

На правах рукописи

Аливердиева Динара Алиевна

**ТРАНСПОРТЕРЫ ДИКАРБОКСИЛАТОВ И МОДЕЛЬНЫЕ ПОРОФОРМЕРЫ
В БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ**

Специальность 1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

Москва 2022

Работа выполнена в лаборатории биоэнергетики Института биохимии им. А.Н.Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» и в лаборатории биохимии и биотехнологии Прикаспийского института биологических ресурсов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Дагестанского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Научный консультант:

Звягильская Рената Александровна доктор биологических наук, профессор, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, лаборатория биоэнергетики.

Официальные оппоненты:

Шугаев Александр Григорьевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией дыхания растений и его регуляции, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН

Калебина Татьяна Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», кафедра молекулярной биологии, лаборатория молекулярной биологии, ведущий научный сотрудник.

Белослудцев Константин Николаевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Марийский государственный университет», кафедра биохимии, клеточной биологии и микробиологии, профессор кафедры.

Ведущая организация: Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», г. Пушкино.

Защита состоится «06» апреля 2023 г. в _14-00_ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук по адресу: 119071 Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071 Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте института <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «.....» 202__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Наряду с неоспоримыми достоинствами методов изучения качественных показателей трансмембранного транспорта на модельных системах (липосомах и бислойных липидных мембранах (БЛМ)) большинство широко используемых прямых методов количественного исследования транспорта обладает рядом неустраненных до настоящего времени недостатков. Изучению количественных параметров мешает негомогенность фракции мелких бислойных липосом [Schwarz and Robert, 1992], несоответствие нативному липидному окружению переносчика [Tillman and Cascio, 2003] и вероятность неоднородного распределения реконструированного транспортера в гигантских однослойных липосомах [Walde et al., 2010]. Для измерения транспорта в стационарном режиме БЛМ не используются. Пэтч-кламп исследования позволяют применять эффекторы только с внутренней (по отношению к нативной ориентации) стороны биомембраны. При высоком значении K_M транспортера неспецифическая сорбция на поверхности клеток и удерживание части субстрата в периплазме может исказить результаты [Benito and Lagunas, 1992].

Митохондрии печени крысы (митохондрии ПК) и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* признаны удобными модельными объектами исследований. Сукцинатоксидазная ферментативная система (далее сукцинатоксидаза) митохондрий ПК включает дикарбоксилатный транспортер (ДКТ), сукцинатдегидрогеназу и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазу (далее убихинолоксидазу). Причем активность компонентов в этом ряду возрастает. Кроме того, величина K_M по сукцинату у переносчика более чем на порядок превышает величину K_M сукцинатдегидрогеназы, т.е. природа «сконструировала» почти идеальную эндогенную сопряженную систему (ЭСС) для измерения в стационарном режиме концентрации сукцината в митохондриях. Поэтому дыхательную цепь можно рассматривать как ЭСС для измерения транспорта сукцината в митохондрии. При изучении транспорта окисляемых субстратов в клетки *S. cerevisiae* в качестве ЭСС могут быть использованы митохондрии этих клеток. Митохондрии защищены от непроникающих в клетку ингибиторов и находятся в среде (цитоплазме) со стабильным рН и ионным составом, благодаря системам гомеостаза клетки. Это позволяет изучать влияние этих внешних эффекторов только на трансплазмалемный транспорт.

В настоящее время в связи с появлением штаммов патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам, увеличивается интерес медиков к давно известным лекарственным препаратам – пороформерам, в том числе аламетицину, мелиттину и мастопарану. Несмотря на многочисленные исследования, механизм антимикробного действия пороформеров не ясен. В присутствии аламетицина имеет место синергическое повышение эффективности эндофлоксацина при лечении респираторных болезней, вызываемых *Mycoplasma pulmonis* [Fehri et al., 2007], причем эффект связывают с порообразующим действием этого пептида. Мастопаран предотвращает метастазообразование в модельных экспериментах [Kamath et al., 2010] и является потенциальным агентом против септического шока [Yibin et al., 2005]. Мелиттин рассматривается как малотоксичный противоопухолевый препарат [Zhang et al., 2010] и перспективное средство при лечении карциномы печени [Liu et al., 2008]. Нерешенным вопросом в механизме порообразования является определение концентрационного порядка

лимитирующей стадии этого процесса. Необходимо разработать метод исследования пороформеров в присутствии трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$).

C₄-дикарбоксилаты (ДКБ) играют важную роль в метаболизме эукариот. В частности, сукцинат и L-малат являются интермедиатами цитратного цикла и обеспечивают взаимосвязь между обменом в пероксисомах и митохондриях. Структура активного центра ДКТ не изучена. В зависимости от возможной ориентации трансмембранные сегменты переносчика могут сформировать как гидрофильный, так и в значительной мере липофильный трансмембранный канал. Степень его липофильности не изучена, так как ни для одного из переносчиков ДКБ эукариот третичная структура не установлена. Хотя на основе переносчика цитрата и глутамата *Vibrio cholera* [Mancusso et al., 2012] была попытка компьютерного моделирования трехмерной структуры дикарбоксилатного транспортера человека [Schlessinger, et al., 2014].

Показано, что точка связывания субстрата в ДКТ митохондрий экспонирована в канал [Шольц и соавт., 1990]. Это позволяет для оценки липофильности канала использовать ингибиторный анализ транспорта с помощью серии алкильных и ацильных производных субстрата разной длины. Для этой оценки необходимо отработать методы исследования взаимодействия этих амфифилов и митохондрий без потери интактности ЭСС.

До наших исследований представления о транспорте ДКБ через плазмалемму *S. cerevisiae* были противоречивыми, а его механизм не изучен. Вопрос о существовании возможного транспортера дикарбоксилатов в плазмалемме *S. cerevisiae* оставался нерешенным из-за отсутствия метода измерения низких активностей окисления сукцината и L-малата на фоне активного эндогенного дыхания.

Представляется актуальным изучение структуры и свойств дикарбоксилатных транспортеров и механизмов порообразования модельных пороформеров. А перечисленные преимущества интактных митохондрий и клеток делают перспективным предлагаемое направление – использование ЭСС в количественном изучении трансмембранного транспорта.

Цель работы – Изучение особенностей порообразования индукторами ионной проницаемости – аламетицином, мелиттином и мастопараном с использованием митохондрий ПК, а также сравнительное изучение свойств, кинетических параметров и активного центра нативных дикарбоксилатных транспортеров митохондрий ПК и плазмалеммы *S. cerevisiae* с различными механизмами функционирования.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **основные задачи**:

1. Разработать новые экспериментальные подходы для определения параметров переносчиков и измерения трансмембранного катионного транспорта (тока) на препаратах митохондрий ПК.

2. Получить количественные соотношения между активацией дыхания митохондрий ПК и катионным током, индуцированным во внутренней мембране валиномицином, аламетицином, мелиттином, тетраацетилмелиттином (ТАМ) и мастопараном и изучить скорость-лимитирующую стадию порообразования.

3. Изучить свойства и кинетические характеристики переносчика ДКБ плазмалеммы *S. cerevisiae*: механизм, субстратную специфичность, рН-оптимум, влияние катионов на величины K_M и V_{max} .

4. Провести зондирование окрестности точки связывания сукцината в активном центре нативного ДКТ митохондрий ПК с помощью 2-алкилмалонатов, 2,2-диалкилмалонатов, О-ацил-L-малатов, α,ω -алкилендималонатов – потенциальных конкурентных ингибиторов транспорта.

5. Провести аналогичное зондирование транспортера ДКБ плазмалеммы *S. cerevisiae* с помощью 2-алкилмалонатов и О-ацил-L-малатов.

Научная новизна работы. Получены новые данные, характеризующие первые этапы порообразования для мелиттина, мастопарана и аламетицина в митохондриях ПК, генерирующих $\Delta\psi$. Показана возможность использования суспензии высокосопряженных митохондрий в оксиметрической ячейке в качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока (КТТ), индуцированного пептидами-пороформерами. Проводимость, индуцированная во внутренней мембране митохондрий печени крысы, и степень активации окисления ими сукцината связаны линейной зависимостью. Впервые показано, что с помощью такого подхода можно измерить стационарную калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм в присутствии $\Delta\psi$ при низких пептид/липидных соотношениях и оценить диаметр поры. Определено соотношение степеней активации дыхания аламетицином, мелиттином или мастопараном в монокалиевой и монолитиевой средах при одинаковом значении $\Delta\psi$. Сделано предположение о том, что в присутствии аламетицина проводимость лимитируется реакцией образования поры, а в присутствии мелиттина или мастопарана – стадией, предшествующей порообразованию. Разработана методология использования амфифильных эффекторов и изучения нативных транспортеров в интактных системах, методы измерения кинетических параметров интактных переносчиков *in situ*, основанные на использовании эндогенных систем окисления субстратов в качестве сопряженных систем измерения транспорта этих соединений. Подобраны условия, при которых митохондрии в клетках *S. cerevisiae* могут служить ЭСС для измерения стационарных скоростей транспорта сукцината и пирувата через плазмалемму. Впервые показано, что в диапазоне от pH 5,5 до pH 7,5, транспорт сукцината через плазмалемму *S. cerevisiae* опосредован О-пальмитоил-L-малат чувствительным транспортером с уникальными и нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами. Для двух транспортеров (митохондрий и плазмалеммы) с разным механизмом действия изучена структура их каналов вблизи точки связывания субстрата.

Практическая значимость. Научно-практическую ценность имеют разработанные или усовершенствованные методы использования амфифильных эффекторов и предложенная в работе методология измерения нативных транспортеров в интактных системах. Методы, разработанные при изучении транспортера ДКБ *S. cerevisiae* применимы для изучения и поиска малоактивных переносчиков окисляемых субстратов дрожжей. Проведенное нами впервые зондирование активных центров переносчиков дикарбоксилатов с использованием линейки производных субстратов с монотонно увеличивающимся алифатическим заместителем в отсутствие рентгеноструктурных данных о третичной структуре транспортеров ДКБ является в настоящее время единственным источником детальной информации о структуре их активных центров.

Методический подход, основанный на использовании суспензии высокосопряженных митохондрий в оксиметрической ячейке в качестве бесконтактного биосенсора

трансмембранного катионного тока, примененный нами при изучении 4-х пептидов-пороформеров, можно в перспективе применить для изучения побочных эффектов 10-ти широко используемых в современной медицине пороформеров-антибиотиков и двух десятков пороформеров, которые по данным FDA находятся на второй стадии клинических испытаний. Эффективность использованного подхода подтверждена возможностью измерения стационарной калиевой проводимости, индуцированной в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм в присутствии $\Delta\psi$ при низких пептид/липидных соотношениях и оценки диаметра поры. Полученные результаты расширяют представление о механизмах возможного токсического действия пептидов-пороформеров и должны учитываться при разработке на их основе препаратов медицинского назначения.

Положения, выдвигаемые на защиту:

1. Сформулирован, теоретически обоснован и экспериментально подтвержден новый методологический подход. Ферментативные системы окисления субстратов в препаратах митохондрий и клеток можно использовать в качестве ЭСС для изучения трансмембранного транспорта моно-, ди- и трикарбоновых кислот.

2. Впервые показано существование О-пальмитоил-L-малат чувствительного транспортера плазмалеммы *S. cerevisiae*.

3. Новый переносчик дрожжей обладает уникальными для транспортеров плазмалеммы дрожжей свойствами: широкой субстратной специфичностью, рН оптимумом в щелочной области, рН-зависимым модулированием транспорта однозарядными катионами; механизм транспорта – неэлектрогенный унипорт.

4. Канал транспортеров, переносящих гидрофильный субстрат (дикарбоксилат), имеет гидрофобную поверхность (модели трехмерных структур скорректированы).

5. Обнаружены два механизма самоассоциации пороформеров в биомембране: с замедлением образования непроводящей димерной предпоры и с замедлением образования транспортирующего канала.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 43 работы, в т.ч. 23 статьи в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, из них 21 – в научных журналах, индексируемых в базе данных Web of Science. В соавторстве получен 1 российский патент на изобретение. Данные диссертации суммированы в обзорных статьях, а также включены в книги зарубежных издательств: “Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology” выпущенной издательством “Formatex Research Center”, Spain, 2010; “Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges”, издательством World Scientific Publishing Co., USA, UK, 2012, “Industrial, medical and environmental applications of microorganisms. Current status and trends”, издательством Wageningen Academic Publishers, the Netherlands, 2014, “Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms”, издательством BrownWalker Press, 2016.

Апробация работы. Результаты и основные положения диссертации доложены и обсуждены на 25 российских и международных конференциях, конгрессах и симпозиумах, в том числе, Симпозиуме ESF-EMBO «Comparative genomics of eukaryotic microorganisms. Eucaryotic genome evolution, approaches with yeasts and fungi» (Каталония, Испания, 2005), III-м и IV-м Съездах Общества биохимиков и молекулярных биологов России (Санкт-

Петербург, 2002 и Новосибирск, 2008), Московских международных научных конференциях «Биотехнология – окружающей среде» (Москва, 2004, 2005 и 2006), Московском Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2009), 2-м Международном конгрессе Биотехнология – 2011 (Филадельфия, США), IV-й международной конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2011 (Малага, Испания, 2011), V-ой международной конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology BioMicroWorld2013 (Мадрид, Испания, 2013), 27-ой конференции FEBS/PABMB (Лиссабон, Португалия, 2001) Европейских Биоэнергетических конференциях (ЕВЕС) (Москва, 2006 и Дублин, Ирландия, 2008), 38-ой конференции FEBS (Санкт-Петербург, 2013) и 39-ой конференции FEBS-EMBO (Париж, Франция, 2014), VI конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2015 (Барселона, Испания, 2015), VI Съезде биохимиков России (Сочи, 2019), VII-м Съезде биохимиков России и X-м Российском симпозиуме "Белки и пептиды" (Сочи–Дагомыс, 2021). Работа поддержана РФФИ (гранты №№ 04-04-49670, 07-04-00225, 05-04-52062, 05-04-52093, 06-04-03078, 07-04-05024, 08-04-05002).

Место проведения работы. Работа проводилась в лаборатории биоэнергетики Института биохимии им. А.Н. Баха РАН и в лаборатории биохимии и биотехнологии ПИБР ДФИЦ РАН.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, заключения и списка использованной литературы. Работа изложена на 324 страницах машинописного текста. Список цитируемой литературы включает 510 наименований. Иллюстративный материал содержит 78 рисунков и 10 таблиц.

Список принятых сокращений. БЛМ – бислойная липидная мембрана; ДК – дыхательный контроль; ДКБ – дикарбоксилаты; ДКТ – дикарбоксилатный транспортер; ДМСО – диметилсульфоксид; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; ККЛ – критическая концентрация лизиса; КТТ – калиевый трансмембранный ток; митохондрии ПК – митохондрии печени крысы; СВ – среда выделения; СВЖ – среднее время жизни; СМЧ – субмитохондриальные частицы; ТАМ – тетраацетилмелиттин; ЭСС – эндогенная сопряженная система; A_{200} – концентрация пептида, активирующая v_4 на 200%; C_m – равноэффективная мембранная концентрация пептида, соответствующая A_{200} ; F – флуоресценция; FCCP – (англ. carbonylcyanide(4-trifluoromethoxy)phenylhydrazone) – карбонилцианид(4-флюорометокси)фенилгидразон; NEPES – (англ. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоная кислота; I_{50} – концентрация ингибитора, вызывающая полумаксимальный эффект; K_i – константа ингибирования; K_M – константа Михаэлиса; K_p – коэффициент распределения амфифильного эффектора между митохондрией ПК и средой; MES – 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid – 2-(N-морфолино)этансульфоная кислота; n – количество атомов углерода в алкильном или ацильном заместителе в формуле ингибитора ДКТ; R_n – коэффициент распределения O-ацил-L-малатов в системе октанол/среда; SF – 3,5-ди-трет-бутил-4-оксибензилиденмалоннитрил V_{max} – максимальная скорость; v_0 – скорость дыхания до добавления ингибитора; v_e – скорость эндогенного дыхания; v_4 – скорость окисления субстрата митохондриями в отсутствие активаторов; v_i – скорость дыхания в присутствии ингибитора; YNB – Yeast

Nitrogen Base; $\Delta\psi$ – трансмембранный потенциал; λ – удельное содержание доступной эффектору гидрофобной фазы (удельное содержание липида в митохондриях).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы описана роль транспортеров ДКБ в метаболизме клетки, подробно анализируются молекулярные характеристики транспортеров S_4 -ДКБ, механизм транслокации, структура и субстратная специфичность. Описаны структура и механизм мембранотропного действия пороформеров аламетицина, мелиттина и мастопарана, предлагаемые модели образуемых ими каналов в искусственных и биологических мембранах, рассматривается медицинское значение пороформеров. Обсуждаются традиционные прямые и непрямые методы исследования трансмембранного транспорта в интактных органеллах и клетках, теоретически обоснованы используемые в работе методические приемы.

Глава 2. Материалы и методы исследования

В работе использовали штаммы *S. cerevisiae* Y-502, Y-503, YNN 295, *S. paradoxus* N17, *S. bayanus* MCYC623, YBS618, YBS817 и YBS24 из коллекции ФГУП ГосНИИ Генетика НИЦ Курчатовский институт (Россия), и штамм *S. cerevisiae* S288с, использованный для расшифровки генома (<http://www.yeastgenome.org>) от проф. Л. Малле (Франция).

Молекулярно генетическая характеристика штамма дрожжей. Тетраплоидность штамма Y-503 была подтверждена С.В.Беневоленским (ФГУП ГосНИИ Генетика). Определение удельного содержания хромосомной ДНК в клетках штаммов проводили, как описано [Hoffman and Winston, 1987]. Принадлежность этого штамма к *S. cerevisiae* показана молекулярно-генетическими методами по [Naumova et al., 2003, Наумова и соавт., 2007].

Условия выращивания и предобработки клеток *S. cerevisiae*. Инокулят выращивали при 28°C в упрощенной полусинтетической среде, содержащей 0,2%-ный дрожжевой экстракт, 1%-ную глюкозу, 0,21 % K_2HPO_4 (pH 4,5), в отдельных случаях без добавления фосфата, затем медленно охлаждали до 4°C без перемешивания не менее 1 суток для «мягкой» синхронизации культуры [Узбеков, 2004]. Культуру выращивали при 28°C в той же среде, но с 0,1%-ной глюкозой или в синтетической среде 0,17% Yeast Nitrogen Base (YNB) (pH 4,5), с добавлением 0,1%-ного K_2HPO_4 , 0,1%-ного аспарагина в течение 12 ч в фазе роста, совпадающей с исчерпанием глюкозы из среды выращивания.

Через 10 или 12 ч выращивания клетки быстро (3 – 5 мин) охлаждали, осаждали при 2700 g 3 мин и трижды промывали дистиллированной водой (при 0°C). Затем клетки суспендировали в 10 mM K_2HPO_4 , pH 5,5, до концентрации 0,5 г сырой биомассы в 1 мл (далее – г/мл). Перед опытом эту суспензию преинкубировали при 0°C, интенсивно перемешивая.

Состав сред инкубации: Среда инкубации дрожжевых митохондрий (СИ1) содержала 0,6 М маннит, 1 mM ЭДТАNa, 5 mM MgCl_2 , 10 mM MES (pH 6,5), 10 mM K_2HPO_4 , 0,48 mM ADP, 1 mM пируват Na. Среда инкубации митохондрий ПК (СИ2) содержала 125 mM сахарозу, 2 mM EDTA, 20 mM KCl, 6 mM MgCl_2 , 10 mM K_2HPO_4 , 10 mM сукцинат Na, ротенон 3 нг/мг митохондрий, 20 mM Tris (pH 7,2). СИ3 отличалась от СИ2 отсутствием сукцината и присутствием 2 mM MgCl_2 . Среда инкубации митохондрий с поврежденной наружной мембраной (СИ4) содержала 10 mM сукцинат, 2 mM ЭДТА, 2,5 mM MgCl_2 и 10 mM Tris (pH

7,2). Использовали также монокатионные среды с рН 7,5, в которых все катионы, кроме магния были замещены на ионы K^+ или Li^+ , при этом Tris заменяли на 10 мМ HEPES. Это увеличивало концентрацию Me^+ до 35 мМ. Среда именовали СИ5 (среда инкубации с 10 мМ KH_2PO_4 и 6 мМ $MgCl_2$), СИ6 (среда инкубации с 1 мМ KH_2PO_4 и 6 мМ $MgCl_2$), СИ7 (среда инкубации с 0,3 мМ KH_2PO_4 и 6 мМ $MgCl_2$), или СИ8 (среда инкубации с 0,3 мМ LiH_2PO_4 и 6 мМ $MgCl_2$). Также использовали среды с рН 7,2, содержащие 30 мМ Tris в качестве основного катиона (СИ9). За исключением оговоренных случаев все среды, содержали цитохром с (4 мкМ). Тоничность всех сред доводили до 270 мОсМ, варьируя концентрацию сахарозы.

Прочно сопряженные интактные митохондрии ПК выделяли по модифицированной методике Вейнбаха [Мосолова, 1971]. Величина дыхательного контроля (ДК) митохондрий по Чансу [Chance, 1965] в СИ2 составляла – $5,14 \pm 0,65$. ДК в СИ7 и СИ8 был одинаковым. Скорость окисления сукцината митохондриями в отсутствие активаторов (v_4) в СИ2 составляла $11,43 \pm 0,5$ нмоль/мин мг белка. В пределах каждой серии кривых, полученных на одном препарате (16 часов), изменение этой величины не превышало 4%, а в пределах одной кривой – 2-3% за полчаса. Стандартная концентрация митохондрий ПК в оксиметрической ячейке – 0,25 мг/мл, за исключением оговоренных экспериментов.

Белок митохондрий определяли модифицированным методом Бредфорд [Аливердиева и соавт., 1984] и по [Goa, 1953]. **Субмитохондриальные частицы (СМЧ) из митохондрий ПК** и их сукцинат: феррицианидредуктазную активность в СИ3 определяли по [Шольц и соавт., 1990], а концентрацию СМЧ – по [Goa, 1953].

Митохондрии с поврежденной внешней мембраной получали непосредственно в ячейке для измерения кислорода, добавляя митохондрии ПК в гипотоническую СИ4 и прибавляя 100 мМ сахарозу через 1 мин [Мамаев и соавт., 1985].

