и алкилгидропероксидов, способен восстанавливать пероксиды фосфолипидов [6,7]. При этом Prx6 восстанавливает как свободные молекулы гидропероксидов жирных кислот, так и в составе

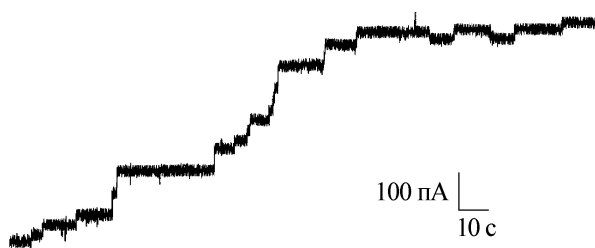
фосфолипидов [7,8]. Пероксидазный каталитический центр Prx6 формируется тремя высококонсервативными остатками: His39, Cys47 и Arg132.

Биологическая активность Prx6 происходит в окружении клеточных мембран, и вполне вероятно – на их поверхности. Как известно, фосфолипидный бислой является обязательным составным структурным компонентом всех клеточных мембран. Поэтому вполне логичным является изучение взаимодействия Prx6 с бислоем фосфолипидной мембраной, что и было выполнено в данной работе методом измерения проводимости мембраны в режиме фиксированного напряжения методом фиксации потенциала.

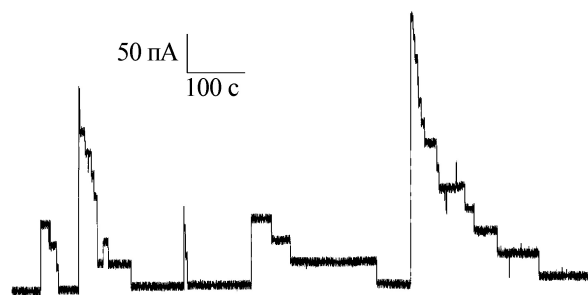
### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали электрофоретически чистые препараты (98% чистоты) белка Prx6, методика получения которого детально описана в работе Шарапова и соавт. [9]. Необходимое количество Prx6 добавляли в 12 мл объем электролита (100–200 мМ КС1) с одной стороны липидной мембраны, сформированной из фосфатидилхолина (P 5638, Sigma, США), так, чтобы окончательная концентрация Prx6 в этом объеме была примерно 10<sup>-8</sup> М. После 5-минутного перемешивания начинали измерение мембранного тока в режиме фиксации напряжения. Для записи и анализа токов каналов использовали программу WinEDR 3.3.1 [10]. Исполь-

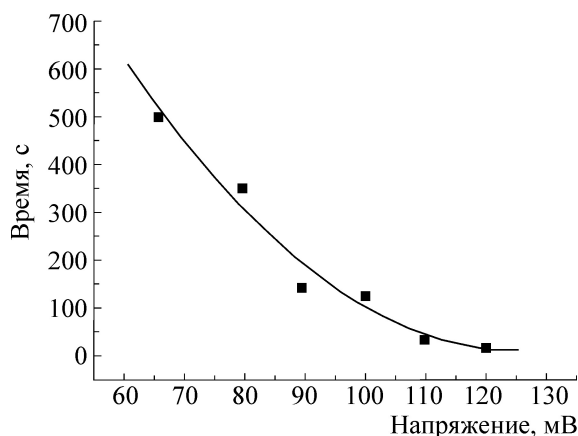
Сокращение: Prx – пероксиредоксины.



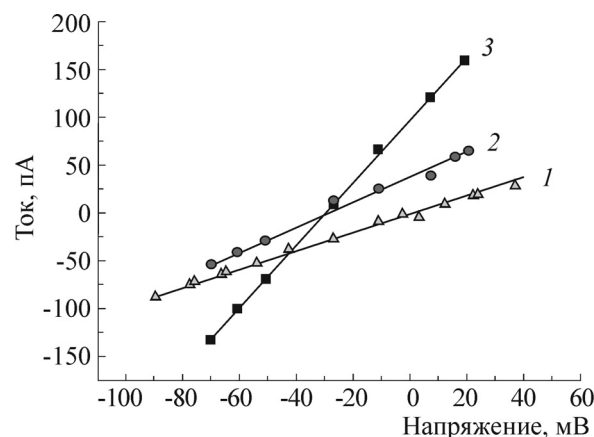
**Рис. 1.** Токи одиночных ионных каналов, формируемых пероксиредоксином-6 в липидном бислое. Условия: 200 мМ КС1, рН 7,0, напряжение 57 мВ. Калибровка: вертикальная – 100 пА, горизонтальная – 10 с.



