

СРАВНЕНИЕ ПОРООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМА С ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ рН И В ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКЕ МЕТОДОМ БЛМ

Жиленкова А.Е., Юдаева А.Д., Корепанова Е.А.

*Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия*

Введение. Как известно, апоптоз – запрограммированная клеточная смерть – осуществляется двумя путями: внешним (рецепторным) и внутренним (митохондриальным). Важнейшим событием для осуществления внутреннего пути является выход цитохрома с в цитозоль, который запускает образование апоптосом, что приводит к активации каспаз. Молекула цитохрома с заряжена положительно, благодаря большому количеству Lys и His, которые образуют несколько сайтов связывания белка с липидами, фосфолипиды мембраны несут отрицательный заряд, следовательно, просто цитохром с не может преодолеть гидрофобный барьер.

Материалы и методы. Мембрана для метода бимолекулярных липидных мембран (БЛМ) формировалась по Мюллеру на круглом отверстии в стенке тефлоновой камеры диаметра 0,8 нм из азолектина в н-декане с концентрацией 28 мг/мл (азолектин из соевых бобов, Sigma). В каждый из отсеков камеры помещали хлорсеребряный электрод и заливали 2,5 мл 100 мМ KCl, 5 мМ Tris-HCl рН 7,4 в первом эксперименте и 100 мМ KCl, 5 мМ Tris-HCl рН 10,7 во втором. Цитохром с (Sigma) добавляли в концентрации 5 мг/мл. После формирования модельного бислоя производились ассиметричные добавки (в одну камеру) цитохрома с по 30 мкл до 120 мкл. На электроды подавалось переменное пилообразное напряжение равное +/-100 мВ и постоянное напряжение +30 и -30 мВ.

Результаты и выводы. Далее рассчитывались значения ёмкости мембраны, которые составили от 1799 до 2093,75 пФ при рН 7,4 и от 1730 до 2674 пФ при рН 10,7. Рассчитанные значения проводимости при рН 7,4 менялись незначительно, от 31,25 до 17,8 пСм, а при рН 10,7 проводимость резко возрастала от 26,8 до 159,8 пСм. Кроме того, была зафиксирована значительная поровая активность с радиусом пор, равным 0,4-1,2 нм. При физиологическом рН, напротив, обнаружена лишь пара единичных пор.

Можно предположить, что при физиологическом рН цитохром с, благодаря своему положительному заряду прикреплен к отрицательно заряженному слою липидов. В более щелочных рН, соответствующих его изоэлектрической точке (рН 10,1), цитохром с теряет заряд, что позволяет ему проходить через мембрану, осуществляя порообразующую активность. Следовательно, именно потеря заряда цитохромом с, например, при алкалозе или соединении с отрицательно заряженной молекулой, может являться ключевым событием перед его выходом в цитозоль.