Митохондрии дрожжей выделяли по модифицированной нами методике [Vazhenova, 1998]: для получения протопластов использовали литиказу, в среде промывания протопластов заменяли фосфат HEPES'ом (3 мМ) и добавляли $MgCl_2$ (5 мМ). В среду промывания митохондрий добавляли $MgCl_2$ (5 мМ) и исключили бычий сывороточный альбумин (БСА).

Скорость дыхания измеряли амперометрически с закрытым электродом Кларка в термостатируемой ячейке [Шольц, Островский, 1975]. Ротенон добавляли непосредственно перед добавлением митохондрий.

Клетки и митохондрии *S. cerevisiae* изучали при 30°C, а митохондрии ПК при 25 °С.

$\Delta\psi$ митохондрий ПК измеряли по [Emaus et al., 1986] по изменению флуоресценции (F) 0,4 мкМ родамина123 (при 503/527 нм) на флуориметре Shimadzu RF-5301 РС (Япония). В отдельных опытах показали, что типичный индуктор проницаемости митохондрий (аламетицин), вызывающий их набухание, не искажает флуоресценцию за время измерения.

Расчет концентрации мембранотропного амфифила основан на определении его коэффициента распределения (K_p) между митохондриями ПК и средой инкубации [Шольц, 1980].

Как показано для мастопарана, кривые активации меняются с ростом концентрации органелл (Рис. 1а.). Зависимости от этой концентрации равноэффективных концентраций пептида (Рис. 1б.) отсекают на оси абсцисс величину, которая после умножения на соотношение липид/белок в митохондриях ПК равна величине обратной K_p для мастопарана

$-0,73 \times 10^5$ ($(0,77 \pm 0,04) \times 10^5$ (среднее из трех измерений)).

Критическую концентрацию амфифила, лизирующую митохондрии (ККЛ) определяли турбидиметрически [Соловьева и соавт., 1974].

Коэффициенты распределения (R_n) О-ацил-L-малатов в системе октанол/среда (10 мМ KH_2PO_4 , рН 7,2 или 5,5) определяли с использованием метиленового синего по [Бондаренко и соавт., 2004].

Мелитгин из *Apis mellifera* и **мастопаран** из яда шершня *Vespa orientalis*, не содержащие фосфолипазу, выделяли по [Gauldie et al., 1976] с использованием гель-фильтрации на сефадексе G-50 и тонкослойной адсорбционной хроматографии на целлюлозе [Мирошников и соавт., 1981].

Глюкозу в культуральной жидкости определяли по [Okuda and Miwa, 1973] после удаления клеток фильтрованием (диаметр пор 0,3 мкм).

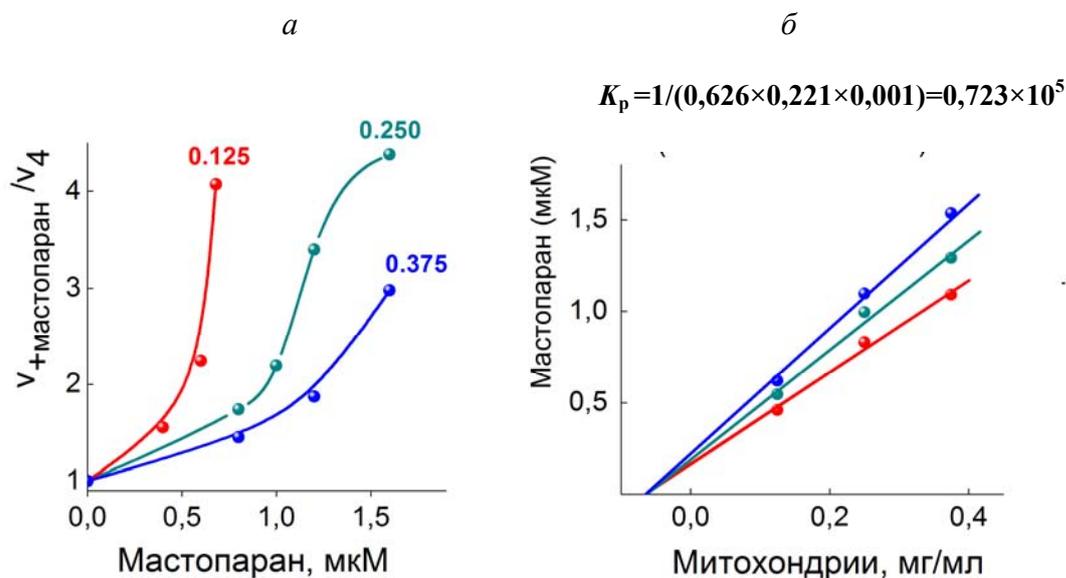


Рис. 1. а – Зависимости максимальной стабилизированной скорости окисления сукцината митохондриями ПК (при определенной концентрации пептида) от концентрации мастопарана при различных концентрациях органелл 0,375, 0,250, 0,125 мг белка/мл (нижняя, средняя и верхняя кривые, соответственно).

б – Зависимость равноэффективной концентрации мастопарана от концентрации митохондрий (1,8-кратная, 2,2-кратная и 2,8-кратная активация (нижняя, средняя и верхняя кривые, соответственно)).

Условия: Среда инкубации СИ2.

Расстояние от линии, соединяющей карбоксилы, до последнего атома углерода в заместителе производных малата и малоната в конформации с минимальной свободной энергией рассчитывали с помощью программы Chemoffice, MM2. Эту величину принимали за длину молекулярного зонда.

Представление результатов. Благодаря длительной (30 мин) стабильности скорости окисления субстратов митохондриями и клетками, зависимость этих скоростей от концентрации эффикторов получали в одной оксиграмме, последовательно добавляя их к одной порции органелл или клеток. Для относительной активация состояния v_4 митохондрий ($v_{+эффиктор}/v_4$), I_{50} , K_i , K_M или V_{max} разброс указан в тексте. Исключением были зависимости для α,ω -алкилендималонатов (митохондрии ПК), а прототонофоров (клетки дрожжей). Каждая константа определялась не менее, чем в 3-х экспериментах.

При изучении дрожжей и их митохондрий из скорости окисления экзогенных субстратов (v) вычитали величину эндогенного дыхания (v_e). Она оставалась неизменной в течение всего времени эксперимента. Стандартные обозначения: v_e – скорость эндогенного дыхания клеток; v – скорость дыхания в присутствии данной концентрации субстрата (в отсутствие ингибитора или эффектора); v_4 – скорость дыхания митохондрий в состоянии 4; V или V_{\max} – максимальная скорость дыхания с субстратом; v_0 – скорость дыхания с субстратом в присутствии нулевой концентрации ингибитора; v_i – скорость дыхания в присутствии ингибитора; $v_{\text{+эффектор}}$ – скорость дыхания в присутствии эффектора; I_{50} – концентрация ингибитора, вызывающая полумаксимальный эффект; K_i – константа ингибирования; K_M – константа Михаэлиса.

I_{50} Высших 2-алкилмалонатов, начиная с 2-додецилмалоната, и высших О-ацил-L- и D-малатов, начиная с О-миристоилмалата, а также 1,8-октилендималоната и 1,11-ундецилендималоната получали экстраполируя к нулевой концентрации органелл или клеток по [Heirwegh et al., 1988].

$\Delta\psi$ Митохондрий ПК рассчитывали по эмпирическому уравнению $-\Delta F/F = (\Delta\psi - 60)/323$ (формула 1), описывающему (для $\Delta\psi > 66$ мВ) линейный участок соответствующей зависимости, которая приведена в статье [Emaus et al., 1986], где ΔF – разница величин флуоресценции (F) до и после добавления протонофора. Если $\Delta\psi$ в разных средах инкубации отличалась, то при расчете соотношения активаций дыхания митохондрий и пропорциональных им трансмембранных токов в этих средах мы вводили поправку согласно закону Фарадея.

Реактивы и материалы. В работе использовали валиномицин, N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфокислота (HEPES), литиказу, мерсалил, флавоин, L- и D-яблочную кислоту (Sigma, Германия), D-глюкозу моногидрат, D-маннит, D-сорбит, (Merk, Германия), 2-оксибутират натрия (Ferak, Германия), бычий сывороточный альбумин («Calbiochem», США), антимицин А, кумасси бриллиантовый голубой, морфолино-этансульфокислоту (MES), ротенон, Tris(оксиметил)аминометан (Tris), цитохром с (Serva, Германия), бакто-агар, дрожжевой экстракт, пептон, среду YNB без аминокислот и сульфата аммония (BD, Difco Laboratories, США), аспарагин, динатриевую соль аденозин-5-дифосфорной кислоты, этилендиаминтетрауксусную кислоту или ее динатриевую соль, (Reanal, Венгрия), протонофоры 3,5-ди-трет-бутил-4-оксибензилиденмалонитрил (SF-4867, далее SF) (Sumitomo Chem. Co., Япония) и (карбонил-цианид-4-трифторметокси)фенилгидразон (FCCP) (Sigma, Aldrich), малонат натрия (ICN, США), аламетицин из *Trichoderma viride*, NaOH («Fluka», Швейцария), эндонуклеазы *HaeIII* и *HpaII* (Fermentas, Литва); отечественные препараты (Реахим, Россия): KCl, KH_2PO_4 и KOH квалификации о.с.ч., гексан, диметилсульфоксид (ДМСО), метиленовый синий, сахарозу – х.ч., октанол, хлороформ – х.ч., перегнанные, итаконовую, малеиновую, фумаровую и янтарную кислоты, $MgCl_2$, пируват и сукцинат натрия перекристаллизовывали дважды, глюкозооксидазу, совкаин, дитиотрейтол. Алкилмалонаты и О-ацил-L-малаты были синтезированы и очищены в нашей лаборатории Д.И. Бондаренко. Аламетицин, синтезированный по [Rinehart et al., 1977], был любезно предоставлен проф. К.Л. Райнхартом (Иллинойский университет, США), причем этот препарат использован в большинстве опытов. 1,7,21,23-Тетраацетилмелиттин синтезировали из мелиттина по [Habermann and Kowallek, 1970]. Отсутствие фосфолипазной активности в этом препарате контролировали по

[Shipolini et al., 1971]. Грамицидин S полученный от проф. Г.Ф. Гаузе, перекристаллизован из этилового спирта.

Для генетической и молекулярной идентификации штамма Y-503 использовали стандартные гаплоидные штаммы *S. cerevisiae* S288c (α SUC2gal2), X2180-1A (a SUC2gal2), CBS 1171, гаплоидные штаммы *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus*. Кроме того, использовали штаммы *S. cerevisiae*: YNN 295, ВКМ Y-502, *S. paradoxus*: N17; *S. bayanus*: МСУС 623.

Глава 3. Основные результаты и их обсуждение

3.1. Митохондрии ПК – биосенсоры трансмембранного тока

3.1.1. Оценка гомогенности и стабильности митопластов, образующихся из митохондрий ПК при действии индукторов проницаемости.

Под действием индукторов катионной проницаемости (в том числе валиномицина) дышащие митохондрии ПК набухают, и их внешняя мембрана повреждается. Митохондрии становятся митопластами. При обработке ультразвуком митопластов возрастала доля нечувствительной к 2,2-дигексилмалонату сукцинатоксидазы ($(1-v_2/v_1)$) (Рис. 2а.).

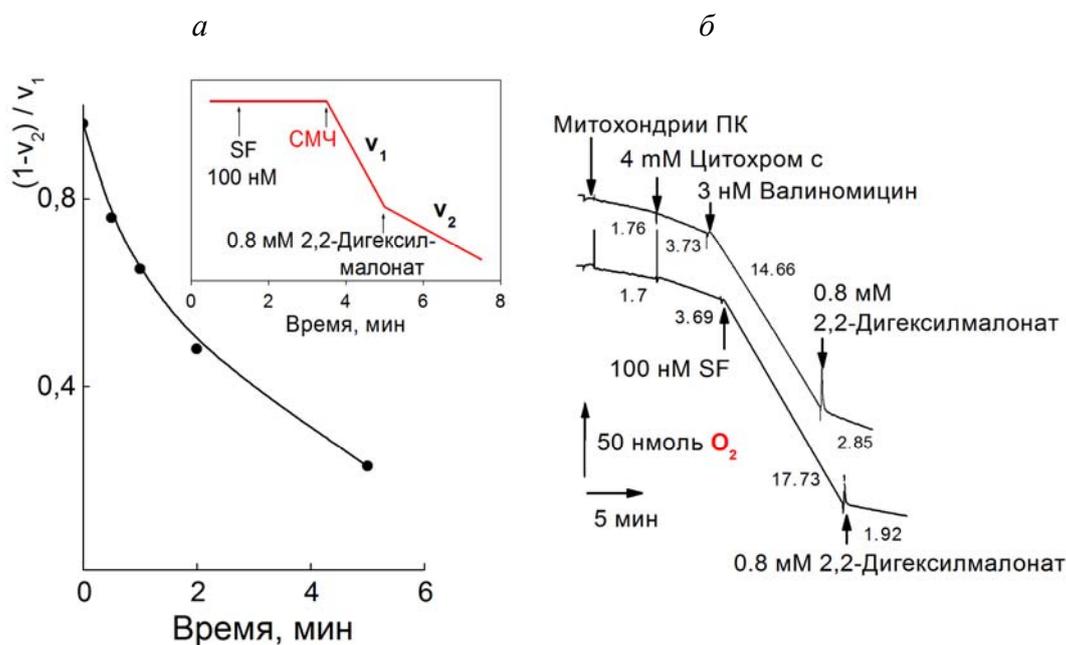


Рис. 2. а - Зависимость относительного ингибирования 2,2-дигексилмалонатом активированного SF окисления сукцината митохондриями ПК от времени их предварительной ультразвуковой обработки (СМЧ) в присутствии цитохрома с. На врезке показан порядок добавления реагентов в среде; v_1 и v_2 - значения скорости дыхания.

б - Окисление сукцината митохондриями ПК без их ультразвуковой обработки в отсутствие цитохрома с, но в присутствии SF (нижняя оксиграмма) или валиномицина (верхняя оксиграмма). Цифры при оксиграммах – скорости окисления в нмоль O₂/мин.

Условия: Среда инкубации СИ2, концентрация митохондрий 0,25 мг белка/мл.

Ранее было показано, что ДКТ и сукцинатдегидрогеназа митохондрий ПК радикально (на 6 порядков) отличаются по чувствительности к этому ингибитору [Шольц и соавт., 1990; Бондаренко и соавт., 1996]. Если пренебречь разницей в степени активации v_4 протонофором SF и валиномицином, то выявляется 12,6%-ая примесь «дефектных» митопластов,

нечувствительных к 2,2-дигексилмалонату. Таким образом, валиномицин в максимально активирующей концентрации (3 нМ) за 14 мин незначительно повреждал митохондрии ПК. Так как максимальный эффект индукторов проницаемости измеряли не дольше 3 мин, то примесь «дефектных» митопластов пренебрегали.

3.1.2. Особенности активации v_4 митохондрий ПК в монокалиевой среде валиномицином и мелиттином.

В качестве агента при измерении калиевого трансмембранного тока (КТТ) в митохондриях ПК выбрали валиномицин. Валиномицин имеет простой механизм индукции КТТ [Овчинников и соавт., 1974] и эффективен в концентрациях, незначительно «возмущающих» мембрану [Gracheva, 1979]. Согласно литературным данным КТТ при избытке K^+ пропорционален концентрации пептида в мембране, т.е. благодаря высокому K_p $((1,25 \pm 0,2) \cdot 10^5$ – общей концентрации в системе).

На Рис. 3а. представлена зависимость относительной активации v_4 митохондрий ПК от концентрации валиномицина в присутствии разных концентрации K^+ (20 и 44 мМ) в среде инкубации. При этом эффектор добавляли к одной порции органелл, а на врезке каждой точке соответствует активации v_4 после однократной добавки пептида. Эта скорость стабильна в течение 2-16 мин (Рис. 3б.).

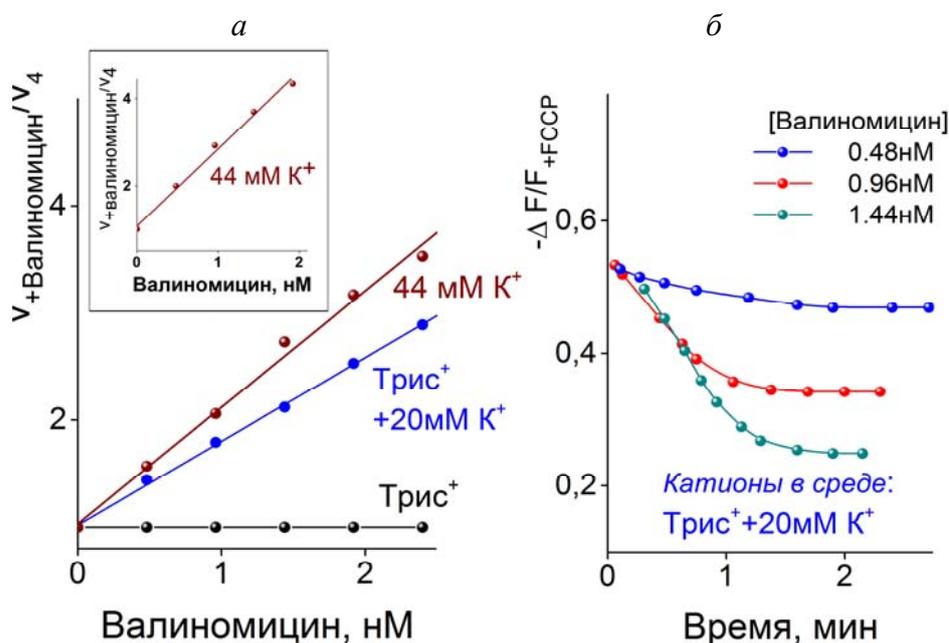


Рис. 3. а - Зависимость активации v_4 митохондрий ПК от концентрации валиномицина (титрование в одной кривой). На врезке суммированы результаты, полученные при однократном добавлении валиномицина к каждой порции митохондрий ПК.

б - Зависимость от времени относительной флуоресценции родамина 123 (пропорциональной $\Delta\psi$ митохондрий ПК).

Условие: а - среды инкубации СИ9, СИ9 + 20 мМ КСІ и СИ5, нижняя, средняя и верхняя зависимость, соответственно. Данные, приведенные на врезке, получены в среде СИ5. Концентрация митохондрий – 0,25 мг белка/мл.

Стационарную активацию v_4 измеряли при стабильном $\Delta\psi$. Причем величины относительной активации v_4 , вызванные 0,48 нМ валиномицином при обеих концентрациях K^+ , отличались на 18%, а соотношение величин $-\Delta F/F$ на 2-ой минуте – на 77%.

Согласно данным, приведенным на Рис. 3а., активация v_4 валиномицином была пропорциональна его концентрации. Мы предположили, что и КТТ пропорционален этой активации. Для проверки этого предположения определили концентрационный порядок реакции, лимитирующей КТТ, индуцированный мелиттином. На Рис. 4а. показано, что относительная активация v_4 митохондрий пептидом стабилизируется на 5-6 мин, синхронно стабилизируется и $\Delta\psi$ (Рис. 4б.). Причем активация v_4 менялась с изменением концентрации пептида более радикально, чем уровень равновесного потенциала. Если относительная активация v_4 митохондрий пропорциональна КТТ, и мелиттин не имеет побочных действий на митохондрии ПК, то концентрационный порядок реакции, лимитирующий v_4 , при действии пептида, должен быть близок к 2. Именно такая величина порядка реакции была определена в модельной системе по скорости вызванного пептидом выхода из липосом репортерного красителя [Takei et al, 1999].

Действительно, определенный по зависимости относительной активации v_4 митохондрий ПК от концентрации мелиттина в среде СИ5 концентрационный порядок активации v_4 составлял 2,16 (среднее – $2,01 \pm 0,15$) (Рис. 5). Благодаря высокому значению K_p для мелиттина [Шольц и соавт., 1980] весь пептид связан с внутренней мембраной органелл, содержащей большую часть их липида.

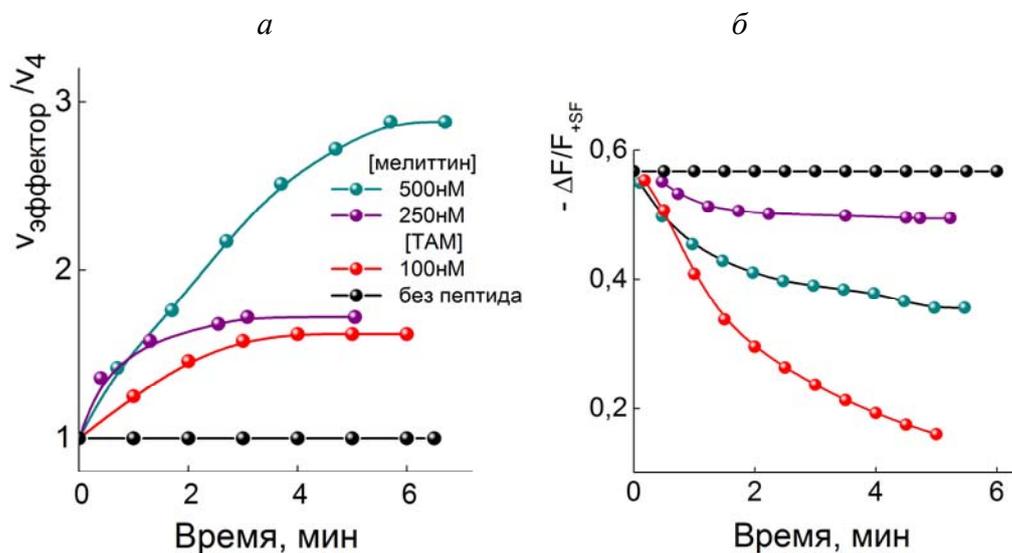


Рис. 4. а - Зависимость от времени активации v_4 митохондрий ПК в присутствии 250 и 500 нМ мелиттина, а также 100 нМ ТАМ.

б - Зависимость от времени относительной флуоресценции родамина 123 (пропорциональной $\Delta\psi$) в присутствии мелиттина и ТАМ.

Условия: Среды инкубации для изучения мелиттина – СИ5, ТАМ – СИ6.

Концентрация митохондрий – 0,25 мг белка/мл.

