

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 2024

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, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», лаборатория биоэнергетики, главный научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Шугаев Александр Григорьевич доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, лаборатория дыхания растений и механизмов его регуляции, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией.

Калеева Татьяна Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», кафедра 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: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН).

Защита состоится « » 2024 г. в час 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 «.....» 2024 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 трансмембранного транспорта соединений обладает рядом не устраненных до настоящего времени недостатков. Изучению количественных параметров мешает гетерогенность 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].

Метод локальной фиксации потенциала (пэтч-кламп) позволяет применять эффекторы только с внутренней стороны биомембраны и не используется для измерения электронеutralного антипорта [Festa, 2022; Bazzone et al., 2023]. При высоком значении K_M для субстрата транспортера может иметь место неспецифическая сорбция на поверхности клеток и удерживание части субстрата в периплазме, искажающие результаты [Benito and Lagunas, 1992]. Преимущества и недостатки существующих методов изучения трансмембранного транспорта обсуждаются в недавно вышедших работах [Schmidt et al., 2022; Lovisolo, 2023; Herianto et al., 2024].

Митохондрии печени крысы и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* признаны удобными модельными объектами исследований. Сукцинатоксидазная ферментативная система митохондрий печени крысы включает дикарбоксилатный транспортер (ДКТ), сукцинатдегидрогеназный комплекс (далее, для краткости, сукцинатдегидрогеназу) и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазу (далее убихинолоксидазную систему). Причем активность компонентов в этом ряду возрастает. Величина K_M для сукцината у переносчика более чем на порядок превышает величину K_M для сукцината в реакции, катализируемой сукцинатдегидрогеназой, 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 до конца не ясен. Показано антибактериальное, антигрибковое, антипаразитарное и противоопухолевое действие аламетицина [Collins et al., 2023; Torre et al., 2023], что связывают с порообразующим действием этого пептида. Мастопаран предотвращает метастазирование в модельных экспериментах и индуцирует апоптоз опухолевых клеток мочевого пузыря [Ren et al., 2023]. Мелиттин рассматривается как

малотоксичный противоопухолевый препарат [Zhang et al., 2016; Pandey et al., 2023], воздействующий на процессы апоптоза, метастазирования, ангиогенеза [Liu et al., 2016]. Показано антимикробное [Huang et al., 2024; Stephani et al., 2024] и нейтропротекторное действие мелиттина [Xing et al., 2024]. Мелиттин ингибирует *in vitro* рост устойчивой к метициллину бактерии *Staphylococcus aureus* и в сочетании с оксациллином эффективен *in vivo* при лечении инфекций, вызванных *S. aureus* [Pereira et al., 2023]. Мелиттин и грамицидин S *in vitro* показали противовирусную активность в отношении SARS-CoV-2, и они рассматриваются в качестве потенциальных противовирусных препаратов [Enayathullah et al., 2022]. Одним из нерешенных вопросов в выяснении механизма порообразования является определение концентрационного порядка лимитирующей стадии этого процесса. Очевидна необходимость разработки методических подходов для исследования действия пороформеров на митохондрии при генерации ими мембранного потенциала ($\Delta\psi$).

C₄-дикарбоксилаты играют важную роль в метаболизме эукариот. В частности, сукцинат и L-малат являются интермедиатами цикла Кребса и обеспечивают взаимосвязь между обменом в пероксисомах и митохондриях. Показана важная роль транспортеров дикарбоксилатов (ДКТ) в обменных процессах, связанных с возникновением системных патологий, таких как диабет, ожирение печени, а также онкологических заболеваний [Korpe et al., 2021; Akhtar et al., 2022; Selim et al., 2023]. 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 дикарбоксилатов эукариот третичная структура не установлена. Описано лишь моделирование трехмерной структуры Na⁺-зависимого ДКТ человека – NaDC3 [Schlessinger, et al., 2014] на основе переносчика цитрата и глутамата *Vibrio cholera* [Mancusso et al., 2012], что позволило предположить локализацию точек связывания субстратов и Na⁺ на противоположных доменах молекулы и подтвердить предположение проведенным мутагенезом [Colas et al., 2017].

Показано, что точка связывания субстрата в ДКТ митохондрий печени крысы экспонирована в просвет канала [Шольц и др., 1990], что позволяет использовать для оценки степени липофильности канала ингибиторный анализ транспорта с помощью серии алкильных и ацильных производных субстрата разной длины [Sholtz et al., 1993; Бондаренко и др., 1996]. Для этой оценки необходимо было разработать или усовершенствовать методы исследования взаимодействия этих амфифильных соединений с митохондриями и клетками без потери интактности ЭСС.

До наших исследований представления о транспорте дикарбоксилатов через плазмалемму *S. cerevisiae* были противоречивыми, а его механизм не изучен, да и сам вопрос о существовании возможного транспортера дикарбоксилатов в плазмалемме *S. cerevisiae* оставался открытым 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 и основные задачи исследования. Цель работы – изучение особенностей порообразования пептидными индукторами катионной проницаемости с использованием митохондрий печени крысы, а также изучение свойств, кинетических параметров и структуры активного центра нативного транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей *S. cerevisiae*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать экспериментальные подходы для определения количественных характеристик нативного переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей *S. cerevisiae* и измерения трансмембранного катионного транспорта (тока) на препаратах митохондрий печени крысы.

2. Получить количественные соотношения между активацией дыхания митохондрий печени крысы и катионным током, индуцированным во внутренней мембране валиномицином, аламетицином, мелиттином, тетраацетилмелиттином (ТАМ) и мастопараном; определить скорость-лимитирующую стадию порообразования для этих пептидов.

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

4. Установить особенности структуры активного центра нативного транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* с использованием метода зондирования активного центра с помощью алкильных и ацильных производных субстратов – конкурентных ингибиторов транспорта; сравнить структуры активных центров транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей и антипортера митохондрий печени крысы.

5. Используя молекулярное моделирование, определить наиболее вероятную конформацию молекул ингибиторов в канале транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* и рассчитать протяженность липофильной зоны канала переносчика.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Теоретически обоснована и экспериментально подтверждена возможность использования митохондрий и клеток в качестве ЭСС для изучения трансмембранного транспорта моно-, ди- и трикарбоновых кислот.

2. Обнаружены два механизма самоассоциации пороформеров во внутренней мембране митохондрий: с замедлением образования непроводящей димерной предпоры и с замедлением образования транспортирующего канала.

3. Показано существование О-пальмитоил-L-малат-чувствительного транспортера дикарбоксилатов в плазмалемме *S. cerevisiae*, обладающего уникальными для транспортеров плазмалеммы дрожжей свойствами: транспорт по механизму неэлектрогенного унипорта, широкой субстратной специфичностью, рН оптимумом в щелочной области, рН-зависимым модулированием транспорта однозарядными катионами.

4. В активном центре транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей *S. cerevisiae*, переносящего гидрофильные субстраты, выявлена протяженная липофильная область, занимающая значительную часть канала вблизи точки связывания субстрата.

Научная новизна работы. Получены новые данные, характеризующие первые этапы порообразования для мелиттина, мастопарана и аламетицина в митохондриях печени крысы, генерирующих $\Delta\psi$. Показана возможность использования суспензии прочносопряженных митохондрий в оксиметрической ячейке в качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока, индуцированного пептидами-пороформерами. Доказано, что проводимость, индуцированная во внутренней мембране митохондрий печени крысы, и степень активации окисления ими сукцината связаны линейной зависимостью. Показано, что с помощью такого подхода можно измерить стационарную калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм при генерации $\Delta\psi$, в условиях низких пептид/липидных соотношений и оценить диаметр поры. Определено соотношение степеней активации дыхания аламетицином, мелиттином или мастопараном в монокалиевой и монолитиевой средах при одинаковом значении $\Delta\psi$. Высказано предположение о том, что в присутствии аламетицина и тетраацетилмелиттина проводимость лимитируются реакцией образования поры, а в присутствии мелиттина или мастопарана – стадией, предшествующей порообразованию. На основании обобщения многолетнего экспериментального материала 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. Показано, что в диапазоне от pH 5,5 до pH 7,5, транспорт сукцината через плазмалемму *S. cerevisiae* опосредован O-пальмитоил-L-малат чувствительным транспортером с уникальными и нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами: широкой субстратной специфичностью, оптимумом в области щелочных значений pH, pH-зависимым модулированием транспорта однозарядными катионами; механизм транспорта – неэлектрогенный унипорт. Впервые с помощью непроникающих в клетку конкурентных ингибиторов 2-алкилмалонатов изучена структура канала транспортера вблизи точки связывания субстрата. Скорректированы модели трехмерных структур переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* и ДКТ митохондрий печени крысы с разным механизмом функционирования.

Практическая значимость. Научно-практическую ценность имеют разработанные или усовершенствованные методы использования амфифильных эффекторов и методология изучения нативных транспортеров в интактных системах. Методы, разработанные при изучении транспортера *S. cerevisiae*, применимы для изучения и поиска малоактивных переносчиков окисляемых субстратов дрожжей. Проведенное нами зондирование активных центров переносчиков дикарбоксилатов с использованием линейки производных субстратов с монотонно увеличивающимся алифатическим заместителем в отсутствие рентгеноструктурных данных о третичной структуре транспортеров дикарбоксилатов является в настоящее время единственным источником детальной информации о структуре их активных центров. Методический подход, основанный на использовании суспензии прочносопряженных митохондрий в оксиметрической ячейке в качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока, примененный нами при изучении четырех

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 (Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств) 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 при генерации $\Delta\psi$ 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.

Методология и методы исследования. Работа выполнена с привлечением комплекса методов молекулярной биологии (ПЦР, секвенирование, молекулярное кариотипирование), микробиологии (культивирование микроорганизмов, микроскопия), биохимии (спектрофотометрия, флуориметрия, амперометрия). В процессе работы были также использованы методы ферментативной кинетики и молекулярного моделирования. Многие из используемых методов были разработаны или оптимизированы в лаборатории.

Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов обусловлена репрезентативным объемом экспериментального материала, подтверждается воспроизводимостью результатов, полученных разными методами, соответствующими поставленным задачам. Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли в соответствии с общепринятыми алгоритмами.

Личный вклад соискателя заключался в выборе направления исследований, постановке задач, разработке и развитии новых методических подходов, анализе и обобщении экспериментальных данных, полученных лично автором или при его непосредственном участии, а также в подготовке и оформлении материалов научных публикаций, в том числе при выполнении под его руководством работ по проектам РФФИ.

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 BioMicroWorld 2013 (Мадрид, Испания, 2013), 27-ой конференции FEBS/PABMB (Лиссабон, Португалия, 2001) Европейских Биоэнергетических конференциях (ЕБЕС) (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), Всероссийской конференции с международным участием «Теоретические и практические аспекты действия естественной и искусственной гипотермии на организм» (Махачкала, 2023).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 47 работ, в т.ч. 24 статьи в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, из них 22 – в научных журналах, индексируемых в базе данных Web of Science. В соавторстве получены 2 российских патента на изобретение. Данные диссертации представлены в 5 статьях, включенных в книги зарубежных издательств, в том числе, в качестве глав: “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.

Финансовая поддержка. Работа была поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№№ 04-04-49670а, 07-04-00225а (руководитель Д.А. Аливердиева), 06-04-030786, 07-04-050246, 08-04-050026 (руководитель член-корреспондент РАН М-Р.Д. Магомедов)).

Место проведения работы. Диссертационная работа выполнена в лаборатории биоэнергетики Института биохимии им. А.Н. Баха РАН (ФИЦ Биотехнологии РАН) и в лаборатории биохимии и биотехнологии Прикаспийского института биологических ресурсов ДФИЦ РАН.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, трех основных глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение), заключения, выводов, и списка литературы, изложена на 271 странице машинописного текста и содержит 60 рисунков, 9 таблиц и 465 источников литературы.

Сокращения, принятые в тексте. БЛМ – бислойная липидная мембрана; БСА – бычий сывороточный альбумин; ДК – дыхательный контроль; ДКТ – дикарбоксилатный транспортер; ДМСО – диметилсульфоксид; КЛМ – концентрация пептида, вызывающая лизис митохондрий; СМЧ – субмитохондриальные частицы; ТАМ – тетраацетилмелиттин; ЭСС – эндогенная сопряженная система; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; A_{200} – концентрация пептида, активирующая v_4 на 200%; C_m – мембранная концентрация пептида, соответствующая A_{200} ; F – флуоресценция; FCCP – карбонилцианид(4-флюорометокси)фенилгидразон; FDA - (*англ.* Food and Drug Administration) – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств; NEPES –4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота; I_{50} – концентрация ингибитора, вызывающая полумаксимальный эффект; K_i – константа ингибирования; K_M – константа Михаэлиса; K_p – коэффициент распределения амфифильного эффектора между митохондриями печени крысы и средой; MES –2-(N-морфолино)этансульфоновая 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-оксибензилиденмалононитрил; 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 – (*англ.* Yeast Nitrogen Base) среда выращивания дрожжей; λ – удельное содержание липида в митохондриях; $\Delta\psi$ – потенциал, генерируемый на внутренней митохондриальной мембране.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы описана роль транспортеров дикарбоксилатов в метаболизме клетки, подробно проанализированы молекулярные характеристики транспортеров C_4 -дикарбоксилатов, 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, рассмотрено медицинское значение пороформеров. Обсуждены 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

Модельные организмы. В работе использовали 2-3-х-месячных самцов крысы линии Wistar. В качестве другой экспериментальной модели использовали дрожжи *S. cerevisiae*, штамм S288с, использованный для секвенирования генома *S. cerevisiae* (SGD <https://www.yeastgenome.org/>), от проф. Л. Малле (Франция), штаммы Y-502, Y-503, Y-5030, YNN 295, *S. paradoxus* N17, *S. bayanus* MCYC 623, YBS618, YBS817 и YBS24 из коллекции ВКПМ и ГосНИИ Генетика НИЦ Курчатовский институт (Россия).

Молекулярно генетическая характеристика штамма дрожжей. Тетраплоидность штамма Y-503 была подтверждена С.В. Беневоленским (ГосНИИгенетика НИЦ "Курчатовский институт"). Определение удельного содержания хромосомной ДНК в клетках штаммов проводили, как описано [Hoffman and Winston, 1987]. Принадлежность этого штамма к *S. cerevisiae* показана Е.С. Наумовой (ГосНИИгенетика НИЦ "Курчатовский институт") молекулярно-генетическими методами.

Условия выращивания и предобработки клеток *S. cerevisiae*. Инокулят выращивали при 28°C в полусинтетической среде, содержащей 0,2%-ный дрожжевой экстракт, 1%-ную глюкозу, 0,21 % KH_2PO_4 (pH 4,5), в отдельных случаях без добавления фосфата, затем медленно охлаждали до 4°C без в течение не менее 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 KH_2PO_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 в течение 3 мин и трижды промывали дистиллированной водой (при 0°C). Затем клетки суспендировали в 10

мМ K_2HPO_4 , рН 5,5, до концентрации 0,5 г сырой биомассы 1 мл (далее – г/мл). Перед опытом эту суспензию преинкубировали при 0°C, интенсивно перемешивая.

Состав сред инкубации приведен в подписях к рисункам. За исключением оговоренных случаев все среды, содержали цитохром с (4 мкМ). Тоничность всех сред довели до 270 мосМ, варьируя концентрацию сахарозы.

Прочносопряженные митохондрии печени крысы выделяли по модифицированной методике Вейнбаха [Мосолова и др., 1971]. Величины дыхательного контроля (ДК), рассчитанные, как рекомендовано [Chance and Williams, 1955], при окислении сукцинита митохондриями в среде инкубации, содержащей 125 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl_2 , 10 мМ K_2HPO_4 , 10 мМ сукцинат Na, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 20 мМ Tris-HCl (рН 7,2) составляли – $5,14 \pm 0,65$. Скорость окисления сукцината митохондриями в отсутствие активаторов (v_4) составляла $11,43 \pm 0,5$ нмоль/мин мг белка. Величины ДК в среде, содержащей 194 мМ сахарозу, 2 мМ ЭДТА, 6 мМ MgCl_2 , 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 10 мМ HEPES, рН 7,5, при замене 0,3 мМ K_2HPO_4 на 0,3 мМ LiH_2PO_4 были одинаковыми. Стандартная концентрация митохондрий печени крысы в оксиметрической ячейке, если не отмечено специально, составляла 0,25 мг белка/мл. Скорости окисления сукцината дрожжевыми клетками после их аэробной инкубации для истощения эндогенных субстратов в ходе эксперимента менялась незначительно (2-4%).

Белок митохондрий определяли методом Бредфорд [Bradford, 1976], модифицированным для концентрированных суспензий митохондрий [Аливердиева и др., 1984].

Субмитохондриальные частицы (СМЧ) из митохондрий печени крысы и их сукцинат: феррицианидредуктазную активность в среде, содержащей 125 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 2 мМ MgCl_2 , 10 мМ K_2HPO_4 , ротенон 2 мкг/мг белка, 4 мкМ цитохром с, 20 мМ Tris-HCl, рН 7,2, митохондрии (0,25 мг белка/мл) определяли, как рекомендовано [Шольц и др., 1990].

Митохондрии с поврежденной внешней мембраной получали непосредственно в ячейке для измерения кислорода, добавляя митохондрии печени крысы в гипотоническую среду, содержащую 10 мМ сукцинат, 2 мМ ЭДТА, 2,5 мМ MgCl_2 и 10 мМ Tris, рН 7,2 и добавляя 100 мМ сахарозу через 1 мин, как рекомендовано [Мамаев и др., 1985].

Митохондрии дрожжей выделяли как рекомендовано [Bazhenova et al., 1998] и по модифицированной нами методике: для получения протопластов использовали комплекс литических ферментов - литиказу, в среде промывания протопластов фосфат заменяли на 3 мМ HEPES и добавляли 5 мМ MgCl_2 ; в среду промывания митохондрий добавляли 5 мМ MgCl_2 и исключали бычий сывороточный альбумин (БСА).

