ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н. БАХА

На правах рукописи

Аливердиева Динара Алиевна

ТРАНСПОРТЕРЫ ДИКАРБОКСИЛАТОВ И МОДЕЛЬНЫЕ ПОРОФОРМЕРЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ

1.5.4. Биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени доктора биологических наук

> Научный консультант доктор биологических наук, профессор Звягильская Рената Александровна

Москва 2022

оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6м
ВЕДЕНИЕ	
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Традиционные прямые и непрямые методы исследования трансмембранн	ЮГО
транспорта в интактных органеллах и клетках	18
1.2. Митохондрии печени крысы и дрожжи Saccharomyces cerevisiae – удобны	ме
модельные объекты исследований	
1.3. Транспортеры митохондрий млекопитающих и митохондрий S. cerevisiae	,
1.4. Сопрягающая мембрана митохондрий печени крысы и плазмалемма S. се	revisiae,
протонные помпы, протонофорный цикл	
1.5. Структура и механизм мембранотропного действия пороформеров аламе	тицина,
мелиттина и мастопарана	
1.6. Медицинское значение пороформеров мелиттина, мастопарана и аламети	щина76
1.7. Молекулярные характеристики транспортеров С ₄ -ДКБ и механизм транси	покации 81
1.7.1. Транспортеры ДКБ. Общие сведения, роль в метаболизме	
1.7.2. Первичная структура транспортеров ДКБ	
1.7.3. Вторичная структура транспортеров ДКБ	
1.7.4. Механизм транспорта и специфичность переносчиков	
1.7.5. Реконструкция трехмерной структуры активного центра и механизм	
транслокации	
1.7.6. Предполагаемая третичная структура дикарбоксилатных транспортеров	3108
1.8. Трехмерные структуры трансмембранных транспортеров	
1.9. Теоретическое обоснование некоторых используемых в работе методичес	ских
приемов	
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
2.1. Реагенты	
2.2. Модельные организмы	
2.3. Условия выращивания и предобработки клеток S. cerevisiae	
2.4. Выделение митохондрий печени крысы, митоходрий дрожжей, получени	е СМЧ и
митохондрий с поврежденной внешней мембраной	
2.4.1. Среды выделения и инкубации митохондрий и СМЧ	

2.4.2. Выделение митохондрий S. cerevisiae	137
2.4.3. Выделение митохондрий печени крысы	. 137
2.4.4. Получение СМЧ	. 138
2.4.5. Измерение сукцинатдегидрогеназной активности СМЧ	. 139
2.4.6. Получение митохондрий с поврежденной внешней мембраной	. 139
2.5. Выделение мастопарана и мелиттина	139
2.6. Определение количества белка митохондрий	140
2.7. Определение количества глюкозы	140
2.8. Определение скорости поглощения кислорода	140
2.9. Регистрация потенциала, генерируемого на внутренней мембране митохондрий.	. 141
2.10. Измерение набухания митохондрий и определение критической концентрации	
амфифила, вызывающей лизис митохондрий	.142
2.11. Определение доли доступной мембранной фазы клеток	. 143
2.12. Синтез производных малата и малоната	. 144
2.13. Определение коэффициентов распределения О-ацил-L-малатов в системе	
октанол/среда	.144
2.14. Определение размеров молекул	145
2.15. Расчет действующей концентрации мембраноактивных пептидов	.146
2.16. Определение кинетических параметров	.146
2.17. Молекулярно-генетические методы	. 147
2.18. Представление результатов	150
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	152
3.1. Митохондрии печени крысы – биосенсоры трансмембранного тока	. 152
3.1.1. Оценка гомогенности и стабильности митопластов, образующихся из	
митохондрий печени крысы при действии индукторов проницаемости	.152
3.1.2. Особенности активации v4 митохондрий печени крысы в монокалиевой среде	
валиномицином и мелиттином	153
3.2. Непрямые методы измерения трансмембранного транспорта в митохондр	лях
печени крысы и в клетках S. cerevisiae	. 160
3.2.1. Сукцинатоксидаза препарата митохондрий печени крысы в присутствии	
протонофора (SF) – эндогенная сопряженная система для измерения транспорта	
интактным ДКТ	160
3.2.2. Эндогенная сопряженная система клеток для изучения транспорта сукцината	
и пирувата через плазмалемму S. cerevisiae	165

3.2.2.1. Молекулярно-генетическая характеристика штамма S. cerevisiae	165
3.2.2.2. Подбор условий для измерения низкой скорости окисления сукцината клетка	МИ
S. cerevisiae	168
3.2.2.3. Эквивалентность прямого и непрямого методов измерения транспорта пирува	ата
в клетки S. cerevisiae	172
3.2.2.4. Измерение транспорта сукцината в клетки S. cerevisiae	176
3.2.2.5. Непроницаемость плазматической мембраны S. cerevisiae для ингибиторов	
транспорта	181
3.3. Характеристики пороформеров аламетицина и мастопарана в сопрягающей	
мембране интактных митохондрий печени крысы	187
3.3.1. Природа стадии, лимитирующей активацию v4 митохондрий печени крысы	
мелиттином, мастопараном и ТАМ	187
3.3.2. Измерение концентрационного порядка реакции, лимитирующей КТТ,	
индуцированный мастопараном в митохондриях печени крысы	192
3.3.3. Природа двуфазной зависимости от времени активации v4 митохондрий печени	ſ
крысы аламетицином	194
3.3.4. Измерение концентрационного порядка реакции, лимитирующей КТТ,	
индуцированный аламетицином в первой фазе активации v ₄ митохондрий печени	
крысы	196
3.3.5. Природа стадии, лимитирующей первую фазу активации v4 митохондрий печен	łИ
крысы аламетицином	198
3.4. Новыи транспортер ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> и его энзимологическая	
3.4. Новыи транспортер ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> и его энзимологическая характеристика	201
 3.4. Новыи транспортер ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> и его энзимологическая 3.4.1. Регуляция транспортера ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> катионами	201 212
 3.4. Новыи транспортер ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> и его энзимологическая характеристика	201 212 219
 3.4. Новыи транспортер ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> и его энзимологическая характеристика	201 212 219
 3.4. Новыи транспортер ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> и его энзимологическая характеристика. 3.4.1. Регуляция транспортера ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> катионами	201 212 219 220
 3.4. Новыи транспортер ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> и его энзимологическая характеристика. 3.4.1. Регуляция транспортера ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> катионами	201 212 219 220
 3.4. Новыи транспортер ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> и его энзимологическая характеристика	201 212 219 220 220
 3.4. Новыи транспортер ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> и его энзимологическая характеристика	201 212 219 220 209
 3.4. Новыи транспортер ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> и его энзимологическая характеристика	 201 212 219 220 209 223
 3.4. Новыи транспортер ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> и его энзимологическая характеристика	 201 212 219 220 209 223 230
 3.4. Новыи транспортер ДКБ плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> и его энзимологическая характеристика	 201 212 219 220 209 223 230 236

3.11. Липофильный профиль канала транспортера ДКБ плазмалеммы S. cerevisiae и	
перспективы получения липофильных профилей точечных мутантов	249
3.12. Преимущества использования эндогенных сопряженных систем по сравнению с	С
традиционными прямыми методами измерения транспорта	254
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	257
ВЫВОДЫ	259
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	261
Благодарности	323

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЦ	_	активный центр;
a. o.	_	аминокислотный остаток;
БЛМ	_	бислойная липидная мембрана;
ДК	—	дыхательный контроль;
ДКБ	—	дикарбоксилаты;
ДКТ	_	дикарбоксилатный транспортер;
ДМСО	—	диметилсульфоксид;
ДЦ	—	дыхательная цепь;
ККЛ	_	критическая концентрация лизиса;
KTT	_	калиевый трансмембранный ток;
ОКСФОС	—	окислительное фосфорилирование;
С ₄ -ДКБ	_	четырехуглеродные дикарбоксилаты;
CB	_	среда выделения митохондрий;
СВД	—	среда выращивания дрожжей;
СВЖ	—	среднее время жизни;
СМЧ	—	субмитохондриальные частицы;
СИ	_	среда инкубации митохондрий;
СИД	—	среда инкубации клеток дрожжей;
TAM	—	тетраацетилмелиттин;
ЭСС	_	эндогенная сопряженная система;
ЭТЦ	_	электрон-транспортная цепь;
A_{200}	_	концентрация пептида, активирующая v ₄ на 200%;
$C_{\rm m}$	_	равноэффективная мембранная концентрация пептида,
		соответствующая A_{200} ;
DTT	_	(англ. dithiothreitol) – 1,4-дитиотреит;
NADH	_	восстановленная форма
		никотинамидадениндинуклеотида;

NAD^+	_	окисления форма никотинамилалениндинуклеотила.
		окисленная форма никотинамидадениндинуклеотида,
F	-	флуоресценция;
FCCP	—	(англ. carbonylcyanide(4-trifluoromethoxy)phenylhydrazone)
		– карбонилцианид(4-флюорометокси)фенилгидразон;
HEPES	—	(англ. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)-4-
		(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота;
I_{50}	—	концентрация ингибитора, вызывающая
		полумаксимальный эффект;
Ki	—	константа ингибирования;
K_{M}	—	константа Михаэлиса;
Kp	—	коэффициент распределения амфифильного эффектора
		между митохондриями печени крысы и средой;
MES	—	(англ. 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) – 2-(N-
		морфолино) этансульфоновая кислота;
NaCT	—	Na ⁺ -цитратный транспортер;
NaDCT	_	Na ⁺ -дикарбоксилатный симпортер;
R _n	_	коэффициент распределения О-ацил-L-малатов в системе
		октанол/среда;
SF	_	3,5-ди-трет-бутил-4-оксибензилиденмалононитрил
TMC	_	трансмембранный сегмент;
Tris	_	(англ. Tris(hydroxymethyl)aminomethane) –
		трис(гидроксиметил)аминометан;
YNB	_	(англ. Yeast Nitrogen Base) среда выращивания дрожжей.

введение

Актуальность темы. Наряду с неоспоримыми достоинствами изучения показателей трансмемебранного методов качественных транспорта на модельных системах (липосомах и плоских бислойных липидных мембранах (БЛМ)) большинство широко используемых прямых методов количественного исследования транспорта обладает рядом неустраненных настоящего времени недостатков. Изучению до количественных параметров мешает негомогенность фракции мелких бислойных липосом [Schwarz and Robert, 1992], несоответствие нативному липидного окружения переносчика Tillman and Cascio, 2003] И вероятность неоднородного распределения реконструированного транспортера в гигантских однослойных липосомах [Walde et al., 2010]. Для измерения транспорта в стационарном режиме БЛМ не используются. Метод пэтч-кламп позволяет применять эффекторы только с внутренней (по отношению к нативной ориентации) стороны биомембраны. При транспортера неспецифическая высоком значении $K_{\rm M}$ сорбция на поверхности клеток и удерживание части субстрата в периплазме может исказить результаты [Benito and Lagunas, 1992]. Очевидна необходимость новых методов и подходов к изучению количественных характеристик субстратов трансмембранного транспорта В нативных мембранных системах. Чтобы возможные артефакты, исключить связанные С выделением переносчиков ИХ реконструкцией В искусственные И работе мембраны, В настоящей активности дикарбоксилатных транспортеров измеряли в интактных мембранах с помощью эндогенных сопряженных систем (ЭСС).

Сукцинатоксидазная ферментативная система митохондрий печени крысы (далее сукцинатоксидаза) включает дикарбоксилатный транспортер (ДКТ) митохондрий, сукцинатдегидрогеназный комплекс (далее

сукцинатдегидрогеназа) и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазу. Причем активность компонентов в этом ряду возрастает. Кроме того, величина $K_{\rm M}$ по сукцинату у переносчика более чем на порядок превышает величину $K_{\rm M}$ сукцинатдегидрогеназы, т.е. природа «сконструировала» почти идеальную ЭСС для измерения в стационарном режиме концентрации сукцината в митохондриях. Поэтому дыхательную цепь (ДЦ) 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 pH и ионным составом, благодаря системам гомеостаза клетки. Это позволяет изучать влияние этих внешних эффекторов только на трансплазмалеммный 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. В присутствии аламетицина имеет место синергическое повышение эффективности эндофлоксацина при лечении респираторных болезней, вызываемых Mycoplasma pulmonis [Fehri et al., 2007], причем эффект связывают с порообразующим действием этого пептида. Мастопаран предотвращает метастазообразование в модельных экспериментах [Kamath et.al., 2001, et.al., 2016] и Hilchie является потенциальным агентом против септического шока [Yibin et al., 2005]. Мелиттин является малотоксичным противоопухолевым препаратом [Zhang et al., 2016] и перспективным средством при лечении карциномы печени, оказывает влияние на пролиферацию опухолевых клеток, процессы апоптоза, метастазирования, ангиогенеза [Liu et.al., 2016].

Несмотря многочисленные исследования, на механизм антимикробного действия пороформеров до сих пор не ясен. Нерешенным вопросом порообразования В механизме является определение концентрационного порядка лимитирующей стадии ЭТОГО процесса. Очевидна необходимость разработки методов исследования действия пороформеров на митохондрии в присутствии градиента электрического потенциала на внутренней митохондриальной мембране ($\Delta \psi$).

С₄-дикарбоксилаты (С₄-ДКБ) играют важную роль в метаболизме эукариот. В частности, сукцинат и L-малат являются интермедиатами цитратного цикла и обеспечивают взаимосвязь между обменом в пероксисомах И митохондриях. Структура активного центра переносчиков ДКБ не изучена. В зависимости от возможной ориентации трансмембранные сегменты переносчика могут сформировать как гидрофильный, В значительной липофильный так И мере трансмембранный канал. Степень его липофильности не изучена, так как ни для одного из транспортеров ДКБ эукариот третичная структура не установлена. Хотя на основе переносчика цитрата и глутамата Vibrio cholera [Mancusso et al., 2012] была сделана попытка компьютерного Na⁺/дикарбоксилатного моделирования трехмерной структуры котранспортера человека [Schlessinger, et al., 2014].

Показано, что точка связывания субстрата в ДКТ митохондрий экспонирована в канал [Шольц и соавт., 1990]. Это позволило для оценки липофильности канала использовать ингибиторный анализ транспорта с помощью серии алкильных и ацильных производных субстрата разной длины углеводородной цепи. Для этой оценки было необходимо отработать новые подходы, включающие, прежде всего, разработку методов исследования взаимодействия этих амфифилов и митохондрий без потери интактности ЭСС.

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

На основании вышеизложенного, можно заключить, что ДЛЯ изучения структуры и свойств дикарбоксилатных транспортеров и механизмов порообразования модельных пороформеров требуется разработка методических подходов. перечисленные новых А преимущества интактных митохондрий и клеток делают перспективным предлагаемое направление – использование ЭСС в количественном изучении трансмембранного транспорта.

Цель и основные задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение особенностей порообразования индукторами ионной аламетицином, мелиттином проницаемости – И мастопараном c использованием митохондрий печени крысы, а также сравнительное изучение свойств, кинетических параметров и активного центра дикарбоксилатных транспортеров митохондрий печени крысы И плазмалеммы S. cerevisiae различными С механизмами функционирования.

Для достижения цели работы были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать новые экспериментальные подходы для определения параметров переносчиков 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 (TAM) и мастопараном и изучить скоростьлимитирующую стадию порообразования.

3. Изучить свойства и кинетические характеристики переносчика ДКБ плазмалеммы *S. cerevisiae*: механизм, субстратную специфичность, pH-оптимум, влияние катионов на величины $K_{\rm M}$ и $V_{\rm max}$.

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

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

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

Теоретическаяая и практическая значимость работы. Научнопрактическую ценность имеют разработанные или усовершенствованные методы использования амфифильных эффекторов и методология измерения нативных транспортеров в интактных системах:

1. Выбор хорошо изученного организма в качестве объекта исследования и разработка методик получения однородных препаратов органелл или клеток для этих объектов. Так, для изучения действия мастопарана, мелиттина и аламетицина на митохондрии использовали препарат высокосопряженных митохондрий печени крысы. К нативным транспортерам были применены кинетические подходы, разработанные для препаратов очищенных ферментов.

2. Использование по возможности минимальных сред инкубации. Особенности клеток микроорганизмов позволяют изучать транспорт через плазмалемму в односоставных средах, а также подобрать условия выращивания и подготовки клеток, когда активность ЭСС больше активности измеряемого транспорта.

3. Подтверждение принципиальных результатов несколькими независимыми способами в работе со сложными ЭСС. Например, лимитирование скорости окисления сукцината его транспортом и для клеток дрожжей, и для митохондрий печени крысы демонстрировали тремя независимыми способами и контролировали в каждой кривой при измерении $K_{\rm M}$ или I_{50} . Транспорт ДКБ в клетку в дианионной форме показывали по зависимости $K_{\rm M}$ от рН и по наличию стереоспецифичности в паре фумарат/малеат.

4. Подбор условий, в которых эффектор, используемый для изучения транспорта, не проникал через мембрану к измеряющей транспорт системе (в случае трансплазмалеммного транспорта в клетках дрожжей) или не влиял на ДЦ (в случае транспорта в митохондрии печени крысы). Разработка простых тестов на такую непроницаемость.

5. Учет детергентных амфифильных свойств эффекторов (модельных пептидов-пороформеров и алкил- или ацилсодержащих ингибиторов трансмембранных переносчиков ДКБ) при высоких концентрациях. Исследования проводили в безопасной для органелл и амфифилов, клеток зоне концентраций существенно меньших литической.

Разработанные при изучении транспортера ДКБ S. cerevisiae экспериментальные подходы применимы для изучения малоактивных переносчиков окисляемых субстратов дрожжей. Предложенный нами центров ДКБ метод зондирования активных переносчиков с субстратов использованием линейки производных с монотонно

увеличивающимся алифатическим заместителем можно использовать для изучения структуры активных центров трансмембранных транспортеров.

Выявленное нами влияние пептидов-пороформеров на $\Delta \psi$ и сопоставление литической и эффективной их концентрации (ККЛ/ A_{200}) позволит предварительно оценить возможное токсическое и терапевтическое действие пороформеров – потенциальных лекарств. Данные, полученные в работе, расширяют представления о механизмах порообразования мелиттина, мастопарана и аламетицина, используемых в медицинской практике.

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

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, списка цитируемой литературы, включающего 510 ссылок. Работа изложена на 324 страницах машинописного текста, содержит 78 рисунков и 10 таблиц.

Личный вклад соискателя заключается в выборе направления исследований, разработке И развитии новых экспериментальных подходов, использованных В работе, интерпретации полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, вклад соискателя заключался в постановке задачи, непосредственном участии в проведении экспериментальной работы, в обсуждении полученных результатов и оформлении их в виде публикаций.

Положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Сформулирован, теоретически обоснован и экспериментально подтвержден новый методологический подход. Ферментативные системы окисления субстратов в препаратах митохондрий и клеток можно

использовать в качестве ЭСС для изучения трансмембранного транспорта моно-, ди- и трикарбоновых кислот.

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

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

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

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

Апробация работы. Результаты основные И 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 – среде" (Москва, 2004, 2005 и окружающей 2006), Московском Международном конгрессе "Биотехнология – состояние и перспективы развития" (Москва, 2009), 2-м Международном конгрессе Биотехнология – 2011 (Филадельфия, США), IV-ый международной конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2011 V-ой (Малага, Испания, 2011), международной конференции

Environmental, Industrial and Applied Microbiology BioMicroWorld2013 (Мадрид, Испания, 2013), 27-ой конференции FEBS/PABMB (Лиссабон, Португалия, 2001) Европейских Биоэнергетических конференциях (ЕВЕС) (Москва, 2006 и Дублин, Ирландия, 2008), 38-ой конференции FEBS (Санкт-Петербург, 2013) и 39-ой конференции FEBS-EMBO (Париж, Франция, 2014), VI-ой международной конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2015 (Барселона, Испания, 2015), І-м Российском микробиологическом конгрессе (Москва, 2017), VI-м Съезде биохимиков России (Сочи, 2019), VII-м Съезде биохимиков России и Х-м Российском симпозиуме "Белки и пептиды" (Сочи, Дагомыс, 2021).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 43 работы в международных и российских рецензируемых научных изданиях, в т.ч. 23 статьи в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, из них 21 – в научных журналах, индексируемых в базе данных Web of Science, получен 1 российский патент на изобретение. Данные диссертации суммированы в 6-ти обзорных статьях, а также включены в книги зарубежных издательств: "Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology" выпущенной издательством "Formatex Research Center", Spain, 2010; Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges", издательством World Scientific Publishing Co., USA, UK, 2012, "Industrial, medical and environmental applications of microorganisms. Current status and trends", издательством Wageningen Academic Publishers, the Netherlands, 2014, "Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms", издательством BrownWalker Press, 2016.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Традиционные прямые и непрямые методы исследования трансмембранного транспорта в интактных органеллах и клетках

Биологические мембраны не являются абсолютно непроницаемым барьером. Клеточная мембрана (плазмалемма, плазматическая мембрана) содержимое клетки от внешней среды, обеспечивая отделяет eë целостность и регулируя обмен между клеткой и средой. Одной из ее функций является транспорт веществ в обоих направлениях: в клетку и из нее. Метаболизм в эукариотической клетке компартментализован. В цитозоле осуществляются гликолиз, липолиз, обмен аминокислот, в митохондриях локализованы такие метаболические пути, как цитратный цикл, β- окисление жирных кислот, важные этапы аммониогенеза, метаболизма аминокислот и ДЦ, необходимые для выполнения основной функции митохондрий _ окислительного фосфорилирования. Взаимозависимость биохимических протекающих процессов, В митохондриях и цитозоле, обеспечивается интенсивным транспортом метаболитов через митохондриальные мембраны.

Транспорт веществ осуществляется с помощью различных механизмов. А именно, простая диффузия, когда вещества пересекают липидный бислой клеточной мембраны по градиенту концентрации без затрат энергии; пассивный транспорт, разновидностью которого является облегченная диффузия, в которой участвуют специальные белки – транспортеры, и активный транспорт, требующий затрат энергии, так как он происходит против градиента концентрации переносимого вещества. В зависимости от направления перемещения веществ в ходе мембранного

транспорта и их количества различают унипорт (транспорт одного вещества в одном направлении), симпорт (транспорт двух веществ в одном направлении) и антипорт (перенос веществ в противоположных направлениях с помощью одного транспортера).

Проблемы, связанные С изучением транспорта реконструированными белками-транспортерами. Нативность белков и гомогенность их популяции в препарате. В отличие от очищенных ферментов, измерение трансмембранного транспорта очищенными (или рекомбинантными) переносчиками требует ИХ реконструкции В искусственную мембранную систему. Это ставит перед экспериментатором несколько очевидных методических проблем. Известно, что гигантские липосомы получают только монослойными. Мелкие же бислойные липосомы, как правило, имеют ограниченный $K_{\rm M}$ внутренний объем, И при измерении транспорта субстрата, перенесенного из среды в липосомы, концентрация его в липосомах всегда будет существенно большой. А при транспорте субстрата из липосом в среду концентрация субстрата внутри липосом слишком быстро убывает. Кроме того, гомогенность встраивания В мембрану исходно несимметричных молекул транспортера, даже работающих по механизму электронейтрального антипорта, не гарантирована.

Биологическая мембрана отличается от искусственной липидным составом и возможной асимметрией между наружным и внутренним лепестками [van der Rest et.al., 1995]. Наиболее простые в получении и гомогенные малые моноламмелярные визикулы имеют следующие недостатки: площадь наружного слоя почти вдвое больше площади внутреннего, а липидные молекулы, имеющие форму обратного конуса (фосфатидилхолин, например) находятся преимущественно в наружном слое, что приводит к искусственной асимметрии. Малые липосомы

отличаются большей гомогенностью по сравнению с гигантскими, что существенно при изучении транспортных процессов.

Экспериментально показано отличие свойств солюбилизированных, очищенных и реконструированных в липосомы трикарбоксилатного [Bisaccia et.al., 1993] и аденилатного [Majima et.al., 2002] транспортеров от свойств нативных транспортеров. Восстановление активности интегрального белка биологической мембраны после реконструкции в БЛМ также не гарантирует воссоздание всех его функциональных характеристик. Так АТФ-ингибируемый К⁺-канал теряет в искуственной системе зависимость ингибирующего эффекта от Mg²⁺ [Негода и соавт., 2005].

Внутренняя или сопрягающая мембрана митохондрий состоит преимущественно из белков (75% по весу), но в то же время доля собственно погруженной в бислой «белковой массы» не так велика [Скулачев, 1989]. Тем не менее, существенную часть гидрофобного матрикса мембраны составляют боковые цепи гидрофобных аминокислот и ассоциированные с ними липиды с нарушенной бислойной организацией [Gil et.al., 1998; Fattal and Ben-Shaul, 1993]. В частности, количество липидов, ассоциированных с самым распространенным интегральным белком – аденилатным переносчиком (25% от общего количества белка [Шольц, 1994]), составляет до 25 молекул липида на димер (65 кДа) [Horvath et.al., 1990]. Вместе с тем, по соотношению липид/белок искусственные системы существенно отличаются от сопрягающей мембраны митохондрий или хлоропластов [Скулачев, 1989].

Традиционные методы прямого измерения транспорта в клетках и в препаратах нативных субклеточных структур. В настоящее время традиционно при измерении транспорта в клетках и нативных субклеточных мембранных субструктурах применяют, как правило, радиоизотопные методы, экзогенные сопряженные системы и метод

локальной фиксации потенциала, patch-clamp (англ. patch – фрагмент, clamp – захват, фиксация). Эти прямые методы измерения транспорта лишены недостатков, описанных выше. Количество субстрата, вошедшего в клетку (или органеллу), определяют как разницу между количеством добавленного субстрата и количеством субстрата, оставшегося в натанте после осаждения клетки (или субструктуры), а также как разницу с количеством субстрата, оставшегося в осадке (например, [Akita et.al., 2000; Sousa et.al., 1992]). В ряде случаев возникают методические проблемы, например, измерение в клетках прямыми методами малых транспортных активностей со сродством к субстрату порядка нескольких миллимолей для метаболизирующегося субстрата, затруднено. Увеличение времени измерения увеличивает количество перенесенного в клетку субстрата, но при этом растет ошибка из-за конверсии субстрата (например, меченый углерод теряется в виде CO₂) [Teusink et.al., 1998]. Если из-за высокого используются большие концентрации субстрата, значения $K_{\rm M}$, то увеличивается неспецифическая сорбция на поверхности клеток и удерживание части субстрата в периплазме [Benito and Lagunas, 1992]. В результате – количество субстрата в осадке не всегда эквивалентно его количеству в цитоплазме. Радиоизотопный метод или метод меченых атомов основан на использовании радиоактивных и стабильных изотопов в качестве метки химических элементов, что позволяет следить за их поведением в системе. С помощью счетчика радиактивности измеряют количество радиоактивного субстрата в натанте или в осадке, полученном центрифугированием сразу после остановки транспортного процесса. Добавление к натанту экзогенной сопряженной системы (например, лактатдегидрогеназы и НАДН) позволяет определить количество пирувата, оставшегося после акта транспорта, по убыванию вещества с высокой молярной экстинкцией (НАДН), потраченного на превращение пирувата в лактат.

Метод локальной фиксации потенциала, patch-clamp – один из методов электрофизиологии для изучения ионных каналов. Метод позволяет в контролируемых условиях измерять ионный ток через каналы в изолированом фрагменте биологической мембраны [Suk HJ et al., 2019]. Metog patch-clamp, успешный во многих отношениях, требует ненативных гигантских митохондрий [Antonenko et.al., 1991], что связано с изменением под действием купризона нативного липидного состава этих органелл [Sorgato et.al., 1987], или модификаций клеток под действием цефалексина - блокатора образования клеточных перегородок [Геннис, 1997]. Метод patch-clamp непригоден для измерения электронейтрального антипорта и мало приспособлен для измерения низких транспортных активностей [Геннис, 1997]. Таким образом, наряду с использованием общепринятых на сегодняшний день методов прямого измерения трансмембранного транспорта актуален поиск и применение альтернативных, в том числе непрямых методов измерения активности нативных транспортеров.

Измерение транспорта, индуцированного катионного самособирающимися пороформирующими пептидами. Пороформеры – это группа липофильных или амфипатических соединений различной природы (пептиды, липопептиды, гликолипопептиды и полиеновые соединения), образующих поры (или каналы) в биологических И искусственных мембранах. Общим свойством исследованных в работе пороформирующих пептидов (мелиттина, аламетицина и мастопарана) является способность самособираться в канал, состоящий в основном из αспирализованных мономеров в трансмембранном состоянии в присутствии трансмембранного потенциала более 50 мВ [Bechinger, 1997; de Kroon et.al., 1991]. Соответственно, для относительно длительных кинетических исследований индуцированной такими пептидами катионной проводимости необходимы системы, поддерживающие $\Delta \psi$. Проще всего $\Delta \psi$ постоянного значения поддерживать на БЛМ, легко создаваемой в

небольшом отверстии из растворенных в неорганическом растворителе липидов [Hanke and Boheim, 1980]. Если образовавшаяся пленка разделяет резервуары с разной концентрацией солей, то на мембране формируется долгоживущий концентрационный потенциал, который можно создать также и с помощью электродов, опущенных в эти резервуары. Важным преимуществом планарных мембран, разделяющих 2 отсека, является возможность проведения с их помощью измерений, позволяющих изучить влияние электрохимических свойств границы раздела БЛМ - раствор электролита, свойства двойного электрического слоя, влияние заряженных проводимость, индуцированную искусственными частиц на И биологическими индукторами проницаемости, включая белки-переносчики [Kasbauer, 1999; Bechinger, 1997]. Однако данная система малопригодна для изучения зависимости кинетики самосборки каналов от концентрации пептида (подробнее – в разделе 1.5.). В малых бислойных липосомах концентрация субстрата быстро истощается при добавлении пороформера, а в гигантских липосомах поры несинхронно открываются и закрываются, что затрудняет интерпретацию данных [Takei et.al., 1999; Schwarz et.al., проницаемость в 1992]. При ЭТОМ необходимо измерять момент добавления пороформера, пока еще не произошло изоосмотической декомпенсации $\Delta \psi$ [Polozov et.al., 1997]. Поэтому желательно использовать объемную мембранную структуру со «встроенным генератором $\Delta \psi$ ». Об этом будет подробнее написано ниже в разделах 1.2 и 1.3.

Сенсоры. Биосенсоры для изучения транспорта. Сенсором называют устройство, определяющее или измеряющее свойство системы и тем или иным способом регистрирующее результатат. Сенсоры делятся на химические, физические и биосенсоры [Эггинс, 2005]. Химический сенсор – устройство, откликающееся на химический аналит, преобразуя его в ходе химической реакции, которая и используется для качественного или количественного определения аналита [Эггинс, 2005]. Термин

«трансдьюсер» относится к устройству, преобразующему наблюдаемые изменения в электрический сигнал, величина которого пропорциональна концентрации определяемого вещества. Наиболее распространенными являются сенсоры на основе ферментов (например, глюкозооксидазы для мониторинга уровня сахара в крови диабетиков) [Курочкин и Еременко, биосенсоров могут быть использованы клетки 2010]. В качестве микроорганизмов [Решетилов, 2010] или препараты митохондрий [Gonzalez-Suarez et al., 2014]. Трансдьюсером в приведенном случае может являться модифицированная амперометрическая ячейка с закрытым позволяющая электродом Кларка, измерять сверхмалые скорости поглощения кислорода.

1.2. Митохондрии печени крысы и дрожжи S. cerevisiae – удобные модельные объекты исследований

Митохондрии важнейшими являются внутриклеточными органеллами, выполняющими ключевую роль в функционировании клетки, как в норме, так и при различных патологических состояниях. Кроме функции обеспечения клетки энергией в виде аденозинтрифосфата (АТФ), митохондрии принимают участие в биосинтезе и деградации метаболитов, генерации сигналов для клеточной пролиферации, дифференцировки [Weinberg and Chandel, 2015] и апоптоза – запрограммированной гибели клетки [Galluzzi et al., 2015]. С дисфункцией митохондрий связывают развитие нейродегенеративных и онкологических заболеваний, диабета, воспалений [Cwerman-Thibault et al., 2011; Filosto et al., 2011; Murphy, 2016; Peruzzo et al., 2016; Schon and DiMauro, 2003], болезней сердечнососудистой системы, легких, кожи и многих других [Suomalainen, 2011]. Из-за сложности организации митохондрий, простые модели, например, на основе синтетических липосом, не могут дать полного представления о биохимических процессах, происходящих в митохондриях.

Удобной экспериментальной моделью для исследований признаны и дрожжи *S. cerevisiae* благодаря хорошей изученности генома, транскриптома и протеома [Goffeau et al., 1996], малым размерам, высокой скорости роста [Matthews and Vosshall, 2020], относительной простоте и дешевизне генетических манипуляций, содержанию многочисленных белков-ортологов человека.

Хорошо изученные, генетически охарактеризованные объекты с многолетней историей методической подготовки позволяют существенно снизить количество необходимых контролей в эксперименте.

Митохондрии печени крысы и пороформеры. Требования к качеству митохондрий, целостности их внешней мембраны и чистоте

пороформеров. Общепринятое представление о строении митохондрии Рис. 1.1а., однако существует большое количество приведено на фенотипов митохондрий, отличающихся многообразием форм и размеров. Митохондрии мембраны, внутренняя, характерны две внешняя И межмембранное пространство и матрикс, ограниченный внутренней мембраной. Складки внутренней мембраны называют кристами. Количество крист и их форма определяют энергетическое состояние клетки, поскольку это то место, где находится большинство ответственных за окислительное фосфорилирование (ОКСФОС) белков, и происходит собственно производство энергии в виде АТФ. Новые 3D технологии, электронно-микроскопическая томография дают возможность получить объемное изображение митохондрии (Рис. 1.16.), что расширяет наши представления о внутренней структурной организации органеллы [Frey and Mannella, 2000; Mannella, 2000].



Рис. 1.1. *а* - Схема строения митохондрии по данным [Palade, 1952; Lodish et al., 2016]. *б* - Электронно-микроскопическая томография структуры митохондрии печени крысы. 3D изображение, С – кристы, IM – внутренняя мембрана, ОМ – наружная мембрана. Треугольники указывают на места прикрепления крист к внутренней мембране и друг к другу, адаптировано из [Frey and Mannella, 2000].

Для изучения внешних пептидов-пороформеров влияния на трансмембранный ток в препарате митохондрий необходим высокий уровень целостности внутренней мембраны органелл и минимальный трансмембранных проводимостей уровень эндогенных («паразитных утечек» этого тока), которые оценивают по достаточно высокому уровню дыхательного контроля (ДК) – соотношения скоростей дыхания в присутствии и отсутствие АДФ. Этому критерию не отвечает, например, препарат митохондрий S. cerevisiae [Izawa and Unger, 2017]. Митохондрии ИЗ мягких тканей (мозга, бурого жира, надпочечников), а также митохондрии сердца отвечают этому критерию [Fišar and Hroudová, 2016; Wolkow and Iser, 2006; Justo et al., 2005; Wakabayashi et al., 1976], однако эти органеллы содержат эндогенные поры, а также переносчики калия и натрия, которые могут не подавляться катионами магния в отличие от таковых в митохондриях печени крыс (подробнее – в разделе 1.3.), или содержат переносчик магния [O'Rourke and Maack, 2007]. По-видимому, благодаря подавлению эндогенных трансмембранных проводимостей катионов («паразитных утечек») в присутствии 6 мМ магния В инкубационной среде, а также мерам по подавлению липолиза (отсутствие кальция и наличие ЭДТА в инкубационнной среде) препарат митохондрий печени крысы характеризуется высоким ДК [Мосолова и соавт., 1971]. Таким образом, только в препарате митохондрий печени крысы можно подавить все эндогенные катионные трансмембранные проводимости, чтобы изучать индукцию проводимости добавленными к препарату пептидами-пороформерами. Митохондрии этом случае В можно биосенсора трансмембранного рассматривать В качестве тока, индуцируемого пороформирующими пептидами. Биосенсор на основе митохондрий имеет ряд преимуществ перед искусственными системами. Потенциал, внутренней мембране создаваемый на митохондрий ферментами комплексов I, III и IV системы ОКСФОС (подробнее – в

разделе 1.4.), позволяет на протяжении достаточного времени (нескольких минут) проводить исследования механизма ассоциации в мембране потенциал-зависимых пептидов-пороформеров (подробнее – в разделе 3.1.). Пороформирующие пептиды создают в дышащих митохондриях трансмембранный поток катионов, что приводит к набуханию органелл и разрыву их внешней мембраны с образованием митопластов.

Митопласты – это частицы, образующиеся при разрыве внешней мембраны митохондрий, которая имеет гораздо меньшую площадь, чем внутренняя (см. Рис. 1.1а.). Для митохондрий печени крысы в лаборатории биоэнергетики ИНБИ РАН разработана методика получения препарата, обогащенного крупными органеллами [Мосолова и соавт., 1971], для теоретическое время набухания без разрыва внутренней которых мембраны велико. Тем не менее, было необходимо при изучении действия пороформеров на митохондрии разработать экспериментальную методику оценки целостности их внутренней мембраны. Именно для митопластов печени крысы при окислении сукцината продемонстрирована столь же эффективная система генерации протонного градиента (а, следовательно, и $\Delta \psi$), что и для неповрежденных органелл (соотношение H⁺/O 4,6 ± 0,18 и $5,9 \pm 0,2$, соответственно [Hendler and Shrager, 1987]). Минимальное или постоянное эндогенное дыхание на сукцинате показано для препаратов и митохондрий и митопластов [Шольц и Мамаев, 1985].

Использование препарата органелл в качестве потенциального биосенсора трансмембранного катионного тока выдвигает повышенные требования к чистоте пептидов-пороформеров, выделенных из природных источников. Они не должны содержать примесей агентов, катализирующих липолиз, веществ, поддерживающих или ингибирующих дыхание митохондрий или (в идеале) должны быть синтезированы *de novo* и тщательно очищены.

Митохондрии печени крысы и ДКТ внутренней мембраны. ЭСС требования измерения транспорта сукцината И К ней. Дикарбоксилатный транспортер митохондрий печени крысы хорошо нативной изучен как В системе В митохондриях, так И реконструированный в липосомы [Passarella and Quagliariello, 1976; Meijer 1981; and van Dam, Indiveri et al., 1988]. Сукцинатоксидазная ферментативная система препарата митохондрий печени крысы (см. выше, сукцинатоксидаза) в присутствии протонофора (SF) может быть удобной ЭСС для измерения транспорта сукцината интактным ДКТ. Суммарная активность сукцинатоксидазы митохондрий может определяться в разных условиях и скоростью переноса сукцината через мембрану посредством ДКТ, и активностью сукцинатдегидрогеназы или убихинол-цитохром соксидоредуктазы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) (Рис. 1.2.).



Рис 1.2. Транспорт сукцината ДКТ и окисление этого субстрата митохондриями печени крысы (схема составлена на основе информации из [Скулачев В.П., 1989]).

Необходимо отметить, что эндогенное дыхание митохондрий печени крысы в присутствии ротенона составляло не более 0,8% от скорости В присутствии протонофора. Если окисления сукцината принять эндогенное дыхание за фон, а сигналом считать скорость окисления сукцината, то такое соотношение сигнал/фон в этом потенциальном биосенсоре позволяет уверенно проводить измерения Шольц и Мамаев, 1985]. В пределах каждой серии кривых, полученных на одном препарате митоходрий печени крысы (в течение 16 часов), изменение этой величины не превышало 4%, а в пределах одной кривой – 2-3% в течение получаса [Шольц и соавт., 1990]. Надо отметить, что высокие величины и нестабильность этой характеристики для 2-оксоглутаратоксидазы И митохондрий печени крысы цитратоксидазы [Шольц, персональное сообщение] не позволяет исследовать аналогичным 2методом оксоглутаратный и цитратный переносчики. ЭСС митохондрий печени крысы имеет первый признак хорошей сопряженной системы для измерения трансмембранного транспорта сукцината: на порядок меньшую $K_{\rm M}$ для ДКТ, по сравнению с сукцинатдегидрогеназой [Passarella and признак Quagliariello, 1976]. Второй _ бо́льшую активность сукцинатдегидрогеназы – необходимо доказывать. Тем не менее, величина $K_{\rm M}$ по сукцинату, равная 1,01 ± 0,21 мM, и $K_{\rm i}$ для непроникающего в митохондрии конкурентного ингибитора бутилмалоната, равная 0,17 ± 0,025 мМ, измеренные с помощью сукцинатоксидазы митохондрий, были близки к результатам, полученным для ДКТ прямыми методами измерения транспорта сукцината в органеллы ($K_{\rm M} = 1,17$ мМ [Palmieri et al., 1971; Passarella and Quagliariello, 1976], $K_i = 0.15 \text{ MM}$ [Meijer and van Dam, 1981]). При изучении влияния групп эффекторов на транспорт необходимо проверять отсутствие их побочного действия на компоненты ЭСС, чтобы не нарушалось лимитирование транспортером сукцинатоксидазы митохондрий. Известно, ингибирует что 2-додецилмалонат

сукцинатоксидазу интактных митохондрий в 10000 раз эффективнее, чем сукцинатдегидрогеназу СМЧ [Бондаренко и соавт., 1996]. Ингибирование на 95% при сохранении линейности (однофазности) в координатах Диксона свидетельствовало 0 TOM, что доля митохондрий С неповрежденной внутренней мембраной составляет более 95% препарата. Это означало то, что препарат интактных митохондрий гомогенный, и параметры нативного ДКТ, измеренные предлагаемым способом В митохондриях, должны характеризовать переносчик с точностью до 95%. Для проверки отсутствия влияния эффекторов на убихинол-цитохром соксидоредуктазу можно использовать в качестве тестирующей системы ферментативный путь окисления 3-оксибутирата – 3-оксибутиратоксидазу митохондрий печени a на сукцинатдегидрогеназу крысы, сукцинат: феррицианид-редуктазную активность СМЧ, полученных ИЗ митохондрий печени крысы под действием ультразвука [Шольц и соавт., 1990]. Как тест на проницаемость внутренней мембраны митохондрий для эффекторов и действие их на компоненты ЭТЦ можно использовать разницу концентрациях, вызывающих полуингибирование В сукцинатоксидазы В присутствии протонофора И полуактивацию окисления 2-оксибутирата в его отсутствие [Бондаренко и соавт., 1996].

Клетки *S*. cerevisiae И потенциальный транспортер ДКБ плазмалеммы. Несколько ЭСС клетки и требования к ним. Для измерения скорости транспорта окисляемых субстратов в клетки S. cerevisiae можно использовать ЭСС клеток, которая представляет собой митохондрии этих клеток, окисляющие перенесенный в цитоплазму субстрат (Рис. 1.3.). Для измерения скорости транспорта сукцината в интактных клетках можно использовать ЭСС окисления сукцината (далее – сукцинатоксидазу клеток), которая состоит ИЗ предполагаемого ДКБ ДКТ переносчика плазмалеммы, митохондрий, сукцинатдегидрогеназы и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы.

Максимального количества митохондрий в клетке (и активности соответствующих оксидаз) можно достичь, выращивая клетки в условиях низкой концентрации глюкозы (0,1%) в среде до завершения экспотенциальной фазы роста [Polakis et al, 1965].

Важной задачей при использовании целых клеток в качестве биосенсора для измерения трансплазмалеммного транспорта субстратов является мягкая синхронизация культуры. Таковой является холодовая синхронизация, в ходе которой при охлаждении до 0 – 2°C все клетки задерживались в G₁-фазе клеточного цикла [Узбеков, 2004]. Однако при использовании метода холодовой синхронизации по сравнению с химическим методом, несмотря на эффективное торможение клеточного цикла и задержку всех клеток в G₁-фазе, не все процессы синтеза белков идут после ее завершения с одинаковой скоростью [Узбеков, 2004]. Этот метод более мягкий при достаточной продуктивности по сравнению с



Рис. 1.3. Транспорт и окисление субстратов в клетке *S. cerevisiae*; рисунок создан на основе информации из [van der Rest et al., 1995; Machicka et al., 2004; Gancedo and Cerrano, 1989]. Потенциальный транспортер ДКБ плазмалеммы и его субстраты выделены красным цветом.

химическим методом синхронизации, в котором обычно используют противоопухолевые препараты (цитостатики), обладающие большим количеством побочных действий на митохондрии [Узбеков, 2004]. Одним из факторов, способствующих синхронизации культуры клеток, может быть также и посев инокулята, выращенного при высокой концентрации глюкозы, в среду с низким ее содержанием. Синхронизация при этом переключения энергетического обмена происходит путем c гликолитического на дыхательный (с участием митохондрий). При этом желательно ограничить количество циклов удвоения клеток для избежания десинхронизации культуры [Узбеков, 2004].

Важной особенностью дышащих клеток *S. cerevisiae* является поддержание в цитоплазме постоянного значения pH и постоянного соотношения концентраций K^+ и Na⁺ при значительных колебаниях этих параметров за пределами клеток [Yenush, 2016; de Nadal et al., 1999; Pena et al., 1972]. Это позволяет исследовать одностороннее влияние на активность переносчиков плазматической мембраны, измеренную с помощью ЭСС клетки, не действуя непосредственно на ЭСС. Система поддержания кислотного и катионного гомеостаза в цитоплазме надежна и тщательно изучена у дрожжей *S. cerevisiae* (см. Рис. 1.4.)[Yenush, 2016].

Ha схеме стрелками показаны основные сигнальные ПУТИ, обеспечивающие гомеостаз по принципу обратной связи. Видно, что эти механизмы контроля дублированы. Например, при закислении среды внутри клетки Na⁺/H⁺ антипортер плазмалеммы Nha1 выбрасывает наружу катионы натрия, а при защелачивании – наоборот, при этом другие системы поддержания постоянной концентрации натрия стабилизируют концентрацию [Yenush, 2016; Marquez and Serrano, 1996]. В его уменьшении pH цитоплазмы участвует вакуолярная ATФ-за Vma1, а в увеличении – протонные помпы митохондрий [Yenush, 2016].



Рис. 1.4. Транспортеры и регуляторы, контролирующие калиевый и натриевый транспорт в *S. cerevisiae*, адаптировано из [Yenush, 2016].

ДКБ Возможные субстраты предполагаемого транспортера плазмалеммы S. cerevisiae изображены на Рис. 1.3. в пунктирном четырехугольнике, подразумевающем условность. В работах, предшествующих нашей, на такую возможность косвенно указывало то несмотря на нейтральный pН цитоплазмы, запрещающий что, трансплазмалеммную диффузию ДКБ в недиссоциированной форме, клетки S. cerevisiae с «поврежденным» циклом Кребса выбрасывали в среду культивирования накапливающиеся в ней сукцинат, L-малат, фумарат, а также цитрат [Machicka et al., 2004].

Для нашей работы имело значение, что некоторые соединения, в частности, амфифильные монокарбоксилаты (но не дикарбоксилаты), удалялись из клетки при участии, например, низкоспецифичного ABC транспортера Aqr1 [Tenreiro et al., 2002], катализирующего ATФзависимый транспорт.

1.3. Транспортеры митохондрий млекопитающих и митохондрий *S. cerevisiae*

Митохондриальные транспортеры метаболитов: особенности метаболизме Генетически структуры, значение В клетки. охарактеризованные переносчики митохондрий млекопитающих и их ортологи в митохондриях S. cerevisiae. Митохондриальные переносчики - семейство кодируемых в ядре небольших белков (около 300 а.о.), преимущественно локализованных во внутренней мембране митохондрий транспортирующих многочисленные метаболиты, нуклеотиды, И кофакторы и неорганические ионы. Уникальной особенностью этих транспортеров является 3-х-частная структура, 6 трансмембранных αспирализованных сегментов и наличие общей для всех членов семейства небольшой последовательности (мотива), по которому митохондриальные переносчики легко распознать. Мотив (Pro-X-[Asp/Glu]-X-X-[Lys/Arg]-X-[Lys/Arg]-X₂₀₋₃₀-[Asp/Glu]-Gly-X-X-X-[Trp/Tyr/Phe]-[Lys/Arg]-Gly) содержится в каждом из 3-х частей молекулы, N- и C- концы локализованы на цитозольной стороне внутренней мембраны [Palmieri and Monne, 2016].

внутренней Переносчики мембраны митохондрий связывают метаболические локализующиеся пути, по стороны разные митохондриальной мембраны, катализируя транслокацию метаболитов и неорганических ионов. Поэтому они играют важную роль в таких Кребса, биохимических процессах, цикл окислительное как фосфорилирование, транспорт восстановительных эквивалентов NADH и NADPH, гликонеогенез, метаболизм аминокислот и жирных кислот, митохондриальная репликация, трансляция и транскрипция, передача Ca^{2+} – сигнала внутри клетки и секреция инсулина [Palmieri and Monne, 2016].

Несмотря на структурное сходство митохондриальные переносчики транспортируют такие различающиеся по размерам и структуре молекулы, как H⁺ и NAD⁺, коэнзим A, причем субстраты могут иметь положительный или отрицательный заряд, а также быть цвиттер-ионами. Большая часть митохондриальных переносчиков катализирует обмен субстратами по механизму электронейтрального антипорта (в соотношении 1:1), но некоторые (монокарбоксилатный, например, см. ниже) функционируют как унипортеры и в симпорте с H⁺.

Все предшественники митохондриальных транспортеров кодируются в ядре и содержат последовательность, распознаваемую митохондриальной машинерией, отвечающей за вход белков в органеллу. Для митохондрий млекопитающих показано, что комплекс из находящихся в цитозоле шаперонов Hsc70 (англ. heat-shock cognate 70) и Hsp90 (англ. heat-shock protein 90) с предшественниками промотирует импорт, взаимодействуя с рецептором импорта – транслоказой Tom 70 (англ. translocase of the mitochondrial outer membrane) [Zara et al., 2009]. Делеция по участку гена, кодирующего пресиквенс фосфатного переносчика PiC (англ. mitochondrial phosphate carrier), эффективно подавляет импорт, но не приводит к агрегации белкового продукта, при этом уменьшается связывание поврежденного белка с Hsc70, но не Hsp90 [Zara et al., 2009]. Делеция по участку гена, кодирующего пресиквенс цитратного переносчика CIC (англ. mitochondrial citrate carrier), приводит к агрегации белкового продукта, но не влияет на вклад Hsc70 и Hsp90 в импорт транспортера в митохондрии [Zara et al., 2009]. Потеря пресиквенса оксоглутаратного переносчика OGC (англ. mitochondrial 2-oxoglutarate carrier) способствовала его меньшей растворимости, хотя он все еще зависел от Hsc70 и Hsp90 [Zara et al., 2009].

Начиная с 1996 г. генетически охарактеризованы следующие переносчики митохондрий млекопитающих: переносчик глутамата, антипортер ATP-Mg/фосфата, ADP/ATP антипортер (аденилатный
переносчик) изоформа 4, переносчик СоА и 3'- фосфоаденозин 5'-фосфата, FAD NAD^+ . пероксисомальный переносчик CoA. И антипортер метаболитов/фосфата, четырехуглеродных переносчик основных Также охарактеризованы переносчики митохондрий аминокислот. млекопитающих и их ортологи в S. cerevisiae: дикарбоксилатный переносчик Sпереносчик, тиаминпирофосфата, переносчик аденозилметионина, переносчик пиримидиновых нуклеотидов, переносчик переносчик оксалоацетата сульфата карнитина, И оксалоацетат/сульфатный антипортер, аспартат/глутаматный переносчик, антипортер; S. оксоглутарат/малатный переносчики митохондрий *cerevisiae*: переносчик орнитина, GTP/GDP антипортер, переносчик NAD⁺, цитрат/оксоглутаратный антипортер, переносчик 5'аденозин фосфосульфата, пероксисомальный переносчик адениновых нуклеотидов [Palmieri and Monne, 2016]. Мы рассматривали только всесторонне охарактеризованные транспортеры, у которых определен ген, выделен и реконструирован функционирующий белок или, по крайней мере, имеется высокоспецифичный неконкурентный ингибитор. При этом за пределами рассмотрения [Palmieri and Monne, 2016] остались не отвечающие этим критериям D-лактатный переносчик S. cerevisiae (механизм – симпорт с протоном) [Pallotta et al., 2004] или, например, фумарат/малатный и фумарат/аспартатный переносчики, обнаруженные В нативных митохондриях почек крысы только радиоизотопным И спектрофотометрическими методами [Atlante et al., 1998]. В свете направленности диссертации несколько большее внимание уделено описанию функционирования транспортеров сукцината и малата в митохондриях.

Дикарбоксилатный переносчик митохондрий дрожжей *S. cerevisiae* – Dic1p и млекопитающих – DIC. Роль в метаболизме. Дикарбоксилатный переносчик митохондрий дрожжей S. cerevisiae кодируется геном YLR348c. Реконструированный продукт гена, далее Dic1p. (по называемый транспортирует механизму антипорта) дикарбоксилаты – малат, сукцинат и малонат, неорганический фосфат, сульфат и тиосульфат [Palmieri et al., 1996]. Аналогичная специфичность описана для DIC из изолированных митохондрий печени крысы и выделенного переносчика из этих митохондрий [Palmieri et al., 1971; Crompton et al., 1974]. Оксоглутарат им не транспортируется. В опытах на мутантах показано, что он крайне необходим для роста S. cerevisiae на этаноле и ацетате [Palmieri et al., 1999]. Рост восстанавливается при добавлении оксалоацетата, аспартата, глутамата и цитрата в низких концентрациях, но не лейцина и лизина, которые не являются необходимыми для воссоздания интермедиатов цикла Кребса [Palmieri et al., 1999]. У линий дикого типа S. cerevisiae при росте на этаноле и ацетате Dic1p катализирует вход в митохондрии сукцината, в обмен на внутренний фосфат, причем этот фосфат возвращается затем с помощью фосфатного переносчика. На Рис. 1.5. показано превращение вошедшего сукцината в фумарат и оксалоацетат внутри митохондрий, которое приводит к окислению ацетил-CoA, продуцируемого из этанола и ацетата [Palmieri and Monne, 2016].