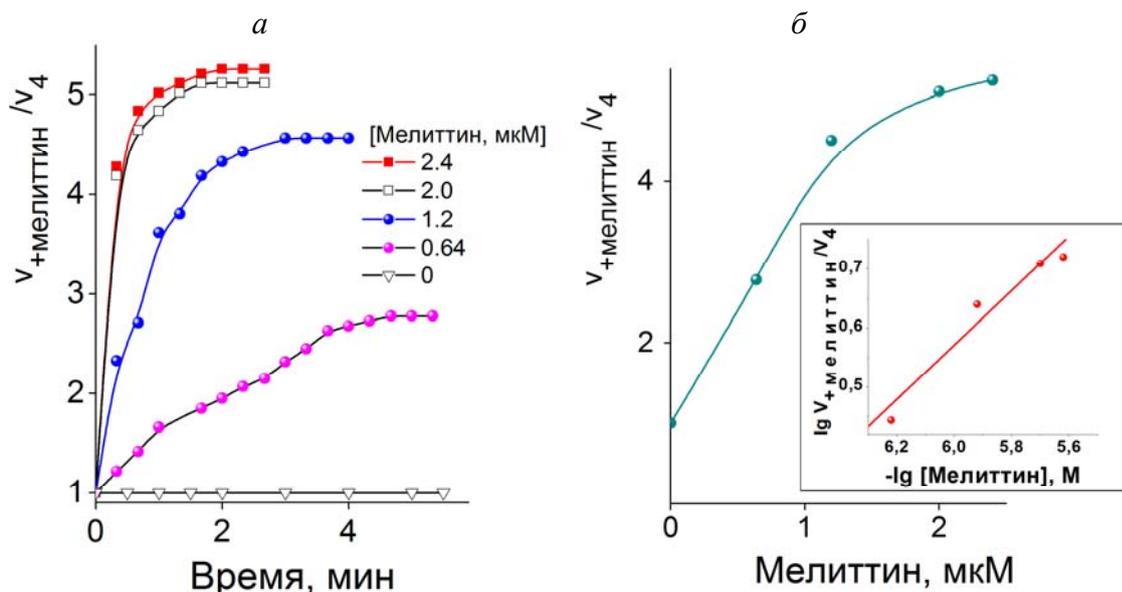


Рис.5. а - Зависимость от времени активации v_4 митохондрий ПК в присутствии различных концентраций мелиттина. б - Зависимость максимальной активации v_4 от концентрации пептида; на врезке эти данные приведены в двойных логарифмических координатах.

Условия: Среда инкубации – СИ5. Концентрация митохондрий – 0,25 мг белка/мл.

Мы показали линейную зависимость активации v_4 от концентрации валиномицина в среде СИ5 и использовали такую линейность, как быстрый тест на пропорциональность активации v_4 митохондрий ПК и КТТ в калий содержащих средах. Линейный характер зависимости от концентрации валиномицина сохранялся вплоть до 4-х кратной активации во всех используемых нами средах инкубации. Таким образом, препарат митохондрий ПК и оксиметр можно использовать как биосенсор КТТ, индуцированного пороформерами во внутренней мембране органелл.

3.2. Непрямые методы измерения трансмембранного транспорта в митохондриях ПК и клетках *S. cerevisiae*.

3.2.1. Сукцинатоксидаза препарата митохондрий ПК в присутствии протонофора (SF) - эндогенная сопряженная система для измерения транспорта интактным ДКТ.

Суммарная активность сукцинатоксидазы митохондрий может определяться в разных условиях и скоростью переноса сукцината через мембрану посредством ДКТ, и активностями сукцинатдегидрогеназы или убихинолксидазы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) (Рис. 6).

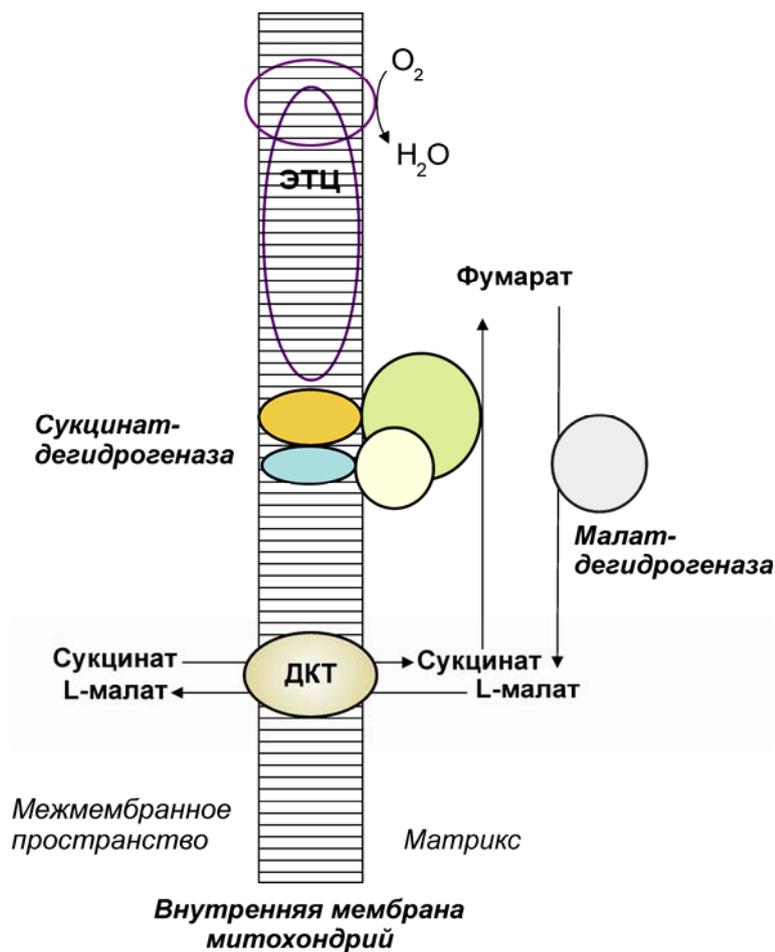


Рис. 6. Транспорт сукцината ДКТ и окисление этого субстрата митохондриями ПК (схема)

Специфический ингибитор лимитирующего звена ферментативной цепи должен показывать линейную зависимость в координатах Диксона. Лимитирующим звеном сукцинатоксидазы митопластов, обедненных по цитохрому с, являлась убихинолоксидаза. На Рис. 7 (нижняя кривая) показано отклонение от линейной зависимости для бутилмалоната (специфического ингибитора ДКТ). В присутствии избытка экзогенного цитохрома с линейность восстанавливалась (Рис. 7, верхняя кривая) и становилась такой же, как у интактных митохондрий. На Рис. 8 показано действие на митохондрии специфического ингибитора ДКТ (но не сукцинатдегидрогеназы) О-лауроил-L-малата. Плато на верхней кривой в присутствии низкой (пороформирующей) концентрации грамицидина S свидетельствует о появлении 50%-ой нечувствительности сукцинатоксидазы к ингибитору (и попадании сукцината в митохондрии, минуя переносчик). Разбавитель SF предотвращал вызванное грамицидином S набухание митохондрий, а 3 мМ сукцинат обеспечивал ненасыщенность по субстрату ДКТ, но не сукцинатдегидрогеназы ($K_M = 1$ мМ [Passarella and Quagliariello, 1976] и 0,1 мМ [Шольц и соавт., 1990], соответственно). В присутствии 10 мМ сукцината, «насыщающего» и переносчик, и сукцинатдегидрогеназу, грамицидин S, «шунтирующий» ДКТ на 50%, увеличивал активность сукцинатоксидазы митохондрий на 15%.

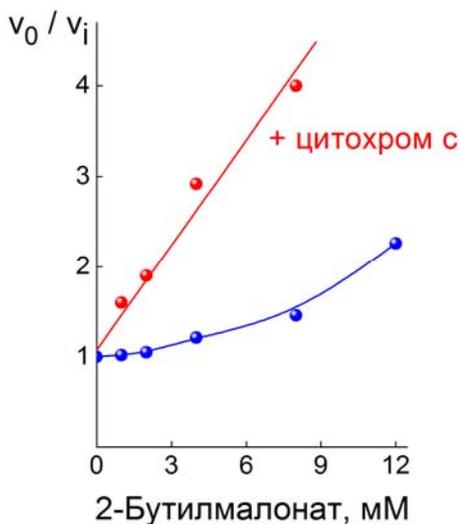


Рис. 7. Зависимость скорости окисления 10 мМ сукцината натрия митохондриями ПК, частично обедненными по цитохрому с, от концентрации 2-бутилмалоната в координатах Диксона в присутствии и в отсутствие 4 мкМ цитохрома с, верхняя и нижняя кривые, соответственно.

Условия: Среда инкубации СИ4.

Концентрация митохондрий – 0,5 мг белка в 1 мл.

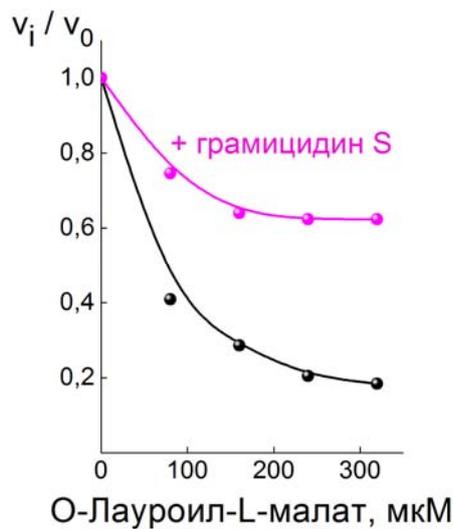


Рис. 8. Зависимость относительной скорости окисления 3 мМ сукцината натрия митохондриями ПК от концентрации О-лауроил-L-малата в присутствии 4 мкМ цитохрома с и 2,25 мкМ грамицидина S, а также в отсутствие этого пороформера, верхняя и нижняя кривые, соответственно.

Условия: Среда инкубации СИ3.

Концентрация митохондрий – 0,2 мг белка в 1 мл.

При 100%-ом шунтировании можно было бы оценить величину, на которую суммарная активность сукцинатдегидрогеназы и убихинолоксидазы выше активности ДКТ ($15\% \times 2 = 30\%$). Таким образом, ЭСС митохондрий ПК имела два признака хорошей сопряженной системы для измерения трансмембранного транспорта сукцината: на порядок меньшую K_M и активность ЭТЦ большую, чем измеряемая с ее помощью транспортная.

В СИ2 в присутствии SF величина K_M по сукцинату составляла $1,01 \pm 0,21$ мМ, а бутилмалонат ингибировал сукцинатоксидазу с величиной $K_i = 0,17 \pm 0,025$ мМ. Эти величины близки к результатам, полученными прямым методом измерения транспорта сукцината ($K_M = 1,17$ мМ [Passarella and Quagliariello, 1976], $K_i = 0,15$ мМ [Meijer, 1981]).

При изучении влияния эффекторов на транспорт сукцината проверяли отсутствие их побочного действия на компоненты ЭСС. Известно, что все 2-моно- и 2,2-диалкилмалонаты ингибируют сукцинатдегидрогеназу более чем на порядок эффективнее, чем ДКТ [Шольц и соавт., 1990]. Выход на плато в присутствии грамицидина S (см. Рис. 8) означает, что О-ацил-L-малаты или не проникают в матрикс митохондрий к сукцинатдегидрогеназе, или действует на нее слабее, чем на ДКТ. Согласно теории действия протонофоров в сопрягающих мембранах [Terada, 1990], если амфифильная кислота (в наших опытах – ингибитор) в некотором интервале концентраций проникает через замкнутую мембрану, то она – протонофор в этом интервале.

Для всех амфифилов-ингибиторов, использованных в наших исследованиях на митохондриях ПК, было показано, что они являются слабыми протонофорами, величина A_{200} (концентрация пептида, активирующая v_4 на 200%) от 2,5 до 1000 раз превышает I_{50} конкурентного ингибирования сукцинатоксидазы этих митохондрий, т.е. в зоне ингибирования эффекторы не проникали в митохондрии и действовали на ДКТ только с цитоплазматической стороны. A_{200} измеряли по активации в 2 раза окисления 3-оксибутирата митохондриями ПК в 4-ом состоянии. Для типичных представителей (2-додецилмалоната, О миристоил-L-малата и 1,11-ундецилендималоната) 3-х исследованных рядов соединений показано, что они почти не ингибируют 3-оксибутиратоксидазу митохондрий, а, следовательно, и убихинолксидазу ЭТЦ.

3.2.2. Эндогенная сопряженная система клеток для изучения транспорта сукцината и пирувата через плазмалемму *S. cerevisiae*.

Генетическая характеристика штаммов *S. cerevisiae*. Свидетельством принадлежности штаммов к виду *S. cerevisiae* была показана методами молекулярной биологии [Naumov et al., 2000; Наумова и соавт., 2007]. Сравнение относительного содержания ДНК в клетках разных штаммов, в т.ч. гаплоидных, диплоидных и тетраплоидного штамма составило 1,0, 1,75, и 3,5, соответственно. Тетраплоиды обладают большими, чем у диплоидов активностями систем окисления субстратов [Galitski et.al, 1999], поэтому система окисления сукцината в клетках тетраплоидного штамма удобна для изучения в качестве ЭСС измерения транспорта этого субстрата через плазмалемму.

Подбор условий для измерения низкой скорости окисления сукцината. Для измерения скорости транспорта субстрата в клетки *S. cerevisiae* использовали сопряженную систему (далее сукцинатоксидазу клеток), представляющую собой митохондрии клеток, окисляющие перенесенный в цитоплазму субстрат (Рис. 9). Сукцинатоксидаза клеток состояла из предполагаемого переносчика ДКБ плазмалеммы, ДКТ митохондрий, сукцинатдегидрогеназы и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы. Однако такие клетки имели высокий уровень эндогенного (фонового) дыхания (v_e). Аэробная преинкубации при 0°C густой суспензии клеток, отмытых при температуре 0°C (см. материалы и методы), через 9-25 ч приводила к радикальному уменьшению такого дыхания (сравнить кривые в присутствии и в отсутствие сукцината на Рис. 10а.).

Скорость дыхания клеток в присутствии сукцината за вычетом v_e между 9-м и 25-м часом практически не менялась (см. Рис. 10б.). Это свидетельствует о том, что снижение v_e , а также скорости окисления пирувата и глюкозы (Рис. 10а.) не связано с гибелью клеток в ходе преинкубации. Антимидин А (ингибитор убихинолксидазы митохондрий) полностью подавлял дыхание на сукцинате, глюкозе и пирувате, поэтому митохондриальные окислительные системы – это единственный путь окисления этих субстратов в клетке в условиях наших опытов.

Эквивалентность прямого и непрямого метода измерения транспорта пирувата в клетку *S. cerevisiae*. Измерение транспорта сукцината в клетку *S. cerevisiae* прямыми методами затруднено. Поэтому для сопоставления результатов, полученных прямым и непрямым методами, исследовали транспорт пирувата через плазмалемму *S. cerevisiae*.

В клетках штамма Y-503, выращенных в течение 12 ч в синтетической среде, v_e стабилизировалась уже через полтора часа (Рис. 11а., верхняя оксиграмма). Ферментативную систему окисления пирувата в клетках, окисляющую перенесенный в цитоплазму субстрат (Рис. 9), далее называли пируватоксидазой клеток. Стабильная скорость окисления пирувата устанавливалась через 6 мин и сохранялась в течение 11 мин (Рис. 11а., средняя оксиграмма). Это позволило измерить скорость дыхания в присутствии 4-х концентраций пирувата в одной оксиметрической кривой (Рис. 11а., нижняя оксиграмма). Начиная со второй добавки, стационарная скорость окисления пирувата стабилизировалась в течение 1,5 мин. Скорость пируватоксидазы в присутствии 4 мМ пирувата не зависела от времени преинкубации дрожжей в течение 4-х часов (Рис. 11б. плато на нижней кривой). В то же время скорость с насыщающей концентрацией субстрата (20 мМ) неуклонно снижалась (Рис. 11б., верхняя кривая).

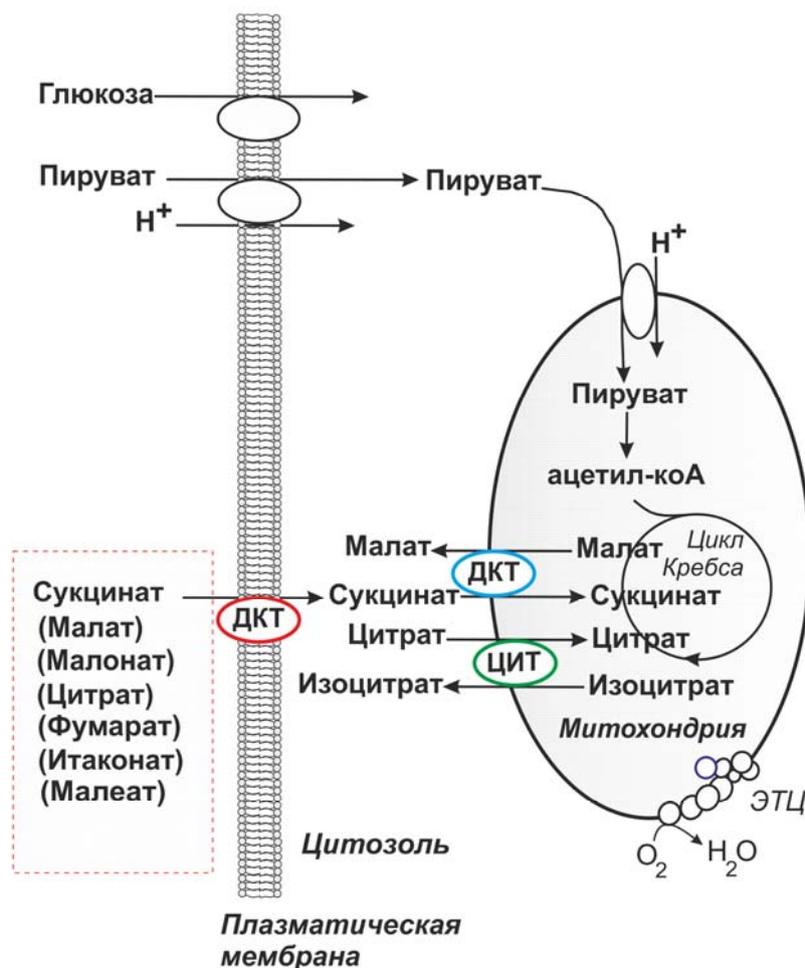


Рисунок 9. Транспорт и окисление субстратов транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* (схема).

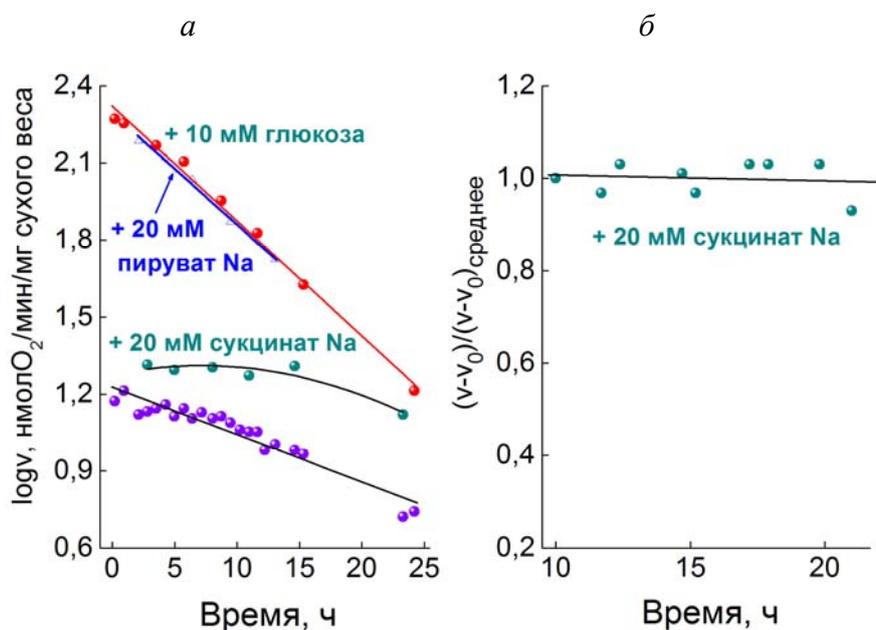


Рис. 10. а – Зависимость скорости окисления клетками *S. cerevisiae* 10 мМ глюкозы, 24 мМ пирувата натрия, 20 мМ сукцината натрия и в отсутствие экзогенных субстратов (v_0) при 30°C от времени аэробной преинкубации при 0°C.

б – Изменение относительной скорости окисления 20 мМ сукцината натрия в ходе аэробной преинкубации при 0°C.

Условия: Среда инкубации 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5). Концентрация клеток – 5 мг/мл.

Обработка нижней оксиграммы из Рис. 11а. в координатах Лайнуивера-Берка позволила рассчитать значения $V_{\max} = 25$ нмоль O_2 /мин и $K_M = 4,2$ мМ (средняя из трех опытов – $5,2 \pm 1,0$ мМ). Эта величина близка к измеренной прямым методом для монокарбоксилатного H^+ -симпортера плазмалеммы *S. cerevisiae* ($K_M = 5,6$ и $4,1$ мМ при рН 4,0 и 6,0, соответственно [Akita et al., 2000]). Аналогично на клетках после 6 ч преинкубации при 0°C рассчитанная величина K_M составляла $1,19 \pm 0,23$ мМ. Эта величина близка к величине K_M для монокарбоксилатного переносчика митохондрий (0,8 мМ [Nałęcz et al., 1991]). Таким образом, чтобы кинетические параметры транспорта в клетку внешнего окисляемого субстрата, измеренные прямым и косвенным (по скорости окисления) способом, совпадали, требуется соблюдение нескольких условий. Активность эндогенной оксидазы не должна меняться от опыта к опыту, v_e в ходе измерения должна быть стабильной, скорость окисления транспортируемого субстрата в лимитирующих по переносчику плазмалеммы условиях должна сохраняться постоянной. В таких условиях скорость окисления экзогенного субстрата определяется скоростью его транспорта через плазмалемму. Этот подход мы применили к неизученному ранее транспортеру сукцината плазмалеммы *S. cerevisiae*, а также к изученному прямым методом монокарбоксилатному транспортеру *S. cerevisiae* [Akita et al., 2000]. Стабильные в течение длительного времени скорости эндогенного дыхания и окисления сукцината в присутствии и отсутствие непроникающего ингибитора Опальмитоил-L-малата (Рис. 12а., верхняя и нижняя оксиграммы, соответственно) позволили получить зависимости скоростей дыхания от концентраций субстрата и ингибитора на одной оксиграмме (Рис. 12б.).