**Рис. 2.** Ток мембраны при напряжении на мембране 20 мВ (верхняя часть рисунка) и при 88 мВ. Условия: 200 мМ КС1, рН 7,0. Калибровки: вертикальная – 50 пА, горизонтальная – 100 с.



**Рис. 3.** Зависимость среднего времени открытого состояния Prx6-канала от напряжения.



**Рис. 4.** Вольтамперные характеристики ионных каналов-кластеров, образуемых пероксиредоксином-6: 1 – трехканальный кластер, 100 мМ КС1 по обе стороны мембраны, 2 – этот же кластер при градиенте КС1 (300/100 мМ), 3 – четырехканальный кластер при градиенте КС1 (300/100 мМ). Потенциал нулевого тока для зависимостей 2 и 3 равен 30 мВ, что соответствует идеальной калиевой селективности всех открытых каналов.

званный в работе метод регистрации мембранных токов детально описан в ряде публикаций (см., например, работу Борисовой и соавт. [11]).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

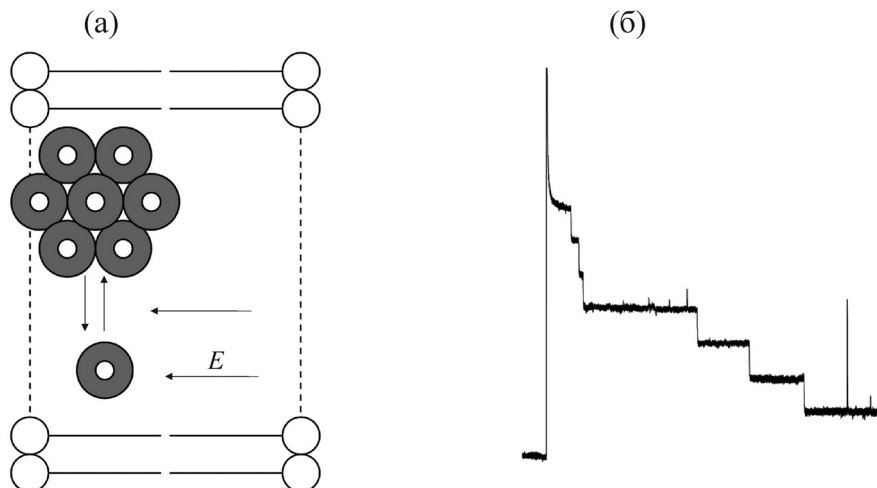
На рис. 1 показана запись тока мембраны во времени, при напряжении 57 мВ. Минимальная ступенька тока величиной в 20 пА соответствует открытию трансмембранного канала (проводимостью в 350 пСм). На записи тока видны импульсные увеличения тока величиной, кратной 20 пА, – это одновременное открытие нескольких каналов. Вероятно, это включение кластера каналов.

Действительно, кластерность встраиваемых каналов отчетливо проявляется при повышенных напряжениях. Например, вид флуктуаций тока мембраны при напряжении в 88 мВ (рис. 2) существенно отличается от флуктуации при напряжении в 57 мВ (рис. 1). Канал, включенный при 57 мВ, практически не выключается, но при 88 мВ времена открытого состояния значительно короче. Видно, что выключающийся

кластер может состоять из разного количества моноканалов с проводимостью в 360 пСм. Это отражается разным количеством ступенек отключения тока (см. рис. 2). Существует распределение времен открытого состояния кластера.

Количественно зависимость среднего времени открытого состояния канала-кластера показана на рис. 3.

Катион-анионная селективность каналов была определена в эксперименте, результаты которого приведены на рис. 4. Вольтамперные характеристики 1 и 2 соответствуют ситуации, когда кластер, вероятно, состоит из шести моноканалов проводимостью примерно в 170 пСм. Действительно, с большой вероятностью можно ожидать, что проводимость канала, имеющего проводимость 350 пСм в 200 мМ КС1, будет равна 175 пСм в 100 мМ КС1, а проводимость



**Рис. 5.** Вероятный механизм процесса инактивации Pqx6 канала-кластера. Предполагается, что олигомер из 10 и более молекул Pqx6 является более стабильной, долгоживущей внутри бислоя структурой, по сравнению с мономером. Вышедший из кластера канал (мономер Pqx6) покидает бислой под действием внешнего поля. Ток мембраны дискретно уменьшается.