Характеризуя ДКТ митохондрий печени крысы (DIC), надо отметить, что он, как описано выше, имеет широкую субстратную специфичность, аналогичную таковой для эволюционно неблизких гомологов из *Caenorhabditis elegans* и *S. cerevisiae* [Fiermonte et al., 1998]. Величины K_M для L-малата и фосфата транспортера DIC митохондрий печени крысы составляли, соответственно, 0,5 и 1,5 мМ [Palmieri et al., 1971]. Аналогичные величины были получены для реконструированного в липосомы рекомбинантного Dic1p *S. cerevisiae* [Palmieri et al., 1996], дикарбоксилатного транспортера *C. elegans* и транспортера DIC митохондрий человека [Fiermonte et al., 1998].



Рис. 1.5. Роль митохондриальных переносчиков *S. cerevisiae* в метаболизме. Метаболические процессы показаны красным цветом, а аббревиатуры ферментов выделены зеленым: ALS, ацетолактатсинтаза; OGDH, 2-оксоглутаратдегидрогеназа; PDH, пируватдегидрогеназа. Аббревиатуры соединений: α-IPM, α-изопропилмалат; APS, аденозин 5'-фосфосульфат; EtOH, этанол; GSH, глютатион; OAA, оксалоацетат; Orn, орнитин; Py(d)NMPs, пиримидин(дезокси-)нуклеозид монофосфат; Py(d)NTPs, пиримидин(дезокси-)нуклеозид трифосфат; SAM, S-аденозилметионин; SAHC, S-аденозилгомоцистеин; ThMP, тиаминмонофосфат; ThPP, тиаминпирофосфат. Пропущенные стадии в цепочке показаны прерывистой черной линией. Адаптировано из [Palmieri and Monne, 2016].

Показано, что у человека DIC экспрессируется в печени, почках, сердце, мозге, легких, поджелудочной железе и жировой ткани [Huizing et al., 1998; Das et al., 1999]. Надо отметить некоторые важные функции

переносчика при определенных физиологических условиях в некоторых тканях. Он включается в анаплеротический приток интермедиатов цикла Кребса и участвует в обмене малата на фосфат для нужд гликонеогенеза преимущественно в печени, но также и в почках. DIC также играет роль в цикле мочевины, где импортируемый малат превращается в фумарат для аргинин-сукцинат-лиазы. Этот переносчик включается в синтез жирных кислот, когда экспортируемый малат в ходе цитрат-пируватного шаттла приводит к выходу цитрата из митохондрий и продуцированию NADPH в цитозоле [Palmieri, 2004]. Ввиду того, что имеет место дополнительная экспрессия DIC в различных раковых опухолях, предполагается, что его нокдаун уменьшит вероятность злокачественного варианта опухоли [Zhou et al., 2015].

DIC играет существенную роль в метаболизме серы: в митохондриях в ходе деградации цистеинсульфината из тиосульфата по действием роданазы и тиосульфат редуктазы образуется сульфит, причем небольшие количества тиосульфата образуются и в митохондриях из сероводорода, после выхода из митохондрий с помощью DIC сульфит окисляется за пределами этих органелл [Crompton et al., 1974; Crompton et al., 1974а; Hildebrandt and Grieshaber, 2008]. Таким образом, цистеинсульфинат, тиосульфат и сероводород могут входить в митохондрии, а сульфит и сульфат выходить из этих органелл [Palmieri and Monne, 2016] (Puc. 1.6.).

Другие переносчики С₄-ДКБ млекопитающих и S. cerevisiae.

Сукцинат/фумаратный антипортер митохондрий S. cerevisiae Sfc1p кодируется генами YJR095w или ACR1. При росте на этаноле и ацетате сукцинат продуцируется в ходе глиоксилатного пути, и благодаря переносчику этот метаболит транспортируется из цитозоля в митохондрии и становится доступным сукцинатдегидрогеназе [Palmieri et al., 1997].

Sfc1p также транспортирует оксоглутарат и в меньшей степени оксалоацетат ($K_{\rm M} = 2$ мМ).



Рис. 1.6. Роль митохондриальных переносчиков млекопитающих в метаболизме. Метаболические процессы показаны красным цветом, а аббревиатуры ферментов выделены зеленым: GDH, глутаматдегидрогеназа; OADH, 2-оксоадипатдегидрогеназа. Аббревиатуры соединений: AXP, аденозиннуклеотид; CSA, цистеинсульфинат; HO-Lys, гидроксилизин; PAP, аденозин 3',5'-дифосфат; SAM, S-аденозилметионин; SAHC, S-аденозилгомоцистеин. Пропущенные стадии в цепочке показаны прерывистой черной линией. Адаптировано из [Palmieri and Monne, 2016].

Антипортер четырехуглеродные метаболиты/фосфат (UCP2) млекопитающих. На основе структурной гомологии в группу SLC25A8 объединяют антипортеры UCP1, UCP3-6, DIC и оксоглутаратный переносчик. Из 6-ти человеческих белков UCP, только UCP1 41

транспортирует протон и является разобщающим белком митохондрий [Klingenberg and Winkler, 1985; Nicholls, 2006]. В то же время рекомбинантный UCP2 транспортирует аспартат, малат, малонат, оксалоацетат в обмен на фосфат с протоном или сульфат с протоном [Vozza et.al., 2014]. Нокдаун UCP2 в клетках гепатокарциномы человека (HepG2) усиливает окисление глюкозы и уменьшает глутаминолиз [Vozza et.al., 2014].

Оксидикарбоксилатные переносчики млекопитающих И оксидикарбоксилатный переносчик (ODC1) S. cerevisiae. В S. cerevisiae гены ODC1 и ODC2 кодируют изоформы оксидикарбоксилатного транспортера, причем оба транспортируют $C_5 - C_7$ оксидикарбоксилаты в обмен на малат [Fiermonte et.al., 2001]. Ортолог белка митохондрий человека был экспрессирован в *Escherichia coli*, очищен и реконструирован в липосомы. Транспортеры из обоих источников катализировали транспорт 2-оксоадипата и 2-оксоглутарата по обменному механизму, но антипортер митохондрий человека не транспортировал малат [Fiermonte et.al., 2001]. Сообщается, идентифицирован что В почках крысы несколько отличающийся по первичной структуре на С-конце оксодикарбоксилатный транспортер, нокдаун гена этого переносчика приводит к уменьшению накопления липидов [Niimi et.al., 2009]. Показано, что сверхэкспрессия DIC и оксоглутаратного переносчика в культуре клеток почечных проксимальных канальцев (NRK-52E) радикально улучшает транспорт глутатиона в митохондрии, что позволяет автору сделать предположение об участии этих переносчиков в транспорте этого метаболита [Lash, 2006].

Трикарбоксилатный переносчик млекопитающих и цитрат/изоцитратный транспортер *S. cerevisiae*. Рекомбинантный функционально активный цитрат/изоцитратный переносчик *S. cerevisiae*, реконструированный в липосомы, продемонстрировал величину $K_{\rm M}$ по цитрату, равную 0,36 мМ, и способность обменивать цитрат на изоцитрат, но не малат, по механизму электронейтрального антипорта [Kaplan et.al., 1995]. 1,2,3-Бензентрикарбоксилат – эффективный конкурентный ингибитор трикарбоксилатного переносчика митохондрий печени крысы подавляет также цитрат-цитратный обмен у переносчика, выделенного из митопластов печени крысы и реконструированного в липосомы [Kaplan et.al., 1990]. Этот транспорт ингибируют также изоцитрат, малат и фосфоенолпируват [Kaplan et.al., 1990]. Выход цитрата из митохондрий играет ключевую роль в стимулируемой глюкозой секреции инсулина β-клетками поджелудочной железы [Joseph et.al., 2006].

Существенные для этой работы транспортер Mg²⁺ S. *cerevisiae* и пируватный транспортер S. *cerevisiae* и млекопитающих.

Транспортер Mg^{2+} S. cerevisiae. Дрожжевой ген YMR166c кодирует митохондриальный транспортер магния Mme1. Делеция ПО гену, кодирующему Mme1, приводит к увеличению уровня митохондриального магния, что позволяет сделать вывод о необходимости транспортера для выхода из матрикса этого катиона. Реконструкция транспортера в липосомы, нагруженные магнием, подтверждает этот факт [Cui Y., 2015]. Присутствие этого транспортера в митохондриях дрожжей не позволяет действия пороформеров проводить исследования механизма на митохондрии S. cerevisiae.

Пируватный транспортер *S. cerevisiae* и млекопитающих. Пируват играет ключевую роль в метаболизме углеводов в клетке. Идентифицированы 2 белка Mpc1 и Mpc2, существенные для транспорта пирувата в митохондрии *S. cerevisiae* и человека [Bricker et.al., 2012]. Причем показано, что функционирующая единица транспортера *S. cerevisiae* – гетеродимер, а не гомомультимер [Tavoulari et.al., 2019]. Потеря MPC1 *S. cerevisiae* приводит к ухудшению метаболизма пирувата, накоплению предшествующих метаболитов в цепочке и уменьшению интермедиатов цикла Кребса. Пируватный (монокарбоксилатный)

S. cerevisiae был аффинной транспортер очищен помощью С хроматографии с иммобилизованным специфическим ингибитором этого 2-циано-4-гидроксициннаматом, переносчика переносчик продемонстрировал антипорт пируват/ацетоацетат с величиной К_м по пирувату, равной 0,8 мМ [Nałecz, 1991]. Переносчик транспортировал также 2-оксокапроат, 2-оксоизовалерат и 2-оксо-3-метилвалерат, но не цитрат, сукцинат или цитрат [Nałecz, 1991]. Из митохондрий серца быка аналогичным методом выделили и очистили 2 переносчика, способных транспортировать кетокислоты, но с разным механизмом. Один из них (с равной 31.5 кДа) молекулярной массой, катализировал электоронейтральный обмен 2-оксоглутарата на 2-оксоглутарат, а второй (с молекулярной массой, равной 34 кДа) транспортировал пируват и другие кетокислоты, но не ди- и три-карбоновые кислоты по механизму, чувствительному к градиенту pH (не электронейтральному) [Bolli et.al., 1989]. У детей с мутациями в переносчике пирувата обнаружены ацидоз, вызванный избытком молочной кислоты и гиперпируватемия [Bricker et.al., 2012]. Обнаружены мутации, уменьшающие чуствительность транспортера к специфическому ингибитору пируватного транспорта в митохондриях – α-цианоциннамату [Bricker et.al., 2012].

1.4. Сопрягающая мембрана митохондрий печени крысы и плазмалемма *S. cerevisiae*, протонные помпы, протонофорный цикл

Сопрягающая мембрана митохондрий печени крысы и природа естественных катионных утечек (трансмембранного тока). Для решения первых трех поставленных задач диссертации (см. выше) были использованы свойства 2-х сопрягающих мембран: внутренней мембраны препарата интактных митохондрий печени крысы и плазмалеммы живых клеток *S. cerevisiae*.

Сопрягающая мембрана – биологическая мембрана, способная генерировать и поддерживать трансмембранный потенциал. Внутренняя сопрягяющая мембрана митохондрий представляет отдельный или интерес, так как в ней находятся ферменты системы ОКСФОС, создается значительный потенциал ионов водорода и ОН-. В системе ОКСФОС ферменты можно разделить на те, которые создают потенциал, и те, которые его потребляют. На Рис. 1.7. показаны 4 компонента дыхательной цепи: I – NADH-убихинон оксидоредуктаза, II – сукцинатдегидрогеназа, III - убихинол цитохром с оксидоредуктаза, IV - цитохром с оксидаза и комплекс V - АТФ-синтаза. Генераторами электрохимического потенциала ионов водорода являются комплексы I, III и IV, а основным потребителем является комплекс V. Было показано, что комплексы I, III и IV могут по отдельности функционировать как протонные помпы, и АТФ – синтетаза является обратимой протонной помпой. [Hatefi, 1985].

С помощью калиевых и натриевых протонных антипортеров в мембране протонный потенциал частично преобразуется В электрохимический. Внутренняя мембрана митохондрий в препарате сопряженных печени прочно митохондрий крысы имеет высокое сопротивление и самоподдерживающийся в присутствии субстрата дыхания $\Delta \psi$ на уровне около 180-200 мВ. Причем, даже при активации дыхания АДФ на 500% (при окислении сукцината), сопровождающейся «утечкой» протонов через АТФ-азу, величина $\Delta \psi$ уменьшается только на 15% [Dufour et.al., 1996]. В отдельных опытах на липосомах, созданных из фосфолипидов внутренней мембраны митохондрий, показано, что утечка протонов и калия из них крайне невелика, по сравнению с такой утечкой через внутреннюю мембрану митохондрий [Brookes et.al., 1997], поэтому постоянная работа протонных помп, поддерживающая уровень $\Delta \psi$ существенна для достижения поставленных в работе целей.



Рис. 1.7. Комплексы дыхательной цепи и протонные помпы внутренней мембраны митохондрий млекопитающих. Адаптировано из [Sazanov, 2015].

Эндогенные катионные проводимости утечки тока (и ИЛИ могут величины $\Delta \Psi$) индуцировать (каналы), уменьшение поры присутствующие внутренней мембране И открывающиеся BO при определенных условиях. Если использовать сопрягающую мембрану исследования свойств экзогенных митохондрий лля пороформеров, необходимо чтобы эти каналы были блокированы. В качестве примера пренебрежения этим правилом можно привести работу по влиянию пороформера мастопарана в среде, не содержащей катионы магния, на индукцию собственных пор внутренней мембраны [Pfeiffer et.al., 1995]. В отсутствие катионов магния двойной эффект на индуцированную проницаемость делает неоднозначной интерпретацию результатов. Ниже будет описана ключевая роль катионов магния в блокировании почти всех эндогенных катионных каналов и некоторых других проводимостей внутренней мембраны митохондрий.

Чтобы использовать митохондрии печени крыс в качестве биосенсора трансмембранного тока, необходимо блокировать в сопрягающей мембране собственные катионные транспортеры и каналы. Утечки через поры, активируемые кальцием, можно исключить с

помощью использования бескальциевых сред и добавлением ЭДТА (мощного комплексона кальция). В отличие от кальция, магний не образовании неспецифической эффективен липидной поры В С пальмитатом [Agafonov et.al., 2003]. Кроме того, унипортер кальция ингибируется в присутствии магния [Litsky et.al., 1997]. Для митохондрий печени крысы показано, что воздействие небольшого количества кальция (30µМ), который может выйти из митохондрий, обращается внешним 5 мМ магнием [Toninello et.al., 1982]. Анионный канал внутренней мембраны также ингибируется магнием [Beavis and Powers, 2004]. Митохондриальная мегапора, которая открывается, например, при апоптозе, также активируется только в присутствии кальция [Kinnally et al., 1992].

Если изучать трансмембранный калиевый ток (в монокалиевой среде инкубации), индуцированный экзогенными пороформерами, необходимо блокировать присутствующие во внутренней мембране митохондрий собственные транспортеры калия. На Рис. 1.8. показано, что В митохондриях существуют 4 таких транспортера, причем mitoBKCa существует только в митохондриях скелетных мышц, а TASK-3 - в al., 2009]. митохондриях лимфоцитов [Szewczyk et Магний нечувствительные электрофоретические каналы не были обнаружены с помощью электрофизиологической техники на мембранах, полученных с обработки помощью слияния митопластов печени крысы после дигитонином (растворяющим внешнюю мембрану) [Zoratti and Szabó, 1994]. Оказалось, что в митохондриях печени крысы обнаружены АТФзависимый унипортер и электронейтральный К⁺/H⁺- антипортер, и что активность обоих в присутствии 6 мМ магния полностью подавлена [Szewczyk et al., 2009; Belyaeva and Wojtczak., 1994]. Причем транспортер магния обнаружен только в сердечных митохондриях [Romani, 2007]. Неспецифический натрий - протонный антипортер, способный переносить

литий (что существенно для проводимых нами экспериментов), подавляется магнием [Jezek et al., 1990].



Рис. 1.8. Транспортеры калия внутренней мембраны митохондрий печени крысы (по данным [Szewczyk et al., 2009])

Существование в митохондриях печени крысы высокоспецифичного натрий - протонного антипортера требует исключить в исследованиях среды, содержащие натрий [Brierley et al., 1994], хотя электрофоретический транспорт натрия в митохондрии печени крысы также подавляется магнием [Bernardi et al., 1990]. Таким образом, внутреняя мембрана митохондрий печени крысы не содержит не подавляемых магнием каналов, за исключением нескольких, нуждающихся для своей активации в катионах Ca²⁺. Таким образом, в магний содержащей калиевой среде инкубации, пороформер, добавленный к митохондриям печени крысы, будет индуцировать ток только через создаваемые им каналы. Митохондрии при этом условии могут быть потенциальными биосенсорами катионного тока, индуцированного пороформером.

Известно, что действие экзогеных индукторов проницаемости на митохондрии вызывает трансмембранный вход катионов в органеллы, что приводит к их набуханию и превращению их в митопласты (см. Рис. 1.1.). Поэтому для изучения действия индукторов проницаемости на митохондрии необходимо разработать экспериментальную методику оценки целостности внутренней мембраны.

Для изучения взаимоотношений между индуцированным трансмембранным калиевым током и дыханием митохондрий печени крысы желательно иметь инструмент создания такого тока с простым механизмом действия. Таким удобным инструментом является антибиотик валиномицин (подробнее – в разделе 1.9.).

Протонная транспортеры потребители помпа И _ *S*. cerevisiae. трансмембранного потенциала В плазмалемме Плазмалемма *S*. cerevisiae является сопрягающей мембраной, где протонной помпой является АТФ-аза Р-типа – доминирующий белок этой мембраны [van der Rest et al., 1995]. В этой мембране присутствуют три Na^{+}/H^{+} антипортера (Enal-4p, Nhalp, Nhxlp), участвующие также в транспорте К⁺ [Kinclova-Zimmermannova et al., 2006]. С помощью этих антипортеров протонный потенциал частично преобразуется В электрохимический. Потеря всех трех транспортеров приводит К деполяризации мембраны, а сверхэкспрессия Na⁺, K⁺/H⁺ антипортера $(Nha1) - \kappa$ ее гиперполяризации [Kinclova-Zimmermannova et al., 2006]. Протонный потенциал активно используется клеткой для транспорта необходимых веществ в форме симпорта с протоном. На схеме (Рис. 1.9.)

этот тип транспорта показан на примере переносчиков аминокислот и фосфата. Для нашей работы представляют интерес три переносчика с этим механизмом действия: аллантоиновый, переносящий уреидосукцинат [Turoscy and Cooper, 1987], переносчик кислых аминокислот, переносящий аспартат [Regenberg et al., 1998] и монокарбоксилатный переносчик, переносящий пируват [Akita et al., 2000].



Рис.1.9. Ключевые транспортеры плазмалеммы дрожжей *S. cerevisiae*. Адаптировано из [Kschischo et al., 2016].

(Рис. 1.9.) показаны переносчики с механизмом, Ha схеме непосредственно зависящим $\Delta \psi$, a именно, натрий-зависимый ОТ симпортер фосфата и электрофоретические транспортеры калия и кальция. Все выше перечисленные переносчики подавляются протонофорами [van der Rest et al., 1995], слабыми амфифильными кислотами или основаниями, 1990]. способными проникать бислой [Terada, Косвенно через АТФ-зависимые протонофоры подавляют И транспортеры $(AT\Phi$ зависимый транспортер натрия, Рис. 1.9.), поскольку проникая в клетки, они распределяются по всем внутриклеточным мембранам [Beauvoit et al., 1991]. При этом они деэнергизуют мембрану митохондрий и превращают АТФ-синтазу в АТФ-азу, что приводит к истощению запасов АТФ клетки [Beauvoit et al., 1991]. Энергонезависимый (и не подавляемый протонофором) транспортер (канал) на схеме представлен переносчиком глюкозы. Для ацетата (но не для пирувата) описан канал Pdr12, функционирующий по механизму облегченной диффузии [Casal et al., 2016].

Способность амфифильной кислоты проникать в клетку (то есть быть протонофором) и вызывать деэнергизацию плазмалеммы, приводит к подавлению транспорта пирувата в цитоплазму [Cássio et al., 1987], а не энергонезависимому переносу пирувата из цитоплазмы в митохондрии [Nałęcz et al., 1991]. Деэнергизацию плазмалеммы можно использовать в качестве теста на способность амфифильной кислоты проникать в клетку. Необходимо заметить, что оба транспортера плазмалеммы, способные переносить пируват (Jen1 и Ady2), являются протонными симпортерами [Casal et al., 2016]. До настоящей работы было принято считать, что в S. cerevisiae плазмалемме отсутствует активная (детектируемая стандартными радиоизотопными методами) опосредованная белком система транспорта C₄-ДКБ [Lodi et al., 2004]. При рН 3,0 был показан только транспорт L-малата в форме диффузиии его непротонированной формы [Salmon, 1987] (на Рис. 1.9. этот механизм показан для монокарбоксилатных кислот – ХСООН). По-видимому, механизм функционирования потенциального транспортера ДКБ плазмалеммы надо искать в перечне механизмов для переносчиков, характерных для плазмалеммы S. cerevisiae (см. Рис. 1.9.), а именно: симпорт с протоном, симпорт с натрием, электрогенная диффузия через канал, неэлектрогенная диффузия через канал, АТФ-зависимый транспорт. Подробнее 0 транспортерах ДКБ и механизмах транслокации – в разделе 1.7.

1.5. Структура и механизм мембранотропного действия пороформеров аламетицина, мелиттина и мастопарана

Антимикробные пептиды представляют собой разнообразную по структуре и функциям группу молекул, которые продуцируются многими тканями и типами клеток у различных видов растений и животных, а также клетками микроорганизмов. Их аминокислотный состав, амфипатичность, катионный заряд и размер позволяют им прикрепляться к биологическим мембранам и встраиваться в них для формирования пор с использованием различных механизмов. Существуют разные модели, описывающие взаимодействие пороформирующих антимикробных пептидов С биологическими мембранами, такие как модель «бочонка», «ковра», «тороида», однако механизмы этого взаимодействия, так же как и механизмы формирования пор, требуют дальнейшего изучения [Jozefiak and Engberg, 2017; Bechinger and Gorr, 2017; Yi et al., 2014].

Самосборка из мономеров в олигомер в мембране характерна для некоторых белков – переносчиков катионов. Общее свойство вышеназванных пороформирующих пептидов – это их самосборка в канал α-спирализованных мономеров В трансмембранном ИЗ состоянии. Поскольку трансмембранные каналы ряда белков - переносчиков также состоят из трансмембранных α-спирализованных элементов (сегментов) вторичной структуры этих белков, то самособирающиеся пептиды – это своеобразная модель таких белков. Так, описаны переносчики, канал которых собирается из одинаковых белковых субъединиц. Например, транспортер катионов магния прокариот CorA «самособирается» в мембране из 5-ти мономеров, включающих каждый по 2 трансмембранных которых непосредственно сегмента, только ОДИН ИЗ участвует В связывании магния [Maguire, 2006]. В БЛМ показано также образование трансмембранной поры путем самоассоциации 8-ми α-спирализованных 35 пептидов длиной a.o. С-концевого домена D4 транспортера полисахаридов Wza E. coli, причем ориентация пептидов в составе этой

искусственной поры соответствует таковой в нативном переносчике [Mahendran et al., 2017].

Аламетицин. Первичная коэффициент структура, распределения, дипольный момент и влияние $\Delta \psi$, существенные элементы вторичной структуры. Аламетицин (антибиотик U-22324) линейный полипептид, продуцируемый плесенью Trichoderma viride, впервые выделенный в 1967 г. [Meyer and Reusser, 1967], состоит из 19-ти остатков аминокислот L-ряда (в основном, гидрофобных) и остатка (Phol (2-амино-3-фенил-1-пропанола)). Коэффициент фенилаланинола распределения между мембраной и средой - 10⁻³ М [Stankowski, 1989]. 80% Природной смеси аламетицина (и коммерческого препарата фирмы Fluka), составляет изоформа Rf50 (Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phe-OH) [Brueckner. and Przybylski, 1984], 20% - Rf30, которая содержит Glu-18 вместо Gln-18 [Leitgeb et al., 2007]. Изоформа аламетицина Rf50 содержит 8 остатков необычной непротеиногенной аминокислоты α-аминоизобутирата (Aib), N-концевая ацетилирована, С-конце аминокислота локализован остаток на фенилаланинола. Из-за большого количества остатков Aib И восстановленного С-конца молекулы (Phol) аламетицин относят К семейству пептидов, называемых пептаиболами. При нейтральном значении pH молекула аламетицина в целом имела заряд -1 [Mihailovich and Lazaridis, 2010] который обеспечивался остатком Glu-18 (рК карбоксильной группы 5,5) [Wu et al., 1990]. Половина около аламетицина Rf50 сосредоточена положительного заряда на N-, отрицательного – на С-конце молекулы [Bechinger, 1997]. Благодаря этому молекула имеет небольшой дипольный момент (60-79 D в октаноле [Bechinger, 1997]) и небольшую энергию перехода пептида в трансмембране ИЗ поверхностно-ориентированного (1.5-2)положение В ккал/моль) [Kessel et al., 2000]. Вторичная структура аламетицина – это, в основном, α-спираль (с переломом на уровне Pro-14) длиной, достаточной для «пронизывания» мембраны. В области Pro-14 α-спираль прерывается 3₁₀-спиралью [Bak et al., 2001]. Анализ ЯМР-спектров свидетельствовал о том, что в водных растворах N-конец (9-10 аминокислотных остатков) молекулы образует стабильную α-спираль [Bak et al., 2001], а С-конец (15-20 аминокислотных остатков) - β-конформацию [Szekeres et al., 2005]. В гидрофобном окружении (этанол, мицеллы детергента, липидные мембраны) кластер из 2-12 а.о. молекулы аламетицина приобретал конформацию α-спирали [Kouzayha, 2009а].

В воде аламетицин образует агрегаты. Критическая концентрация мицеллообразования аламетицина в воде составляла около 2,4 мкМ. Полагают, что агрегация мономеров в воде обеспечивалась не только их гидрофобными взаимодействиями, но и путем образования водородных связей Dempsey and Handcock, 1996]. Методами КД-И ЯМРспектроскопии показали что в спиртах (метаноле, этаноле, бутаноле, октаноле) аламетицин присутствовал В виде мономеров, a при использовании миллимолярных концентраций пептида в метаноле – димеров [Dempsey and Handcock, 1996].

За последние 20 лет синтезированы многочисленные производные аламетицина с точечными заменами В первичной структуре, дополнительными заместителями и иными модификациями, в частности, сшивками в димер гибким линкером [Woolley et al., 2007]. Так, уменьшая длину молекулы аламетицина выяснили, что для потенциал-зависимого транспорта достаточно 13-ти а.о. в полипептиде, хотя более длинные полипептиды активнее как разобщители, чем короткие [Mathew and Balaram, 1983]. Замена Рго на Gly радикально меняла характеристики формируемого аламетицином трансмембранного канала [Molle et al., 1991]. При формировании транс-конформации под действием $\Delta \psi$ [Brumfeld and Miller, 1990] или при высоком пептид/липидном соотношении [Cascio and

Wallace, 1988] степень спирализации молекулы также увеличивалась.

Структура аламетициновых каналов: жесткие прямые методы структуры визуализации поры И мягкие косвенные методы подтверждения этой структуры. Под действием $\Delta \psi$ аламетицин формирует в мембране трансмембранные каналы [Su et al., 2018] с разной проводимостью и разным диаметром [Woolley, 2007]. Параметры наиболее стабильной поры с максимальной проводимостью (и диаметром) хорошо изучены. В области высоких молярных соотношений пептид/липид (порядка 1/20 – 1/30) трансмембранный канал формировался в отсутствие $\Delta \psi$ и визуализировался в БЛМ с помощью нейтронного сканирования [He, 1996] или дифракции рентгеновских лучей [Qian et al., 2008]. Пора из 8-ми мономеров аламетицина имела внутренний диаметр 19,5 Å. Согласно данным [He et al., 1996] и [Qian et al., 2008] стенки поры не содержали липидов, а их толщина соответствовала диаметру α-спирали аламетицина (1,1 нм [Fox and Richards, 1982]). Степень олигомеризации возрастала с 8ми до 11-ти при увеличении толщины мембраны (использовали фосфолипиды с олеильным (С₁₈) и фитаноильным (С₂₀) остатками) [Не, 1996]. Прямые методы изучения структуры нуждались в жесткой предобработке мембраны: для контрастирования использовали тяжелую воду [He, 1996] или бромированный липид [Qian et al., 2008]. Атомы брома и тяжелая вода создавали темный фон, пептиды формировали светлое кольцо, внутренний и внешний диаметр которого можно было оценить. Степень олигомеризации, определенная в прямых измерениях параметров поры, соответствовала размерам канала, рассчитанным из геометрических параметров для чисто пептидной модели бочонка «barrel-stave» (см. ниже) с тем же количеством мономеров (Wu et al., 1995). Структура канала, полученная прямыми, высокоолигомерного но жесткими методами, подтверждается мягкими, но косвенными методами: показано существование в центре канала обводненной полости [Vodyanoy et al.,

1993]. Перед описанием результатов, полученных с использованием косвенных методов, необходимо описать особенности измерения проводимости каналов аламетицина в БЛМ.

Изучение $\Delta \Psi$ влияния на индуцированную аламетицином обычно осуществляли на БЛМ проводимость при фиксированном потенциале $\Delta \psi$ (метод одиночного канала). Флуктуации тока формировали серии из скачков проводимости разной амплитуды, когда каждая высокоамплитудная флуктуация формировалась только из предыдущей низкоамплитудной и далее понижалась от высоко- к низкоамплитудной с образованием характерной «пирамидки» субсостояний проводимости одиночного канала. Это было свидетельством того, что наблюдали пору с переменной олигомерностью (и, соответственно, диаметром), а не кластер нескольких пор с низкоамплитудной проводимостью. Было показано, что на проводимость пор, сформированных аламетицином в БЛМ, влияет [Opsahl and Webbt, 1994]. Для осмотическое давление высшего проводящего состояния объем жидкости внутри поры («исключенный объем») для непроникающих полимеров согласуется с объемом поры, оцененной по проводимости [Vodyanoy et al., 1993]. Экспериментальная зависимость проводимости от концентрации хлорида калия совпадает с зависимостью в соответствии с системой уравнений Нернста-Планка-Пуассона, что позволяет оценить коэффициент диффузии для K^+ (2 × 10⁻⁵ cm^2/cek) [Woolley et al., 1997], который близок к определенному в водном $cm^2/ce\kappa$) 10^{-5} растворе (1-3) \times [Тимофеева И соавт., 2003]. Высокоолигомерные способны поры потенциал зависимо _ транспортировать такие крупные молекулы, как АТФ [Бутылин и Ритов, 1990] с гидродинамическим диаметром 2,0 нм. Таким образом, можно говорить о близости характеристик высокоолигомерной поры, измеренных с помощью жестких прямых и мягких косвенных методов.

Оценить характеристики низкоолигомерных пор можно только с помощью косвенных методов, по изучению их проводимости. Низшее субсостояние проводимости аламетициновой поры характеризовалось катионной селективностью, в частности, «неспособностью» пропускать катионы Ca^{2+} и Tris⁺ [Hanke and Boheim, 1980] (Рис. 1.10.).



Рис. 1.10. Флуктуации проводимости, индуцированные аламетицином в БЛМ, схема, адаптированная из [Hanke and Boheim, 1980]); время жизни каждого состояния для наглядности принято одинаковым.

До сих пор соотношения между различными субсостояниями проводимости аламетицина объясняли в рамках агрегационной теории, сформулированной исходно в работе [Boheim, 1974]. Изменение степени олигомерности канала с прибавлением или отщеплением мономера с соответствующим изменением внутреннего диаметра поры [Duclohier, 2010] приводило к переходу от одного субсостояния многоуровневой флуктуации проводимости к другому. Поскольку серии многоуровневой отсутствия проводимости периодами сменялись длительными проводимости, последнюю объясняли закрытием канала и полной его дезагрегацией. Стационарная трансмембранная проводимость (макропроводимость), индуцированная аламетицином, «неомическая» (нелинейная), но для каждого субсостояния проводимости, каждого одиночного канала имела место линейная зависимость тока от потенциала, начиная с определенного напряжения. Это обусловливало постоянное соотношение амплитуд в пирамидке (снизу вверх: 1:4:20:45:75:110 [Hanke and Boheim, 1980], Рис. 1.10.). Причем это соотношение (но не время жизни и количество ступенек) не зависело от ионной силы (см. [Duclohier, 2010]) и заряда липидных головок [Aguilella and Bezrukov, 2001]). На Рис. 1.10. видно, что в растворе Tris-HCl наименьшая ступенька исчезала (5 ступенек вместо 6-ти в растворе KCl). В отсутствие $\Delta \psi$ при высоких соотношениях пептид/липид среди высокоолигомерных пор в виде небольшой фракции всегда выявлялись мономеры аламетицина [Angelova et al., 2000], а при низких соотношениях такие мономеры составляли большинство [Barranger-Mathys and Cafiso, 1994].

Агрегационная пороформирования теория И лве альтернативные модели структуры пор (каналов), образуемых пороформирующими пептидами. Предполагаемый механизм действия аламетицина. Относительно механизма действия пороформирующих белков биологические мембраны искусственные И наиболее на разработаны две группы моделей: модель «бочонка» (англ. «barrel-stave») и тороидальная модель [Boheim, 1974; Duclohier, 2010; Mihajlovic and Lazaridis, 2010; Yang et al., 2001] (Рис. 1.11.). В соответствии с этими моделями, образуемые поры можно разделить на два основных вида: бочкообразные (или циллиндрические), у которых внутренняя полость сформирована только белковыми мономерами, и тороидальные, у которых в выстилке проводящего пути дополнительно участвуют липидные молекулы мембраны [Андреева-Ковалевская и соавт., 2008].

Согласно модели "бочонка", предложенной в 1974 г. [Boheim, 1974], проводящая структура собирается из молекул аламетицина, образуя водную пору внутри замкнутой цепочки этих молекул. Изменение числа мономеров, образующих канал, приводит к изменению его проводимости. Встраивание каждой новой молекулы увеличивает периметр канала на 0,66 нм [He et al., 1996]. Авторы допускают, что в отсутствие $\Delta \psi$ мономеры аламетицина лежат на поверхности мембраны, в присутствии $\Delta \psi$ – встраиваются в мембрану благодаря наличию у них дипольного момента [Broniatowski et al., 2008].



Barrel-Stave Model

Toroidal (wormhole) Model

Рис. 1.11. Модели пор, образуемых пептидами в бислойных липидных мембранах, адаптировано из [Yang et al., 2001]. Мономеры пептида изображены в виде темных цилиндров.

Одновременно с этим в процессе латеральной диффузии происходит агрегация мономеров в функциональный канал [Helluin et al., 1997], причем, чем выше потенциал, тем больше мономеров встраивается в мембрану и тем больше образующиеся кольцевые агрегаты. Полагают, что каждому проводящему состоянию канала соответствует определенное количество мономеров в кольце [He et al., 1996]. Исходя из модели "бочонка", флуктуации проводимости объясняют изменением диаметра полости поры. Предполагают, что первое проводящее состояние образует тример [Boheim and Kolb, 1978; He et al., 1996]. Такая модель хорошо объясняет крутую зависимость проводимости концентрации ОТ аламетицина, концентрации электролита и трансмембранного потенциала.

Таким образом, согласно этой модели, аламетицин образует чисто пептидную пору, состоящую из плотно сомкнутых кольцом мономеров,

расположенных перпендикулярно поверхности мембраны, имеющую цилиндрическую внутреннюю поверхность. Для высокоолигомерного состояния эту модель можно считать доказанной на основании данных, полученных в работах [He et al., 1996; Qian et al., 2008].

Существует также предположение, что и в отсутствие $\Delta \psi$ молекулы аламетицина локализуются в мембране. При этом молекулы аламетицина наряду с α -спиралью имеют частично и β -структуру. Присутствие $\Delta \psi$ способствует превращению β-структуры α-спираль. Механизм В образования проводящей аламетициновой структуры в этом случае результатом конформационных изменений является мономеров аламетицина [Fringeli U.P. and Fringeli M., 1979]. Существенной при этом является способность расположенных внутри канала амидных групп Gln-7 в присутствии $\Delta \psi$ изменять ориентацию таким образом, что диаметр канала при этом увеличивается с 0,45 нм до 0,7 нм (для октамерной модели). Внутренняя полость канала содержит 3 кольца полярных групп, способных образовывать водородные связи с молекулами растворителя в канале. Это a.o. Gln-7, Aib-10, Gly-11 и Glu -18. Снаружи канал гидрофобен, длина его вдоль оси олигомера – 3,2 нм. Самое узкое место канала - в области кольца водородных связей, образованных Gln-7.

Результаты молекулярно-динамического моделирования и анализа конформации молекул методом главных компонент свидетельствовали о том, что аламетициновая пора не соответствует строго модели «бочонка», а представляет собой менее упорядоченную структуру [Thøgersen et al., 2008]. По мнению авторов, аламетицин имеет только три гидрофильные боковые цепи, две из которых расположены на С-конце, то есть вне трансмембранного сегмента, идеально расположенные для взаимодействия с полярными головками липидов мембраны.

Согласно второй модели, головки липидов, смыкающихся лепестков мембраны, в промежутках между мономерами пороформирующих белков

(пептидов) образуют тороидальную поверхность (Рис. 1.11.). При этом происходит инвагинация внешнего монослоя бислойной мембраны так, что гидрофильные головки липидного бислоя участвуют в формировании поры и направлены внутрь нее [Allende et al., 2005]. Принципиальной особенностью второй ПО сравнению первой модели с является возможность иметь больший внутренний диаметр поры при меньшей степени олигомеризации [Sengupta, et al., 2008], а так же облегченный флип/флоп пептида (смена N-C ориентации вертикально расположенного пептида на тороидальной поверхности) во внутренний лепесток с возможной антипараллельной димеризацией [Mottamal and Lazaridis, 2006].

Методами ЯМР и КД-спектроскопии показано, что аламетицин образует наряду с циллиндрическими (модель «бочонка») в мембранах из POPC (1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина) И тороидальные поры мембранах, состоящих DHPC (1,2-0-В ИЗ дигексадецил-sn-глицеро-3-фосфохолина) [Dave et al., 2005]. Способность аламетицина формировать наряду с циллиндрическими, менее упорядоченных пор «хаотической» структуры в мембране Bacillus subtilis и тороидальных пор в искусственных мембранных везикулах показана также в работах [Barns and Weisshaar, 2016; Henderson et al., 2016].

Показана роль положительно заряженных остатков на N-конце молекулы пептида в механизме порообразования [Mihajlovic and Lazaridis, 2012]. Так, замена остатка Gln-7 на Lys в молекуле аламетицина способствовала образованию тороидальной поры [Mihajlovic and Lazaridis, 2012]. Утончение липидного бислоя в области 100Å вокруг отдельного мономера аламетицина и связь его с долей аламетицина в транс - положении была подтверждена методом дифракции рентгеновских лучей с использованием немодифицированного пептида (Рис. 1.12.). Необходимо отметить, что по данным ЯМР одна молекула пептида способна контактировать с 500-ми липидными молекулами [Hauser et al., 1970], т.е.

при соотношениях пептид/липид 1/20 до 1/150 «невозмущенный» бислой практически отсутствует [Kouzayha et al 2009]. Тем не менее, теории молекулярного ионного транспорта особенностей механизма И порообразования были сформулированы на основе данных, полученных области пептид/липидных соотношений от 1/20 до 1/150. Полученные закономерности экстраполировали на область более низких соотношений пептид/липид [Huang, 2006; Woolley, 2007; Leitgeb et al., 2007; Qian et al., 2008]. Например, кооперативность и сигмоидальную зависимость проводимости от концентрации аламетицина объясняли энергетическим вкладом взаимодействия областей утончения бислоя в области 100 Å вокруг каждого мономера [Wu et al., 1995]. При агрегации мономеров энергетические вклады этих областей суммировались [Chen, 2002], и чем больше олигомерность, тем была стабильнее пора.



Рис. 1.12. Пространственная модель аламетицина в липидном бислое, представлена с помощью INSIGHT (Molecular Simulations, San Diego, CA); атомы углерода – зеленые, водорода – белые, кислорода – красные, азота – голубые; белые линии - границы углеводородной части липидного бислоя, адаптировано из [Kessel et al., 2000].

Попытки калибровки размеров аламетициновой поры и выявления проводимости низкоолигомерных пор. Необходимо отметить, что Δψ, способствуя транс - положению молекулы аламетицина, сдвигал образование высокоолигомерных агрегатов в область низких пептид/липидных соотношений [Mottamal and Lazaridis, 2006]. И именно в этой области кооперативность, опосредованная «возмущенным» липидом, уменьшалась, и концентрационный порядок реакции олигомеризации можно было связать с ее молекулярностью [Duclohier, 2010]. Поскольку низкоолигомерные поры обладают существенно меньшей проводимостью, структура пор аламетицина с меньшей степенью олигомеризации и область низких пептид/липидных соотношений приходится изучать косвенными и менее доказательными методами. Существование стабильных встраиванием мембрану, предагрегатов аламетицина перед его В предполагаемое в работе [Fox and Richards, 1982], не показано [Archer and Cafiso, 1991]. Кроме того, в отсутствие потенциала при высоких соотношениях пептид/липид среди высокоолигомерных пор методом рентгеновской дифрактометрии с временной разверткой в виде небольшой фракции, выявлялись мономеры аламетицина [Angelova et al., 2000], а при низких соотношениях (> 1/150) - мономеры преобладали (Barranger-Mathys and Cafiso, 1994). Необходимо заметить, что объяснение низких концентрационных порядков (от 2-х до 4-x) для проводимости, индуцированной аламетицином, в рамках чисто пептидного «barrel-stave» канала, необъяснимо в рамках агрегационной теории. Постулирование пептидного цилиндра для низкоолигомерных состояний аламетициновой поры приводило к следующим оценкам. Известно, что диаметры гидратированных катионов Li⁺, Na⁺, K⁺ составляют, соответственно, 3,40, 2,76 и 2,32 Å и содержат, соответственно, 25,3, 16,6 и 10,5 молекул воды [Cotton and Wilkinson, 1980]. Низшее проводящее состояние аламетицина имело на 20% меньшую проводимость, чем каналы, образованные грамицидином A [Hanke, 1980], селективные по выше перечисленным катионам и имеющие внутренний диаметр канала 3,8 Å. Поэтому неселективный низколигомерный канал аламетицина предположительно должен иметь диаметр не менее 5Å [Hanke and Boheim, 1980]. Низшее субсостояние проводимости, выявляемое в калиевой среде, не выявлялось в присутствии катиона Ca^{2+} [Hanke and Boheim, 1980], гидратированный которого составляет 4,12 Å [Laatikainen et al., 2007]. диаметр Геометрическая оценка внутреннего диаметра канала в пептидной модели аламетицина составляла 3,5 Å для пентамера, и 2,1 Å для тетрамера, что означает, что тетрамер не мог свободно пропускать K⁺ [Tieleman et al., 2002]. Пентамер в рамках агрегационной теории должен демонстрировать пятый порядок для зависимости низшего уровня субпроводимости от концентрации пептида в калиевой среде [Tieleman et al., 2002]. В связи с тем. ЧТО проводимость и время жизни субстояний существенно различались, представляла интерес оценка концентрационного порядка проницаемости для частиц, больших, чем катион Ca²⁺. Максимальный концентрационный порядок для аламетицина, определенный по вытеканию из липосом карбоксифлуоресцеина, существенно большего по размеру, чем К⁺, составлял 5,5 [Schwarz and Robert, 1990]. При этом порядок, определенный по входу в липосомы катионов Pr³⁺ составлял 4,0 [Hunt and Jones, 1982].

Таким образом, порядок зависимости проводимости от концентрации аламетицина даже для пор с большей олигомерностью колеблется между 4 и 5. Это может быть связано с методическими проблемами. Представляло интерес найти способ выделить проводимости, связанные с порами разного диаметра.

Трудности химической и нехимической фиксации пор разной степени олигомерности и их проводимостей. «Сшитые» гибкими линкерами тримеры и тетрамеры аламетицина демонстрировали при фиксированном потенциале одиночные каналы с единственным проводящим состоянием, которое имело время жизни существенно большее, чем у «несшитого» пептида, в то время как сшитые димеры образовывали несколько долгоживущих субсостояний [Duclohier, 2010]. В последнем случае интересно, что более гибкая или длинная сшивка

обеспечивала более долгоживущее состояние. Время жизни возрастало более, чем в 20 раз. К сожалению, во всех подобных работах отсутствуют попытки калибровать пору катионами с различным гидродинамическим Поэтому объемом. приписывание авторами низшего состояния проводимости тетрамерной поре не убедительно. Присоединение к молекулам аламетицина фуллеренов или аналогов липидов создавало столь же долгоживущие субсостояния, что и при ковалентной сшивке мономеров [Jung et al., 2003]. Возможно, в обоих случаях увеличение времени жизни связано не с фиксацией олигомера, но с ограничением возможности мономеров удалиться друг от друга на определенное расстояние [Jung et al., 2003]. Попытка создать химическую модель низшего состояния проводимости с помощью «сшитых» линкерами гибкости тетрамеров аламетицина различной дала неоднозначные результаты. Наблюдалась долгоживущая одноуровневая флуктуация проводимости, имеющая амплитуду 60, 250, и даже 500 pS (в зависимости от вида сшивки), что было близко к амплитудам, соответственно, 1, 2 и 3 уровней проводимости нативного аламетицина, но не к нулевому уровню (19 pS) [Duclohier, 2010]. В рамках тороидальной модели это можно объяснить, предполагая, что разное количество липида в стенках поры, зависящее от гибкости сшивки, модулировало диаметр этой тетрамерной Вопрос, тем не менее, остается дискуссионным, поскольку поры. визуализировать пору, соответствующую непосредственно «barrel-stave» модели, можно только для высокоолигомерных пор [He et al., 1996; Wu et al., 1995; Qianet al., 2008].

Возможная тороидальная структура низкоолигомерных аламетициновых пор. Низкоолигомерные субсостояния слишком короткоживущие, чтобы определить их вольт-амперную характеристику или изучить их в присутствии градиента иона [Huang, 2006]. Несмотря на очевидные противоречия, сторонники агрегационной теории и чисто пептидной поры (например, в статье [Cernescu and Luchian, 2006]) используют представление о пентамере, как наименьшей проводящей Объяснение низших состояний проводимости поре. В рамках агрегационной теории возможно при постулировании тороидальной модели канала. В соответствии с этой моделью часть стенок канала образованы липидом, и при меньшей молекулярности по пептиду возможен больший диаметр канала [Yang et al., 2001], по крайней мере, для низших проводящих состояний. В упомянутой выше работе [Cernescu and Luchian, 2006] это позволило бы объяснить непропорционально большее влияние холестерина, как замедлителя скорости агрегации мономеров аламетицина, на время жизни низших уровней проводимости [Cernescu and Luchian, 2006; Chiriac and Luchian, 2008]. Можно предположить, что второй концентрационный порядок для низшего проводящего состояния действительно отражает его молекулярность по пептиду [Шольц, 1983]. В этом случае неизбежное включение липида в состав канала гармонирует с данными по максимальной чуствительности этого субсостояния к pHмодулированию дипольного момента мембраны [Chiriac and Luchian, 2007]. Увеличение поверхностного натяжения БЛМ сокращало время жизни преимущественно низкопроводящих субсостояний [Hunt et al., 1984]. Влияние иных модификаторов дипольного потенциала на проводимость и время жизни неоспоримо для тороидальной поры, образуемой серингомицином E, что показано в работе [Ostroumova et al., 2007]. Аналогичное влияние (pH - зависимого поверхностного заряда мембраны и модуляторов мембранного дипольного потенциала) на время низших субсостояний проводимости жизни (И, соответственно, низкоолигомерных пор) показано для аламетицина [Mereuta et al., 2011]. В пользу тороидальной модели косвенно свидетельствует способность образовывать флуктуации проводимости семейства многоуровневые липофильных трет-бутоксикарбонил-(Ala-Aib-Ala-Aibполипептидов,

Ala)n-OMe, n = 2 - 4 [Menestrina et al., 1986]. В их присутствии наблюдали трехуровневую проводимость с существенно большими временами жизни, чем в присутствии аламетицина, и вторым уровнем проводимости, соответствующим по амплитуде высшему уровню аламетицина (т.е. 2500 pS). Однако равноэффективной проводимости требовалась для существенно большая, чем с аламетицином, концентрация (для n = 2 и 4 - в 200-800 раз). Любопытно выглядит моделирование первого проводящего состояния аламетицина использованием упрощенной С аламетициноподобной структуры без а.о. Pro: Ac-(Aib-Lys-Aib-Ala)5-NH₂, где наблюдали флуктуацию 50 pS при 100 мB, 100 мM KCl и pH = 7,4 [Taira et al., 2009]. К сожалению, исследование зависимости проводимости от концентрации искуственного пептида авторы не привели.

Мелиттин. Первичная структура, коэффициент распределения, дипольный момент и влияние $\Delta \psi$, существенные элементы. Мелиттин пороообразующий пептид из яда европейской медоносной пчелы Apis *mellifera*, составляет 40-60% сухого веса пчелиного яда [Chen et al., 2016], состоит из 26-ти остатков аминокислот L-ряда: Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Tre-Tre-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH₂ [Habermann, 1972]. Большая часть аминокислот гидрофобные, 6 имеют положительный заряд, что увеличивает сродство пептида к липидам с отрицательно заряженной головкой. Количественное изучение связывания с липидами осложнялось тем, что пептид способствовал агрегации липосом из таких липидов [van den Bogaart et al., 2008], но даже небольшая их примесь стократно увеличивала сродство пептида к мембране [Papo and Shai, 2003]. Коэффициент распределения между средой и липосомами из нейтральных (цвиттерионных) липидов составил – 5×10^{-3} [Rex, 1996], ацетилирование остатков лизина, блокирующее его сродство к положительный заряд. уменьшало подобным липидам [Stankowski and Schwarz, 1990], но не мешало образованию каналов [Hanke et al., 1983]. Более того, модифицированный пептид формировал каналы с временами жизни в 20-100 раз большими [Stankowski et al., 1991], чем у нативного мелиттина. Мелиттин в мембраносвязанном состоянии, подобно аламетицину образует α -спираль с переломом на уровне Pro-14 [Bechinger, 1997]. Дипольные моменты этих пептидов: 75D [Schwarz and Savko, 1982] и 67 D [Yantorno et al., 1982], соответственно, также близки, и это, повидимому, определило малоэнергоемкий сдвиг равновесия мембраносвязанного пороформера трансмембранной сторону В конформации в присутствии потенциала. На БЛМ [Kempf et al., 1982] и липосомах [Schwarz and Robert, 1990] показано, что потенциал ускоряет порообразование, индуцированное мелиттином (присутствие потенциала 100 мВ благодаря калиевому градиенту, создаваемому с помощью валиномицина, ускоряло выход красителя в 3 раза.). В частности, долю трансмембранного мелиттина, образующегося под оценивали действием диффузного калий/валиномицинового потенциала с помощью появления чувствительности проводимости к проназе, добавленной с противоположной стороны БЛМ [Kempf et al., 1982]. Если в отсутствие $\Delta \psi$ почти полная трансмембранная локализация пептида достигается при его молекулярном соотношении к липиду, равном 1/10 [Sengupta et al., 2008], то в присутствии $\Delta \psi$ соотношение становится порядка 1/300 [Kempf et al., 1982]. На БЛМ индукция проводимости была более эффективна при добавлении пептида с положительно заряженной стороны мембраны [Pawlak et al., 1991].

Модель взаимодействия мелиттина с бислоем, экспериментальная проверка. Гипотеза о димерной предпоре. В работах [Sengupta et al., 2008; Klocek et al., 2009] показано, что в отличие от аламетицина, лимитирующей стадией порообразования являлась предагрегация мембраносвязанного мелиттина [Schwarz, 1992] и эта предпора – димер [Takei et al., 1999]. Эти результаты являются для нас

принципиальными, и мы рассмотрим их более подробно. В обеих работах использовали мелкие униламеллярные диолеилфосфатидилхолиновые липосомы, содержащие 50 мМ карбоксифлуорисцеин, который при выходе из липосом флуоресцировал в режиме 490/520 нм. Соотношение пептида к липиду подобрано таким образом, что на одну липосому приходилась одна мелиттиновая пора. Это условие накладывало ограничение на использование высоких концентраций мелиттина и, вместе с тем, приводило к образованию одноразмерных пор [Lee, 2008]. В статье [Schwarz and Beschiashvili, 1989] приведена двустадийная модель ассоциации пептида с липидным бислоем: $A_f + L \leftrightarrow A_l$ и $mA_l \rightarrow P$, где A_f свободный и A₁ - связанный с липидом (L) пептид, т – количество мономеров, Р – пора.

$$1/\tau = k_{as} c_L + k_{dis}, \qquad (1)$$

где с_L – общая концентрация липида, k_{as} и k_{dis} – константы скорости ассоциации и диссоциации. Результаты, полученные для диолеилфосфатидилхолина: k_{as} = $10^5 M^{-1} s^{-1}$, k_{dis} = $10 s^{-1}$ [Schwarz and Beschiashvili, 1989]. Экспериментальные данные по порообразованию, измеренному по вытеканию красителя из липосом, подтвердили адекватность модели [Takei et al., 1999]. Скорость порообразования имеет двухфазный характер и подчиняется уравнению:

$$v_p = v_{pi} + (v_{po} - v_{pi})e^{-kt},$$
 (2)

где v_p – скорость вытекания красителя, v_{po} – начальная скорость, v_{pi} – скорость медленной стационарной стадии. Медленная стадия в зависимости скорости вытекания красителя от концентрации мелиттина, ассоциированного с липидом, в двойных логарифмических координатах имела наклон, равный 2 (Рис. 1.13.). Авторы [Schwarz et al., 1992] предположили, что образование агрегированных форм (димеров) в мембране играет существенную роль в пермеабилизации мембран.



Рис. 1.13. Зависимость промежуточной скорости образования поры (А) и константы времени (В), характеризующей уменьшение скорости, от концентрации мелиттина, ассоциированного с липидом (в двойных логарифмических координатах); кривые имеют наклон, равный 2 и 1, соответственно; адаптировано из [Schwarz et al., 1992].