Скорость поглощения кислорода клетками, митохондриями печени крысы и митохондриями дрожжей измеряли амперометрически с закрытым электродом Кларка в термостатируемой ячейке [Шольц, Островский, 1975]. Ротенон добавляли непосредственно перед добавлением митохондрий. Клетки *S. cerevisiae* инкубировали при 28 и 30°C, митохондрии – при 25 °C.

Генерацию мембранного потенциала ($\Delta\psi$) митохондриями печени крысы измеряли по [Emaus et al., 1986] по изменению флуоресценции 0,4 мкМ родамина123 (при 503/527 нм) на флуориметре Shimadzu RF-5301 PC (Япония). В контрольных опытах было показано, что

типичный индуктор проницаемости митохондрий (аламетицин), вызывающий их набухание, не искажал флуоресценцию за время измерения.

Коэффициент распределения (K_p) между митохондриями печени крысы и средой инкубации, определяли, как рекомендовано [Шольц и др., 1980], но в условиях, исключающих индукцию эндогенных проводимостей в сопрягающей мембране митохондрий печени крысы.

Набухание митохондрий регистрировали турбидиметрически при 610 нм и спектрофотометрически при 540 нм спектрофотометре Varian Cary 300 Bio (США) или спектрофотометре Hitachi-557 (Япония).

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 [Бондаренко и др., 2004].

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

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. Поскольку, как было показано в контрольных опытах, скорости окисления субстратов митохондриями печени крысы и клетками оставались неизменными в течение всего времени эксперимента, зависимости этих скоростей от концентраций эффектора получали в одной оксиграмме, последовательно добавляя аликвоты эффектора. Для относительной активации v_4 митохондрий ($v_{+\text{эффектор}}/v_4$), а также величин I_{50} , K_i , K_M или V_{max} разброс значений указан в тексте. Для α,ω -алкилендималонатов (опыты с митохондриями печени крысы) и прототонофоров (опыты с клетками дрожжей) каждую константу определяли не менее, чем в 3-х независимых экспериментах.

При изучении дрожжей и выделенных из них митохондрий из скорости окисления экзогенных (добавленных) 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 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 отсутствие 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. Концентрация клеток указана в мг сухого веса в мл.

Значения I_{50} высших 2-алкилмалонатов, начиная с 2-додecilмалоната, 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 митохондрий или клеток, как рекомендовано [Heirwegh et al., 1988].

Величину мембранного потенциала, генерируемого митохондриями печени крысы ($\Delta\psi$) рассчитывали по эмпирическому уравнению $-\Delta F/F = (\Delta\psi - 60)/323$, как описано в [Emaus et al., 1986], где ΔF – разница величин флуоресценции (F) до и после добавления прототонофора. Если значения $\Delta\psi$ в разных средах инкубации отличались, то при расчете соотношения

активаций дыхания митохондрий и пропорциональных им трансмембранных токов в этих средах мы вводили поправку согласно закону Фарадея.

2-Алкилмалонаты и О-ацил-L-малаты были синтезированы и очищены в лаборатории биоэнергетики ИНБИ РАН Д.И. Бондаренко. Аламетицин был синтезирован и любезно предоставлен проф. К.Л. Райнхартом (Иллинойский университет, США), этот препарат использован в большинстве опытов, использовали также аламетицин из *Trichoderma viride* («Fluka», Швейцария). Мелиттин из *Apis mellifera* и мастопаран из *Vespa orientalis*, были любезно предоставлены Л.Г. Снежковой (ИБХ РАН), родамина 19 бутиловый эфир, SkQ1 (10-(4,5-диметил-3,6-диоксо-1,4-циклогексадиен-1-ил)децилтрифенилфосфоний) и SkQThy (10-(2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинонил-6)децилтрифенилфосфоний) были любезно предоставлены Г.А. Коршуновой, SkQ3 (10-(2,4,5-триметил-3,6-диоксо-1,4-циклогексадиен-1-ил)децилтрифенилфосфоний) и MitoQ (10-(4,5-диметокси-2-метил-3,6-диоксо-1,4-циклогексадиен-1-ил)децилтрифенил-фосфоний) – Д.С. Есиповым, Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ.

Глава 3. Основные результаты и их обсуждение

3.1. Митохондрии печени крысы – биосенсоры трансмембранного тока

3.1.1. Оценка степени гомогенности и стабильности митопластов, образующихся из митохондрий печени крысы при действии индукторов проницаемости.

Под действием индукторов катионной проницаемости (в том числе валиномицина) дышащие митохондрии печени крысы набухали, их внешняя мембрана могла повредиться, и митохондрии могли стать митопластами (лишенными внешней мембраны). В контрольных опытах было показано (Рис. 1), что протонфор SF существенно активировал скорость окисления сукцината митохондриями, и активность сукцинатоксидазной системы на 90% ингибировалась 2,2-дигексилмалонатом при сохранении линейности (однофазности) в координатах Диксона, что свидетельствовало о том, что доля митохондрий с неповрежденной внутренней мембраной составляла около 88 % препарата.

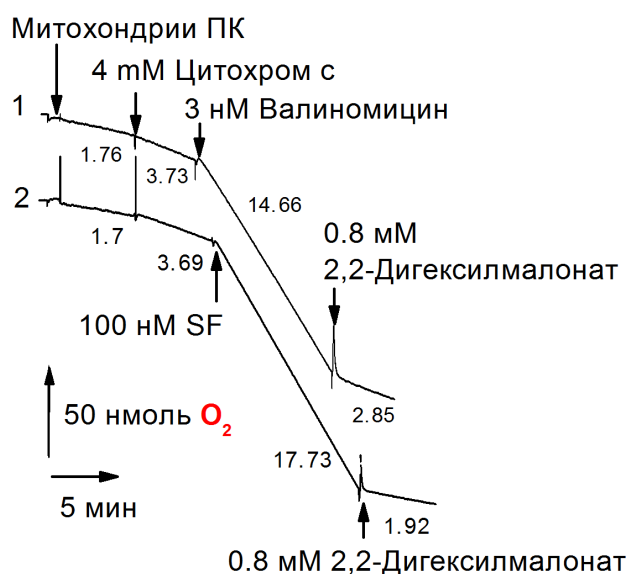


Рис. 1. Активация v_4 митохондрий печени крысы валиномицином (кривая 1) или протонфором SF (кривая 2). Цифры при оксиграммах – скорости окисления в нмоль O₂/мин.

Среда инкубации содержала 125 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 10 мМ KH₂PO₄, 10 мМ сукцинат Na, ротенон (2 мкг/мг белка), 20 мМ Tris-HCl (pH 7,2), митохондрии (0,25 мг белка/мл) и дополнительно 4 мкМ цитохром с (1).

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

При измерении калиевого трансмембранного тока в митохондриях печени крысы использовали валиномицин, который имеет простой механизм индукции калиевого тока [Овчинников и др., 1974]. Согласно данным литературы, при избытке K^+ калиевый ток пропорционален концентрации пептида в мембране [Naumowicz et al., 2006], т.е. благодаря высокому K_p $(1,25 \pm 0,2) \times 10^5$ [Шольц и др., 1985] – общей концентрации в системе. На Рис. 2а. представлена зависимость относительной скорости активации v_4 митохондрий печени крысы от концентрации валиномицина в присутствии разных концентраций K^+ в среде инкубации. Зависимость этих скоростей от концентрации пептида получали в одной оксиграмме, последовательно добавляя его. Эта скорость была стабильна в течение 2-16 мин (Рис. 2б.). Стационарную активацию v_4 измеряли при стабильном значении $\Delta\psi$.

При измерении величины мембранного потенциала мы отказались от использования сафранина, поскольку он влиял на действие исследуемых пороформеров (возможно, взаимодействуя с ними). Использовали родамин 123 [Emaus et al., 1986], который был лишен этого недостатка. Согласно данным, приведенным на Рис. 2а., активация v_4 валиномицином была пропорциональна его концентрации. Было высказано предположение, что и величина калиевого трансмембранного тока пропорциональна этой активации.

Для проверки этого предположения определили концентрационный порядок реакции, лимитирующей калиевый ток, индуцированный мелиттином. На Рис. 3а. показано, что относительная активация v_4 митохондрий пептидом стабилизировалась на 5-6 мин, синхронно стабилизировалась и величина $\Delta\psi$ (Рис. 3б.). При этом активация v_4 менялась с изменением концентрации пептида более радикально, чем уровень равновесного потенциала.

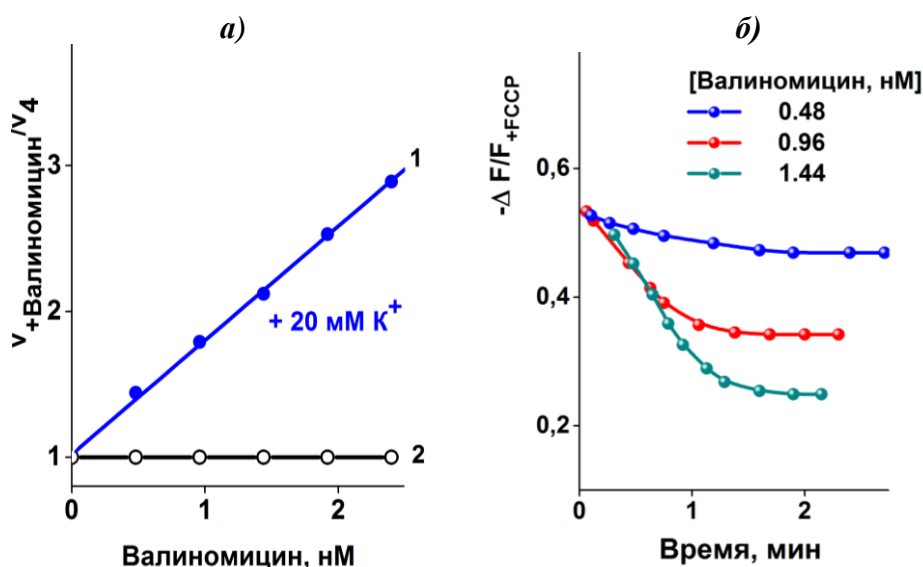


Рис. 2. Активация v_4 митохондрий печени крысы валиномицином (а). Влияние различных концентраций валиномицина на величину мембранного потенциала, генерируемого митохондриями печени крысы (б). Среда инкубации (а) содержала: 209 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 1 мМ KН₂РO₄, 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 30 мМ Tris-HCl, рН 7,2 (кривая 1) или не содержала 20 мМ KCl (кривая 2), и митохондрии (0,25 мг белка/мл). Среда инкубации (б), как на рис. (а, кривая 1), но была дополнена 0,4 мкМ родамином 123.

Если принять, что относительная активация v_4 митохондрий пропорциональна величине калиевого трансмембранного тока, и мелиттин не имел побочных действий на митохондрии печени крысы, 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 выхода из липосом репортерного красителя под действием пептида [Takei et al, 1999].

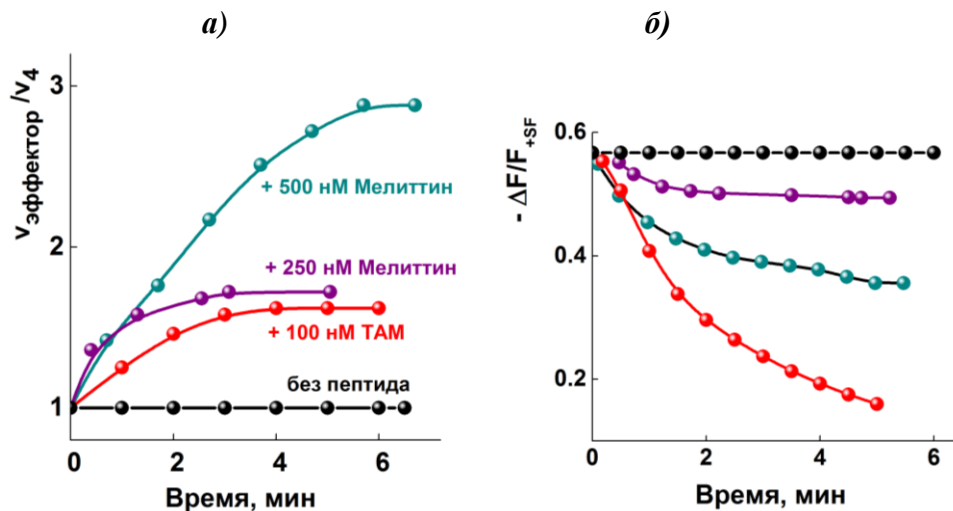


Рис. 3. Активация v_4 митохондрий печени крысы 250, 500 нМ мелиттином и 100 нМ ТАМ (а). Влияние мелиттина и ТАМ на величину мембранного потенциала, генерируемого митохондриями печени крысы (б). Среда инкубации (а) содержала: 176 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 10 мМ KН₂PO₄, 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 10 мМ HEPES (pH 7,5) и митохондрии (0,25 мг белка/мл). Среда инкубации (б) содержала 194 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 1 мМ KН₂PO₄, 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 10 мМ HEPES (pH 7,5), 0,4 мкМ родамин 123 и митохондрии (0,25 мг белка/мл).

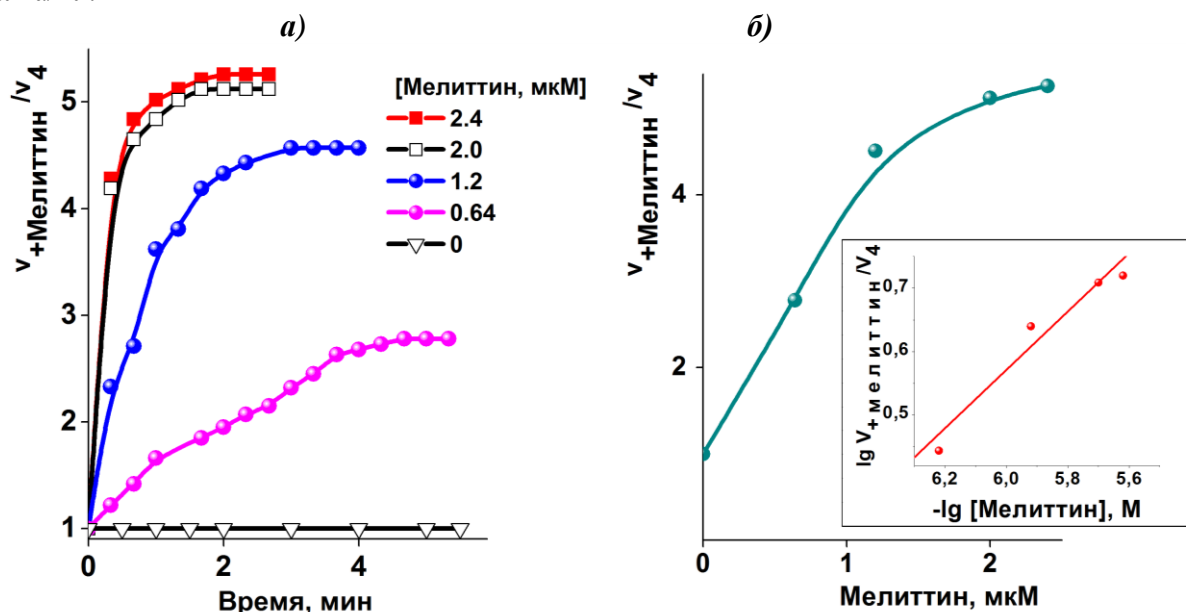


Рис. 4. Активация v_4 митохондрий печени крысы в присутствии различных концентраций мелиттина (а). Зависимость максимальной активации v_4 от концентрации мелиттина (б). Среда инкубации содержала: 176 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 10 мМ KН₂PO₄, 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 10 мМ HEPES (pH 7,5) и митохондрии (0,25 мг белка/мл).

Концентрационный порядок активации v_4 митохондрий печени крысы мелиттином составил 2,16 (среднее значение – $2,01 \pm 0,15$) (Рис. 4) (измерения проводили в условиях, исключающих индукцию иных эндогенных проводимостей [O'Rourke, 2007; Belosludtsev et al., 2006; Szewczyk et al., 2009]). Благодаря высокому значению K_p для мелиттина [Шольц и др., 1980], вероятно, весь пептид связан с внутренней мембраной, содержащей большую часть митохондриального липида.

Показана линейная зависимость активации v_4 от концентрации валиномицина в той же среде, она была использована как быстрый тест на пропорциональность активации v_4 митохондрий печени крысы и калиевого трансмембранного тока в средах инкубации митохондрий, содержащих калий. Линейный характер зависимости активации v_4 от концентрации валиномицина сохранялся вплоть до 4-х кратной активации во всех используемых нами средах инкубации. Таким образом, препарат митохондрий печени крысы и оксиметр можно использовать как биосенсор калиевого трансмембранного тока, индуцированного пороформерами во внутренней мембране органелл.

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

3.2.1. Сукцинатоксидазная ферментативная система препарата митохондрий печени крысы в присутствии протонофора 3,5-ди-*трет*-бутил-4-оксипензилиденмалонитрила (SF) - эндогенная сопряженная система для измерения транспорта интактным ДКТ.

Суммарная активность сукцинатоксидазной системы митохондрий может определяться в разных условиях как скоростью переноса сукцината через мембрану посредством ДКТ, так и активностями сукцинатдегидрогеназы и убихинолксидазной системы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) (Рис. 5).

Специфический ингибитор лимитирующего звена ферментативной цепи должен показывать линейную зависимость ингибирования в координатах Диксона. Лимитирующим звеном сукцинатоксидазной системы митопластов, обедненных по цитохрому с, являлась убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза [Шольц и др., 1985]. Было показано отклонение от линейной зависимости для бутилмалоната (специфического ингибитора ДКТ) [Мамаев, Аливердиева и др., 2006]. В присутствии избытка экзогенного цитохрома с линейность восстанавливалась и становилась такой же, как у интактных митохондрий.