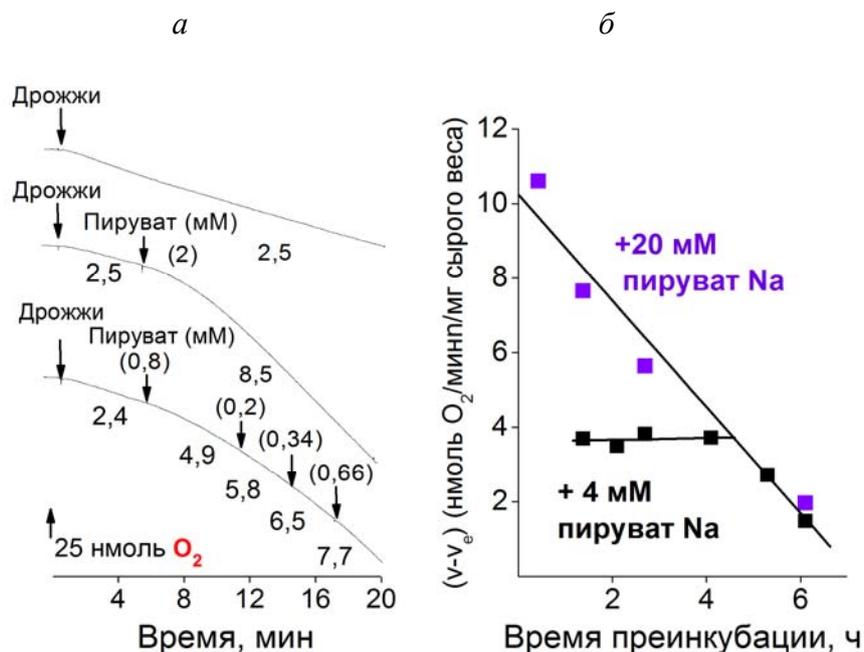


Рис. 11. а – Поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae* в отсутствии и в присутствии пирувата натрия. Цифры при оксиграммах – скорости окисления в нмоль O₂ /мин. Время аэробной преинкубации клеток при 0°C – 1,4, 2,1 и 2,7 ч (верхняя, средняя и нижняя оксиграмма, соответственно).

б - Зависимость скорости окисления 4 мМ или 20 мМ пирувата натрия клетками *S. cerevisiae* от времени их аэробной преинкубации при 0°C.

Условия: Среда инкубации – 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5). Концентрация клеток – 1,5 мг/мл.

Обработка результатов, приведенных на оксиграмме (Рис. 12б.) в координатах Лайнуивера-Берка и Диксона, соответственно, позволила рассчитать величины K_M (5,6 мМ), V_{max} (4,17 нмоль O₂/мин) и I_{50} для О-пальмитоил-L-малата (37,3 мкМ). Линейная зависимость этого ингибирования сукцинатоксидазы клеток в координатах Диксона свидетельствует о его действии на лимитирующее звено ЭСС и о связывании ингибитора с ней в одной точке. В отдельных экспериментах было показано, что пермеабиллизация мембран ДМСО не повлияла на накопление клетками протонофоров (SF и FCCP), поскольку они свободно распределяются по мембранам неповрежденной клетки [Beauvoit et al., 1991], но существенно увеличивала стационарное накопление О-пальмитоил-L-малата, который, по-видимому, не проникает в неповрежденную клетку. Таким образом, транспорт сукцината через плазмалемму является лимитирующим звеном сукцинатоксидазы клеток.

Линейность ингибирования в координатах Диксона и одинаковые величины K_M имели место во всех опытах, когда сукцинатоксидаза была максимально активирована и не зависела от дальнейшей преинкубации клеток при 0°C (плато на Рис. 10б.). Можно утверждать, что сукцинатоксидаза лимитировалась транспортом через плазмалемму при линейности ингибирования в координатах Диксона.

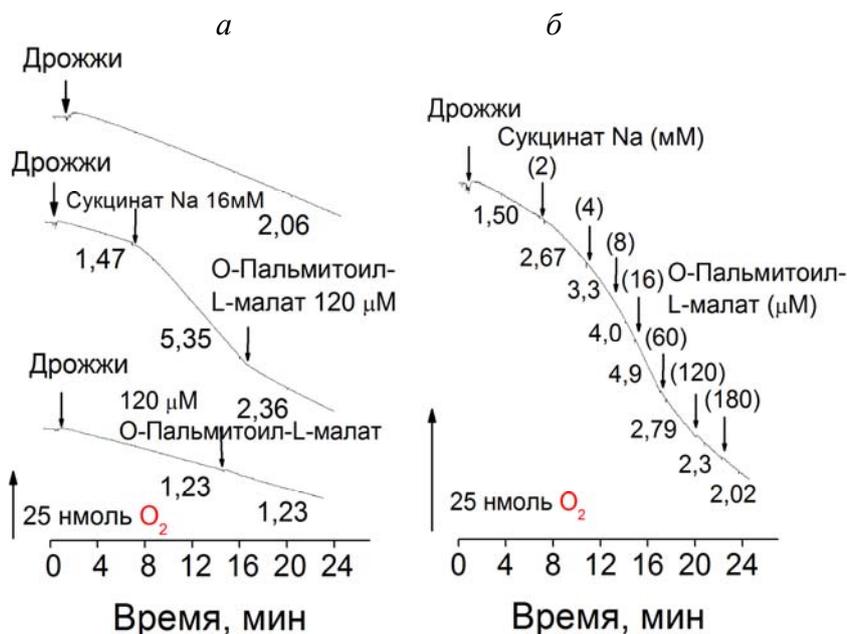


Рис. 12. Поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae*. *a* - в отсутствие эфффекторов (верхняя оксиграмма), в присутствии 16 мМ сукцината натрия и 120 мкМ О-пальмитоил-*L*-малата (средняя оксиграмма) и в присутствии только О-пальмитоил-*L*-малата (нижняя оксиграмма). Цифры при оксиграммах – скорости окисления в нмоль O₂/мин. Время аэробной преинкубации клеток при 0°С – 17,5, 18 и 20 ч (верхняя, средняя и нижняя оксиграмма, соответственно).

б – Поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae* при последовательном добавлении сукцината и О-пальмитоил-*L*-малата. Время аэробной преинкубации клеток при 0°С – 18,5 ч. Условия: Среда инкубации – 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5). Концентрация клеток – 5 мг/мл.

Непроницаемость плазмалеммы для ингибиторов транспорта. Использование пермеабилзации дрожжей для оценки способности амфифильного эфффектора проникать в клетку занимает много времени. Тестом на протонифорную активность (и, соответственно, проницаемость) эфффектора в клетках *S. cerevisiae* и деэнергизацию плазмалеммы может быть ингибирование монокарбоксилатного H⁺-симпортера плазмалеммы [Akita et al., 2000], а, следовательно, пируватоксидазы клеток. Величина *I*₅₀ ингибирования пируватоксидазы протонифором FCCP (Рис. 13а., нижняя кривая) была примерно в 5 раз ниже величины *A*₅₀ активации им ферментативного пути окисления глюкозы (далее – глюкозооксидазы). FCCP активировал глюкозооксидазу клеток *S. cerevisiae* (Рис. 13а., верхняя кривая). Сходное соотношение *A*₅₀/*I*₅₀ (равное 4), получили для протонифора SF с другой химической структурой, т.е. подавление пируватоксидазы связано именно с протонифорностью эфффектора, а не иным ингибирующим действием.

Для изучения транспорта сукцината через плазмалемму использовали две группы (гомологических ряда) соединений: 2-алкилмалонаты и О-ацил-*L*-малаты. Их неспособность проникать в клетки в зоне концентраций, вызывающих 99% подавление сукцинатоксидазы (*I*₉₉), была проверена с помощью «протонифорного» теста для крайних членов этих рядов: О-лауроил-*L*-малата, О-стеароил-*L*-малата, 2-пентилмалоната, 2-пентадецилмалоната (Рис. 14б.). 2-Ундецилмалонат – наиболее эфффективный ингибитор из тех, действие которых не зависит от количества дрожжевых клеток.

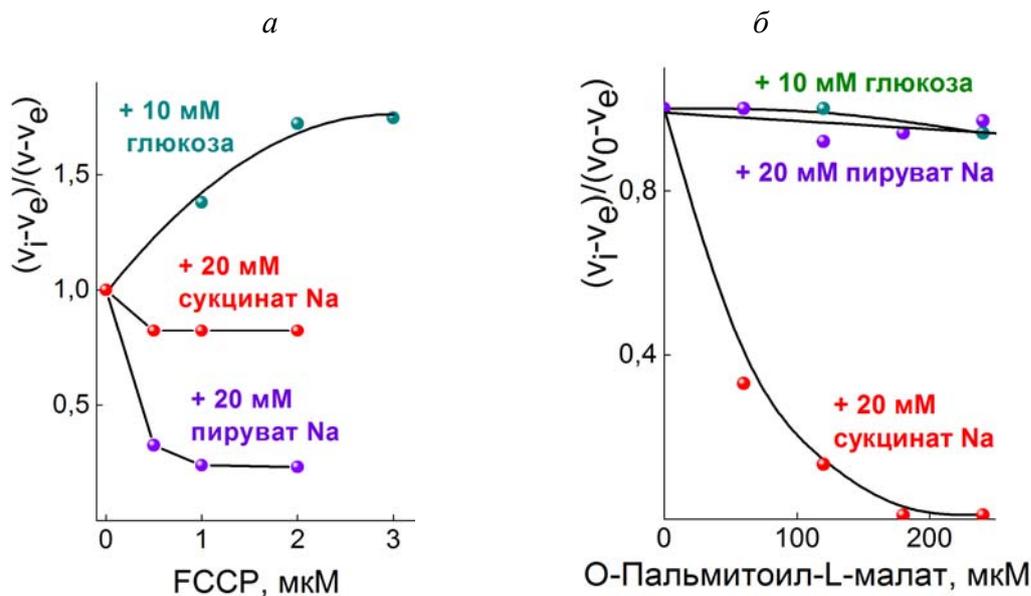


Рис. 13. а – Зависимость относительной скорости окисления 10 мМ глюкозы, 20 мМ сукцината натрия и 20 мМ пирувата натрия клетками *S. cerevisiae* от концентрации FCCP.

Аэробная преинкубация клеток при 0°С – 10 - 14 ч. Субстрат добавляли после протонофора. Скорости окисления в присутствии FCCP, сукцината натрия, пирувата натрия и глюкозы стабилизировались соответственно через 3, 4, 10 и 2 мин после добавления эффектора (зависимости от времени не приведены).

Условия: Среда инкубации – 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5). Концентрация клеток – 10 мг/мл.

б – Зависимость относительной скорости окисления клетками *S. cerevisiae* 10 мМ глюкозы, 20 мМ пирувата натрия и 20 мМ сукцината натрия от концентрации О-пальмитоил-L-малата.

Аэробная преинкубация клеток при 0°С – 10 - 14 ч.

Условия: Среда инкубации 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5). Концентрация клеток – 5 мг/мл.

Из Рис. 14а. видно, что при 99% ингибировании (I_{99}) сукцинатоксидазы клеток дрожжей пируватоксидаза не подавлялась ни при рН 5,5, ни при рН 6,5. Характерное для действия протонофора на пируватоксидазу клеток *S. cerevisiae* резкое снижение дыхательной активности при небольшом увеличении его концентрации (Рис. 13а., нижняя кривая) наступало при концентрациях 2-ундецилмалоната, существенно превышающих эту I_{99} (Рис. 14а.). Доля незаряженной протонированной формы 2-ундецилмалоната [Evtodienko et al., 1999], способной проникать через бислой, снижается с увеличением значений рН от 5,5 до 6,5, и вполне ожидаемым выглядит подавление пируватоксидазы при вдвое больших концентрациях этого алкилмалоната при рН 6,5.

Если ингибиторы транспорта сукцината через плазмалемму не проникают в клетку к митохондриям (Рис. 9), то побочные действия этих ингибиторов на сопряженную систему гарантированно отсутствуют.

Используя препараты митохондрий *S. cerevisiae*, мы получили дополнительное свидетельство непроницаемости плазмалеммы клеток для амфифильных ингибиторов транспорта сукцината. О-Пальмитоил-L-малат и О-миристоил-L-малат подавляли окисление сукцината в митохондриях гораздо более эффективно, чем в клетках (Таблица 1).

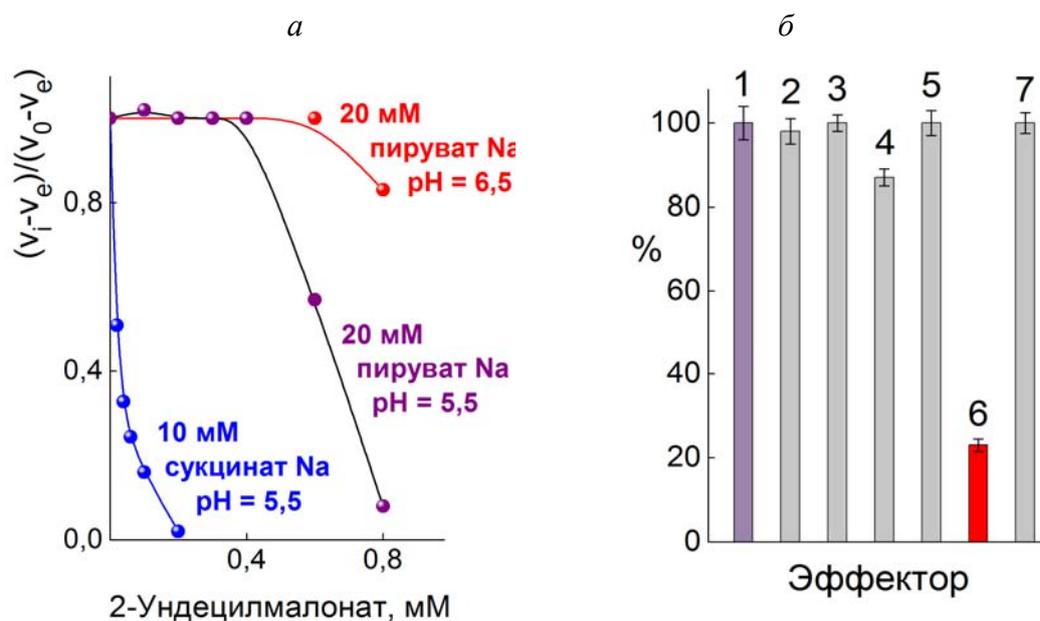


Рис. 14. *a* – Зависимость относительной скорости окисления клетками *S. cerevisiae* 20 мМ пирувата натрия при pH 6,5, 20 мМ пирувата натрия при pH 5,5, 20 мМ сукцината натрия при pH 5,5 (верхняя, средняя и нижняя кривые, соответственно) от концентрации 2-ундецилмалоната.

Условия: Среда инкубации 50 мМ натрий - фосфатный буфер. Концентрация клеток – 5 мг/мл.

б – Активность пируватоксидазы клеток в отсутствие эффе́ктора (1) и в присутствии 8 мМ 2-пентилмалоната (2), 4 мкМ 2-пентадецилмалоната (3), 600 мкМ О-лауроил-L-малата (4), 40 мкМ О-стеароил-L-малата (5), 1 мкМ FCCP (6), 250 мкМ О-пальмитоил-L-малата (7). Концентрация пирувата натрия – 20 мМ.

Для измерения окисления пирувата натрия клетки аэробно преинкубировали при 0°С 2 - 4 ч, а для окисления сукцината натрия – 10 - 14 ч.

Условия: Среда инкубации 50 мМ калий - фосфатный буфер (pH 5,5). Концентрация клеток – 1,7 мг/мл.

Таблица 1. Константы конкурентного ингибирования транспорта ДКБ ацильными производными L-малата в плазмалемме и митохондриях *S. cerevisiae*.

Ингибитор	K_i сукцинатоксидазы клеток (мкМ), 50 мМ калий - фосфатный буфер (pH 5,5)	K_i сукцинатоксидазы митохондрий (мкМ), среда СИ1 (pH 6,5)
О-пальмитоил-L-малат	$3,1 \pm 1,2$	$0,24 \pm 0,10$
О-миристоил-L-малат	$75,9 \pm 24,1$	$6,7 \pm 0,30$

3.3. Характеристики пороформеров: аламетицина и мастопарана в сопрягающей мембране интактных митохондрий ПК.

3.3.1. Природа стадии, лимитирующей активацию v_4 митохондрий ПК мелиттином, мастопараном и тетраацетилмелиттином (ТАМ).

Известно, что мелиттин, мастопаран и ТАМ образуют крупноразмерные поры [Huang, 2009, Matsuzaki, et al., 1997, Stankowski et al., 1991]. Следовательно, величина пор всех трех пептидов не должна ограничивать подвижность K^+ и Li^+ . Если бы индуцированная мелиттином проводимость определялась скоростью прохождения катионов через пору, то соотношение степеней активации v_4 в монокалиевой и монокатионной средах было бы близко к соотношению чисел переноса этих катионов в растворе при 35 мМ концентрации катиона

при 25°C (1,53), согласно справочным данным [Тимофеева и соавт., 2003]. Однако средние значения этого соотношения для мелиттина и мастопарана составляли соответственно 1,09 (среднее – $1,12 \pm 0,03$) (Рис. 15а.) и $1,18 \pm 0,02$ (данные не приведены). Это свидетельствует о том, что активацию v_4 (и КТТ) мелиттином и мастопараном лимитирует стадия, предшествующая порообразованию. Для мелиттина на липосомах показано, что формирование поры лимитируется предпоровыми стадиями [Takei et al., 1999]. Для мастопарана такие данные в литературе отсутствуют. Согласно Рис. 15б., среднее соотношение степеней активации v_4 в монокалиевой и монокатионной средах для ТАМ составляло 1,4. По-видимому, для ТАМ лимитирующей стадией является порообразование, при этом $\Delta\psi$ в области стабилизированной активации v_4 в монокатионной и монокалиевой средах можно считать практически неизменным (Рис. 15в,г.).

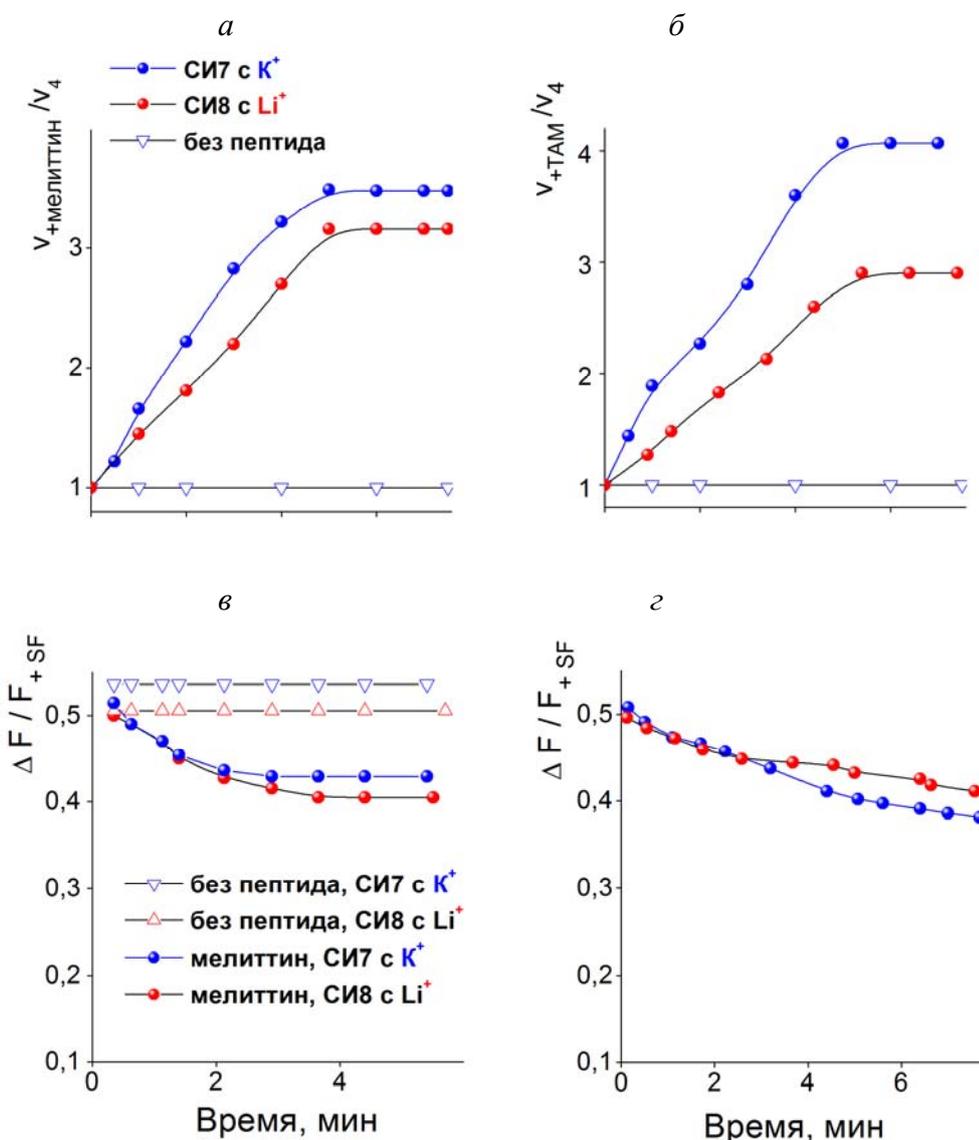


Рис. 15. Зависимость от времени активации v_4 митохондрий ПК в присутствии 500 нМ мелиттина (а) и 100 нМ ТАМ (б) и соответствующая зависимость относительной флуоресценции родамина 123 (пропорциональной $\Delta\psi$ митохондрий ПК) (в, г).
Условия: Среды инкубации – СИ7 и СИ8. Концентрация митохондрий – 0,25 мг белка/мл.

3.3.2. Измерение концентрационного порядка реакции, лимитирующей КТТ, индуцированный мастопараном в митохондриях ПК.