В работе [Takei et al., 1999] были использованы вышеописанные липосомы, обладающие концентрационным градиентом К⁺ на мембране, который сохранялся вначале действия мелиттина. Авторы показали (см. Рис. 1.14.), что начальная скорость порообразования, индуцированного мелиттином, увеличивалась пропорционально квадрату концентрации пептида, в то время как димеризованный с помощью дисульфидного мостика мелиттин, демонстрировал 1-й концентрационный порядок для этой зависимости [Takei et al., 1999]. Авторы сделали вывод, что димеризация пептида В условиях эксперимента ЭТО стадия, лимитирующая скорость образования мелиттиновой поры.



Рис. 1.14. Зависимость начальной скорости порообразования, индуцированого мелиттином и димелиттином, от концентрации пептида, адаптировано из [Takei et al., 1999].

Мелиттин – один из наиболее изученных мембранотропных пептидов [Guha et al., 2019]. Первоначально считалось, что мелиттин индуцирует, в основном, циллиндрические поры, соответствующие модели «бочонка», однако большинство исследователей считает, что мелиттин образует тороидальные поры [Allende et al., 2005; Mihajlovic and Lazaridis, 2010; Lee et al., 2013; Guha et al., 2019]. Моделирование методами молекулярной динамики также свидетельствуют 0 тороидальном механизме формирования пор [Lin and Baumgaertner, 2000]. В мембранах димиристоил-фосфатидилхолина/димиристоил-фосфатидилглицерола ИЗ (DMPC/DMPG) мелиттин образует нестабильную тороидальную пору, состоящую из четырех молекул пептида [Leveritt et al., 2015]. Однако исследование методом поверхностного плазмонного резонанса показало, что мелиттин может изменять свой механизм действия в зависимости от свойств мембраны Papo and Shai, 2003]. Методом двумерной флуоресцентной микроскопии (DCBFA) с использованием мембран из диолеоил-фосфатидилхолина (DOPC) и DOPC:холестерина 9:1 показана зависимость механизма действия мелиттина на мембраны от его концентрации. Индуцированные мелиттином поры не воспроизводились этим методом с таким качеством, которое подтвердило бы гипотезу о тороидальных порах. На основании анализа изображений, полученных с помощью атомно-силового микроскопа, предположили, что мелиттин образует не поры, а скорее, «расщелины» в мембране [Pandidan and Mechler, 2019]. Таким образом, нет единого мнения относительно структуры мелиттиновой поры [Levelitt, et al., 2015].

В работе [Manna and Mukhopadhyay, 2009] предполагается, что предпора, формируемая мелиттином, индуцирует дефект-впадину в бислое, и это утончение бислоя в ходе последующей электропорации (пробоя) под действием потенциала может образовать липидную пору, инкрустированную мелиттином. Этот пептид формирует несколько видов

крупноразмерных пор, диаметр которых оценен разными методами в диапазоне 25-30Å [Ladokhin et al., 1997] или 35-40Å [Park et al., 2006], причем при низких концентрациях формируются более узкие поры, проницаемые для глюкозы, а при более высоких – для сахарозы [Lee et al., 2008]. Большие поры образовывались при большем соотношении пептид/липид, при низких соотношениях крупноразмерных пор практически не было. Гидратированные катионы щелочных И щелочноземельных металлов меньшими С гидродинамическими диаметрами (см. выше) свободно диффундировали через мелиттиновые поры. Прямые методы, например, метод ориентированного кругового дихроизма (демонстрирующий преимущественную ориентацию мелиттиновых спиралей в мембране при высоких пептид/липидных соотношениях) или метод нейтронной дифракции (визуализирующий пору) показали, что мелиттиновые поры соответствуют тороидальной модели, с внутренним диаметром 44 Å [Yang et al., 2001]. В работе показано, что такие характеристики имели место в мембранах из нескольких видов липидов, в частности, с разной длиной хвостов и, al., соответственно, с разной толщиной бислоя [Yang et 2001]. Формирование мелиттиновой поры в соответствии с тороидальной моделью косвенно подтверждается корелляцией между порообразованием и облегченным флипп-флоп'ом пептида в противоположный лепесток бислоя [Matsuzaki et al., 1996].

Особенности тетраацетилмелиттина (ТАМ). Ацетилирование не влияет на коэффициент распределения пептида между мембраной и водой [Stankowski et al., 1991]. Однако продемонстрирована большую амплитуду флуктуаций проводимости, индуцированной ТАМ в БЛМ из дифосфатидилхолина, по сравнению с немодифицированным мелиттином и сравнительно большее время жизни этой флуктуации. Это, по-видимому,
свидетельствует о существовании индуцированной ТАМ долгоживущей крупноразмерной поры.

Мастопаран. Первичная структура, коэффициент распределения, влияние Δψ, существенные элементы вторичной структуры. Мастопараны – пептиды, входящие в состав ядов шершней. Для них характерна последовательность из 14 аминокислот L- ряда с блокированной амидом С-концевой аминокислотой. Впервые один из мастопаранов был выделен из яда Vespa lewisii в 1979 г. в Японии [Hirai et al., 1979]. Он был назван мастопараном в связи со способностью вызывать дегрануляцию тучных клеток млекопитающих (*англ.* mast cell – тучная клетка).

Исследуемый нами мастопаран – полипептид из яда шершня V. orientalis [Мирошников и соавт., 1981], содержит остатки 10 гидрофобных и 4 полярных L-аминокислот (Ile-Asn-Leu-Lys-Ala-Ile-Ala-Ala-Leu-Val-Lys-Lys-Val-Leu (NH₂)). Из яда ос других видов выделены [Hirai et al., 1979; Ho and Hwang, 1991] и синтезированы [Yajima et al., 1981; Colombo, 1981] другие мастопараны, отличающиеся по аминокислотному составу. Наличие C-концевого лейцамидного остатка и присутствие остатков Lys является характерным для этих пептидов. Кластер из 5 остатков гидрофобных аминокислот в средней части молекулы обеспечивает амфифильность этих соединений.

Существование магнитного момента у молекул полипептидов, обусловленное 2-3 остатками Lys на C- конце, позволяет считать мастопараны структурными аналогами мелиттина [Hori et al., 2001]. α-Спиральная конформация полипептида в мембраносвязанном состоянии показана разными методами для разных мастопаранов [Hori et al., 2001; Yu et al., 2001]. Так в работе [Tucker et al., 2005] использовали содержащий триптофан мастопаран X из Vespa xanthoptera с модифицированным рцианофенилаланином на C-конце. При спирализации расстояние между ним, измеренное с помощью FRET (fluorescence resonance energy transfer) существенно сокращается. Показано, что α-спирализация наступает после погружения пептида в мембрану. Причем методом 2Н-ЯМР спектроскопии дейтерированных с использованием головок димеристоилфосфатидилхолина показана характерная периодичность в 3 – 4 остатка для химических сдвигов в амидных протонах [Hori et al., 2001]. Аналогичное применение 2Н-ЯМР спектроскопии для мастопарана В из яда Vespa basalis демонстрирует α -спирализованную структуру участка от 2 до 14 аминокислотных остатков пептида, погруженного в мембрану [Yu et al., 2001]. При солюбилизации неионным детергентом октилгликозидом, мастопаран Х имеет такую же α-спирализацию, как и связи с липосомами, где фосфолипиды имеют заряженные головки [Hellmann and Schwarz, 1998]. Авторы делают вывод, что электростатическое взаимодействие важно для локализации, но не для α-спирализации пептида. Методом флуоресценции триптофана в гигантских фосфолипидных тушения везикулах показано, что диффузионный калиевый потенциал увеличивает формальную скорость связывания мастопарана X с мембраной [de Kroon et al., 1991]. Можно предположить α -спирализованную структуру в мембране и аналогичное действие $\Delta \psi$ и для использованного в нашей работе мастопарана, поскольку его первичная структура отличается OT вышеописанных пептидов незначительно.

Обоснование тороидальной структуры поры и калибровка мастопарановых пор. Для мастопарана при соотношении пептид/липид, равном 1/10, отношение транс- и параллельной мембране конформации составляет 1/9, в то время как признаки порообразования, связанные с флип/флоп переносом пептида во внутренний лепесток бислоя, наступают уже при соотношении - 1/100 [Hori et al., 2001]. В работе [Matsuzaki et al., 1996] флип-флоп липидов оценивали с помощью флуоресценции NBD-меченых липидов в дитионите натрия. Авторы показали, что мастопаран Х

усиливал быстрый флип-флоп и отрицательно заряженных и нейтральных липидов, и это кореллировало с порообразованием и транслокацией самого пептида. Все эти вышеописанные данные обсвидетельствуют о тороидальной структуре мастопарановой поры.

Для калибровки пор в зависимости от соотношения пептид/липид использовали вытекание ИЗ липосом кальцеина И декстрана С молекулярной массой 623 и 4400 г/моль и диаметром 1,3 и 2,4 нм, пор для меньших соответственно. Диаметр мастопарана Х при пептид/липидных соотношения составляет 13 Å, а при больших – 24Å [Matsuzaki et al., 1996]. По-видимому, потенциал может легко сдвинуть это соотношение. Качественно тенденция к агрегации мембраносвязанного мастопарана показана в работах [Schwarz and Reiter, 2001; Fujita et al., 1994]. В опытах по изучению связывания пептида с липосомами [Schwarz and Reiter, 2001] отмечена негативная кооперативность на зависимости одной из фаз престационарно измеренной скорости связывания от концентрации пептида. Авторы на основании этих косвенных данных мембране предположили агрегацию мастопарана В перед порообразованием. В работе [Fujita et al., 1994] авторы модифицировали мастопаран Х, присоединив к С-концу антрильную группу. Это позволило по форме зависимости от концентрации модифицированного пептида FRET флуоресценции сигнала деполяризации предположить И самоассоциацию мастопарана в липидном бислое. Однако ни в одной из более поздних работ не сообщается о существовании димерной предпоры для мастопарана, характерной для мелиттина, что возможно связано с методическими трудностями (см. выше).

Изучение предпорообразования мастопарана. Применение метода изучения зависимости порообразования от концентрации пептида по вытеканию репортерного красителя из липосом (см. выше) [Schwarz and Robert, 1990; Schwarz et al., 1992], для мастопарана затруднено [Cabrera,

2008], поскольку время существования поры мастопарана существенно меньше, чем временная шкала измерения скорости вытекания этого красителя. Если за время существования поры, через нее вытекает только часть красителя, то измерение некорректно. Методом stop-flow по изменению флуоресценции триптофана показаны фазы 163 и 28 с⁻¹ [Hori et al., 2001]. Первая фаза, по мнению авторов, связана с сорбцией, вторая - с реориентацией и погружением в бислой, а только затем предполагается медленное порообразование.

Таким образом, степень олигомерности (количество мономеров в ассоциате) корректными экспериментальными методами не установлена. Качественно тенденция к агрегации мембраносвязанного мастопарана показана в работах [Schwarz and Reiter, 2001; Fujita et al., 1994]. Однако ни в одной из работ не сообщается о структуре ассоциатов. В отличие от мелиттина, способность образовывать предпору для мастопарана не показана.

1.6. Медицинское значение пороформеров мелиттина, мастопарана и аламетицина

К настоящему времени описано большое количество пептидов пороформеров [Sierra et al., 2017; Greber and Dawgul, 2017; Yi et al., 2014], однако пептидов. имеющих хорошо изученный механизм функционирования и в то же время используемых в медицине, немного [Andreeva-Kovalevskaya et al., 2008]. Антибиотики пороформеры – группа антибактериальных, противогрибковых и противовирусных препаратов, обладающих уникальной особенностью: по сравнению с традиционными антибиотиками к ним практически не вырабатывается резистентность Пороформеры патогенных штаммов микроорганизмов. способны разрушать микробные клеточные мембраны и это делает их идеальными комбинированной кандидатами для терапии с традиционными

[Hollmann 2018]. антибиотиками et al., Пороформеры облегчают проникновение в цитоплазму молекул антибиотиков к основной мишени действия. Препараты антимикробных их на основе пептидов пороформеров применяют и рассматривают как перспективные лекарства для лечения и профилактики ряда заболеваний [Tonk et al., 2016; Rady et 2017; Kim S-K. et al., 2011; Fehri et al., 2007]. Некоторые al., пороформирующие пептиды оказывают противоопухолевое действие и [Jin. обладают противораковыми свойствами 2019]. Однако для испытаний проведения клинических этих пептидов В качестве потенциальных лекарств, необходимо изучить механизм их действия и возможные токсические побочные эффекты [Lei et al., 2019; Nuti et al., 2017].

Хорошо изучены применяемые в настоящее время в практической медицине 10 антибиотиков-пороформеров. Эти соединения можно подразделить на 5 групп: линейные пептиды – мелиттин, циклопептиды – грамицидин S и исеганан, липопептиды – полимиксин B, полимиксин E (колистин) и даптомицин, липогликопептиды – оритаванцин и телаванцин, и полиеновые антибиотики – амфотерицин В и нистатин. Видно, что пороформеры – группа, объединенная общим физико-химическим эффектом, а не сходством молекулярной структуры.

Антибиотики-пороформеры в терапии инфекционных болезней – чемпионы по длительности применения. Ниже приведен перечень пороформеров с указанием (в скобках) года выдачи Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (*англ*. Food and Drug Administration, FDA) разрешения на практическое применение в США: полимиксин Е (1962), полимиксин В (1964), нистатин (1976), амфотерицин В (1992), грамицидин S (1996), даптомицин (2003), оритаванцин (2008), телаванцин (2009), исеганан - III фаза клинических испытаний (2014).

Монотерапия амфотерицином В применяется на протяжении 50 лет [Vincent et al., 2013]. Грамицидин S использовали в СССР в качестве обычного противозачаточного средства несколько десятилетий [Bourinbaiar et al., 1994]. Из последовательности дат видно, что некоторые лекарства из числа пороформеров используются более 50 лет (это не характерно для антибиотиков), а остальные вводятся в практику медленно и равномерно, в отличие от традиционных антибиотиков, линейка которых обновляется каждые 10 лет [Bassetti et al., 2013].

Развитие устойчивости микроорганизмов к лекарствам на основе пороформирующих пептидов. Развитие устойчивости к лекарству обычно связано с тем, что микроорганизм находит способ функционирования в обход молекулярной мишени, на которую направлено антибиотика. Считается, что действие действие пороформирующих пептидов преимущественно направлено бислой липидный на биологических мембран. По-видимому, именно с этим связано то, что развитие устойчивости микроорганизмов к пороформерам затруднено [Bayer et al., 2013]. Показано, например, что мембрана клеток штаммов, нечувствительных к даптомицину, устойчива К деполяризации И пермеабилизации из-за ухудшения связывания даптомицина с мембраной с измененным липидным составом [Bayer et al., 2013]. У штаммов mitis/oralis, устойчивых к даптомицину, Streptococcus В мембране фосфатидилглицерин, кардиолипин и микродомены отсутствуют c анионными фосфолипидами [Mishra et al., 2017]. Аналогичное понижение фосфатидилглицерина доли описано для резистентных штаммов Corynebacterium striatum [Goldner et al., 2018]. Описана mprF мутация с лизилфосфатидилглицерина увеличенным количеством В мембране резистентного штамма [Gómez Casanova et al., 2018]. Колистин устойчивые Α. baumannii штаммы граммотрицательных патогенов лишены возможности синтезировать липополисахариды, с которыми связывается

антибиотик, а также в этих штаммах понижено содержание катионных липидов, таких как фосфатидилэтаноламин [Moffatt et al., 2010; Stokes et al., 2017]. В обоих случаях такие штаммы теряют патогенность. Штаммы P. aeruginosa, устойчивые к полимиксину В, также теряют вирулентность [Bulman et al., 2015]. Описаны штаммы, резистентные к полимиксину В, защищающие свою внешнюю мембрану путем пентаацелирования липида А, однако более гидрофобные аналоги этого антибиотика являются эффективными [Han al., лекарствами et 2018]. Резистентные К амфотерицину В штаммы Leishmania sp. содержат дефектные ферменты в цепочке синтеза эргостерола – компонента мембраны, связывающего антибиотик [Purkait et al., 2012; Mwenechanya et al., 2017]. Однако паразиты с такими мутациями ослаблены, и такая резистентность представляет только лабораторный интерес [Mwenechanya et al., 2017]. Таким образом, показано, что при изменении состава липидного бислоя мембраны, развивается резистентность микроорганизмов к пороформерам, а патогенность их радикально уменьшается.

Мелиттин, мастопаран аламетицин потенциальные И лекарства. В нашей работе изучены механизмы возможных побочных действий 3-х пептидных пороформирующих антибиотиков: аламетицина, мелиттина и мастопарана. Известно, что кроме биологических мембран они имеют в клетке и дополнительные мишени воздействия. Аламетицин синергически увеличивает эффективность эндофлаксацина в лечении болезней дыхательных путей, вызываемых Mycoplasma pulmonis [Fehri et al., 2007]. Мелиттин – основной компонент пчелиного яда Apis mellifera [Son et al., 2007; Oršolić, 2012], составляющий около 50% сухого веса яда [Li et al., 2010]. В китайской традиционной медицине пчелиный яд используют при лечении артрита, ревматизма, рака, болезней кожи, а также в качестве местного анальгетика [Son et al., 2007]. Кроме внешней мембраны, существуют другие мишени этого пороформера в клетке

[Shpakov, 2009]. Мелиттин ингибирует активность ядерного фактора kappaB и, возможно определяет антивоспалительные и антиартритные свойства пчелиного яда [Son et al., 2007], индуцирует апоптоз в апоптозоустойчивых синовиоцитах и имеет перспективы как лекарство от ревматоидного артрита [Kim et al., 2011]. Антиартритный эффект мелиттина показан на модельном артрите у мышей [Li et al., 2010]. Инъекция мелиттина уменьшает реакцию мышей на висцеральную боль [Kwon et al., 2005]. Утверждается, что мелиттин может стать эффективным средством по предотвращению фиброза печени [Park et al., 2011], лечению атеросклероза [Kim et al., 2011], острой печеночной недостаточности [Park et.al., 2012]. Мелиттин рассматривают как перспективное лекарство для лечения различных видов онкологических заболеваний [Rady et al., 2017], в том числе лейкемии и злокачественных опухолей легких. Пептид индуцирует апоптоз в культуре лейкемических клеток [Ceremuga, et al., 2020], клеток ChaGo-K1 бронхогенной карциномы человека и ингибирует превращение моноцитов THP-1 в опухоль-ассоциированные макрофаги (TAM) [Tipgomut et al., 2018]. Мелиттин индуцирует аутофагию в клетках гепатокарциномы человека в культуре и подавляет развитие опухоли митохондриального путем активации пути апоптоза запуска И каспазозависимой апоптотической гибели опухолевых клеток [Lv et al., 2019]. Мастопаран ингибирует метастазообразование через активацию G(i)/фосфоинозитид-3-гидрокси-киназозависимого пути [Kamath et al., 2001]. Лечение мастопараном (3 мг/кг) защищает мышь с модельным септическим шоком, индуцированным E. coli [Yibin et al., 2005]. Показано, что антимикробные пептиды класса пептаиболов, в том числе аламетицин, индуцируют апоптоз и аутофагию клеток гепатокарциномы человека и могут служить в качестве потенциальных супрессоров опухолевых клеток [Shi et al., 2010]. Однако некоторая неспецифическая цитотоксичность

ограничивает возможности клинического применения пороформирующих пептидов [Rady et al., 2017].

Медицинское значение трех описанных пептидов явилось одним из оснований для изучения механизмов их взаимодействия с митохондриями – важнейшими энергопроизводящими органеллами клетки. Исследованиями последних лет показана ведущая роль митохондрий в чувствительности к лекарствам, их ключеваю роль в старении организма, процессах апоптоза. Нейродегенеративные и онкологические болезни также тесным образом связаны с энергетическим обменом и дисфункцией митохондрий.

1.7. Молекулярные характеристики переносчиков С₄-ДКБ и механизм транслокации

1.7.1. Транспортеры ДКБ. Общие сведения, роль в метаболизме. С₄-ДКБ, прежде всего L-малат и сукцинат, играют важную роль в метаболизме эукариотической клетки. Они являются интермедиатами цитратного цикла, локализованного в митохондриях. Окисление С₄-ДКБ необходимо фосфорилирования, окислительного основного для поставщика АТФ в клетке. Особую роль играет специфический транспорт этих метаболитов через биологические мембраны. Например, транспорт Lмалата через митохондриальную мембрану связан с так называемым транспортом восстановительных эквивалентов, необходимым для обеспечения взаимодействия между двумя изолированными пулами никотинамидадениндинуклеотидов – митохондриальным и цитозольным. Генетические повреждения дикарбоксилатных переносчиков часто бывают фатальными. Например, отсутствие оксодикарбоксилатного переносчика митохондрий приводит к митохондриальной дисфункции, накоплению оксоадипата И гуанолиновой кислоты, приводящему К атрофии

повреждения мускулатуры позвоночника из-за токсического соответствующих моторных нейронов [Восгопаdi et al., 2018]. Транспорт сукцината через митохондриальную мембрану обеспечивает взаимосвязь между обменом в пероксисомах и митохондриях. Как правило, объектом регуляции являются ключевые звенья метаболизма. Ряд транспортеров С₄-ДКБ у многоклеточных организмов регулируются гормонами [Strungaru et al., 2011] например, фактор транскрипции РІТХ2 непосредственно дикарбокслатого регулирует экспрессию Na-зависимого трапортера (SLC13A3) в клетках глаза [Strungaru et al., 2011] а факторы эмбриогенеза, кодируемые генами nadc1 и nadc2 экспрессируется только на ранней личиночной стадии C. elegans [Fei et al., 2004]. Переносчик цитрата в митохондриях животных, растений и простейших функционирует как дикарбоксилат-трикарбоксилатный переносчик, в отличие от цитратизоцитратного переносчика митохондрий дрожжей [Dolce et al., 2014]. Этот переносчик отвечает за выход ацетил-КоА из митохондрий в цитозоль в форме цитрата, что в дальнейшем ведет к синтезу жирных кислот, синтезу холестерина и ацетилированию гистонов [Dolce et al., 2014]. У животных этот переносчик задействован в цепи реакций, связанных с гликонеогенезом, секрецией инсулина, развитием воспаления и рака, а в клетках растений – с продукцией глицерата, ассимиляцией азота, созреванием фруктов [Dolce et al., 2014]. Необходимо отметить сторону медицинскую исследования последствий мутаций транспортеров Ключевые для дикарбоксилатных человека. потери Na⁺-зависимом функционирования мутации В дикарбоксилатном переносчике связывают с эпилептической энцефалопатией новорожденных [Lu, 2019]. Интересны биотехнологические изыскания по повышению промышленного продуцирования малата, фумарата и сукцината грибами Aspergillus. В подобранной среде сверхэкспрессия рода гена дикарбоксилатного транспортера и привнесенного гена frd, кодирующего

фумаратредуктазу *Trypanosoma brucei* существенно увеличивала продукцию дикарбоксилатных кислот и сдерживало накопление цитрата, обычно секретируемого грибком *Aspergillus carbonarius* [Yang et al., 2017]. Авторы предполагают существенный потенциал этого грибка в утилизации лигноцеллюлозной биомассы как субстрата для продуцирования C_4 -ДКБ [Yang et al., 2017].

микрооганизмов У транспортеры ДКБ иногда индуцируются собственно дикарбоксилатами [Karinou et al., 2017] и подавляются глюкозой в высокой концентрации [Côrte-Real et al., 1989]. Показано, что подвержен 2-оксоглутаратный глюкозной репрессии переносчик митохондрий S. cerevisiae, кодируемый геном ODC2 [Palmieri et al., 2001], и H⁺-зависимый дикарбоксилатный транспортер плазмалеммы *Candida* utilis [Cássio and Leão, 1993]. Последний индуцируется внешним малатом после концентрации понижения глюкозы смены дрожжами И ферментативного статуса на окислительный [Cássio and Leão, 1993]. Переносчик, обменивающий фумарат на малат, в митохондриях S. cerevisiae индуцируется в ходе выращивания клеток на этаноле или ацетате [Bojunga et al., 1998.], [Redruello et al., 1999]. При выращивании в присутствии низких концентраций глюкозы функционирует транспортер способный дикарбоксилатный митохондрий, не транспортировать фумарат [Kakhniashvili et al., 1997]. Многие бактерии мембраносвязанные сенсоры С4-ДКБ, содержат имеющие доменсвязывающий дикарбоксилат и домен, являющийся гистидинкиназой, С₄-ДКБ который контролирует синтез ферментов, связанных с метаболизмом, в частности DctA переносчик [Janausch et al., 2002]. В дальнейшем уточнили, что DctA-транспортер и DctB-сенсор нуждаются для взаимодействия в косенсоре DctS. Авторы предположили, что образование такого трехчастного комплекса необходимо для рецепции С₄-ДКБ в *Bacillus subtilis* [Graf et al., 2014].

Приведенные факты свидетельствуют о существенной роли транспорта С₄-ДКБ.

Переносчики С₄-ДКБ обнаружены BO всех видах энергопреобразующих мембран практически всех групп животных, растений, грибов и бактерий: у рыб [Campagno et al., 2018], земноводных [Oshiro and Pajor, 2005], птиц [Lim et al., 2012], млекопитающих [Dolce et al., 2014], [Oshiro and Pajor, 2006], [Brauburger et al., 2011], насекомых [Knauf et al., 2006], круглых червей [Fiermonte et al., 1998] [Strungaru et al., 2011], высших растений [Zhao et al., 2018], у дрожжей [Lodi et al., 2004; Saayman et al., 2000], разнообразные транспортеры C_4 -ДКБ обнаружены у бактерий [McClelland M., 2001; Fraseret al., 1998; Kaneko et al., 2002; Hall and Pajor, 2007; Karinou et al., 2017]. Охарактеризованы переносчики С₄-ДКБ в плазмалемме клеток некоторых специализированных органов, например, почек [Campagno, 2018] и мозга [Brauburger, 2011]. В мембранах органелл такие переносчики присутствуют обязательно. Так ряда охарактеризованы транспортеры C₄-ДКБ в мембранах митохондрий [Ма et al., 2007; Cappello et al., 2006; Spagnoletta et al., 2006; Zhao, 2018; Boczonadi, 2018], пероксисом [Visser W.F., 2006], хлоропластов [Zhao et al., 2018], тонопласта [Frei et al., 2018]. Увеличивающееся количество публикаций, посвященных транспорту С₄-ДКБ, свидетельствует о возрастании интереса к этим переносчикам.

За последние десять лет получены первичные структуры для большого числа митохондриальных и плазмалеммных транспортеров, а также переносчиков бактерий и изучен их кинетический механизм и транспорта. Однако отсутствуют обзоры, посвященные параметры сравнению всех видов транспортеров С₄-ДКБ в связи их структурной организацией, взаимосвязью субстратной специфичности и механизма особенностями структуры транслокации С транспортера. Анализ молекулярного механизма функционирования затруднен отсутствием рентгеноструктурных данных о третичной структуре. В частности, не установлены принципиальные для функции переносчиков особенности структуры их активного центра, включающего точки связывания ДКБ и канал, по которому осуществляется транслокация.

Представляет интерес поиск связей между особенностями первичной вторичной структуры, а также существенными аминокислотными остатками транспортеров С₄-ДКБ, описанных в последние годы, и механизмом транслокации субстрата, а также наиболее успешных современных подходов, которые способствуют решению этой задачи. Мы сконцентрировали внимание на транспортерах, для которых подтвержден перенос C₄-ДКБ с обоими ионизированными карбоксилами («дианион»). Так транспортеры моноанионной формы малата [Grobler et al., 1995] не описаны, но, в то же время, мы использовали информацию о некоторых переносчиках цитрата в монопротонированной форме. При этом мы традиционное цитратный (формально сохраняли название трикарбоксилатный) транспортер. Если в литературе использованы несколько названий для одного и того же переносчика, мы выбирали название, содержащее указание на механизм транспорта, например, αкетоглутарат/малатный антипортер хлоропластов шпината [Pos et al., 1998].

1.7.2. Первичная структура транспортеров ДКБ. Исследования транспортеров ДКБ митохондрий растений [Spagnoletta et al., 2006; Picault et al., 2002], животных [Fiermonte et al., 1998; Kaplan et al., 1995] и грибов [Ma et al., 2007; Palmieri et al., 2001; Palmieri et al., 1997; Pallotta et al., 1999] содержат 300 a. 0. Аминокислотная показали, что они около последовательность всех митохондриальных переносчиков состоит из трех примерно равных частей, в которых порядок а. о. в значительной мере «Повторяемость» повторяется. определяют по доле идентичных аминокислотных остатков в одинаковом положении последовательности (степень гомологии) или пытаются выявить непрерывные идентичные

области (мотивы). Консервативный участок последовательности Px(D/E)x(V/I/A/M)(K/R)x(R/K), начинающийся с пролина и содержащий два близко расположенных положительно заряженных остатка аргинина или лизина, повторяется 2-3 раза у всех митохондриальных переносчиков [Cappello et al., 2006; Fiermonte et al., 1998]. По-видимому, это является признаком митохондриального семейства транспортеров и не связано со специфичностью к конкретному субстрату. Присутствие отрицательно заряженных остатков вблизи N-конца также характерно для всех митохондриальных транспортеров [Kakhniashvili et al., 1997; Fiermonte et al., 1998; Kaplan et al., 1995; Kaplan et al., 1993; Runswick et al., 1990].

Степень идентичности митохондриального дикарбоксилатного транспортера печени крысы с аналогичными транспортерами мыши, С. elegans и S. cerevisiae составляет 96, 59 и 37%, соответственно [Fiermonte et al., 1998]. Первичная структура транспортера митохондрий человека гомологична структуре соответствующих переносчиков крысы, мыши, С. elegans и S. cerevisiae на 88, 89, 57 и 36% [Fiermonte et al., 1999]. Степень транспортера митохондрий S. гомологии цитратного cerevisiae И аналогичных переносчиков печени крысы и C. elegans составляет 37,7 и 36,7% [Kaplan et al., 1993]. Из этого следует, что сходство первичных последовательностей уменьшается У эволюционно отдаленных организмов.

L-малат в митохондрии эукариот переносят три транспортера: дикарбоксилатный, 2-оксоглутаратный и трикарбоксилатный. Степень гомологии дикарбоксилатного транспортера S. cerevisiae с транспортером 2-оксоглутарата (и малата) сердца быка, переносчиком ортофосфата печени крысы и разобщающего белка бурого жира (транспортирующим протон) составляет 25,1, 27 и 26,6% соответственно [Kaplan et al., 1995]. Степень гомологии оксоглутаратным между переносчиком И разобщающим белком бурого жира почти такая же, как между

оксоглутаратным и трикарбоксилатным переносчиками [Kaplan et al., 1995] и составляет 26,6% и 25,1%. Таким образом, по формальным признакам, способность переносить малат не приводит к повышенному сходству первичных структур переносчиков, транспортирующих С₄-ДКБ. Консервативный участок первичной последовательности («дикарбоксилатный мотив»), характерный только для переносчиков ДКБ, также не обнаружен.

Сопоставляя первичные структуры переносчиков, придают значение гомологии. Если сравнить первичные низким степеням последовательности ферментов некоторых И переносчиков двух филогенетически близких видов дрожжей Kluyveromyces lactis и S. cerevisiae, то степень гомологии по идентичным a. o. у ферментов значительно выше, чем у транспортеров. Так для Н⁺-АТФазы плазмалеммы (Pma1) она достигает 86%, флавопротеида сукцинатдегидрогеназы 1 – 85%, а для монокарбоксилатного переносчика плазмалеммы – 50,1% и цитрат/изоцитратного переносчика митохондрий – 31%. Примерно третья часть погруженной в мембрану доли молекулы этого митохондриального транспортера S. cerevisiae была исследована с помощью последовательных индивидуальных замен а. о. на остаток цистеина (сканирование с помощью цистеинового мутагенеза). Оказалось, что почти 50% таких точечных мутаций не меняют ни активность, ни величину $K_{\rm M}$ реконструированного в липосомы переносчика [Ma et al., 2007; Ma et al., 2004]. По-видимому, низкие уровни гомологии могут быть достаточными для сопоставления структур переносчиков.

В настоящее время установлена первичная структура более двухсот бактериальных транспортеров С₄-ДКБ. В отличие от митохондриальных транспортеров ДКБ размер большинства аналогичных бактериальных транспортеров значительно больше и составляет около 420 – 450 а. о., вне зависимости от механизма функционирования. Такой размер характерен

для симпортеров, транспортирующих С₄-ДКБ вместе с протоном или ионом натрия [Janausch et al., 2002], а также функционирующих по обменному [Six et al., 1994] или смешанному механизму [Bandell and Lolkema, 1999]. Среди наиболее изученного бактериального семейства транспортеров DctA присутствуют как Na⁺-, так и H⁺-зависимые симпортеры [Janausch et al., 2002]. Степень гомологии между Н⁺зависимыми дикарбоксилатными транспортерами, принадлежащими к группе DctA, варьирует от 95% (между транспортерами E. coli и Serovar typhimurium) до 60% (между транспортерами S. typhimurium и Rhizobium *legiminosarum*) [Baker et al., 1996]. Сравнение 18-ти Н⁺-зависимых дикарбоксилатных транспортеров группы DctA позволяет выделить две консервативных области (мотива): на участках 35 _ 54 a. 0. 291 (KPxGDxFxxLxKMxIxPxIF) 318 И a. 0. (VGLVxPTGYSFNLDGTxIYxFxAxxFxAQ) [Janausch et al., 2002]. Однако подобные мотивы отсутствуют у иных транспортеров С₄-ДКБ. У протонзависимых транспортеров С₄-ДКБ «дикарбоксилатный мотив» выделить не удается [Lolkema et al., 2005]. В целом у бактериальных транспортеров способность переносить дикарбоксилаты не приводит к повышенной степени гомологии [Lolkema et al., 2005].

Переносчики С₄-ДКБ плазмалеммы почти в два раза больше по размеру, чем транспортеры митохондрий [Pajor, 1995; Pajor, 1996]. Так, Na^+ -дикарбоксилатные симпортеры (далее NaDCT) высших эукариот содержат около 600 аминокислотных остатков, а H⁺-дикарбоксилатный симпортер дрожжей *K. lactis* – 528 [Lodi T., 2004]. Это различие в размерах характерно и для переносчиков иных метаболитов в плазмалемме, например, транспортеров аминокислот [Wipf et al., 2002]. Таким образом, «дикарбоксилатная» специфичность не влияет на средний размер молекулы переносчика, он остается типичным для конкретной мембраны: для плазматической – 500 – 600 а.о., митохондриальной – 300 а.о., бактериальной цитоплазматической – 400 – 420 а.о.

NaDCT плазмалеммы позвоночных объединяют в три группы в зависимости от величины сродства к переносимым субстратам: NaDCT3 – переносчики высокого сродства (К_м порядка микромолей), NaDCT1 – переносчики низкого сродства (К_м порядка миллимолей) и NaCT – цитратные переносчики, связывающие цитрат лучше С₄-ДКБ. Внутри каждой группы степень гомологии первичной структуры достигает 65 – 70%, например, для NaDCT3 таких отдаленных организмов как человек и шпорцевая лягушка [Oshiro and Pajor, 2005]. В то же время, первичная структура транспортеров – представителей разных групп: отличаются существенно. Так структура NaDCT3 рыбы Pseudopleuronectes americanus гомологична структуре транспортеров NaDCT1 почек крысы, кролика и человека соответственно на 43, 44 и 43% [Steffgen et al., 1999]. Величины того же порядка демонстрируют степени гомологии представителей трех переносчиков одного организма (мыши). Так групп первичная последовательность NaCT гомологична NaDCT1 на 50%, а NaDCT3 - на 44% [Inoue et al., 2004]. Более того, Na⁺-сульфатный симпортер почек крысы и Na⁺-дикарбоксилатный транспортер кролика содержат 65% сходных а. о., из которых 47% – идентичные [Pajor, 1996]. Поскольку представители всех трех групп переносят в основном одни и те же С₄-ДКБ, степень гомологии предопределяется не субстратной специфичностью. Отдельные участки аминокислотной последовательности этих транспортеров (482 – 568 и 71 – 157 в Na⁺- сульфатном симпортере) обнаруживают еще более высокую гомологию (соответственно 84 и 96%). Такая высокая степень гомологии позволила создать функционирующие белковые химеры дикарбоксилатного транспортера кролика и сульфатного транспортера Xenopus laevis [Pajor, 1996]. Необходимо отметить, что NaDCT1 степень гомологии И переносчика плазмалеммы, функционирующего по механизму электронейтрального обмена C_4 -ДКБ, составляет 34% [Knaufet al., 2006; Inoue et al., 2004].

Таким образом, способность переносить C₄-ДКБ для транспортеров из всех изученных типов мембран в различных группах организмов не коррелирует с характерными изменениями в молекулярном весе или первичной последовательности переносчиков. Первичные последовательности NaDCT1 транспортеров базолатеральной мембраны проксимальных канальцев почек крысы и кишечника крысы, обладают гомологией 79%. Причем различие приходится в основном на 27 а. о. в области 260 – 290 а. о. [Sekina et al., 1998]. Поскольку показано, что субстратная специфичность таких транспортеров связана с областью 420-615 а. о. [Kahn and Pajor, 1999], то область 260-290 а. о. остатков может отвечать за тканевую специфичность транспортера.

Существуют любопытные факты, свидетельствующие о сходстве транспортеров прокариот и эукариот. Имеет место сравнительно высокая гомология (35%) у Na-ДКТ симпортеров человека и *Stafillococcus aureus* [Hall and Pajor, 2007]. Причины такой близости между транспортерами прокариот и эукариот неясны. Интересно отметить, что первичная структура цитрат/сукцинатного антипортера *E. coli* CitT имеет 34% гомологии со структурой α -кетоглутарат/малатного антипортера хлоропластов шпината [Pos et al., 1998], в то время как ее сходство со структурой транспортеров C₄-ДКБ из семейств Dct и Dcu составляет менее 25% [Janausch et al., 2002].

По размерам дикарбоксилатные транспортеры хлоропластов ближе к бактериальным, а не митохондриальным переносчикам [Zhao et al, 2018], [Renne et al., 2003]. Единственный известный к настоящему времени дикарбоксилатный транспортер пероксисом (изоцитрат/оксоглутаратный антипортер) имеет размеры близкие к размерам митохондриальных переносчиков [Visser et al., 2006]. Оба молекулярно охарактеризованных к

настоящему времени переносчика C_4 -ДКБ тонопласта клеток растений имеют размер около 550 а. о. [Emmerlich et al., 2003; Kovermann et al., 2007]. Небольшое количество переносчиков с известной первичной структурой не позволяет выявить гомологичные участки и инвариантные а. о.

1.7.3. Вторичная структура транспортеров ДКБ. Особенности вторичной структуры транспортеров выявляются при построении гидропатического профиля на основе первичной структуры с помощью метода Кайт и Дулиттла [Kyte and Doolittle, 1982], основанного на установлении зависимости ОТ номера a. 0. среднего индекса липофильности а. о., соседствующих в первичной последовательности пределах окна (короткого участка белка В полипептидной цепи протяженностью 7 – 15 а. о.). Полученные этим способом гидропатические профили для цитратных переносчиков митохондрий из трех источников показали, что количество липофильных участков и их размеры сходны для всех трех переносчиков, хотя первичные структуры гомологичны менее, чем на 40% [Kaplan et al., 1993]. Принимается, что липофильные участки такого гидропатического профиля, протяженностью около 20 а. о., образуют α-спирализованные трансмембранные сегменты (далее ТМС) в молекуле интегрального мембранного белка. Промежуточные профиля, гидрофильные участки условно называемые «петлями», экспонированы в раствор. Существенным является то, что предсказанные гидропатическим профилям по элементы вторичной структуры переносчиков соответствуют рентгеноструктурным данным [Dahl et al., 2004; Pebay-Peyroula et al., 2003], только так называемые «петли» образуют компактные, но, как правило, не спирализованные структуры. Как отмечалось выше, аминокислотная последовательность митохондриальных транспортеров содержит три внутренних гомологичных между собой участка. Анализ гидропатических профилей (см. выше) указывает на

существование двух возможных трансмембранных α-спирализованных сегмента на каждом таком участке для трикарбоксилатного [Kaplan et al., 1993], оксоглутаратного [Runswick et al., 1990] и дикарбоксилатного [Kakhniashvili et al., 1997] транспортеров митохондрий. Гидропатические профили для переносчиков из разных организмов имеют сходную форму. Трансмембранные сегменты начинаются и заканчиваются в одной и той же области первичной последовательности. Относительно низкая липофильность IV ТМС характерна для трикарбоксилатных транспортеров различных организмов, находящихся на различных этапах эволюции [Kaplan et al., 1993]. Для цитрат-изоцитратного антипортера митохондрий S. cerevisiae [Kaplan et al., 2000] был применен еще один методический подход к определению вторичной структуры. Для III и IV ТМС транспортера было осуществлено сканирование с помощью цистеинового мутагенеза. Сохранившие активность двадцать мутантных по IV ТМС транспортеров обладали различной чувствительностью к гидрофильным SH – агентам, производным метантиосульфоната. Полученная по этим данным зависимость константы скорости инактивации транспорта от номера остатка на участке 174 – 194 имела период, соответствующий одному обороту α-спирали [Kaplan et al., 2000]. Для III ТМС были получены аналогичные результаты [Ma et al., 2006].

У транспортеров ДКБ митохондриального семейства, содержащих шесть трансмембранных сегментов, между липофильными I и II, III и IV, V и VI ТМС находятся три большие гидрофильные петли, обращенные в матрикс митохондрий [Kaplan et al., 1993; Fiermonte et al., 1998]. Они имеют более консервативную структуру, чем две внешние гидрофильные петли. Причем наибольшее количество консервативных а. о., как в липофильных, гидрофильных участках транспортера, находятся так И В вблизи поверхности мембраны. Аналогичную структуру демонстрируют митохондриальные переносчики животных [Kaplan et al., 1993] и высших

растений [Spagnoletta et al., 2006; Picault et al, 2002].

Все три транспортера хлоропластов *Arabidopsis thaliana*, способных транспортировать C₄-ДКБ по обменному механизму (дикарбоксилатный, оксалоацетатный и 2-оксоглутарат/малатный) содержат 12 ТМС [Taniguchi et al., 2002], что типично для большинства транспортеров этих мембран, хотя в этих органеллах обнаружены транспортеры и митохондриального типа, например, транспортер фолата [Bedhomme et al., 2005].

По данным гидропатического анализа NaDCT симпортеры плазматической мембраны эукариот содержат 12 ТМС [Lodi et al., 2004; Pajor et al., 2006]. Большая гидрофильная петля между III и IV ТМС, локализованная на наружной стороне мембраны, содержит участок Предполагается, гликозилирования. что гликозилирование петель способствует удержанию в мембране соседствующих с ними липофильных сегментов [Bai and Pajor, 1997]. Дополнительные данные по анализу доступности петель, экспонированных, соответственно, в цитоплазму и внеклеточную среду, получили для NaDC3 c помощью анализа доступности проникающих сульфогидрильных реагентов к мутантным цистеиновым а. о. в петлях. Уточненная модель вторичной структуры содержала 11 ТМС [Bai et al., 2007].

Как и в митохондриальных транспортерах, в Na⁺-дикарбоксилатных симпортерах плазматических мембран кишечника *X. laevis*, почек человека, крысы и кролика консервативные а. о. группируются вблизи примембранных участков гидрофильных петель и липофильных ТМС [Pajor, 1996]. Методами генной инженерии удалось создать гибридную мРНК из участков, кодирующих дикарбоксилатный и сульфатный транспортеры, имеющие существенную степень гомологии между собой. Затем она помещалась в ооциты шпорцевой лягушки, в плазмалемме которых отсутствовали оба эти переносчика. В результате – ооцит приобретал «гибридный» переносчик, способный транспортировать

сукцинат или сульфат. Выяснилось, что ответственный за связывание ДКБ вблизи С-конца (в последней участок находится четверти последовательности). Поскольку «дикарбоксилатный мотив» отсутствовал, специфичность предположили, что определяют авторы элементы вторичной структуры. С помощью химерных структур, включающих Na⁺-дикарбоксилатного фрагменты транспортера плазматической мембраны камбалы И сульфатного транспортера Х. laevis, было обнаружено, что связывание сукцината ответственны четыре за трансмембранных сегмента вблизи С-конца транспортера [Kahn and Pajor, 1999; Pajor et al., 1998]. Причем в одном из них (в VII TMC) находится консервативный домен (K/R)L(K/R), общий для транспортеров почек человека, крысы, кролика и X. laevis [Bai and Pajor, 1997]. Однако на сродство к сукцинату влияет каждый из четырех ТМС (VII, VIII, IX или XI). Так химера, содержащая 13 ТМС транспортера кролика и один из ТМС (VII, IX или X) транспортера человека имеет промежуточное сродство, в то время как величина $K_{\rm M}$ исходных транспортеров кролика и человека отличается друг от друга на порядок [Kahn and Pajor, 1999]. Одновременная мутация по двум отрицательно заряженным остаткам Asp373 и Glu475 в TMC VIII и IX транспортера кролика, участвующих в транспорте Na⁺, также влияет на сродство к сукцинату [Griffith and Pajor, 1999]. Таким образом, можно предположить, что активный центр «делокализован» между элементами вторичной структуры, составляющими почти половину всей молекулы переносчика. Однако не ясно, концентрируется ли область определения сродства в одной точке, или канал, формируемый липофильными сегментами, также определяет специфичность. Необходимо заметить, что на сродство к адипату влияют только 3 TMC NaDC1 из 4-х (VIII, IX и X) [Oshiro et al., 2006]. Недавно продемонстрировано, что модификация каждой из 5 a. o. (Lys84, Glu101, Trp103, His106, Leu111), находящихся в составе 3-й внешней петли влияет на сродство к дикарбоксилату. Таким, образом, частично, сродство связано с а. о., находящимися за пределами трансмембранной части канала [Weerachayaphorn and Pajor., 2007]. Интересно, что переносчики C_4 -ДКБ функционирующие плазмалеммы животных, ПО механизму обмена, также имеют 12 TMC, электронейтрального выявляемых гидропатическим анализом [Yokoyama et al., 2008]. Единственный известный к настоящему времени натрий-зависимый дикарбоксилатный симпортер тонопласта растений (AttDT) имеет 12-ти сегментный гидропатический профиль [Emmerlich et al., 2003], а узкоспецифичный, аллюминий-активируемый канал тонопласта Arabidopsis thaliana – 8 ТМС [Kovermann et al., 2007]. Причем аналогичный по функции малатный канал в плазмалемме A. thaliana тоже содержит 8 ТМС [Hoekenga et al., 2006].

профиль Гидропатический дикарбоксилатных транспортеров бактерий более консервативен, чем их первичная структура [Lolkema et al., 2005]. В области трехсотого а. о. семь ТМС N-конца отделены длинным гидрофильным регионом от пяти ТМС С-конца, причем аналогичная у переносчиков с структура сохраняется различным механизмом транспорта. Подобной структурой обладают антипортеры [Krom and Lolkema, 2003] протонные [Tynecka et al., 2001] и натриевые [Hall and переносчики, функционирующие Pajor, 2007] симпортеры и по смешанному механизму [Bandell et al., 1997]. Для одного из переносчиков – для citS 12-ти сегментная структура подтверждена с помощью проникающих и непроникающих через мембрану SH-агентов, которые И связываются с внутривнеклеточными остатками цистеина гидрофильных «петель» [Lolkema et al., 2005]. Этим независимым способом показано, что «петли» по разные стороны трансмембранного сегмента экспонированы в раствор по разные стороны мембраны. Повидимому, некоторые «петли» способны образовать структуру, более гидрофильную с одной стороны и более гидрофобную – с другой. Так,

«петля» между VIII и IX TMC цитратного транспортера (citS) Klebsiella pneumoniae по результатам сканирования с помощью цистеинового мутагенеза содержит доступные и недоступные для гидрофильных агентов а. о. Поскольку ряд а. о. на «петле» определяет сродство к субстрату и скорость транспорта, предполагают, что структура эта как-то взаимодействует с трансмембранным каналом, образованным гидрофобными трансмембранными сегментами [Sobczak and Lolkema, 2005]. Авторы даже делают осторожное предположение, что эта «петля» может играть роль «крышки», закрывающей и открывающей канал.

Таким образом, как правило, вторичная структура (количество трансмембранных сегментов) характеризуется наличием 6-ти ТМС для митохондриальной мембраны, и для плазмалеммы, хлоропласта, тонопласта и бактериальной мембраны – 11 - 12 ТМС. Подобная закономерность характерна и для переносчиков других субстратов, локализованных в этих типах мембран.

Третичная структура транспортеров ДКБ не изучена, хотя для транспортеров митохондрий дрожжей (2-оксоглутаратного [Cappello et al., 2006] и цитратизоцитратного [Ma et al., 2007]) предприняты попытки реконструировать опираясь предположение, что ee, на все митохондриальные транспортеры имеют третичную структуру, сходную с переносчиком (подробнее – в разделе аденилатным 1.8.). Имеются четвертичной структуре некоторых транспортеров. сведения 0 Гетеротример (dctQ), состоящий из трех белков, транспортирует сукцинат через мембрану Rhodobacter capsulatus. Один из этих белков имеет 12-ти сегментную структуру [Wyborn et al., 2001]. Показано, что некоторые транспортеры образуют гомодимер после солюбилизации в растворе детергента или реконструкции в липосомы. Такими свойствами обладает вышеупомянутый транспортер (citS) K. pneumoniae [Kastner et al., 2003]. транспортер митохондрий Оксоглутаратный млекопитающих также

существует в липосомах ввиде гомодимера [Bisaccia et al., 1996]. Для объяснения электронейтрального антипорта переносчиком, имеющим одну дикарбоксилата точку связывания мономер, предполагают на кооперативное взаимодействие субъединиц гомодимере. Авторы В субъединица допускают, что В то время как одна гомодимера транспортирует С₄-ДКБ в одну сторону, вторая переносит другой С₄-ДКБ в противоположную [De Palma et al.,2005].

1.7.4. Механизм транспорта и специфичность переносчиков. Транспорт С₄-ДКБ в различных мембранах может осуществляться с помощью нескольких механизмов: электронейтрального антипорта, протон-зависимого И натрий-зависимого электрогенного симпорта, электронейтрального симпорта и диффузии по градиенту концентрации. В то же время по характеру специфичности С₄-ДКБ транспортеры можно объединить в группы, имеющие широкую (6 - 12 переносимых субстратов) или узкую субстратную специфичность (2 – 3 субстрата). Кроме того, можно объединить переносчики в группы по способности связывать и транспортировать C_4 -ДКБ в малеатной [Spagnoletta et al., 2006; Picault et al., 2002], или фумаратной конформации [Kaufhold et al., 2011; Knauf et al., 2006; Saayman et al., 2000; Karinou et al., 2017; Pallotta et al., 1999; Renne et al., 2003; Inoue et al., 2004; Hafke et al., 2003; Yao and Pajor, 2000]. Описаны отдельные транспортеры, переносящие кроме С₄-ДКБ (L-малат, сукцинат, оксалоацетат, фумарат, малеат, оксоглутарат, дианионы цитрата, изоцитрата, cis-аконитата) [Knauf et al., 2006; Spagnoletta et al., 2006; Wada M., 2006; Inoue et al., 2002], кислые аминокислоты [Zhao et al, 2018; Renne et al., 2003; Atlante Gagliardi, 1998], а иногда также их N-ацетилы [Yodoya et al., 2006], в виде исключения неорганические дианионы (ортофосфат, сульфат, тиосульфат) [Palmieri et al., 2008)], изредка малонат [Indiveri et al., 1993], тартрат [Kim and Unden, 2007], глутарат [Oshiro et al., 2006] и адипат [Oshiro, Pajor, 2006]. Среди митохондриальных антипортеров широкой субстратной специфичностью обладают дикарбоксилатный переносчик млекопитающих (8 субстратов) [Indiveriet al., 1989] и высших растений (12 субстратов) [Palmieri et al., 2008]. Цитрат/изоцитратный [Ma et al.,2007] и фумарат/сукцинатный антипортеры [Palmieri et al.,1997] *S. cerevisiae*, а также малат/оксалоацетатный антипортер митохондрий пшеницы [Pastore et al., 2003] переносят только по 2 субстрата.

Малатный канал тонопласта листьев одного из видов коланхоэ с близкой эффективностью транспортирует малат ($K_{\rm M} - 2,5$ мМ) и фумарат, а дианион цитрата и малеата существенно хуже [Hafke et al., 2003]. Канал открывается под действием отрицательного потенциала (величина мВ), 43 «полуоткрытия» равна проводимость одиночного канала, измеренного с помощью электрофизиологической техники, составляет 3pS [Hafke et al., 2003]. Специфический неконкурентный ингибитор – нифлумовая кислота, описанная ранее, как ингибитор хлоридных каналов [Knauf and Nancy, 1984] и некоторых видов кальциевых каналов [Balderas et al., 2012]. Недавно охарактеризован, выделен и реконструирован в липосомы дикарбоксилатный транспортер из вакуолей A. thaliana [Frei et al., 2018]. Механизм транспорта – электронейтральный антипорт (малат обменивается на цитрат в дианионной форме), также транспортируются фумарат и сукцинат, но не α-кетоглутарат, сульфат и фосфат [Frei et al., 2018]. Нокдаун гена, кодирующего вышеописанный переносчик, ослабляет накопление малата и цитрата в листьях, но на способности к фотосинтезу не сказывается [Medeiros et al., 2017].

В цитоплазматической мембране бактерий описаны антипортеры, протонные и натриевые симпортеры преимущественно с широкой субстратной специфичностью [Lolkema et al., 2005]. В плазматической мембране животных – в основном, Na⁺-зависимые симпортеры [Pajor, 2006]. Они отличаются от аналогичных по механизму бактериальных симпортеров иным соотношением Na⁺/дикарбоксилат (3 – 4 [Pajor, 2006], а

не 2 [Hall and Pajor, 2007], как у бактерий), поэтому симпорт у эукариот – электрогенный. В то же время, в плазмалемме эпителия почечных канальцев обнаружены электронейтральные антипортеры, такие как rOat5 [Lim et al., 2012; Anzai et al., 2005], а также rOat8 [Yokoyama et al., 2008].