ЭСС митохондрий печени крысы позволяют быстро и с большой точностью измерить скорость транспорта субстрата интактными переносчиками. Важно, что сродство сукцината к ДКТ на порядок ниже его сродства к сукцинатдегидрогеназной системе, и ДКТ является лимитирующим звеном окисления сукцината в митохондриях печени крысы. Величина K_M ($1,01 \pm 0,21$ мМ) для сукцината в реакции, катализируемой сукцинатдегидрогеназой, и величина K_i ($0,17 \pm 0,025$ мМ) для непроникающего в митохондрии бутилмалоната, конкурентного ингибитора ДКТ [Шольц и др., 1990], измеренные с помощью сукцинатоксидазной системы митохондрий печени крысы, были близки к результатам, полученным для ДКТ прямыми радиоизотопными методами измерения транспорта сукцината в органеллы ($K_M = 1,17$ мМ [Palmieri et al., 1971; Passarella and Quagliariello, 1976], $K_i = 0,15$ мМ [Meijer and van Dam, 1981]).

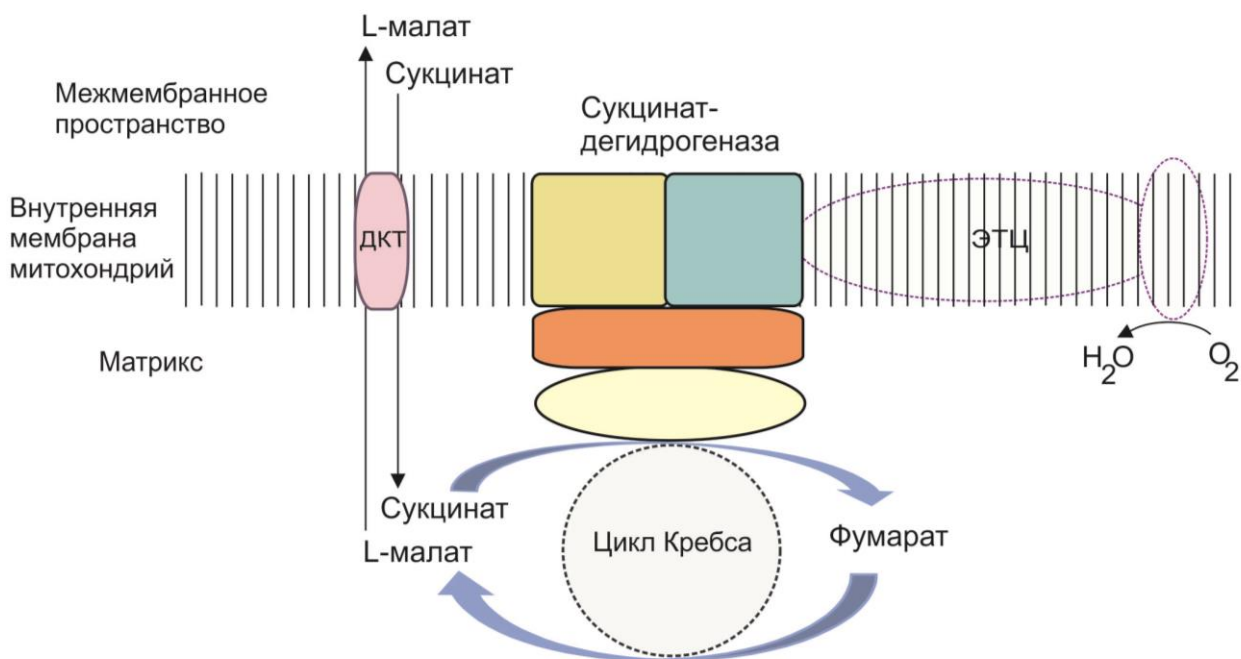


Рис. 5. Транспорт сукцината ДКТ и окисление этого субстрата митохондриями печени крысы (схема)

При изучении влияния эффекторов на транспорт сукцината проверяли отсутствие их побочного действия на компоненты ЭСС. Известно, что все 2-моно- и 2,2-диалкилмалонаты ингибировали сукцинатдегидрогеназу более чем на порядок эффективнее, чем ДКТ [Шольц и др., 1990]. Показано, что О-ацил-L-малаты или не проникали в матрикс митохондрий к сукцинатдегидрогеназе (активный центр которой экспонирован в матрикс митохондрий), или действовали на нее слабее, чем на ДКТ (результат получен в соавторстве с Д.В. Мамаевым [Мамаев, Аливердиева и др., 2006]). Во всех опытах для каждого эффектора (ингибитора) мы проверяли отсутствие его влияния на убихинол-цитохром с-оксидоредуктазу и на сукцинатдегидрогеназу. Все ингибиторы (амфифильные соединения), использованные в наших исследованиях, были слабыми протонифорами. Величина A_{200} (концентрация пептида, активирующая v_4 на 200%) значительно превышала I_{50} конкурентного ингибирования системы окисления сукцината этих митохондрий, т.е. в зоне ингибирования использованные амфифильные соединения не проникали в митохондрии и действовали на ДКТ только с цитоплазматической стороны. Непроницаемость плазмалеммы дрожжей для использованных ингибиторов транспорта дикарбоксилатов была показана в специальных опытах (раздел 3.2.2.).

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

Подбор условий для измерения низкой скорости окисления сукцината. Сукцинатоксидазная ферментативная система клеток состояла из предполагаемого переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы, ДКТ митохондрий, сукцинатдегидрогеназного

и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазного комплексов ЭТЦ (Рис. 6). Однако такие клетки имели высокий уровень эндогенного (фонового) дыхания (v_e).

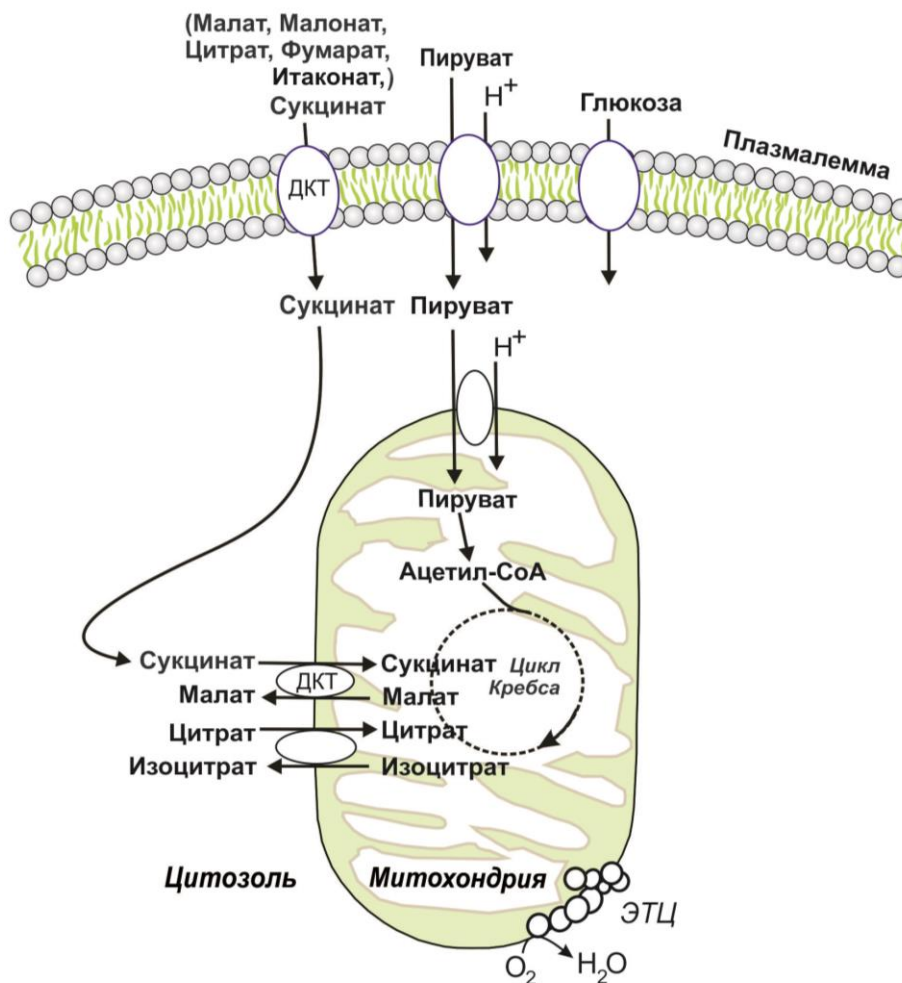


Рисунок 6. Транспорт и окисление субстратов клетками *S. cerevisiae* (на основе информации из [Machicka et al., 2004; Casal et al., 2016] и собственных результатов).

Аэробная преинкубации при 0°C густой суспензии клеток, отмытых при температуре 0°C (см. раздел Материалы и методы), через 9-25 ч приводила к радикальному уменьшению скорости такого дыхания (сравнить зависимости в присутствии и в отсутствие сукцината на Рис. 7а.). Скорость дыхания клеток в присутствии сукцината за вычетом v_e между 9-м и 25-м часом практически не менялась (см. Рис. 7б.). Это свидетельствовало о том, что снижение v_e , а также скорости окисления пирувата и глюкозы (Рис. 7а.) не были связаны с гибелью клеток в ходе преинкубации. Поскольку антимицин А (ингибитор убихинолоксидазной системы митохондрий) полностью подавлял дыхание дрожжевых клеток на сукцинате, глюкозе и пирувате, митохондриальные окислительные системы – это единственный путь окисления этих субстратов в клетке в условиях наших опытов.

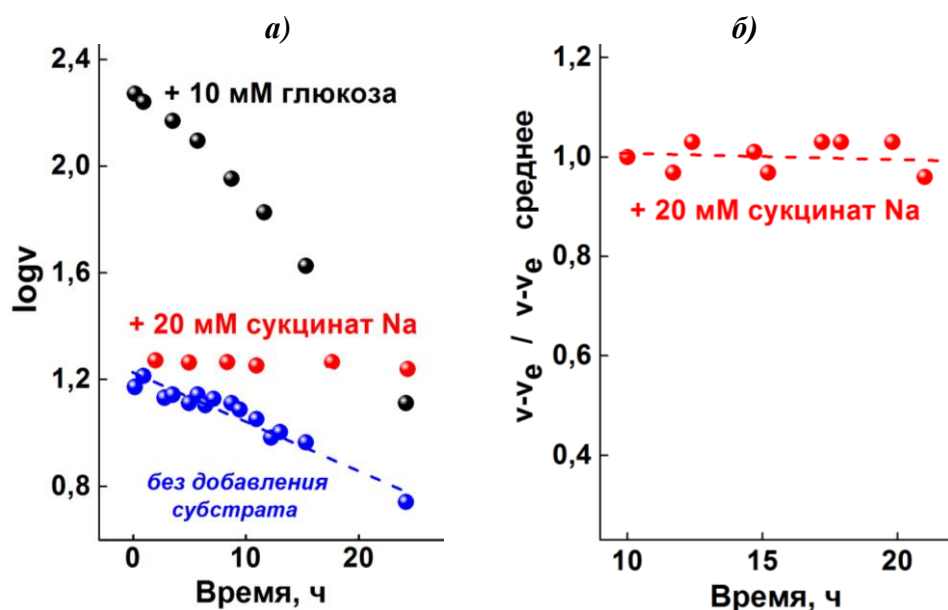


Рис. 7. Окисление клетками *S. cerevisiae* эндогенных субстратов (v_0), 10 мМ глюкозы и 20 мМ сукцината натрия при 30°C от времени аэробной преинкубации при 0°C (а). Окисление 20 мМ сукцината натрия в ходе аэробной преинкубации при 0°C (б).
Среда инкубации содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), клетки 5 мг/мл.

Эквивалентность прямого и непрямого метода измерения транспорта пирувата в клетки *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 на синтетической среде, v_e стабилизировалась уже через полтора часа (Рис. 8а., оксиграмма 1). Ферментативную систему окисления пирувата в клетках, окисляющую перенесенный в цитоплазму пируват (Рис.6), далее будем называть пируватоксидазной системой клеток.

Стабильная скорость окисления пирувата устанавливалась через 6 мин и сохранялась в течение 11 мин (Рис. 8а., оксиграмма 2). Это позволило измерить скорость дыхания в присутствии 4-х концентраций пирувата в одной оксиметрической кривой (Рис. 8а., оксиграмма 3). Начиная со второй добавки, стационарная скорость окисления пирувата стабилизировалась в течение 1,5 мин. Скорость пируватоксидазной системы в присутствии 4 мМ пирувата не зависела от времени преинкубации дрожжей в течение 4-х часов (Рис. 8б. плато на кривой 2). В то же время скорость с насыщающей концентрацией субстрата (20 мМ) неуклонно снижалась (Рис. 8б., кривая 1).

Обработка оксиграммы 3 из Рис. 8а. в координатах Лайнуивера-Берка позволила рассчитать значения $V_{\max} = 25$ нмоль O_2 /мин и $K_M = 4,2$ мМ (среднее значение из трех опытов – $5,2 \pm 1,0$ мМ). Эта величина K_M близка 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 величине K_M для монокарбоксилатного переносчика митохондрий (0,8 мМ [Nałęcz et al., 1991]).

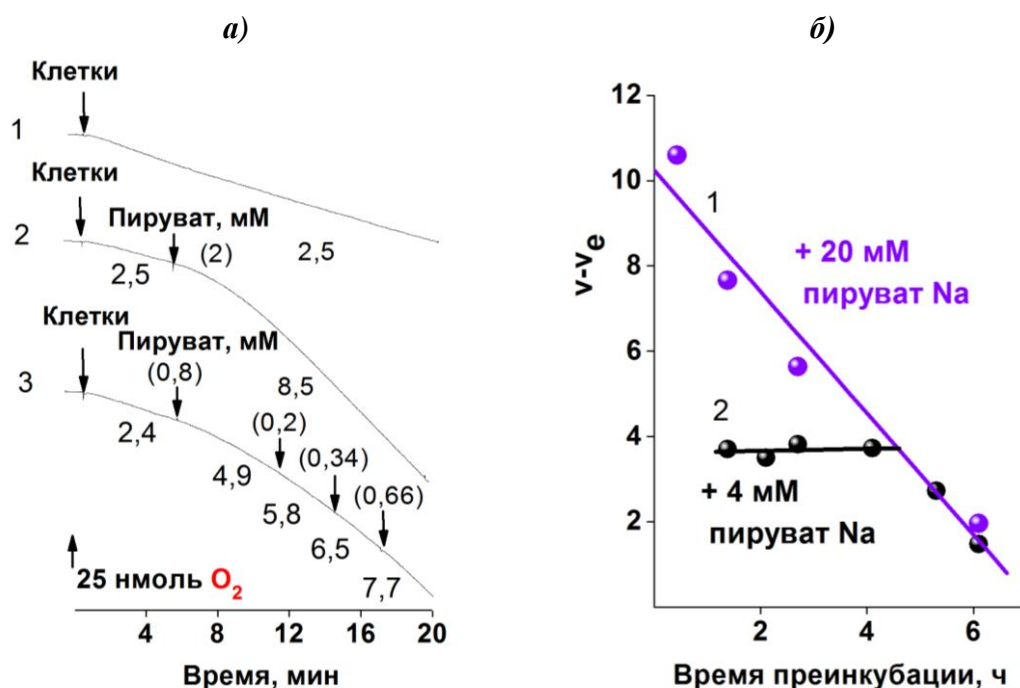


Рис. 8. Поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae* в отсутствие и в присутствии пирувата натрия (а). Окисление 4 мМ или 20 мМ пирувата натрия клетками *S. cerevisiae* в зависимости от времени их аэробной преинкубации при 0°C (б).

Среда инкубации, содержащая 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), была дополнена клетками (1,5 мг/мл). Цифры при оксиграммах (а) - скорости окисления в нмоль O₂/мин. Время аэробной преинкубации клеток при 0°C 1,4, 2,1 и 2,7 ч (кривые 1, 2 и 3, соответственно).

Скорость окисления экзогенного субстрата клеткой будет определяться скоростью его транспорта через плазмалемму при сочетании 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. Именно такой подход мы применили к неисследованному 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 О-пальмитоил-L-малата (Рис. 9а., оксиграммы 2 и 1, соответственно) позволили рассчитать зависимости скоростей дыхания от концентраций субстрата и ингибитора на одной оксиграмме (Рис. 9б.). В координатах Лайнуивера-Берка и Диксона, соответственно, они составили K_M (5,6 мМ), V_{max} (4,17 нмол O₂/мин) и I_{50} для О-пальмитоил-L-малата (37,3 мкМ). Линейная зависимость этого ингибирования сукцинатоксидазного комплекса клеток в координатах Диксона свидетельствовала о его действии на лимитирующее звено ЭСС и о связывании ингибитора с ней в одной точке.

В специальных экспериментах было показано, что пермеабиллизация мембран ДМСО не влияла на накопление клетками карбонилцианид(4-флюорометокси)фенилгидразона (FCCP), известно, что протонофоры легко проникают в неповрежденные клетки [Beauvoit et al.,

1991], но существенно увеличивала стационарное накопление О-пальмитоил-L-малата, который, по-видимому, не проникал в неповрежденную клетку.