Использование модели, основанной на вытекании репортерного красителя из липосом, сформулированной для мелиттина, для мастопарана затруднено [Cabrera et al., 2008], так как время существования поры существенно меньше, чем временная шкала измерения скорости вытекания красителя. Рассчитанный аналогично мелиттину (см. раздел. 3.1.2, Рис. 5б.) концентрационный порядок для мастопарана составлял $1,83 \pm 0,23$. Это позволяет предположить, что аналогично мелиттину предпора, лимитирующая стадия порообразования мастопарана – димер. При действии мастопарана, так же, как и мелиттина, имеет место синхронная со стабилизацией активированного дыхания стабилизация $\Delta\psi$ митохондрий ПК.

3.3.3 Природа двуфазной зависимости от времени активации v_4 митохондрий ПК аламетицином.

Зависимость активации v_4 под действием аламетицина имеет 2 стационарных участка (Рис. 16а.). На Рис. 17а. видно, что в монотрисовой среде первая фаза, по-видимому, отражающая проводимости пор с наименьшей олигомерностью, отсутствует, а после добавления в среду KCl она появляется. На БЛМ было показано, что низшее субсостояние исчезает из флуктуации проводимости одиночного канала, индуцированного пептидом, в средах, содержащих только Tris^+ или Ca^{2+} [Hanke and Boheim 1980]. В качестве своеобразного контроля исследовали активацию v_4 митохондрий ПК под действием ТАМ, образующего поры, которые не “самоорганизуются” с помощью последовательного присоединения мономеров.

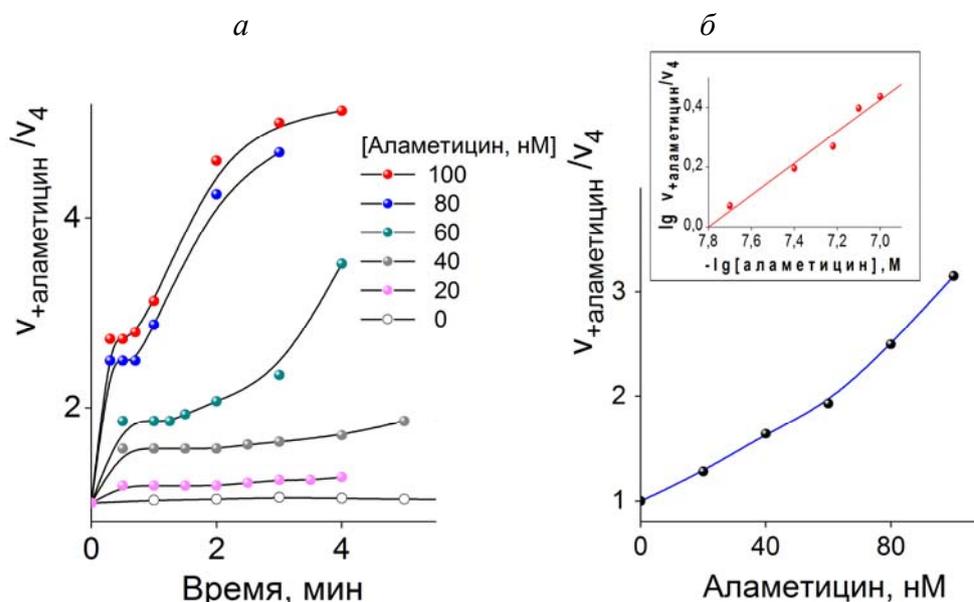


Рис. 16. а - Зависимость от времени активации v_4 митохондрий ПК в присутствии различных концентраций синтезированного аламетицина.

б - Зависимость максимальной скорости в первой фазе этой активации от концентрации пептида; на врезке эти данные приведены в двойных логарифмических координатах.

Условия: Среда инкубации – СИ6. Концентрация митохондрий – 0,25 мг белка/мл.

На врезке на Рис. 17 показан, что кривая активации v_4 200 нМ ТАМ в монотрисовой среде имеет однофазный характер. Поскольку гидратированный диаметр присутствующего в средах инкубации Mg^{2+} больше, чем таковой Ca^{2+} [Laatikainen et al., 2007], он не проникает в митохондрии через низкоолигомерные поры аламетицина. В его присутствии синхронная к оксиграмме зависимость для $\Delta\psi$ (Рис. 17б.) неуклонно снижалась, что согласуется с литературными данными [Duclohier, 2001; Woolley, 2007] о том, что именно порообразование лимитируют трансмембранный ток.

3.3.4. Измерение концентрационного порядка реакции, лимитирующей КТТ, индуцированный аламетицином в первой фазе активации v_4 митохондрий ПК.

K_p аламетицина, равный $(0,76 \pm 0,01) \times 10^3$, позволяет нам считать практически весь добавленный аламетицин находящимся в водной фазе, а небольшое количество мембраносвязанного пептида (от 5 до 20%) пропорциональным его общей концентрации.

Согласно данным на Рис. 16б., концентрационный порядок реакции равен 1,86. Уменьшение протяженности 1-го стационарного участка с возрастанием концентрации пептида (Рис. 16а.) хорошо согласуется с увеличением доли высокоолигомерных агрегатов, диаметр (и соответственно, проводимость) которых выше. Соотношение проводимостей каналов аламетицина с разной степенью олигомерности составляет 1:4:20:45:75:110 [Hanke and Voheim, 1980], при этом даже небольшая примесь высокоолигомерного канала резко увеличивает проводимость и 1-я фаза активации v_4 митохондрий маскируется 2-ой.

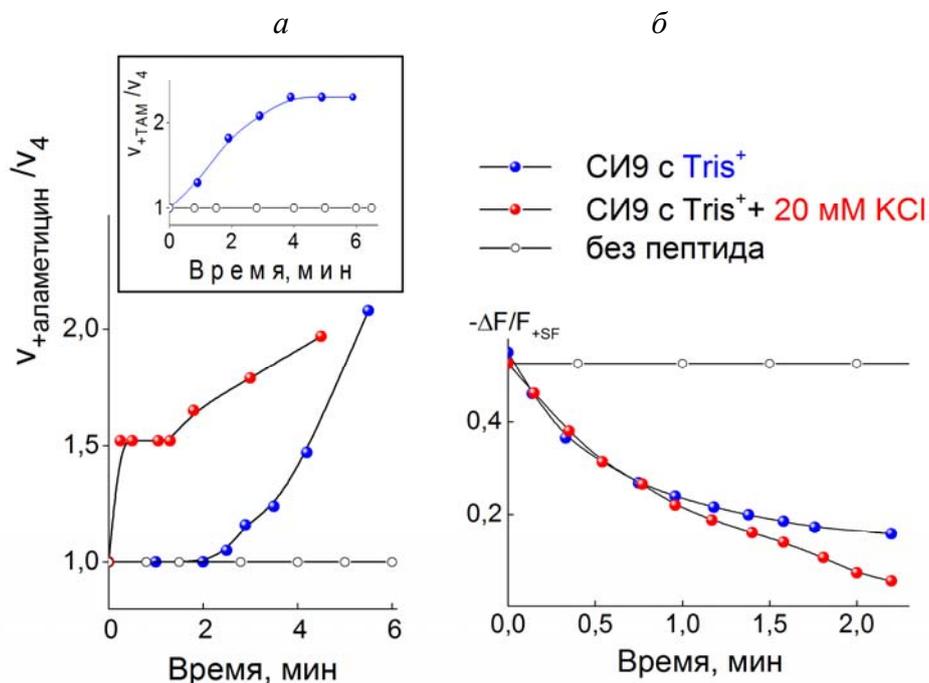


Рис. 17. а – Зависимость от времени активации v_4 митохондрий ПК 110 нМ аламетицином в присутствии и в отсутствие 20 мМ KCl;

б – соответствующая зависимость относительной флуоресценции родамина 123 (пропорциональной $\Delta\psi$ митохондрий ПК).

На врезке – Зависимость от времени относительной активации v_4 митохондрий ПК 200 нМ ТАМ в отсутствие KCl.

Условия: Среда инкубации – СИ9. Концентрация митохондрий – 0,25 мг белка/мл.

3.3.5. Природа стадии, лимитирующей первую фазу активации v_4 митохондрий ПК аламетицином

По данным Рис. 18а., среднее соотношение активаций v_4 в монокалиевой и монолитиевой средах составляет 1,35. На рис. 18 б. видно, что $\Delta\psi$ в этих средах в каждый момент времени отличается, и для расчета соотношения активаций их приводили к значению при одинаковом $\Delta\psi$ согласно закону Фарадея (детали см. Материалы и методы).

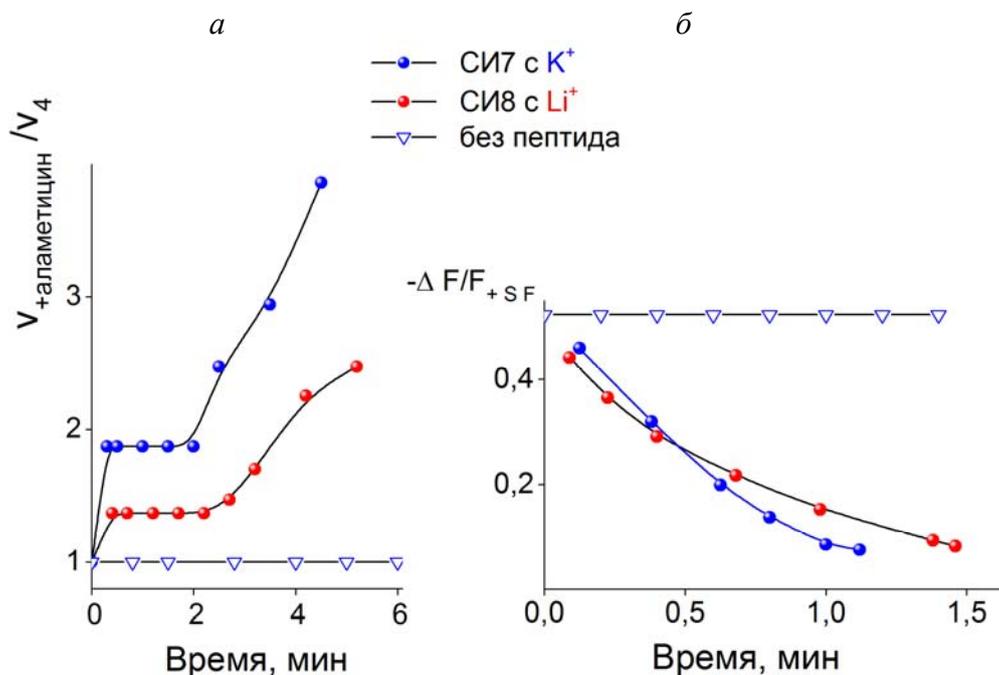


Рис. 18. а – Зависимость от времени активации v_4 митохондрий ПК в присутствии 110 нМ синтетического аламетицина;

б – соответствующая зависимость относительной флуоресценции родамина 123 (пропорциональной $\Delta\psi$ в митохондриях ПК),

Условия: Среда инкубации – СИ7 и СИ8. Концентрация митохондрий – 0,25 мг белка/мл.

Усредненное «исправленное» соотношение составило 1,59, что весьма близко к соотношению подвижностей K^+ и Li^+ в средах инкубации (1,53, см. 3.1.1). В модельных системах порообразование аламетицина лимитирует собственно образование каналов и все каналы, как и в наших экспериментах, свободно проницаемы для K^+ и Li^+ [Woolley, 2007]. Близость справочных величин с величинами, определенными предлагаемым нами методом, можно рассматривать как свидетельство корректности использования препарата митохондрий ПК в качестве биосенсора для измерения КТТ.

3.4. Новый транспортер дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* и его энзимологическая характеристика.

До настоящей работы было принято считать, что в плазмалемме *S. cerevisiae* отсутствует опосредованная белком система транспорта C_4 -дикарбоксилатов [Lodi et al., 2004]. При pH 3,0 был показан только транспорт L-малата, опосредованный диффузией его непротонированной формы [Salmon, 1987]. Клетки тетраплоидного штамма Y-503 окисляли сукцинат при pH 5,5 (Рис. 12б.), когда доля его протонированной формы мала. Аналогичные

данные были получены нами и на стандартном для генетических исследований (<http://www.yeastgenome.org>) штамме S288с. Гиперболическая зависимость окисления клетками сукцината от его концентрации (Рис. 12а.) и его подавление специфическим ингибитором пальмитоилмалатом (Рис. 12б.), непроникающим в клетку (см. раздел 3.2.2), предполагает существование в плазмалемме специфического сукцинатного транспортера. Он в отличие от переносчиков *P. tannophilus* [Harrod et al., 1997] или *C. utilis* [Cássio et al., 1993] не нуждается в индукции малатом, поскольку было показано окисление сукцината клетками *S. cerevisiae*, выращенными в безмалатной синтетической среде (данные не приведены).

Субстратную специфичность переносчика плазмалеммы *S. cerevisiae* исследовали на клетках в условиях, лимитирующих транспорт сукцината через плазмалемму. Максимальная скорость окисления L-малата составляла не более 13% от таковой сукцината и постепенно уменьшалась в 6 – 8 раз к 18-му часу аэробной преинкубации при 0°C. Это позволило после 18 – 20 ч преинкубации изучить ингибирование окисления сукцината L-малатом, пренебрегая его вкладом в скорость дыхания. Это ингибирование имело линейный характер в координатах Диксона (с величиной $K_i = 17,5 \pm 1,1$ мМ (Рис. 19б.), которая существенно выше величины $K_i = 6,6 \pm 1,3$ мкМ для О-пальмитоил-L-малата.

О-Пальмитоил-L-малат увеличивал величину K_M сукцинатоксидазы клеток дрожжей, не изменяя V_{max} . Увеличение концентрации сукцината уменьшало величину I_{50} для L-малата. По-видимому, оба субстрата конкурируют за общую точку связывания. 2-Ундецилмалонат (его непроницаемость в митохондрии показана в разделе 3.2.2), как и О-пальмитоил-L-малат, не влиял на v_e клеток, но ингибировал окисление сукцината. Ингибирование имело линейный характер в координатах Диксона. 2-Ундецилмалонат также увеличивал величину K_M сукцинатоксидазы клеток дрожжей, не изменяя максимальную скорость реакции. Величина $K_i = 35,6 \pm 4,4$ мкМ. Конкурентный характер действия обоих ингибиторов означает, что они взаимодействовали с одной точкой связывания субстрата в активном центре переносчика. По аналогии с О-пальмитоил-L-малатом это позволяет предположить, что малонат, так же как и L-малат связывается с сукцинатным транспортером плазмалеммы. По-видимому, и итаконат связывается с активным центром переносчика сукцината, конкурентно к этому субстрату (Рис. 19б.). На Рис. 20б., видно, что только фумарат, но не малеат, эффективно подавлял ($K_i = 1,0 \pm 0,1$ мМ) окисление сукцината, конкурентно к нему (Рис. 20а.).

На Рис. 10а. активность сукцинатоксидазы клеток увеличивается в ходе длительной преинкубации при 0° С, но остается существенно меньшей, чем активность пируватоксидазы. Известно, что активности митохондриальных сукцинатоксидазы и пируватоксидазы соизмеримы. Если бы низкая активность сукцинатоксидазы была связана с небольшой примесью перфорированных клеток, то стереоспецифичность ее ингибирования в паре фумарат/малеат соответствовала бы митохондриальной. Кроме того, данные приведенные в Таблице 1, свидетельствуют о том, что окисление сукцината митохондриями гораздо чувствительнее к О-миристоил-L-малату и О-пальмитоил-L-малату, чем окисление сукцината клетками. Все это свидетельствует о том, что действием ингибиторов на примесь дрожжей с плазмалеммой, поврежденной в ходе продолжительной предобработки, можно пренебречь.

В условиях, когда скорость окисления сукцината лимитирована его транспортом через плазмалемму, протониферы FCCP (Рис. 13а., средняя кривая) и SF (данные не показаны) почти не влияли на окисление сукцината, в отличие от активации глюкозы (Рис. 13а., верхняя кривая) и ингибирования пирувата (Рис. 13а., нижняя кривая), что позволяет предположить, что транспорт сукцината через плазматическую мембрану осуществлялся не в симпорте с протоном.

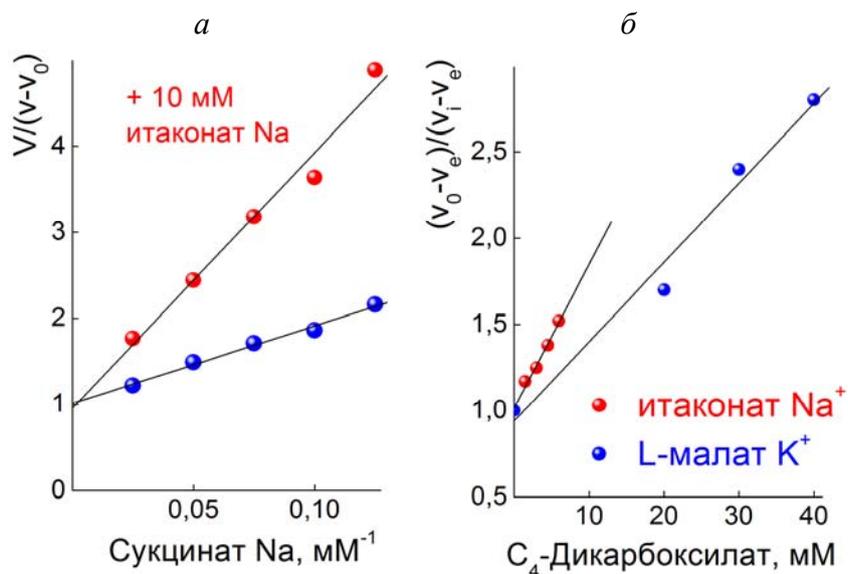


Рис. 19. *a* – Зависимость относительной скорости окисления 10 мМ сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* от концентрации сукцината в присутствии 10 мМ итаконата натрия и без ингибитора, верхняя и нижняя кривые, соответственно (координаты Лайнуивера–Берка); *б* – Зависимость относительной скорости окисления 10 мМ сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* от концентрации итаконата натрия и L-малата калия, верхняя и нижняя кривые, соответственно (координаты Диксона).

Клетки аэробно преинкубировали при 0°C в течение 18 ч.

Условия: Среда инкубации – 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 5,5).

Концентрация клеток – *a* – 5 мг/мл, *б* – 10 мг/мл.

Линейный характер ингибирования 2-ундецилмалонатом в координатах Диксона для окисления сукцината и цитрата свидетельствует о том, что ингибитор подавляет стадию, лимитирующую окисление обоих субстратов. Поскольку ингибитор не проникает в клетку, то лимитирующей стадией является транспорт обоих субстратов через плазмалемму (Рис. 9), и особенности их окисления (Рис. 21) связаны со свойствами транспортера. Поэтому в дальнейшем мы будем называть скорость окисления субстратов скоростью транспорта через плазмалемму в условиях, когда вышеописанную линейность была подтверждена.

На Рис. 21 показано, что окисление клетками цитрата (верхняя и средняя оксиграммы) и сукцината (нижняя оксиграмма) нечувствительны к действию FCCP в концентрации (2 мкМ), максимально влияющей на окисление глюкозы и пирувата (Рис. 13а., верхняя и нижняя кривые, соответственно). В натрий - фосфатном буфере (рН 5,5) скорость окисления цитрата в 7 раз превышала скорость его окисления в калий - фосфатном буфере (рН 5,5) (Рис. 21, средняя и верхняя оксиграммы). В отдельных опытах показали, что аналогично зависело от состава среды и окисление сукцината. Скорости окисления сукцината и цитрата

одинаково эффективно (в 4 раза) подавлялись непроникающим ингибитором – 2-ундецилмалонатом (Рис. 21, средняя и нижняя оксиграммы). Степень ингибирования транспорта цитрата зависит от его концентрации - при больших концентрациях цитрата (20 мМ) необходима и большая концентрация ингибитора. По-видимому, субстрат «защищает» от ингибирования переносчик цитрата плазмалеммы. 2-Ундецилмалонат увеличивал наблюдаемую величину K_M , не меняя V_{max} как для сукцината, так и цитрата. Причем, K_i для сукцинатного и цитратного транспорта были соизмеримы (соответственно, 7,8 мкМ и 3,8 мкМ) и сопоставимы с величинами K_i , рассчитанными по зависимости от концентрации ингибитора (6,7 мкМ и 5,7 мкМ, соответственно). В отдельных опытах в условиях, когда скорость окисления цитрата была минимальной, цитрат конкурентно подавлял окисление сукцината клетками. Можно утверждать, что эти данные и данные, приведенные на Рис. 21, с высокой долей вероятности свидетельствуют о том, что сукцинат и цитрат транспортируются в клетку общим переносчиком.

В контрольных опытах было показано, что ферментативная система окисления цитрата (цитратоксидаза) препарата митохондрий *S. cerevisiae* не чувствительна к 2-ундецилмалонату (Рис. 22), в отличие от цитратоксидазы клеток (Рис. 23), т.е. объектом воздействия ингибитора является именно транспортер плазмалеммы. Эти данные дополнительно свидетельствуют о том, что сравнительно низкая активность окисления цитрата клетками не связана с примесью перфорированных клеток.

Таким образом, транспорт сукцината, L-малата и цитрата через плазмалемму *S. cerevisiae* осуществляется с помощью дикарбоксилатного транспортера (ДКТ). Кроме того, этот переносчик способен связывать малонат, итаконат, малеат и фумарат, конкурентно к сукцинату (Рис. 19 и 20).

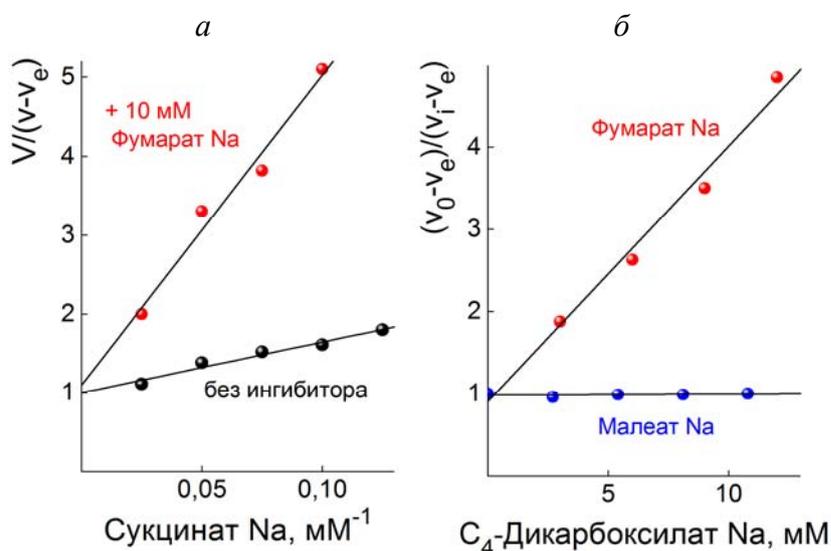


Рис. 20. а – Зависимость относительной скорости окисления от концентрации сукцината в присутствии 10 мМ фумарата натрия и без ингибитора, верхняя и нижняя кривые, соответственно, координаты Лайнуивера–Берка. Клетки *S. cerevisiae* аэробно преинкубировали при 0°С в течение 20 ч. Условия: 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 5,5). Концентрация клеток – 5 мг/мл.