На плазмалемме дрожжей создается градиент H^+ , и для этой мембраны характерны протонные симпортеры, которые ингибируются протонофорами – веществами, разрушающими протонный градиент, например в плазмалемме. Такие переносчики описаны у дрожжей *K. lactis* [Lodi et al., 2004]. Все эти переносчики способны транспортировать, по крайней мере, 7 – 10 видов C₄-ДКБ.

В плазмалемме животных C₄-ДКБ транспортеры можно объединить в три группы по величине сродства к своим субстратам, причем степень гомологии первичных структур внутри каждой такой группы достаточно велика. NaDCT1, более чем NaDCT2 и NaCT переносчики, чувствителен к неконкурентному ингибитору N-(p-амилциннамоил)антраниловой кислоте [Pajor and Randolph, 2007]. Однако особенности вторичной структуры и механизм (симпорт с Na⁺), остаются одинаковыми во всех трех случаях [Pajor, 2006]. Корреляция между тем или иным набором транспортируемых субстратов и механизмом транспорта для 3-х групп хорошо изученных переносчиков: митохондриальных, плазмалеммных и бактериальных, не выявлена.

Величина сродства, как правило, связана с функцией транспортера. Так, большинство антипортеров митохондрий (в том числе и не дикарбоксилатные) имеют сродство к своим субстратам порядка 1 мМ [Шольц, 1994]. Такое же сродство к сукцинату имеют Na⁺-зависимые симпортеры C₄-ДКБ плазмалеммы животных в начальных отделах выделительной системы, в то же время, у переносчиков в дистальных отделах почечных канальцев, связанных с ресорбцией C₄-ДКБ из первичной мочи, сродство к сукцинату больше на два порядка [Pajor, 2006]. Величина $K_{\rm M}$ дикарбоксилатного транспортера плазмалеммы дрожжей, ответственного за снабжение источниками углерода, также составляет 0,03 – 0,12 мМ [Cássio and Leão,1993; Queiros et al.,1998].

Сочетание методов создания «химерных» Na⁺-симпортеров C₄-ДКБ, обладающих активностью, и исследование их субстратной специфичности, позволило уточнить представление об области канала транспортера, определяющей селективность. С этой целью были использованы гомологичные более, чем на 70% переносчики (NaDCT1) почек мыши и кролика. Оказалось, что если гибридный переносчик содержит только два ТМС (III и IV) мыши, то сродство к глутарату уменьшается в 3,5 раза по сравнению с немодифицированным транспортером кролика [Oshiro et al., 2006]. Любопытно, что в области VIII, IX и X ТМС переносчики отличаются только одним a. o. (у мыши Ala504, a у кролика Ser512). Точечная замена в переносчике мыши Ala504 на Ser приводит к избирательному увеличению сродства к сукцинату и адипату [Oshiro et al., 2006]. Существенное изменение сродства достигается даже при замене Ser512 на Tre [Weerachayaphorn and Pajor, 2008]. Для митохондриальных транспортеров показано, что их специфичность может зависеть от незначительных изменений в первичной структуре ТМС. Так, различия в структурах цитратных переносчиков митохондрий крысы и S. cerevisiae в области второго участка связывания невелики (Leu120/Val и Ser123/Ala и Arg181/Lys), но дрожжевой цитратный транспортер в отличие от транспортера крыс не способен переносить малат [Kaplan et al., 1995]. Таким образом, характер специфичности могут определять единичные а. о. в канале переносчика.

Для молекул переносчиков плазматической мембраны с известной трехмерной структурой показано, что липофильные сегменты, рассчитанные по гидропатическим профилям, не начинаются в одной плоскости и не перпендикулярны к плоскости мембраны [Dahl et al., 2004],

как обычно изображают на схемах вторичной структуры молекулы транспортера [Lodi et al., 2004] [Kaneko et al., 2002; Dahl et al., 2004]. Поэтому положение области, определяющей селективность относительно начала или конца канала невозможно предсказать в результате анализа положения инвариантных или существенных а. о. в первичной структуре, особенно, если отдельные принципиальные для сродства а. о. принадлежат к разным ТМС.

1.7.5. Реконструкция трехмерной структуры активного центра и механизм транслокации. Переносчики, катализирующие транспорт веществ через биологические мембраны, похожи на ферменты тем, что они образуют комплекс с молекулой субстрата в процессе каталитического цикла. Не только сама точка связывания субстрата, но и путь его через канал молекулы переносчика входит в состав активного центра. Для небольших митохондриальных транспортеров, в которых все шесть трансмембранных сегментов формируют канал, это означает, что активный центр занимает большую долю молекулы [Walters and Kaplan, 2004]. Энергопреобразующие мембраны, в которых находится большая часть известных переносчиков ДКБ, должны иметь достаточное сопротивление, чтобы удерживать потенциал порядка 150 – 200 мВ. Переносчики крупных гидрофильных молекул, в том числе, транспортеры С₄-ДКБ, избирательно транслоцирующие субстрат с четырьмя зарядами, не должны быть источниками утечек тока в энергопреобразующей мембране. Важным этапом для понимания того, как это происходит, является изучение природы а. о., выстилающих канал. Если третичная структура переносчика рентгеноструктурного не получена методом анализа С высоким разрешением (менее 0,15 нм), это непростая задача [Dahl et al., 2004].

Для хорошо исследованных транспортеров плазматической мембраны с известной третичной структурой [Dahl et al., 2004] показано, что они, по-видимому, имеют одну точку связывания субстрата («область,

определяющую селективность») на молекулу. Для митохондриальных транспортеров (цитратного [Xu et al., 2000] и оксоглутаратного [Stipani et al., 2001]) показано, что точечная замена инвариантных остатков аргинина, находящихся в глубине IV-ого ТМС, приводит к необратимой потере что Na⁺-глутаматный активности. Аналогичным методом показано, симпортер плазмалеммы нейронов содержит консервативный остаток Arg479, ответственный за специфичность к глутамату и аспартату в составе 8-го трансмембранного сегмента [Bendahan et al., 2000]. В VII-м ТМС вблизи С-конца Na⁺-дикарбоксилатного симпортера кролика [Pajor et al., 1998], [Kahn et al., 1999] находится консервативный Arg349, общий для транспортеров почек человека, крысы, кролика и X. laevis [Bai and Pajor, 1997]. Его замена на изолейцин приводит почти к полной потере активности (хотя неактивный белок присутствует в мембране). В то же время замена на остаток лизина практически не изменяет активность транспортера, но увеличивает в 6 раз его K_M по сукцинату [Pajor et al., 2000]. Для ряда бактериальных пермеаз и переносчиков в плазматической мембране дрожжей, которые переносят сукцинат и малат, было показано существование остатков аргинина внутри трансмембранных липофильных α-спиральных сегментов. Для многочисленных С₄-ДКБ транспортеров (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) бактерий анализ последовательностей ТМС показал, что в центре хотя бы одного ТМС содержится хотя бы один остаток аргинина. Так, например, транспортер Dcu C Serovar typhimurium имеет остаток Arg74 в III-ем ТМС и остаток Arg209 в VI-ом TMC [McClelland et al., 2001], переносчик dct M Treponema pallidum – остаток Arg143 в IV-ом ТМС [Fraser et al., 1998], транспортер dct Р Bradyrhizobium japonicum – остаток Arg258 в VI-ом ТМС [Kaneko et al., 2002]. С₄-ДКБ переносчик дрожжей K. lactis имеет остаток Arg127 во II-ом ТМС и остаток Arg17 – в IV-ом [Lodi et al., 2004]. Наличие одного – двух остатков аргинина в трансмембранной части молекулы переносчика дает основания предполагать, что большинство таких транспортеров имеют единственную точку связывания отрицательно заряженного субстрата.

цитратного переносчика митохондрий дрожжей изучили Для функцию большинства а. о., экспонированных в канал. Сканирование поверхности III-го и IV-го ТМС с помощью точечного цистеинового мутагенеза и изучение доступности а. о., замененных на цистеин для связывания с гидрофильными SH-агентами в присутствии и в отсутствие субстрата, позволило идентифицировать остатки, связанные с путем транслокации цитрата [Kaplan et al., 2000], [Ma et al., 2006]. Эти остатки были отмечены на модели цитратного транспортера. Она была создана на базе трехмерной структуры аденилатного переносчика путем наложения на структуры трансмембранных нее первичной сегментов цитратного переносчика [Walters and Kaplan, 2004]. Для 30-ти белков с цистеиновой заменой, способных осуществлять транспорт, определили $K_{\rm M}$ и $V_{\rm max}$ [Ma et al., 2007]. В рамках модели в 0,1 нм от начала транспортного пути (от поверхности, экспонированной в цитоплазму) группируются остатки, замена которых повышает $K_{\rm M}$. Это остатки Arg189 IV-го TMC, Arg87 II-го ТМС (согласно модели они образуют солевые мостики с ионизированными дикарбоксилатами) и Lys83 III-го ТМС. Эту группу назвали первым субстрат-связывающим центром. В 0,2 нм от начала транспортного пути такой связывающий центр образуют остатки Lys37 I-го TMC, Arg181 IV-го TMC, Lys239 V-го TMC, Arg276 и Arg279 VI-го TMC. Девять из десяти а. о., замещение которых ухудшает сродство, оказались эволюционно консервативными. Поскольку длина молекулы цитрата – 0,9 нм, авторы существование двух неперекрывающихся предположили центров связывания на пути транслокации субстрата. Кроме того, суммарная протяженность обоих областей связывания покрывает большую часть длины канала.

Помимо этих положительно заряженных остатков в радиусе 0,45 нм

от каждого из этих центров оказались гидрофобные, незаряженные и полярные отрицательно заряженные остатки, которые, не меняя существенно $K_{\rm M}$, радикально уменьшали $V_{\rm max}$. Для первого центра связывания это – остатки Leu116, Gly119, Leu120, Ser123, Gln182, Asn185, Gln186, для второго – Glu34, Glu131, Lys134, Val229, Met233, Glu236. С помощью SH-агентов с положительным зарядом восстанавливали прежний заряд для остатков цистеина, заменявших остатки аргинина и лизина (Lys83, Arg87, Arg181, Arg189, Arg276, Arg279). При этом К_М восстанавливалась до величины, характерной для «нативного» транспортера или даже уменьшалась, а V_{max} сохранялась пониженной. Такая «прецизионность» положительных зарядов, участвующих В ДКБ, связывании свидетельствовать 0 конформационной может «жесткости» канала или о «машиноподобном» механизме транслокации, при котором удлинение любого «шарнира» недопустимо. Консервативные Arg181, Lys239, Arg276, остатки Lys37, Arg279 имеются В митохондриальных переносчиках кето- и аминокислот [Robinson and Kunji, 2006], а остатки Lys83, Arg87, Gly119, Arg189 оказались уникальными. Интересно, что мутации по остаткам Asp140, Tir148 улучшили сродство субстрата к транспортеру в 6 – 7 раз [Ma et al., 2007].

Подобный подход был применен и к 2-оксоглутаратному переносчику митохондрий [Stipani et al., 2001]. Были получены молекулы, модифицированные по одному ИЗ 20-ти существенных для функционирования а. о. Однако измерение только начальных скоростей переносчиков не позволило авторам отличить влияние точечной мутации на сродство от влияния на активность [Stipani et al., 2001]. Тем не менее, опираясь на измерение расстояний от молекулы малата до существенных остатков Arg90, Arg190 и Arg288 в трехмерной модели, и близких к ним в соответствии трехмерной реконструкцией остатков Ala35, Gln40, Gly130, Gly133, Ala134, Gly230, Ser237 сделан вывод об одной точке связывания субстрата в канале транспортера [Stipani et al., 2001]. Причем, авторы продемонстрировали, что не только замена этих остатков на цистеины, но и замена на некоторые другие алифатические остатки также радикально ухудшает активность модифицированного транспортера. При исследовании цитратного переносчика была показана неизменность спектров кругового дихроизма (КД) [Cascio et al., 2004], а для 2-оксоглутаратного - неизменность ЯМР спектров [Castiglione-Morelli et al., 2005] транспортеров после точечной мутации. Это свидетельствует об отсутствии существенных изменений в структуре модифицированной молекулы по сравнению с интактным переносчиком.

Количество точек связывания в электронейтральных антипортерах существенно для понимания молекулярной природы кинетического механизма транслокации. Если количество точек связывания две на молекулу, можно предположить электронейтральный обмен внешнего и внутреннего С₄-ДКБ на уровне одной молекулы переносчика. Если точка связывания одна, предполагают, что электронейтральность транспорта достигается сочетанием 2-х последовательных унипортов из внешней среды в матрикс митохондрий и обратно. Постулируют, что после субстрата переноса внешнего В матрикс митохондрий молекула переносчика не способна открыться наружу, пока не свяжет внутренний субстрат [De Palma et al., 2005].

Для объяснения противоречивых данных о различном числе точек связывания субстрата В молекулах близких по структуре С₄-ДКБ предполагать переносчиков разный ДЛЯ них можно механизм транслокации. Кроме того, можно использовать независимый метод характеристики внутренней поверхности канала и количества точек связывания в нем. Разработка такого подхода была осуществлена и на дикарбоксилатном переносчике печени крысы в работах Шольца и сотрудников [Sholtz et al., 1993] по исследованию интактного транспортера

набора конкурентных ингибиторов. Было помощью сделано С точка гидрофильного субстрата предположение, что связывания (сукцината) экспонирована в канал дикарбоксилатного переносчика, так же, как это было продемонстрировано для двух других митохондриальных переносчиков ДКБ – цитратного [Ma et al., 2007] и 2-оксоглутаратного [Cappello et al., 2006]. В этом случае связывание с дикарбоксилатным переносчиком конкурентных ингибиторов характеризовало поверхность канала вблизи точки связывания субстрата. Подтверждающие друг друга результаты были получены с использованием производных обоих субстратов переносчика – малоната (2-моноалкилмалонаты) и L-малата (Оацил-L-малаты). Изменение констант ингибирования этих соединений (ΔK_i $= K_{i(n)} - K_{i(n-1)}$) при удлинении на одно метиленовое звено характеризовало липофильности В районе связывания степень активным центром переносчика конечной метильной группы ингибитора, где «n» - число атомов углерода в алифатической цепи [Sholtz et al., 1993]. Таким образом, шаг за шагом удаляясь от точки связывания с ингибитор – «молекулярный зонд» было предложено измерять степень липофильности стенок канала [Sholtz et al., 1993]. Независимым свидетельством преимущественно липофильного характера канала транспортера служат данные ПО способности ДКТ транспортировать жирные кислоты в анионной форме [Самарцев, 2000]. Кроме того, ингибирование этого транспортера высшими ацилами-КоА имело конкурентный характер [Ventura et al., 2005], причем логарифм констанаты ингибирования уменьшался пропорционально длине молекулы [Morel et al., 1974]. В обеих последних работах транспорт измеряли прямым радиоизотопным методом.

Наиболее продуктивные методические подходы были применены к различным объектам, и трудно заключить, подтверждают или противоречат друг другу полученные результаты. На Na⁺-симпортерах плазмалеммы животных методом «белковых химер» было продемонстрировано, крупные формирующие что домены, канал небольшое переносчика. ответственны за сравнительно изменение специфичности [Oshiro et al., 2006]. Этот результат не исключает того, что за специфичность ответственна структура всего пути транслокации субстрата, а не локальная точка связывания. Влияние точечных замен ключевых а. о., выстилающих канал переносчика, на транспорт было систематически изучено 2-x небольших митохондриальных для cerevisiae: цитратного [Ma 2007] S. et al., И 2переносчиков оксоглутаратного [Cappello et al., 2006; Stipani et al., 2001]. Результаты этих исследований дали противоположные ответы на вопрос: локальна или делокализована вдоль канала область определения специфичности в канале транспортера (см. раздел 3.10.). Однако именно эти переносчики имеют узкую субстратную специфичность, что не позволяет исследовать участки транслокацию активного центра, ответственные за связывание И нескольких отличающихся субстратов. Более того, именно эти дрожжевые С₄-ДКБ транспортеры имеют низкую степень гомологии с переносчиками из других объектов. Это не позволяет применить к ним эффективный метод, связанный с созданием белковых химер (см. раздел 1.7.). Степень липофильности стенок канала (зависимость K_i ингибитора от длины алифатического заместителя) было предложено измерять для дикарбоксилатного транспортера митохондрий печени крысы [Sholtz et al., 1993], обладающего самой широкой субстратной специфичностью (8 субстратов) среди митохондриальных переносчиков животных [Indiveri et al., 1993; Indiveri et al., 1989]. Желательно было бы применить все подходы к одному переносчику. Идеальный объект должен обладать широкой субстратной специфичностью, иметь небольшой размер, причем В нескольких видах организмов для него должны быть определены первичные структуры, имеющие высокую степень гомологии. Такими свойствами обладает ДКТ митохондрий печени крысы. Другим подходящим объектом для комплексных исследований может оказаться дикарбоксилат/трикарбоксилатный переносчик митохондрий высших растений, описанный для нескольких объектов [Spagnoletta et al., 2006; Picault et al., 2002]. Этот сравнительно небольшой переносчик способен транспортировать 2-оксоглутарат, малат, сукцинат, малеат, малонат, цитрат, транс-аконитат, изоцитрат [Spagnoletta et al., 2006], а переносчик *A. thaliana* еще и оксалоацетат, фосфат, сульфат и тиосульфат [Palmieri et al., 2008].

Поскольку количество ТМС в молекуле переносчика или характер специфичности не предопределяют механизм транспорта (антипорт, симпорт с протоном или симпорт с катионом), то в случае исследования описанными выше методами одного переносчика могут быть выявлены общие черты в механизме транслокации субстрата для всех переносчиков С₄-ДКБ.

Представлений о конкретных путях транслокации дикарбоксилата внутри канала переносчика, опирающихся на экспериментальный Множественные дисульфидные материал, немного. связи между внутренними поверхностями трансмембранных сегментов бактериального Na⁺-зависимого дикарбоксилатного транспортера vcINDY V. cholerae блокируют транспорт, в отличие от таких связей между двумя доменами, транспортирующими, соответственно, катион и анион [Mulligan et al., 2016]. Авторы предполагают «элеваторный» механизм транслокации, при субстрат-связывающий трансмембранную котором центр имеет мобильность [Mulligan et al., 2016].

1.7.6. Предполагаемая третичная структура дикарбоксилатных **транспортеров**. Единственная к настоящему времени 3D структура C₄-ДКБ транспортера получена для бактериального Na⁺-зависимого дикарбоксилатного транспортера vcINDY из *V. cholerae* с разрешением 3.2 Å [Mancusso et al., 2012]. На Рис. 1.15*a*. видно, что переносчик имеет
специфичность по Na⁺, Li⁺, но не K⁺. На Рис. 1.156. – что транспорт сукцината ингибируется сукцинатом, малатом и фумаратом, но не цитратом, глутаматом или сульфатом, т.е. vcINDY – высокоспецифичный переносчик C₄-ДКБ. На Рис. 1.15*в,г.* видно, что катион и дикарбоксилат связываются с каждым мономером, причем участок связывания Na⁺ погружен вглубь транспортера, а цитрат (присутствие этих катиона и аниона необходимо для кристаллизации) экспонирован в цитозоль.



Рис. 1.15. Функциональная характеристика и структурные особенности Na⁺зависимого дикарбоксилатного транспортера vcINDY из V. cholerae. a - Na⁺зависимый вход 5 мкM [¹⁴C]сукцината в присутствии одного из одновалентных катионов - Na⁺, Li⁺ или K⁺ в клетки E. coli, трансформированные встроенным vcINDY. δ – Вход [¹⁴C]сукцината в присутствии различных ди- и три- карбокасилатов (в концентрации 1мМ). в и c – 2 проекции (в мембране и со стороны цитозоля) кристаллической структуры vcINDY димера с разрешением 3.2 Å. По данным [Mancusso et al., 2012].

Такое разрешение позволяет выделить как структуру участков связывания субстратов, так и соположение трансмембранных сегментов и

петель [Mancusso et al., 2012]. Видно, что участок связывания катиона отделен от участка связывания аниона – цитрата. Авторы показывают, что катион Na⁺ связывается координационными связями с Ser146, Ser150, Asn151 домена, называемого спирализованной шпилькой (helical hairpin, HPin), обращенного в цитоплазматическую сторону, и Gly199 в петле L5ab. Если Ser146 мутирует в аланин или лейцин, то транспортная активность радикально уменьшается [Mancusso et al., 2012]. 5-я Карбоксильная группа цитрата связана с Ser150, Asn151 и Thr152 в HPin, в то время как 1-я карбоксильная группа непосредственно взаимодействует с Ser377, Asn378 и T379 в спирализованной шпильки HPout на противоположной стороне мембраны, обращенной в периплазму и связанной с 9-м ТС посредством спирали H9c. При замене Asn151 или Asn378 на аланин, сродство vcINDY к сукцинату и скорость транспорта радикально уменьшаются [Mancusso et al., 2012]. Спекуляции авторов о механизме транслокации дикарбоксилата внутри транспортера не очень убедительны, так как мало опираются на полученные ими результаты кристаллографии.

В работе [Rosa et al., 2019] на основе сравнения первичных структур показано, что белок сенсор MatC (RPA3494) Rhodopseudomonas palustris близок к транспортерам, переносящим трикарбоксилаты, но, по мнению авторов, утратил свою транспортную функцию. Поскольку для этого белка авторами получена 3D структура с разрешением 2,1 Å [Rosa et al., 2019], особенности высокоаффинного связывания малата в активном центре, субстратной можно рассматривать как модель для объяснения специфичности дикарбоксилатных Триптофановая переносчиков. флуоресцентная спектроскопия показала, что белок сенсор связывает L- и D-малат с величиной K_d, равной 27 и 21 нМ, соответственно, а сукцинат и фумарат с величиной K_d , равной 110 и 400 нМ, соответственно [Rosa et al., 2019]. Ключевую роль авторы отводят участию в связывании малата 2-х молекул воды, которые образуют мостик из водородных связей между карбоксильными группами субстрата и двумя петлями белка, содержащими консервативные (при сравнении первичных структур) а. о. [Rosa et al., 2019].



D-malate bound to MatC. $K_d = 21 \pm 2 \text{ nM}$

Рис. 1.16. Модель участка связывания субстрата в MatBAC, разрешение 2,1 Å, штриховые синие линии – водородные связи, адаптировано из [Rosa et al., 2019].

На Рис. 1.16. видно, что заместитель у 2-го атома в молекуле малата имеет дополнительные связи, что повидимому, обеспечивает более высокое сродство по сравнению с сукцинатаом. Мезаконат, в структуре которого имеется метильная группа, в этой позиции не показывал связывания в экспериментах по определению величины K_d флуоресцентными методами [Rosa et al., 2019]. Необходимо заметить, что сравнивать с сукцинатом и малатом было бы корректнее итаконовую кислоту, отличающуюся от них только заместителем.

1.8. Трехмерные структуры трансмембранных транспортеров

получения Возможность рентгеноструктурных моделей транспортеров гидрофильных субстратов трансмембранных С высоким разрешением. Аквапорин. В настоящее время известно более рентгеновских структур переносчиков гидрофильных пятидесяти субстратов [Dahl et al., 2004]. Ни одна из них не имеет достаточного Å). (1.2)разрешения чтобы установить точные координаты аминокислотных остатков, выстилающих канал транспортера, и поэтому при построении модели авторы часто поворачивают элементы вторичной с априорными структуры, В соответствии представлениями 0 гидрофобности гидрофильности) канала [Dahl et al., 2004]. (или Необходимо заметить, что кристаллические структуры транспортеров с таким разрешением не получены до сих пор [результаты поиска в PubMed]. По-видимому, гидрофильные области молекулы, экспонированные в по обе стороны гидрофобного трансмембранного участка, раствор, мешают качественной кристаллизации (количество полностью мембранных растворимых белков, полученных ИЛИ С высоким разрешением, существенно). Исключение составляет аквапорин, N- и Cконцы которого не участвуют в кристаллообразовании, и их конформация не влияет на упаковку в кристалле [Fischer et al., 2009]. 3D структура дрожжевого аквапорина, Aqy1, из Pichia pastoris получена с разрешением 1,15 Å [Fischer et al., 2009] (Рис. 1.17.). Тетрамер в кристалле состоит из 4-х независимых водных каналов, а каждый мономер образован 6-ю трансмембранными спиралями, формирующими конструкцию, похожую на песочные часы (Рис. 1.18а.). На увеличенном участке показаны гидрофобные а. о. канала. Кроме того, вблизи характерного для аквапоринов мотива Asp – Pro – Ala в центре канала, образованного петлями В и Е, для транспортируемой молекулы воды, также содержатся гидрофобные а. о. (Рис. 1.18.). Сужение водной поры на внеклеточной стороне вблизи ароматической/аргининовой конструкции (Рис. 1.18а.), повидимому, служит селективным фильтром, а гидроксильная группа Tyr31 в сочетании с карбонильными группами Gly108 и Gly109 – запором, образующим сужение размером около 0,8 Å (Рис. 18*в.*).

Таким образом, за исключением 2-х а. о. канал выстлан гидрофобными аминокислотами. Сходный вывод можно сделать и для унипортера ацетата SatP_Ck, полученного с разрешением 1,8 Å (подробнее, см. ниже) [Qiu et al., 2018].



Рис. 1.17. 3D – структура Aqy1 с разрешением 1,15 Å. *а* – «Ленточная» презентация демонстрирует канал в профиль: две полуспирали петель, которые содержат аквапориновый мотив (выделены оранжевым цветом), *б* – Отдельные (овальные) молекулы воды в канале показаны красным цветом. Атомы углерода – желтые, азота – голубые, кислорода – красные шарики. По данным [Fischer et al., 2009].

Две гипотезы и две модели транслокации субстратов. Для транспортеров заряженных (и гидрофильных) субстратов на основе кристаллографических и некоторых иных подходов сформулировано два основных представления о транслокации. В соответствии с первой крупное конформационное изменение молекулы гипотезой, бензилтранспортера Mhp1 Microbacterium liquefaciens, гидантоин ИЗ сопровождается сменой обводненной воронки с субстрат связывающим центром на дне, открытой наружу, на открытую во внутрь. Вопрос о пути продвижения субстрата сквозь молекулу транспортера при этом вообще не

рассматривается [Weyand et al., 2008]. Эту модель авторы предлагают и для транспортера лейцина, LeuT, и переносчика галактозы, vSGLT.



Рис. 1.18. Аqy1, закрытый на цитоплазматической стороне структурами N-конца. a – представлена полость по которой проходят молекулы воды (красные), на врезке указано место сужения канала вблизи Туг31. δ – показаны стерические препятствия для молекулы воды вблизи Туг31. e – показан пакет из тетрамеров вблизи N-концов в 2-х проекциях. По данным [Fischer et al., 2009].

В второй предполагается рамках гипотезы существование протяженного трансмолекулярного «проводящего пути», включающего обводненную воронку, втягивающую канал за ион В счет электоростатических взаимодействий, трансмембранных диполи на спиральных элементах, обеспечивающих узнавание иона и гидрофобный проход, приводящих ион в движение сквозь канал [Doyle, 2004a; Doyle, 2004b]. Автор применяет эту модель к ряду транспортеров катиона калия, обращая внимание на относительно протяженную гидрофобную зону канала. Первая модель была использована, в частности, для объяснения особенностей кристаллической структуры и механизма АТФ-зависимых кассетных транспортеров [Locher, 2009]. На Рис. 1.19. показана визуализированная в кристаллическом состоянии структура молибдат/тунгстат транспортера ModBC из *Archaeoglobus fulgidus*, открытая с внутренней стороны мембраны. В то же время структура, открытая в другую сторону, показана на примере транспортера мальтозы, MalFGK-E комплекса (данные не приведены) [Locher, 2009].



Рис. 1.19. Структура, топология и механизм ABC импортеров 1-го типа. А – ModBC в «ленточной» презентации. Б – топология отдельной ModB субъединицы с пронумерованными трансмембранными сегментами и обозначением критически важного участка. В – схема транспорта молибдата. По данным [Locher, 2009].

Подход означал особое внимание к месту и структуре субстратсвязывающего центра и был применен также к структуре с разрешением 2,4 Å концентрационного транспортера нуклеозидов из *V. cholerae* [Johnson et al., 2012], с разрешением 3,5 Å лактозной пермиазы *E. coli* [Jiang et al., 2016], с разрешением 2,3 Å для Na⁺-независимого карнитин/бутиробетаин антипортера, CaiT, *Proteus mirabilis* [Schulze et al., 2010], с разрешением 3,1 Å глутамат/ γ – аминобутират антипортера, GadC, *E. coli* [Ma D. et al, 2012], с разрешением 2,8 Å – урацил/H⁺- симпортера, UraA, *E. coli* [Lu et al., 2011] и многие другие. Из приведенных данных видно, что модель применяли к транспортерам с разным механизмом действия и различной величиной субстрата.

Вторая модель использована для объяснения кристаллической структуры транспортера дивалентных катионов, CorA, *Thermotoga maritima* с высоким разрешением (2,9 Å). На Рис. 1.20. авторы обращают внимание на гидрофильный вход в канал, содержащий Ser284, Thr287 и Thr305, гидрофобный пояс канала переносчика, содержащий Met291, Leu294, and Met302, и заряженный выход с Asp277 [Eshaghi et al., 2006].

Путь субстрата внутри транспортера содержит 4 участка связывания ацетата, разделенные 3-мя гидрофобными областями (Рис. 1.21*в*.), а предполагаемый способ перекрывания канала – «шибер поворотный (вьюшка)» из ароматического кольца Phe17 (Pис. 1.22.) [Qiu et al., 2018]. На Рис. 1.21*в,г.* показана гидрофобная область, сформированная Phe17, Tyr72 и Leu131 с диаметром 2,0 Å и протяженностью 15 – 20 Å.

В работе [Payandeh et al., 2011] сформулирована модель общая для значительного количества транспортеров шелочных катионов и некоторых небольших анионов. 3D структура электрически управляемого Na⁺-канала из *Arcobacter butzleri*, NavAb, в закрытой конформации получена с разрешением 2,7 Å [Payandeh et al., 2011].

На модели выделяют внеклеточную воронку (вход в канал), селективный фильтр, центральную полость канала и активируемые ворота (выход внутрь клетки) (Рис. 1.23*г*.). Селективный фильтр NavAb короткий (4,6 Å), гидрофильный, содержащий 4 кислых остатка Glu, непосредственно участвующих в дегидратации Na⁺, а стороны внутренней части поры, отвечающие за «изгнание катиона» выстланы гидрофобными а. о., в том числе центральная полость [Payandeh et al., 2011].

Аналогичная гидрофобная зона канала показана для двупорового канала, TPC1, из *A. thaliana*, где центральная полость содержит Leu301, Val668, Tyr305 и Leu672 [Kintzer and Stroud, 2016].



Рис. 1.20. Заряженный периплазматический вход в CorA пору. *a* – Карбонилы а. о. Gly309, Tyr311 и Gly312, по-видимому, отвечающие за гидратацию субстрата. *б* - Met291, Leu294 и Met302, формирующие гидрофобный пояс, кольцо из Asp277. По данным [Eshaghi et al., 2006].

Нитрат/нитритный антипортер *E. coli* содержит в окаймляющих центральную полость трансмембранных спиралях (TM5 и TM11) обогащенные глицином последовательности (соответственно, Gly164-Gly165-Ala166-Leu167-Gly168-Leu169-Asn170-Gly171-Gly172-Leu173-Gly174-Asn175 и Gly408-Phe409-Ile410-Ser411-Ala412-Ile413-Gly414-Gly415-Phe416-Phe417) [Zheng et al., 2013]. На структурной модели эпителиального кальциевого канала TRPV6 крыс, полученного с разрешением 3,25 Å авторы показывают «подобную К⁺-каналам» гидрофильную воронку, обращенную наружу, селективный фильтр из остатков Asp и гидрофобную центральную полость после нее [Saotome et al., 2016].



120 048 2.8. 2.0. 2.0. 0,50

б

Рис. 1.21. Особенности структуры мономера SatP_Ck и ацетатный путь. a – TMC5 и TMC6 окаймляют путь стороной, содержащей заряженные, полярные и ароматические а. о. Атомы углерода связанных молекул ацетата изображены темно синим, а кислорода – красным цветом; δ – Gln50 может сформировать водородную связь с Gly46, а последовательность от Gly42 до Ala49 имеет перелом в области Gly46; e – ацетатный путь показан облаком розовых точек, три гидрофобные области образованы гидрофобными а. о. в их составе; e – показаны а. о. ацетат-связывающих участков. По данным [Qiu et al., 2018].



Рис. 1.22. Схема последовательных стадий унипорта ацетата. a – канал в закрытом состоянии: участок 3 связан с частично дегидратированным ацетататом; δ – канал в закрытом состоянии: участок 1 связывает частично дегидратированный ацетат, а 3 – дегидратированный ацетат; ϵ – канал в закрытом состоянии: участок 1 связывает частично дегидратированный ацетат, а 2 и 3 – дегидратированный ацетат. Отталкивание между остатками ацетатов на участках 1 и 2, и между 2 и ароматическим кольцом Phe17 инициирует конформационные изменения в Phe17 и в близлежащих а. о.; ϵ – канал в открытом состоянии: сродство ацетата к участку 3 ослабевает в результате вышеописанного конформационного изменения в Phe17 и в близлежащих а. о.; ∂ – канал в открытом состоянии: ацетат поступает с участка 2 на 3, затем на 4. По данным [Qiu et al., 2018].

На модели 3D структуры пентамерного кальций-активируемого хлоридного канала цыпленка (CaCC), полученного с разрешением 2,85 Å, авторы демонстрируют обводненную гидрофильную воронку, обращенную во внеклеточное пространство. После нее – гидрофобную зону канала, содержащую а. о. Ile 76, Phe 80 и Phe 84 каждой из 5-ти S2b спиралей, окаймляющих канал, а затем ближе к внутриклеточному пространству – гидрофильную полость [Kane Dicksonet al., 2014].



Рис. 1.23. 3D структура электрически управляемого Na⁺-канала A. butzleri. a – окаймляющие пору S6 спирали NavAb (желтые) и закрытых конформаций калиевых и натрий/калиевых каналов (MlotiK (3BEH), KcsA (1K4C) и NaK (2AHY), соответственно. Красный круг – обобщенный радиус закрытых активирующих ворот; δ – сравнение положения S6 спиралей закрытого NavAb и открытого KV1.2/2.1 (2R9R) канала; e – взаимодействие S6 спиралей с S4-S5 линкерами (NavAb, вверху; KV1.2/2.1, внизу); z – архитектура NavAb поры; ∂ – электростатический потенциал (красный). Внутренний объем поры – серый. По данным [Рауаndeh et al., 2011].

Таким образом, переносчики второй И каналы co моделью функционирования, переносящие довольно разнообразные ионы (щелочные и щелочноземельные металлы, хлорид, нитрат) всегда содержат после участка связывания субстрата (селективного фильтра) протяженную гидрофобную полость, а перед ним гидрофильную воронку. Это позволяет использовать упрощенную модель, предложенную для калиевого канала Streptomyces lividans Дойлом и соавторами в 1998 г. (Рис.1.24.) [Doyle et al., 1998].

Аденилатный переносчик – структурная модель всех митохондриальных переносчиков с 6-ю трансмембранными сегментами. Современный взгляд, основанный на рентгеноструктурном анализе аденилатного переносчика дрожжей, состоит в том, что любой митохондриальный переносчик, состоящий из 6-ти трансмембранных сегментов (подробнее – в разделе 1.3.) функционирует как мономер с единственным субстрат-связывающим центром, контролируемым 2-мя фланкирующими солевыми мостиками; и этого достаточно для объяснения и унипорта, и сторогого антипорта [Kunji et al., 2010]. Структура переносчика митохондрий быка вышеописанного в комплексе с карбоксиаттрактилазидом была получена с разрешением 2,2 Å (Рис. 1.25.) [Pebay-Peyroula] al., 2003] и все et модели митохондриальных транспортеров основаны на ней [Walters and Kaplan, 2004].



Рис.1.24. Модель калиевого канала *S. lividans*, полученная на основе рентгеноструктурного анализа данных с разрешением 3,2 Å. В крупной обводненной полости катион (зеленые шарики) стабилизируется и ориентируется за счет частично отрицательных зарядов карбоксилов (красный цвет). Серым цветом показана гидрофобная зона. По данным [Doyle et al., 1998].

Принципиальных различий взаиморасположении BO трансмембранных у транспортеров, сегментов имеющих разные механизмы, не выявлено, поэтому В качестве основы модели дикарбоксилатных переносчиков, анализируемой в работе с помощью ингибиторного анализа, использовали модель аденилатного переносчика (единственная структура, полученная для митохондриального антипортера) и упрощенную модель, предложенную [Doyle et al., 1998] для калиевого канала *S. lividans*.



Рис. 1.25. Структура аденилатного переносчика митохондрий быка в комплексе с карбоксиаттрактилазидом с разрешением 2,2 Å. a – схематическая диаграмма вторичной структуры переносчика. Более длинные трансмембранные сегменты имеют перелом на уровне пролинов (Pro27, Pro132, Pro229); δ – ленточная диаграмма третичной структуры переносчика; в – вид снаружи; e – вид изнутри. По данным [Pebay-Peyroula et al., 2003]

1.9. Теоретическое обоснование некоторых используемых в работе методических приемов

Коэффициент распределения амфифильных эффекторов между мембраной органелл или клеток и средой инкубации. Эффекторы, действующие ИЗ мембраны И раствора. Согласно ИЗ закону распределения Бертло-Нернста при данной температуре вещество распределяется между несмешивающимися растворителями так, что отношение его концентраций (точнее, отношение термодинамических активностей) в этих растворителях не зависит от общего количества растворенного вещества Гиббс, 1982]. Согласно этому закону, соотношение между концентрациями вещества в липофильной фазе биологических мембран ($C_{\rm m}$) и водной средой ($C_{\rm w}$) является постоянной величиной, называемой коэффициентом распределения (R): $R = C_m/C_w$. Каждая из форм липофильной кислоты (в наших опытах – алкильного производного малоновой кислоты или ацильного эфира яблочной кислоты – ингибиторов ДКТ) – протонированная и депротонированная, имеют свой коэффициент распределения. Поскольку действующей формой являлась именно депротонированная форма, то мы определяли коэффициент распределения для нее (подробнее см. Материалы и методы). Необходимо заметить, что для практически непроникающих через мембрану (в той области рН, в которой мы работали) производных ДКБ распределение идет между внешним лепестком бислоя мембраны и средой, т.е. практически процесс весьма сходен с сорбцией на внешнем мономолекулярном слое. Однако упрощенный закон сорбции Ленгмюра (достаточно точный при наших ошибках измерения – 3-5%) тоже имеет форму $K = C_m/C_w$ [Новоселова, 1980]. Это позволяет применять общий математический формализм не только к митохондриям, но и к клеткам дрожжей с мощной (потенциально сорбирующей) оболочкой. Соласно расчетам по [Heirwegh et al., 1988], действующую (водную) концентрацию ингибитора (I_{50}) можно определить экстраполяцией кажущейся величины полуингибирования к нулевой концентрации органелл или клеток – носителей гидрофобной фазы. Мебраноактивные пептиды – пороформеры образуют каналы внутри бислоя мембраны (подробнее – в разделе 1.5.) и действующей их концентрацией является мембранная, которую рассчитывали по формуле: $C_{\rm m} = A_{200}/(1/K_{\rm p}+\lambda B)$ [Шольц, Захарова, 1980], где λ – удельное содержание доступной эффектору гидрофобной фазы (удельное содержание липида в митохондриях), равное 0,001 мг/мл, а В – концентрация митохондрий (подробнее см. Материалы и методы).

Протонофорный цикл. Протонофоры как инструмент исследования. Протонофор – это соединение – переносчик протонов, функционирующий не посредством образования каналов в мембране, а диффундируя поперек бислоя. В большинстве случаев – это слабая липофильная кислота с ароматическим компонентом, анион которой имеет делокализованный по π-орбиталям отрицательный заряд и поэтому проникающий через мембрану [Nicholls and Ferguson, 2002]. Являясь трансмембранного своеобразным катализатором переноса заряда, протонофоры способны эффективно уменьшать Ду в наномолярных концентрациях (например, производное фенола SF-6847 - 3,5-ди-третбутил-4-оксибензилиденмалононитрил), т.е. меньших, чем например, приведенная (к 0,5 мг митохондриального белка/мл) концентрация компонентов ДЦ в митохондриях [Terada, 1990]. Это позволяет принебречь побочными действиями высоких концентраций протонофоров на цитохромоксидазу [Мансурова и соавт., 1995] и их связыванием с гидрофобной площадкой в убихинол связывающем центре bc1 комплекса [Saitoh et al., 1992]. Каталитический цикл, называемый протонофорным циклом (Рис. 1.26.), основан на быстрой диффузии, высоких скоростях ассоциации и диссоциации протона в мембране, высокой скорости диффузии протона через зону контакта мембраны и раствора и быстрого связывания протона с буферными компонентами по обе стороны мембраны [Miyoshi et al., 1990]. Эффективность цикла для SF-6847, оценивается числом оборотов 800 сек⁻¹ [Terada, 1990]. Снижение $\Delta \psi$, вызывает максимально возможную активацию протонных помп митохондрий (подробнее см. раздел 1.4.) и, соответственно, максимальную активацию дыхания этих органелл.





Сопоставимой эффективностью с SF-6847 обладают слабые основания, FCCP фенолов, например, карбонилцианид(4производные _ флюорометокси) фенилгидразон, тоже имеющие механизм шаттла (англ. shuttle-type mechanism) [Miyoshi et al., 1987]. Эти общие особенности механизма подтверждаются линейной корреляцией между коэффициентом распределения протонофора и его активностью [Terada, 1990]. Казалось бы, чем эффективнее протонофор, тем лучше – меньше побочных общем случае умножаются с ростом действий, которые в его концентрации. Так, что один из самых эффективных протонофоров флуазинам (3-хлор-N-5-трифторметил-2-пиридиламин) теряет свою активность в митохондриях из-за взаимодействия с глутатионом [Guo et al., 1991]. Поскольку, SF-6847 и FCCP радикально отличаются по структуре, то одинаковое действие этих соединений на какую-либо $\Delta \psi$ - зависимую активность гарантирует именно протонофорный механизм воздействия. Поскольку с помощью циклической вольтаметрии показано, что SF-6847 способен транспортировать через мембрану не только протон, но и Na⁺ [Ozaki et al., 2008], т.е. взаимодействовать в липидной фазе с катионом, то разумно при исследовании анионных мембранотропных агентов использовать анионные протонофоры, а при исследовании катионных эффекторов – катионные протонофоры.

Валиномицин удобный инструмент изучения трансмембранного калиевого тока В препарате митохондрий. Валиномицин - циклический додекадепсипептид, содержащий трижды повторяющуюся последовательность, состоящую из D-валина, L-лактата, L-валина D-изовалерата (Рис. 1.27). способен образовывать И эквимолярные комплексы с высоким сродством к К⁺ (в этаноле константа ассоциации (K_a) составляет 2 × 10⁶ [Ovchinnikov et al., 1974], и несколько меньше в метаноле: $9,4 \times 10^3 - 7,9 \times 10^4$ [Ehala et al., 2008]). Валиномицин обладает несложным, хорошо изученным, механизмом транспорта: электрофоретическим движением этих комплексов градиенту ПО трансмембранного потенциала [Ovchinnikov et al., 1974; Naumowicz et al., 2006].



Рис. 1.27. Структурная формула валиномицина, $C_{54}H_{90}N_6O_{18}$, по данным [Ovchinnikov et al., 1974].

Это связано с тем, что при избытке калия константа скорости транспорта на порядок меньше констант скорости ассоциации и диссоциации [Stark et al., 1971]. В модельных системах (БЛМ) показано, что индуцированная пептидом калиевая проводимость при избытке калия пропорциональна концентрации валиномицина [Naumowicz et al., 2006]. Трансмембранная подвижность пептида, по-видимому, может модулироваться липидным составом мембраны: в частности, холестерин ее уменьшает [Bittman et al., 1986], увеличение насыщенности кислот в липидах увеличивает [Scarpa and Gier, 1971], а в моноолеиллипидах, подвижность больше, чем в диолеиллипидах [Stephen et al., 1972]. Качественно трансмембранный перенос К⁺ в митохондрии печени крысы, индуцированный низкими концентрациями валиномицина (в среде содержащей фосфат в качестве проникающего аниона), был показан в работе [Pressman, 1968]. Это было набуханию органелл, причем эффект оценено ПО сопровождался активацией дыхания. Был определен коэффициент распределения пептида между этой средой и дышащими митохондриями – $K_{\rm p}$, равный (1,8 \pm 0,2) imes10⁵ (Шольц, 1985). Содержание пептида в митохондриальной мембране с учетом этого коэффициента варьирует в вышеописанном опыте от 0,4 до 2,0 нмоль/мг [Шольц, 1985]. Поскольку содержание усредненного липида составляет 250 нмоль/мг белка митохондрий печени крысы [Lenton et al., 1995], молярное соотношение валиномицин/липид варьирует от 1/625 до 1/125. Эти соотношения - меньше нижней границы (1/100), определяющей существенное влияние этого пептида на структуру бислоя [Грачеваи соавт., 1979]. Если говорить о побочных эффектах действия валиномицина на митохондрии печени крысы, то зона влияния пептида на дыхание этих митохондрий на порядок ниже, чем описанное влияние антибиотика на спектр цитохромоксидазы [Steverding and Kadenbach, 1990] и на два порядка меньше, чем концентрация, влияющая на сродство атрактилозида к аденилатному переносчику [Pierre et al., 1983]. Таким образом, валиномицин является удобным инструментом для исследования зависимости индуцированного им трансмембранного тока в калийсодержащей среде на параметры дыхания митохондрий печени крысы.

Пошаговое зондирование активного центра дикарбоксилатного митохондрий печени крысы. Ранее была переносчика изучена топография канала активного центра дикарбоксилатного переносчика митохондрий печени крысы [Шольц и соавт., 1987; Шольц и соавт., 1990]. С этой целью использовали 17 конкурентных ингибиторов транспортера, относящихся к одному классу соединений – 2-моноалкилмалонатов от 2-2-гептадецилмалоната. Изменение метилмалоната до констант ингибирования этих соединений ($K_i = K_i(n) - K_i(n-1)$) при удлинении на одно метиленовое звено характеризовало степень липофильности в районе связывания этой метильной группы [Шольц и соавт., 1990]. Однако вопрос о форме алифатического заместителя внутри канала переносчика остался открытым, поскольку теоретически его гибкая углеводородная цепь могла свободно изгибаться и даже завиваться в клубок. Соответственно, и вопрос о форме обнаруженной обширной липофильной области вблизи точки связывания малоната в переносчике, остался открытым.

мембранотропные Амфифильные эффекторы И лизис митохондрий. Необходимо заметить, что все вышеописанные амфифильные производные малоната, а также валиномицин и описанные в 1.5. мембранотропные разделе пептиды достаточно В высоких концентрациях действуют как детергенты, вызывая неспецифический лизис митохондрий. Это показано для аламетицина [Шольц и соавт., 1985], мелиттина [Шольц, Захарова, 1980], мастопарана [Шольц и соавт., 1983] и [Pressman, 1968]. специфических валиномицина Для изучения свойств производных субстратов дикарбоксилатного ингибирующих переносчика и специфической (пороформирующей) функции пептидов необходимо использовать концентрации, значительно ниже литических.

128

УП - ПЦР и геносистематика близкородственных видов. Среди всех используемых филогенетических маркеров в таксономических исследованиях рибосомальную РНК (рРНК) используют для оценки эволюционного родства на разном таксономическом уровне, в том числе видовом и подвидовом, благодаря присутствию в ее молекуле участков с различной степенью изменчивости. Для установления генетического родства между видами и родами дрожжей используются методы, основанные на сравнении последовательностей рибосомальных генов (5S, 18S, 26S). Из всех молекулярных маркеров эволюции наиболее часто используется ген 18S субъединицы рРНК. В структуре эукариотической 18S рРНК различают 8 больших вариабельных районов.

Участок D1/D2 в 600 нуклеотидов, расположенный недалеко от 5'конца гена 26S рРНК, также обладает достаточной изменчивостью для анализа дрожжей на видовом уровне. Секвенирование района D1/D2 у типовых культур всех известных видов аскомицетовых дрожжей [Kurtzman and Robnett, 1998] позволило создать компьютерную базу данных для определения таксономического положения новых штаммов. Различия по 6ти и более нуклеотидам в районе D1/D2 обычно указывают на [Guadet J, 1989]. принадлежность штаммов К разным видам а конспецифичные штаммы имеют идентичные последовательности или различаются по 1-3 нуклеотидам [Naumova et al., 2003].

В настоящее время в таксономии дрожжей используют метод ПЦР с праймерами, имеющими случайную нуклеотидную последовательность: RAPD-PCR (случайно амплифицированная полиморфная ДНК), AP-PCR (ПЦР с произвольными праймерами) и УП-ПЦР (ПЦР с универсальными праймерами) (Булат, Мироненко, 1996). Для классификации дрожжей используют и другие молекулярные методы: определение молярного содержания суммы гуанина и цитозина (ГЦ) в процентах от общего количества оснований ДНК у разных объектов (Kurtzman and Robnett,

129

1998), (Boekhout молекулярное кариотипирование et al., 1993), изоферментный анализ (Yamazaki et al., 2005; Kurtzman and Robnett, 1998). Благодаря универсальному дизайну универсальных праймеров удается амплифицировать видоспецифичные ПЦР-профили, a различия ПО отдельным фрагментам позволяют дифференцировать штаммы внутри одного вида. Молекулярное кариотипирование используют, в основном, для дифференциации филогенетически отдаленных видов. ПЦР-анализ с универсальными праймерами дифференцировать позволяет как филогенетически далекие таксоны, так и близкородственные виды [Булат, Мироненко, 1996; Bulat et al., 1998].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Реагенты

В работе использовали валиномицин, N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфокислота (HEPES), литиказу, мерсалил, флавон, L- и Dяблочную кислоту, родамин 123 (Sigma, Германия), **D-**глюкозу моногидрат, D-маннит, D-сорбит, (Merk, Германия), 2-оксибутират натрия (Ferak, Германия), бычий сывороточный альбумин (Calbiochem, США), антимицин А, Кумасси бриллиантовый голубой G-250, морфолино-этансульфокислоту (MES), ротенон, Tris(оксиметил)аминометан (Tris), цитохром с (Serva, Германия), бакто-агар, дрожжевой экстракт, пептон, среду YNB без аминокислот и сульфата аммония (BD, Difco Laboratories, США), аспарагин, динатриевую соль аденозин-5-дифосфорной кислоты, этилендиаминтетрауксусную кислоту или ее динатриевую соль (Reanal, Венгрия), протонофоры 3,5-ди-трет-бутил-4-оксибензилиденмалононитрил (SF-4867, далее SF) (Sumitomo Chem. Со., Япония) и карбонил-цианид-4-(трифторметокси)фенилгидразон (FCCP) (Sigma, Aldrich), малонат натрия (ICN, США), аламетицин из Trichoderma viride, 2-теноилтрифторацетон, NaOH (Fluka, Швейцария), эндонуклеазы HaeIII и HpaII (Fermentas, Литва); отечественные препараты (Реахим, Россия): КСl, КH₂PO₄ и КОН квалификации о.с.ч., гексан, диметилсульфоксид (ДМСО), метиленовый синий, сахароза – х.ч., октанол, хлороформ – х.ч., итаконовую, малеиновую, фумаровую и янтарную кислоты (перегнанные), MgCl₂, И натрия (перекристаллизованные пируват сукцинат дважды), глюкозооксидазу, совкаин, дитиотрейтол. Аламетицин, синтезированный по [Rinehart et al., 1977], был любезно предоставлен проф. К.Л. Райнхартом (Иллинойский университет, США), препарат использован в большинстве опытов. 1,7,21,23-Тетраацетиллмелиттин синтезировали из мелиттина по [Habermann and Kowallek, 1970]. Отсутствие фосфолипазной активности в этом препарате контролировали по [Shipolini et al., 1971]. Грамицидин S, полученный от проф. Г.Ф. Гаузе, перекристаллизован из этилового спирта. Бутиловый эфир родамина 19 был любезно предоставлен Г.А. Коршуновой и Н.В. Сумбатян, SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний и SkQT1 – 10-(5'- толухинолил) децилтрифенилфосфоний были синтезированы в группе Г.А. Коршуновой в Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, феррицианид (Реахим).

Производные субстратов дикарбоксилатных транспортеров L-малата малоната: 2-алкилмалонаты, 2,2-диалкилмалонаты, И α,ωалкилендималонаты и О-ацил-L-малаты были синтезированы и очищены в лаборатории биоэнергетики ИНБИ РАН (подробнее см. в разделе 2.12.). В были 2-метилмалонат, 2-этилмалонат, 2работе использованы пропилмалонат, 2-бутилмалонат, 2-пентилмалонат, 2-гексилмалонат, 2гептилмалонат, 2-октилмалонат, 2-нонилмалонат, 2-децилмалонат, 2-2-додецилмалонат, 2-тридецилмалонат, 2ундецилмалонат, тетрадецилмалонат, 2-пентадецилмалонат, 2-гексадецилмалонат; диметилмалонат, диэтилмалонат, дипропилмалонат; О-этил-L-малат, Обутироил-L-малат О-валероил-L-малат, каприлоил-L-малат каприноил-Lлауроил-L-малат, миристоил-L-малат, пальмитоил-L-малат, малат, стеароил-L-малат; α,ω-алкилендималонаты: дималонат, 1,2этилендималонат, 1,6-гексилендималонат, 1,8-октилендималонат, 1.11ундецилендималонат.

2.2. Модельные организмы

В работе использовали 2-3-х-месячных самцов крысы линии Wistar. В качестве другой экспериментальной модели использовали дрожжи *S. cerevisiae*, штаммы ВКПМ Y-502, Y-503, YNN 295, *S. paradoxus* N17, *S. bayanus* MCYC 623, YBS618, YBS817 и YBS24 из коллекции ФГУП

«ГосНИИ Генетика» (Россия), и штамм S288c, использованный для *S*. cerevisiae секвенирования генома (см. базу SGD данных https://www.yeastgenome.org/), от проф. Л. Малле (Франция). Для генетической и молекулярной идентификации штамма Y-503 использовали стандартные штаммы S. cerevisiae S288c (a SUC2gal2), X2180-1A (a SUC2gal2), CBS 1171, гаплоидные штаммы S. bayanus, S. cariocanus, S. kudriavzevii, S. mikatae и S. paradoxus.