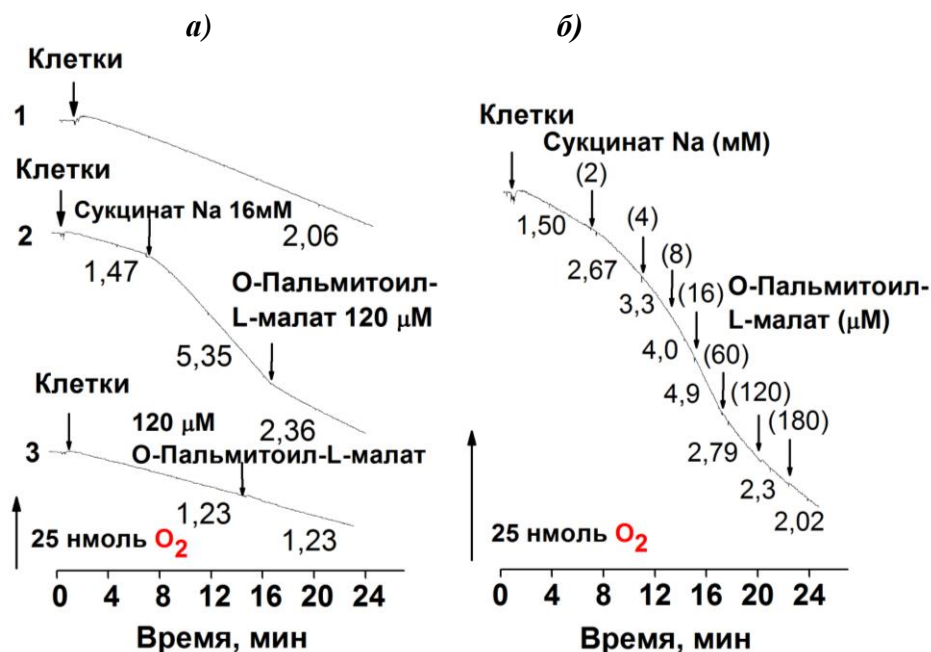


Рис. 9. Поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae*. в отсутствие эффекторов (кривая 1), в присутствии сукцината натрия и О-пальмитоил-L-малата (кривая 2) и в присутствии О-пальмитоил-L-малата (кривая 3) (а). Поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae* при последовательном добавлении сукцината и О-пальмитоил-L-малата (б). Среда инкубации (а) содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5). Добавки: 16 мМ сукцинат натрия, 120 мкМ О-пальмитоил-L-малат, клетки (5 мг/мл). Время аэробной преинкубации клеток при 0°С – 18,5 ч. Среда инкубации (б) содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5). Добавки: 16 мМ сукцинат натрия, 120 мкМ О-пальмитоил-L-малат, клетки (5 мг/мл). Время аэробной преинкубации клеток при 0°С – 17,5, 18 и 20 ч (кривые 1, 2 и 3, соответственно). Цифры при оксиграммах – скорости окисления в нмоль O₂/мин.

Таким образом, транспорт сукцината через плазмалемму является лимитирующим звеном системы окисления сукцината в клетках. Линейность ингибирования в координатах Диксона и одинаковые величины K_M имели место во всех опытах, когда сукциноксидазная ферментативная система была максимально активирована и не зависела от дальнейшей преинкубации клеток при 0°С (Рис. 8б., кривая 2, плато). Можно утверждать, что ферментативная система окисления сукцината при линейности ингибирования в координатах Диксона лимитирована транспортом сукцината через плазмалемму.

Непроницаемость плазмалеммы для ингибиторов транспорта. Использование пермеабиллизации дрожжей для оценки способности амфифильного эффектора проникать в клетку занимает много времени. Мы предположили, что тестом на протонифорную активность эффектора в клетках *S. cerevisiae* и деэнергизацию плазмалеммы может быть ингибирование монокарбоксилатного H⁺- симпортера плазмалеммы [Akita et al., 2000], а, следовательно, пируватоксидазной системы клеток. Величина I_{50} ингибирования пируватоксидазной системы протонифором FCCP (Рис. 10а., кривая 3) была примерно в 5 раз ниже величины A_{50} активации им ферментативного пути окисления глюкозы (далее – глюкозоксидазной системы). Протонифор FCCP активировал глюкозоксидазную систему клеток *S. cerevisiae* (Рис. 10а., кривая 1). Сходное соотношение A_{50}/I_{50} (равное 4), получили

для протонатора SF с другой химической структурой, т.е. подавление пируватоксидазной системы было связано именно с протонаторностью эффектора, а не иным ингибирующим действием.

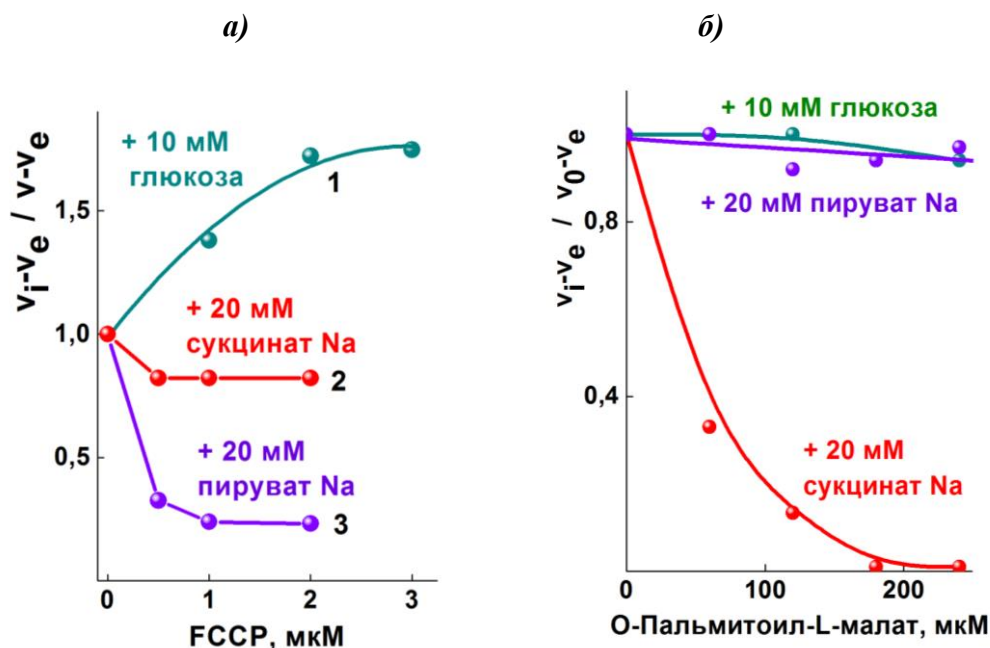


Рис. 10. Влияние протонатора FCCP на окисление клетками *S. cerevisiae* глюкозы, сукцината натрия или пирувата натрия (а). Влияние О-пальмитоил-Л-малата на окисление клетками *S. cerevisiae* глюкозы, пирувата натрия или сукцината натрия (б). Среда инкубации (а) содержащая 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), клетки (10 мг/мл), была дополнена 10 мМ глюкозой, 20 мМ сукцинатом натрия или 20 мМ пируватом натрия. Клетки аэробно преинкубировали при 0°С – 10 - 14 ч. Субстрат добавляли после протонатора. Скорости окисления в присутствии FCCP, сукцината натрия, пирувата натрия и глюкозы стабилизировались соответственно через 3, 4, 10 и 2 мин после добавления эффектора. Время аэробной преинкубации клеток при 0°С – 10 - 14 ч. Среда инкубации (б), содержащая 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), клетки (5 мг/мл), была дополнена 10 мМ глюкозой, 20 мМ сукцинатом натрия или 20 мМ пируватом натрия. Клетки аэробно преинкубировали при 0°С в течение 10 - 14 ч.

Для изучения транспорта сукцината через плазмалемму использовали 2-алкилмалонаты и О-ацил-Л-малаты. Их неспособность проникать в клетки в зоне концентраций, вызывающих 99%-ое подавление сукцинатоксидазы (I_{99}), была проверена с помощью «протонаторного теста» для крайних членов этих рядов, таких как: О-лауроил-Л-малат, О-стеароил-Л-малат, 2-пентилмалонат, 2-пентадецилмалонат (Рис. 11б.). Ингибиторы были использованы в концентрациях, вызывающих максимальный эффект на окисление субстратов клетками.

На Рис. 11а. видно, что при полном ингибировании 2-ундецилмалонатом скорости окисления сукцината клетками дрожжей пируватоксидазная система не ингибировалась ни при рН 5,5, ни при рН 6,5. В модельных опытах было показано [Evtodienko et al., 1999], что доля незаряженной протонированной формы 2-ундецилмалоната, способной проникать через БЛМ, снижалась с увеличением значений рН от 5,5 до 6,5, что объясняло ингибирование пируватоксидазной системы при рН 6,5 вдвое большими концентрациями этого алкилмалоната.

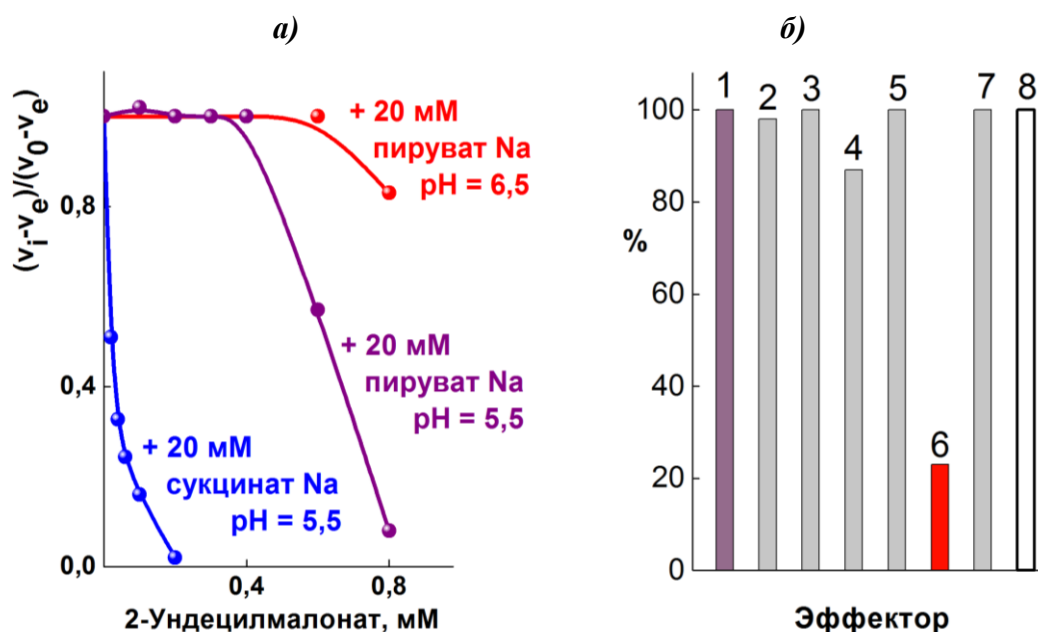


Рис. 11. Влияние 2-ундецилмалоната на окисление клетками *S. cerevisiae* пирувата натрия или сукцината натрия (а). Активность пируватоксидазной системы клеток в отсутствие эффектора (1) и в присутствии 8 мМ 2-пентилмалоната (2), 4 мкМ 2-пентадецилмалоната (3), 600 мкМ О-лауроил-L-малата (4), 40 мкМ О-стеароил-L-малата (5), 1 мкМ FCCP (6), 250 мкМ О-пальмитоил-L-малата (7) и 200 мкМ 2-ундецилмалоната (8) (б).

Среда инкубации (а), содержащая 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 5,5 или рН 6,5), клетки (5 мг/мл) была дополнена 20 мМ пируватом или 20 мМ сукцинатом. Среда инкубации (б) содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), 20 мМ пируват натрия, клетки (1,7 мг/мл). Для измерения окисления пирувата натрия клетки аэробно преинкубировали при 0°С в течение 2 - 4 ч, а для сукцината натрия – в течение 10 - 14 ч.

Для изучения транспорта сукцината через плазматическую мембрану использовали две группы (два ряда) соединений: 2-алкилмалонаты и О-ацил-L-малаты. 2-Ундецилмалонат – наиболее эффективный ингибитор из тех, действие которых не зависело от количества дрожжевых клеток. Характерное для действия протонифора на пируватоксидазу клеток *S. cerevisiae* резкое снижение дыхательной активности при небольшом увеличении его концентрации (Рис. 10а., кривая 3) наступало при концентрациях 2-ундецилмалоната, существенно превышающих величину I_{99} (Рис. 11а.). Доля незаряженной протонированной формы 2-ундецилмалоната [Evtodienko et al., 1999], способной проникать через бислой, снижалась с увеличением значений рН от 5,5 до 6,5, и вполне ожидаемым выглядело подавление активности пируватоксидазы клеток при вдвое больших концентрациях этого алкилмалоната при рН 6,5.

Если ингибиторы транспорта сукцината через плазмалемму не проникали в клетку к митохондриям (Рис. б), то побочные действия этих ингибиторов на сопряженную систему должны гарантированно отсутствовать. Используя препараты митохондрий *S. cerevisiae*, мы получили дополнительное свидетельство того, что ингибиторы транспорта сукцината не проникали через плазмалемму клеток *S. cerevisiae*. О-Пальмитоил-L-малат и О-миристоил-L-малат подавляли окисление сукцината в митохондриях гораздо более эффективно, чем в клетках (Таблица 1).

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

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

*Среда инкубации содержала 0,6 М маннит, 1 мМ ЭДТАNa, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ KH₂PO₄, 0,48 мМ ADP, 10 мМ сукцинат Na, 10 мМ MES (pH 6,5), митохондрии (1,8 мг белка/мл).

3.3. Характеристики пороформеров мелиттина, мастопарана, тетраацетилмелиттина и аламетицина в сопрягающей мембране интактных митохондрий печени крысы.

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

Известно, что мелиттин, мастопаран и ТАМ образуют крупноразмерные поры [Pandidan and Mechler, 2019; 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 монолитиевой 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 др., 2003]. Однако средние значения этого соотношения для мелиттина и мастопарана составляли соответственно 1,09 (среднее – $1,12 \pm 0,03$) (Рис. 12а.) и $1,18 \pm 0,02$ (данные не приведены). Это свидетельствовало о том, что активацию v_4 (и катионного трансмембранного тока) мелиттином и мастопараном лимитировала стадия, предшествующая порообразованию. Для мелиттина на липосомах показано, что формирование поры лимитировалось предпоровыми стадиями [Takei et al., 1999]. Для мастопарана такие данные в литературе отсутствовали. Согласно данным, представленным на Рис. 12б., среднее соотношение степеней активации v_4 в монокалиевой и монолитиевой средах для ТАМ составило 1,4. По-видимому, для ТАМ лимитирующей стадией являлось порообразование, при этом величину $\Delta\psi$ в области стабилизированной активации v_4 в монолитиевой и монокалиевой средах можно было считать практически неизменной первые несколько минут измерения (Рис. 12в,г.), но при увеличении времени воздействия, в отличие от мелиттина, величина $\Delta\psi$ радикально уменьшалась.

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.

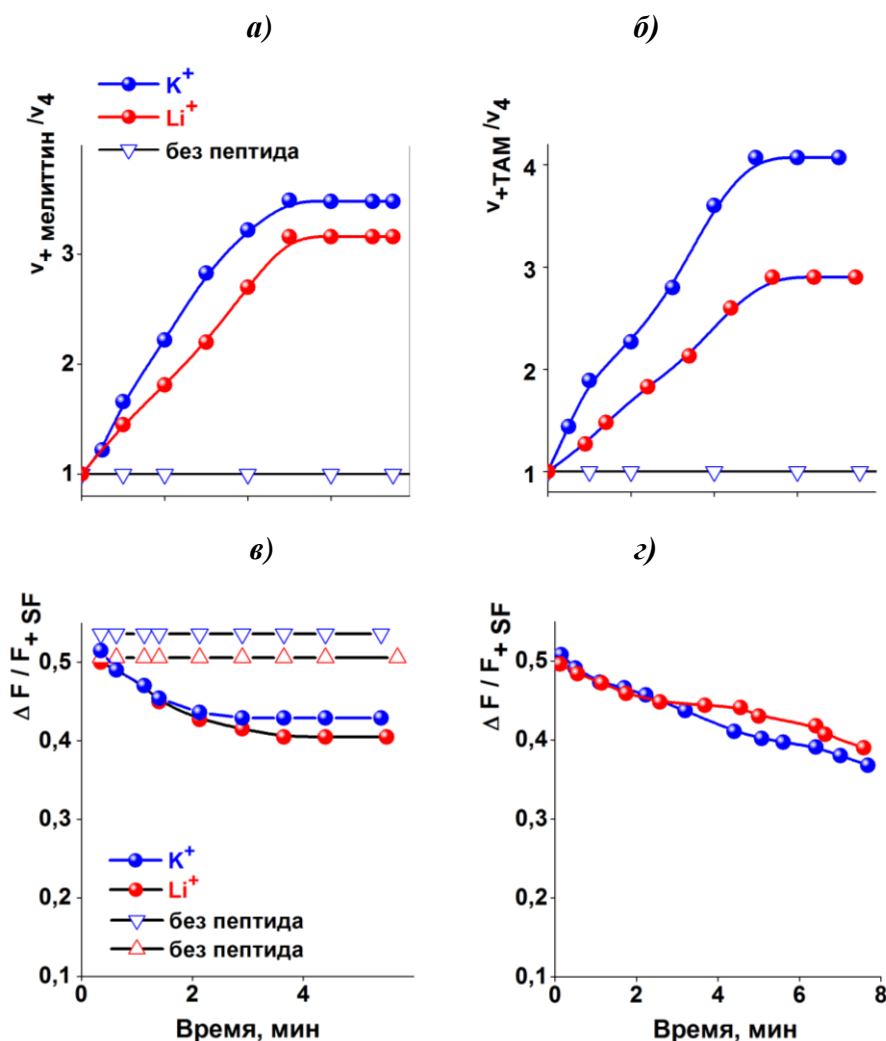


Рис. 12. Активация v_4 митохондрий печени крысы мелиттином (а) и ТАМ (б). Влияние мелиттина и ТАМ на величину мембранного потенциала, генерируемого митохондриями печени крысы (в, з).

Среда инкубации, содержащая 194 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 6 мМ $MgCl_2$, 0,3 мМ KH_2PO_4 или 0,3 мМ LiH_2PO_4 , 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 10 мМ HEPES-KOH (pH 7,5) или 10 мМ HEPES-LiOH (pH 7,5), и митохондрии (0,25 мг белка/мл) была дополнена 500 нМ мелиттином или 100 нМ ТАМ и 0,4 мкМ родамином 123 (в, з).