б – Зависимость относительной скорости окисления 10 мМ сукцината натрия от концентрации фумарата натрия и малеата натрия, верхняя и нижняя кривые, соответственно, координаты Диксона.

Клетки *S. cerevisiae* аэробно преинкубировали при 0°С в течение 20 ч.

Условия: 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 5,5). Концентрация клеток – 10 мг/мл.

Регуляция транспортера плазмалеммы *S. cerevisiae* катионами. Окисление сукцината зависело от pH среды и катиона в среде инкубации (Рис. 24). При pH 5,5 (Рис. 27a.) скорость окисления сукцината в присутствии Na^+ была выше, чем в присутствии K^+ или Tris^+ (соответственно нижняя, верхняя и средняя оксиграммы). При pH 6,5 (Рис. 24б.) скорость окисления сукцината была существенно выше, чем при pH 5,5, но скорости в присутствии каждого из трех катионов: Na^+ , K^+ и Tris^+ были близки.



Рис. 21. Окисление клетками *S. cerevisiae* цитрата калия в 50 мМ калий - фосфатном буфере (pH 5,5) (верхняя оксиграмма), и цитрата натрия или сукцината натрия в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 5,5) (средняя и нижняя оксиграммы).
Добавки: клетки (10 мг/мл), 2 мкМ FCCP, 20 мМ сукцинат или цитрат, 300 мкМ 2-ундецилмалонат.
Время аэробной преинкубации клеток при 0°C – 12 - 18 ч.

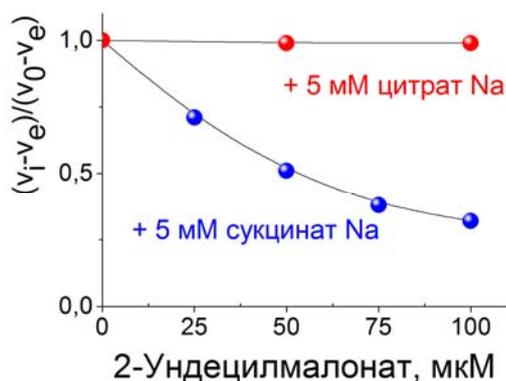


Рис. 22. Зависимость относительной скорости окисления 5 мМ цитрата натрия и 5 мМ сукцината натрия препаратом митохондрий *S. cerevisiae* (верхняя и нижняя кривые, соответственно) от концентрации 2-ундецилмалоната.
Условия: Среда инкубации СИ1 (pH 6,5). Концентрация митохондрий – 1,8 мг/мл.

В то же время катионы по-разному влияли на подавление окисления сукцината 2-ундецилмалонатом. Ингибирование было максимальным в среде с Tris^+ (в среднем 89%), минимальным в среде с Na^+ (65%) и средним (77%) в среде с K^+ . Чтобы проверить, не связан ли эффект K^+ и Na^+ с изменением сродства транспортера к сукцинату, сопоставили величины K_M при pH 5,5 в K^+ - и Na^+ -содержащих средах: показано, что модулирование сродства транспортера к сукцинату и цитрату катионами носило «квазиконкурентный» характер. Поскольку в литературе описан транспорт малата в комплексе с двухзарядным катионом [Gunzel et al., 2005], нами было установлено, что двухзарядные катионы не активировали

транспорт сукцината, а их отсутствие не приводило к ингибированию транспорта (данные не приведены).

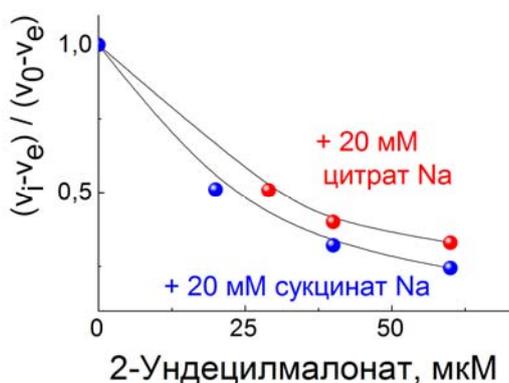


Рис. 23. Зависимость относительной скорости окисления 20 мМ цитрата натрия и 20 мМ сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* (20 и 5 мг/мл, соответственно) (верхняя и нижняя кривые, соответственно) от концентрации 2-ундецилмалоната.

Условия: Среда инкубации 50 мМ калий - фосфатный буфер (pH 6,5).

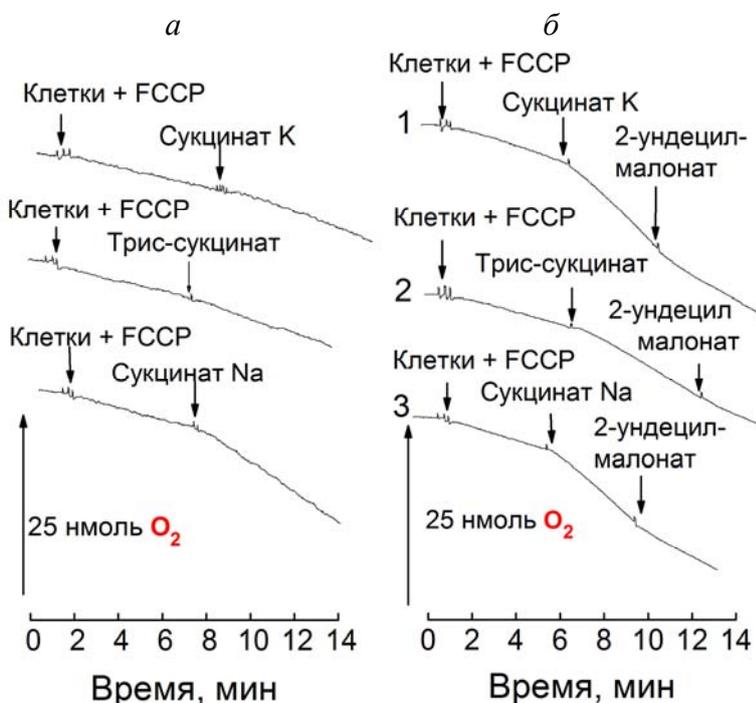


Рис. 24. Зависимость от времени окисления клетками *S. cerevisiae* сукцината калия (верхняя оксиграмма), Tris - сукцината (средняя оксиграмма) и сукцината натрия (нижняя оксиграмма).

а - Добавки: клетки, 2 мкМ FCCP, 20 мМ сукцинат.

Условия: Среда инкубации: 50 мМ калий - фосфатный буфер (pH 5,5) (верхняя оксиграмма); 50 мМ Tris - фосфатный буфер (pH 5,5) (средняя оксиграмма); 50 мМ натрий - фосфатный буфер (pH 5,5) (нижняя оксиграмма).

б - Добавки: клетки, 2 мкМ FCCP, 6 мМ сукцинат, 300 мкМ 2-ундецилмалонат;

Условия: Среда инкубации клеток: 50 мМ калий - фосфатный буфер (pH 6,5) (верхняя оксиграмма); 50 мМ Tris - фосфатный буфер (pH 6,5) (средняя оксиграмма); 50 мМ натрий - фосфатный буфер (pH 6,5) (нижняя оксиграмма).

Клетки преинкубировали в аэробных условиях при 0°C 12-18 ч, концентрация клеток (*а* и *б*) – 10 мг/мл.

pH профиль ДКТ плазмалеммы *S. cerevisiae*. Исследовали влияние pH на K_M и V_{max} транспорта сукцината в 50 мМ NaH_2PO_4 (Таблица 2). При каждом значении pH линейность ингибирования транспорта 2-ундецилмалонатом в координатах Диксона подтверждала его лимитирование переносчиком плазмалеммы. При отклонении от линейности (и лимитировании окисления сукцината его транспортом в митохондриях) величина K_M по сукцинату не зависела от pH в диапазоне 5,5 – 7,5, при которых внутриклеточное значение pH не меняется [Purwin et al., 1986; Beauvoit et al., 1991; Pena et al., 1972]. Величина K_M по сукцинату в этих условиях составляла $0,84 \pm 0,3$ мМ, и была близка к величине K_M , полученной для препарата митохондрий, выделенных нами из клеток штамма *S. cerevisiae* Y-503 ($0,85 \pm 0,17$ мМ) при pH 6,5. pH-Оптимум для V_{max} находился в щелочной области. Увеличение величины K_M для сукцината с увеличением pH, связано, по-видимому, с увеличением доли дианионной формы субстрата. В пересчете на дианион величина K_M оставалась постоянной (Таблица 2).

Таблица 2. Влияние pH на кинетические параметры транспорта сукцината в клетки *S. cerevisiae* в 50 мМ натрий - фосфатном буфере в отсутствие FCCP.

Кинетические параметры	pH 4,5 (2)*	pH 5,5 (3)*	pH 6,5 (2)*	pH 7,5 (2)*
K_M , мМ	-	$3,4 \pm 0,2$	$1,63 \pm 0,13$	$1,65 \pm 0,02$
K_M , мМ в пересчете на дианион сукцината по [Dawson et al., 1986]	-	1,45	1,38	1,65
V_{max} , нмоль O_2 /мг сырого веса	0,05<	$1,67 \pm 0,07$	$2,06 \pm 0,03$	$3,3 \pm 0,01$

* В скобках указано количество измерений.

При pH 4 доля дианионной формы не превышает 10% (рассчитано по [Dawson et al., 1986]) и сукцинат практически не окислялся. Вероятно, именно дианионная форма субстрата являлась единственной транспортируемой формой. Этот результат согласуется с нашими данными о конкурентном ингибировании окисления дрожжевыми клетками сукцината фумаратом, но не малеатом (см. выше). Такая стереоспецифичность ингибирования возможна при связывании дианионной формы субстрата с активным центром переносчика.

3.5. Зондирование активного центра ДКТ митохондрий ПК с помощью амфифильных производных субстратов. Липофильный профиль канала.

Для всех α,ω -алкилендималонатов и О-ацил-L-малатов в координатах Диксона были получены линейные зависимости подавления этими ингибиторами сукцинатоксидазы митохондрий ПК, что свидетельствует о том, что K_i характеризует лимитирующее звено – ДКТ. Для моно- и диалкилмалонатов такие зависимости были получены коллегами автора [Шольц и соавт., 1990; Бондаренко и соавт., 1996]. Для крайних членов ряда 2-моноалкилмалонатов, а также для 2-моноалкилмалонатов, находящихся в точках перегиба на зависимости $\lg K_i$ от n (числа атомов углеродов в алифатической цепи ингибитора), для всех α,ω -алкилендималонатов и О-ацил-L-малатов было показано, что ингибиторы повышали величину K_M сукцинатоксидазы митохондрий, не меняя ее V_{max} . Конкурентный характер действия всех этих ингибиторов означает, что они взаимодействуют с точкой связывания

субстрата в активном центре переносчика. Есть основания предполагать, что критически важные для связывания субстрата аргинилы экспонированы в канал у всех митохондриальных переносчиков дикарбоксилатов [Xu et al., 2000; Stipani et al., 2001; Ma et al., 2007; Cappello et al., 2006], а также, что третичная структура канала транспортеров представляет собой цилиндрическую полость [Walters and Kaplan, 2004].

Изменение констант ингибирования производных малата и малоната с алифатическим «хвостом» ($\Delta \lg K_i = \lg K_{i(n)} - \lg K_{i(n-1)}$) при удлинении на одно метиленовое звено характеризует степень липофильности в районе связывания последней метильной группы. Причем зонд измеряет удаленность этого района от аргинилов точки связывания. Зависимость $\lg K_i$ от n далее назвали «липофильным профилем» (Рис. 25 и Рис. 26).

По-видимому, «липофильный профиль» характеризует внутреннюю поверхность канала. В случае с бифункциональными ингибиторами – α, ω -алкилендималонатами при их удлинении надеялись «нащупать» вероятную дополнительную точку связывания дикарбоксилата в канале переносчика. На Рис. 25б. видно, что «липофильные профили» для О-ацил-L-малатов и 2-алкилмалонатов имеют значительное сходство. Обе кривые имеют площадку для n от 4 до 8 (связывание с полярной зоной) и область уменьшения $\lg K_i$ для n от 8 до 15 (связывание с «большим липофильным участком»). Эта область описывается уравнением: $\lg K_i = -0,38n + 1,41$ (формула 2). По-видимому, одинаковые участки алифатической цепи О-ацил-L-малатов и 2-моноалкилмалонатов связываются общими зонами канала переносчика. Зависимости коэффициента распределения О-ацил-L-малатов (R_n) в системе октанол/калий-фосфатный буфер, pH 7,2, описываются уравнением: $\lg R_n = 0,406n - 5,42$ (формула 3) (Рис. 27). Величины коэффициента при n в уравнениях для зависимостей $\lg K_i$ (n) и для $\lg R_n$ (n) близки. $\Delta \Delta G = RT \Delta \lg K_i = 941,5 \pm 277$ Дж/моль – молярная энергия переноса метиленового звена алкильного заместителя в ингибиторе из среды в активный центр переносчика, $\Delta \Delta G = RT \Delta \lg R_n = 999,2 \pm 270$ Дж/моль – молярная энергия переноса метиленового звена алкильного заместителя в ингибиторе из среды в октанол (R – универсальная газовая постоянная, а T – абсолютная температура).

Следовательно, энергия взаимодействия метильного звена алифатической цепи ингибиторов с аминокислотными остатками, выстилающими канал в активном центре транспортеров, обусловлена только липофильными взаимодействиями. Одновременно это свидетельствует о том, что стерические препятствия не искажали конформацию алифатического «хвоста» ингибитора, которую она имеет в состоянии с минимальной энергией, иначе бы стерические препятствия связыванию понизили бы энергию взаимодействия.

2-Алкилмалонаты и О-ацил-L-малаты – это две «линейки» для измерения длины липофильной зоны канала переносчика. Желательно было выяснить: «прикладываются» ли они к точке отсчета в активном центре дикарбоксилатной «головкой» или началом алифатического «хвоста». Реперная площадка, которая имеет место в профилях, полученных обоих рядов (Рис. 25), свидетельствует о большей вероятности второго предположения.

В Таблице 3 приведены результаты сравнительного зондирования 2,2-диалкилмалонатами активного центра сукцинатдегидрогеназы ПК и транспортера ДКТ ПК, имеющих одинаковый субстрат – сукцинат. Дополнительные заместители вблизи карбоксильных групп уменьшали сродство соединения к ферменту гораздо сильнее, чем к

транспортеру. По-видимому, область в непосредственной близости от субстратсвязывающей точки транспортера относительно просторна. В ней более длинный О-ацил-L-малатный зонд (длина сложноэфирной связи – 0,229 нм) может «свернуться» так, чтобы расстояние от дикарбоксилатов до первого углерода алифатического «хвоста» было таким же, как у 2-алкилмалонатов.

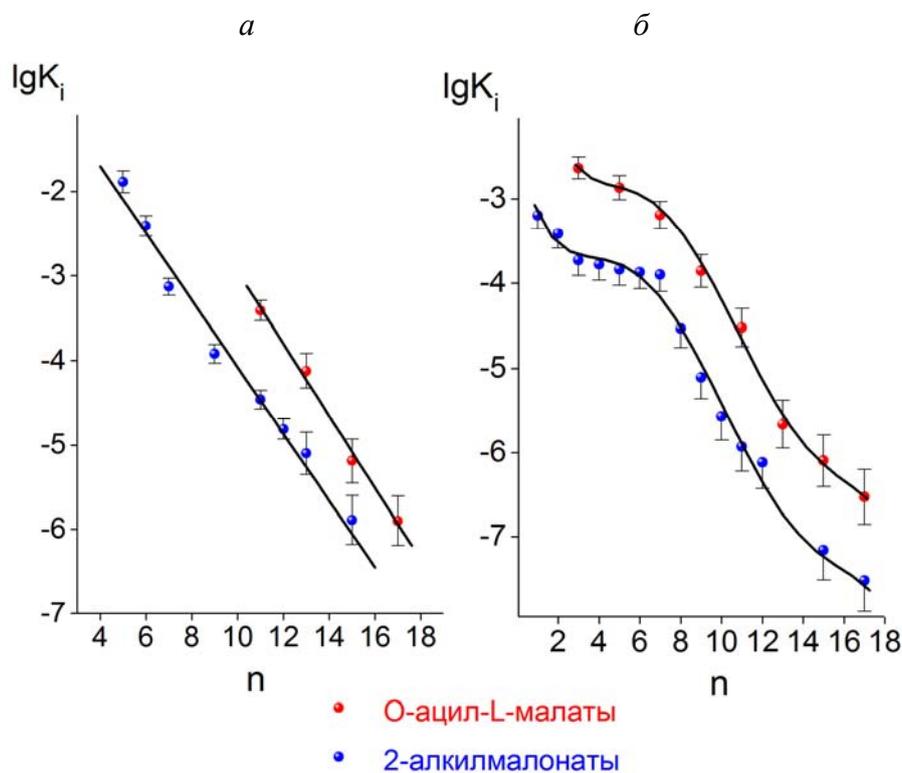


Рис. 25. а – Зависимость константы ингибирования сукцинатоксидазы клеток *S. cerevisiae* О-ацил-L-малатами и 2-алкилмалонатами от числа атомов углерода (n) в их алифатической цепи, верхняя и нижняя зависимости, соответственно.
Условия: Среда инкубации 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5). Концентрация клеток – 10 мг/мл;
б – Зависимость константы ингибирования сукцинатоксидазы митохондрий ПК О-ацил-L-малатами и 2-алкилмалонатами от числа атомов углерода (n) их в алифатической цепи, верхняя и нижняя зависимости, соответственно.
Условия: Среда инкубации СИЗ. Концентрация митохондрий – 0,25 мг/мл.

Таблица 3. Зависимость конкурентного ингибирования сукцинат: феррицианид-редуктазной реакции СМЧ и сукцинатоксидазы митохондрий ПК от количества заместителей в молекуле малоната (в скобках указано количество независимых измерений), среда инкубации СИЗ.

Ингибитор	$-\lg K_i$ сукцинатоксидазы митохондрий ПК	$-\lg K_i$ сукцинатдегидрогеназы СМЧ
Малонат	3,7 [Indivery et al., 1993]	5,65 ± 0,10 (3)
2-Метилмалонат	3,20 ± 0,20 (3)	2,72 ± 0,19 (2)
2,2-Диметилмалонат	2,56 ± 0,12 (3)	1,55 ± 0,18 (3)

Как показано на Рис. 26, липофильный профиль для α,ω -алкилендималонатов имеет значительное сходство с таковым для высших 2-алкилмалонатов (пунктирная линия на

рисунке). Имеет место плато на зависимости до n , равного 6, и область снижения $\lg K_i$ на участке с n – от 6 до 11. Вероятно, равноудаленные от субстратсвязывающей точки метиленовые звенья обеих групп ингибиторов взаимодействуют с одинаковыми зонами в переносчике. Каждый соответствующий α,ω -алкилендималонат ингибировал слабее 2-алкилмалоната.

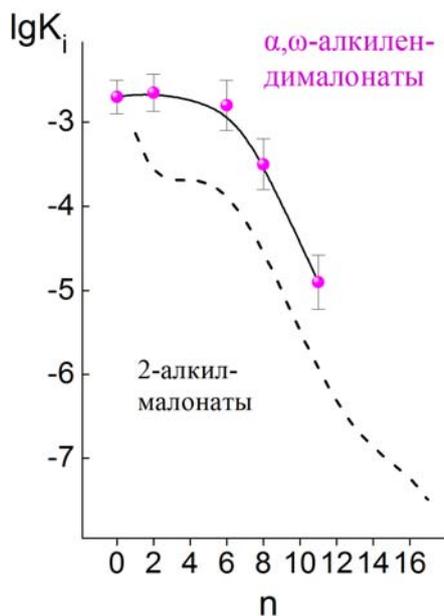


Рис. 26. Зависимость константы ингибирования сукцинатоксидазы митохондрий ПК α,ω -алкилендималонатами и 2-алкилмалонатами от числа атомов углерода в алифатической цепи ингибитора (n), верхняя и нижняя кривые, соответственно.

Условия: Среда инкубации СИЗ.

Концентрация митохондрий – 0,25 мг/мл.

3.6. Зондирование активного центра ДКТ плазмалеммы *S. cerevisiae* с помощью амфифильных производных субстратов. Липофильный профиль канала

Линейные зависимости ингибирования производными субстратов ДКТ в координатах Диксона, свидетельствующие о лимитировании сукцинатоксидазы клеток транспортом через плазмалемму, получали для каждого ингибитора. Для крайних членов ряда 2-алкилмалонатов (2-пентилмалоната и 2-пентадецилмалоната) и для крайних членов ряда производных L-малата (собственно L-малата и О-стеароил-L-малата) показано, что ингибиторы повышали величину K_M сукцинатоксидазы клеток, не меняя V_{max} процесса. По различным причинам не все соединения оказались пригодными для зондирования переносчика плазмалеммы *S. cerevisiae*, по сравнению с ДКТ ПК (Рис. 25а,б.). Как следует из данных, приведенных на Рис. 25а., липофильные профили для О-ацил-L-малатов и 2-алкилмалонатов у сукцинатоксидазы клеток *S. cerevisiae* линейны и параллельны между собой. Зависимости описываются соответствующими уравнениями: $\lg K_i = -0,427n + 1,323$ и $\lg K_i = -0,396n - 0,115$ (формулы 4 и 5, соответственно). С увеличением степени гидрофобности соединения возрастает его сродство к активному центру. Зависимость коэффициента распределения О-ацил-L-малатов (R_n) в системе октанол/ калий - фосфатный буфер, рН 5,5 (Рис. 27), описывались уравнением: $\lg R_n = 0,416n - 3,46$ (формула 6). Величины коэффициентов при n в уравнениях для зависимостей $\lg K_i (n)$ и $\lg R_n (n)$ близки и, по-видимому, по причинам, аналогичным вышеописанным для митохондриального транспортера – степени гидрофобности стенок канала и отсутствие стерических препятствий для связывания. Отсутствие реперной площадки, которая имеет место в профиле митохондриального переносчика (Рис. 25б.), не дало нам возможность предположить, что молекулярные «линейки»: 2-алкилмалонаты и О-ацил-L-малаты «прикладываются» к одной

и той же точке канала началом алифатического «хвоста». Мы изучили действие на дыхание *S. cerevisiae* итаконата и L-малата, соответственно, с гидрофобной метиленовой и гидрофильной гидроксильной группой во втором положении молекулы субстрата. Данные на Рис. 19б. свидетельствуют о лучшем сродстве для итаконата ($K_i = 4,15 \pm 0,35$), более гидрофобного конкурентного ингибитора ДКТ (Рис. 19а.) клеток по сравнению с L-малатом ($K_i = 17,5 \pm 1,1$ мМ).