в 1000 пСм (зависимости 1 и 2 на рис 4) соответствует проводимости шести таких моноканалов кластера. Зависимость 1 была получена в симметричных по концентрации КС1 условиях (100 мМ) по обе стороны мембраны, а зависимость 2 – при трехкратном градиенте КС1 (300/100 мМ), 300 мМ – во внешнем отсеке, в котором измеряется потенциал относительно заземленного внутреннего отсека. Зависимость 3 соответствует случаю, когда при градиенте КС1 открыт дополнительный кластер при трехкратном градиенте концентрации КС1. Видно, что потенциал нулевого тока кривых 2 и 3 равен 30 мВ, это соответствует идеальной  $K^+$ -селективности каналов.

Дискретность инактивации можно, вероятно, объяснить тем, что при пониженном (и даже нулевом) напряжении на мембране в бислое встраивается кластер, состоящий из нескольких мономеров Pqx6, и в момент включения напряжения регистрируется суммарный ток каналов кластера. При низком напряжении целостность кластера сохраняется долго, а при повышении напряжения проявляется ступенчатое уменьшение тока – выход из мембраны каналов-мономеров Pqx6 (рис. 5, справа). Действительно, с точки зрения теории сольватации, олигомер, состоящий из нескольких молекул Pqx6, должен легче встраиваться в бислой, чем мономер. Энергия сольватации определяется уравнением Борна [12,13]:

$$E \sim q^2(1 - 1/\epsilon)/r,$$

где  $E$  – энергия сольватации,  $q$  – заряд молекулы,  $\epsilon$  – диэлектрическая константа,  $r$  – радиус

молекулы. В данном случае рассматривается разность энергий для двух сред, отличающихся по  $\epsilon$ : одна с  $\epsilon = 80$ , раствор КС1, другая – гидрофобная часть липидного бислоя с  $\epsilon = 2$ .

Наблюдаемую зависимость от трансмембранного потенциала скорости выхода из бислоя каналов-мономеров можно объяснить эффектом плавления олигомера – канала-кластера, так как плотности токов мембраны находятся в диапазоне нескольких сотен ампер на см<sup>2</sup>.

Таким образом, нами показано:

1. Pqx6 формирует в липидном бислое катион-селективные ионные каналы кластерной структуры.
2. Канал-кластер обладает потенциал-зависимой инактивацией проводимости.
3. Высказано предположение, что эффект «плавления» внутримембранного кластера и разница в энергиях сольватации олигомера и мономера Pqx6 могут быть физическими факторами, ответственными за инактивацию проводимости канала-кластера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты № 13-94-00537 и № 13-04-00763.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. S. Seo, S. W. Kang, K. Kim, et al., J. Biol. Chem. **275**, 20346 (2000).
2. B. Hofmann, H. H. Hecht, and L. Flohe, Biol. Chem. **383**, 347 (2002).
3. Z. A. Wood, L. B. Poole, and P. A. Karplus, Science **300**, 650 (2003).

4. A. Karplus and A. Hall, *Subcell. Biochem.* **44**, 46 (2007).
5. H. H. Jang, K. O. Lee, Y. H. Chi, et al., *Cell* **117**, 625–635 (2004).
6. J. W. Chen, C. Dodia, S. I. Feinstein, et al., *J. Biol. Chem.* **275**, 28421 (2000).
7. Y. Manevich, T. Shuvaeva, C. Dodia, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **485**, 139 (2009).
8. S. Y. Kim, H. Y. Jo, M. H. Kim, et al., *J. Biol. Chem.* **283**, 33563 (2008).
9. М. Г. Шарапов, В. И. Новоселов и В. К. Раввин, *Молекуляр. биология* **43** (3), 505 (2009).
10. J. Demster, *Strathclyde Electrophysiology Software Win EDR 3.2.2* (University of Strathclyde, 2014).
11. М. Р. Борисова, Е.А. Brutyan, and L. N. Ermishkin, *J. Membrane Biol.* **90** (1), 13 (1988).
12. М. Born, *Zeitschrift fur Physik* **1**, 45 (1920).
13. N. Bazhin, *Thermodynamics* **2012**, Article ID 204104, 3 pages doi:10.5402/2012/204104 (2012).

## Potential-dependent Cation Selective Ion Channels Formed by Peroxiredoxin 6 in the Lipid Bilayer

P.A. Grigoriev, M.G. Sharapov, and V.I. Novoselov

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

The antioxidant enzyme peroxiredoxin 6 forms cation selective ion cluster-type channels in the lipid bilayer. Channel clustering as oligomeric structure consists of three or more subunits – channels with conductance of about 350 pS in the 200 mM KCl. Mean dwell time of the channel's open states decreases with increasing membrane voltage. A possible molecular mechanism of the observed potential-dependent inactivation of the channel cluster is discussed.

*Key words: ion channels, lipid bilayer, potential-dependent inactivation*