Рассчитанный аналогично мелиттину (см. раздел 3.1.2, Рис. 4б.) концентрационный порядок реакции, лимитирующей трансмембранный катионный ток, индуцированный мастопараном, составил $1,83 \pm 0,23$ (измерения проводили в более корректных условиях, исключая индукцию иных эндогенных проводимостей [O'Rourke, 2007; Szewczyk et al., 2009], в отличие от [Шольц, Аливердиева и др., 1983]). Это позволило предположить, что аналогично мелиттину предпора, лимитирующая стадия порообразования мастопарана – димер. При действии мастопарана, так же, как и мелиттина, имела место синхронная со стабилизацией активированного дыхания стабилизация величины $\Delta\psi$, генерируемая митохондриями печени крысы.

3.3.2 Природа двуфазной активации v_4 митохондрий печени крысы аламетицином.

Зависимость активации v_4 под действием аламетицина (40 нМ и выше) двухфазная (Рис. 13).

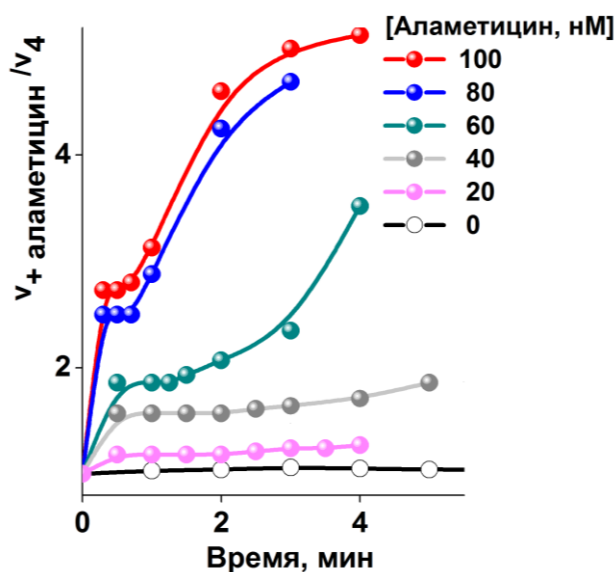


Рис. 13. Активация v_4 митохондрий печени крысы разными концентрациями аламетицина.

Среда инкубации содержала 194 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 1 мМ KН₂РO₄, 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 10 мМ HEPES (pH 7,5), митохондрии (0,25 мг белка/мл.)

На Рис. 14а. видно, что в монотрисовой среде первая фаза (отражающая, вероятно, проводимость пор с наименьшей степенью олигомерностью) отсутствует, и она появляется после добавления в среду KCl. На БЛМ было показано, что субсостояние минимальной проводимости исчезает из флуктуации проводимости одиночного канала, индуцированного пептидом, в средах, содержащих только катионы Tris⁺ или Ca²⁺ [Hanke and Boheim 1980]. В качестве своеобразного контроля исследовали активацию v_4 митохондриями печени крысы под действием ТАМ, образующего поры, которые не “самоорганизуются” с помощью последовательного присоединения мономеров. На врезке на Рис. 14 показано, что кривая активации v_4 200 нМ ТАМ в монотрисовой среде имела однофазный характер. Поскольку гидратированный диаметр присутствующего в средах инкубации Mg²⁺ больше, чем таковой Ca²⁺ [Laatikainen et al., 2007], этот катион не проникал в митохондрии через низкоолигомерные поры аламетицина. В его присутствии синхронная к оксиграмме зависимость для величины $\Delta\psi$ (Рис. 14б.) неуклонно снижалась, что согласуется с литературными данными [Duclohier, 2001; Woolley, 2007] о том, что именно порообразование аламетицином лимитировало трансмембранный катионный ток.

Величина K_p аламетицина, равная $(0,76 \pm 0,01) \times 10^3$ [Шольц, Аливердиева и др., 1985], позволила нам считать практически весь добавленный аламетицин находящимся в водной фазе, а небольшое количество мембраносвязанного пептида (от 5 до 20%) пропорциональным его общей концентрации. Уменьшение протяженности 1-го стационарного участка (первой фазы) с возрастанием концентрации пептида (Рис. 13) хорошо согласовалось с предположением об увеличении доли высокоолигомерных агрегатов, диаметр (и соответственно, проводимость) которых выше. Концентрационный порядок реакции, рассчитанный для первой фазы, был равен $1,92 \pm 0,07$ (измерения проводили в более корректных условиях, исключая индукцию иных эндогенных

проводимостей [O'Rourke, 2007; Szewczyk et al., 2009], в отличие от [Шольц, Аливердиева и др., 1985]).

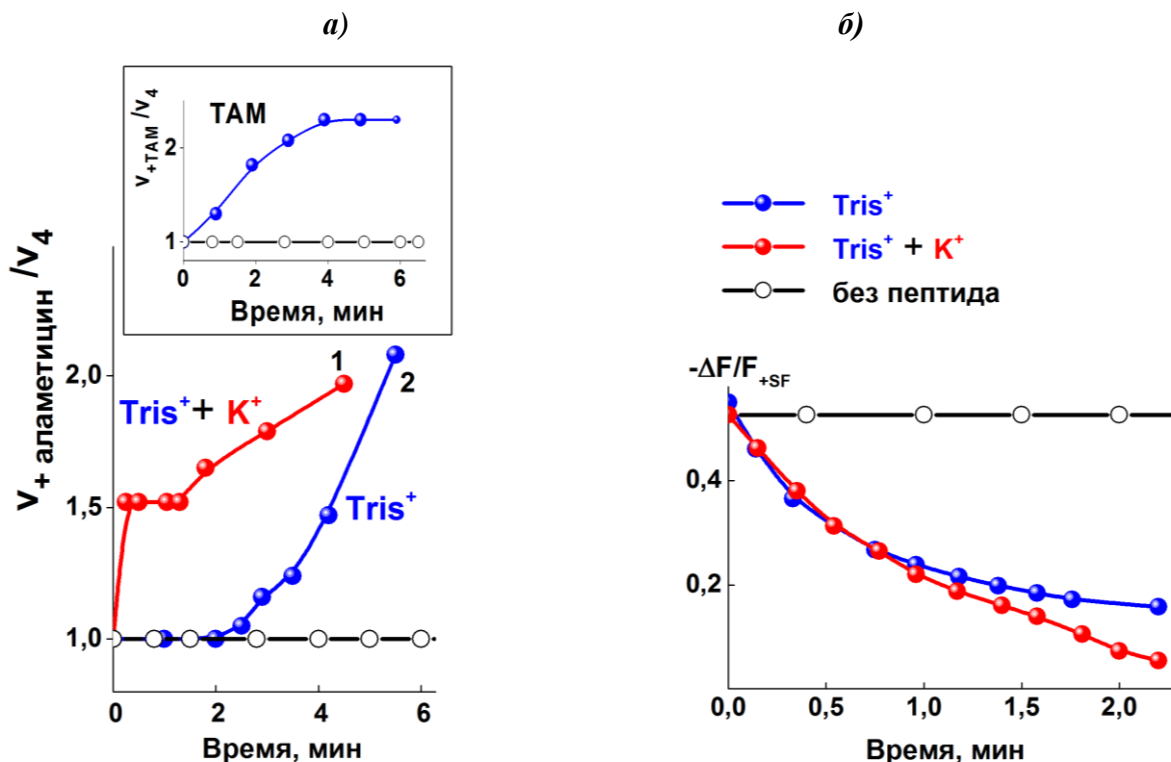


Рис. 14. Активация v_4 митохондрий печени крысы 110 нМ аламетицином в присутствии и в отсутствие 20 мМ KCl (а). Влияние аламетицина на величину мембранного потенциала, генерируемого митохондриями печени крысы (б). Среда инкубации содержала: 209 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 6 мМ $MgCl_2$, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 30 мМ Tris-HCl (pH 7,2) и митохондрии (0,25 мг белка/мл) или дополнительно 20 мМ KCl; к обеим средам добавляли 0,4 мкМ родамин 123 (б). На врезке – Активация v_4 200 нМ TAM в отсутствие KCl.

Это позволило предположить, что пора, индуцированная аламетицином с наименьшим диаметром, содержит липид (и это позволяет каналу при меньшей степени олигомеризации мономеров иметь больший диаметр). Такая пора, вероятно, является тороидальной, в отличие от чисто пептидных высокоолигомерных пор пептида, описываемых «barrel-stave» моделью [Laitgeb et al., 2007; Wei and Pohorille, 2023]. Соотношение проводимостей каналов аламетицина с разной степенью олигомерности составляло 1:4:20:45:75:110 [Hanke and Voheim, 1980], при этом даже небольшая примесь высокоолигомерного канала резко увеличивала его проводимость и 1-я фаза активации v_4 митохондрий маскировалась 2-ой.

3.3.3. Природа стадии, лимитирующей первую фазу активации v_4 митохондрий печени крысы аламетицином

По данным Рис. 15а., среднее соотношение активации v_4 аламетицином в монокалиевой и монолитиевой средах составило 1,35. На рис. 15б. видно, что величина $\Delta\psi$ в этих средах в каждый момент времени отличалась, и для расчета соотношения активаций их приводили к значению при одинаковом значении $\Delta\psi$ согласно закону Фарадея (детали см. Материалы и методы исследования). 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 аламетицином лимитировано образованием каналов и

все каналы, как и в наших экспериментах, были свободно проницаемы для K^+ и Li^+ [Woolley, 2007]. Близость справочных величин и определенных предлагаемым нами методом, можно рассматривать как свидетельство корректности использования препарата митохондрий печени крысы в качестве биосенсора для измерения трансмембранного катионного тока.

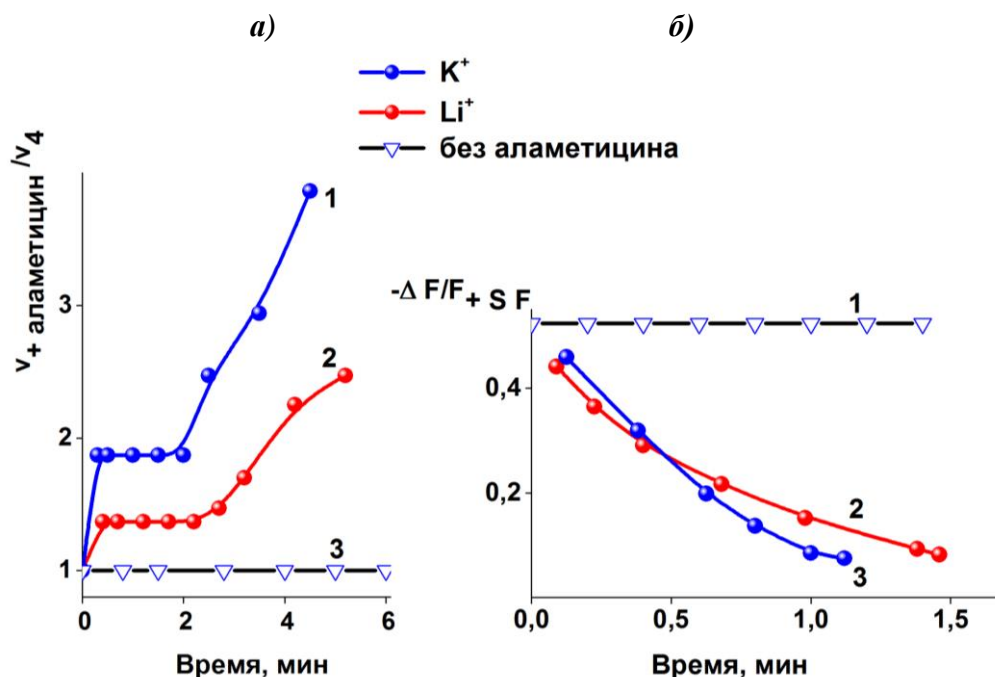


Рис. 15. Активация v_4 митохондрий печени крысы аламетицином (а) и влияние аламетицина на величину мембранного потенциала, генерируемого митохондриями печени крысы (б). Среда инкубации (а), содержащая 194 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 6 мМ $MgCl_2$, 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, митохондрии (0,25 мг белка/мл), были дополнена 0,3 мМ KH_2PO_4 и 10 мМ $HEPES-KOH$ (рН 7,5) (кривая 1) или 0,3 мМ LiH_2PO_4 и 10 мМ $HEPES-LiOH$ (рН 7,5) (кривая 2), и 110 нМ аламетицином; в контроле (кривая 3) использовали те же среды, но без добавления аламетицина.

На Рис (б), использовали те же среды, что на Рис (а), но они были дополнены 0,4 мкМ родамином 123.

3.4. Энзимологическая характеристика нового транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae*

До настоящей работы было принято считать, что в плазмалемме *S. cerevisiae* отсутствует опосредованная белком система транспорта C_4 -дикарбоксилатов [Lodi et al., 2004]. При рН 3,0 был показан только транспорт L-малата, обусловленный диффузией его непротонированной формы [Salmon, 1987]. Клетки тетраплоидного штамма Y-503 окисляли сукцинат при рН 5,5 (Рис. 9б.), когда доля его протонированной формы невелика. 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 и его подавление специфическим ингибитором пальмитоилмалатом (Рис. 9б.), непроникающим в клетку (см. раздел 3.2.2), позволили предположить существование в плазмалемме специфического транспортера сукцината. Он, в отличие от переносчиков сукцината *P. tannophilus* [Harrod et al., 1997] или *C. utilis* [Cássio et al., 1993] не нуждался в индукции малатом, так как окисление сукцината наблюдалось при

выращивании клеток *S. cerevisiae* в синтетической среде, гарантированно не содержащей малат.

Субстратную специфичность переносчика плазмалеммы *S. cerevisiae* исследовали на дрожжевых 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, 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 для сукцината сукцинатоксидазной системы клеток дрожжей, не изменяя величины V_{max} . Увеличение концентрации сукцината уменьшало величину I_{50} для L-малата. По-видимому, оба субстрата конкурировали за общую точку связывания. 2-Ундецилмалонат (его непроницаемость в митохондриях показана в разделе 3.2.2), как и О-пальмитоил-L-малат, не влиял на v_e клеток, но ингибировал окисление сукцината. Ингибирование было линейным в координатах Диксона (величина $K_i = 35,6 \pm 4,4$ мкМ). 2-Ундецилмалонат также увеличивал величину K_M сукцинатоксидазной системы клеток дрожжей для сукцината, не изменяя величины V_{max} . Конкурентный характер действия обоих ингибиторов означал, что они взаимодействовали с общей точкой связывания субстрата в активном центре переносчика. По аналогии с О-пальмитоил-L-малатом это позволило предположить, что малонат, так же, как и L-малат связывались с транспортером сукцината плазмалеммы. По-видимому, и итаконат связывался с активным центром переносчика сукцината, конкурентно к этому субстрату (Рис. 16б.). На Рис. 17б., видно, что фумарат, но не малеат, эффективно подавлял ($K_i = 1,0 \pm 0,1$ мМ) окисление сукцината, конкурентно к нему (Рис. 17а.).

На Рис. 7а. было показано, что активность сукцинатоксидазной системы клеток увеличивалась в ходе длительной преинкубации при 0°C, но оставалась существенно меньшей, чем пируватоксидазная активность. Известно, что активности митохондриальных сукцинатоксидазной и пируватоксидазной систем соизмеримы. Если бы низкая активность сукцинатоксидазной системы была связана с небольшой примесью клеток с поврежденной плазмалеммой, 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. Это означает, 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, протонофоры FCCP (Рис. 10а., кривая 2) и SF (данные не показаны) почти не влияли на скорость окисления сукцината, в отличие от окисления глюкозы и пирувата (Рис. 10а., кривая 2), что позволило предположить, что транспорт сукцината через плазматическую мембрану осуществлялся не в симпорте с протоном.

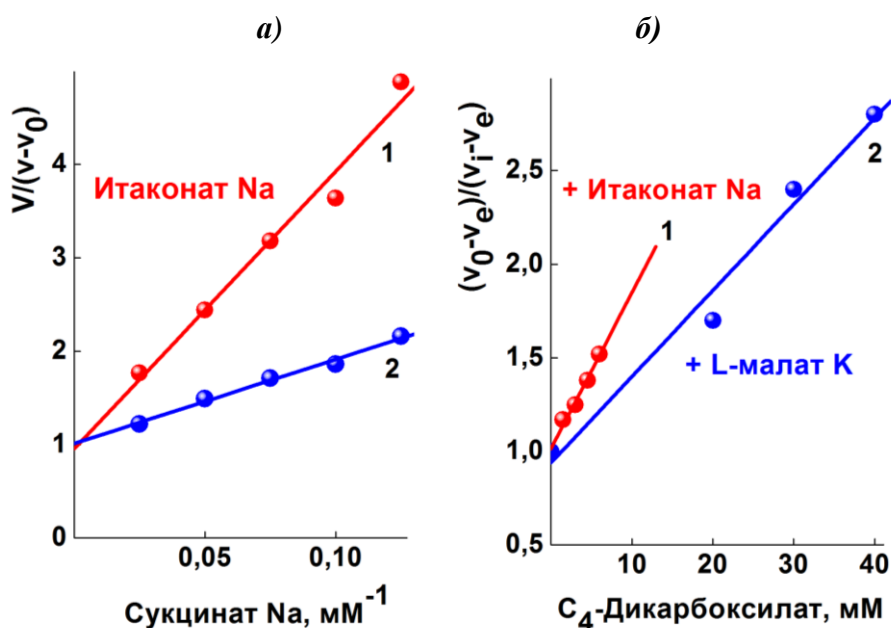


Рис. 16. Влияние итаконата натрия на скорость окисления клетками *S. cerevisiae* сукцината натрия (координаты Лайнуивера–Берка) (а). Влияние итаконата натрия и L-малата калия на скорость окисления сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* (координаты Диксона) (б). Среда инкубации (а), содержащая 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 5,5), 10 мМ сукцинат натрия, клетки (5 мг/мл), была дополнена 10 мМ итаконатом натрия (кривая 1). Среда инкубации (б), содержащая 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 5,5), 10 мМ сукцинат натрия, клетки (10 мг/мл), была дополнена 10 мМ итаконатом натрия (кривая 1) или 10 мМ L-малатом калия (кривая 2). Время аэробной преинкубации клеток при 0°С составляло 18 ч.