По-видимому, в отличие от митохондриального переносчика, гидроксил L-малата не участвует в связывании с ДКТ плазмалеммы, и полярное сложноэфирное звено О-ацил-L-малатов может входить в канал. Это, в свою очередь, позволяет предположить, что вся длина ингибитора участвует в сканировании этого канала.

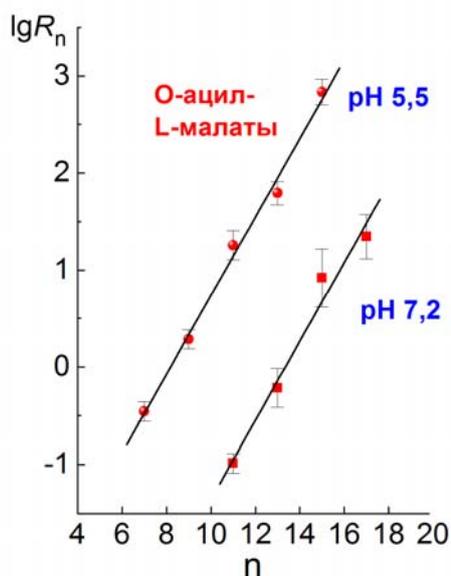


Рис. 27. Зависимость коэффициента распределения О-ацил-L-малатов (R_n) в системе октанол/50 мМ калий - фосфатный буфер (pH 5,5) и (pH 7,2), верхняя и нижняя зависимости, соответственно; n – число атомов углерода в алифатической цепи ингибитора.

3.7. Обсуждение результатов

3.7.1. Методические достижения и анализ новых свойств пороформеров.

Из Таблицы 4 следует, что предложенный нами подход позволяет исследовать характеристики индукторов проницаемости в диапазоне C_m от 40 до 4600 мкМ. С учетом данных по содержанию усредненного липида в митохондриях ПК (250 нмоль/мг белка митохондрий [Lenton et al., 1995]) и удельного объема липидной фазы (10^{-6} л/мг [Шольц, Захарова, 1980]), это соответствует соотношениям пептид/липид от 1/625 до 1/54. Причем для аламетицина эта зона соотношений (вблизи 1/625) не была изучена из-за недостаточной чувствительности традиционных методов. Сопоставление литической и эффективной концентрации (KKJ/A_{200}) свидетельствует о том, что амфифильные пептиды не разрушают митохондрии, используемые нами в качестве биосенсора. Возможно, липид в бислое полностью дезорганизован при пептид/липидном соотношении, близком к ККЛ, т.к. это преимущественно «припептидный» липид. В таком случае при соотношениях от 1/625 до 1/54 мы можем игнорировать его кооперативный эффект, а присутствие $\Delta\psi$ поддерживает весь мембраносвязанный пептид в трансмембранном состоянии. Скорости порообразования измеряли в стационарном режиме в течение минут, поскольку набухание тяжелой фракции митохондрий в присутствии пороформеров в течение почти 15 мин не приводило к повреждению внутренних мембран органелл (Рис. 2) и их способности генерировать $\Delta\psi$. В

этих условиях формальный порядок реакции отражает именно реакцию ассоциации мономеров на лимитирующей стадии порообразования. В этом метод с применением биосенсора имеет неоспоримые преимущества по сравнению с традиционными методами, хотя применим в узком диапазоне температур, ионной силы и вариаций липидного состава мембраны. Классический метод вытекания репортерного красителя из липосом через формируемые исследуемыми пептидами поры чувствителен к степени гомогенности липосом и не приспособлен к поддержанию $\Delta\psi$. К исследованию порообразования мастопараном этот метод не применим даже теоретически [Cabrega et al., 2008]. Прямой подход (использование сшитых гибким линкером димеров и тетрамеров) к исследованию связи между степенью олигомерности и проводимостью для аламетицина в попытке стабилизировать низшие проводящие субсостояния пептида в БЛМ не привели к однозначным результатам [Huang, 2006]. Использование не прямых методов измерения КТТ в такой ситуации, по-видимому, неизбежно.

Таблица 4. Эффект пороформеров на митохондрии ПК.

Параметр	Название пептида (среда инкубации, в которой получены характеристики)			
	Мастопаран (СИ2)	Мелиттин (СИ5)	ТАМ (СИ6)	Аламетицин (СИ6)
A_{200} , мкМ	1,15±0,15 (3)	0,385±0,015 (2)	0,08 [**]	0,065±0,004 (2)
K_p	(0,73±0,04) × 10 ⁵ (3)	>>1×10 ⁵ [**]	>>1×10 ⁵ (2)	(0,76±0,01) × 10 ³ (2)
C_m , мкМ	4600	1540	320	40
ККЛ, мкМ	15,6±0,1 (3)	3,8 [**]	0,6 [**]	2,9±0,1 (3)
ККЛ/ A_{200}	13,6	9,9	7,5	44,6
Порядок реакции	1,83±0,23 (3)	2,01±0,15 (2)	-	1,92±0,07 (3)
A_{K^+}/A_{Li^+}	1,18±0,02 (3)	1,12±0,03 (3)	1,39±0,01 (3)	1,39±0,04(1,59*) (3)
Подавление $\Delta\psi$	умеренное стабилизирующееся		радикальное	
Самоассоциат, лимитирующий проводимость	непроводящая предпора		проводящая пора	

Примечания: В скобках при цифрах – количество независимых измерений или ссылка, концентрация митохондрий ПК равна 0,25 мг/мл кроме графы с K_p , A_{200} – концентрация пептида, активирующая v_4 на 200%, C_m – равноэффективная мембранная концентрация, соответствующая A_{200} , которую рассчитывали по формуле: $C_m = A_{200}/(1/K_p + \lambda V)$ [Шольц, Захарова, 1980], где λ , равное 0,001мл/мг, – удельное содержание доступной эффектору гидрофобной фазы (удельное содержание липида в митохондриях), V – концентрация митохондрий ПК. Для $K_p > 1 \times 10^5$ – рассчитывали по формуле: $C_m = A_{200}/(\lambda V)$.

* - с поправкой на разную скорость снижения $\Delta\psi$ в монолитиевой и монкалиевой средах.

** - Шольц и соавт., 1980.

В литературе сложилась практика распространять на представления о пептидном характере пор, экспериментально обоснованные только для высокоолигомерной пор, на низкоолигомерные поры. Мы предполагаем, что низкоолигомерная пора аламетицина содержит липид (см. 3.3.4.). Пептидная пора свободно пропускает гидратированный K^+ , в том случае, если она пентамер [Chiriac and Luchian, 2007], а мы определили порядок реакции

формирования низкоолигомерной поры, равный 2-м. Хотя модель тороидальной (липидсодержащей) поры для аламетицина непопулярна, наши результаты не противоречат некоторым представлениям и экспериментальным данным о взаимодействии аламетицина с липидами бислоя. Трансмембранный мономер пептида формирует в обоих лепестках бислоя лунку с «утонченным» бислоем, что при столкновении (и даже сближении) мономеров способствует электропорации в бислое, формированию липид-пептидной поры и, по-видимому, ее стабилизации [Kessel et al., 2004] т. е. увеличению её среднего времени жизни (СВЖ), по сравнению с чисто липидной порой. Тороидальная пора с участием аламетицина облегчает переход пептидов из наружного лепестка мембраны во внутренний. При этом дополнительная стабилизация поры может происходить за счет энергетически выгодной ассоциации двух молекул аламетицина в «противофазе»: «голова к хвосту» [Mottamal and Lazaridis, 2006]. СВЖ низших субсостояний проводимости, соответствующих низкоолигомерному аламетицину, более чувствительно к вариациям pH липидной поверхности и дипольному потенциалу мембраны [Chiriac and Luchian, 2007], чем чисто пептидная высокоолигомерная пора.

С помощью предлагаемого нами подхода можно не только измерить ток, индуцированный аламетицином в присутствии $\Delta\psi$ при низких пептид/липидных соотношениях, но и разделить во времени стационарную проводимость фракции низкоолигомерных каналов и проводимость, созданную более широкими каналами этого пептида. Также можно «откалибровать» диаметр поры, если индуцированная пороформером проводимость во внутренней мембране митохондрий лимитирует активацию v_4 органелл.

Ключевым в исследовании проницаемости, индуцированной низкоолигомерной формой аламетицина, является разделение во времени КТТ через фракцию этих и более высокоолигомерных каналов. В модельных системах (БЛМ, например) это удастся только в рамках «метода одиночного» канала, который исключает исследование зависимости проводимости от концентрации пептида. «Нижняя ступенька в пирамидке» проводящих субсостояний аламетициновой поры имеет наименьшую амплитуду и это вынуждает исследователей использовать высокие концентрации катионов. Нами предложено объяснение, почему именно митохондрии позволяют разделить во времени КТТ, индуцированный фракциями низко- и высокоолигомерных каналов аламетицина (Рис. 17). Внутренняя мембрана митохондрий обогащена преимущественно гидрофобными белками. И белки, и мономеры пороформеров, окружены оболочкой из липидов, увлекаемой при двумерной диффузии в бислое. Это, по-видимому, делает их столкновения «неупругими», а контакты в момент столкновения относительно долгоживущими. При достаточно низкой концентрации аламетицина в мембране ($C_m = 40$ мкМ, соотношение пептид/липид – 1/625) формальный «свободный» пробег между столкновениями собственно мономеров аламетицина может быть существенно больше, чем в БЛМ или липосомах при аналогичном соотношении.

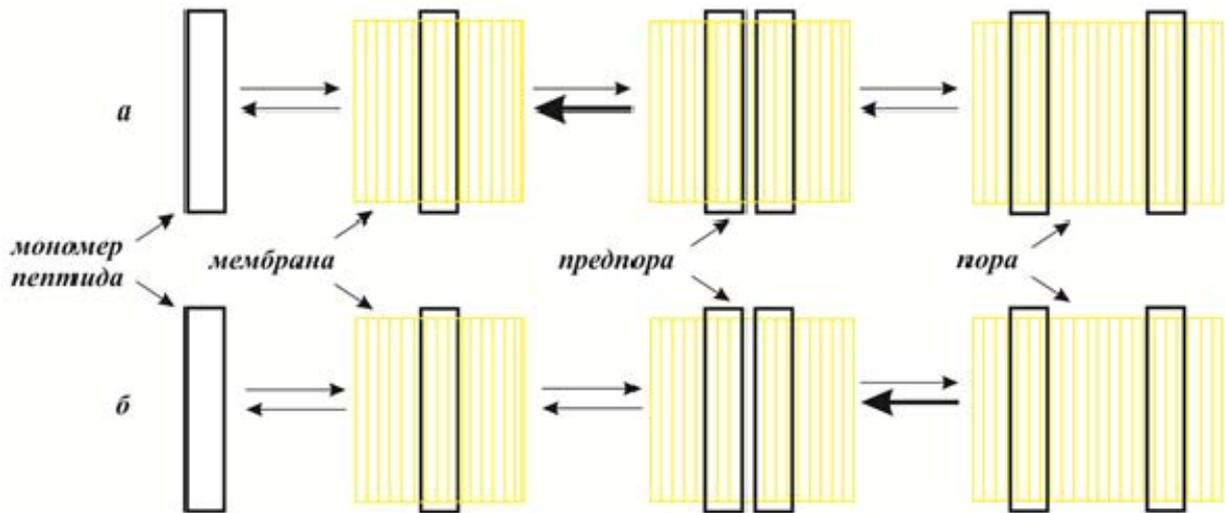


Рис. 28. Модель самоассоциации пептидов - пороформеров в мембране: *a* – мелиттина или мастопарана; *б* – аламетицина или ТАМ; стрелка, выделенная жирным, иллюстрирует сдвиг равновесия.

Данные, представленные на Рис. 4б, 15в,г., 17б. и 18б., свидетельствуют о том, что по эффективности подавления $\Delta\psi$ в митохондриях ПК при одинаковой активации v_4 (и, следовательно, КТТ) исследуемые нами пороформеры подразделяются на 2 группы: умеренно (мелиттин и мастопаран) и сильно (ТАМ и аламетицин) влияющие на $\Delta\psi$. Пептиды второй группы, по-видимому, более гепатотоксичны. Причем, данные о соотношении активации v_4 митохондрий ПК этими пороформерами в монокалийевой и монолитиевой средах (см. разделы 3.3.1. и 3.3.5.) свидетельствуют о том, что трансмембранный ток, индуцированный мастопараном и мелиттином, лимитирует самоассоциация мономеров в непроводящую предпору, а ток, индуцированный ТАМ и низкоолигомерным аламетицином, лимитирует образование поры. На Рис. 28 представлена модель самоассоциации пептидов – пороформеров в мембране и наиболее вероятные равновесные формы олигомеров. Существенно, что сравнительно небольшая модификация мелиттина, блокирование 4-х положительных зарядов при получении тетраацетилмелиттина (ТАМ), изменяет механизм порообразования, хотя величина коэффициента распределения при этом не изменяется.

3.7.2. Уникальные свойства ДКТ плазматической мембраны *S. cerevisiae*.

В настоящей работе впервые показано, что дыхание клеток *S. cerevisiae* в присутствии сукцината не связано с его диффузией, а обусловлено существованием в плазматической мембране дикарбоксилатного транспортера. Об этом свидетельствуют следующие факты:

1. Окисление сукцината клетками при pH 6,5 и 7,5 (pK_a 4,21 и 5,72) [Dawson et al., 1986] происходит в отсутствие его недиссоциированной формы (Рис. 24, Таблица 2)).

2. Зависимость скорости окисления от концентрации сукцината описывается кривой с насыщением. Причем величины K_M для сукцината различались у клеток *S. cerevisiae* и в препарате митохондрий, выделенных из этих клеток (соответственно $4,4 \pm 1,3$ мМ и $0,85 \pm 0,2$ мМ в близких по катионному составу (Na^+/K^+) средах инкубации, рН 6,5).

3. Найден не проникающий в клетку эффективный конкурентный ($K_i = 6,6 \pm 1,3$ мкМ) ингибитор окисления сукцината – О-пальмитоил-L-малат.

4. Модулирование величин K_M и V_{\max} окисления сукцината клетками катионами и значениями рН среды инкубации.

5. Стереоспецифичность ингибирования окисления сукцината в условиях лимитирования транспортом через плазмалемму, свидетельствует о транспорте субстрата в форме дианиона.

Соотношение скоростей окисления клетками пирувата и сукцината составляет $162,2 \pm 8,1$ к $13,8 \pm 0,4$ нмоль/мин мг сухого веса. Можно было бы предположить малоактивный транспорт сукцината в моноанионной форме монокабоксилатным транспортером, а также другими протонными симпортерами плазмалеммы *S. cerevisiae*, переносящих вещества с близкой к сукцинату структурой: уреидосукцинат [Turoscy and Cooper, 1979; Turoscy and Cooper, 1987] и аспартат [Regenberg et al., 1998]. Однако активность всех этих переносчиков подавляется протонофорами. Таким образом, нами впервые было доказано существование специфического транспортера сукцината в плазмалемме *S. cerevisiae* [Аливердиева, 2006; Аливердиева, 2007].

Поскольку зависимость ингибирования окисления сукцината и цитрата непроникающим в клетку ингибитором 2-ундецилмалонатом в координатах Диксона линейная (без переломов), то можно говорить о единственном переносчике. рН профиль активности транспортера (Таблица 2) свидетельствует о транспорте субстратов в дианионной форме, а ингибирование фумаратом, но не малеатом (Рис. 20) позволяет предположить, что субстрат транспортируется в цис-конформации.

Широкая субстратная специфичность характерна для известных дикарбоксилатных транспортеров дрожжей [Lodi et al., 2004; Saayman et al., 2000]. Однако способность транспортировать цитрат и влияние катионов на их транспортную активность не описаны. В наших опытах ДКТ плазмалеммы *S. cerevisiae* переносил L-малат, сукцинат, малонат и фумарат. Позже [Jamalzadeh, 2012] были получены экспериментальные свидетельства присутствия в плазмалемме *S. cerevisiae* чувствительного к рН транспортера фумарата.

Свойства изучаемого нами переносчика позволяют высказать предположение о возможном механизме его функционирования. Известны следующие механизмы: импорт дикарбоксилата с протоном или катионом, АТР-зависимый транспорт, электронейтральный антипорт и унипорт [Lolkema et al., 2005]. Нечувствительность транспорта сукцината к протонофору в концентрациях, деэнергизирующих плазмалемму (Рис. 21) позволяет отвергнуть в качестве механизма импорт дикарбоксилата с протоном. Это же делает маловероятным АТР-зависимый транспорт сукцината. Электронейтральный антипорт в качестве физиологически целесообразного механизма подразумевает соизмеримые концентрации дикарбоксилатов по обе стороны плазмалеммы. Для изучаемого переносчика они должны быть соизмеримы с величиной K_M , для сукцината, колеблющейся при рН 6,5 от $1,63 \pm 0,13$ мМ (Таблица 2) до $4,4 \pm 1,3$ мМ, в зависимости от катионного состава среды инкубации. Но

внешняя среда для непаразитических одноклеточных организмов, как правило, не содержит таких высоких концентраций субстратов. Дрожжи, использующие дикарбоксилаты как субстраты для роста, содержат в плазмалемме переносчики с высоким сродством (при pH 5,5 величины K_M для сукцината составляют для *P. tannophilus* – 0,064 мМ [Harrod et al., 1997], для *K. marxianus* – 0,031 мМ [Côte-Real et al., 1989], для *S. utilis*– 0,124 мМ [Cássio, 1993]). Клетки *S. cerevisiae* окисляют сукцинат в среде, в которой единственным катионом является непроницающий катион Tris^+ (Рис. 24, средняя оксиграмма). Это делает маловероятным симпорт с катионом в качестве возможного механизма транспорта. Обычно в качестве косубстрата дикарбоксилатные симпортеры используют только катионы щелочных металлов (ссылки в обзоре [Rajog, 2006]). Мы также показали, что электронейтральный транспорт дикарбоксилата в комплексе с двухзарядными катионами маловероятен. Наши данные о кинетических свойствах транспортера не противоречат механизму унипорта. В рамках этого механизма, K^+ может быть модулятором сродства дианиона сукцината через самостоятельный аллостерический центр. Известно, что *in vivo* катионный состав и pH могут изменяться во внешней среде, но не в цитоплазме *S. cerevisiae* [Purwin et al., 1986; de Nadal et al., 1999]. По-видимому, предполагаемый регулирующий центр транспортера эспонирован во внешнюю среду.

3.7.3. Особенности структуры активного центра ДКТ митохондрий ПК.

Однофазность зависимостей в координатах Диксона для О-ацил-L-малатов, О-ацил-D-малатов и α,ω -алкилендималонатов, а также 2-алкилмалонатов и 2,2-диалкилмалонатов [Шольц и соавт., 1990] свидетельствует о том, что все они взаимодействуют с единственным белком – ДКТ, с субстратом которого – сукцинатом они конкурируют. Если при связывании каждого из эффекторов активный центр переносчика находится в одной и той же конформации, то различия в ингибировании определяются особенностями субстратсвязывающей точки и ее ближайшего окружения. Для О-ацил-L-малатов, 2-алкилмалонатов (Рис. 25) и α,ω -алкилендималонатов (Рис. 26) сходство липофильных профилей для $n > 3$ позволяет предположить, что одинаковые участки алифатической цепи связываются одними и теми же участками канала транспортера.

Зависимости для О-ацил-L-малатов и 2-алкилмалонатов эквидистантны на всем протяжении, причем совпадают и протяженности линейных участков, и координаты точек перегиба (Рис. 25). Связывание транспортером протяженного участка (для n от 8 до 17) алифатической цепи О-стеароил-L-малата или 2-гептадецилмалоната обеспечивает 50 – 60% всей энергии связывания ингибитора в активном центре. Однако карбоксилы каждого О-ацил-L-малата расположены дальше от первого углерода алифатического заместителя по сравнению с соответствующим 2-алкилмалонатом. Это позволяет предположить существование двух близко расположенных потенциальных точек связывания: «малатной» и «малонатной». Связывание бифункционального ингибитора одновременно с двумя точками должно было бы быть эффективнее, чем с одной (примерно, $2\lg K_i$ малоната). Однако величины K_i для дималоната и 1,2-этилидендималоната составляли соответственно 0,50 и 0,53 мМ и были соизмеримы с величиной K_i малоната – 0,35 мМ [Indiveri et al., 1989]. Это свидетельствует об одной общей точке связывания для обоих субстратов в активном центре. Маловероятно, что связывание малата вместо малоната вызывает такое конформационное изменение транспортера, при котором полярная зона и протяженная липофильная область в полости канала сдвигаются вдоль оси канала, сохраняя свои размеры. α,ω -

Алкилендималонаты и 2-алкилмалонаты имеют перегиб в липофильном профиле в области $n = 7$ (Рис. 26). Это дополнительно свидетельствует о том, что их малонатные «головки» связываются общей субстратсвязывающей точкой.