2.3. Условия выращивания и предобработки клеток S. cerevisiae

Среды выращивания дрожжей. Среда выращивания инокулята дрожжей (СВД1) содержала дрожжевой экстракт (1%), глюкозу (1%), КН₂PO₄ (0,2%, pH 4,5). Среда выращивания дрожжей (СВД2) идентична среде СВД1, но содержит 0,2%-ный дрожжевой экстракт и 0,1%-ную глюкозу. В отдельных опытах использовали синтетическую среду на основе Yeast Nitrogen Base (YNB) (pH 4,5) – 0,17% с добавлением 0,1% КН₂PO₄ и 0,1% аспарагина. Эта среда для выращивания инокулята дрожжей (СВД3) содержала дополнительно 1%-ную глюкозу, а среда для выращивания дрожжей (СВД4) - 0,1% глюкозу.

Условия выращивания дрожжей. Клетки S. cerevisiae выращивали на 750-мл колбах Эрленмейера (рабочий объем – 100 мл) при 28°С в среде СВД2 на роторной качалке (220 об/мин) на полусинтетической среде. Инокулят выращивали в среде СВД1, в отдельных случаях без добавления фосфата, затем медленно охлаждали до 4°С без перемешивания. Хранили ее перед инокулированием при этой температуре не менее 1 суток для 2004]. Узбеков. После «мягкой» синхронизации культуры (ΔD^{540}) исходной суспензии плотность инокулирования оптическая составляла не более 0,1 единиц. До достижения стационарной фазы происходило 3,0 – 3,5 удвоения биомассы (Рис. 2.1.). Клетки выращивали в

(0,1%),низкой концентрации глюкозы способствующих условиях 1965]. пролиферации митохондрий [Polakis al. Завершение et экспоненциальной фазы роста (12-ч культура) практически совпадало с экзогенной глюкозы в среде (Рис. 2.1.). исчерпанием В опытах использовали 10-ти или 12-часовую культуру, клетки которой обогащены митохондриями [Polakis et al, 1965]. При этом десинхронизация культуры была минимальной: 80% клеток имели одинаковый «типоразмер». Через 10 или 12 ч выращивания клетки быстро (в течение 3 – 5 мин) охлаждали и





осаждали при 2700 g 3 мин при 0°С, трижды промывали ледяной дистиллированной водой. Промытые клетки суспендировали в 10 мМ калий-фосфатный буфере (pH 5,5), до концентрации 0,5 г сырого веса в 1 мл (далее – г/мл). Суспензию клеток преинкубировали в пробирке с плоским дном при 0°С, интенсивно перемешивая на магнитной мешалке.

2.4. Выделение митохондрий печени крысы и митоходрий дрожжей, получение СМЧ и митохондрий с поврежденной внешней мембраной

2.4.1. Среды выделения и инкубации митохондрий и СМЧ.

Среда выделения митохондрий печени крысы CB1, содержала 250 мМ сахарозу, 2 мМ ЭДТА, 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4 или 10 мМ HEPES, pH 7,5. Гипотоническая среда CB2, используемая при получении CMЧ из митохондрий печени крысы, содержала 5 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 2 мМ ЭДТА-Na, 15 мМ KCl.

Среды выделения митохондрий дрожжей.

Среда для обработки дрожжей дитиотреитолом (СВ3) содержала 50 мМ Tris-HCl. рΗ 8,9, дитиотреитол (1,5)мг/мл. добавляется непосредственно перед опытом.). Среда инкубации дрожжей с литиказой (CB4) содержала 1 М сорбит, 50 мМ ЭДТА-Na, 10 мМ КН₂PO₄, pH 7,5. Среда для получения протопластов S. cerevisiae (CB5) содержала 1,2 М сорбит, 20 мМ ЭДТА-Na, 10 мМ MES, pH 6,5. Среда лизиса протопластов (СВ6) содержала 0,4 М маннит, 1 мМ ЭДТА-Na, 0,1% БСА, 10 мМ Tris-HCl, pH 6,5. Среда промывания митохондрий S. cerevisiae (CB7) содержала 0,6 М маннит, 1 мМ ЭДТА-Na, 10 мМ MES, pH 6,5.

Среды инкубации клеток дрожжей, митохондрий дрожжей, митохондрий печени крысы и СМЧ:

Среда инкубации клеток дрожжей СИД содержала 50 мМ калийфосфатный буфер, pH 5,5 или 50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 4,5, 5,5, 6,5 или 7,5.

Среда инкубации митохондрий дрожжей (СИ1) содержала 0,6 М маннит, 1 мМ ЭДТАNа, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ KH₂PO₄, 0,48 мМ ADP, 1 мМ пируват Na, 10 мМ MES, pH 6,5.

Среда инкубации митохондрий печени крысы (СИ2) содержала 125 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 10 мМ KH₂PO₄, 10 мМ сукцинат Na, 1 мкМ ротенон, протонофор 3,5-ди-*трет*-бутил-4-оксибензилиденмалононитрил (0,2 мкМ с 0,5 мг белка митохондрий в 1 мл), 20 мМ Tris-HCl, pH 7,2. Ротенон добавляли непосредственно перед

добавлением митохондрий или субмитохондриальных частиц. Концентрацию протонофора корректировали в зависимости от концентрации митохондрий с учетом его коэффициента распределения [Terada, 1975]. ДК измеряли как рекомендовано [Chance B. and Williams, 1955] в СИ2.

Среда инкубации СМЧ из митохондрий печени крысы (СИЗ). Измерение сукцинат: феррицианидредуктазной активности СМЧ проводили в среде СИЗ. СИЗ отличалась от СИ2 отсутствием сукцината и присутствием 2 мМ MgCl₂.

Среда инкубации митохондрий с поврежденной наружной мембраной (СИ4) содержала 10 мМ сукцинат, 2 мМ ЭДТА, 2,5 мМ MgCl₂ и 10 мМ Tris-HCl, pH 7,2.

В монокатионных средах инкубации все катионы, кроме магния были замещены на ионы K^+ или Li⁺, при этом Tris заменяли на 10 мМ HEPES, pH 7,5. Это позволяло увеличить концентрацию Me⁺ до 35 мМ. Среды именовали СИ5 (среда инкубации с 10 мМ KH₂PO₄ и 6 мМ MgCl₂), СИ6 (среда инкубации с 1 мМ KH₂PO₄ и 6 мМ MgCl₂), СИ7 (среда инкубации с 0,3 мМ KH₂PO₄ и 6 мМ MgCl₂), или СИ8 (среда инкубации с 0,3 мМ LiH₂PO₄ и 6 мМ MgCl₂). Использовали также среды с pH 7,2, содержащие 30 мМ Tris-HCl (СИ9) или 70 мМ Tris-HCl (СИ10) в качестве основного катиона. За исключением оговоренных случаев все среды, содержали 4 мкМ цитохром с. Тоничность всех сред доводили до 270 мосМ, варьируя концентрацию сахарозы.

Среды для измерения пассивного набухания митохондрий печени крысы (СИ11) содержали 80 мМ К₂НРО₄, что соответствует при рН 7,55 120 мМ К⁺ или 240 мМ сахарозу, маннит, рафинозу или сорбит (соответственно, СИ11фосфат, СИ11сахароза, СИ11маннит, СИ11рафиноза, СИ11сорбит). Общими компонентами были 2 мМ ЭДТА, 2

мМ хлорид магния, 1,5 мкМ ротенон, 1 мкМ антимицин A и 10 мМ HEPES (pH 7,55), уравновешенный 4 мМ К⁺ при этом значении pH.

2.4.2. Выделение митохондрий *S. cerevisiae.* Митохондрии дрожжей выделяли по модифицированной нами методике [Bazhenova, 1998]: для получения протопластов использовали литиказу, в среде промывания протопластов в отдельных случаях (опыты по измерению ингибирования ундецилмалонатом сукцинатоксидазы и цитратоксидазы митохондрий дрожжей) фосфат заменяли на HEPES (3 мМ) и добавляли MgCl₂ (5 мМ), а в среду промывания митохондрий добавляли MgCl₂ (5 мМ) и во всех случаях исключали бычий сывороточный альбумин (БСА).

2.4.3. Выделение митохондрий печени крысы. Митохондрии печени крысы выделяли методом дифференциального центрифугирования по модифицированной методике Вейнбаха, используя тяжелую фракцию митохондрий (5500g) [Мосолова и соавт., 1971]. Печень крысы (линия Wistar, самец, вес 150 – 300 г) извлекали и помещали на 20 мин в ледяной раствор 250 мМ сахарозы. Все дальнейшие операции проводили в холодной комнате (0 – 2°С). Охлажденную печень (6 - 7 г) продавливали через рычажный пресс объемом ~10 мл с отверстиями диаметром 1 мм (~25 см⁻²) в 3 мл среды выделения СВ1 и после тщательного перемешивания доводили гомогенат средой СВ1 до концентрации 10%. Полученную суспензию дважды по 5 мин центрифугировали при 700g на центрифуге К-23 (Германия) с угловым ротором, отбрасывая осадок. Супернатант центрифугировали при 6000 g в течение 10 мин. Осадок митохондрий суспендировали в среде CB1 (70 мл) и осаждали при тех же условиях. Полученный осадок суспендировали в среде СВ1 (в объеме, равном весу осадка), помещали в стеклянную пробирку (0°С) и определяли в суспензии белок. Эта характеристика «сопряженности» препарата

митохондрий в опытах с пороформерами в присутствии сукцината и ротенона составляла – 5.14 ± 0.65 (данные по 45 препаратам). В опытах с ингибиторами ДКТ – 4,57 ± 0,65 (данные по 30 препаратам). ДК в СИ7 и СИ8 был одинаковым, т.е. количество эндогенных проницаемостей внутренней мембраны органелл было идентичным в обеих средах. Скорость окисления сукцината митохондриями в отсутствии активаторов (v₄) в СИ2 составляла $11,43 \pm 0,5$ нмоль/мин мг белка (разброс указан для препаратов митохондрий). Причем разных эндогенное дыхание митохондрий печени крысы в присутствии ротенона составляло не более 6% от v₄. В пределах каждой серии кривых, полученных на одном препарате митоходндрий (16 часов), изменение этой величины не превышало 4%, а в пределах одной кривой – 2 - 3% за полчаса (в СИ2 скорость стабилизировалась через 3 мин после добавки митохондрий печени крысы, а в остальных использованных средах через 5 мин). Стандартная концентрация митохондрий печени крысы в оксиметрической ячейке составляла 0,25 мг/мл, за исключением экспериментов по определению коэффициента распределения (*K*_p) амфифильного эффектора между митохондриями и средой инкубации.

2.4.4. Получение СМЧ. Субмитохондриальные частицы из митохондрий печени крысы получали по модифицированной методике Сэйнт-Макари [Saint-Macary, 1985]. Сукцинат: феррицианидредуктазную активность СМЧ в СИЗ определяли по [Saint-Macary, 1985], а концентрацию СМЧ - по [Goa, 1953].

Митохондрии (200 мг белка) суспендировали в гипотонической среде CB2, выдерживали 20 мин при 0°C и добавляли концентрированный раствор сахарозы до конечной концентрации 250 мМ. После центрифугирования в течение 20 мин при 6000 g 10 мин осадок митопластов суспендировали в 5 мл среды CB1, добавляли 2,4 нмоль

цитохрома с, перемешивали и подвергали обработке на ультразвуковом дезинтеграторе MSE (Великобритания) при 0,8 А при 0°С в 2 приема по 2 мин. Дезинтеграт разбавляли средой CB1 до 25 мл и центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при 0°С на центрифуге К-24 (Германия) с угловым ротором. Супернатант центрифугировали при 105000 g в течение 30 мин при 0°С на центрифуге УР-65 (СССР) с угловым ротором. Осадок суспендировали в 600 мкл среды CB1. В препарате определяют белок по [Goa, 1953] и состав частиц.

2.4.5. Измерение сукцинатдегидрогеназной активности СМЧ. Сукцинат: феррицианид-редуктазную активность СМЧ печени крысы измеряли фотометрически при 420 нм на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) в среде СИ2 с добавлением антимицина А (1 мкМ), цианида (1 мМ) и феррицианида калия (1 мМ). Для зависимостей скорости от концентрации сукцината реакцию стартировали сукцинатом, ДЛЯ зависимостей от концентрации ингибиторов в присутствии постоянной концентрации сукцината, реакцию стартировали добавлением суспензии частиц. Алкилмалонаты добавляли в виде водных растворов их калиевых солей с рН 7,2.

2.4.6. Получение митохондрий с поврежденной внешней мембраной. Митохондрии с поврежденной внешней мембраной получали непосредственно в ячейке для измерения кислорода, добавляя митохондрии печени крысы в гипотоническую среду СИ4 и прибавляя 100 мМ сахарозу через 1 мин [Шольц и др., 1985].

2.5. Выделение мастопарана и мелиттина. Мастопаран из яда шершня *Vespa orientalis* и мелиттин из *Apis mellifera*, не содержащий фосфолипазу, был выделен по [Gauldie et al., 1976] Снежковой Л.Г. (ИБХ

РАН) с использованием гель-фильтрации на сефадексе G-75 и тонкослойной адсорбционной хроматографии на целлюлозе [Мирошников А.И. и др., 1981]. Определение молекулярного веса пептидов проводили диск-электрофорезом в полиакриламидном геле по методу [Rato K., et.al., 1975].

2.6. Определение количества белка митохондрий. Белок митохондрий определяли по [Goa, 1953] и модифицированным методом Бредфорд, разработанным автором для концентрированных суспензий митохондрий [Аливердиева и соавт., 1984]. В последнем случае добавляли 10 мкл 3%-ной NaOH к 1-5 мкл концентрированной суспензии органелл (60 – 80 мг/мл) и выдерживали 5 мин.

2.7. Определение количества глюкозы. Глюкозу в пробах культуральной жидкости определяли с глюкозооксидазой при амперометрической регистрации кислорода по [Okuda and Miwa, 1973] в 10 мМ калий-фосфатном буфере (pH 5,5). Перед определением содержания глюкозы клетки удаляли фильтрованием проб через фильтр Synpor № 7 (Чехословакия) с порами диаметром 0,3 мкм.

2.8. Определение скорости поглощения кислорода. Скорость поглощения кислорода определяли в полярографическим методом в термостатируемой ячейке [Шольц и Островский, 1975] с рабочим объемом 1 мл с закрытым кислородным электродом типа Кларка, обладающим временем «полуответа» 20 сек. Используемый в работе оксиметр уверенно измерял скорости окисления порядка 0,2 нмол O₂/мин и разницу в уровнях O₂ – 2 нМ.

Валиномицин, аламетицин, ротенон (последний - непосредственно перед добавлением органелл в среду инкубации) добавляли в виде

концентрированного раствора в этаноле, а Родамин123 – в виде раствора в диметилсульфоксиде. Мелиттин, ТАМ, мастопаран, цитохром с и КСl добавляли в виде концентрированного водного раствора. Каждый из эффекторов в самой высокой из используемых концентраций активировал v4 митохондрий печени крысы до стабильного в течение 20 мин состояния.

Клетки и митохондрии *S. cerevisiae* изучали при 30°С, а митохондрии печени крысы при 25°С.

2.9. Регистрация потенциала, генерируемого на внутренней мембране митохондрий. Потенциал регистрировали на флуориметре Shimadzu RF-5301 PC (Япония) по изменению флуоресценции (F) 0,4 мкМ родамина123 (поглощение – 503 нм, а испускание – 527 нм) [Emaus et al., 1986] в тех же средах инкубации, что и контрольные оксиметрические измерения. В отдельных опытах показали, что типичный индуктор проницаемости митохондрий, вызывающий их набухание (аламетицин), не искажает флуоресценцию за время измерения (Рис. 2.2.). Используемая концентрация красителя не влияла на скорости окисления, как в отсутствие, так и в присутствии всех используемых эффекторов.

Мы отказались от стандартной методики с сафранином, так как это вещество усиливало действие исследуемых нами веществ пороформеров (побочное действие пороформеров – ингибирующее, возможно, сафранин взаимодействует с пороформерами на этапе ингибирующего эффекта) на митохондрии печени крысы и использовали производное родамина – родамин 123 [Emaus et al., 1986]. Так как бутиловый эфир родамина 19 в неразобщающих концентрациях увеличивал разобщающую низких активность жирных кислот (например, пальмитиновой) и способствовал Са²⁺/Р_і-зависимой неспецифической открытию поры, ΜЫ сделали специальные контроли по влиянию на дыхание в 4-м состоянии и взаимодействию с пороформерами родамина 123 [Emaus et al., 1986]. Оказалось, что в отличие от сафранина такое влияние отсутствует.



Рис. 2.2. a – Зависимость флуоресценции родамина 123 (F) от времени после добавления агента, вызывающего (аламетицин) и не вызывающего (SF) набухание митохондрий печени крысы. δ – Зависимость оптической плотности (D^{610}) суспензии митохондрий печени крысы от времени после добавления агента, вызывающего набухание - аламетицина.

Условия: Среда инкубации СИ2. Концентрация митохондрий 0,5 мг/мл.

2.10. Измерение набухания митохондрий определение И критической концентрации амфифила, вызывающей лизис митохондрий. Набухание митохондрий регистрировали турбидиметрически по изменению оптической плотности суспензии митохондрий при 610 нм [Hunter and Smith, 1967]. Измерения проводили в термостатируемой ячейке объемом 1 мл с прозрачными окнами из стекла на фотоэлектроколориметре ФЭК-56 с записью показателей на самописце ПДС-021. Перемешивание производилось при помощи вертикальной механической мешалки. Опыты проводили при 25°С. Прибор калибровали суспензией митохондрий. Энергонезависимое (пассивное) набухание митохондрий исследовали в специальной среде СИ11 в отсутствие субстрата и в присутствии ингибитора дыхания антимицина А (1 мкМ). Критическую концентрацию амфифила, вызывающего лизис митохондрий

(ККЛ), измеряли по [Шольц и соавт., 1974].

2.11. Определение доли доступной мембранной фазы клеток. Использованное в данной работе определение доли доступной для амфифильного эффектора липофильной фазы (соотношение β_a/β_0), основано на прямом определении равновесной концентрации ингибитора в водной фазе в системе клетки/среда. Метод разработан автором совместно с коллегами [Бондаренко и соавт., 2004]. К 2,0 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 5,5), содержащего эффектор, в стеклянной центрифужной пробирке добавляли суспензию дрожжей (50 мкл), выдерживали 3 мин, периодически перемешивая, и осаждали клетки на центрифуге ЦЛН-2 при 8000 об/мин в течение 10 мин. Пермеабилизацию клеток проводили с помощью ДМСО. К суспензии дрожжей (50 мкл) добавляли 50 мМ калийфосфатный буфер (pH 5,5) с 40% ДМСО (1,2 мл среды + 0,8 мл ДМСО), выдерживали 5 мин, периодически перемешивая, и осаждали клетки при 8000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант тщательно отделяли и к осадку добавляли 2,0 мл среды с эффектором. Смесь выдерживали 3 мин, периодически перемешивая, и клетки осаждали при 8000 об/мин в течение 10 мин.

Для определения О-пальмитоил-L-малата 0,5 мл супернатанта смешивали с 1,0 мл 0,05% метиленовой сини в 0,1 М калий-фосфатном буфере с pH 5,5 и экстрагировали хлороформом (2,0 мл) комплекс амфифильнольной кислоты с красителем встряхиванием в течение 2 мин. Хлороформный экстракт фотометрировали при 650 нм. Для определения протонофора к 1,0 мл супернатанта добавляли 50 мкл 0,5 М КОН и фотометрировали при 455 нм.

Расчет доли доступной липофильной фазы клеток. Доля доступной для амфифила липофильной фазы клеток *S. cerevisiae* может быть определена по уравнению:

$$\beta_{a}/\beta_{0} = (C_{0}'/C_{w}' - 1)/(C_{0}''/C_{w}'' - 1), \qquad (3)$$

где β_0 и β_a – приведенный объем общей и доступной для соединения липофильной фазы клеток (в мл/мг), C_0' и C_w' – исходная и равновесная концентрация соединения в среде инкубации, C_0'' и C_w'' – то же в присутствии пермеабилизованных ДМСО клеток. Так как значения оптического поглощения (D^{650} или D^{357}) пропорциональны C, уравнение принимает вид:

$$\beta_{a}/\beta_{0} = (D_{0}'/D_{w}' - 1)/(D_{0}''/D_{w}'' - 1)$$
(4)

С помощью этого уравнения рассчитывали долю доступной липофильной фазы клеток *S. cerevisiae* для О-пальмитоил-L-малата и протонофора FCCP.

2.12. Синтез производных малата и малоната. Производные субстратов дикарбоксилатных транспортеров L-малата, и малоната (2-алкилмалонаты, 2,2-диалкилмалонаты, О-ацил-L- и α,ω-алкилдималонаты) синтезированы Д.И. Бондаренко в лаборатории биоэнергетики ИНБИ РАН. Для очистки соединений их многократно перекристаллизовывали из органических растворителей. Чистоту препаратов проверяли методом газожидкостной хроматографии на приборе «Цвет-102» и методом тонкослойной хроматографией с использованием пластины «Silufol» (Чехия).

2.13. Определение коэффициентов распределения О-ацил-Lмалатов в системе октанол/среда. Коэффициенты распределения (*R*_i) Оацил-L-малатов в системе октанол/среда (10 мМ калий-фосфатный буфер, pH 7,2 или 5,5) определяли с использованием метиленового синего по [Бондаренко и др., 2004]. Аликвоту раствора ингибитора в диметилсульфоксиде вводили в среду (см. выше), перемешивали и добавляли октанол. Соотношение объемов водной и липофильной фаз
таким образом, чтобы после установления равновесия подбирали концентрация амфифильной кислоты в водной фазе снизилась на 20 – 50%. После добавления октанола проводили осторожное перемешивание жидкостей (30 - 120 мин) до установления равновесия, когда концентрация ингибитора водной изменяться. Концентрацию В фазе перестает ингибитора В водной фазе определяли С метиленовым синим. Коэффициент распределения соответствующей кислоты (*R*) рассчитывали по формуле:

$$R = (C_0 - C_w) \mathbf{v}_w / C_w \mathbf{v}_o \tag{5}$$

где C_0 и C_w – исходная и равновесная концентрации кислоты в водной фазе, v_o и v_w – объем октанола и водной фазы.

Этим методом были получены зависимости коэффициентов распределения О-ацил-L-малатов в системе октанол/10 мМ калийфосфатный буфер от количества атомов углерода (*n*) в алифатической цепи этих соединений при pH 5,5 (pH среды инкубации клеток *S. cerevisiae*) и 7,2 (pH среды инкубации митохондрий). Эти зависимости описываются уравнениями с близкими инкрементами lg*R*:

$$lgR = 0,416n - 3,46$$
 (для pH 5,5) (6)
 $lgR = 0,406n - 5,42$ (для pH 7,2) (7)

Зависимость lg*R* для нулевого члена ряда от pH, по-видимому, связана с различиями в ионизации остатка малата.

2.14. Определение размеров молекул. 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.

2.15. Расчет действующей концентрации мембраноактивных пептидов основан на определении их коэффициента распределения (K_p) между липидом митохондрий и средой инкубации [Шольц, 1980]. Как показано для мастопарана, кривые активации изменялись с ростом концентрации органелл (Рис. 2.3*a*.). Зависимости от этой концентрации равноэффективных концентраций пептида (Рис. 2.3*б*.) отсекают на оси абсцисс величину, которая после умножения на соотношение липид/белок в митохондриях печени крысы равна величине обратной K_p для мастопарана – 0,73 × 10⁵ ((0,77 ± 0,04) × 10⁵ (среднее из трех измерений)).



Рис. 2.3. *а* – Зависимости максимальной стабилизированной скорости окисления сукцината митохондриями печени крысы (при определенной концентрации пептида) от концентрации мастопарана при различных концентрациях органелл 0,375, 0,250, 0,125 мг белка/мл (нижняя, средняя и верхняя кривые, соответственно). *б* – Зависимость равноэффективной концентрации мастопарана от концентрации митохондрий (1,8-кратная, 2,2 – кратная и 2,8 – кратная активация (нижняя, средняя и верхняя кривые, соответственно)). *Условия*: Среда инкубации СИ2.

2.16. Определение кинетических параметров.

Константы ингибирования (*K*_i) рассчитывали по формулам:

$$K_{\rm i} = IK_{\rm M} / (K'_{\rm M} - K_{\rm M}) \tag{8}$$

ИЛИ

$$K_{\rm i} = I_{50} K_{\rm M} / (S + K_{\rm M}),$$
 (9)

где K_M и K'_M - константы Михаэлиса для субстрата (определенные в координатах Лайнуивера – Берка в отсутствие и в присутствии ингибитора, соответственно; І₅₀ и І – концентрации ингибитора: вызывающая 50%-ное ингибирование (определена в координатах Диксона) и использованная, соответственно; *S* – концентрация субстрата. Приведенные формулы обычных основаны представлениях 0 механизме действия на ингибиторов [Маршелл, 1981]. Средние конкурентных величины наблюдаемых констант ингибирования (K_i) получены на 3 – 9-ти различных препаратах митохондрий. Исправленные значения pK_i (pK_i) определяли по формуле, учитывающей действующую (равновесную) концентрацию вещества в среде [Шольц и Захарова, 1980]:

$$pK_i' = pK_i + \lg(R\lambda + 1), \tag{10}$$

где R — коэффициент распределения ингибитора между мембранами митохондрий и средой; λ — концентрация липидного компонента мембран митохондрий в среде (в мг/мл).

Инкременты свободной энергии переноса ($\Delta\Delta G_{\rm m}$) метиленовой группы алкилмалонатов из среды в липидную фазу митохондрий рассчитывали по формуле:

$$\Delta \Delta G_{\rm m} = \operatorname{RTln} \left(R_{\rm n} / R_{\rm n+1} \right), \tag{11}$$

где n – количество атомов углерода в алкильной цепи соединения.

Инкременты свободной энергии связывания ($\Delta\Delta G_b$) метиленовой группы алкильной цепи малонатов рассчитывали по формуле:

$$\Delta\Delta G_{\rm b} = \operatorname{RTln}\left(K_{i\,(n)}^{\prime}/K_{i\,(n+1)}^{\prime}\right) \tag{12}$$

2.17. Молекулярно-генетические методы.

Молекулярную идентификацию штаммов дрожжей проводили с помощью следующих методов: 1) секвенирование части гена 26S рРНК по

[Наумов и др., 2003]; 2) рестриктазный анализ амплифицированного 5.8S-ITS фрагмента, включающего 5.8S рДНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2 по [Naumov et.al., 2000; Naumova et al., 2003]; 3) пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК по [Naumova et al., 2003].

Секвенирование части гена 26S рРНК. С помощью праймеров NL-1 (5'–GCATATCAATAAGCGGAGGAAAG) и NL-4 (5'– GGTCCGTGTTTCAAGACGG) проводили амплификацию участка D1/D2 штамма Y-503 и секвенирование этого фрагмента для сравнения с последовательностью такого же участка типовой культуры *S. cerevisiae* CBS 1171.

Рестриктазный анализ амплифицированного 5.8S-ITS фрагмента, включающего 5.8S рДНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2. Выделение ДНК, амплификацию фрагментов и рестрикцию проводили как описано [Наумов и др., 2003]. Для сравнения использовали типовые культуры *S. cerevisiae*. Амплификацию 5.8S-ITSфрагмента провели у исходного штамма Y-503, штамма DAW-3a и видовых тестеров *S. cerevisiae* Y-502, *S. paradoxus*: N17 и *S. bayanus*: МСҮС 623. Продукты ПЦР анализировали с помощью ферментативного расщепления эндонуклеазами *Hae*III и *Hpa*II.

Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК или молекулярное кариотипирование. Для разделения хромосомной ДНК использовали аппарат CHEF–DR III (Bio-Rad, CША). В качестве кариотипического стандарта использовали штамм *S. cerevisiae* YNN 295, имеющий известный порядок и размеры хромосом. Образцы помещали в щели 1%-ного агарозного геля. Пульс–электрофорез проводили при 200 В в течение 15 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени лереключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 60 с и 9 ч при времени переключения полей 90 с. Использовали буфер, следующего состава: 45 мМ Тгіs, 10 мМ ЭДТА, 45 мМ борная кислота, охлажденный до 14°С.

После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Генетическую идентификацию штамма Ү-503 проводили на основании определения фертильности гибридов исследуемых штаммов с 6-ти биологических тестовыми штаммами известных видов рода Saccharomyces по [Naumov et al., 2000]. Определение удельного содержания хромосомной ДНК в клетках исследуемых штаммов определяли ПО [Kartasheva et.al., 1996]. Учитывая, что гетероталличные штаммы до последнего времени были обнаружены только среди дрожжей S. cerevisiae, для идентификации штаммов были использованы два стандартных гаплоидных генетических штамма S. cerevisiae противоположных типов спаривания: S288c (aSUC2gal2) и X2180-1A (aSUC2gal2). Скрещивания осуществляли в течение суток при 28°С на среде YPD (дрожжевой экстракт - 1%, пептон, глюкоза и агар-агар - 2%). Через сутки в смеси клеток наблюдали образование зигот. С помощью микроманипулятора зиготы были клонированы. Для изучения выживаемости аскоспор их изолировали микроманипулятором на среде YPD после обработки асков ферментным препаратом из желудочного сока виноградной улитки Helix pomatia. Через двое суток была изучена выживаемость спор 27 тетрад. Изучали споруляцию полученных гибридных штаммов через 2 суток на ацетатной среде (CH₃COONa – 1%, KCl – 0,5% и агар-агар – 2%).

Идентификация штамма Y-503 методом ПЦР с использованием универсальных праймеров. Штамм Y-503 тестировали с помощью метода ПЦР по [Bulat and Mironenko, 1996; Bulat et al., 1998] с использованием универсальных праймеров:

AA2 (16 mer): 5'- CTGCGACCCAGAGCGG-3'

L15/AS19 (15 mer): 5'- GAGGGTGGCGGCTAG-3'

Анализ ПЦР-продуктов был проведен в 1,7% агарозном геле, окрашенном этидиум бромидом, как описано [Bulat et al., 1998]. Для

определения молекулярно-генетических характеристик штаммов *S. cerevisiae* провели тестирование типа их спаривания методом половой агглютинации с клетоками тестовых штаммов. Данный тест проводили, как описано [Sherman et al., 1986] с использованием в качестве половых партнеров клеток штаммов YBS817 (a ura3) и YBS24 (α ura3) (штаммы получены от С.В. Беневоленского (ГосНИИгенетика); анализ споруляционных свойств штаммов проводили как описано [Sherman et al., 1986]. Определение удельного содержания хромосомной ДНК штамма Y-503, а также YBS618 (гаплоидный контроль) проводили по [Kartasheva et al., 1996]. Процедуры, связанные с разрушением клеток стеклянными шариками, выделением и очисткой суммарной клеточной ДНК, проводили для всех штаммов одинаково и параллельно как описано [Hoffman and Winston, 1987].

2.18. Представление результатов. Стационарные скорости окисления субстратов клетками устанавливались в течение 1 – 3 мин и оставались на этом уровне в течение 30 мин. Это позволяло определить зависимость окисления субстратов митохондриями и клетками, а также зависимость этих скоростей от концентрации эффекторов (не влияющих на эндогенное дыхание) в одной оксиметрической кривой. При этом эффекторы последовательно добавляли к одной порции органелл или клеток. Поэтому разброс значений указан не на графиках, описывающих результаты преобразования этой оксиграммы, а для концентраций субстратов или эффекторов, полученных в независимых экспериментах. Для относительной активация состояния v4 митохондрий (v+эффектор/v4), I50, $K_{\rm i}$, $K_{\rm M}$ или $V_{\rm max}$ разброс данных указан в тексте. Исключением были зависимости для α,ω-алкилендималонатов (в опытах с митохондриями печени крысы) и прототонофоров (с клетками дрожжей). Каждую константу определяли не менее, чем в 3-х независимых экспериментах.

При изучении дрожжей и их митохондрий из скорости окисления экзогенных субстратов (v) вычитали величину эндогенного дыхания (v_e).

Она оставалась неизменной в течение всего времени эксперимента. Стандартные обозначения: v_e – скорость эндогенного дыхания клеток; v – скорость дыхания в присутствии данной концентрации субстрата (в отсутствии ингибитора или эффектора); v_4 – скорость дыхания митохондрий в состоянии 4; V или V_{max} –максимальная скорость дыхания с субстратом; v_0 – скорость дыхания с субстратом в присутствии нулевой концентрации ингибитора; v_i – скорость дыхания в присутствии ингибитора; $v_{abdectrop}$ – скорость дыхания в присутствии.

Полумаксималные ингибирующие концентрации (*I*₅₀) высших 2алкилмалонатов, начиная с 2-додецилмалоната, и высших О-ацил-L- и Dмалатов, начиная с О-миристоилмалата, а также 1,8-октилендималоната и 1,11-ундецилендималоната получали, экстраполируя к нулевой концентрации органелл или клеток по [Heirwegh et al., 1988].

 $\Delta \psi$ Митохондрий печени крысы рассчитывали по эмпирическому уравнению описывающему (для $\Delta \psi > 66$ мВ) линейный участок соответствующей зависимости, которая приведена в статье [Emaus et al., 1986]:

$$-\Delta F/F = (\Delta \psi - 60)/323,$$
 (13)

где ΔF – разница величин флуоресценции (F) до и после добавления протонофора. Если $\Delta \psi$ в разных средах инкубации отличалась, то при расчете соотношения активаций дыхания митохондрий и пропорциональных им трансмембранных токов в этих средах мы вводили поправку согласно закону Фарадея.

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли в соответствии с общепринятыми алгоритмами.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Митохондрии печени крысы – биосенсоры трансмембранного тока.

3.1.1. Оценка 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 набухают, их внешняя мембрана повреждается, митохондрии И становятся митопластами. Гомогенность препарата митопластов (свободных от фракции митохондрий с поврежденной внутренней мембраной) является необходимым условием использования ИХ В качестве биосенсора трансмембранного калиевого тока.

Ранее ДКТ было показано. что И сукцинатдегидрогеназа митохондрий печени крысы радикально (на 6 порядков) отличаются по ингибитору чувствительности к окисления сукцината 2,2дигексилмалонату [Шольц и соавт., 1990; Бондаренко и соавт., 1996]. Результаты, приведенные на Рис. 3.1а. демонстрируют, как в ходе воздействия фракция обогащалась ультразвукового митопластов поврежденными и вывернутыми частицами, поскольку увеличивалась доля нечувствительной к ингибитору сукцинатоксидазы митохондрий ((1 v_2/v_1)). На Рис. 3.16. показано, что за 14 мин действия на митохондрии валиномицина в максимально активирующей концентрации (3 нМ), эта доля возрастала незначительно. Если пренебречь разницей в степени активации v_4 протонофором SF и валиномицином, то такая оценка сверху выявляет 12,6%-ю примесь «дефектных» митопластов (2%-е антимицинисключали), нечувствительных 2,2независимое дыхание к Так максимальный эффект индукторов дигексилмалонату. как

проницаемости в наших опытах измеряли не дольше 3 мин, то примесью «дефектных» митопластов пренебрегали.



Рис. 3.1. *а* - Зависимость относительного ингибирования 2,2-дигексилмалонатом активированного SF окисления сукцината митохондриями печени крысы от времени их предварительной ультразвуковой обработки (СМЧ) в присутствии цитохрома с. *На врезке* показан порядок добавления реагентов в среде; v₁ и v₂ - значения скорости дыхания.

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

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

3.1.2. Особенности активации v₄ митохондрий печени крысы в монокалиевой среде валиномицином и мелиттином.

В качестве агента измерения трансмембранного тока в митохондриях печени крысы использовали валиномицин. Этот индуктор калиевого трансмембранного тока имеет простой механизмом действия и эффективен

в концентрациях, незначительно «возмущающих» мембрану [Грачева и соавт., 1979]. Ha модельных системах показано, что калиевый трансмембранный ток обусловлен электрофоретическим движением эквимолярных комплексов катиона с пептидом [Ovchinnikov, 1974] по градиенту $\Delta \psi$ [Naumowicz et al., 2006], причем этот ток пропорционален концентрации валиномицина [Naumowicz et al., 2006]. По-видимому, это связано с тем, что при избытке К⁺ константа скорости транспорта на порядок меньше констант скорости ассоциации и диссоциации этих комплексов [Stark et al., 1971]. В нашей группе [Шольц и соавт., 1985] способность валиномицина активировать v₄ митохондрий печени крысы была показана в среде инкубации СИ2, содержавшей 6 мМ Mg²⁺, в присутствии которого эндогенные транспортеры К⁺ в митохондриях печени крысы подавлены [Belyaeva and Wojtczak, 1994; Belosludtsev et al., 2006; Toninello et al., 1982; Szewczyk et al., 2009; Pfeiffer et al., 1995; Brierley et al., 1994; Zoratti and Szabó, 1994]. Калиевый трансмембранный ток в условиях избытка К⁺ пропорционален концентрации валиномицина в мембране благодаря высокому *К*_р пептида между средой и митохондриями $((1,25 \pm 0,2) \times 10^5$ (среднее из трех измерений, типичное определение K_p на Рис. 3.2.), [Шольц и соавт., 1985]) и общей концентрации пептида в системе.

На Рис. 3.3*а*. представлена зависимость относительной активации v_4 митохондрий печени крысы от концентрации валиномицина в присутствии разных концентраций K⁺ (20 и 44 мМ) в среде инкубации. При этом эффектор добавляли к одной порции органелл, а на врезке каждой точке соответствует активация v_4 после однократной добавки пептида. Эта скорость была стабильна в течение 2-16 мин (Рис. 3.3*б*.). Причем в обеих средах стабилизация величины относительной флуоресценции (- Δ F/F), пропорциональной $\Delta \psi$, наступала уже через 2 мин после добавки – см. Рис. 3.3*б*.).



Рис. 3.2. *а* - Зависимость максимальной скорости окисления сукцината митохондриями печени крысы от концентрации валиномицина при различных концентрациях органелл 0,394, 0,250, 0,11 мг белка/мл.

б - Зависимость равноэффективной концентрации валиномицина от концентрации митохондрий (2,5-кратная и 4-кратная активация (нижняя и верхняя зависимости, соответственно)).

Условия: Среда инкубации СИ2.

Аналогично стабилизировалась v_4 митохондрий, активированная пептидом. Стационарную степень активации v_4 измеряли при стабильном $\Delta \psi$, но соотношение этой степени и - $\Delta F/F$ в разных средах не совпадало. Причем величины относительной активации v_4 , вызванные 0,48 нМ валиномицином при обеих концентрациях K^+ , отличались на 18%, а соотношение величин - $\Delta F/F$ на 2-ой минуте – на 77%.

Линейный характер зависимости сохранялся и при титровании митохондрий печени крысы валиномицином в одной кривой во всех использованных нами средах инкубации, содержащих К⁺ (см. Рис. 3.4.).

Поэтому можно утверждать, что в каждом отдельно взятом опыте препарат митохондрий имел пропорциональный концентрации валиномицина параметр – степень активации v₄ пептидом.



Рис. 3.3. *а* - Зависимость активации **v**₄ митохондрий печени крысы от концентрации валиномицина (титрование в одной кривой). На врезке суммированы результаты, полученные при однократном добавлении валиномицина к каждой порции митохондрий печени крысы.

б - Зависимость от времени относительной флуоресценции родамина 123 (пропорциональной Δψ митохондрий печени крысы).

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

Необходимо отметить, что в разных средах изменялся угол наклона зависимости к оси абсцисс (см. Рис. 3.3*а*. и 3.4.), величины v₄ и ДК препарата митохондрий печени крысы, линейный но характер зависимости сохранялся всегда. Так как содержание усредненного липида в митохондриях печени крысы составляет 250 нмоль/мг белка al., Lenton et 1995], то молярное митохондрий соотношение валиномицин/липид в наших опытах (Рис. 3.3. и 3.4.) варьировало от 1/625 до 1/125. Эти соотношения - меньше нижней границы (1/100), определяющей существенное влияние пептида на структуру бислоя [Грачева и соавт., 1979] и на порядок ниже, чем соотношение, влияющее на спектр цитохромоксидазы [Steverding and Kadenbach, 1990].



Рис. 3.4. Зависимость относительной активации окисления сукцината митохондриями печени крысы валиномицином от его концентрации. Условия: СИ2 (а), СИ6 (б), СИ7 (в), СИ10 (г). Концентрация митохондрий – 0,25 мг белка/мл.

Принималось, что коэффициент пропорциональности между током и концентрацией валиномицина одинаков для фиксированного $\Delta \psi$ и зависит от диффузионных характеристик комплекса валиномицина с K⁺ в данной мембране и концентрации проникающего аниона (фосфата), который мы варьировали в разных средах инкубации. Величина относительной флуоресценции родамина 123, пропорциональная $\Delta \psi$, изменялась после добавления той или иной концентрации валиномицина (Рис. 3.3*6*.), но остальные свойства системы (среда, концентрация митохондрий, свойства митохондрий) были неизменны. Согласно Рис. 3.3*a*. и 3.4., препарат

органелл имел пропорциональный концентрации валиномицина параметр – относительную активацию пептидом v_4 . Мы предположили, что КТТ пропорционален активации v_4 и что эта пропорциональность не зависит от природы индуктора трансмембранного тока.

Для проверки этого предположения определили концентрационный порядок реакции, лимитирующей КТТ, индуцированный в митохондриях печени крысы мелиттином. Этот пептид хорошо изучен прямыми методами в модельных системах и не похож на валиномицин по структуре и механизму действия. На Рис. 3.5. показано, что относительная активация v_4 митохондрий мелиттином стабилизировалась на 5 – 6-ой мин, синхронно стабилизировался и $\Delta \psi$ (Рис. 3.5*6*.). Причем степень активация v_4 изменялась с изменением концентрации пептида более радикально, чем величина равновесного потенциала.



Рисунок 3.5. *а* - Зависимость от времени активации v₄ митохондрий печени крысы в присутствии 250 и 500 нМ мелиттина, а также 100 нМ ТАМ. *б* - Зависимость от времени относительной флуоресценции родамина 123 (пропорциональной Δψ) в присутствии мелиттина и ТАМ. *Условия*: Среды инкубации для изучения мелиттина – СИ5, ТАМ – СИ6.

Концентрация митохондрий – 0,25 мг белка/мл.

Если относительная активация v_4 митохондрий пропорциональна КТТ, 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-м. Именно такая величина порядка реакции была определена в модельной системе по скорости вызванного пептидом выхода из липосом репортерного красителя [Takei et al, 1999], так как она лимитировалась образованием димерной предпоры (см. Обзор литературы, раздел 1.5.).

Действительно, определенный по зависимости относительной активации v_4 митохондрий печени крысы от концентрации мелиттина концентрационный порядок активации v_4 составлял 2,16 (среднее – 2,01 ± 0,15) (Рис. 3.6.). Благодаря высокому значению K_p для мелиттина [Шольц и соавт., 1980] весь добавленный пептид был связан с внутренней мембраной органелл, содержащей большую часть их липида.



Рис. 3.6. *а* - Зависимость от времени активации v₄ митохондрий печени крысы в присутствии различных концентраций мелиттина. *б* - Зависимость максимальной активации v₄ от концентрации пептида; на врезке эти данные приведены в двойных логарифмических координатах.

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

По (TAM) сравнению мелиттином, тетраацетилмелиттин С демонстрировал большую эффективность, и $\Delta \psi$ в зоне стационарной активации дыхания (3,5 – 6 мин) при этом монотонно уменьшалась (Рис. 3.5.). Ацетилированный пептид формировал каналы с временами жизни в 20 100 раз большими [Stankowski et al., 1991], _ чем У немодифицированного мелиттина (<10 мс [Matsuzaki et al., 1997]). Повидимому, КТТ, индуцированный ТАМ, в отличие от нативного пептида, не лимитировался скоростью образования димерной предпоры [Sengupta et al., 2008; Klocek et al., 2009].

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

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

3.2.1. Сукцинатоксидаза препарата митохондрий печени крысы в присутствии протонофора (SF) – эндогенная сопряженная система для измерения транспорта интактным ДКТ.

Для измерения активности ДКТ в интактных митохондриях печени крысы использовали сопряженную систему окисления сукцината (сукцинатоксидазу), ДКТ состоящую ИЗ митохондрий, сукцинатдегидрогеназы и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы (см. Введение Рис. 1.2.). Суммарная И активность сукцинатоксидазы

митохондрий может определяться в разных условиях и скоростью переноса сукцината через мембрану посредством ДКТ, и активностями сукцинатдегидрогеназы или убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы.

Лимитирование сукцинатоксидазы митохондрий ДКТ показали способами. Специфический независимыми ингибитор ДВУМЯ лимитирующего звена ферментативной цепи должен показывать линейную зависимость в координатах Диксона. В митохондриях с поврежденной внешней мембраной из-за выхода в раствор цитохрома с обратимо снижалась активность сукцинатоксидазы, и лимитирующим звеном в ней становилась убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза Шольц и соавт., 1985], которая демонстрировала отклонение от линейной зависимости для бутилмалоната – специфического ингибитора ДКТ (Рис. 3.7., нижняя зависимость). В присутствии экзогенного цитохрома с линейность восстанавливалась (Рис. 3.7., верхняя зависимость) и становилась такой же, как у интактных митохондрий, что служило указанием на то, что в присутствии ингибитора транспортер продолжал быть лимитирующим звеном сукцинатоксидазы.



Рис. 3.7. Зависимость скорости окисления 10 мМ сукцината натрия митопластами печени крысы, частично обедненными по цитохрому *с*, от концентрации 2бутилмалоната в координатах Диксона в присутствии и в отсутствие 4 мкМ цитохрома с, верхняя и нижняя кривые, соответственно.

Условия: Среда инкубации СИ4.

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

На Рис. 3.8. показано действие на сукцинатоксидазу митохондрий разных концентраций одного из О-ацилмалатов – О-лауроил-L-малата. Степень ингибирования значительно снижалась при пермеабилизации митохондрий каналогеном грамицидином S. Плато на этой зависимости, связанное с нечувствительностью части сукцинатоксидазы к ингибитору, можно объяснить появлением проницаемости для сукцината, не зависящей дикарбоксилатного транспортера. Известно, что антибиотик OT В концентрациях ниже литической способен индуцировать проницаемость бактериальной мембраны для крупных ионов [Капрельянц и соавт., 1977]. В наших условиях используемая концентрация грамицидина S была ниже литической более чем на порядок (2,25 и 40 мкМ, соответственно). Присутствующий в среде разобщитель (Рис. 3.8.) SF предотвращал вызванное грамицидином S набухание митохондрий, а 3 мМ сукцинат обеспечивал ненасыщенность по субстрату ДКТ ($K_{\rm M} = 1,17$ мМ [Palmieri et al., 1971; Passarella and Quagliariello, 1976], но не сукцинатдегидрогеназы (К_м = 0,1 мМ [Шольц и соавт., 1990]). Выход на плато в присутствии антибиотика означал, что О-лауроил-L-малат или не проникал в матрикс митохондрий к сукцинатдегидрогеназе, или действовал на этот фермент существенно слабее, чем на транспортер. В присутствии грамицидина S, шунтирующего переносчик, и подобранной концентрации сукцината (3 мМ), скорость сукцинатоксидазной реакции возрастала на 17%. Повидимому, это происходило за счет активации сукцинатдегидрогеназы дополнительным количеством сукцината, проникающего в матрикс митохондрий. Аналогичный результат (15%) был получен и для концентрации сукцината (10 мМ), являющейся насыщающей и для переносчика, и для сукцинатдегидрогеназы. Так как поток сукцината, не зависящий от переносчика, составлял не менее 50% (Рис. 3.8.), активность сопряженной системы превышала активность транспортера, по крайней мере, на 30%.



3.8. Рис. Зависимость относительной скорости окисления 3 мМ сукцината натрия митохондриями печени крысы от концентрации О-лауроил-L-малата В присутствии 4 мкМ цитохрома с и 2,25 мкМ грамицидина S, а также в отсутствие этого пороформера, верхняя и нижняя кривые, соответственно. Условия: Среда инкубации СИЗ.

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

Таким образом, ЭСС митохондрий печени крысы имела два признака хорошей сопряженной системы для измерения трансмембранного транспорта сукцината: на порядок меньшую *К*_м и активность ЭТЦ, большую, чем измеряемая с ее помощью транспортная.

Ранее в нашей группе было показано, что 2-додецилмалонат в 10000 раз эффективнее ингибирует сукцинатоксидазу интактных митохондрий, чем сукцинатдегидрогеназу СМЧ [Бондаренко и соавт., 1996]. Почти полное ингибирование при сохранении линейности в координатах Диксона подтверждало, что препарат митохондрий гомогенный и измеренные таким способом параметры характеризовали ДКТ с высокой точностью. В СИ2 в присутствии SF величина $K_{\rm M}$ по сукцинату составляла 1,0 ± 0,21 мМ, а характеристикой ингибирования сукцинатоксидазы бутилмалонатом была величина $K_{\rm i} = 0,17 \pm 0,025$ мМ. Значения констант близки к таковым, полученным в результате прямого измерения транспорта сукцината ($K_{\rm M} =$ 1,17 мМ [Palmieri et al., 1971; Passarella and Quagliariello, 1976] и $K_{\rm i} = 0,15$ мМ [Meijer and van Dam, 1981]) (см. Обзор литературы, раздел 1.2.).

При изучении влияния эффекторов на транспорт проверяли отсутствие их побочного действия на компоненты ЭСС, чтобы не лимитирование транспортером сукцинатоксидазы нарушалось Известно, что все 2-моно-И 2,2-диалкилмалонаты митохондрий. ингибируют сукцинатдегидрогеназу более чем на порядок эффективнее, чем ДКТ [Шольц и соавт., 1990]. Выход зависимости на плато в присутствии грамицидина S (см. Рис. 3.8.) означал, что О-ацил-L-малаты или не проникали в матрикс митохондрий к сукцинатдегидрогеназе, или действовали на нее слабее, чем на ДКТ. Согласно теории действия мембранах [Terada, 1990]. протонофоров В сопрягающих если амфифильная кислота (в наших опытах – ингибитор) в некотором интервале концентраций проникает через замкнутую мембрану, то она – протонофор в этом интервале. Если она – не протонофор, то она не проникает через мембрану. Для всех амфифилов – ингибиторов, использованных в наших исследованиях на митохондриях печени крысы, было показано, что величина А200, характеризующая протонофорный эффект ингибиторов, существенно (от 2,5 до 1000 раз) превышает I₅₀ конкурентного ингибирования сукцинатоксидазы митохондрий (A_{200}) двукратной активации 3-оксибутирата измеряли окисления ПО митохондриями печени крысы в 4-м состоянии).

Для типичных представителей 3-х исследованных рядов соединений (2-додецилмалоната, О-миристоил-L-малата и 1,11-ундецилендималоната) показано, что они почти не ингибируют окисление митохондриями 3оксибутирата (далее 3-оксибутиратоксидазу), а, следовательно, и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазу ЭТЦ. Последнее звено является общим для сукцинатоксидазы и 3-оксибутиратоксидазы. Как нами было показано ранее, 2-моно- и 2,2-диалкилмалонаты в концентрациях, ингибирующих окисление сукцината, также практически не влияли на окисление 3-оксибутирата [Бондаренко и соавт., 1996]. Это означало, что

действовали ингибиторы транспорт ИЛИ на сукцината, ИЛИ на сукцинатдегидрогеназу, то есть в подобранных условиях действовали на ДКТ только с цитоплазматической стороны. Из всех использовавшихся производных малоната только 2-метилмалонат ингибировал обе эти системы в сопоставимых концентрациях, хотя и в этом случае I₅₀ для сукцинатоксидазы митохондрий была более чем на порядок больше I_{50} для сукцинат: феррицианидредуктазы субмитохондриальных частиц (2,52 и 65.2 мM, соответственно, при концентрации сукцината 3 мM, использованной для определения K_i всех ингибиторов).

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

3.2.2.1. Молекулярно-генетическая характеристика штамма

дрожжей.

Принадлежность штамма Y-503 к виду S. cerevisiae была показана методами молекулярной биологии [Naumov et al., 2000; Naumova et al., 2003]. По стандартной методике была проведена гибридизация полученных из тетраплоида гаплоидных штаммов со стандартными штаммами всех 6-ти видов рода Saccharomyces. Высокая выживаемость (96%) гибридных аскоспор свидетельствовала о принадлежности штамма Y-503 к виду S. cerevisiae. Установлено, что шесть видов рода *Saccharomyces* последовательностями различаются внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 рибосомальной ДНК (рДНК) [Naumov et al., 2000]. Поэтому эти виды могут быть дифференцированы на основе сравнения длин фрагментов рестрикции этого участка [Naumov et al., 2000]. Мы провели амплификацию 5.8S-ITS-фрагмента Y-503 и видовых тестеров S. cerevisiae Y-502, N17 и MCYC 623. У всех 4-х штаммов размер ПЦР-продукта был одинаковым и составлял примерно 850 пар нуклеотидов (п.н.) Это подтверждает принадлежность изучаемых

штаммов к роду Saccharomyces. ПЦР-продукты анализировали с помощью ферментативного расщепления эндонуклеазами *Hae*III и *Hpa*II. Тестштамм S. cerevisiae Y-502 и штамм Y-503 имели по четыре *Hae*IIIфрагмента размером примерно 320, 230, 170 и 130 п.н. (Рис. 3.9а., дорожки 1-5) и два *Hpa*II-фрагмента размером примерно 730 и 120 п.н. (Рис. 3.9б., дорожки 1-5).



Рис. 3.9. Рестрикционный анализ амплифицированных 5.8S-ITS-фрагментов рДНК штаммов *Saccharomyces* с помощью эндонуклеаз *Hae*III (А) и *Hpa*II (В).

S. cerevisiae: 1 - Y-502, 2 - Y-503, 3 - DAW-3a; 4 - S. paradoxus N17; 5 - S. bayanus MCYC 623. М - маркер молекулярных весов (п.н.) «100 bp DNA Ladder» («Fermentas», Литва).