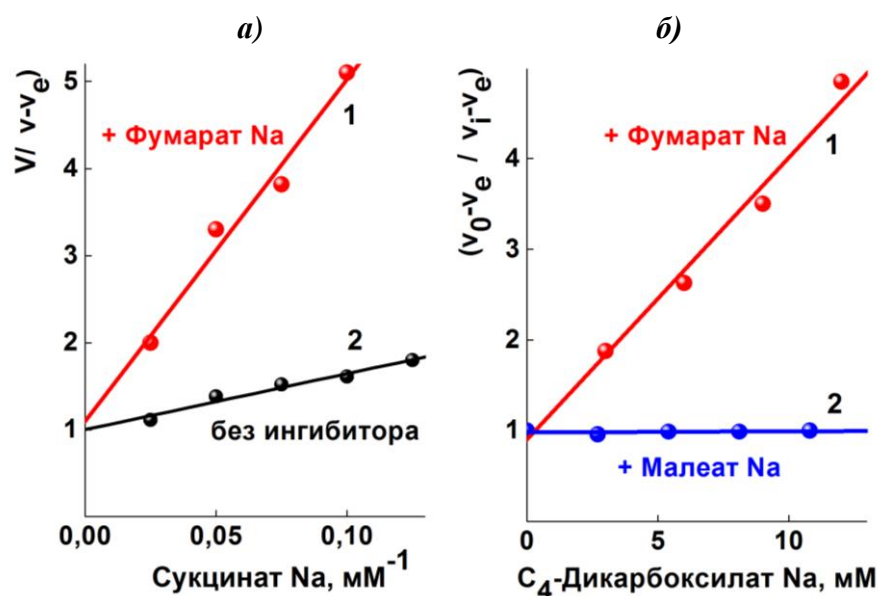


Рис. 17. Влияние фумарата натрия на скорость окисления клетками *S. cerevisiae* сукцината натрия (координаты Лайнуивера–Берка) (а). Окисление клетками *S. cerevisiae* сукцината натрия в присутствии фумарата натрия или малеата натрия (координаты Диксона) (б). Среда инкубации (а), содержащая 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 5,5), 10 мМ сукцинат натрия, клетки (5 мг/мл), была дополнена фумаратом натрия (кривая 1). Среда инкубации (б), содержащая 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 5,5), 10 мМ сукцинат натрия, клетки (10 мг/мл), была дополнена 10 мМ фумаратом натрия (кривая 1) или 10 мМ малеатом натрия (кривая 2). Время аэробной преинкубации клеток *S. cerevisiae* при 0°С составляло 20 ч.

Линейный характер ингибирования окисления сукцината и цитрата 2-ундецилмалонатом в координатах Диксона свидетельствовал о том, что ингибитор подавлял стадию, лимитирующую окисление обоих субстратов. Поскольку ингибитор не проникал в клетку, то лимитирующей стадией являлся транспорт обоих субстратов через плазмалемму (Рис. 6), и особенности их окисления (Рис. 18) связаны со свойствами транспортера. Поэтому в условиях, когда вышеописанная линейность была подтверждена, скорость окисления субстратов определялась скоростью транспорта через плазмалемму.

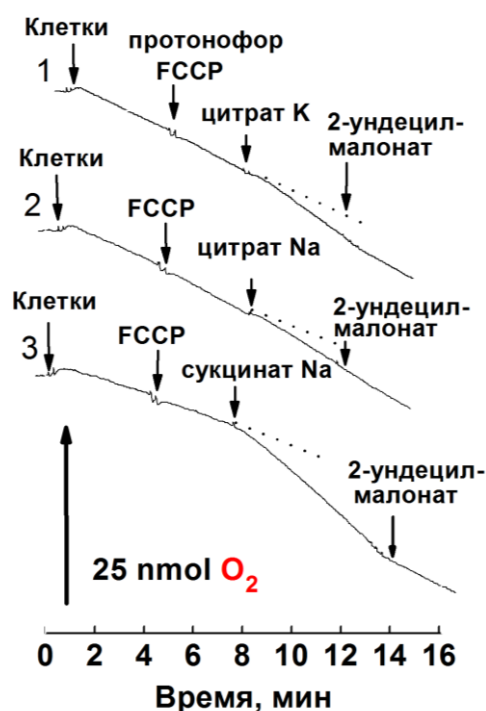


Рис. 18. Влияние 2-ундецилмалоната на скорость окисления клетками *S. cerevisiae* цитрата калия в 50 мМ калий - фосфатном буфере (рН 5,5) (кривая 1), цитрата натрия или сукцината натрия в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 5,5) (кривые 2 и 3).
Добавки: клетки (10 мг/мл), 2 мкМ FCCP, 20 мМ сукцинат или цитрат, 300 мкМ 2-ундецилмалонат.
Время аэробной преинкубации клеток при 0°С составляло 12 – 18 ч.

На Рис. 18 показано, что окисление клетками цитрата (верхняя и средняя оксиграммы) и сукцината (нижняя оксиграмма) нечувствительны к действию протонофора FCCP в концентрации (2 мкМ), максимально активирующей окисление глюкозы и подавляющей окисление пирувата (Рис. 10а., кривая 3). Протонофор, добавленный после субстрата, так же не влиял на скорость его окисления. 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. 18, оксиграммы 2 и 1). Окисление сукцината зависело от состава ионной среды аналогичным образом. Скорости окисления сукцината и цитрата одинаково эффективно (в 4 раза) подавлялись непроникающим ингибитором – 2-ундецилмалонатом (Рис. 18, оксиграммы 2 и 1). Степень ингибирования транспорта цитрата зависела от его концентрации: при больших концентрациях цитрата (20 мМ) необходимы и большие концентрации ингибитора. 2-ундецилмалонат увеличивал наблюдаемую величину K_M , не меняя V_{max} как для сукцината (признак конкурентного ингибирования), так и цитрата, при этом величины K_i для транспорта сукцината и цитрата были соизмеримы (соответственно, 7,8 мкМ и 3,8 мкМ) и сопоставимы с величинами K_i , рассчитанными по зависимости относительной скорости дыхания 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 (способ показать

конкурентность субстратов в активном центре транспортера). Можно полагать, что эти данные и данные, приведенные на Рис. 18, с высокой долей вероятности свидетельствовали о том, что сукцинат и цитрат транспортировались в клетку общим переносчиком.

В контрольных опытах было показано, что ферментативная система окисления цитрата (цитратоксидазная система) препарата митохондрий *S. cerevisiae* не чувствительна к 2-ундецилмалонату (Рис. 19), в отличие от цитратоксидазной системы клеток (Рис. 20), т.е. объектом воздействия ингибитора являлся именно транспортер плазмалеммы. Эти данные дополнительно свидетельствовали о том, что сравнительно низкая активность окисления цитрата клетками не связана с примесью клеток с поврежденной плазмалеммой.

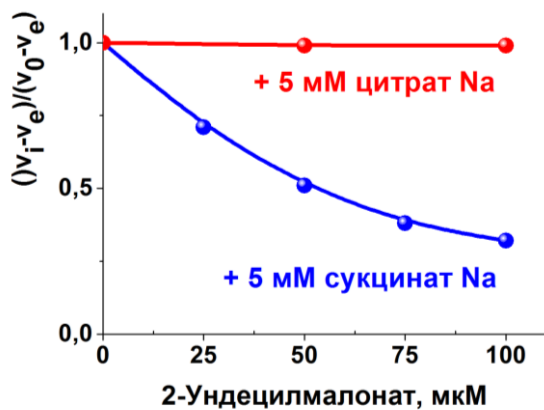


Рис. 19. Влияние 2-ундецилмалоната на скорость окисления цитрата натрия или сукцината натрия митохондриями *S. cerevisiae*.

Среда инкубации, содержащая 0,6 М маннит, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ KН₂РO₄, 0,48 мМ ADP, 10 мМ MES (рН 6,5), митохондрии (1,8 мг белка/мл), была дополнена 5 мМ цитратом или 5 мМ сукцинатом натрия.

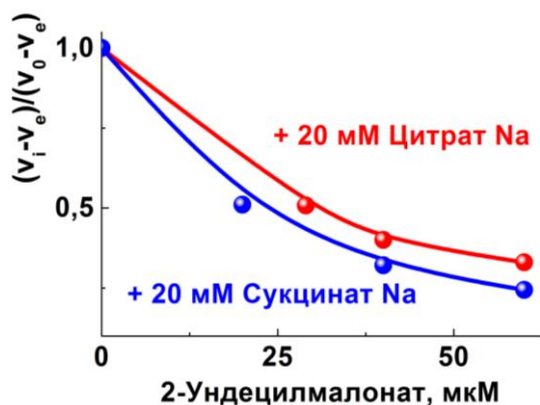


Рис. 20. Влияние 2-ундецилмалоната на скорость окисления цитрата натрия или сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* (20 и 5 мг/мл, соответственно) от концентрации 2-ундецилмалоната.

Среда инкубации, содержащая 50 мМ натрий-фосфатный буфер (рН 6,5), была дополнена 20 мМ цитратом или 20 мМ сукцинатом натрия. Время аэробной преинкубации при 0°С составляло 15-16 ч.

Таким образом, есть основания полагать, что транспорт сукцината, L-малата и цитрата через плазмалемму *S. cerevisiae* осуществлялся с помощью общего для этих субстратов транспортера дикарбоксилатов. Кроме того, этот переносчик был способен связывать малонат, итаконат и фумарат, конкурентно к сукцинату (Рис. 16 и 17).

Регуляция транспортера плазмалеммы *S. cerevisiae* катионами. Окисление сукцината дрожжевыми клетками зависело от рН среды и катиона в среде инкубации (Рис. 21). При рН 5,5 (Рис. 21а.) скорость окисления сукцината в присутствии Na⁺ была выше, чем в присутствии катионов K⁺ или Tris⁺ (соответственно оксиграммы 3, 2 и 1). При рН 6,5 (Рис. 21б.) скорость окисления сукцината была существенно выше, чем при рН 5,5, но скорости в присутствии каждого из трех катионов: Na⁺, K⁺ и Tris⁺ были близки.

В то же время катионы по-разному влияли на подавление окисления сукцината 2-ундецилмалонатом. Ингибирование было максимальным в среде с катионом Tris^+ (в среднем 89%), минимальным в среде с Na^+ (65%) и средним (77%) в среде с K^+ .

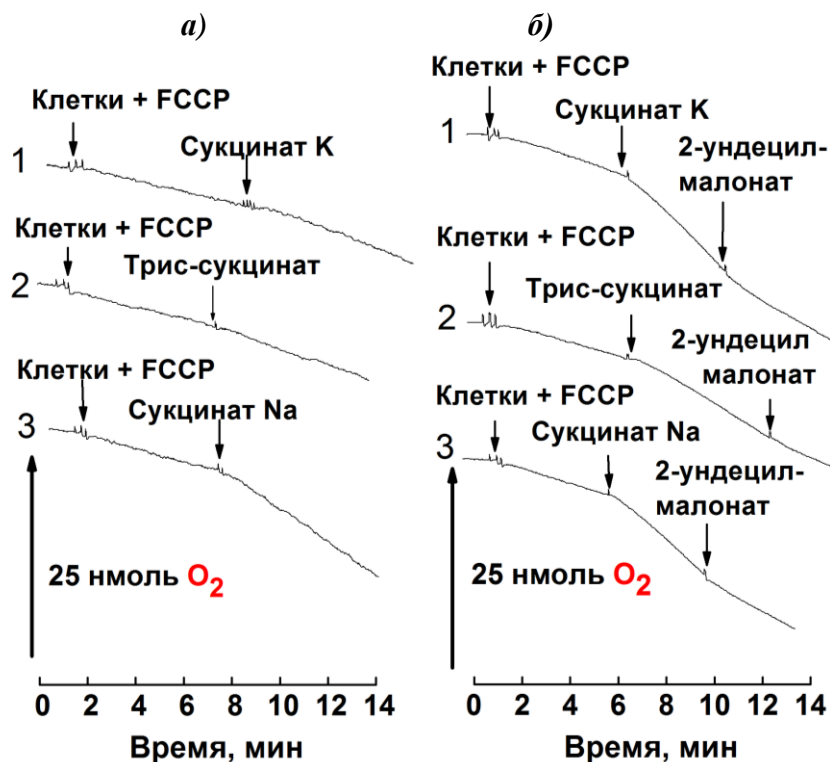


Рис. 21. Окисление клетками *S. cerevisiae* сукцината калия (кривые 1а,б), Tris - сукцината (кривые 2а,б) и сукцината натрия (кривые 3а,б).

Среды инкубации (а) содержали 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5) (кривая 1); 50 мМ Tris - фосфатный буфер (рН 5,5) (кривая 2); 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 5,5) (кривая 3).
 Добавки: клетки (10 мг/мл), 2 мкМ FCCP, 20 мМ сукцинат К (кривая 1), 20 мМ Tris-сукцинат (кривая 2), 20 мМ сукцинат Na (кривая 3).

Среды инкубации (б) содержали 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 6,5) (кривая 1); 50 мМ Tris - фосфатный буфер (рН 6,5) (кривая 2); 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 6,5) (кривая 3).
 Добавки: клетки (10 мг/мл), 2 мкМ FCCP, 300 мкМ 2-ундецилмалонат), 6 мМ сукцинат К (кривая 1), 6 мМ Tris-сукцинат (кривая 2) 6 мМ сукцинат Na (кривая 3).

Время аэробной преинкубации клеток при 0°С составляло 12-18 ч.

Чтобы проверить, не связано ли действие K^+ и Na^+ с изменением сродства транспортера к сукцинату, сопоставили величины K_M при рН 5,5 в K^+ - и Na^+ -содержащих средах. Показано, что в среде, содержащей K^+ , сукцинат имел вдвое худшее сродство, чем в среде, содержащей Na^+ , V_{\max} была неизменной. Модулирование сродства транспортера к сукцинату и цитрату катионами носило квазиконкурентный характер, так как маловероятно связывание в одной точке противоположно заряженных соединений – катиона и дикарбоксилата (аниона). Показано также, что двухзарядные катионы не активировали транспорт сукцината, а их отсутствие не приводило к ингибированию транспорта (данные не приведены).

рН профиль транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae*.
 Исследовали влияние рН на величины K_M и V_{\max} транспорта сукцината в 50 мМ NaH_2PO_4 (Таблица 2). При каждом значении рН линейность ингибирования транспорта 2-

ундецилмалонатом в координатах Диксона подтверждала его лимитирование переносчиком плазмалеммы.

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 отклонении от линейности (и лимитировании окисления сукцината его транспортом в митохондриях) величина K_M для сукцината не зависела от значения pH в диапазоне 5,5 – 7,5, при которых внутриклеточное значение pH оставалось постоянным [Purwin et al., 1986; Beauvoit et al., 1991]. Величина K_M для сукцината 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-Оптимальное для V_{max} находилось 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).

При pH 4 доля дианионной формы не превышала 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. Использование амфифильных производных субстратов для изучения активного центра транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей *S. cerevisiae*.

Ранее в группе К.Ф. Шольца (лаборатория биоэнергетики ИНБИ РАН) для моно- и диалкилмалонатов, О-ацил-L-малатов и α,ω -алкилендималонатов были получены линейные зависимости в координатах Диксона подавления этими ингибиторами сукцинатоксидазной системы митохондрий печени крысы, что свидетельствовало о том, что K_i характеризует лимитирующее звено – ДКТ [Шольц и др., 1990; Бондаренко и др., 1996]. Было показано, что ингибиторы повышали величину K_M окисления сукцината митохондрий, не меняя величины V_{max} [Шольц и др., 1990]. Конкурентный характер действия всех этих ингибиторов означал, что они взаимодействовали с точкой связывания субстрата в активном центре переносчика. Было высказано предположение о том, что критически важные для связывания субстрата остатки аргинина экспонированы в просвет канала у всех митохондриальных переносчиков дикарбоксилатов [Xu et al., 2000; Stipani et al., 2001; Cappello et al., 2006; Ma et al., 2007], а

также, что третичная структура канала транспортеров представляет собой цилиндрическую полость [Walters and Kaplan, 2004]. В наших опытах 2-алкилмалонаты и О-ацил-L-малаты служили в качестве молекулярной линейки (или зонда) для измерения длины липофильной зоны канала переносчика. Изменение констант ингибирования производными малата и малоната с алифатическим заместителем ($\Delta \lg K_i = \lg K_{i(n)} - \lg K_{i(n-1)}$) при удлинении на одно метиленовое звено характеризовало степень липофильности в районе связывания последней метильной группы. При этом зонд измерял удаленность этого района от остатков аргинина точки связывания субстрата [Шольц и др., 1990]. Зависимость $\lg K_i$ от n далее называли «липофильным профилем» (Рис. 22). Было сделано предположение, что липофильный профиль характеризовал внутреннюю поверхность канала. В случае с бифункциональными ингибиторами – α, ω -алкилендималонатами при их удлинении мы надеялись обнаружить дополнительную точку связывания дикарбоксилата в канале переносчика. Показано, что «липофильные профили» канала переносчика митохондрий печени крысы для О-ацил-L-малатов и 2-алкилмалонатов имели большое сходство. Обе кривые имели 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») (результат получен в соавторстве с Д.В. Мамаевым [Мамаев, Аливердиева и др., 2006]).