Трикарбоксилатный, аденилатный и дикарбоксилатный транспортеры митохондрий ингибируются ацилами-КоА конкурентно к своим субстратам. Качественная зависимость интенсивности ингибирования от числа углеродов в ацильном заместителе (n) до 10 атома одинакова и линейна в координатах $\lg K_i(n)$ [Morel et al., 1974]. Для дикарбоксилатного транспортера это явление было подтверждено и в опытах по окислению сукцината препаратом митохондрий в присутствии протонофора [Ventura et al., 2005]. Это позволяет предположить сходство ближайшего окружения точки связывания в канале для всех трех переносчиков и использовать для описания ДКТ 3D-модель аденилатного переносчика, как было предложено [Walters and Kaplan, 2004] (Рис. 29а.). На модели показано установленное нами распределение липофильных и гидрофильных зон на внутренней поверхности канала транспортера (Рис. 29а.).

3.7.4. Липофильный профиль канала дрожжевого переносчика. Зондирование канала переносчиков вблизи точки связывания субстратов с помощью конкурентных ингибиторов является весьма информативным. В соответствии с данными, приведенными на Рис. 29, канал митохондриального ДКТ имеет полярную зону в этой области и обладает переменной липофильностью канала. Митохондриальные переносчики отличаются от транспортеров плазматической мембраны размером, количеством трансмембранных сегментов и механизмами функционирования. Их объединяет только наличие канала в структуре. Разумно предположить, что этот канал – единственное место в структуре переносчика, где алифатическая цепь в конкурентном ингибиторе может иметь конформацию с минимальной энергией, как предсказывают углы наклона зависимостей логарифма K_i от длины этой цепи. Одинаковый характер «липофильности» в активных центрах транспортеров и модельной системе (октанол/среда) свидетельствует об изотропном окружении алифатических цепочек ингибиторов в этих центрах. Это позволяет использовать модельные расчеты для определения длины молекулярного зонда в вакууме, поскольку уравновешивающее влияние микроокружения эквивалентно отсутствию этого влияния. Результаты модулирования с использованием программы MM2 Chemoffice оценивают гибкую алифатическую цепочку как стержень, в длину которого вклад проекции каждого метиленового звена составляет 0,13 нм. Мы принимаем, что ДКТ плазмалеммы соответствует модели, в которую вписываются все известные к настоящему времени специфические переносчики небольших гидрофильных молекул. На основе рентгеноструктурных данных с высоким разрешением была создана модель калиевого канала бактерий [Doyle et al., 1998] (Рис. 29б.). Модель содержит цилиндрическую полость – канал (гидрофобный для K^+ канала), большое гидрофильное устье, обращенное во внешнюю среду и меньшее – в цитоплазму. Единственная зона, определяющая селективность канала находится в большом устье. Вход и выход из транспортера всегда окружены выступающим в среду гидрофильным валиком, а канал сформирован преимущественно гидрофобными α -спирализованными трансмембранными сегментами.

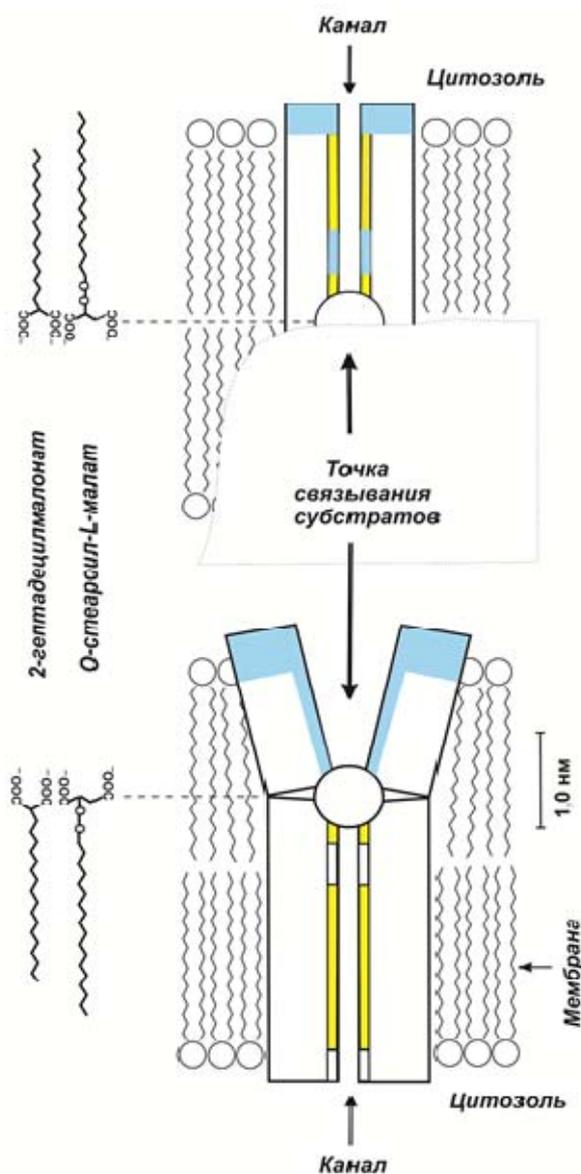


Рис. 29.

а – Модель трансмембранной части канала ДКТ митохондрий ПК (внешнего полуканала), созданная на базе третичной структуры аденилатного переносчика. [Pebay-Peyroula et al., 2003; Walters and Kaplan, 2004].

б – Модель трансмембранной части транспортера ДКБ плазмалеммы *S. cerevisiae*, созданная на базе третичной структуры калиевого канала *E. coli* [Doyle et al., 1998].

Гидрофильная область голубая; липофильная – желтая. Расстояния по вертикали масштабированы, а по горизонтали условны (например, толщина стенок канала и диаметр поры). Длины молекулярных зондов рассчитаны, как описано, см. Результаты и обсуждение, раздел 3.5.

Модель канала *E. coli*, созданная [Doyle et al., 1998], позволила нам утверждать, что алифатический «хвост» амфифильных конкурентных ингибиторов в комплексе с ДКТ плазмалеммы *S. cerevisiae* «опущен» в канал. В противном случае около 80% длины «хвоста» наиболее длинных ингибиторов должна огибать обширную гидрофильную зону, и липофильный профиль (Рис. 25) представлял бы собой параллельную оси абсцисс прямую или участок с небольшим наклоном [Шольц и соавт., 1990]. Если малатная и малонатная головки ингибитора транспортера плазмалеммы *S. cerevisiae* связываются в одной точке, что косвенно подтверждают наши данные по сравнительной эффективности ингибирования итаконатом и L-малатом, то канал переносчика плазматической мембраны остается липофильным на расстоянии 2,52 нм (длина О-стеароил-L-малата) от точки связывания субстрата. Протяженность гидрофобного участка липофильного профиля оценивали как разницу длин О-стеароил-L-малата (2,52 нм) и 2-пентилмалоната (0,75 нм) – самого длинного и самого короткого молекулярных зондов. Она составила около 1,77 нм. В этом, липофильный канал ДКТ плазмалеммы *S. cerevisiae* похож на канал калиевого переносчика бактерий [Doyle et al., 1998], у которого протяженность гидрофобной зоны, рассчитанная из его трехмерной структуры, составляет 2,4 нм. Транспортёр глюкозы плазматической

мембраны клеток человека [Zuniga et al., 2001] имеет гидрофильный канал. Очевидна перспективность разработки новых подходов к «сканированию» каналов переносчиков в нативных условиях.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что суспензия митохондрий в оксиметрической ячейке может быть использована в качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока. Проводимость, индуцированная во внутренней мембране митохондрий ПК, и степень активации окисления ими сукцината связаны линейной зависимостью.

2. Установлено, что существуют два механизма самоассоциации пороформеров в мембране митохондрий: с замедлением образования непроводящей предпору (для мелиттина и мастопарана) и с замедлением образования транспортирующего канала (для аламетицина и тетраацетилмелиттина). Эти механизмы отличаются медленным стабилизирующимся и быстрым не стабилизирующимся характером уменьшения величины трансмембранного потенциала, соответственно.

3. Впервые показано, что стационарную калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина, можно измерить на фоне проводимости его высокоолигомерных форм. Порядок реакции, лимитирующей низкоолигомерную проводимость, близок к двум. Это свидетельствует, что образованная алметицином пора, по-видимому, содержит димеризованный пептид и липид. Аналогичным способом показано, что предпора мастопарана также является димером.

4. Сформулированы, теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены методологические принципы измерения активности нативных транспортеров в интактных системах.

5. Разработаны методы измерения кинетических параметров интактных переносчиков *in situ*, основанные на использовании эндогенных систем окисления моно- ди- и трикарбоксилатов в качестве сопряженных систем измерения транспорта этих соединений. С применением этого подхода впервые показано существование О-пальмитоил-L-малат чувствительного транспортера плазмалеммы *S. cerevisiae*.

6. Впервые показаны нехарактерные для транспортеров плазмалеммы грибов особенности: независимость транспорта от электрохимического градиента, способность транспортировать как сукцинат, так и цитрат, причем в дианионной форме, рН оптимум в щелочной области и рН зависимое модулирование активности однозарядными катионами (Na^+ , K^+ , Tris^+). Предполагаемый механизм транспорта – неэлектрогенный унипорт. Показана широкая субстратная специфичность переносчика (сукцинат, цитрат, фумарат, итаконат, малонат, L- и D-малат).

7. Впервые для изучения активного центра нативного дикарбоксилатного транспортера плазмалеммы *S. cerevisiae* применен метод зондирования с использованием двух рядов непроникающих конкурентных ингибиторов (2-алкилмалонатов и О-ацил-L-малатов). Выявлена протяженная (1,7 нм) липофильная область вблизи точки связывания двухзарядной головки ингибитора. Для внешнего полуканала дикарбоксилатного антипортера митохондрий ПК выявлена липофильная зона (1,2 нм), разделенная гидрофильной площадкой (0,4 нм). С использованием бифункциональных α,ω -алкилендималонатов показано, что малат и малонат в митохондриальном переносчике имеют единую точку связывания.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Обзоры и главы в книгах:

1. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В. Молекулярные характеристики транспортеров дикарбоксилатов и механизм транслокации // **Журнал эволюционной биохимии и физиологии.** – 2009. – Т. 45, № 3. – С. 263-276.
 2. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., L.S. Lagutina and D.I. Bondarenko. Transport of dicarboxylates in *Saccharomyces cerevisiae*. In: “**Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**” Ed.: Antonio Mendez Vilas, Publisher: Formatex Research Center, Spain. – 2010. – V. 2. – P. 1611-1620.
 3. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V. Study on the Dicarboxylates transport into *Saccharomyces cerevisiae* Cell using its Endogenous Coupled System" In: "**Biotechnology in Medicine, Foodstuffs, Biocatalysis, Environment and Biogeotechnology**” Eds.: S.D. Varfolomeev, G.E. Zaikov, L.P. Krylova, Publisher: Nova Publishers, USA/Russia. – 2010. – Chapter 8. P. 65-72.
 4. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Lagutina L.S. *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane dicarboxylate transporter is a probable sensor of extracellular pH. In: “**Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges**”. Ed.: Antonio Mendez Vilas. Publisher: World Scientific Publishing Co., Spain. – 2012. – P. 640-644.
 5. Рогов А.Г., Суханова Е.И, Уральская Л.А., **Аливердиева Д.А.**, Звягильская Р.А. Альтернативная оксидаза: распространение, индукция, свойства, структура, регуляция, функции // **Биохимия.** – 2014. – Т. 79, Вып.13 – С. 1615-1634.
 6. **Aliverdieva D.A.**, Efendieva M.H., Mamaev D.V. Natural pore forming antimicrobial peptides: test for potential toxicity. In: "**Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends**", Publisher: Wageningen Academic Publishers. – 2014. – P. 560-564.
 7. **Aliverdieva D.A.**, Efendieva M.H., Mamaev D.V. Pore forming drugs: antimicrobial mechanism and clinical applications. In: "**Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms**". Ed.: Antonio Mendez Vilas, Publisher: Boca Raton: Brown Walker Press, USA. – 2016. – P. 302-306.
- Статьи:
8. Абрамов Ш.А., Эфендиева Д.А. (**Аливердиева Д.А.**), Котенко С.Ц. Влияние питательной среды на содержание белка в дрожжах *S. cerevisiae* // **Прикладная биохимия и микробиология.** – 1994. – Т. 30, № 2. – С. 275-279.
 9. Абрамов Ш.А., Котенко С.Ц., Эфендиева Д.А. (**Аливердиева Д.А.**), Халилова Э.А., Исламмагомедова Э.А. Новая питательная среда для выращивания дрожжей // **Прикладная биохимия и микробиология.** – 1995. – Т. 31, № 2. – С. 232-233.
 10. Абрамов Ш.А., **Аливердиева Д.А.**, Котенко С.Ц. Морфологические и биохимические свойства нового штамма *Saccharomyces cerevisiae* Y-503 // **Прикладная биохимия и микробиология.** – 1997. – Т.33, № 3. – С. 325-328.
 11. **Аливердиева Д.А.** Сравнительное изучение некоторых параметров энергетического обмена двух штаммов *Saccharomyces cerevisiae* // **Прикладная биохимия и микробиология.** – 2001. – Т. 37, № 1. – С. 90-96.

12. Бондаренко Д.И., **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Шольц К.Ф. Определение проницаемости плазматической мембраны дрожжей для амфифильных соединений // **Доклады Академии наук.** – 2004. – Т. 399, № 5. – С. 693-695.
13. **Аливердиева Д.А.**, Малыгин А.Г., Лагутина Л.С., Шольц К.Ф. Получение клеточных оболочек *Saccharomyces cerevisiae* с целью определения белкового состава // **Прикладная биохимия и микробиология.** – 2004. – Т.40, № 1. – С. 350-353.
14. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Лагутина Л.С., Шольц К.Ф. Особенности изменения содержания субстратов эндогенного дыхания в клетках *Saccharomyces cerevisiae* при низкой температуре // **Биохимия.** – 2006. – Т. 71, Вып.1. – С. 50-58.
15. Мамаев Д.В., **Аливердиева Д.А.**, Бондаренко Д.И., Шольц К.Ф. Изучение топографии активного центра дикарбоксилатного транспортера митохондрий пени крыс с помощью липофильных производных его субстратов // **Биохимия.** – 2006. – Т. 71, Вып. 7. – С. 984-995.
16. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Бондаренко Д.И., Шольц К.Ф. Свойства дикарбоксилатного транспортера плазматической мембраны *Saccharomyces cerevisiae* // **Биохимия.** – 2006. – Т. 71, Вып. 10. – С. 1430-1440.
17. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Бондаренко Д.И., Шольц К.Ф. Изучение топографии активного центра дикарбоксилатного транспортера плазматической мембраны *Saccharomyces cerevisiae* с помощью липофильных производных его субстратов // **Биохимия.** – 2007. – Т. 72, Вып. 3. – С. 325-337.
18. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Бондаренко Д.И. Дикарбоксилатный транспортер плазматической мембраны *Saccharomyces cerevisiae* переносит цитрат и модулируется катионами // **Биологические мембраны.** – 2008. – Т. 25, № 6. – С. 467-478.
19. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Лагутина Л.С. Транспорт сукцината в клетки *Saccharomyces cerevisiae* после продолжительной холодовой преинкубации // **Прикладная биохимия и микробиология.** – 2009. – Т. 45, № 5. – С. 577-485.
20. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В. Транспорт сукцината в клетку *Saccharomyces cerevisiae* не осуществляется через образование его нейтрального комплекса с 2-х зарядными катионами // **Биологические мембраны.** – 2011. – Т. 28, № 2. – С. 153-154.
21. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Snezhkova L, Sholtz Ch.F. Evaluation of molecularity of rate-limiting step of pore formation by antimicrobial peptides studied using mitochondria as a biosensor // **Toxicology in vitro.** – 2012. – V. 26. – P. 939-949.
22. Тренделева Т.А., **Аливердиева Д.А.**, Звягильская Р.А. Механизмы определения низкого уровня кислорода у млекопитающих и дрожжей и их адаптационные ответы. // **Биохимия.** – 2014. – Т. 79, Вып. 8. – С. 944-956.
23. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V. Discrimination of conductance of lower and higher oligomeric alamethicin pores // **International Journal of Membrane Science and Technology.** – 2015. – № 2. – P. 1-4.
24. Рогов А.Г., Тренделева Т.А., **Аливердиева Д.А.**, Р.А. Звягильская. Еще раз о взаимодействии бутилового эфира родамина 19 с митохондриями печени крысы // **Биохимия.** – 2016. – Т. 81, Вып. 4. – С. 432-438.
25. Рогов А.Г, Голева Т.Н., Овченкова А.П., **Аливердиева Д.А.**, Звягильская Р.А. Новые данные о действии SkQ1 и SkQT1 на митохондрии печени крысы и клетки дрожжей // **Биохимия.** – 2018. – Т. 83, Вып. 5. – С. 724-734.

26. **Aliverdieva D.A.**, Durzhinskaya M.H., Snezkova L.G., Mamaev D.V. Mastoparan dissipates mitochondrial transmembrane potential in the physiological (ADP-like) range // **International Journal of Membrane Science and Technology**. – 2019. – V. 6, № 2. – P. 1-4. <http://dx.doi.org/10.15379/2410-1869.2019.06.02.01>.

27. Goleva T.N., Rogov A.G., Korshunova GA, Trendeleva T.A., Mamaev D.V., **Aliverdieva D.A.**, Zvyagil'skaya R.A. SkQThy, the novel promising mitochondria-targeted antioxidant // **Mitochondrion**. 2019. V.49. – P. 206-216.

28. Rogov A. G., Goleva T. N., Suchanova E.I., Ovchenkova A.P., **Aliverdieva D.A.**, Zvyagil'skaya R.A. Mitochondrial disfunctions may be the major causative factors underlying detrimental effects of benzalkonium chloride // **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. – 2020:8956504. doi: 10.1155/2020/8956504. eCollection 2020.

Патенты:

1. Абрамов Ш.А., Котенко С.Ц., Далгатова Б.И., Эфендиева Д.А. (**Аливердиева Д.А.**), Халилова Э.А. Способ получения питательной среды для выращивания хлебопекарных дрожжей. 20845519 RU, МКИ6 С12 № 1/18 // Бюллетень изобретений. 1997. № 20. С 270.

Избранные публикации в материалах конференций:

1. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Bondarenko D.I., Sholtz K.F. Studies on cell respiration of *Saccharomyces cerevisiae*: physiological significance of dicarboxylate transporter of plasma membrane. // 27th FEBS /PABMB Meeting Materials. PW8-005. Portugal, 30 June – 7 July, 2001 // **European Journal of Biochemistry**. 2001. – V. 269. – P. 222-223.

2. **Аливердиева Д.А.** Определение содержания общего белка в концентрированных суспензиях митохондрий. // Тезисы второй международной научной конференции «Биотехнология – окружающей среде», Москва, 25-27 мая 2004 г. // Научные труды международного биотехнологического центра МГУ, 2004. – С. 93.

3. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Sholtz K.F. A comparative sequence analysis of proteins encoded in yeast genomes. // Abstracts ESF-EMBO Symposium on Comparative genomics of eukaryotic microorganisms. Eucaryotic genome evolution, approaches with yeasts and fungi, Sant Feliu de Guixols, Spain, 12 – 17 November, 2005. – P. 80.

4. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Lagutina L.S., Sholtz K.F. Endogenous respiration substrates level in *Saccharomyces cerevisiae* cells. // 14th European Bioenergetics Conference. Moscow, 22 – 27 July, 2006. // **Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics**. EBEC Short reports. – 2006. – Suppl. V. 14. – P. 326-327.

5. Mamaev D.V., **Aliverdieva D.A.**, Bondarenko D.V., Sholtz K.F. Inhibitory analysis of the rat liver mitochondrial dicarboxylate transporter by means of lipophilic derivatives of substrates. // 14th European Bioenergetics Conference. Moscow, 22 – 27 July, 2006. // **Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics**. EBEC Short reports. – 2006 – Suppl.V. 14. – P. 325.

6. Mamaev D.V., **Aliverdieva D.A.**, Bondarenko D.V., Sholtz K.F. The atypical plasmalemmal dicarboxylate transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. // 15th European Bioenergetics Conference. Moscow, 19 – 24 July, 2008. // **Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics**. – 2008. – 1777. EBEC Suppl. – P. 80.

7. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В., Бондаренко Д.И., Шольц К.Ф. Изучение топографии активных центров дикарбоксилатных транспортеров с помощью липофильных

производных субстратов. // Тезисы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, 11-15 мая 2008 г. – С. 554.

8. **Аливердиева Д.А.** Методические подходы к изучению дикарбоксилатного транспортера плазмалеммы дрожжей. // Тезисы Пятой Международной научно-практической конференции "Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности", Санкт-Петербург, 28-30 апреля 2008 г. – С. 269-270.

9. **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В. Изучение транспорта дикарбоксилатов в клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с помощью эндогенной сопряженной системы. // Материалы Пятого Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 16-20 марта 2009. – С. 41-42.

10. **Aliverdieva D.A.** A mitochondrial biosensor for studies of rate-limiting step of pore formation by alamethicin. // **J. Microbial. Biochem. Technol.** – 2011. V. 3, Iss. 6. – P. 72.

11. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Efendieva M.H., Snezhkova L.G. A mitochondrial biosensor for studies of molecularity of rate-limiting step of pore formation by alamethicin, mastoparan and melittin. Abstracts. 38th FEBS Congress. Saint Petersburg, 6 – 11 July, 2013. // **FEBS Journal.** – 2013. – V. 280, Suppl. 1, SW 03. S14-28. – P. 258-259.

12. **Aliverdieva D.A.**, Efendieva M.H., Mamaev D.V. The mitochondria in testing drug-induced toxicity. Abstracts. 39th FEBS EMBO 2014 Conference. Paris. France, 30 August – 4 September, 2014. // **FEBS Journal.** – 2014. – V. 281, Iss. Suppl. s1, CSIII-03 Mitochondria and mitochondrial disorders. – P. 365.

13. Дуржинская М.Х., **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В. Пороформирующие антимикробные пептиды и митохондрии: тест на токсичность. // Материалы VI Съезда биохимиков России. Симпозиум «Биохимия и молекулярная медицина». IX Российский симпозиум "Белки и пептиды": Инновационные лекарственные средства на основе пептидов и белков. Сочи, Дагомыс, 1 – 6 октября 2019 г. // **Acta Naturae.** – Т.2. – С.137.

14. Дуржинская М.Х., **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В. Антимикробный пептид аламетицин: механизм порообразования и перспективы клинического использования. // Научные труды III Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов, VII Съезда биохимиков России. Сочи, Дагомыс, 3 – 8 октября 2021 г. – Т.2. – С.142-143.