Молекулярное кариотипирование или пульс-электрофорез (англ. pulsedfield gel electrophoresis, PFGE) проводили по методу, описанному в статье [Naumova et al., 2003]. В качестве кариотипических стандартов использовали штаммы *S. cerevisiae* YNN 295; Y-502, *S. paradoxus* N17, *S. bayanus* MCYC 623 (Рис. 3.10.). Размеры хромосомных ДНК соответствовали стандартному штамму YNN 295. Вариабельные у различных видов участки гена 26S рибосомальной РНК (рРНК) оказались полностью идентичными для гаплоидного штамма, полученного из Y-503, и типового штамма CBS 1171.



Рис. 3.10. Молекулярные кариотипы штаммов Saccharomyces. Дорожки: 1 – S. cerevisiae YNN 295; 2 – Y-502, 5 – DAW-3a; 6 – Y-503; S. paradoxus 3 – N17, S. bayanus 4 – MCYC 623. Размеры хромосомных ДНК соответсвуют стандартному штамму YNN 295.

Таким образом, на основании данных по гибридизации, длин рестрикционных фрагментов 5.8S-ITS рДНК, секвенирования части гена 26S рРНК и молекулярного кариотипирования штамм Y-503 идентифицирован как *S. cerevisiae*. Идентификация штамма Y-503 методом ПЦР с использованием универсальных праймеров подтвердила полученный результат.

Сравнение относительного содержания ДНК в клетках гаплоидных и штамма Y-503 (1,0,1.75. 3.5. диплоидных тест-штаммов И И соответственно), а также тестирование типа спаривания методом половой агглютинации клеток, позволили идентифицировать штамм Y-503 как тетраплоид, гетерозиготный по типу спаривания. Тетраплоиды обладают большими, чем у диплоидов активностями систем окисления субстратов [Galitski et.al, 1999], поэтому система окисления сукцината в клетках этого штамма была удобна для изучения в качестве ЭСС измерения транспорта субстратов через плазмалемму.

3.2.2.2. Подбор условий для измерения низкой скорости окисления сукцината клетками S. cerevisiae. Для измерения скорости транспорта субстрата в клетки S. cerevisiae использовали ЭСС окисления сукцината (сукцинатоксидазу клеток), которая состоит из предполагаемого переносчика ДКБ плазмалеммы, ДКТ митохондрий, сукцинатдегидрогеназы и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы (см. Обзор литературы, раздел 1.2., Рис. 1.3.). Чтобы активность сопряженной системы была максимальной, как описано выше, выбрали тетраплоидный штамм S. cerevisiae Y-503, клетки выращивали при низких концентрациях глюкозы, вплоть до полного ее исчерпания в раннем стационаре (см. Материалы и методы, раздел 2.3., Рис. 2.1.).

Нашим первым шагом был подбор условий для измерения транспорта дикарбоновых кислот (сукцината и малата) через плазмалемму дрожжевой клетки, когда диффузия протонированной, т. е. незаряженной формы ДКБ практически отсутствовала (значения pH 5,5 и выше). Основная трудность измерения скорости окисления внешнего сукцината клетками *S. cerevisiae*, выращенными при низкой концентрации глюкозы, т. е. в отсутствии глюкозной репрессии, была связана с высоким уровнем эндогенного (фонового) дыхания (v_e) свежеотмытых клеток дрожжей (Puc. 3.11.), которое маскировало низкую скорость окисления сукцината клетками. По мере выдержки клеток при 0°C в аэробных условиях скорость эндогенного дыхания клеток снижалась с полупериодом около 5 ч (Puc. 3.11*б*.).



Рис. 3.11. Кинетика эндогенного дыхания клеток *S. cerevisiae*.

Потребление а кислорода через 1,0 - 13,4 ч после перевода клеток культуральной ИЗ жидкости в среду инкубации при 0°С. б – Зависимость скорости эндогенного дыхания от времени инкубации клеток при 0°С. Условия: 50 мМ калий -

условия: 50 мм калии - фосфатный буфер, 30°С.

Данные Рис. 3.12а. демонстрируют, что аэробная преинкубация клеток дрожжей при 0°C существенно снижала скорость эндогенного дыхания. Уже после 14-ти часов такой преинкубации скорость дыхания, измеренная на 20-й минуте, уменьшалась почти на порядок: с 5,9 (верхняя оксиграмма) до 0,62 нмоль О₂/мин (нижняя оксиграмма). Причем, после такой продолжительной преинкубации скорость стабилизировалась. По данным верхней оксиграммы видно, что скорость уменьшалась за 20 мин в 3,4 раза, а наклон нижней оксиграммы оставался постоянным. На врезке показан увеличенный участок нижней оксиграммы. Эта скорость дыхания (0,62 нмоль О₂/мин) в 3 раза больше минимальной скорости окисления субстрата в наших исследованиях. Колебания фона не мешали уверенно аппроксимировать оксиграмму прямой оценивать величину И стационарной скорости. После преинкубации дрожжей при 15°С, мы получали для эндогенного дыхания сходные с результаты. За 14 часов преинкубации при 15°С скорость эндогенного дыхания уменьшалась в 4 раза и стабилизировалась во времени (Рис. 3.126.).



Рис. 3.12. Зависимость от времени скорости эндогенного дыхания клеток *S. cerevisiae* после преинкубации при 0°С (*a*) или при 15°С (*б*) в течение 0,5 (*1*) или 14 (2) часов.

На врезке: участок оксиграммы 2 (*a*), увеличенный масштаб. Прямая линия, аппроксимирующая зависимость, проведена поверх оксиграммы. Среда выращивания инокулята не содержала фосфат. Клетки концентрировали и отмывали после быстрого охлаждения.

Условия: Среда инкубации 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5). Концентрация клеток – 3 мг/мл.

Таким образом, аэробная преинкубации при 0°C суспензии клеток, отмытых при температуре 0°С (см. Материалы и методы, раздел 2.3.), через 9 – 25 ч приводила к радикальному уменьшению эндогенного дыхания (Рис. 3.11., 3.13*a*., нижняя зависимость) до величин, сопоставимых с дыханием в присутствии сукцината (сравнить две нижние зависимости на Рис. 3.12. и 3.13а.). Скорость дыхания клеток в присутствии сукцината за вычетом v_e между 9-м и 26-м часом практически не изменялась (Рис. 3.13б.). Это свидетельствовало о том, что уменьшение величины v_e, а также скорости окисления пирувата и глюкозы (Рис. 3.12. и

3.13а.) не связано с прогрессивной гибелью клеток в ходе преинкубации. Антимицин А (ингибитор убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы митохондрий) полностью подавлял дыхание на сукцинате, глюкозе и пирувате, поэтому митохондриальные окислительные системы – это единственный путь окисления этих субстратов в клетке в наших условиях. Показано, что v_e интенсивнее уменьшалась в условиях субнулевой преинкубации, если в среде выращивания инокулята присутствовал дополнительный фосфат, а также, если культуру выращивали в течение 12 ч. Однако в этом случае стабилизация сукцинатного дыхания наступала почти в 2 раза позже.

Из данных на рис. 3.13*а.*, видно, что даже через 8 – 10 часов аэробной преинкубации при 0°С скорости окисления глюкозы и пирувата существенно превышали скорость эндогенного дыхания. Однако его величиной нельзя было пренебречь при измерении дыхания в присутствии сукцината. Поэтому проверяли действие всех исследуемых эффекторов на эндогенное дыхание и вычитали его величину из совокупной скорости окисления в присутствии сукцината. Эту приведенную скорость называли скоростью окисления сукцината. Поскольку после аэробной преинкубации при 0°С между 9-м и 26-м часом скорость дыхания практически не изменялась (Рис. 3.13*б.*), в наших опытах использовали именно эти условия.

Необходимо отметить, что сопоставимые скорости окисления сукцината в этих условиях получили и для штамма S288c, и для штамма Y-503. Существенное превышение скоростей окисления глюкозы и пирувата над скоростью окисления сукцината (см. Рис. 3.13*a*.) свидетельствовало о том, что последнее звено сукцинатоксидазы клеток – общее для систем окисления этих субстратов (см. Обзор литературы, раздел 1.2., Рис. 1.3.), не лимитировало окисление сукцината.



Рис. 3.13. *а* – Зависимость скорости окисления клетками *S. cerevisiae* 10 мМ глюкозы, 24 мМ пирувата натрия, 20 мМ сукцината натрия и в отсутствие экзогенных субстратов (v₀) при 30°C от времени аэробной преинкубации при 0°C.

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

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

3.2.2.3. Эквивалентность прямого и непрямого методов измерения транспорта пирувата в клетки *S. cerevisiae*. Измерение транспорта сукцината в клетку *S. cerevisiae* прямыми методами затруднено (см. Обзор литературы, раздел 1.1.). Поэтому для сравнения результатов, полученных прямыми и непрямыми методами, исследовали транспорт пирувата через плазмалемму *S. cerevisiae* с использованием предложенного нами методологического подхода.

Эмпирически были подобраны условия измерения скорости транспорта пирувата в клетку *S. cerevisiae*. В наших условиях (Рис. 3.13. и 3.14.) скорость окисления пирувата Na была полностью активирована в присутствии 20 мM субстрата, но была использована и 4 мM концентрация для того, чтобы транспорт через плазмалемму лимитировал скорость его

окисления. В клетках, выращенных в течение 12 ч и специально подготовленных дрожжей (дополнительный 0,1%-й фосфат в инокуляте и быстрое охлаждение культуры перед концентрированием), Ve стабилизировалась уже через 1,4 часа (Рис. 3.14а., верхняя оксиграмма). Время установления стационарной скорости в присутствии пирувата Na составляло 6 мин, стабильная скорость сохранялась в течение 11 мин (Рис. 3.14а., средняя оксиграмма). Начиная со второй добавки, стационарная скорость окисления стабилизировалась в течение 1,5 мин. Это позволило измерить скорости окисления в присутствии 4-х концентраций пирувата в ходе последовательных добавок при одной и той же концентрации дрожжей (Рис. 3.14а., нижняя оксиграмма).

Скорость окисления 4 мМ пирувата не зависела от времени преинкубации дрожжей в течение 4-х часов (Рис. 3.146., плато на нижней зависимости). В то же время скорость в присутствии насыщающей концентрации субстрата (20 мМ) неуклонно снижалась (Рис. 3.14б., верхняя зависимость). Обработка нижней оксиграммы из Рис. 3.14а., приведена на Рис. 3.15*a*., зависимость 2. Она позволяет рассчитать $V_{\text{max}} =$ 25 нмоль O_2 /мин и $K_M = 4,2$ мМ (среднее из трех опытов $-5,2 \pm 1,0$ мМ). Эта величина близка к $K_{\rm M}$, измеренной прямым методом для монокарбоксилатного H⁺- симпортера плазматической мембраны S. *cerevisiae*: $K_{\rm M}$ = 5,6 и 4,1 мМ при рН 4,0 и 6,0, соответственно [Akita et al., 2000]. Зависимость 1 на Рис. 3.15а. получена на клетках после 6,1 ч преинкубации при 0°С. К_м, рассчитанная по данным этой зависимости, составила 0,9 мМ, а среднее значение из трех опытов $1,19 \pm 0,23$ мМ. Эта величина близка к значению $K_{\rm M}$ для монокарбоксилатного переносчика митохондрий (0,8 мМ [Nałęcz et al., 1991]), измеренной прямым методом по скорости выхода пирувата. По-видимому, перелом на нижней зависимости, Рис. 3.14б., выявляет смену лимитирующего звена при окислении пирувата клетками.



Рис. 3.14. *а* – Поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae* в отсутствии и в присутствии пирувата натрия. Цифры при оксиграммах – скорости окисления в нмоль O₂ /мин. Время аэробной преинкубации клеток при 0°C – 1,4, 2,1 и 2,7 ч (верхняя, средняя и нижняя оксиграмма, соответственно).

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

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

Было использовано проникающее в клетку соединение – флавон (специфический конкурентный ингибитор НАДН-дегидрогеназы дрожжевых митохондрий, и, следовательно, в наших опытах – дыхания митохондрий) для независимого способа определения лимитирующего звена. Выраженная сигмоидальная зависимость относительной скорости дыхания от концентрации ингибитора имела место только при 4 мМ концентрации пирувата Na (Рис. 3.15*б*., верхняя зависимость), но не при 20 мМ (Рис. 3.15*б*., нижняя зависимость). По-видимому, в этих условиях (в пределах плато на Рис. 3.14*б*.) дыхание митохондрий не лимитировала скорость окисления пирувата клетками. Таким образом, чтобы кинетические параметры транспорта в клетку внешнего окисляемого субстрата, измеренные прямым и непрямым (по скорости окисления) способами, совпадали, необходимо, чтобы:

1) скорость окисления субстрата не менялась от опыта к опыту (плато на Рис. 3.14*б*.);

2) эндогенное дыхание было низким и стабильным в ходе измерения (Рис. 3.14*a*., верхняя оксиграмма);

3) сохранялась постоянной скорость окисления транспортируемого субстрата (Рис. 3.14*a*., средняя оксиграмма) в лимитирующих по переносчику условиях (Рис. 3.15*a*., зависимость 2, Рис. 3.15*б*., верхняя зависимость).



Рис. 3.15. *а* – Зависимость скорости окисления пирувата натрия клетками *S. cerevisiae* после 6,1 ч аэробной преинкубации клеток при 0°С (1) и аналогичной зависимости, полученной после 2,7 ч такой преинкубации (представленной на нижней амперограмме Рис. 3.14*a*. (2) в координатах Лайнуивера-Берка.

б – Зависимость относительной скорости окисления 4 мМ и 20 мМ пирувата натрия от концентрации флавона. Время аэробной преинкубации клеток S. cerevisiae при 0°С при получении верхней и нижней зависимости – 2 ч и 3 ч, соответственно.

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

1,5 мг/мл.

В таких условиях скорость окисления субстрата определяется скоростью его транспорта через плазмалемму. Этот подход к изученному ранее прямым методом монокарбоксилатному транспортеру *S. cerevisiae* [Akita et al., 2000] мы применили (см. далее) к неизученному транспорту сукцината через плазмалемму клеток *S. cerevisiae*.

3.2.2.4. Измерение транспорта сукцината в клетки S. cerevisiae. В Таблице 3.1. представлены данные, отражающие изменение концентрации амфифильного соединения растворе присутствии В В непермеабилизованных и пермеабилизованных с помощью ДМСО клеток S. cerevisiae. Как следует из данных Таблицы 3.1., соотношение β_a/β_0 для протонофора FCCP составляет величину, близкую к единице (1,013). Это означает, что данное соединение быстро приникает в клетку, то есть, по крайней мере, за 2 мин вся липофильная фаза становится доступной для этого соединения. Это согласуется с тем, что высокая скорость трансмембранной диффузии этого соединения является необходимым условием для его протонофорной активности. Пермеабилизация не повлияла также на аккумуляцию клетками протонофора SF, поскольку оба эти протонофора свободно распределяются по мембранам неповрежденной клетки [Beauvoit et al., 1991]. В тех же условиях (50 мМ калий-фосфатный буфер pH 5,5, 30°C) доля доступной липофильной фазы клеток дрожжей для О-пальмитоил-L-малата была значительно меньше единицы И составляла примерно 0,365. Пермеабилизация клеток вдвое увеличила величину стационарной аккумуляции этого соединения. Из этого следует, что О-пальмитоил-L-малат в условиях наших опытов (время выдержки 2 мин) не проникал в клетки. Величина β_a/β_0 при увеличении времени выдержки клеток с О-пальмитоил-L-малатом с 2 до 20 мин практически не изменялась. По-видимому, эта величина является соотношением доступного из среды объема внешнего лепестка плазматической мембраны клетки к общему объему ее липофильной фазы, так как ДМСО

пермеабилизует не только плазматическую мембрану клеток, но и мембраны субклеточных структур.

Таблица 3.1. Определение доли доступной липофильной фазы (β_a/β₀) клеток *S. cerevisiae* для О-пальмитоил-L-малата (40 мкМ) и протонофора FCCP (12,5 мкМ).

Соединение	Дрожжи мг/мл	D_0''	D_0'	$\mathrm{D_w}''$	$\mathrm{D_w}'$	β_a/β_0
О-Пальмитоил-	50,0	0,60	0,60	0,19	0,33	0,380
L-малат						
с метиленовым	25,0	0,65	0,65	0,13	0,28	0,323
СИНИМ В						
хлороформе,	25,0	0,55	0,55	0,12	0,24	0,392
D^{650}						
	Среднее:					0,365
FCCP,	25,0	0,2	0,218	0,130	0,140	1,012
$D^{357}-$						
относительно	25,0	0,2	0,2	0,148	0,15	1,014
линии						
303 - 450 нм	Среднее:					1,013
			*			-

 β_a/β_0 – постоянно в течение 2 – 20 мин

Примечание. Доля доступной для амфифила липофильной фазы клеток *S. cerevisiae* $\beta_a/\beta_0 = (C_0'/C_w' - 1)/(C_0''/C_w'' - 1)$, где β_0 и β_a – приведенный объем общей и доступной для соединения липофильной фазы клеток (в мл/мг), C_0' и C_w' – исходная и равновесная концентрация соединения в среде инкубации, C_0'' и C_w'' – то же в присутствии пермеабилизованных ДМСО клеток. Так как D^{650} или D^{357} – С, уравнение принимает вид: $\beta_a/\beta_0 = (D_0'/D_w' - 1)/(D_0''/D_w'' - 1)$. Среда инкубации клеток 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 5,5).

Стабильные в течение длительного времени скорости эндогенного дыхания и окисления сукцината в отсутствие и присутствии непроникающего ингибитора О-пальмитоил-L-малата (Рис. 3.16*a*., верхняя и средняя оксиграммы, соответственно) позволили получить зависимость скорости дыхания от концентрации субстрата и ингибитора в одной оксиграмме (в начале и в конце оксиметрической кривой, соответственно) (Рис. 3.16*б*.). Необходимо отметить, что время установления стационарной скорости после первой добавки сукцината составляло 4 мин, а при дальнейших добавках – 1,5 мин.



Рис. 3.16. Поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae. a* - в отсутствие эффекторов (верхняя оксиграмма), в присутствии 16 мМ сукцината натрия и 120 мкМ О-пальмитоил-L-малата (средняя оксиграмма) и в присутствии только О-пальмитоил-L-малата (нижняя оксиграмма). Цифры при оксиграммах – скорости окисления в нмоль O₂/мин. Время аэробной преинкубации клеток при 0°C – 17,5, 18 и 20 ч (верхняя, средняя и нижняя оксиграмма, соответственно).

б − Поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae* при последовательном добавлении сукцината и О-пальмитоил-L-малата. Время аэробной преинкубации клеток при 0°C − 18,5 ч.

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

Обработка результатов, приведенных на оксиграмме (Рис. 3.166.) в координатах Лайнуивера-Берка (Рис. 3.17*a*.) и Диксона (Рис. 3.17*b*.), соответственно, позволила рассчитать величину $K_{\rm M}$, равную 5,6 мМ, $V_{\rm max}$ – 4,17 нмол O₂/мин, и I_{50} ингибирования О-пальмитоил-L-малатом, равную 37,3 мкМ. Среднее значение $K_{\rm M}$ из трех независимых опытов составляло 7,3 ± 2,1 мМ. В отличие от традиционных прямых методов определения

сродства к субстрату переносчиков ДКБ плазмалеммы разных видов дрожжей (например, [Cássio et al., 1993, Queiros et al., 1998]), зависимость для определения К_м получена нами в одной кривой за 30 мин. Линейная зависимость ингибирования О-пальмитоил-L-малатом скорости окисления (Рис. 3.17б.) сукцината клетками В координатах Диксона свидетельствовала о его действии на лимитирующее звено окисления этого субстрата и о связывании ингибитора с ним в одной точке. Так как ингибитор за время эксперимента (до 20 мин) не проникал через плазматическую мембрану, это означало, что лимитирующим звеном являлся транспорт сукцината через эту мембрану. Таким образом, измеряя скорость окисления экзогенного сукцината клетками S. cerevisiae, мы определяли скорость транспорта субстрата через плазмалемму и его $K_{\rm M}$.



Рис. 3.17. *а* – Зависимость скорости окисления сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* от его концентрации, рассчитанная по оксиграмме на Рис. 3.16*б.*, координаты Лайнуивера-Берка.

б - Зависимость скорости окисления 16 мМ сукцината натрия клетками *S.cerevisiae* от концентрации О-пальмитоил-L- малата. Эта зависимость рассчитана по оксиграмме на Рис. 3.16*б*., координаты Диксона.

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

Линейный характер ингибирования в координатах Диксона и одинаковые величины К_М имели место во всех опытах, когда скорость окисления сукцината была максимальной и не зависела от дальнейшей преинкубации клеток при 0°С (плато на Рис. 3.136.). Можно сделать вывод, что скорость окисления сукцината в клетками лимитировалась транспортом через плазмалемму при линейном характере ингибирования в координатах Диксона. Получение такой зависимости при каждом изменении условий подготовки и инкубации клеток необязательно. Это трудоемкое получение зависимости исключало активности сукцинатоксидазы клеток от времени преинкубации в каждой серии опытов. Многочисленные опыты подтвердили, что скорость окисления сукцината лимитировалась транспортом в каждой оксиметрической кривой (типичный результат на Рис. 3.166., Рис. 3.17а.).

Значение I_{50} для О-пальмитоил-L-малата линейно зависело от концентрации клеток в пробе (Рис. 3.18*б*.). Ингибирующей концентрацией этого соединения конкурентного к гидрофильному субстрату (сукцинату) являлась его концентрация в среде, а не в мембране. Экстраполяция прямой на Рис. 3.18*б*. к нулевой концентрации клеток позволила рассчитать величину K_i , равную 1,9 мкМ (среднее из трех опытов 3,1 ± 1,2).

Получение зависимости, аналогичной приведенной на Рис. 3.18*а*. традиционным методом, потребовало бы значительно большего количества повторов. Необходимо отметить, что воспроизводимость I_{50} при определенных концентрациях дрожжей и сукцината Na – хороший и быстрый тест на воспроизводимость условий подготовки клеток к измерению. В то же время экстраполированная к нулевой концентрации дрожжей величина I_{50} не зависела от их концентрации.


Рис. 3.18. *а* - Зависимость скорости окисления 20 мМ сукцината натрия от концентрации О-пальмитоил-L-малата клетками *S. cerevisiae* (мг/мл): *1* – 5, *2* – 10, *3* - 15.

б– Зависимость *I*₅₀ от концентрации клеток *S. cerevisiae* после преинкубации при 0°С.

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

3.2.2.5. Непроницаемость плазматической мембраны *S. cerevisiae* для ингибиторов транспорта.

Использование пермеабилизации дрожжей для оценки способности амфифильного эффектора проникать в клетку занимает много времени. Как мы отмечали выше (см. Обзор литературы, раздел 1.4., Рис. 1.9.), если амфифильная кислота (в наших опытах – ингибитор) не проникает через плазматическую мембрану в некотором интервале концентраций, то в этом интервале она – не протонофор [Terada, 1990].

Тестом на протонофорную активность эффектора в клетках *S. cerevisiae* и деэнергизацию ее плазмалеммы может быть ингибирование монокарбоксилатного H⁺-симпортера плазматической мембраны [Akita et al., 2000], а, следовательно, пируватоксидазы клеток. Деэнергизация внутренней мембраны митохондрий в клетках дрожжей проникающим

протонофором [Beauvoit et al., 1991] увеличивала скорость окисления митохондриями продуктов метаболизма глюкозы в цитоплазме после энергонезависимого транспорта [van der Rest et al., 1995] этого моносахарида через плазмалемму. Так как транспорт глюкозы в клетку не лимитировал процесс ее окисления, FCCP увеличивал скорость окисления этого субстрата клетками *S. cerevisiae* (Рис. 3.19*а.*, верхняя зависимость).



Рис. 3.19. *а* – Зависимость относительной скорости окисления 10 мМ глюкозы, 20 мМ сукцината натрия и 20 мМ пирувата натрия клетками *S. cerevisiae* от концентрации FCCP.

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

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

б – Зависимость относительной скорости окисления клетками S. cerevisiae 10 мМ глюкозы, 20 мМ пирувата натрия и 20 мМ сукцината натрия от концентрации Опальмитоил-L-малата. Аэробная преинкубация клеток при 0°С – 10 - 14 ч.

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

Время установления стационарной скорости не превышало 1 мин. Это независимое свидетельство быстрого проникновения FCCP в клетку к митохондриям в условиях наших опытов. Величина I₅₀ ингибирования пирувата протонофором FCCP (Рис. 3.19*a*., окисления нижняя зависимость) была примерно в 5 раз ниже величины А₅₀ (концентрация, вызывающая полумаксимальную активацию) активации разобщителем окисления глюкозы (соответственно, 0,21 и 1,0 мкМ, см. Рис. 3.19а.). Сходное соотношение A_{50}/I_{50} (равное 4,1), получили для протонофора SF-6847 с другой химической структурой. Результаты согласуются с прямыми оценками соотношения концентраций протонофора FCCP, необходимых для деэнергизации различных мембран дышащих клеток S. cerevisiae [Beauvoit et al., 1991]. По-видимому, при низких концентрациях протонофор подавлял транспорт пирувата цитоплазму В через плазмалемму, осуществляемый в симпорте с протоном [Cássio et al., 1987], а не энергонезависимый транспорт пирувата из цитоплазмы в митохондрии [Nałęcz et al., 1991]. При низких концентрациях протонофор почти не подавлял окисление сукцината, а при высоких – не активировал (Рис. 3.19*a*.). По-видимому, В отличие ОТ пирувата, транспорт этого дикарбоксилата через плазматическую мембрану осуществлялся не в симпорте с протоном. Скорости окисления сукцината клетками после 14 ч аэробной преинкубации при 0°С в фосфатном буфере, содержащем только ионы калия или только ионы натрия, радикально отличались (Рис. 3.20.). Дыхание на сукцинате регистрировалось только при инкубации в натрийбуфере. Поскольку увеличение фосфатном концентрации калийфосфатного буфера (и, соответственно, катионов калия) не изменяло $K_{\rm M}$ и V_{max} сукцинатоксидазы клеток, результат на контрольной амперограмме, представленной на Рис. 3.20., нельзя объяснить ингибирующим действием По-видимому, калия на транспорт. транспорт сукцината через плазмалемму осуществлялся в симпорте с Na⁺. В среду инкубации добавляли протонофор, чтобы исключить выход ионов натрия из клеток, с помощью соответствующего антипортера плазмалеммы [Bañuelos et al., 1998].

Окисление сукцината дрожжевыми клетками, в отличие от окисления пирувата и глюкозы, почти полностью ингибировалось Опальмитоил-L-малатом 3.196.



Рис. 3.20. Поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae* в монокатионных средах. Время аэробной преинкубации клеток при 0°С – 18,5 ч.

Условия: Среда инкубации – 50 мМ калий - фосфатный буфер (pH 5,5); добавки: клетки S. cerevisiae после аэробной преинкубации при 0°С – 14 часов (1), 1 мкМ FCCP (2), 20 мМ сукцинат калия (3) – верхняя оксиграмма.

Среда инкубации – 50 мМ натрий фосфатный буфер (pH 5,5); *добавки*: клетки *S. cerevisiae* после аэробной преинкубации при 0°С – 14 часов (4), 1 мкМ FCCP (5), 20 мМ сукцинат натрия (6) – нижняя оксиграмма.

Концентрация клеток – 5 мг/мл.

В зоне используемых концентраций О-пальмитоил-L-малат (не проникающий в клетку) не ингибировал окисление пирувата (см. Рис. 3.196.), и, следовательно, не был протонофором. Такая возможность, однако, не исключалась, поскольку ранее нами была показана способность высших 2-алкилмалонатов разобщать окислительное фосфорилирование препаратов митохондрий печени крысы, т.е. действовать как протонофоры. Окисление пирувата дрожжевыми клетками ингибировалось 2-ундецилмалонатом в концентрациях, существенно превышающих *I*₉₉ этого

ингибитора для окисления сукцината (Рис. 3.21.). Так как протонофорный механизм FCCP связан с проницаемостью протонированой формы агента через мембрану, ΜЫ интерпретируем полученный результат, как неспособность вещества проникать В клетку при концентрациях, ингибирующих скорость окисления сукцината. Доля протонированой формы кислоты (2-ундецилмалоновой) должна уменьшаться с увеличением pH, поэтому не удивительно подавление окисления пирувата при вдвое больших концентрациях алкилмалоната при pH 6.5, чем при pH 5,5 (Рис. 3.21а.). В дальнейшем мы использовали этот ингибитор окисления сукцината, как агент, не проникающий в клетку при значениях рН выше 5,5.

Для изучения транспорта сукцината через плазматическую мембрану использовали две группы (гомологических ряда) соединений: 2алкилмалонаты и О-ацил-L-малаты. Их неспособность проникать в клетки в зоне концентраций, вызывающих 99%-ое подавление сукцинатоксидазы (*I*₉₉), была проверена с помощью «протонофорного теста» для крайних членов этих рядов, таких как: О-лауроил-L-малат, О-стеароил-L-малат, 2-пентил-малонат, 2-пентадецилмалонат (Рис. 3.21*б*.). 2-Ундецилмалонат – наиболее эффективный ингибитор из тех, действие которых не зависело от количества дрожжевых клеток.

При 99%-м ингибировании (І₉₉) сукцинатоксидазы клеток дрожжей активность пируватоксидазы не подавлялась ни при pH 5,5, ни при pH 6,5 (Рис. 3.21а.). Характерное для действия протонофора на пируватоксидазу клеток S. cerevisiae резкое снижение дыхательной активности при небольшом увеличении его концентрации (Рис. 3.19а., нижняя кривая) 2-ундецилмалоната, наступало концентрациях существенно при (Рис. 3.21*a*.). превышающих величину I_{99} 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 pH 6,5.

Если ингибиторы транспорта сукцината через плазмалемму не проникали в клетку к митохондриям (см. Обзор литературы, раздел 1.2., Рис. 1.3.), являющимся ЭСС, то побочные действия этих ингибиторов на сопряженную систему гарантированно отсутствовали.



Рис. 3.21. *а* – Зависимость относительной скорости окисления клетками *S. cerevisiae* 20 мМ пирувата натрия при рН 6,5, 20 мМ пирувата натрия при рН 5,5, 20 мМ сукцината натрия при рН 5,5 (верхняя, средняя и нижняя кривые, соответственно) от концентрации 2-ундецилмалоната.

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

б – Активность пируватоксидазы клеток в отсутствие 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). Концентрация пирувата натрия – 20 мМ.

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

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

Используя препараты митохондрий из клеток *S. cerevisiae*, мы получили дополнительное свидетельство непроницаемости плазмалеммы для амфифильных ингибиторов транспорта сукцината. О-Пальмитоил-L-малат и О-миристоил-L-малат, являлись конкурентными ингибиторами окисления сукцината и подавляли окисление сукцината в митохондриях гораздо более эффективно, чем в клетках (Таблица 3.2.).

Таблица 3.2. Константы конкурентного ингибирования транспорта ДКБ ацильными производными L-малата в плазмалемме и митохондриях S. cerevisiae.

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

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

3.3.1. Природа стадии, лимитирующей активацию v₄ митохондрий печени крысы мелиттином, мастопараном и ТАМ

Известно, что мелиттин и ТАМ образуют крупноразмерные поры [Huey and Huang, 2009; Matsuzaki et al., 1997; Stankowski et al., 1991]. На момент начала исследований нашей группы (1982 г.) размер пор, образуемых в бислое мастопараном, был неизвестен. Для оценки этого размера мы использовали способность митохондрий быть микроосмометром [Lehninger and Neubert, 1961]. Если в присутствии эффектора (мастопарана) определенные молекулы инкубационной среды становятся осмотически активными, то можно предполагать индукцию в мембране пор соответствующего диаметра. На Рис. 3.22. видно, что мастопаран способствовал пассивному (неэнергозависимому) набуханию не только в 80 мМ калий - фосфатном буфере (при 200 мосМ среды), но и в 240 мосМ манните, сахарозе, сорбите и рафинозе. В митохондриях печени крысы ионы калия, концентрация которых составляет 90 мосМ, [Rossi and Azzone, 1968], могут вытекать через мастопарановые поры. Кроме того, ЭДТА, магний и HEPES из среды инкубации могли через эти поры входить в матрикс органелл. Однако различия в амплитуде набухания в средах, отличающихся только разными сахарами (Рис. 3.22.), свидетельствовали, приобретали молекулы благодаря что именно ЭТИ мастопарану осмотическую активность. Следовательно, величина пор, образованных мастопараном не должна ограничивать подвижность ионов калия и лития в трансмембранном канале.



Рис. 3.22. Зависимость светорассеяния суспензии митохондрий печени крысы в присутствии (кривые 1 – 5) и в отсутствие 1 мкМ мастопарана. Условия: СИ11фосфат – 1, СИ11сорбит – 2, СИ11_{маннит} – 3, СИ11_{сахароза} – 4, СИ11_{рафиноза} – 5. Концентрация митохондрий 0,25 мг/мл.

Крупноразмерные поры, образуемые мелиттином и ТАМ (см. выше), также не должны ограничивать подвижность K⁺ и Li⁺ в трансмембранном канале. Если бы индуцированная мелиттином проводимость определялась скоростью прохождения катионов через пору, то соотношение степеней активации дыхания 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 справочнику [Тимофеева и соавт., 2003]).



Рис. 3.23. Зависимость от времени активации v₄ митохондрий печени крысы в присутствии 500 нМ мелиттина (*a*) и 100 нМ ТАМ (δ) и соответствующая зависимость относительной флуоресценции родамина 123 (пропорциональной $\Delta \psi$ митохондрий печени крысы) (*в*, *г*).

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

Однако, по данным Рис. 3.23а. оно составляло 1,09 (среднее из трех измерений $-1,12 \pm 0,03$). Это независимое, хотя и косвенное свидетельство пользу того, что собственно образование проводящих пор не В лимитировало процесс, связанный с индукцией трансмембранного тока По-видимому, внутренней мелиттином. процессы BO мембране митохондрий печени крысы, измеренные предлагаемым методом, и процессы искусственных мембранных системах, В измеренные традиционными методами, близки.

Для мастопарана (см. Рис. 3.24*a*.) соответствующее соотношение равно 1,18 ± 0,02 (среднее из трех измерений). Это свидетельствует, что активацию дыхания, вызванную мелиттином или мастопараном (и, соответственно, КТТ) лимитировала стадия, предшествующая порообразованию.



Рис. 3.24. Зависимость от времени относительной скорости окисления сукцината митохондриями печени крыс в присутствии 500 нМ мастопарана (a) и соответствующее изменение относительной флуоресценции родамина 123, пропорциональное $\Delta \psi$ в митохондриях печени крысы (δ) .

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

Для мелиттина на липосомах показано, что формирование поры [Takei al., предпоровыми стадиями et 1999]. Для лимитируется мастопарана такие данные в литературе отсутствуют. Согласно Рис. 3.236. соотношение степеней активации дыхания В монокалиевой И монолитиевой средах ТАМ составляло 1,4 (среднее из трех измерений – $1,39 \pm 0,01$). Это согласуется с данными [Stankowski et al., 1991] по оценке времени жизни канала. По-видимому, лимитирующая стадия изменялась. В обоих случаях $\Delta \psi$ в области стабилизированной активации дыхания в монолитиевой и монокалиевой средах можно считать практически неизменным (Рис. 3.23*в*,*г*.).

На (Рис. 3.25.) показаны результаты оценки K_p ТАМ между средой и дышащими митохондриями печени крысы. В присутствии ТАМ, как и мелиттина, активация дыхания митохондрий в диапазоне от 0,1 до 2 мг/мл не зависела от концентрации органелл, что свидетельствовало, что $K_p >> 1 \times 10^5$, а также о том, что блокирование 4-х положительных зарядов не уменьшало сродство модифицированного мелиттина к митохондриям печени крысы.

В молекуле ТАМ блокированы остатки лизина, ответственные за сорбцию мелиттина на кислых липидах [Bechinger, 1997], и величина K_p теоретически могла снизиться. Она необходима для сопоставления истинной эффективности (мембранной концентрации (C_m)) мелиттина и ТАМ. Поскольку зависимость A_{120} ТАМ от концентрации митохондрий идет в 0, это означает, что его $K_p > 10^5$ согласно [Шольц К.Ф. и Захарова, 1980], как и у мелиттина (см. Таблицу 3.10.). Следовательно, оба пептида преимущественно сосредоточены в мембране и относительно большая эффективность ТАМ (см. Рис. 3.23.) – истинная.



Рис. 3.25. *а* - Зависимость максимальной скорости окисления сукцината митохондриями печени крысы (при определенной концентрации пептида) от концентрации ТАМ при различных концентрациях органелл (в мг белка/мл). *б* – Зависимость равноэффективной концентрации ТАМ от концентрации митохондрий (1,2-кратная активация) *Условия*: Среда инкубации СИ2.

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

Мы попытались определить порядок образования предпоры для мастопарана (Рис. 3.26), тенденция к агрегации которого качественно показана в работах [Schwarz and Robert, 2001; Fujita et al., 1994].

Использование модели «all-or-none leakage» репортерного красителя из липосом, сформулированной для мелиттина в работе [Schwarz and Robert, 1992], для этого пептида затруднено [Cabrera et al., 2008], так как время существования поры существенно меньше, чем временная шкала измерения скорости вытекания этого красителя. Зависимость максимальной активации дыхания митохондрий от концентрации мастопарана приведена на Рис. 3.266.

Рассчитанный по данным врезки на Рис. 3.266. концентрационный порядок составляет 1,76 (1,83 \pm 0,23 – среднее из 3-х измерений). Это позволяет предположить, что аналогично мелиттину предагрегация мастопарана лимитирует проводимость, и эта предпора – димер. При действии мастопарана, так же, как и мелиттина, имеет место синхронная со стабилизацией активированного дыхания стабилизация $\Delta \psi$ митохондрий печени крысы (Рис. 3.246.).



Рис. 3.26. *а* - Зависимость от времени относительной скорости окисления сукцината натрия митохондриями печени крысы в присутствии различных концентраций мастопарана.

б - Зависимость максимальной активации v₄ от концентрации пептида; на врезке эти данные приведены в двойных логарифмических координатах.

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

3.3.3. Природа двуфазной зависимости от времени активации v₄ митохондрий печени крысы аламетицином.

Зависимость активации v₄ под действием аламетицина имеет 2 стационарных участка (Рис. 3.27.). Причем 1-й стационарный участок на зависимости от времени мы предположительно связали с КТТ через аламетициновую пору с наименьшей степенью олигомеризации. Согласно этому предположению, в опытах на митохондриях печени крысы в инкубации монотрисовой среде первая фаза активации должна отсутствовать, а при добавлении К⁺ – появляться. На Рис. 3.28*a*. видно, что в монотрисовой среде первая фаза, предположительно, отражающая проводимости пор с наименьшей олигомерностью, отсутствует, а после добавления в среду KCl, она появляется. Аналогичные данные получены не только для коммерческого аламетицина из Tr. viride, но и для синтетического пептида. На БЛМ было показано, что низшее субсостояние исчезает ИЗ флуктуации проводимости одиночного канала, индуцированного пептидом, в средах, содержащих только Tris⁺ или Ca²⁺ [Hanke and Boheim 1980].

Увеличение концентрации Tris⁺ с 30 до 70 мМ не изменило характер зависимостей (данные не приведены). Поскольку гидратированный диаметр присутствующего в средах инкубации Mg²⁺ больше, чем таковой Ca²⁺ [Laatikainen et al., 2007], он не проникает в митохондрии через низкоолигомерные поры аламецитина. В присутствии пептида синхронная оксиграмме зависимость для $\Delta \psi$ (Рис. 3.28*б*.) неуклонно снижалась, что согласуется с литературными данными [Duclohier, 2001; Woolley, 2007] о образования том, что именно скорость канала лимитируют трансмембранный ток. Опираясь на это заключение, по зависимости проницаемости от концентрации индуктора оценивали молекулярность реакции (например, для сирингомицина в [Feigin AM, 1996] или транспортного комплекса-димера A23187 с Ca²⁺ в [Prabhananda et al.,

194

1998]). Необходимое условие для такого подхода: аламетициновые каналы, не проницаемые для Tris⁺ согласно модельным экспериментам [Hanke, 1980], однотипны, и КТТ через них можно считать равным сумме токов через каждый единичный канал.



Рис. 3.27. *а* - Зависимость от времени активации v₄ митохондрий печени крысы в присутствии различных концентраций синтезированного аламетицина. *б* - Зависимость максимальной скорости в первой фазе этой активации от

концентрации пептида; на врезке эти данные приведены в двойных логарифмических координатах.

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

В качестве своеобразного контроля исследовали активацию v_4 митохондрий печени крысы под действием ТАМ, образующего поры, которые не самоорганизуются с помощью последовательного присоединения мономеров. На врезке (Рис. 3.28.), показано, что кривая активации v_4 200 нМ ТАМ в монотрисовой среде имела однофазный характер.





б – соответствующая зависимость относительной флуоресценции родамина 123 (пропорциональной Δψ митохондрий печени крысы).

На врезке – Зависимость от времени относительной активации v₄ митохондрий печени крысы 200 нМ ТАМ в отсутствие KCl.

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

3.3.4. Измерение концентрационного порядка реакции,

лимитирующей КТТ, индуцированный аламетицином в первой фазе активации v₄ митохондрий печени крысы

Для первой фазы активации дыхания митохондрий печени крысы синтетическим аламетицином изучили зависимость эффекта активации от концентрации пептида (Рис. 3.27.) и определили концентрационный порядок стадии, лимитирующей эту активацию. Ранее нами в этих условиях был определен K_p, равный (0,76 ± 0,01)×10³ [Шольц и соавт., 1985]. Это позволяет считать практически весь добавленный аламетицин находящимся в водной фазе, а небольшое количество мембраносвязанного пептида (от 5-ти до 20%) пропорциональным его общей концентрации. Таким определенный образом, порядок, относительно общей концентрации аламетицина, должен быть близок к порядку относительно его мембранной концентрации. Согласно данным на Рис. 3.276., он равен 1,86 (1,92 \pm 0,07 - среднее из 3-х измерений). Это позволило предположить, что аламетициновая пора с наименьшим диаметром содержит липид (и это позволяет каналу при меньшей олигомерности иметь больший диаметр). Такая пора, вероятно, является тороидальной, в высокоолигомерных отличие ОТ чисто пептидных пор пептида. описываемых «barrel-stave» моделью [Woolley, 2007; Laitgeb et al., 2007]. Этот результат соответствует литературным данным по определению в модельных условиях порядка, равного 4, для поры аламетицина, проницаемой для крупноразмерного иона Pr^{3+} [Hunt and Jones., 1982]. Согласно геометрическим расчетам только пентамер (в рамках «barrelstave» модели) способен свободно пропускать гидратированный ион К⁺ [Tieleman et al., 2002]. Уменьшение протяженности площадки с ростом концентрации пептида (Рис. 3.27а.) хорошо согласовалось с увеличением высокоолигомерных соответственно. доли агрегатов, диаметр (и проводимость) которых выше. Соотношение проводимостей каналов аламетицина с разной степенью олигомерности составляет 1:4:20:45:75:110 [Hanke and Boheim., 1980] и даже небольшая примесь высокоолигомерных каналов резко увеличивала проводимость, и в результате, 1-я фаза активации v₄ митохондрий маскировалась 2-й. Если бы плато на зависимости было следствием суммарного эффекта активации дыхания и его торможения под действием пептида, то с ростом концентрации последнего «площадка» должна была бы удлиняться. В качестве своеобразного контроля исследовали активацию дыхания при образовании иной поры, не самоорганизующейся с помощью последовательного присоединения мономеров. На врезке к Рис. 3.28. показана зависимость для 200 нМ ТАМ. Эта кривая имеет однофазный характер. Возможное побочное действие аламетицина на митохондрии печени крысы, мы исследовали, снижая содержание Mg²⁺ в средах инкубации с 5 мМ до 2 мМ. При этом концентрационный порядок снизился до 1,62 ± 0,12. Соотношение активаций в монокалиевой и монолитиевой средах снизилось до 1,23 ± 0,05, за счет большей активации в монолитиевой среде.

3.3.5. Природа стадии, лимитирующей первую фазу активации v₄ митохондрий печени крысы аламетицином.

В модельных системах при индукции пор аламетицином лимитирует собственно скорость их образования [Duclohier and Wróblewski., 2001; Woolley, 2007], поэтому мы вправе ожидать в монокалиевой И монолитиевой средах достаточно высокое соотношение степеней активаций v₄ митохондрий печени крысы в стационарном состоянии. По данным Рис. 3.29. оно составляет 1,35 (1,39 ± 0,04 – среднее из 3-х определений). На Рис. 3.29. видно, что $\Delta \psi$ в этих средах в каждый момент времени отличалась, и для расчета соотношения степеней активаций их приводили к значению при одинаковом $\Delta \psi$ согласно закону Фарадея (см. Материалы и методы). Однако этот результат требует введения поправки на поведение $\Delta \psi$ (см. Рис. 3.296.) в области стабилизированной активации дыхания. На 0,7 мин соотношение $\Delta \psi$ составило согласно формуле: 112,3 мВ / 127,8 мВ = 0,879. По Фарадею, ионный ток в растворе потенциалов. Если пропорционален разности уменьшить Δψ В монолитиевой среде до уровня монокалиевой, то истинное соотношение значений активации будет равно – 1,536. Для 0,8 мин – исправленное соотношение составит – 1,5, для 1 мин – 1,685, для 1,15 мин – 1,64.

Усредненное «исправленное соотношение степеней активации» составило 1,59, что весьма близко к соотношению подвижностей K⁺ и Li⁺ в растворе (1,53, см. раздел 3.3.1.). Возможно, отклонение связано с примембранным концентрированием однозарядных катионов (с ростом ионной силы растет), соотношение чисел переноса хотя при блокировании образованного поверхностного заряда, липидными головками, двухзарядными катионами (5 мМ), это концентрирование существенно уменьшалась [Muller and Finkelstein, 1972]. В модельных системах порообразование аламетицина лимитирует собственно образование каналов и все каналы, как и в наших экспериментах, свободно проницаемы для К⁺ и Li⁺ [Woolley, 2007]. Близость величин, определенных с применением предлагаемого нами метода к «справочным», является независимым свидетельством корректности подхода, основанного на препарата митохондрий печени использовании крысы В качестве биосенсора для измерения КТТ.

Данные, представленные на Рис. 3.56., 3.236, г., 3.246., 3.286. и 3.296. свидетельствуют том, по эффективности подавления 0 что Δψ митохондрий печени крысы при одинаковой активации V_4 (и, следовательно, КТТ), исследуемые нами пороформеры подразделяются на две группы. Первая – умеренно (мелиттин и мастопаран), вторая – радикально (ТАМ и аламетицин) влияющие на $\Delta \psi$. Пептиды второй группы, по-видимому, более гепатотоксичны. В отдельных опытах по изучению побочного (токсичного) действия потенциального лекарства на митохондрии использовали модельные митохондриально-направленные антиоксиданты SkQ1 и SkQThy. Было показано, что эти соединения влияют на $\Delta \psi$ и синтез АТ Φ в митохондриях печени крысы.

Степень активации v₄ согласно интерпретации данных на Рис. 3.1. служит и тестом на сохранение целостности внутренней мембраны митопластов в ходе инкубации с мембраноактивным пептидом. В наших экспериментах в конце кривой активации дыхания тем или иным пептидом всегда добавляли протонофор (FCCP – в зависимостях с валиномицином, приведенных на Рис. 3.3. и 3.4., или SF – в опытах, результаты которых приведены на Рис. 3.5*a*., 3.6*a*., 3.23*a*., 3.26*a*., 3.27*a*., 3.28*a*. и 3.29*a*.). Во всех случаях степень активации v₄ после такой добавки дополнительно возрастала на 0,8 – 3,5 (данные не приведены), что косвенно свидетельствовало о способности внутренней мембраны сохранять потенциал и ее целостности.





 δ – соответствующая зависимость относительной флуоресценции родамина 123 (пропорциональной $\Delta \Psi$ в митохондриях печени крысы),

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

По данным [Kotlyar et al., 2004], после преинкубации митохондрий печени крысы с 2 мкМ аламетицином в течение 5 мин и переосаждения,

они не теряли малатдегидрогеназу (это существенно большая концентрация аламетицина по сравнению с используемой в наших опытах).

3.4. Новый транспортер ДКБ плазмалеммы S. cerevisiae и его энзимологическая характеристика.

До настоящей работы было принято считать, что в плазмалемме S. *cerevisiae* отсутствует опосредованная белком система транспорта С₄-ДКБ [Lodi et al., 2004]. При рН 3,0 был показан только транспорт L-малата, опосредованный диффузией его протонированной формы [Salmon, 1987]. Клетки тетраплоидного штамма S. cerevisiae Y-503 окисляли сукцинат при рН 5,5 (Рис. 3.16.), когда доля его протонированной формы мала. Аналогичные данные были получены и на стандартном для генетических исследований штамме S288c. Гиперболическая зависимость скорости окисления клетками сукцината от его концентрации (Рис. 3.17а.) и его подавление специфическим ингибитором пальмитоилмалатом (Рис. 3.176.), непроникающим в клетку, предполагало существование в плазмалемме специфического сукцинатного транспортера. Аналогичный результат был получен на клетках, выращенных в синтетической среде без малата. Повидимому, дикарбоксилатный транспортер плазмалеммы S. cerevisiae не нуждался в индукции малатом в отличие от переносчиков *P. tannophilus* [Harrod et al., 1997] или *C. utilis* [Cássio et al., 1993].

Субстратную специфичность переносчика плазмалеммы *S. cerevisiae* исследовали на клетках в условиях, лимитирующих транспорт сукцината через плазмалемму. Максимальная скорость окисления L-малата (как в монокалиевой, так и в мононатриевой среде) клетками при pH 5,5 составляла не более 13% от скорости окисления сукцината. К 18-му часу аэробной преинкубации при 0°C она постепенно уменьшалась до 6 – 8 раз. 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. Величина K_i для L-малата, составляющая 17,5 ± 1,1 мМ (из двух независимых определений, по данным Рис. 3.30.), существенно больше величины K_i для О-пальмитоил-L-малата, равной 6,6 ± 1,3 мкМ. Из этого следует, что ацильный заместитель существенно улучшил сродство производного субстрата к транспортеру. Из данных Рис. 3.30. видно, что увеличение концентрации сукцината уменьшало величину I_{50} для L-малата. По-видимому, оба субстрата к оксертивания за общую точку связывания.



Рис. 3.30. *а* - Зависимость скорости окисления 8 мМ сукцината клетками *S. cerevisiae* от концентрации О-пальмитоил-L-малата, координаты Диксона; *б* - Зависимость скорости окисления 8 мМ и 20 мМ сукцината Na от концентрации L-малата K, координаты Диксона. Условия: Среда инкубации – 50 мМ натрий - фосфатный буфер (pH 5,5).

Концентрация клеток –10 мг/мл; аэробная преинкубация при 0°С 18 ч.

Мы изучили действие на дыхание *S. cerevisiae* итаконата и L-малата, соответственно с гидрофобной метиленовой и гидрофильной гидроксильной группой во втором положении молекулы субстрата. Оба вещества не активировали эндогенное дыхание (L-малат из-за его

насыщающей концентрации цитоплазме). На Рис. 3.31. показано, что в условиях, когда транспорт сукцината в клетку лимитировал его окисление, в присутствии итаконата увеличивалась наблюдаемая величина $K_{\rm M}$, а $V_{\rm max}$ не менялась. По-видимому, и итаконат связывается с активным центром переносчика сукцината, конкурентно к этому субстрату (Рис. 3.31*б*.). Данные, приведенные на Рис. 3.31*б*., свидетельствовали о лучшем сродстве более гидрофобного конкурентного (Рис. 3.31*a*.) ингибитора сукцинатоксидазы клеток (соответственно $K_i = 4,15 \pm 0,35$ и 17,5 ± 1,1 мМ).



Рис. 3.31. *а* – Зависимость относительной скорости окисления 10 мМ сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* от концентрации сукцината в присутствии 10 мМ итаконата натрия и без ингибитора, верхняя и нижняя кривые, соответственно (координаты Лайнуивера–Берка);

б – Зависимость относительной скорости окисления 10 мМ сукцината натрия клетками S. cerevisiae от концентрации итаконата натрия и L-малата калия, верхняя и нижняя кривые, соответственно (координаты Диксона).

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

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

Концентрация клеток -a - 5 мг/мл, $\delta - 10$ мг/мл.

Таким образом, у переносчика плазмалеммы, по-видимому, прилегающая к точкам связывания карбоксилов субстрата гидрофобная зона активного центра не взаимодействует с полярной сложноэфирной группировкой О-ацил-L-малатов, а связывает начальные метиленовые звенья 2-алкилмалонатов. Соответственно, можно ожидать на порядок лучшее сродство 2-алкилмалонатов с такой же длиной алифатической цепи, что и О-ацил-L-малаты.

О-Пальмитоил-L-малат увеличивал величину $K_{\rm M}$ сукцинатоксидазы клеток дрожжей, не изменяя $V_{\rm max}$ (Рис. 3.32*a*.). Увеличение концентрации сукцината уменьшало величину I_{50} для L-малата. По-видимому, оба субстрата конкурируют за общую точку связывания. 2-Ундецилмалонат (в опытах с клетками он не проникал в митохондрии, см. раздел 3.2.2.5.), как и О-пальмитоил-L-малат, не влиял на эндогенное дыхание клеток, но ингибировал окисление сукцината.

Ингибирование имело линейный характер в координатах Диксона с величиной $K_i = 35,6 \pm 4,4$ мкМ (из двух независимых определений). Повидимому, активный центр дикарбоксилатного переносчика плазмалеммы связывает не только L-малат, но и малонат. О-Пальмитоил-L-малат и 2ундецилмалонат увеличивали величину K_M сукцинатоксидазы клеток дрожжей, не изменяя максимальную скорость реакции (в отсутствие ингибитора $K_M = 8,2$ мМ и $V_{max} = 12,4$ нмоль/мин/мг сухого веса (Рис. 3.32*a*.). Конкурентный характер действия этих ингибиторов означал, что они взаимодействовали с одной 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 связывается с сукцинатным транспортером плазмалеммы.