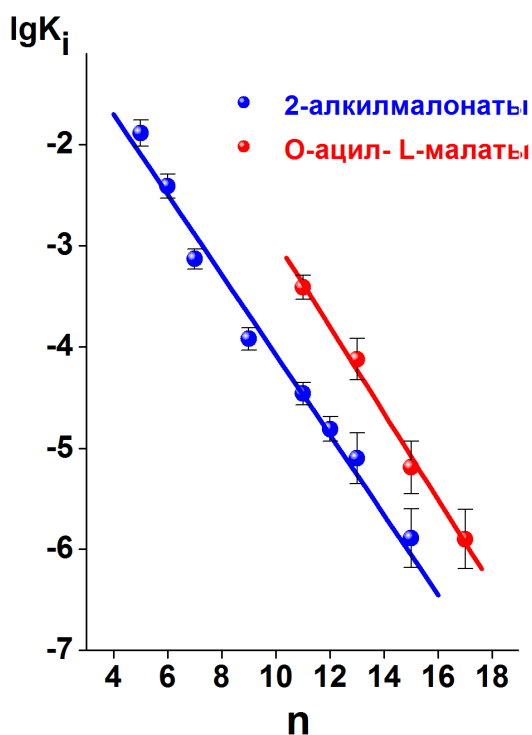


Рис. 22. Зависимость константы ингибирования сукцинатоксидазной системы клеток *S. cerevisiae* О-ацил-L-малатами и 2-алкилмалонатами от количества атомов углерода (n) в их алифатической цепи. Среда инкубации, содержащая 50 мМ калий - фосфатный буфер (pH 5,5), клетки (10 мг/мл). Время аэробной преинкубации при 0°C составляло 10-18 ч.

Значение молярной энергии переноса метиленового звена алкильного заместителя в ингибиторе из среды в активный центр переносчика и молярной энергии переноса метиленового звена алкильного заместителя в ингибиторе из среды в октанол (в модельной системе), были близки: $\Delta \Delta G = RT \Delta \lg K_i = 941,5 \pm 277$ Дж/моль, и $\Delta \Delta G = RT \Delta \lg R_n = 999,2 \pm 270$ Дж/моль (где R – универсальная газовая постоянная, а T – абсолютная температура), соответственно.

При изучении активного центра транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* линейные зависимости ингибирования производными субстратов в координатах Диксона, свидетельствующие о лимитировании системы окисления сукцината клеток транспортом через плазмалемму, получали для каждого ингибитора (Рис. 22). Для 2-алкилмалонатов (2-пентилмалоната и 2-пентадецилмалоната), для L-малата и О-стеароил-L-малата было показано, что ингибиторы повышали величину K_M системы окисления сукцината клеток, не меняя V_{max} процесса.

По различным причинам не все соединения оказались пригодными для зондирования канала переносчика плазмалеммы *S. cerevisiae*. Удалось провести зондирование четырьмя соединениями из ряда О-ацил-L-малатов и впервые для этих целей применить все синтезированные в лаборатории соединения ряда 2-алкилмалонатов. Зависимости для трех соединений ряда О-ацил-L-малатов (для n от 14 до 18) получены совместно с Д.В. Мамаевым [Мамаев, Аливердиева и др., 2006]). Как следует из данных, приведенных на Рис. 22, липофильные профили О-ацил-L-малатов и 2-алкилмалонатов для системы окисления сукцината в клетках *S. cerevisiae* линейны и параллельны друг другу. Зависимости описывались соответствующими уравнениями: $\lg K_i = -0,427n + 1,323$ и $\lg K_i = -0,396n - 0,115$. С увеличением степени гидрофобности соединения возрастало его сродство к активному центру. Величины коэффициентов при n в уравнениях для зависимостей $\lg K_i$ (n) для двух рядов ингибиторов были близки. Так же были близки значения молярной энергии переноса метиленового звена алкильного заместителя в ингибиторе из среды в активный центр переносчика плазмалеммы и молярной энергии переноса метиленового звена алкильного заместителя в ингибиторе из среды в октанол (в модельном эксперименте). Следовательно, энергия взаимодействия метильного звена алифатической цепи ингибиторов с аминокислотными остатками, выстилающими канал в активном центре транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* была обусловлена только липофильными взаимодействиями. Одновременно это свидетельствовало о том, что стерические препятствия не искажали конформацию алифатического заместителя в молекуле ингибитора, которую она имеет в состоянии с минимальной энергией, иначе бы стерические препятствия связыванию понизили бы энергию взаимодействия. Отсутствие реперной площадки, которая имела место в липофильном профиле переносчика митохондрий печени крысы [Мамаев, 2003; Мамаев, Аливердиева и др., 2006], не дало нам возможность предположить одинаковое расположение алифатических заместителей 2-алкилмалонатов и О-ацил-L-малатов в канале активного центра транспортера дикарбоксилатов дрожжей. 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. 16б свидетельствовали о лучшем сродстве для итаконата ($K_i = 4,15 \pm 0,35$), более гидрофобного конкурентного ингибитора транспортера дикарбоксилатов клеток по сравнению с L-малатом ($K_i = 17,5 \pm 1,1$ мМ) (Рис. 16а.). По-видимому, в отличие от митохондриального переносчика, гидроксил L-малата не участвует в связывании с транспортером дикарбоксилатов плазмалеммы, и полярное сложноэфирное звено О-ацил-L-малатов может входить в канал. Это позволило предположить, что вся длина ингибитора участвовала в сканировании этого канала, что свидетельствовало о том, что вблизи 2-го атома связываемого С4-дикарбоксилата имеется гидрофобная площадка. Допустив, что полярная сложноэфирная группа О-ацил-L-малатов не вносила вклад в связывание с активным

центром, длину липофильной зоны, отождествляемой с поверхностью канала, рассчитывали как разницу между длинами 2-пентилмалоната и О-стеароил-L-малата (Рис. 22).

3.6. Обсуждение результатов

3.6.1. Методические разработки и анализ новых свойств пороформеров.

Примененный нами подход позволяет исследовать характеристики исследованных нами пороформеров – индукторов проницаемости в диапазоне от 40 до 4600 мкМ. С учетом данных по содержанию усредненного липида в митохондриях печени крысы (250 нмоль/мг белка митохондрий [Lenton et al., 1995]) и удельного объема липидной фазы (10^{-6} л/мг [Шольц, Захарова, 1980]), это соответствовало соотношениям пептид/липид от 1/625 до 1/54. Для аламетицина эта зона соотношений (вблизи 1/625) не была изучена.

Скорости дыхания измеряли в стационарном режиме в течение нескольких минут. При этом набухание митохондрий в присутствии пороформеров в течение почти 15 мин не приводило к повреждению внутренних мембран органелл (Рис. 1) и не влияло на их способность генерировать $\Delta\psi$. В этих условиях формальный порядок реакции отражал именно реакцию ассоциации мономеров на лимитирующей стадии порообразования. В этом метод с применением биосенсора на основе митохондрий имеет неоспоримые преимущества по сравнению с традиционными методами (с использованием модельных систем, например, БЛМ), хотя применим в узком диапазоне температур, ионной силы и вариаций липидного состава мембраны.

Метод количественного измерения выхода репортерного красителя из липосом через формируемые исследуемыми пептидами поры [Takei et al., 1999] к исследованию порообразования мастопараном не применим, так как время существования поры существенно меньше, чем временная шкала измерения скорости вытекания этого красителя [Cabrera et al., 2008]. Прямой подход (сшивание гибким линкером димеров и тетрамеров) при исследовании связи между степенью олигомерности и проводимостью для аламетицина в попытке стабилизировать нижние проводящие субсостояния пептида в БЛМ не привели к однозначным результатам [Huang, 2006]. Использование непрямых методов измерения трансмембранного катионного тока в такой ситуации, по-видимому, целесообразно.

В литературе сложилась практика распространять представления о пептидном характере пор, экспериментально обоснованные только для высокоолигомерной поры, и на низкоолигомерные поры. На основании полученных результатов было сделано предположение, что низкоолигомерная пора аламетицина содержит липид (см. 3.3.2.). Пептидная пора свободно пропускала гидратированный K^+ в том случае, если она имела пентамерную [Chiriac and Luchian, 2007] или гексамерную [Wei and Pohorille, 2023] структуру. В наших опытах на основании определения порядка реакции для первой фазы активации дыхания митохондрий, индуцированной аламетицином, показано, что пора, образованная димером аламетицина, может также пропускать гидратированный K^+ . 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 формировал в обоих лепестках бислоя лунку с «утонченным» бислоем, что при столкновении (и сближении) мономеров способствовало формированию липид-пептидной поры и, по-видимому, ее стабилизации [Kessel et al., 2004],

т. е. увеличению её среднего времени жизни, по сравнению с чисто липидной порой. Тороидальная пора с участием аламетицина облегчала переход пептидов из наружного лепестка мембраны во внутренний. При этом дополнительная стабилизация поры могла происходить за счет энергетически выгодной ассоциации двух молекул аламетицина в «противофазе»: «голова к хвосту» [Mottamal and Lazaridis, 2006].

Среднее время жизни нижних субсостояний проводимости, соответствующих низкоолигомерному каналу аламетицина, более чувствительно к вариациям значений pH липидной поверхности и дипольному потенциалу мембраны [Chiriac and Luchian, 2007], чем этот показатель чисто пептидной высокоолигомерной поры.

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 лимитировала активацию v_4 органелл.

Ключевым в исследовании проницаемости, индуцированной низкоолигомерной формой аламетицина, является разделение во времени калиевого трансмембранного тока через фракции низко- и высокоолигомерных каналов. В модельных системах (БЛМ, например) это удается только в рамках метода одиночного канала, который исключает исследование зависимости проводимости от концентрации пептида. Нижнее проводящее субсостояние канала, образованного аламетицином, соответствует флуктуации проводимости с наименьшей амплитудой и это вынуждает исследователей использовать высокие концентрации катионов. Предложено объяснение, почему именно митохондрии позволяли разделить во времени калиевый трансмембранный ток, индуцированный фракциями низко- и высокоолигомерных каналов аламетицина (Рис. 15). Внутренняя мембрана митохондрий обогащена преимущественно гидрофобными белками [Bennet et al., 2022]. В процессе латеральной диффузии, и интегральные мембранные белки, и мономеры пороформеров, погруженные в бислои липидов мембраны, находятся в постоянном взаимодействии. При этом в нативных мембранах по сравнению с БЛМ, возможны неупругие столкновения белково-липидных комплексов, что делает их контакты в момент столкновения относительно долгоживущими. При достаточно низкой (40 мкМ) концентрации аламетицина во внутренней митохондриальной мембране ($C_m = \text{соотношение пептид/липид} - 1/625$) формальный «свободный» пробег между столкновениями собственно мономеров аламетицина может быть существенно больше, чем в БЛМ или липосомах при аналогичном соотношении. Это объясняло возможность измерения калиевой проводимости, индуцированной в митохондриях низкоолигомерной формой (димером) аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм. Данные, представленные на Рис. 3б, 12в,г., 14б. и 15б., свидетельствовали о том, что по эффективности снижения величины $\Delta\psi$ в митохондриях печени крысы при одинаковой активации v_4 (и, следовательно, калиевого трансмембранного тока) исследуемые нами пороформеры подразделялись на 2 группы: умеренно (мелиттин и мастопаран) и радикально (ТАМ и аламетицин) влияющие на величину $\Delta\psi$. Данные о соотношении активации v_4 митохондрий печени крысы этими пороформерами в монокалиевой и монолитиевой средах (см. разделы 3.3.1. и 3.3.3.) указывают на то, что трансмембранный ток, индуцированный мастопараном и мелиттином,

лимитирован самоассоциацией мономеров в непроводящую предпору, а ток, индуцированный ТАМ и низкоолигомерным аламетицином, лимитирован образованием поры. Исследования последних лет с применением методов двумерной флуоресцентной микроскопии [Wang et al., 2022], криоэлектронной томографии, атомно-силовой микроскопии [Chen et al., 2023], а также моделирования атомных структур методом молекулярной динамики [Sun et al., 2022] показали, что в зависимости от концентрации пороформера, условий опыта и липидного состава мембраны для одного и того же пептида возможны различные механизмы порообразования. На основании новых данных литературы и собственных результатов, нами предложен иной по сравнению с описанным ранее [Шольц и др., 1980, Шольц и др., 1983, Шольц и др., 1985] механизм образования пор пептидами – пороформерами в сопрягающей мембране митохондрий. На Рис. 23 представлена модель самоассоциации пептидов – пороформеров в мембране и наиболее вероятные равновесные формы олигомеров.

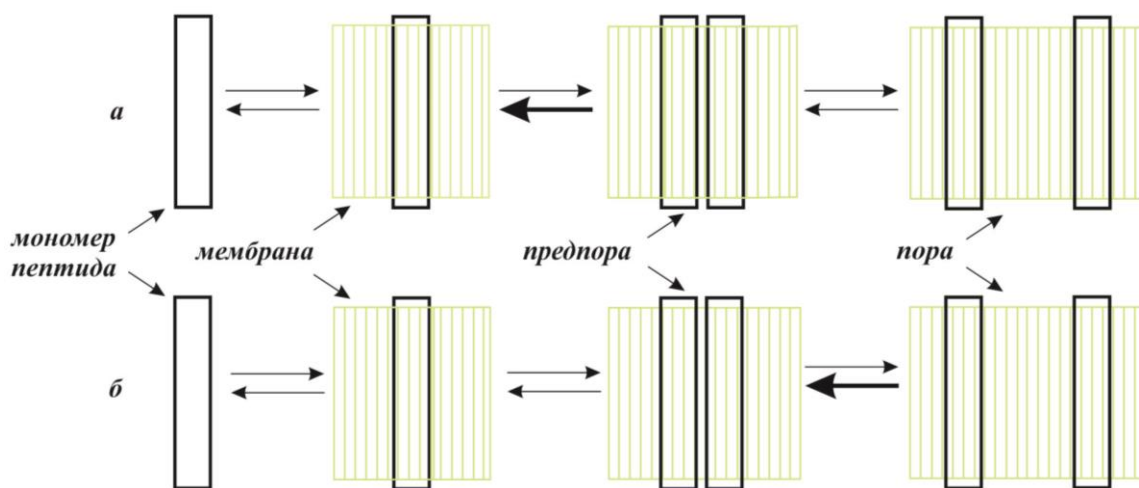


Рис. 23. Модель самоассоциации пептидов - пороформеров в мембране: а – мелиттина или мастопарана; **б** – аламетицина или ТАМ; выделенная стрелка иллюстрирует сдвиг равновесия.

Существенно, что сравнительно небольшая модификация мелиттина, блокирование 4-х положительных зарядов при синтезе тетраацетилмелиттина (ТАМ), изменяла механизм порообразования, хотя величина коэффициента его распределения между митохондриями печени крысы и средой при этом практически не менялась.

Переход мономеров пептидов - пороформеров в трансмембранное положение в присутствии $\Delta\psi$ рассматривают как модель встраивания белков-переносчиков в мембрану [Stephani et al., 2024]. Среди мембранных белков, например, описаны транспортеры, самособирающиеся из двухсегментных мономеров [Maguire, 2006; Uthayabalan et al., 2023]. Самособирающиеся в пору полипептиды, подобные исследованным в данной работе, и нативные мембранные белки-транспортеры могут иметь общие черты, что важно для понимания механизма их сборки, встраивания в мембрану, функционирования и регуляции.

В отдельных опытах для проверки препарата прочносопряженных митохондрий печени крысы в качестве тест-системы по выявлению возможных побочных эффектов потенциальных лекарств, нами были использованы модельные митохондриально-

направленные антиоксиданты SkQ1, SkQ3, SkQThy и MitoQ. На митохондриях печени крысы было показано, что эти соединения влияли на величину $\Delta\psi$ и синтез АТФ в строгом соответствии с выявленной разобщающей активностью, специфического ингибирующего эффекта на синтез АТФ обнаружено не было. Ни одно из этих соединений не вызывало высокоамплитудного набухания митохондрий, что свидетельствовало об отсутствии их влияния на неспецифические митохондриальные поры и каналы. Аламетицин, как агент, вызывающий набухание митохондрий, использовали во всех опытах в качестве положительного контроля.

3.6.2. Уникальные свойства транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae*. Впервые показано, что наблюдаемое поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae* при добавлении сукцината не связано с его диффузией через плазмалемму, а обусловлено существованием в плазматической мембране транспортера дикарбоксилатов. Об этом свидетельствовали следующие факты:

- Окисление сукцината клетками при pH 6,5 и 7,5 (pK_a 4,21 и 5,72) [Dawson et al., 1986] происходило в отсутствие его недиссоциированной формы (Рис. 21, Таблица 2).
- Зависимость скорости окисления от концентрации сукцината описывалась кривой с насыщением. При этом величины K_M для сукцината сукцинатоксидазной системы различались у клеток *S. cerevisiae* и препаратов 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, pH 6,5).
- Эффективное конкурентное ($K_i = 6,6 \pm 1,3$ мкМ) ингибирование окисления сукцината не проникающим в клетку ингибитором О-пальмитоил-L-малатом.
- Модулирование катионами и значениями pH среды инкубации величин K_M и V_{max} окисления сукцината клетками.
- Стереоспецифичность ингибирования окисления сукцината в условиях лимитирования транспортом через плазмалемму свидетельствовала о транспорте субстрата в форме дианиона.

Соотношение скоростей окисления клетками пирувата и сукцината составляло $162,2 \pm 8,1$ 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*, переносящими вещества с близкой к сукцинату структурой, например уреидосукцинат [Turossy and Cooper, 1987] или аспартат [Regenberg et al., 1998]. Однако активность всех этих переносчиков подавлялась протонофорами, в отличие от окисления сукцината клетками дрожжей. Поскольку зависимость ингибирования окисления сукцината и цитрата непроникающим в клетку ингибитором 2-ундецилмалонатом в координатах Диксона линейная, можно предположить существование общего переносчика этих субстратов. pH профиль активности транспортера (Таблица 2) свидетельствовал о транспорте субстратов в дианионной форме, а ингибирование фумаратом, но не малеатом (Рис. 17) позволило предположить, что субстрат транспортируется в *транс*-конформации.

Широкая субстратная специфичность характерна для известных дикарбоксилатных транспортеров дрожжей [Saayman et al., 2000; Lodi et al., 2004]. Однако способность

транспортировать цитрат и влияние катионов на их транспортную активность не были описаны. В наших опытах транспортер дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* переносил L-малат, сукцинат, малонат и фумарат. После опубликованных нами работ были получены экспериментальные свидетельства присутствия в плазмалемме *S. cerevisiae* чувствительного к рН транспортера фумарата [Jamalzadeh et al., 2012].

Свойства изучаемого нами переносчика позволили высказать предположение о возможном механизме его функционирования. Известны следующие механизмы: симпорт дикарбоксилата с протоном или катионом, АТФ-зависимый транспорт, электронейтральный антипорт и унипорт [Lolkema et al., 2005]. Нечувствительность транспорта сукцината к протонофору в концентрациях, деэнергизирующих плазмалемму (Рис. 10а) позволяли отвергнуть в качестве механизма симпорт дикарбоксилата с протоном. Это же делало маловероятным АТФ-зависимый транспорт сукцината. Электронейтральный антипорт в качестве физиологически целесообразного механизма подразумевал соизмеримые концентрации дикарбоксилатов по обе стороны плазмалеммы. Для изучаемого переносчика они должны быть соизмеримы с величиной K_M для сукцината сукцинатоксидазной системы, 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 рН 5,5 величины K_M для сукцината сукцинатоксидазной системы составляют для *P. tannophilus* – 0,064 мМ [Harrod et al., 1997], для *K. marxianus* – 0,031 мМ [Côte-Real et al., 1989], для *C. utilis*– 0,124 мМ [Cássio, 1993]). Клетки *S. cerevisiae* окисляли сукцинат в среде, в которой единственным катионом является непроницающий катион Tris^+ (Рис. 21б, средняя оксиграмма). Это делает маловероятным симпорт с катионом в качестве возможного механизма транспорта. Обычно в качестве косубстрата дикарбоксилатные симпортеры используют только катионы щелочных металлов [Rajor, 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 гипотетический аллостерический центр, локализованный на внешней стороне плазмалеммы.

3.6.3. Липофильный профиль канала переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae*, сравнение с липофильным профилем канала ДКТ митохондрий печени крысы. Зондирование канала переносчиков вблизи точки связывания субстратов с помощью конкурентных ингибиторов является весьма информативным. 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 конкурентного ингибитора может иметь конформацию с минимальной энергией, как предсказывают углы наклона зависимостей логарифма K_i от длины этой цепи.

Линейность 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 для транспортера митохондрий печени крысы [Шольц и др., 1990] свидетельствовала о том, что все они взаимодействовали с единственным белком – ДКТ и конкурировали с его субстратом – сукцинатом. Если при связывании каждого из эффекторов активный центр переносчика находился в одной и той же конформации, то различия в ингибировании определялись бы особенностями субстрат-связывающей точки и ее ближайшего окружения. Опираясь на результаты, полученные ранее в группе К.Ф. Шольца ранее [Шольц и др., 1990; Бондаренко и др., 1996] и на собственные результаты, для О-ацил-L-малатов, 2-алкилмалонатов (Рис. 22), предположили, что одинаковые участки алифатической цепи ингибиторов связываются одними и теми же участками канала транспортера [Мамаев, Аливердиева и др., 2006].

Большинство белков – переносчиков низкомолекулярных соединений имеют внутримолекулярный канал, через который и происходит трансмембранный транспорт [Dahl et al., 2004]. Причем, «область определения сродства» к субстрату (точка связывания субстрата) экспонирована в канал или находится в его устье [Dahl et al., 2004]. Это позволяет использовать систематический ингибиторный анализ с помощью амфифильных производных субстрата для оценки степени липофильности канала. Для тех переносчиков, для которых получена трехмерная структура, канал выглядит как трансмембранная цилиндрическая полость. Как было показано выше (раздел 3.5.), одинаковый характер липофильности в активных центрах транспортеров и модельной системе (см. значения $\Delta\Delta G$) свидетельствовал об изотропном окружении алифатических цепочек ингибиторов в этих центрах. Это позволило использовать модельные расчеты для определения длины молекулярного зонда в вакууме, поскольку уравнивающее влияние микроокружения эквивалентно отсутствию этого влияния. Вытянутая конформация характерна для состояния молекулы амфифила в вакууме с наименьшей суммой энергий связывания и отталкивания между атомами в молекуле. Исходя из вышеизложенного, было проведено моделирование молекулы-зонда с помощью пакета программ Chemoffice и расчет минимальной энергии конформации с помощью метода MM2. Модели строили с помощью последовательного удлинения предыдущего соединения на одно метильное (для 2-алкилмалонатов) или этильное (для О-ацил-L-малатов) звено. Из нескольких альтернативных вариантов расположения молекулы ингибитора выбирали вариант с наименьшей потенциальной энергией. Поскольку алифатический заместитель в молекуле субстрата не содержал атомов с неспаренными электронами, расчета с помощью программы Chemoffice MM2, учитывающей энергии притяжения и отталкивания частично заряженных атомов, было достаточно. Если значения энергии нескольких (3 – 5) моделирований одного и того же соединения совпадали, результаты считали верными (данные не приведены). Сравнение между рядами соединений позволили рассчитать разницу в длине между О-ацилмалатами и 2-алкилмалонатами с одинаковым алифатическим заместителем – 0,229 нм. Результаты моделирования в программе Chemoffice MM2 позволили оценить гибкую алифатическую цепочку ингибитора как стержень, в длину которого вклад проекции каждого метиленового звена составляет 0,13 нм. С использованием этой программы с учетом результатов моделирования конформации 2-алкилмалонатов, О-ацил-L-малатов и α,ω -алкилендималонатов с наименьшей потенциальной энергией для внешнего канала антипортера митохондрий были внесены уточнения в расчет

длины малого, большого липофильных участков и разделяющей их гидрофильной площадки, которые составили 0,37, 0,76 и 0,49 нм, соответственно.

Трикарбоксилатный, дикарбоксилатный транспортеры и ADP/ATP антипортер митохондрий ингибируются ацилами-КоА конкурентно к своим субстратам [Morel et al., 1974; Ventura et al., 2005]. Качественная зависимость интенсивности ингибирования от числа углеродов в ацильном заместителе (n) до 10-го атома одинакова и линейна в координатах $\lg K_i(n)$ [Morel et al., 1974]. Для дикарбоксилатного транспортера эта закономерность была подтверждена и в опытах по окислению сукцината препаратом митохондрий в присутствии протонофора [Ventura et al., 2005]. Это позволило предположить сходство ближайшего окружения точки связывания в канале для всех трех переносчиков и использовать для описания ДКТ митохондрий печени крысы 3D-модель ADP/ATP антипортера митохондрий [Rebay-Peyroula et al., 2003], принятую в качестве архетипа [Walters and Kaplan, 2004] (Рис. 24а.). На модели показано рассчитанное нами распределение липофильных и гидрофильных зон на внутренней поверхности канала транспортера. Было высказано предположение, что транспортер дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* соответствует модели, в которую вписываются все известные к настоящему времени специфические переносчики небольших гидрофильных молекул. Модель калиевого канала бактерии *S. lividans* была создана на основе рентгеноструктурных данных с высоким разрешением [Doyle et al., 1998]. 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 канала окружены выступающим в среду гидрофильным валиком, а канал сформирован преимущественно гидрофобными α -спирализованными трансмембранными сегментами [Doyle et al., 1998]. Модель канала *S. lividans*, созданная [Doyle et al., 1998], позволила нам предположить, что алифатический заместитель конкурентных ингибиторов в комплексе с транспортером дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* «опущен» в канал (Рис. 24б.). В противном случае, около 80% длины алифатического заместителя наиболее длинных ингибиторов должна была огибать обширную гидрофильную зону. Липофильный профиль при этом отличался бы от профиля, полученного нами (Рис. 22), и представлял собой прямую, параллельную оси абсцисс, или участок с небольшим наклоном как описано [Шольц и др., 1990]. В первичной структуре многочисленных переносчиков малата и сукцината цитоплазматической мембраны бактерий и плазмалеммы дрожжей показано наличие консервативных положительно заряженных аминокислотных остатков (например, Arg^+ [McClelland et al., 2001; Kaneko et al., 2002; Lodi et al., 2004]), играющих важную роль в связывании субстрата. Если предположить, что карбоксильная группа (малата или малоната в молекуле ингибитора) взаимодействовала с положительно заряженными аминокислотными остатками активного центра транспортера, то канал переносчика плазматической мембраны оставался липофильным на расстоянии 2,56 нм (длина О-стеароил-L-малата) от точки связывания субстрата (Рис. 24б.). В непосредственной близости от точки связывания дикарбоксилатов (до 0,72 нм) также имелась липофильная область, о чем свидетельствовало более эффективное ингибирование транспорта итаконатом по сравнению с L-малатом (Рис. 16).

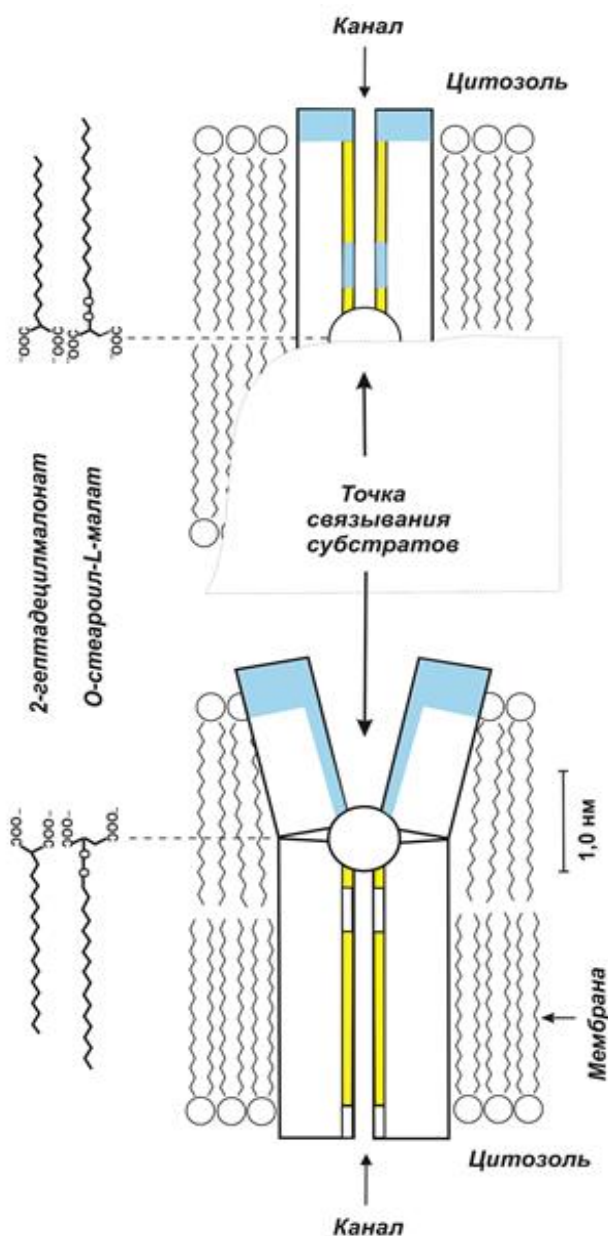


Рис. 24.

а – Модель трансмембранной части канала ДКТ митохондрий печени крысы (внешнего полуканала), созданная на базе третичной структуры ADP/ATP антипортера митохондрий [Pebay-Peyroula et al., 2003; Walters and Kaplan, 2004].

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

Гидрофильная область отмечена голубым цветом; липофильная – желтым. 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).

Протяженность гидрофобного участка липофильного профиля оценивали как разницу длин О-стеароил-L-малата и 2-пентилмалоната (0,72 нм) – самого длинного и самого короткого молекулярных зондов. Она составила 1,84 нм. В этом липофильный канал транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* имел сходство с каналом калиевого переносчика бактерии *S. lividans* [Doyle et al., 1998], у которого протяженность гидрофобной зоны, рассчитанная из его трехмерной структуры, составляла 2,4 нм. Очевидна перспективность разработки новых подходов к «сканированию» каналов переносчиков в нативных условиях.

ВЫВОДЫ

1. Суспензия митохондрий в оксиметрической ячейке может быть использована в качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока. Проводимость, индуцированная во внутренней мембране митохондрий печени крысы, и степень активации окисления сукцината связаны линейной зависимостью.

2. Обнаружены два механизма самоассоциации пороформеров в мембране митохондрий: с замедлением образования непроводящей предпоры (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. Показано, что стационарную калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина, можно измерить на фоне проводимости его высокоолигомерных форм. Пора, образованная аламетицином во внутренней мембране митохондрий, может содержать димеризованный пептид и липид.

4. Сформулированы, теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены принципы использования амфифильных эффекторов при изучении трансмембранного транспорта и измерения активности нативных транспортеров в интактных системах.

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

6. Выявлены нехарактерные для транспортеров плазмалеммы грибов особенности нового переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae*: независимость транспорта от генерации мембранного потенциала, транспорт по механизму неэлектрогенного унипорта, широкая субстратная специфичность (сукцинат, цитрат, фумарат, итаконат, малонат, L- и D-малат), рН оптимум транспорта в щелочной области, рН-зависимое модулирование активности однозарядными катионами (Na^+ , K^+ , Tris^+).

7. Изучен активный центр нового транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* с использованием непроникающих в клетку конкурентных ингибиторов (2-алкилмалонатов). В активном центре переносчика выявлена протяженная (1,84 нм) липофильная область на расстоянии 0,72 нм от точки связывания субстрата.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, индексируемых в Web of Science или Scopus.

1. 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.

2. Абрамов Ш.А., Котенко С.Ц., Эфендиева Д.А. (Аливердиева Д.А.), Халилова Э.А., Исламмагомедова Э.А., Даунова С.М. Новая питательная среда для выращивания дрожжей // **Прикладная биохимия и микробиология**. – 1995. – Т. 31, № 2. – С. 232-233.
3. 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.
4. Аливердиева Д.А. Сравнительное изучение некоторых параметров энергетического обмена двух штаммов *Saccharomyces cerevisiae* // **Прикладная биохимия и микробиология**. – 2001. – Т. 37, № 1. – С. 90-96.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Мамаев Д.В., Аливердиева Д.А., Бондаренко Д.И., Шольц К.Ф. Изучение топографии активного центра дикарбоксилатного транспортера митохондрий печени крыс с помощью липофильных производных его субстратов // **Биохимия**. – 2006. – Т. 71, Вып. 7. – С. 984-995.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Aliverdieva D.A., Mamaev D.V., Snezhkova L.G., 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.

16. 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.
17. 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.
18. **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. doi:10.15379/2410-1869.2015.02.01.1.
19. 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.
20. 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.
21. **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. doi:10.15379/2410-1869.2019.06.02.01.
22. Goleva T.N., Rogov A.G., Korshunova G.A., Trendeleva T.A., Mamaev D.V., **Aliverdieva D.A.**, Zvyagilskaya R.A. SkQThy, the novel promising mitochondria-targeted antioxidant // **Mitochondrion**. – 2019. V.49. – P. 206-216.
23. Rogov A.G., Goleva T.N., Suchanova E.I., Ovchenkova A.P., **Aliverdieva D.A.**, Zvyagilskaya R.A. Mitochondrial disfunctions may be one of the major causative factors underlying detrimental effects of benzalkonium chloride // **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. – 2020:8956504. doi: 10.1155/2020/8956504. eCollection 2020.
24. Rogov A.G., Goleva T.N., **Aliverdieva D.A.**, Zvyagilskaya R.A. SkQ3 exhibits the most pronounced antioxidant effect on isolated rat liver mitochondria and yeast cells. // **Int. J. Mol. Sci.** – 2024. – V. 25, Iss.1. 1107. doi.org/10.3390/ijms25021107. eCollection 2024.

Главы и статьи в книгах:

1. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Lagutina L.S. and Bondarenko D.I. 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.
2. **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.
3. **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.

4. **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.

5. **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 Ratón: Brown Walker Press, USA. – 2016. – P. 302-306.

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. Патент РФ № 2084519, Гос. реестр изобретений РФ, 20.07.1997 // Бюл. № 20., 1997.

2. Халилова Э.А., Исламмагомедова Э.А., Абакарова А.А., **Аливердиева Д.А.** Питательная среда для культивирования дрожжей *Saccharomyces*. Патент РФ № 2804446. Гос. реестр изобретений РФ, 29.09. 2023 // Бюл. № 28, 2023.

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.**, Мамаев Д.В., Бондаренко Д.И., Шольц К.Ф. Роль дикарбоксилатного транспортера плазматической мембраны *Saccharomyces cerevisiae*. // Материалы III съезда Биохимического общества, Санкт-Петербург, 26 июня – 2 июля 2002. – С. 237-238.

3. **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.

4. **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.

5. **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.

6. 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.

7. **Aliverdieva D.A.**, Mamaev D.V., Bondarenko D.V., Sholtz K.F. Zvyagilskaya R.A. The atypical plasmalemmal dicarboxylate transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. // 15th European

Bioenergetics Conference. Moscow, 19 – 24 July, 2008. // **Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics.** – 2008. – 1777. EBCS Suppl. – P. 80.

8. **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.

9. **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.

10. **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.

11. **Aliverdieva D.A.** A mitochondrial biosensor for studies of rate-limiting step of pore formation by alamethicin. Abstracts. 2nd World Congress on Biotechnology, Philadelphia, USA, 29 November – 1 December 2011 // **J. Microbial. Biochem. Technol.** – 2011. V. 3, Iss. 6. – P. 72.

12. **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.

13. **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.

14. Дуржинская М.Х., **Аливердиева Д.А.**, Мамаев Д.В. Пороформирующие антимикробные пептиды и митохондрии: тест на токсичность. // Научные труды II Объединенного научного форума, VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды». Сочи, Дагомыс, 1 – 6 октября 2019 г. // **Acta Naturae.** – Т.2. – С.137.

15. 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 Съезд биохимиков России, X Российский симпозиум «Белки и пептиды», VII Съезд физиологов СНГ. Сочи, Дагомыс, 3 – 8 октября 2021 г. – Т.2. – С.142-143.

16. **Аливердиева Д.А.** Антимикробные пороформирующие полипептиды: механизм действия на митохондрии, перспективы клинического применения. // Тезисы докладов II Всероссийской конференции с международным участием «Теоретические и практические аспекты действия естественной и искусственной гипотермии на организм», Махачкала, 27-30 сентября 2023 г. – С. 70-71.