В отличие от ДКТ митохондрий, ингибируемого уже 10 мМ фосфатом, изменение концентрации фосфатного буфера с 10 до 50 мМ не влияло на величину $K_{\rm M}$ и максимальную скорость сукцинатоксидазы клеток ($K_{\rm M} = 7,8$ мМ и $V_{\rm max} = 12,6$ нмоль/мин/мг сухого веса и $K_{\rm M} = 8,2$ мМ и $V_{\rm max} = 12,4$ нмоль/мин/мг сухого веса, соответственно).

С большой степенью вероятности можно утверждать, что при рН 6,5 О-пальмитоил-L-малат проникал через не внутреннюю мембрану митохондрий S. cerevisiae. Поэтому, линейная зависимость ингибирования О-пальмитоил-L-малатом сукцината S. окисления митохондриями *cerevisiae* от его концентрации в координатах Диксона (см. Рис. 3.32б.) свидетельствовала о том, что ДКТ внутренней мембраны митохондрий являлся лимитирующим звеном сукцинатоксидазы органелл.



Рис. 3.32. *а* – Зависимость относительной скорости окисления от концентрации сукцината натрия в присутствии 50 мкМ О-пальмитоил-L-малата, 100 мкМ 2ундецилмалоната и без ингибитора, координаты Лайнуивера–Берка. Клетки *S. cerevisiae* аэробно преинкубировали при 0°С 18 ч.

Среда инкубации – 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5).

Концентрация клеток – 10 мг/мл.

б – Зависимость относительной скорости окисления 4 мМ сукцината натрия митохондриями *S. cerevisiae* от концентрации О-пальмитоил-L-малата в присутствии 1 мМ пирувата натрия и 0,025 мкМ SF, координаты Диксона.

Условия: Среда инкубации СИДМ (рН 6,5).

Концентрация митохондрий S. cerevisiae – 0,1 мг белка/мл.

Значения *I*₅₀ О-пальмитоил-L-малата, экстраполированные к нулевой концентрации митохондрий позволили рассчитать величину *K*_i, равную

 $0,24 \pm 0,10$ мкМ (среднее из двух измерений). Она меньше величины K_i для транспортера плазматической мембраны (6,6 ± 1,3 мкМ). Это обстоятельство не позволило избирательно ингибировать транспорт сукцината через плазмалемму при кислых значениях рН. Так, ингибитор эффективно задерживал рост дрожжей при рН 4,5 (по-видимому, диффундируя через бислой плазмалеммы к митохондриям и ингибируя дикарбоксилатный антипортер внутренней мембраны этих органелл), но не при рН 5,5.

Известно, что дикарбоксилатный транспортер митохондрий печени крысы способен связывать малеат, но не фумарат [Palmieri et al., 2000]. На Рис. 3.336., видно, что фумарат, но не малеат, ингибирует транспорт сукцината через плазмалемму эффективно ($K_i = 1,0 \pm 0,1$ мМ) и конкурентно по отношению к сукцинату (Рис. 3.33*a*.).

По-видимому, дикарбоксилаты взаимодействуют с точкой связывания субстратов этого транспортера *S. cerevisiae* в *транс*-конформации. Влияние

конфигурации на эффективность ингибирования согласуется с нашими данными по pH-зависимости сродства, свидетельствующими о транспорте сукцината в дианионной форме.

На Рис. 3.13*а.* скорость окисления сукцината клетками S. cerevisiae увеличивалась в ходе длительной преинкубации при 0°C, но оставалась существенно меньшей, чем скорость окисления пирувата. Известно, что активности сукцинатоксидазы И пируватоксидазы митохондрий соизмеримы. Если бы низкая активность сукцинатоксидазы была связана с небольшой примесью перфорированных клеток, то и стереоспецифичность фумарат/малеат ee ингибирования В паре соответствовала бы митохондриальной. Кроме того, данные приведенные в Таблице 3.2., свидетельствовали о том, что окисление сукцината митохондриями гораздо чувствительнее к О-миристоил-L-малату и О-пальмитоил-L-

206

малату, чем окисление сукцината клетками. Все это свидетельствовало о том, что действием ингибиторов на примесь дрожжей с плазматической мембраной, поврежденной в ходе продолжительной предобработки, можно пренебречь.



Рис. 3.33. *а* – Зависимость относительной скорости окисления от концентрации сукцината в присутствии 10 мМ фумарата натрия и без ингибитора, верхняя и нижняя кривые, соответственно, координаты Лайнуивера–Берка. Клетки *S. cerevisiae* аэробно преинкубировали при 0°С в течение 20 ч.

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

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

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

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

В условиях, когда скорость окисления сукцината была лимитирована его транспортом через плазмалемму, протонофоры FCCP (Рис. 3.19а., средняя кривая) и SF почти не влияли на окисление сукцината, в отличие от активации глюкозы (Рис. 3.19а., верхняя кривая) и ингибирования пирувата (Рис. 3.19а., нижняя кривая). Это позволяет предположить, что транспорт сукцината через плазматическую мембрану осуществлялся не в симпорте с протоном.

Окисление клетками цитрата и сукцината (Рис. 3.34., верхняя, соответственно, Таблица 3.3.) средняя И нижняя оксиграммы, нечувствительно к действию FCCP в концентрации 2 мкМ, максимально увеличивающей скорость окисления глюкозы и максимально снижавшей скорость окисления пирувата (Рис. 3.19а., верхняя и нижняя кривые, соответственно). При pH 5,5 в присутствии Na⁺ скорость окисления цитрата $(v_2 - v_1)$ в 7 раз превышала скорость его окисления в присутствии К⁺ (Рис. 3.34., средняя и верхняя оксиграммы, соответственно, Таблица 3.3.). В отдельных опытах показали, что аналогично от состава среды зависело и окисление сукцината. В присутствии Na⁺ скорости окисления сукцината и цитрата одинаково эффективно (в 4 раза) снижались непроникающим ингибитором – 2-ундецилмалонатом (Рис. 3.34., средняя и нижняя оксиграммы, а также Таблица 3.3.).



Рис. 3.34. Окисление клетками S. cerevisiae цитрата калия в 50 мМ К калий фосфатном буфере (pH 5,5) (верхняя оксиграмма), и цитрата натрия или сукцината натрия в 50 мМ натрийфосфатном буфере (pH 5,5) (средняя и нижняя оксиграммы).

Добавки: клетки (10 мг/мл), 2 мкМ FCCP, 20 мМ сукцинат или цитрат, 300 мкМ 2ундецилмалонат.

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

Таблица 3.3. Скорости эндогенного дыхания клеток S. cerevisiae и скорости окисления цитрата и сукцината при pH 5,5 в присутствии различных катионов (последовательность добавок указана на Рис. 3.34.).

Состав среды	Скорость (пмол О2/мин) после добавления							
инкубации,	Клеток	FCCP	Субстрата		2-Ундецил-			
фосфатный буфер:					малоната			
pH 5,5		(v ₁)	(v ₂)	v ₂ v ₁	(v ₃)	v ₃ – v ₁		
К - фосфатный	3060	3654	Цитрата К (3900)	252	3726	72		
Na - фосфатный	3042	3312	Цитрата Na (5022)	1710	3744	432		
Na - фосфатный	1800	2124	Сукцината Na (5616)	3618	3006	882		

При рН 5,5 О-пальмитоил-L-малат ингибировал окисление сукцината клетками *S. cerevisiae* в координатах Диксона по линейному закону (Рис. 3.30*a*.). Такой же характер ингибирования показан для окисления сукцината и цитрата 2-ундецилмалонатом (Рис. 3.35.). Линейность свидетельствовала о том, что ингибитор подавлял стадию, лимитирующую скорость окисления обоих субстратов. Если ингибитор не проникал в клетку, то лимитирующей стадией являлся транспорт обоих субстратов через плазмалемму (см. Обзор литературы, раздел 1.2., Рис. 1.3.), и особенности их окисления (Рис. 3.34.) связаны с особенностями транспорта этих субстратов. Поэтому можно называть скорость окисления субстратов скоростью транспорта через плазмалемму в условиях, когда подтверждена описанная линейность.

На Рис. 3.35*б*. видно, что для достижения одинакового ингибирования при больших концентрациях цитрата (20 мМ) необходима большая концентрация ингибитора. По-видимому, субстрат «защищает» от ингибирования переносчик цитрата плазмалеммы. На основании данных, приведенных на Рис. 3.35*б*. нельзя исключить вероятность существования двух разных переносчиков: цитратного и сукцинатного, чувствительных к 2-ундецилмалонату.

209

2-Ундецилмалонат увеличивал наблюдаемую величину $K_{\rm M}$, не меняя $V_{\rm max}$ как для сукцината (Рис. 3.36*a*., верхняя зависимость), так и цитрата (Рис. 3.36*б*., верхняя зависимость).



Рис. 3.35. *а* - Зависимость относительной скорости окисления клетками *S. cerevisiae* 20 мМ сукцината натрия от концентрации 2-ундецилмалоната в координатах Диксона.

б - Зависимость скорости окисления клетками *S. cerevisiae* 10 (*1*) и 20 мМ (2) цитрата натрия от концентрации 2-ундецилмалоната в координатах Диксона.

Клетки аэробно преинкубировали при 0°С 14-18 ч.

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

При этом константы конкурентного ингибирования для сукцинатного и цитратного транспорта были соизмеримы (*K*_i 7,8 мкМ и 3,8 мкМ, соответственно) и сопоставимы с величинами *K*_i, рассчитанными из данных, представленных на Рис. 3.35. по зависимости от концентрации ингибитора (6,7 мкМ и 5,7 мкМ, соответственно). В отдельных опытах в условиях, когда скорость окисления цитрата была минимальной, цитрат конкурентно подавлял окисление сукцината клетками. Можно утверждать, что данные, приведенные на Рис. 3.34., 3.35. и 3.36. с высокой долей

вероятности свидетельствовали о том, что сукцинат и цитрат транспортировались в клетку общим переносчиком – активируемым ионами Na⁺ при pH 5,5, протонофор-нечувствительным транспортером ДКБ плазмалеммы *S. cerevisiae* (см. Обзор литературы, раздел 1.2., Рис. 1.3.).



Рис. 3.36. *а* – Зависимость относительной скорости окисления клетками *S. cerevisiae* сукцината натрия от его концентрации в присутствии 50 мкМ 2ундецилмалоната и без ингибитора, координаты Лайнуивера-Берка. Клетки аэробно преинкубировали при 0°С 18 ч.

 δ – Зависимость скорости окисления клетками *S. cerevisiae* цитрата натрия от его концентрации в присутствии 60 мкМ 2-ундецилмалоната и без ингибитора, координаты Лайнуивера-Берка. Клетки аэробно преинкубировали при 0°С 14 ч. *Условия*: Среда инкубации (*a* и δ) – 50 мМ калий - фосфатный буфер (pH 5,5). Концентрация клеток: *a* – 5 мг/мл, δ – 10 мг/мл.

Транспорт цитрата мы исследовали с помощью еще одной ЭСС клетки – сопряженной системы окисления цитрата (далее – цитратоксидазы) митохондриями в клетках *S. cerevisiae*.

В контрольных опытах было показано, что цитратоксидаза препарата митохондрий *S. cerevisiae* не чуствительна к 2-ундецилмалонату (Рис. 3.37.), в отличие от цитратоксидазы клеток (Рис. 3.38.), т.е. объектом

воздействия ингибитора является именно тренспортер плазмалеммы. Эти данные дополнительно свидетельствовали о том, что сравнительно низкая активность окисления цитрата клетками не связана с примесью перфорированных клеток.



0,5

0

цитрат Na

50

+ 20 мМ сукцинат Na

2-Ундецилмалонат, мкМ

25

Рис. 3.37. Зависимость относительной скорости окисления 5 мМ цитрата натрия и сукцината 5 мМ натрия препаратом митохондрий S. cerevisiae (верхняя и нижняя кривые, соответственно) от концентрации 2ундецилмалоната.

Условия: Среда инкубации СИ1 (рН 6,5). Концентрация митохондрий – 1,8 мг/мл.

Рис. 3.38. Зависимость относительной скорости окисления 20 мМ цитрата натрия и 20 мМ сукцината натрия клетками S. *cerevisiae* (20 и 5 мг/мл, соответственно) (верхняя и нижняя кривые, соответственно) от концентрации 2-ундецилмалоната. Условия: Среда инкубации 50 мМ калий фосфатный буфер (рН 6,5).

Таким образом, транспорт сукцината, L-малата и цитрата через плазмалемму S. cerevisiae осуществлялся с помощью транспортера ДКБ. Кроме того, этот переносчик способен связывать малонат, итаконат, малеат и фумарат, конкурентно к сукцинату.

3.4.1. Регуляция транспортера ДКБ плазмалеммы S. cerevisiae катионами. Скорость окисления (и, по-видимому, транспорта) сукцината зависела от рН среды и катиона в среде инкубации (Рис. 3.39.).

Чтобы монокатионные среды инкубации не «загрязнялись» Na⁺ и K⁺, которые выйти добавленных клеток могли ИЗ с помощью FCCP протонзависимых антипортеров плазмалеммы, протонофор добавляли одновременно с клетками дрожжей. При рН 5,5 скорость окисления сукцината в присутствии Na⁺ была выше, чем в присутствии К⁺ или Tris⁺ (Рис. 3.39а., нижняя, верхняя и средняя оксиграммы, соответственно, и Таблица 3.4.). При рН 6,5 (Рис. 3.39б.) скорость окисления сукцината существенно выше, чем при рН 5,5, и скорости в присутствии всех трех катионов: Na⁺, K⁺ и Tris⁺ были соизмеримы по величине (с $Tris^+$ – несколько меньше).

Чтобы проверить, не связан ли эффект К⁺ и Na⁺ с изменением сродства транспортера к сукцинату, сопоставили величины $K_{\rm M}$ при pH 5,5, когда К⁺ заметно (в 4,2 раза) ингибировал транспорт (см. Рис. 3.39., таблица 3.4.). Сукцинат Na в 50 мМ калий-фосфатном буфере, исходно содержащем 72 мМ K^+ (рассчитано по [Dawson et al., 1986]), имел вдвое худшее сродство, чем в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, исходно содержащем 72 мМ Na⁺. Концентрацией катионов, привнесенных пренебрегали. Величины $K_{\rm M}$ добавками субстрата, составляли, соответственно, 7,6 и 3,4 мМ, причем, V_{max} практически не изменялась (Рис. 3.40а.). Аналогичный результат был получен для цитрата (К_м, соответственно, 4,45 и 2,4 мМ) (Рис. 3.40б.). Таким образом, модулирование сродства транспортера к анионам катионами носило «квазиконкурентный» характер.

В то же время катионы по-разному влияли на степень ингибирования окисления (транспорта) сукцината 2-ундецилмалонатом. Она была максимальной в среде с $Tris^+ - 89\%$, и минимальной в среде с $Na^+ - 65\%$, в то время как в среде К⁺ получены средние значения – 77% (Таблица 3.4.).



Рис. 3.39. Зависимость от времени окисления клетками S. cerevisiae сукцината калия (верхняя оксиграмма), Tris - сукцината (средняя оксиграмма) и сукцината натрия (нижняя оксиграмма).

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

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

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

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

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

Поскольку именно в мононатриевой среде так называемый транспортер ДКБ имел максимальное сродство к сукцинату, а также сохранял высокую активность при pH 5,5 (Рис. 3.39*а*., нижняя оксиграмма), мы исследовали влияние pH на кинетические параметры транспорта сукцината в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (Таблица 3.5.).

Таблица 3.4. Влияние катионов на скорость транспорта сукцината в клетки *S. cerevisiae*. (последовательность добавок указана на Рис. 3.39.).

Состав	Скорость (пмол О2/мин) после добавления							
среды инкубации:	клеток + FCCP	сукцината		2-ундецил				
фосфатный буфер	(\mathbf{v}_1)	(катион) (v ₂)	$v_2 - v_1$	малоната (v ₃)	v ₃ - v ₁			
К - фосфатный, рН 5,5	1512	(K ⁺) 2106	594	-	-			
Tris - фосфатный, pH 5,5	1386	(Tris ⁺) 2214	828	-	-			
Na - фосфатный, pH 5,5	1674	(Na ⁺) 4140	2466	-	-			
К - фосфатный, рН 6,5	1980	(K ⁺) 5940	3960	3348	1368			
Tris - фосфатный, pH 6,5	1692	(Tris ⁺) 3726	2034	1980	288			
Na - фосфатный, pH 6,5	1980	(Na ⁺) 6120	3708	4140	2160			



Рис. 3.40. Зависимость скорости окисления внешнего субстрата клетками *S. cerevisiae* от его концентрации в присутствии 72 мМ К⁺ и 72 мМ Na⁺, координаты Лайнуивера-Берка.

а – Субстрат – сукцинат Na, концентрация клеток – 5 мг/мл. Клетки аэробно преинкубировали при 0°С в течение 18 ч.

б – Субстрат – цитрат Na, концентрация клеток – 10 мг/мл. Клетки аэробно преинкубировали при 0°С в течение 14 ч.

Условия: Среда инкубации – 50 мМ калий - фосфатный буфер, рН 5,5

После определения зависимости каждого активности OT концентрации сукцината (типичный график на Рис. 3.416., верхняя зависимость), в той же оксиметрической кривой снимали зависимость от непроникающего 2-ундецилмалоната. Линейность концентрации зависимости в координатах Диксона (типичный результат на Рис. 3.41., верхняя зависимость) подтверждала, что скорость окисления при измерении К_М по-прежнему лимитирована активностью переносчика плазмалеммы. В условиях, когда зависимость от 2-ундецилмалоната нелинейна, величина K_M по сукцинату не зависела от pH в диапазоне 5,5 – 7,5 (типичный график для рН 7,5 приведен на Рис. 3.41а., нижняя зависимость) и составляла 0.84 ± 0.3 мМ. Эта величина не зависела также от вида катиона в среде инкубации при рН 6,5. Приведенное значение хорошо совпадало с величиной К_М для сукцината при окислении этого субстрата препаратом дрожжевых митохондрий, выделенных нами из клеток S. cerevisiae, выращенных В стандартных условиях на полусинтетической среде (0,85 ± 0,173 мМ при рН 6,5). Этот результат свидетельствовал о том, что, когда не лимитирован транспорт через плазмалемму (Рис. 3.41., нижняя зависимость), дыхание клеток в присутствии сукцината лимитировала скорость окисления сукцината митохондриями этих клеток. Согласно литературным данным, значение pH цитоплазмы дышащих клеток не изменялось при вариации рН среды инкубации от 4 до 8 [Beauvoit et al., 1991, Purwin et al., 1986, Pena et al., 1972], а изменение концентрации внешнего Na^+ от 0 до 300 мМ не влияло на концентрацию внутриклеточного Na^+ [de Nadal et al., 1999]. Это подтверждает, что скорость и кинетические параметры окисления сукцината митохондриями в клетке могли оставаться неизменными при использованных нами вариациях рН, катионного состава среды и преинкубации клеток в течение 8 - 16 ч при 0°С перед измерением.
Исследуя механизм транспорта ДКБ через плазмалемму S. cerevisiae, мы предложили в качестве наиболее вероятного механизма облегченную 4 способа диффузию, экспериментально отвергнув остальные функционирования переносчика: симпорт ДКБ с протоном или катионом, АТФ-зависимый транспорт и электронейтральный антипорт. Однако в мембранах Enterococcus faecalis [Blancato et al., 2006] и нейронов пиявки Hirudo medicinalis [Gunzel et al., 2005] описан транспорт дианиона малата в Me^{2+} . электронейтрального комплекса c Известен виде также электрогенный, Н⁺-зависимый переносчик комплекса магния и цитрата (CitM) Bacillus subtilis [Boorsma A. et al., 1996.].

Не исключено, что в ходе длительной аэробной преинкубации при 0°С суспензии клеток, из них выходят катионы двухвалентных металлов. Клетки S. cerevisiae содержат Mg²⁺ в количестве 0,0024 мг/мг [Duszkiewicz-Reinhard et al., 2005], а катионы железа, кобальта и цинка – в количестве 0,142, 0,774 и 2,292% от содержания Mg²⁺ [Pisat et al., 2009], соответственно. Если механизм транспорта комплекса [Me²⁺сукцинат²⁻] возможен, то добавление к клеткам Mg²⁺ или EDTA, который мог бы связать другие вышедшие из клетки Me²⁺, должно было существенно влиять на скорость окисления сукцината. Нами было изучено влияние Mg²⁺ EDTA⁴⁻ в среде инкубации И на ундецилмалонат зависимый (трансплазмалеммный) транспорт сукцината в клетки S. cerevisiae.

Можно предположить, что в ходе преинкубации весь магний, содержащийся в суспензии клеток, эквивалентных 1,38 мг сухого веса (3,3 $\times 10^{-6}$ г, или 1,36 $\times 10^{-7}$ моль), оказался за пределами клеток. Однако даже в этом случае концентрация катиона (0,136 мМ) в среде инкубации была бы недостаточной, чтобы обеспечить транспорт 3 мМ сукцината в виде электронейтрального комплекса.



Рис. 3.41. Зависимость скорости окисления сукцината натрия клетками S. cerevisiae от концентрации 2-ундецилмалоната (в координатах Диксона) (a) и от концентрации сукцината натрия (в координатах Лайнуивера-Берка) (б).

Условия: концентрация сукцината Na – 10 мМ (*a*); среда инкубации - 50 мМ натрий - фосфатный буфер, pH 7,5. Клетки (5 мг сырого веса/мл) аэробно преинкубировали при 0°С в течение 18 и 12 ч (*a*, *б*).

На Рис. 3.42*а*. показано, что добавление 5 мМ MgCl₂ не увеличивало скорость окисления 3 и 20 мМ сукцината, причем магний практически не уменьшал сродство к сукцинату: $K_{\rm M} = 3.8 \pm 0.6$ мМ и 4.2 ± 0.5 мМ, в присутствии и в отсутствие 5 мМ MgCl₂, соответственно. По-видимому, транспорт сукцината в виде комплекса с магнием маловероятен. На Рис. 3.42*6*. показано, что добавление 0.8 мМ ЭДТА (концентрации достаточной, чтобы связать катионы железа в количестве 0,193 мкМ, кобальта – 1,05 мкМ или цинка – 1,99 мкМ) не уменьшало скорость окисления. Повидимому, транспорт сукцината в виде комплекса с любым из перечисленных Me²⁺, также маловероятен.



Рис. 3.42. Зависимость от времени окисления сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* в присутствии и в отсутствие MgCl₂ (*a*) или EDTA натрия (б). Клетки выращивали в полусинтетической среде 12 ч и преинкубировали при 0°C 22–26 ч.

Условия: Среда инкубации (*а* и б) – 50 мМ калий - фосфатный буфер (pH 5,5). Концентрация клеток – 1,38 мг/мл.

Данные Рис. 3.42. противоречат также механизму диффузии через канал, активируемой Me^{2+} , как это описано для 32pS анионного канала в тонопласте *Conocephalum conicum* [Trebacz et al., 2007]. Суммируя все приведенные результаты, можно утверждать, что механизм электронейтрального транспорта сукцината в комплексе с Me^{2+} не имеет место при функционировании 2-ундецилмалонат зависимого протонофор нечувствительного (трансплазмалеммного) транспортера ДКБ *S. cerevisiae*.

3.4.2. рН профиль транспортера ДКБ плазмалеммы *S. cerevisiae*. Исследовали влияние рН на $K_{\rm M}$ и $V_{\rm max}$ транспорта сукцината в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (Таблица 3.5.). При каждом значениии рН линейность ингибирования транспорта 2-ундецилмалонатом в координатах Диксона подтверждала его лимитироваение переносчиком плазмалеммы. При отклонении от линейности (и лимитировании окисления сукцината его транспортом в митохондрии) величина $K_{\rm M}$ по сукцинату не зависела от значений рН в диапазоне 5,5 – 7,5, при которых внутриклеточное значение

рН не меняется [Purwin et al., 1986; Beauvoit et al., 1991; Peña et al., 1972]. Величина $K_{\rm M}$ по сукцинату в этих условиях составляла 0,84 ± 0,3 мМ, и была близка к величине $K_{\rm M}$, полученной для препарата митохондрий, выделенных нами из клеток *S. cerevisiae* (0,85 ± 0,17 мМ) при рН 6,5. рН-Оптимум для $V_{\rm max}$ находился в щелочной области. Увеличение величины $K_{\rm M}$ для сукцината с увеличением рН, связано, по-видимому, с увеличением доли дианионной формы субстрата. В пересчете на дианион величина $K_{\rm M}$ оставалась постоянной (Таблица 3.5).

Таблица 3.5. Влияние рН 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)*
<i>К</i> _М , мМ	-	$3,4 \pm 0,2$	$1,63 \pm 0,13$	$1,65 \pm 0,02$
$K_{\rm M}$, мМ в пересчете на дианион сукцината по [Dawson et al., 1986]	-	1,45	1,38	1,65
V _{max} , нмоль О ₂ /мг сырого веса	0,05<	$1,67 \pm 0,07$	$2,06 \pm 0,03$	3,3 ± 0,01

* В скобках указано количество измерений.

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, Рис. 3.33*б*.). Такая стереоспецифичность в ингибировании возможна при связывании дианионной формы субстрата с активным центром переносчика.

3.5. Моделирование «ненапряженной» конформации 2алкилмалонатов, О-ацил-L-малатов и α,ω-алкилендималонатов с помощью пакета программ Chemoffice.

Большинство белков переносчиков низкомолекулярных соединений имеют внутримолекулярный канал, через который И происходит трансмембранный транспорт [Dahl, 2004]. Причем, «область к субстрату (точка связывания определения сродства» субстрата) экспонирована в канал или находится в его устье [Dahl, 2004]. Это позволяет использовать систематический ингибиторный анализ с помощью амфифильных производных субстрата для оценки липофильности канала. Для тех переносчиков, для которых получена трехмерная структура, канал выглядит как трансмембранная цилиндрическая полость. Как будет показано ниже (раздел 3.6.), одинаковый характер липофильности в активных центрах транспортеров и модельной системе (октанол, 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 уравновешивающее влияние вакууме, поскольку микроокружения отсутствию влияния. Вытянутая конформация эквивалентно ЭТОГО характерна для состояния молекулы амфифила в вакууме с наименьшей суммой энергий связывания и отталкивания между атомами в молекуле. Исходя из вышеизложенного, были проведены моделирование молекулызонда с помощью пакета программ Chemoffice, и расчет минимальной энергии конформации с помощью программы ММ2. Модели строились с помощью последовательного удлинения предыдущего соединения на одно этильное звено. Конформацию на виртуальной модели несколько раз намеренно искажали, а затем с помощью программы снова рассчитывали «ненапряженную» конформацию.

Поскольку алифатический заместитель в молекуле субстрата не содержал атомов с неспаренными электронами, расчета с помощью программы 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 и помещали в таблицы. Сравнение между рядами соединений позволяли заметить, что разница в длине между О-ацилмалатами и 2-алкилмалонатами с одинаковым алифатическим заместителем – 0,229 нм.

2-Алкилмалонат	Длина от C _n до O ₁ , O ₂ , O ₃ , O ₄ (нм)	Средняя	Энергия
		длина	(дж/моль)
		(нм)	
2-метилмалонат	0,280 0,358 0,275 0,369	0,321	55,6746
2-бутилмалонат	0,695 0,630 0,527 0,514	0,592	60,3921
2-гексилмалонат	0,761 0,880 0,750 0,930	0,830	61,6519
2-октилмалонат	1,194 0,996 1,009 1,123	1,081	62,9270
2-децилмалонат	1,247 1,440 1,269 1,348	1,326	64,1304
2-додецилмалонат	1,521 1,693 1,600 1,498	1,578	65,4079
2-тетрадецилмалонат	1,898 1,775 1,681 1,559	1,728	64,0961

Таблица 3.6. Моделирование «ненапряженной» конформации 2-алкилмалонатов.

Примечания: Начиная с 2-децилмалоната, удлинение за счет последнего этильного звена не менялось, и было равно 0,252 нм, а длина проекции последнего метильного звена на ось заместителя, соответственно, 0,126 нм. По этой причине соединения от 2-пентадецил- до 2-гептадецилмалоната отсутствуют в таблице; n – число атомов углерода в алифатической цепи ингибитора.

Таолица 3.7	. Моделировани	ие «ненап]	ряжені	НОЙ» К	онфо	ормаці	ии О-ац	ил-L-N	малатов.	
-	_									

О-ацил-L-малат	Длина от C_n до O_1 , O_2 , O_3 , O_4 (нм)	Средняя	Энергия
		длина	(дж/моль)
		(нм)	
О-ацетоил-L-малат	0,435 0,539 0,434 0,540	0,485	43,5573
О-бутироил-L-малат	0,793 0,884 0,761 0,823	0,815	46,0741
О-капроноил-L-малат	1,055 0,999 1,135 1,040	1,057	47,3509
О-каприлоил-L-малат	1,289 1,387 1,245 1,298	1,305	48,6281
О-каприноил-L-малат	1,544 1,494 1,642 1,541	1,555	49,9058
О-лауроил-L-малат	1,792 1,895 1,794 1,745	1,807	51,1831
О-миристоил-L-малат	2,045 2,149 2,044 1,997	2,059	52,4612

Примечания: Начиная с О-каприлоил-L-малата, удлинение за счет последнего этильного звена не менялось, и было равно 0,252 нм, а длина проекции последнего метильного звена на ось заместителя, соответственно, 0,126 нм. По этой причине О-пальмитоил-L-малат и О-стеароил-L-малат отсутствуют в таблице; n – число атомов углерода в алифатической цепи ингибитора.

α,ω-Алкилендималонат	Длина O ₁ -O ₁ , O ₂ -O ₂ , O ₃ -O ₃ ,O ₄ -O ₄ *	Средняя	Энергия
	(нм)	длина	(дж/моль)
		(нм)	
дималонат	0,373 0,471 0,471 0,373	0,440	232,9865
1,2-этилендималонат	0,621 0,561 0,615 0,576	0,593	252,7576
1,4-бутилендималонат	0,872 0,753 0,747 0,877	0,815	220,9483
1,6-гексилендималонат	1,037 1,044 1,073 0,072	1,056	200,5710
1,8-октилендималонат	1,368 1,366 1,359 1,353	1,362	178,4871
1,11-ундециленмалонат	1,613 1,654 1,877 1,856	1,750	167,3219

Таблица 3.8. Моделирование «ненапряженной» конформации α,ω-

 1,11-ундециленмалонат
 1,613
 1,654
 1,877
 1,856
 1,750
 167,3219

 Примечания:
 * Расстояния между симметричными атомами кислорода карбоксилов

алкилендималонатов.

первой и второй малоновых группировок в α, ω -алкилендималонатах.

3.6. Зондирование активного центра ДКТ митохондрий печени крысы с помощью амфифильных производных субстратов, липофильный профиль канала.

Для всех α, ω-алкилендималонатов И О-ацил-L-малатов В координатах Диксона были получены линейные зависимости подавления этими ингибитороми сукцинатоксидазы митохондрий печени крысы, что свидетельствовало о том, что K_i характеризовал лимитирующее звено – ДКТ. Для крайних членов ряда 2-моноалкилмалонатов, а также для 2моноалкилмалонатов, находящихся в точках перегиба на зависимости $\lg K_{i}$ от n (числа углеродов в алифатическом заместителе ингибитора), для всех α.ω-алкилендималонатов и О-ацил-L-малатов было показано. что ингибиторы повышали величину $K_{\rm M}$ сукцинатоксидазы митохондрий, не меняя ее V_{max}. На Рис. 3.43. приведены типичные зависимости для представителей этих классов соединений. Показано, что бутироил- и стеароил-L-малаты – крайние члены ряда ацил-L-малатов, миристоил-L-И 1,11-ундецилендималонат Kм малат повышали значения сукцинатоксидазы митохондрий, не меняя максимальной скорости процесса (Рис. 3.43*а*, б, в.).

Для диалкилмалонатов и некоторых моноалкилмалонатов такие зависимости ранее были получены коллегами автора [Шольц и соавт., 1990; Бондаренко и соавт., 1996]. Таким образом, величина *K*_i скорости сукцинатоксидазной реакции в подобранных условиях отражала сродство ингибиторов к ДКТ. Конкурентный характер действия всех этих ингибиторов означал, что они взаимодействуют с точкой связывания субстрата в активном центре переносчика.

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

Изменение констант ингибирования производных малата и малоната с алифатическим «хвостом» при удлинении на одно метиленовое звено $(\Delta \lg K_i = \lg K_{i(n)} - \lg K_{i(n-1)})$ характеризовало степень липофильности в районе связывания последней метильной группы. Причем зонд измерял удаленность этого района от остатков аргинина точки связывания. Зависимость $\lg K_i$ от п далее назвали липофильным профилем (Рис. 3.44.).

По-видимому, липофильный профиль характеризует внутреннюю поверхность канала. В случае с бифункциональными ингибиторами – α , ω -алкилендималонатами, при их использовании планировалось обнаружить вероятную дополнительную точку связывания дикарбоксилата в канале переносчика. На Рис. 3.44*б*. видно, что липофильные профили для О-ацил-L-малатов и 2-алкилмалонатов имеют значительное сходство. Обе кривые имеют площадку для n от 4 до 8 (связывание с полярной зоной) и область уменьшения $\lg K_i$ для n от 8 до 15 (связывание с большим липофильным участком). Эта область описывается уравнением: $\lg K_i = -0,38n + 1,41$. Повидимому, одинаковые участки алифатической цепи О-ацил-L-малатов и 2-моноалкилмалонатов связывались общими зонами канала переносчика. Зависимости коэффициента распределения О-ацил-L-малатов (R_n) в системе октанол/калий - фосфатный буфер, pH 7,2, описывались уравнением: $lgR_n = 0,406n - 5,42$. Величины коэффициента при n в уравнениях для зависимостей lgK_i и для lgR_n близки. $\Delta\Delta G = RT\Delta lgK_i = 941,5$ ± 277 Дж/моль – молярная энергия переноса метиленового звена алкильного заместителя в ингибиторе из среды в активный центр переносчика. $\Delta\Delta G = RT\Delta lgR_n = 999,2 \pm 270$ Дж/моль – молярная энергия переноса метиленового звена алкильного заместителя в ингибиторе из среды в октанол (R – универсальная газовая постоянная, а T – абсолютная температура).



Рис. 3.43. Зависимость скорости окисления сукцината митохондриями печени крысы от концентрации сукцината натрия в координатах Лайнуивера-Берка: *а* – в присутствии 8 мкМ О-стеароил-L-малата (1) и 6,8 мМ О-бутироил-L-малата (2), а

также без ингибитора (3);

 δ – в присутствии (1) и в отсутствие (2) О-миристоил-L-малата;

в – в присутствии (1) и в отсутствие (2) 62,5 мкМ 1,11-ундецилендималоната.

Условия: Среда инкубации СИЗ; Концентрация митохондрий – 0,5 мг белка/мл.

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





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

6 – Зависимость константы ингибирования сукцинатоксидазы митохондрий печени крысы О-ацил-L-малатами и 2-алкилмалонатами от числа атомов углерода (n) их в алифатической цепи, верхняя и нижняя зависимости, соответственно.

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

2-Алкилмалонаты и О-ацил-L-малаты – это две линейки для измерения длины липофильной зоны канала переносчика. Желательно было выяснить: прикладываются ли они к точке отсчета в активном центре

дикарбоксилатной «головкой» или началом алифатического «хвоста». Реперная площадка, которая имеет место в полученных профилях обоих рядов (Рис. 3.446.), свидетельствовала о большей вероятности второго предположения.

В Таблице 3.9. приведены результаты сравнительного зондирования 2,2-диалкилмалонатами активных центров сукцинатдегидрогеназы печени крысы и ДКТ печени крысы, имеющих одинаковый субстрат – сукцинат. Дополнительные заместители вблизи карбоксильных групп уменьшали сродство соединения к ферменту гораздо сильнее, чем к транспортеру. Повидимому, область в непосредственной близости от субстратсвязывающей точки транспортера относительно просторна. В этой области более длинный О-ацил-L-малатный зонд (длина сложноэфирной связи – 0,229 нм) может свернуться так, чтобы расстояние от дикарбоксилатов до первого углерода алифатического «хвоста» было таким же, как у 2-алкилмалонатов.

Таблица 3.9. Зависимость конкурентного ингибирования сукцинат: феррицианид– редуктазной реакции СМЧ и сукцинатоксидазы митохондрий печени крысы от количества заместителей в молекуле малоната.

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

Примечания: В скобках при цифрах – количество независимых измерений или ссылка, среда инкубации СИЗ.

Как показано на Рис. 3.45., липофильный профиль для α,ωалкилендималонатов имел значительное сходство с таковым для высших 2алкилмалонатов (пунктирная линия на рисунке). Имело место плато на зависимости до n, равного 6, и область снижения $\lg K_i$ на участке с n – от 6 Вероятно, равноудаленные от субстратсвязывающей точки до 11. метиленовые звенья обеих групп ингибиторов взаимодействовали с одинаковыми зонами в переносчике. Каждый соответствующий α,ωалкилендималонат ингибировал слабее 2-алкилмалоната. Значение K_i 2алкилмалоната меньше значения *K*_i соответствующего бифункционального ингибитора (Рис. 3.45.). Низшие дималонаты, по-видимому, не связываются с малым липофильным участком канала. Кроме того, для массивной малоновой группы в ω-положении всех дималонатов могут существовать стерические препятствия в узком канале транспортера.



Рис. 3.45. Зависимость константы ингибирования сукцинатоксидазы митохондрий печени крысы α,ω-2алкилендималонатами И алкилмалонатами 0Т числа атомов углерода В алифатической цепи ингибитора (n), верхняя и нижняя кривые, соответственно. Условия: Среда инкубации СИЗ. Концентрация митохондрий – 0,25 мг/мл.

3.7. Зондирование активного центра транспортера ДКБ *S. cerevisiae* с помощью амфифильных производных субстратов, липофильный профиль канала.

Линейные зависимости ингибирования производными субстратов транспортера ДКБ в координатах Диксона, свидетельствующие о лимитировании сукцинатоксидазы клеток транспортом через плазмалемму, получали для каждого ингибитора. Для крайних членов ряда 2алкилмалонатов (2-пентилмалоната и 2-пентадецилмалоната) и для крайних членов ряда производных L-малата (собственно, L-малата и Остеароил-L-малата) показано, что ингибиторы повышали величину $K_{\rm M}$ сукцинатоксидазы клеток, не меняя V_{max} процесса. По различным причинам не все соединения оказались пригодными для зондирования переносчика плазмалеммы S. cerevisiae, по сравнению с ДКТ печени крысы (Рис. 3.44аб.). Как следует из данных, приведенных на Рис. 3.44а., липрофильные профили для О-ацил-L-малатов и 2-алкилмалонатов у сукцинатоксидазы клеток S. cerevisiae линейны и параллельны между собой. Зависимости описывались соответствующими уравнениями: $\lg K_{i} = -$ 0,427n + 1,323 и lgK_i= - 0,396n - 0,115. С увеличением степени гидрофобности соединения возрастало его сродство к активному центру. Зависимость коэффициента распределения О-ацил-L-малатов (R_n) в системе октанол/калий - фосфатный буфер, рН 5,5 (Рис. 3.46.), описывалась уравнением: $lgR_n = 0,416n - 3,46$.

Величины коэффициентов при n в уравнениях для зависимостей $\lg K_i$ (n) и для lgR (n) близки и, по-видимому, по причинам, аналогичным вышеописанным митохондриального транспортера для – степени гидрофобности стенок канала и отсутствие стерических препятствий для связывания. Отсутствие реперной площадки, которая имела место в профиле митохондриального переносчика (Рис. 3.44б.), не дало нам возможность предположить, что молекулярные линейки: 2-алкилмалонаты и О-ацил-L-малаты прикладывались к одной и той же точке канала началом алифатического «хвоста». Мы изучили действие на дыхание S. и L-малата, соответственно, с гидрофобной cerevisiae итаконата метиленовой и гидрофильной гидроксильной группой BO втором положении молекулы субстрата. Данные на Рис. 3.316. свидетельствовали о лучшем сродстве для итаконата ($K_i = 4,15 \pm 0,35$), более гидрофобного конкурентного ингибитора транспортера ДКБ клеток по сравнению с Lмалатом ($K_i = 17,5 \pm 1,1$ мМ).

По-видимому, в отличие от митохондриального переносчика, гидроксил L-малата не участвовал в связывании с транспортером ДКБ плазмалеммы, и полярное сложноэфирное звено О-ацил-L-малатов могло входить в канал. Это, в свою очередь, позволило предположить, что вся длина ингибитора участвовала в сканировании канала транспортера плазмалеммы клеток.



Рис. 3.46. Зависимость коэффициента распределения О-ацил-L-малатов (*R*_n) в системе октанол/50 мМ калий - фосфатный буфер (pH 5,5) и (pH 7,2), верхняя и и нижняя зависимости, соответственно; п – число атомов углерода в алифатической цепи ингибитора.

3.8. Методические достижения и анализ новых свойств пороформеров.

Из Таблицы 3.10. следует, что предложенный нами подход позволяет исследовать характеристики индукторов проницаемости в диапазоне $C_{\rm m}$ 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 и Захарова, 1980]), это соответствовало соотношениям пептид/липид от 1/625 до 1/54. Причем для аламетицина эта зона соотношений (вблизи 1/625) не была изучена из-за недостаточной чувствительности 230

Сопоставление литической и эффективной методов. традиционных концентрации (ККЛ/А200) свидетельствовало о том, что амфифильные пептиды не разрушали митохондрии, используемые нами в качестве биосенсора. Кроме того, такое сопоставление позволит предварительно оценить возможное гепатотоксическое и терапевтическое действие пороформеров – потенциальных лекарств. Возможно, липид в бислое полностью дезорганизован при пептид - липидном соотношении, близком к ККЛ, так как это преимущественно «припептидный» липид. В таком случае при соотношениях от 1/625 до 1/54 можно игнорировать его кооперативный эффект, а присутствие $\Delta \Psi$ поддерживало весь мембраносвязанный пептид в трансмембранном состоянии.

Парамотр	Название пептида (среда инкубации, в которой получены характеристики)						
Параметр	Мастопаран (СИ2)		Мелиттин (СИ5)		ТАМ (СИ6)	Аламетицин (СИ6)	
A ₂₀₀ , мкМ	1,15±0,15	(3)	0,385±0,015	(2)	0,08 [**]	0,065±0,004 (2)	
K _p	$(0,73\pm0,04) \times 10^{5}$	(3)	>>1×10 ⁵ [**]		$>>1\times10^{5}$ (2)	2) $(0,76\pm0,01) \times 10^3$ (2)	
<i>C</i> _m , мкМ	4600		1540		320	40	
ККЛ, мкМ	15,6±0,1	(3)	3,8 [**]		0,6 [**]	2,9±0,1 (3)	
ККЛ/А ₂₀₀	13,6		9,9		7,5	44,6	
Порядок реакции	1,83±0,23	(3)	2,01±0,15	(2)	-	1,92±0,07 (3)	
$A_{\mathrm{K}^+}/A_{\mathrm{Li}^+}$	1,18±0,02	(3)	1,12±0,03	(3)	1,39±0,01 (3	B) 1,39±0,04(1,59*) (3)	
Подавление Δψ	умеренное стабилизирующееся			радикальное			
Самоассоциат, лимитирующий проводимость	непроводящая предпора			пров	одящая пора		

Таблица 3.10. Эффект пороформеров на митохондрии печени крысы.

Примечания: В скобках при цифрах – количество независимых измерений или ссылка, концентрация митохондрий печени крысы равна 0,25 мг/мл кроме строки с K_p , A_{200} – концентрация пептида, активирующая v₄ на 200%, равноэффективная мембранная концентрация (C_m), соответствующая A_{200} , рассчитанная как описано в [Шольц, Захарова, 1980].

 * – с поправкой на разную скорость снижения ΔΨ в монолитиевой и монкалиевой средах.

** – Шольц и соавт., 1980.

Скорости порообразования измеряли в стационарном режиме в течение минут, поскольку набухание тяжелой фракции митохондрий в присутствии пороформеров в течение почти 15 мин не приводило к повреждению внутренних мембран органелл (Рис. 3.1.) и влияло на их способность генерировать $\Delta \psi$. В этих условиях формальный порядок реакции отражал именно реакцию ассоциации мономеров на лимитирующей стадии порообразования. Именно в этом метод с применением биосенсора имел неоспоримые преимущества по сравнению с традиционными методами, хотя применим в узком диапазоне значений температуры, ионной силы и вариаций липидного состава мембраны. Классический метод вытекания репортерного красителя из липосом через формируемые исследуемыми пептидами поры чуствителен к степени гомогенности липосом и не приспособлен к поддержанию $\Delta \psi$. К исследованию порообразования мастопараном этот метод не применим даже теоретически [Cabrera et al., 2008]. Прямой подход (использование сшитых гибким линкером димеров и тетрамеров) к исследованию связи между степенью олигомерности и проводимостью для аламетицина в попытке стабилизировать низшие проводящие субсостояния пептида в БЛМ не привели к однозначным результатам [Huang, 2006]. Поэтому использование непрямых методов измерения KTT, по-видимому, неизбежно.

В трансмембранном состоянии α-спирализованные мономеры исследованных нами пороформеров имеют близкие геометрические параметры. Можно предположить одинаковую частоту их бинарных столкновений в бислое. Поскольку для всех трех пороформеров при образовании каналов лимитировала бимолекулярная реакция (порядок реакции близкий к 2, см. Таблицу 3.10.), то можно сравнить длительность существования предпоры мелиттина с таковой мастопарана, а также низкоолигомерной поры аламетицина. Равноэффективная мембранная

концентрация (C_m) аламетицина и мелиттина, по-видимому, отражала в этих условиях среднее время жизни (СВЖ) димера, которое зависит от скоростей его образования и распада, а также скорости его превращения в иной олигомер. При низких концентрациях аламетицина скоростью образования тримеров можно пренебречь. По сравнению со скоростью образования предпоры скорость трансформации предпоры мелиттина в пору мала [Pawlak et al., 1991] и ею также можно пренебречь. Содержание гидрофобной фазы мембраны в формуле расчета C_m условно приравняли к удельной концентрации липида митохондрий печени крысы (λ) (см. примечания к Таблице 3.10). При расчете соотношения $C_{\rm m}$ двух пептидов λ сокращалась, и мы получили соотношение СВЖ (38,5) димерной предпоры мелиттина И низкоолигомерной поры аламетицина. Аналогично отношение СВЖ мелиттина и мастопарана – 0,32. Предложенный подход дает возможность в перспективе сопоставить СВЖ димерного состояния модифицированного и нативного пороформеров.

В литературе сложилась практика распространять на представления о пептидном характере пор, экспериментально обоснованные только для высокоолигомерных пор, на низкоолигомерные поры. Мы предположили, что низкоолигомерная пора аламетицина содержала липид (см. раздел 3.3.4.). Пептидная пора свободно пропускала гидратированный К⁺ в том случае, если она пентамер [Chiriac and Luchian, 2007], а нами определен порядок реакции формирования низкоолигомерной поры, равный 2-м. Хотя модель тороидальной (липидсодержащей) поры для аламетицина непопулярна, результаты противоречат некоторым наши не взаимодействии представлениям И экспериментальным данным 0 аламетицина с липидами бислоя. Трансмембранный мономер пептида формирует в обоих лепестках бислоя лунку с утонченным бислоем, что сближении) мономеров при столкновении (и даже способствует электропорации бислоя и формированию липид - пептидной поры (см.

Обзор литературы, раздел 1.5., Рис. 1.11.). Предполагается, что это приводит к ее стабилизации [Kessel et al., 2004] т.е. увеличению СВЖ по сравнению с чисто липидной порой. Тороидальная пора с участием облегчает переход пептидов аламетицина ИЗ наружного лепестка мембраны во внутренний. При этом дополнительная стабилизация поры может происходить за счет энергетически выгодной ассоциации двух молекул аламетицина в противофазе: «голова к хвосту» [Mottamal and Lazaridis, СВЖ 2006]. низших субсостояний проводимости, соответсвующих низкоолигомерному аламетицину, более чувствительно к вариациям pH липидной поверхности и дипольному потенциалу мембраны [Chiriac and Luchian, 2007], чем СВЖ 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 лимитирует активацию v4 органелл.

Ключевым в исследовании проницаемости, индуцированной низкоолигомерной формой аламетицина, являлось разделение во времени КТТ через фракцию этих и более высокоолигомерных каналов. В модельных системах (БЛМ) это удается только в рамках «метода одиночного канала», который исключает исследование зависимости проводимости от концентрации пептида. Нижняя ступенька в «пирамидке» проводящих субсостояний аламетициновой поры имеет наименьшую амплитуду (см. Обзор литературы, раздел 1.5., Рис. 1.10.) и это вынуждает исследователей использовать высокие концентрации катионов. Нами

предложено объяснение, почему именно митохондрии позволяют разделить во времени КТТ, индуцированный фракциями низко- и аламетицина (Рис. 3.27.). высокоолигомерных каналов Внутренняя митохондрий обогащена преимущественно гидрофобными мембрана белками. И белки, и мономеры пороформеров, окружены оболочкой из липидов, увлекаемой при двумерной диффузии в бислое. Это, повидимому, делает их столкновения «неупругими», а контакты в момент столкновения относительно долгоживущими. При достаточно низкой концентрации аламетицина в мембране ($C_{\rm m} = 40$ мкM, соотношение 1/625) формальный пептид/липид — «свободный» пробег между столкновениями собственно мономеров аламетицина может быть существенно больше, чем в БЛМ или липосомах при аналогичном соотношении.

Данные, представленные на Рис. 3.36., 3.56., 3.236, г., 3.246., 3.286. и 3.296, свидетельствовали о том, что по эффективности подавления $\Delta \psi$ в митохондриях печени крысы при одинаковой активации (и, V_4 следовательно, КТТ) исследуемые нами пороформеры подразделялись на 2 группы: умеренно (мелиттин и мастопаран) и сильно (ТАМ и аламетицин) влияющие на $\Delta \psi$. Причем, данные о соотношении активации v_4 митохондрий печени крысы этими пороформерами в монокалиевой и монолитиевой средах (см. разделы 3.3.1. и 3.3.5.) свидетельствовали о том, что трансмембранный ток, индуцированный мастопараном и мелиттином, лимитировался самоассоциацией мономеров в непроводящую предпору, а TAM индуцированный И низкоолигомерным аламетицином, ток, лимитировался процессом образования поры. На Рис. 3.47. представлена модель этой самоассоциации и наиболее вероятные равновесные формы олигомеров. Существенно, что сравнительно небольшая модификация мелиттина, а именно, блокирование 4-х положительных зарядов (ТАМ),

изменяла механизм порообразования, хотя величина коэффициента распределения при этом не изменялась.



Рис. 3.47. Модель самоассоциации пептидов - пороформеров в мембране: *a* – мелиттина или мастопарана; *б* – аламетицина или ТАМ; стрелка, выделенная жирным, иллюстрирует сдвиг равновесия.

3.9. Уникальные свойства транспортера ДКБ плазматической мембраны *S. cerevisiae*.

До настоящей работы было принято считать, что в плазматической мембране *S. cerevisiae* отсутствует опосредованная белком система транспорта C₄-ДКБ [Lodi, 2004; Salmon, 1987] При рН 3,0 был продемонстрирован только транспорт L-малата, опосредованный диффузией его протонированной формы [Salmon, 1987]. В настоящей работе впервые показано, что дыхание клеток *S. cerevisiae* в присутствии сукцината не связано с его диффузией, а обусловлено существованием в плазматической мембране транспортера ДКБ. Об этом свидетельствовали следующие факты:

1. Окисление сукцината (рК_а 4,21 и 5,72) [Dawson et al., 1986] клетками при рН 6,5 и 7,5 в отсутствие его недиссоциированной формы (Рис. 3.39., Таблица 3.5.).

2. Зависимость скорости окисления от концентрации сукцината в форме кривой с насыщением (Рис. 3.32.). Причем величины $K_{\rm M}$ для сукцината различались у переносчика плазмалеммы *S. cerevisiae* и транспортера митохондрий, выделенных из этих клеток (соответственно 4,4 ± 1,3 мM и 0,85 ± 0,2 мM в близких по катионному составу (Na⁺/K⁺) средах инкубации, pH 6,5).

3. Существование не проникающего в клетку эффективного (*K*_i = 6,6 ± 1,3 мкМ) конкурентного ингибитора окисления сукцината – О-пальмитоил-L-малата, конкурентного к этому субстрату (Рис. 3.32.).

Увеличение скорости окисления сукцината после аэробной преинкубации клеток при 0°С (Рис. 3.13а.) нельзя объяснить появлением доли клеток с поврежденной плазматической мембраной. О-пальмитоил-Lмалат ингибировал окисление сукцината препаратом митохондрий пости в 30 раз эффективнее, чем его окисление интактными клетками (соответственно, $K_i = 0.24 \pm 0.10$ и 6.6 ± 1.3 мкМ).

4. Модулирование катионами и pH среды инкубации (при постоянном ионном составе и pH цитоплазмы) величин $K_{\rm M}$ и $V_{\rm max}$ окисления сукцината клетками *S. cerevisiae* в условиях лимитирования по транспорту через плазмалемму.

5. Стереоспецифичность ингибирования окисления сукцината в условиях лимитирования транспортом через плазмалемму, что свидетельствует о транспорте субстрата в форме дианиона. И фумарат, и малеат имеют одинаковые pK_a [Dawson et al., 1986], и недиссоциированная и однозарядная формы этих ДКБ ингибировали бы одинаково.

Соотношение скоростей окисления клетками пирувата и сукцината составляет $162,2 \pm 8,1$ к $13,8 \pm 0,4$ нмоль/мин/мг сухого веса. Можно было бы предположить малоактивный транспорт сукцината в моноанионной форме монокабоксилатным транспортером, а также другими протонными симпортерами плазмалеммы *S. cerevisiae*, переносящими вещества с

близкой к сукцинату структурой: уреидосукцинат [Turoscy and Cooper, 1979; Turoscy and Cooper, 1987] и аспартат [Regenberg et al., 1998]. Однако активность всех этих переносчиков подавляется протонофорами. Таким образом, нами впервые было доказано существование специфического транспортера сукцината в плазмалемме *S. cerevisiae*.

Поскольку зависимость ингибирования окисления сукцината и цитрата непроникающим в клетку ингибитором 2-ундецилмалонатом в координатах Диксона линейная (без переломов), то можно говорить о единственном переносчике. pH Профиль активности транспортера (Таблица 3.5.) свидетельствует о транспорте субстратов в дианионной форме, а ингибирование фумаратом, но не малеатом (Рис. 3.33.) позволяет предположить, что субстрат транспортируется в цис-конформации. Малеат является конкурентным ингибитором сукцинатоксидазы митохондрий, выделенных из клеток *S. cerevisiae*.

Широкая субстратная специфичность характерна для известных дикарбоксилатных транспортеров дрожжей [Lodi et al., 2004; Saayman et al., 2000]. Однако способность транспортировать цитрат, а также влияние катионов на транспортную активность для них не описаны. Исследованный нами транспортер не имеет аналогов среди транспортеров ДКБ плазмалеммы грибов. Na⁺-зависимые ДКБ-симпортеры плазмалеммы, способные транспортировать цитрат, найдены у животных [Pajor, 2006], pacтений [Diatloff et al., 2004], и бактерий [Lolkema et al., 2005]. Модуляция транспортной активности катионами известна для некоторых антипортеров цвиттерионных (но не кислых) аминокислот млекопитающих [Deves et al., 1998]. В тех случаях, когда грибы (например, Penicillium simplicissimum [Gallmetzer et al., 1998]) способны экскретировать одновременно цитрат и дикарбоксилаты, не показана одинаковая чувствительность транспорта к специфическому ингибитору. В наших опытах переносчик ДКБ плазмалеммы S. cerevisiae переносил L-малат, сукцинат, малонат и фумарат. Позже [Jamalzadeh et al., 2012] были получены экспериментальные свидетельства присутствия в плазмалемме *S. cerevisiae* чувствительного к pH транспортера фумарата.

Свойства изучаемого нами переносчика позволяют высказать предположение о возможном механизме его функционирования. Как отмечалось выше, известны следующие механизмы: симпорт дикарбоксилата с протоном или катионом, АТР-зависимый транспорт, электронейтральный антипорт и облегченная диффузия [Lolkema et al., 2005], и переносчики других субстратов с такими механизмами функционирования описаны плазмалемме S. cerevisiae (см. Обзор литературы, разделы 1.2. и 1.4.). Устойчивость транспорта к протонофору в концентрациях, деэнергизующих плазмалемму, показанная на Рис. 3.19а., средняя зависимость, позволяет отвергнуть в качестве механизма симпорт ДКБ с протоном. Это, в свою очередь, позволяет исключить возможность того, что изучаемый нами транспорт – побочная функция известных симпортеров плазмалеммы S. cerevisiae, переносящих вещества с близкой к сукцинату структурой: уреидосукцинат [Turoscy and Cooper, 1979; Turoscy and Cooper, 1987] и аспартат [Regenberg et al., 1998]. Окисление сукцината клетками S. cerevisiae нечувствительно к действию протонофора в концентрациях, активирующих окисление глюкозы (Рис. 3.19а., средняя и зависимости, соответственно). Такая верхняя активация, по всей вероятности, связана с разобщением митохондрий и сопутствующим этому внутриклеточной концентрации ATΦ. уменьшением Это делает с помощью АТФ-зависимых маловероятным транспорт сукцината переносчиков плазмалеммы S. cerevisiae. Электронейтральный антипорт в физиологически целесообразного механизма подразумевает качестве соизмеримые концентрации ДКБ по обе стороны плазмалеммы. Для изучаемого переносчика они должны быть соизмеримы с величиной $K_{\rm M}$ для сукцината, колеблющейся при pH 6,5 от $1,63 \pm 0,13$ мМ (Таблица 3.4.)

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 К_м для сукцината составляют для *P. tannophilus* – 0,064 мМ [Harrod et al., 1997], для Kluyveromyces marxianus – 0,031 мМ [Côrte-Real et al., 1989], для С. utilis- 0,124 мМ [Cássio et al., 1993]). Способность клеток S. cerevisiae окислять сукцинат в среде, в которой единственным катионом является непроникающий катион Tris⁺ (Рис. 3.39., средняя оксиграмма), делает маловероятным симпорт с катионом в качестве возможного механизма транспорта. Обычно качестве косубстрата дикарбоксилатные В симпортеры используют только катионы щелочных металлов [Pajor, 2006]. Невысокое сродство и широкая субстратная специфичность делают маловероятным функционирование изучаемого нами переносчика в качестве сенсора к регулирующему метаболиту, как это описано для узкоспецифичных транспортеров фосфата [McDonald et al., 2001] и 1996], обладающих сравнительно низкой [Ozcan al., глюкозы et активностью в клетке S. cerevisiae, но высоким сродством к субстрату. Мы также показали, что электронейтральный транспорт дикарбоксилата в комплексе с двухзарядными катионами маловероятен. Наши данные о свойствах транспортера не противоречат механизму кинетических облегченной диффузии или унипорта. В этом случае исследованные нами катионы могли бы быть модуляторами сродства через самостоятельный аллостерический центр. В соответствии с данными, приведенными на Рис. 3.40., ион К⁺ (в рамках этого механизма) мог бы быть модулятором сродства дианиона сукцината. Катионный состав и рН могут изменяться во внешней среде, но не в цитоплазме S. cerevisiae [Purwin et al., 1986; de Nadal et al., 1999]. Следовательно, предполагаемый регулирующий центр транспортера должен быть эспонирован во внешнюю среду.

В процессе роста клетки *S. cerevisiae* закисляют внешнюю среду за счет выброса протона при функционировании АТФ-азы, доминирующего белка плазмалеммы [van der Rest et al., 1995], а значение pH цитоплазмы клеток *S. cerevisiae*, выращенных в присутствии глюкозы, составляет 6,5 – 7,0 [Beauvoit et al., 1991]. Низкая активность изучаемого нами транспортера и невысокое сродство к субстратам (Таблица 3.5.), характерное, скорее, для переносчиков внутренних органелл [Шольц, 1994], а также транспорт субстрата в дианионной форме, эффективный при нейтральных pH, позволяют предположить, что физиологическая роль этого переносчика – рецепция высокой концентрации внешних ДКБ.

3.10. Особенности структуры активного центра ДКТ митохондрий печени крысы.

Для ряда митохондриальных переносчиков (цитратного [Xu et al., 2000], 2-оксоглутаратного [Stipani et al., 2001] и аденилатного [Marty et al., 1992]) показано, что замена инвариантных остатков аргинина, глубине трансмембранных сегментов, приводит находящихся В К необратимой потере активности. У ДКТ митохондрий печени крысы три консевативных остатка аргинина локализованы во внутренней трети трансмембранных сегментов II, IV и VI [Fiermonte et al., 1999] и только Arg-72 во втором сегменте является инвариантным и для животных и для дрожжей [Xu et al., 2000] (подробнее см. Обзор литературы, раздел 1.7.). Неясно, этих основных остатков могут участвовать какие ИЗ В формировании субстратсвязывающих центре точек В канала дикарбоксилатного транспортера.

Однофазность зависимостей в координатах Диксона для О-ацил-Lмалатов, α,ω-алкилендималонатов, а также 2-алкилмалонатов и 2,2-

диалкилмалонатов [Шольц и соавт., 1990] свидетельствовала о том, что все они взаимодействуют с единственным белком – ДКТ, с субстратом которого – сукцинатом они конкурируют. Если при связывании каждого из эффекторов активный центр переносчика находился в одной и той же конформации, то различия в ингибировании определялись особенностями субстратсвязывающей точки и ее ближайшего окружения. Для О-ацил-Lмалатов, 2-алкилмалонатов (Рис. 3.44.) и α,ω-алкилендималонатов (Рис. 3.45.) сходство липофильных профилей для n > 3 позволяло предположить, что одинаковые участки алифатической цепи связывались одними и теми же участками канала транспортера. Ряд фактов свидетельствовал о существовании просторной области активного центра в непосредственной связывания субстрата. Параметры сродства близости от точки К транспортеру для малоната, 2-метилмалоната и 2,2-диметилмалоната близки (Таблица 3.9.). Сравнительно невысокое сродство субстратов к дикарбоксилатному транспортеру, по-видимому, требует не многоточечного взаимодействия и жестко конфигурированного плотного окружения, В отличие ОТ окружения субстратсвязывающей точки сукцинатдегидрогеназы. В отличие фермента, 2-метилмалонат ОТ ингибировал переносчик существенно слабее малоната (Таблица 3.9.).

Отсутствие скачкообразного увеличения сродства 1,6для 1,2гексилендималоната сравнению диметилмалонатом по с И этилендималонатом позволило предположить, что полярная зона канала транспортера, разделяющая большой и малый липофильные участки, не содержала катионных групп. Таким образом, в канале транспортера отсутствовала промежуточная точка связывания субстрата.

Зависимости для О-ацил-L-малатов и 2-алкилмалонатов эквидистантны на всем протяжении, причем совпадают и протяженности линейных участков, и координаты точек перегиба (Рис. 3.44.). Связывание транспортером протяженного участка (для n от 8 до 17) алифатической

цепи О-стеароил-L-малата или 2-гептадецилмалоната обеспечивает 50 -60% всей энергии связывания ингибитора в активном центре. Однако карбоксильные группы каждого О-ацил-L-малата удалены от первого углерода алифатического заместителя на 0,318 нм дальше по сравнению с соответствующим 2-алкилмалонатом. Следовательно, в «ненапряженной» конформации головка ацильного производного может находиться на 2,34 длины алифатической связи (n) дальше от большого липофильного участка, в котором прочно заякорен «хвост». Это позволяет предположить существование двух близко расположенных потенциальных точек связывания: «малатной» и «малонатной». Связывание бифункционального ингибитора одновременно с двумя точками должно было бы быть эффективнее, чем с одной (примерно, 2lg K_i малоната). Однако значения K_i для дималоната и 1,2-этилендималоната составляли соответственно 0,50 и 0,53 мМ и были соизмеримы со значением K_i малоната – 0,35 мМ [Indiveri et al., 1989]. Это свидетельствовало об одной общей точке связывания для обоих субстратов в активном центре. Маловероятно, что связывание малата вместо малоната вызывало такое конформационное изменение транспортера, при котором полярная зона и протяженная липофильная область в полости канала сдвигаются вдоль оси канала, сохраняя свои размеры. Так после превращения аспартат/глутаматного антипортера в неспецифическую пору энергия активации транспортера не изменялась [Herick and Krämer, 1995]. По-видимому, связывание субстрата вносило незначительный вклад в энергию активации.

Если точки связывания головок и хвостов обоих рядов ингибиторов совпадают, ацилмалат В активном центре транспортера должен поворачиваться вокруг своей сложноэфирной связи. При этом связи между углеродом карбоксильной группы малата и первым углеродным атомом заместителя образуют кольцеобразную структуру, и тогда расстояние линией, соединяющей карбоксилы, между И первым углеродом алифатического заместителя становится равным таковому между соответствующими группами 2-алкилмалонатов (моделирование С помощью программы Chemoffice, MM2). Такое изменение конформации может уменьшить сродство всех О-ацил-L-малатов по сравнению с 2-(Рис. 3.44б.). Кроме кольцеобразной алкилмалонатами того, для конформации необходима относительно просторная область. Эту гипотезу косвенно подтверждает способность ДКБ с различными расстояниями между карбоксилами (оксалата, малоната, сукцината, глутарата и адипата) ингибировать переносчик [Passarella et al., 1972].

α,ω-Алкилендималонаты и 2-алкилмалонаты имели перегиб В липофильном профиле в области n = 7 (Рис. 3.45.). Это дополнительно свидетельствовало о том, что их малонатные головки связываются общей $K_{\rm i}$ субстратсвязывающей точкой. 2-алкилмалоната Ki меньше соответствующего бифункционального ингибитора (Рис. 3.45.). Низшие дималонаты, по-видимому, не связывались с малым липофильным участком канала. Кроме того, для массивной малоновой головки в ω положении дималонатов существовать стерические всех могли препятствия в узком канале транспортера или в среднем худшее связывание с каналом всех дималонатов, могло отражать энергетические потери при дегидратации дополнительной малоновой группы.

Таким образом, результаты сравнительного зондирования активного центра дикарбоксилатного переносчика хорошо описывались следующей стереоспецифичная моделью: к L-малату единственная субстратсвязывающая точка содержит две катионные группы и находится в просторной области, а два липофильных участка и разделяющая их гидрофильная зона – в узком канале, образованном липофильными трансмембранными сегментами. Воротами, препятствующими проникновению воды через канал, служит большой липофильный участок. Транспортер флуктуирует между двумя состояниями, активный центр

которых последовательно доступен только из матрикса митохондрий или только из цитоплазмы. Комплекс ингибитора с транспортером, повидимому, фиксировал открытую в матрикс конформацию. Алифатическая цепь ингибитора связывалась с полуканалом между субстратсвязывающей точкой транспортера и экспонированной в цитоплазму (in vivo) областью белка. Этот полуканал сужен и не содержал воды. Вероятно, дегидратация дополнительной малоновой группы α,ω-алкилендималонатов при образовании комплекса приводила К замедлению установления стационарной ингибирования скорости транспорта ЭТИМИ бифункциональными ингибиторами. В открытом активном центре мог происходить обмен между связанным и свободным субстратами. После перехода активного центра в альтернативное состояние этот центр становился доступным для свободного субстрата на обратной стороне мембраны. Тем самым обеспечивался транспорт по обменному механизму Подобные (антипорт). состояния, фиксируемые соответственно карбоксиаттрактилатом бонгкрековой кислотой И описаны для аденилатного транспортера [Klingenberg, 1989].

Трикарбоксилатный, аденилатный И дикарбоксилатный транспортеры митохондрий ингибируются ацилами-КоА конкурентно к своим субстратам. Качественная зависимость интенсивности ингибирования от числа углеродов в ацильном заместителя (n) до 10-го атома одинакова и линейна в координатах $lgK_i(n)$ [Morel et al., 1974]. Для дикарбоксилатного транспортера это явление было подтверждено и в опытах по окислению сукцината препаратом митохондрий в присутствии протонофора [Ventura et al., 2005]. Это позволило предположить сходство ближайшего окружения точки связывания в канале для всех трех переносчиков и использовать для описания ДКТ 3D-модель аденилатного переносчика, как было предложено [Walters and Kaplan, 2004] (Рис. 3.48.). Ha модели было показано установленное нами распределение

липофильных и гидрофильных зон на внутренней поверхности канала транспортера (Рис. 3.48.).

Ha сравнительного основании анализа первичных структур митохондриальных антипортеров в свете обобщенной трехмерной модели [Walters and Kaplan, 2004], была предложена модель переносчика с одной точкой связывания субстрата в канале [Cappello et al., 2006]. Две группы исследователей, изучающих цитратизоцитратный [Ma et al., 2007] и 2оксоглутаратный [Cappello et al., 2006] транспортеры митохондрий дрожжей, получили противоположные данные о количестве точек связывания дианиона субстрата в канале. Причем они применили совершенно идентичный подход: с одинаковой обобщенной трехмерной моделью антипортера, созданной на базе кристалографических данных по аденилатному переносчику [Walters and Kaplan, 2004], сопоставили последовательность соответствующего переносчика. первичную Обе группы исследователей провели сканирование поверхности III и IV трансмембранных сегментов с помощью точечного цистеинового мутагенеза и изучили их доступность для гидрофильных SH-агентов в присутствии и в отсутствие субстрата. Это позволило идентифицировать остатки, определяющие $K_{\rm M}$ и $V_{\rm max}$ и, соответственно, связанные с путем транслокации цитрата [Kaplan et al., 2000; Ma et al., 2007] и 2оксоглутарата [Cappello et al., 2006], соответственно. Только ДЛЯ цитратизоцитратного, но не 2-оксоглутаратного переносчика путь транслокации субстрата в канале содержал две неперекрывающиеся точки связывания субстрата.

В основе интерпретации полученных нами результатов лежала общепринятая для митохондриальных антипортеров модель, а данные по ингибиторному анализу ДКТ с использованием α,ω-алкилендималонатов являлись независимым экспериментальным указанием на единственную точку связывания в канале. Предложенная модель и наш подход к

ингибиторному анализу позволили конкретизировать задачи по выяснению роли незаряженных гидрофильных остатков, которые входят в состав трансмембранных липофильных сегментов. Для ДКТ митохондрий печени крысы это: Ser-11, Ser-67, Ser-163, Ser-199, Ser-200 [Fiermonte et al., 1998], причем 1-й, 2-й, 3-й и 5-й остатки серина, являются инвариантными для пяти организмов (мыши [Das et al., 1999], крысы [Fiermonte et al., 1998], нематоды *Caenorhabditis elegans* [Fiermonte et al., 1998], дрожжей S. cerevisiae [Xu et al., 2000] и человека [Fiermonte et al., 1999]). Наличие только одной полярной области в липофильном профиле переносчика, посвидетельствовало, ЧТО не все пять видимому, остатков серина экспонированы в полуканал между субстратсвязывающей точкой и экспонированной в цитоплазму поверхностью молекулы транспортера. В перспективе при последовательной точечной замене этих остатков на неполярный и при сохранении транспортером активности можно выявить остаток, ответственный за полярную зону в канале, а также остаток, ответственный за стереоспецифичность транспортера по отношению к Lмалату. Зондирование активного центра позволит «позиционировать» содержащий замену сегмент относительно субстратсвязывающей точки и выделить поверхность трансмембранного сегмента, экспонированную в канал. В соответствии с шагом α-спирали каждый четвертый – пятый остаток от выявленного, отсчитанный по первичной структуре, также будет экспонирован в канал. Для цитратного [Xu et al., 2000] и αкетоглутаратного транспортеров [Stipani et al., 2001] митохондрий с помощью точечных замен в первичной структуре было показано, что только в одном из шести трансмембранных сегментов молекулы транспортера существуют функционально важные консервативные остатки аргинина. Принимали, что аргинин этого сегмента заведомо экспонирован в канал, и показали, что каждый четвертый остаток от него после замены на Cys становился доступным для растворимого модифицирующего агента [Kaplan et al., 2000; Stipani et al., 2001]. При этом исследовали «открытую» конформацию канала, в то время как мы зондировали «закрытую». Рентгеноструктурные данные, полученные для единственного члена семейства митохондриальных переносчиков [Pebay-Peyroula et al., 2003], показали, что, в то время как внешние концы сегментов формируют открытый полуканал, внутренние их концы формируют закрытый. Липофильность внутреннего полуканала не исключала существования обводненного внешнего полуканала [Marty et al., 1992], и наоборот.

Таким образом, разрабатываемые нами пути сканирования липофильного профиля активного центра ДКТ могут привести к воссозданию его трехмерной структуры. К настоящему времени известно 50-ти рентгеновских структур переносчиков более гидрофильных субстратов [Dahl et al., 2004]. Только некоторые из них имеют достаточное (1,2 Å). разрешение чтобы установить аминокислотные остатки, выстилающие канал транспортера [Dahl et al., 2004]. Показано, что пути иона в калиевом канале [Jiang et al., 2002] и иона аммония [Andrade et al., 2005] в одноименном транспортере бактерий выстланы гидрофобными аминокислотными остатками, а ацетилхолинзависимый канал синапсов в открытом состоянии содержит значительное количество полярных остатков [Miyazawa et al., 2003]. При этом вопрос об изменении степени липофильности при функционировании каналов переносчиков пока не решен.

По-видимому, субстратсвязывающая точка, обеспечивающая неконкурентное по отношению к сукцинату и малату связывание фосфата и фенилфосфата [Bisaccia et al., 1988], находится за пределами канала переносчика, пропускающего сукцинат, малонат и малат. Можно предположить существование ДКТ в двух конформационных состояниях (фосфатпереносящем и малатпереносящем). Только малатпереносящий

конформер связывал бутилмалонат [Bisaccia et al., 1988] и изучался с помощью молекулярных зондов – конкурентов малата в нашей работе.

3.11. Липофильный профиль канала транспортера ДКБ плазматической мембраны *S. cerevisiae* и перспективы получения липофильных профилей точечных мутантов.

Трехмерные структуры дикарбоксилатных транспортеров не для интерпретации результатов применялись изучены, и модели, созданные на основании рентгеноструктурных данных для ИНЫХ переносчиков [Walters and Kaplan, 2004; Doyle et al., 1998]. α-Спиральные трансмемембранные участки молекулы переносчиков плазматической мембраны, в отличие от митохондриальных [Walters and Kaplan, 2004] окружают канал почти в 2 слоя [Dahl et al., 2004], но показано, что за специфичность к сукцинату Na⁺/дикарбоксилатного симпортера печени кролика отвечает только 4 сегмента из 12-ти [Pajor et al., 1998]. Для подобных переносчиков зондирование канала вблизи точки связывания субстратов с помощью ингибиторов – производных этих субстратов, является весьма информативным. В соответствии с данными, приведенными на Рис. 3.48., канал митохондриального ДКТ имеет полярную зону в этой области и обладает переменной липофильностью (липофильная зона – 1,2 нм, гидрофильная площадка – 0,4 нм). Переносчики из митохондриального семейства существенно отличаются от транспортеров плазматической мембраны и размером, и количеством трансмембраных сегментов, и механизмами функционирования. Их объединяет только наличие канала в структуре. Можно предположить, что ЭТОТ канал – единственное место в структуре переносчика, где ингибиторе алифатическая цепь В конкурентном сможет иметь конформацию с минимальной энергией, как предсказывают углы наклона зависимостей логарифма K_i от длины этой цепи. Мы принимаем, что

переносчик ДКБ плазмалеммы соответствует модели, которая применяется ко всем известным к настоящему времени специфическим переносчикам небольших гидрофильных молекул. Модель калиевого канала бактерий была создана на основе рентгеноструктурных данных с высоким разрешением [Doyle et al., 1998] (Рис. 3.48.).

Модель содержит цилиндрическую полость – канал (гидрофобный для калиевого канала), асимметрично большое гидрофильное устье, обращенное во внешнюю среду и меньшее – в цитоплазму. Единственная зона определения селективности находится в большом устье. Вход и выход из транспортера всегда окружены выступающим в среду гидрофильным валиком, а канал сформирован преимущественно гидрофобными αспирализованными трансмембранными сегментами (см. Обзор литературы, 1.8.). Эта особенность позволила нам постулировать, что раздел алифатический «хвост» амфифильных конкурентных ингибиторов в комплексе с транспортером плазмалеммы «свисает» именно в канал. В противном случае около 80% длины «хвоста» наиболее длинных огибать ингибиторов обширную гидрофильную должна зону, И липофильный профиль представлял бы собой параллельную оси абсцисс прямую, как площадка на профиле ДКТ митохондрий печени крысы (Рис. 3.44.), или участок с небольшим наклоном, как вблизи активного центра [Шольц и соавт., 1990]. Если малатная сукцинатдегидрогеназы малонатная головки ингибитора транспортера плазмалеммы S. cerevisiae связывались в одной точке, что косвенно подтверждает наши данные по сравнительной эффективности ингибирования итаконата и L-малата, то канал переносчика плазматической мембраны оставался бы липофильным на расстоянии от точки связывания субстрата, равном длине О-стеароил-Lмалата (2,5 нм).



Рис. 3.48.

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

Гидрофильная область голубая; липофильная – желтая. Расстояния по вертикали масштабированы, а по горизонтали условны (например, толщина стенок канала и диаметр поры).

Длины молекулярных зондов рассчитаны, как описано, см. Результаты и обсуждение, раздел 3.5.

Можно предположить, что канал переносчика плазматической мембраны гидрофобен и на большем удалении от точки связывания субстрата. Зависимость, приведенная на Рис. 3.44., не проявляла тенденции к отклонению от линейности при больших значениях n, как в случае митохондриального транспортера (Рис. 3.44.). Протяженность гидрофобного участка липофильного профиля оценивали как разницу длин О-стеароил-L-малата (2,52 нм) и 2-пентилмалоната (0,75 нм) – самого длинного и самого короткого молекулярных зондов. Она составила 1,77 нм. Липофильный канал транспортера ДКБ плазмалеммы *S. cerevisiae* имел

сходство с каналом калиевого переносчика бактерий [Doyle et al., 1998] и гидрофильного транспортера отличался ОТ канала глюкозы плазматической мембраны клеток человека [Zuniga et al., 2001]. Для калиевого канала протяженность гидрофобной зоны, рассчитанная по его трехмерной структуре [Doyle et al., 1998], составляла 2,4 нм. В настоящее время исследуемый нами переносчик, по-видимому, единственный дикарбоксилатный транспортер, которого охарактеризовали для липофильность внутренней поверхности канала.

Имеется множество литературных данных, свидетельствующих о том, что консервативные остатки аргинина в составе трансмембранных сегментов могут претендовать на роль катионов, связывающих карбоксилы в активном центре дикарбоксилатных транспортеров плазмалеммы, и эти остатки сосредоточены в 1-м участке канала. Для молекул переносчиков плазматической мембраны с известной трехмерной структурой показано, что липофильные сегменты, рассчитанные по гидропатическим профилям, не начинаются в молекуле в одной плоскости и не перпендикулярны плоскости мембраны [Dahl et al., 2004] (см. Обзор литературы, раздел 1.8.), как это обычно представляют на схемах [Majima et al., 2002; Bojunga et al., 1998]. Поэтому, положение субстратсвязывающей точки относительно начала или конца канала невозможно предсказать в результате анализа положения остатков аргинина в первичной структуре. Может оказаться информативным искажение линейного липофильного профиля канала (появление площадки как на Рис. 3.44.) в результате точечной мутации (замены гидрофобного а. о. на гидрофильный) в переносчике. Подход позволит позиционировать эту точку на поверхности трансмембранного сегмента, которая экспонирована в канал, относительно остатков аргинина точки связывания субстрата. Хотя трансмембранные сегменты дикарбоксилатного транспортера митохондрий печени крысы содержат 1998], площадка на единичные остатки серина [Fiermonte et al.,
липофильном профиле хорошо выражена (Рис. 3.44.). В то же время известно, что цитратизоцитратный транспортер дрожжевых митохондрий с точечной заменой единичного остатка в III трансмембранном сегменте функциональную немодифицированного сохранял активность транспортера после реконструкции в липосомы [Ma et al., 2007]. субстрата генетически Зондирование амфифильными производными модифицированного канала переносчика, по-видимому, весьма перспективно. Дикарбоксилатный транспортер плазмалеммы является привлекательным объектом и потому, что его ингибирование (данные не приведены) и, соответственно, вероятная точечная мутация не помешают выращиванию мутантного штамма на сахарозе. Такие мутанты пригодны для получения липофильного профиля переносчика плазмалеммы клеток. В сравнении с цистеиновым мутагенезом, сопровождающимся получением мутантного белка генно-инженерными методами, его встраиванием в липосомы и изучением транспорной активности громоздкими прямыми методами [Ma et al., 2007].

Зондирование активного центра позволит «позиционировать» содержащий замену сегмент относительно субстратсвязывающей точки и выделить поверхность трансмембранного сегмента, экспонированную в даже если сканировали только полканала (Рис. 3.48.). В канал, соответствии с шагом α-спирали каждый четвертый – пятый остаток от отсчитанный по первичной структуре, выявленного, также будет экспонирован в канал. Надо отметить, что результатами сканирования каналов переносчиков с помощью трудоемкого «цистеинового мутагенеза» нативных условиях дополняют кристаллографические результаты, В полученные с высоким разрешением [Zuniga et al., 2001; Dahl et al., 2004]. Когда существуют противоречия между кристаллографическими данными и результатами модулирования катионами проводимости вольтзависимого калиевого канала [Harrod et al., 1997; Jiang et al., 2002], авторы

253

предполагают искажение структуры при безлипидной кристаллизации. Все это делает перспективным разработку новых подходов к «сканированию» молекулы в нативных условиях. Разработка простых подходов к изучению трехмерной структуры позволит сократить разрыв между многочисленными транспортерами с установленной первичной структурой [Dahl et al., 2004] и сравнительно немногочисленными переносчиками с изученной третичной структурой. Полученные результаты позволили разработать для тест выявления потенциальных мутантов по дикарбоксилатному транспортеру Клетку плазмалеммы. С заингибированным переносчиком можно рассматривать в качестве модели клетки с дефектным транспортером плазмалеммы. Такая клетка, повидимому, будет расти на глюкозе, а также окислять глюкозу и пируват in *situ*, но потеряет способность окислять и цитрат, и сукцинат одновременно (Рис. 3.34., 3.35. и 3.36.). При рН 5,5 кривые роста S. cerevisiae на глюкозе совпадали в присутствии и в отсутствие концентрации О-пальмитоил-Lподавляющей окисление сукцината. По-видимому, малата, функционирование транспортера не связано с жизнедеятельностью клетки и использованием основных метаболических путей, функционирующих при росте на глюкозе.

3.12. Преимущества использования эндогенных сопряженных систем по сравнению с традиционными прямыми методами измерения транспорта.

Может показаться очевидным, что традиционные (прямые) методы измерения транспорта в клетки предпочтительнее методов непрямых, с использованием ЭСС. Время измерения скорости в присутствии одной концентрации субстрата использованным нами непрямым методом составляет не более 5 мин. Возможность получить $K_{\rm M}$ или I_{50} при этом в одной оксиметрической кривой позволяла избежать ошибок, связанных с

точностью определения количества органелл и точностью добавления их суспензии (см. Материалы и методы). При этом время измерения скорости присутствии одной концентрации внешнего субстрата В прямыми методами составляет не менее одного часа (например, [Akita et al., 2000]). Более того, измерение в клетках прямыми методами малых транспортных активностей переносчиков со сродством к субстрату порядка нескольких миллимолей для метаболизирующихся субстратов затруднено (подробнее см. Обзор литературы, раздел 1.1.). Традиционно количество субстрата, вошедшего в клетку, определяют как разницу между количеством добавленного субстрата и количеством субстрата, оставшегося в натанте после осаждения клеток или как количество субстрата, оставшегося в осадке. В отличие от митохондрий печени крысы, при измерении транспорта прямыми методами в клетках возникают дополнительные проблемы. Например, ошибка измерения из-за конверсии субстрата [Teusink et al., 1998] или в результате неспецифической сорбции на поверхности клеток и удерживания части субстрата в периплазме [Benito and Lagunas, 1992]. Метод patch-clamp, как отмечалось выше (см. Обзор литературы, раздел 1.1.), непригоден для измерения электронейтрального антипорта, и мало приспособлен для измерения низких транспортных активностей [Геннис, 1997]. Поэтому использование непрямых, но количественных и быстрых методов оправдано. Существует также проблема однородности популяции транспортеров в препарате. В отличие от ферментов, измерение трансмембранного транспорта даже очищенными переносчиками требует их реконструкции в искусственную мембранную систему. Гомогенность препарата липосом и 100%-ное единообразное встраивание асимметричных молекул транспортеров всегда не гарантировано. В интактных системах единообразие ориентации переносчиков не вызывает сомнений, а гомогенность популяции органелл или клеток поддается контролю. Кроме того, применение непроникающих в митохондрии и клетки эффекторов дополнялось возможностью исследования транспортера митохондрий печени крысы или переносчика плазмалеммы *S. cerevisiae* только с одной (внешней) стороны мембраны.

Липофильную зону вблизи субстратсвязывающей точки транспортера отождествляли с соответствующей гидрофобной зоной канала транспортера. Есть основания предполагать, что такие зоны есть во многих переносчиках гидрофильных субстратов (см. Обзор литературы, разделы 1.3. и 1.7.). В этом случае, предложенные подходы к измерению скорости транспорта окисляемых субстратов нативными переносчиками в интактных структурах можно рекомендовать как универсальные.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы предложен и экспериментально подтвержден ряд новых методологических подходов. Предложено использовать ферментативные системы окисления субстратов в препаратах митохондрий и клеток в качестве ЭСС для изучения трансмембранного транспорта моно-, ди- и трикарбоновых кислот. С использованием данного подхода впервые показано, что в диапазоне от рН 5,5 до рН 7,5, транспорт сукцината через плазмалемму S. cerevisiae опосредован О-пальмитоил-Lмалат чувствительным транспортером с уникальными и нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами. Предложенный подход применим для изучения и поиска малоактивных переносчиков окисляемых субстратов дрожжей.

Впервые для изучения активного центра нативного транспортера ДКБ плазмалеммы S. cerevisiae применен метод зондирования активного центра с использованием двух рядов непроникающих конкурентных ингибиторов, производных субстратов (2-алкилмалонатов и О-ацил-Lмалатов), с монотонно увеличивающимся алифатическим заместителем. Показано, что канал транспортеров, переносящих гидрофильный субстрат (дикарбоксилат), имеет гидрофобную поверхность. В отсутствие ренггеноструктурных данных о третичной структуре дикарбоксилатных переносчиков такой подход является в настоящее время единственным источником детальной информации о структуре их активных центров. Появление В перспективе рентгеноструктурных данных позволит информацию о третичной структуре транспортеров сопоставить В биомембране и в кристалле, что представляет отдельный интерес.

Показана возможность использования суспензии высокосопряженных митохондрий в оксиметрической ячейке в качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока,

257

индуцированного пептидами - пороформерами. Впервые показано, что с помощью такого подхода можно измерить стационарную калиевую индуцированную в митохондриях проводимость, низкоолигомерной формой аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм в присутствии $\Delta \psi$ при низких пептид/липидных соотношениях и оценить диаметр поры. Обнаружены два механизма самоассоциации пороформеров в биомембране: с замедлением образования непроводящей димерной предпоры и с замедлением образования транспортирующего канала, показано влияние пептидов-пороформеров на величину $\Delta \psi$ митохондрий. Полученные результаты расширяют представление о механизмах действия пороформирующих пептидов на митохондрии, а также возможного действия разработанных токсического на ИХ основе препаратов назначения. Предложеннный медицинского подход (использование митохондрий в качестве биосенсора КТТ) на примере 4-х пептидовпороформеров, можно в перспективе применить для изучения побочных эффектов 10-ти широко используемых современной В медицине пороформеров-антибиотиков и двух десятков пороформеров, которые по данным FDA находятся на второй стадии клинических испытаний.

Кроме того, переход мономеров пептидов - пороформеров в трансмембранное положение в присутствии $\Delta \psi$ рассматривают как модель трансмембранных сегментов при встраивании заякоривания белков-[Shahidullah and London, переносчиков в мембрану 2008]. Среди мембранных белков, В частности, описаны транспортеры, самособирающиеся из двухсегментных мономеров [Maguire, 2006]. Это свидетельствует, что самособирающиеся в пору полипетиды, подобные исследованным в данной работе, и нативные мембранные белкитранспортеры могут иметь общие черты, что важно для понимания механизма их сборки, встраивания в мембрану, функционирования и регуляции.

выводы

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

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

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

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

239

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

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

260

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аливердиева Д.А., Шольц К.Ф. Количественное определение общего белка митохондрий с кумасси // Прикл биохим и микробиол. – 1984. – Т. 20. – С. 823-830.
- Бондаренко Д.И, Аливердиева Д.А., Мамаев Д.В, Шольц К.Ф. Определение проницаемости плазматической мембраны дрожжей для амфифильных соединений // Докл Академии наук. – 2004. – Т. 399, № 5. – С. 693-695.
- Бондаренко Д.И., Мамаев Д.В., Шольц К.Ф. Локализация точек связывания субстратов в дикарбоксилатном транспортере митохондрий // Докл Академии наук. – 1996. – Т. 349, No 3. – С. 408-410.
- Бутылин А.А., Ритов В.Б. Прохождение аденозинтрифосфата через аламетициновые каналы в бислойной липидной мембране // Докл АН СССР. – 1990. – Т. 310. – С. 731-734.
- Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции М.: Мир. – 1997. – С. 624.
- Гиббс Д.В. Термодинамика. Статистическая механика. М.: Наука, 1982. – 584 с.
- Грачева О.А, Соколова А.Е, Привалов П.Л, Лев А.А. Возникновение солезависимого и катионспецифичного состояния липидного бислоя в присутствии валиномицина // Докл АН СССР. – Т. 246, № 4. – 1979. – С. 986-990.
- Капрельянц А.С., Никифоров В.В., Мирошников А.И., Снежкова Л.Г., Ерёмин В.А., Островский Д.Н. Мембраны бактерий и механизм действия антибиотика Грамицидина S // Биохимия. 1977. V. 42. No 2. P. 329-337.

- Курочкин И.Н., Еременко А.В. Биосенсорные системы на основе ферментов для медикобиологический исследований и экологического мониторинга // Проблемы аналитической химии. – Т.12. Биохимические методы анализа / под ред. Дзантиева Б.Б. – М.: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 2010. – С. 138-185.
- Мансурова С.Э., Симонян Р.А., Скулачев В.П., Старков А.А. Сопрягающее действие 6-кетохолестанола на митохондрии, гидролизующие аденозинтрифосфат в присутствии разобщителей протонофоров // Мол биол. – 1995. – Т. 29. – С. 1376-1383.
- Маршелл Э. Биофизическая химия. М.: Мир, 1981. Т. 1. С. 304-310.
- Мирошников А.И, Снежкова Л.Г., Назимов И.В., Решетова О.И., Розыков Б.В., Гущин И.С. Структура и свойства гистамин высвобождающих пептидов из яда шершня Vespa orientalis // Биоорг химия. – 1981. – Т. 7. – С. 1467-1474.
- Мирошников А.И., Снежкова Л.Г., Назимов И.В., Решетова О.И., Розынов Б.В. Структура и свойства гистаминвысвобождающих пептидов из яда шершня Vespa orientalis // Биоорг химия. – 1981. – Т. 7, № 10. – С. 1467-1477.
- Мосолова И.А., Горская И.А., Шольц К.Ф., Котельникова А.В. Получение прочносопряженных митохондрий из печени крысы, стабильных при хранении // Вопр мед химии. – 1971. – Т. 17, № 3. – С. 286.
- Наумов Г.И., Газдиев Д.О., Наумова Е.С. Обнаружение биологического вида Saccharomyces bayanus в Дальневосточной Азии // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 6. – С. 834-839.
- Негода А.Е., Качаева Е.В., Миронова Г.Д. Чайлахян Л.М. Механизм регуляции митохондриального АТФ-чуствительного калиевого

канала адениновыми нуклеотидам // Докл Академии наук. – 2005. – Т. 400. – С. 116-118.

- Новоселова А.В. Методы исследования гетерогенных равновесий. М.: Высшая школа, 1980. – 166 с.
- Решетилов А.Н. Биосенсоры на основе клеток микроорганизмов. // Проблемы аналитической химии. Т. 12. Биохимические методы анализа / под ред. Б.Б. Дзантиева. – М.: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 2010. – С. 186-242.
- Самарцев В.Н. Жирные кислоты как разобщители окислительного фосфорилирования // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – С. 991-1005.
- Скулачев В.П. Мембранные преобразователи энергии. Биохимия мембран. М.: Высш. шк., 1989. 271 с.
- Скулачев В. П. Энергетика биологических мембран. М.: Наука, 1989. – 546 с.
- Тимофеева З.Н., Барон Н.М., Равдель А.А., Пономарева А.М. Краткий справочник физико-химических величин / под ред. Равделя А.А. и Пономаревой А.М. – СПб.: Иван Федоров, 2003. – 238 с.
- 23. Узбеков Р.Е. Анализ клеточного цикла и методика исследования динамики уровня Экспрессии белков на его различных фазах с использованием синхронизованных клеток // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 5. – С. 597- 611.
- 24. Шольц К.Ф. Транспорт субстратов в митохондрии // Усп. биол. химии. – 1994. – Т. 34. – С. 167-187.
- 25. Шольц К.Ф., Аливердиева Д.А., Котельникова А.В. Действие аламетицина на сопрягающую мембрану митохондрий // Докл Академии наук СССР. – 1985. – Т. 283, № 3. – С. 723-727.
- Шольц К.Ф., Аливердиева Д.А., Снежкова Л.Г., Мирошников А.И., Котельникова А.В. Действие мастопарана из яда шершня на

митохондрии // Докл Академии наук СССР. – 1983. – Т. 273, № 3. – С. 247-250.

- Шольц К.Ф., Захарова Т.С. Определение действующей концентрации гидрофобных агентов в митохондриях // Биохимические методы / под ред. Кретовича В.Л. и Шольца К.Ф. – М.: Наука, 1980. – С. 141-147.
- Шольц К.Ф., Мамаев Д.В. Взаимодействие цитохрома с с белками митохондрий и цибакрон-декстраном // Биохимия. – 1985. – Т. 50, No 11. – С. 1877-1883.
- Шольц К.Ф., Мамаев Д.В., Бондаренко Д.И., Лагутина Л.С. Особенности взаимодействия 2-алкилмалонатов с центром связывания субстратов дикарбоксилатного переносчика митохондрий печени крыс // Биохимия. –1990. Т. 55, № 10. С. 1832-1840.
- Шольц К.Ф., Мамаев Д.В., Гладких А.Г. Взаимодействие 2алкилмалонатов с дикарбоксилатным переносчиком в интактных митохондриях // Докл Академии наук СССР. – 1987. – Т. 294. – С. 1509-1514.
- Шольц К.Ф., Островский Д.Н. Ячейка амперометрического определения кислорода // В кн.: Методы современной биохимии. – М.: Наука, 1975, – С. 52-58.
- 32. Шольц К.Ф., Резник Г.И., Соловьева Н.А., Снежкова Л.Г., Мирошников А.И., Котельникова А.В. Действие мелиттина и его тетраацильного производного на митохондрии печени крыс // Биохимия. – 1980. – Т. 54, № 10. – С. 1840-1848.
- Шольц К.Ф., Соловьева Н.А., Шульгин М.Н., Котельникова А.В. Действие индукторов катионной проницаемости на связь цитохрома с с мембраной митохондрий // Биохимия. – 1978. – Т. 43, № 6. – С. 1012-1017.

- Эггинс Б. Химические и биологические сенсоры М.: Техносфера, 2005. – 336 с.
- Agafonov A., Gritsenko E., Belosludtsev K., Kovalev A., Gateau-Roesch O., Saris N.E., Mironova G.D. A permeability transition in liposomes induced by the formation of Ca²⁺/palmitic acid complexes // Biochim Biophys Acta. 2003. V. 1609, No 2. P. 153-160.
- Aguilella V.M., Bezrukov S. M. Alamethicin channel conductance modified by lipid charge // Eur Biophys J. – 2001. – V. 30, No 4. – P. 233-241.
- 37. Akita O., Nishimori C., Shimamoto T., Fujii T., Iefuji H. Transport of pyruvate in *Saccharomyces cerevisiae* and cloning of the gene encoded pyruvate permease // Biosci Biotechnol Biochem. – 2000. – V. 64, No 5. – P. 980-984.
- Allende, D., Simon, S.A., McIntosh, T.J. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores // Biophysical Journal. – 2005. – V. 88. – P. 1828–1837.
- Andrade S.L.A., Dickmanns A., Ficner R., Einsle O. Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus //* Proc Natl Acad Sci U S A. – 2005. – V. 102, No 42. – P. 14994-14999.
- 40. Andreeva-Kovalevskaya Z. I., Solonin A. S., Sineva E. V., Ternovsky V. I. Pore-forming proteins and adaptation of living organisms to environmental conditions // Biochemistry (Mosc). 2008. V. 73, No 13. P. 1473-1492.
- 41. Angelova A., Ionov R., Koch M.H., Rapp G. Interaction of the peptide antibiotic alamethicin with bilayer- and non-bilayer-forming lipids: influence of increasing alamethicin concentration on the lipids supramolecular structures. // Arch Biochem Biophys. – 2000. – V. 378, No 1. – P. 93-106.

- Antonenko Y.N., Kinnally K.W., Tedeschi H. Identification of anion and cation pathways in the inner mitochondrial membrane by patch clamping of mouse liver mitoplasts // J Membr Biol. – 1991. – V. 124. – P. 151-158.
- 43. Anzai N., Jutabha P., Enomoto A. Functional characterization of rat organic anion transporter 5 (Slc22a19) at the apical membrane of renal proximal tubules // Pharmacol Exp Ther. – 2005. – V. 315, No 2. – P. 534-544.
- 44. Archer S.J., Cafiso D.S. Voltage-dependent conductance for alamethicin in phospholipid vesicles. A test for the mechanism of gating // Biophys J. 1991. V.60, No 2. P. 380-388.
- 45. Atlante A., Gagliardi S., Passarella S. Fumarate permeation in normal and acidotic rat kidney mitochondria: fumarate/malate and fumarate/aspartate translocators // Biochem Biophys Res Commun. – 1998. – V. 243, No 3. – P. 711-718.
- 46. Bai L., Pajor A.M. Expression cloning of NaDC-2, an intestinal Na⁺- or Li⁺-dependent dicarboxylate transporter // Am J Physiol. 1997. V. 273, No 1. P. 267-274.
- 47. Bai X.Y., Chen X., Sun A.Q. Membrane topology structure of human high-affinity, sodium-dependent dicarboxylate transporter // FASEB J. 2007. V. 21, No 10. P. 2409-2417.
- Bak M., Bywater R.P., Hohwy M., Thomsen J.K., Adelhorst K., Jakobsen H.J., Sørensen O.W., Nielsen N.C. Conformation of alamethicin in oriented phospholipid bilayers determined by (15)N solid-state nuclear magnetic resonance // Biophys J. 2001. V. 81, No. 3 P. 1684-1698.
- 49. Baker K.E., Ditullio K.P., Neuhard J., Kelln R.A. Utilization of orotate as a pyrimidine source by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* requires the dicarboxylate transport protein encoded by dctA // J Bacteriol. – 1996. – V. 178, No 24. – P. 7099-7105.
- 50. Balderas E., Ateaga-Tlecuitl R., Rivera M., Gomora J.C., Darszon A.

Niflumic acid blocks native and recombinant T-type channels // J Cell Physiol. – 2012. – V. 227, No 6. – P. 2542-2555.

- Bandell M., Ansanay V., Rachidi N. Membrane potential-generating malate (MleP) and citrate (CitP) transporters of lactic acid bacteria are homologous proteins. Substrate specificity of the 2-hydroxycarboxylate transporter family // J Biol Chem. – 1997. – V. 272, No 29. – P. 18140-18146.
- Bandell M., Lolkema J.S. Stereoselectivity of the membrane potentialgenerating citrate and malate transporters of lactic acid bacteria // Biochemistry. – 1999. – V.38. – P. 10352-10360.
- Bañuelos M.A., Sychrová H., Bleykasten-Grosshans C., Souciet J.L., Potier S. The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux // Microbiology (Reading). – 1998. – V. 144, No 10. – P. 2749-2758.
- 54. Barns K. J., Weisshaar J. C. Single-cell, time-resolved study of the effects of the antimicrobial peptide alamethicin on *Bacillus subtilis* // Biochim Biophys Acta. – 2016. – V. 1858, No. 4. – P. 725-732.
- 55. Barranger-Mathys, M., Cafiso, D.S. Collisions between helical peptides in membranes monitored using electron paramagnetic resonance: evidence that alamethicin is monomeric in the absence of a membrane potential // Biophys J. – 1994. – V. 67, No.1. – P. 172-176.
- Bassetti M., Righi E. Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? // Hematology Am Soc Hematol Educ Program. – 2013. – V. 2013. – P. 428-432.
- 57. Bayer A. S., Schneider T., Sahl H-G. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall // Ann N Y Acad Sci. – 2013. – V. 1277, No 1. – P. 139-158.
- 58. Bazhenova E.N., Deryabina Y.I., Eriksson O., Zvyagilskaya R.A., Saris N-E.L. Characterization of a high capacity calcium transport system in

mitochondria of the yeast *Endomyces magnusii* // J Biol Chem. – 1998. – V. 273, No 8. – P. 4372-4377.

- 59. Beauvoit B., Rigoulet M., Raffard G., Canioni P., Guérin B. Differential sensitivity of the cellular compartments of *Saccharomyces cerevisiae* to protonophoric uncoupler under fermentative and respiratory energy supply // Biochemistry. – 1991. – V. 30, No 47. – P. 11212-11220.
- Beavis A.D., Powers M. Temperature dependence of the mitochondrial inner membrane anion channel: the relationship between temperature and inhibition by magnesium. // J Biol Chem. – 2004. – V. 279. – P. 4045-4050.
- Bechinger B. J. Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin // J Membr Biol. – 1997. – V.156, No. 3. – P. 197-211.
- Bechinger B.; Gorr S.U. Antimicrobial peptides: Mechanisms of action and resistance // J Dent Res. – 2017. – V.96. – P.254-260.
- Bedhomme M., Hoffmann M., McCarthy E.A., et al Folate metabolism in plants: an Arabidopsis homolog of the mammalian mitochondrial folate transporter mediates folate import into chloroplasts // J Biol Chem. 2005. V. 280, No 41. P. 34823-34831.
- 64. Belosludtsev K., Saris N., Andersson L.C., Belosludtseva N., Agafonov A., Sharma A., Moshkov D.A., Mironova G.D. On the mechanism of palmitic acid-induced apoptosis: the role of a pore induced by palmitic acid and Ca²⁺ in mitochondria // J Bioenerg Biomembr. 2006. V. 38, No 2. P. 113-120.
- Belyaeva E.A., Wojtczak L. An attempt to quantify K⁺ fluxes in rat liver mitochondria // Biochem Mol Biol Int. 1994. V. 33, No 1. P.165-175.
- 66. Bendahan A., Armon A., Madani N. Arginine 447 plays a pivotal role in substrate interactions in a neuronal glutamate transporter // J Biol Chem. –

2000. - V. 275. - P. 37436-37442.

- Benito B., Lagunas R. The low-affinity component of *Saccharomyces cerevisiae* maltose transport is an artifact // J Bacteriol. 1992. V. 174, No 9. P. 3065-3069.
- Bernardi P., Angrilli A., Azzone G.F. A gated pathway for electrophoretic Na⁺ fluxes in rat liver mitochondria. Regulation by surface Mg²⁺ // Eur J Biochem. – 1990. – V. 188. – P. 91-97.
- Bisaccia F., De Palma A., Dierks T., Krämer R., Palmieri F. Reaction mechanism of the reconstituted tricarboxylate carrier from rat liver mitochondria // Biochim Biophys Acta. – 1993. – V. 1142. – P. 139-145.
- Bisaccia F., Zara V., Capobianco L. The formation of a disulfide crosslink between the two subunits demonstrates the dimeric structure of the mitochondrial oxoglutarate carrier // Biochim Biophys Acta. – 1996. – V. 1292, No 2. – P. 281-288.
- Bittman R., Clejan S., Fugler L., Rosenthal A.F. The effect of cholesterol on glycerophosphono- and glycerophosphinocholines. Permeability measurements in lipid vesicles // Biochim Biophys Acta. – 1986. – V. 855, No 2. – P. 265-270.
- 72. Blancato V.S., Magni C., Lolkema J.S. Functional characterization and Me ion specificity of a Ca-citrate transporter from *Enterococcus faecalis* // FEBS J. – 2006. – V. 273, No 22. – P. 5121-5130.
- 73. Boczonadi V., King M.S., Smith A.C., Olahova M., Bansagi B., Roos A., Eyassu F., Borchers C., Ramesh V., Lochmüller H., Polvikoski T., Whittaker R.G., Pyle A., Griffin H., Taylor R.W., Chinnery P.F., Robinson A.J., Kunji E.R.S, Horvath R. Mitochondrial oxodicarboxylate carrier deficiency is associated with mitochondrial DNA depletion and spinal muscular atrophy-like disease // Genet Med. – 2018. – V. 20, No 10. – P. 1224-1235.

- Boekhout T., Renting M., Scheffers W. A., Bosboom R. The use of karyotyping in the systematics of yeasts // Antonie Van Leeuwenhoek. – 1993. – V. 63, No 2. – P. 157-163.
- Boheim G. Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes // J Membr Biol. – 1974. – V. 19, No. 3. – P. 277-303.
- Boheim G., Kolb H.A. Analysis of the multi-pore system of alamethicin in a lipid membrane // J Membr Biol. – 1978. – V. 38. – P. 99-150.
- 77. Bojunga N., Kötter P., Entian K.D. The succinate/fumarate transporter Acr1p of *Saccharomyces cerevisiae* is part of the gluconeogenic pathway and its expression is regulated by Cat8p // Mol Gen Genet. 1998. V. 260, No 5. P. 453-461.
- Bolli R., Nałecz K.A., Azzi A. Monocarboxylate and alpha-ketoglutarate carriers from bovine heart mitochondria. Purification by affinity chromatography on immobilized 2-cyano-4-hydroxycinnamate // J Biol Chem. – 1989. – V. 264, No 30. – P. 18024-18030.
- 79. Boorsma A., van der Rest M. E., Lolkema J. S. & Konings W. N. Secondary transporters for citrate and the Mg²⁺-citrate complex in *Bacillus subtilis* are homologous proteins // J Bacteriol. 1996. V. 178, No 21. P. 6216–6222.
- Bourinbaiar A S, Krasinski K, Borkowsky W. Anti-HIV effect of gramicidin in vitro: potential for spermicide use // Life Sci. – 1994. – V. 54, No 1:PL5-9.
- 81. Brauburger K., Burckhardt G., Burckhardt B.C. The sodium-dependent di- and tricarboxylate transporter, NaCT, is not responsible for the uptake of D-, L-2-hydroxyglutarate and 3-hydroxyglutarate into neurons // J Inherit Metab Dis. – 2011. – V. 34, No 2. – P. 477-482.
- Bricker D.K., Taylor E.B., Schell J.C., Orsak T., Boutron A., Chen Y.C., Cox J.E., Cardon C.M., Van Vranken J.G., Dephoure N., Redin C., Boudina S., Gygi S.P., Brivet M., Thummel C.S., Rutter J. A

mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, Drosophila, and humans // Science. -2012. - V. 337, No 6090. - P. 96-100.

- Brierley G.P., Baysal K., Jung D.W. Cation transport systems in mitochondria: Na⁺ and K⁺ uniports and exchangers // J Bioenerg Biomembr. – 1994. – V. 26, No 5. – P. 519-526.
- Broniatowski M., Vila-Romeu N., Dynarowicz-Łatka P. Two-dimensional miscibility studies of alamethicin and selected film-forming molecules // J Phys Chem B. – 2008. – V. 112, No. 26. – P. 7762-7770.
- Brookes P.S., Rolfe DF, Brand MD. 1997 The proton permeability of liposomes made from mitochondrial inner membrane phospholipids: comparison with isolated mitochondria // J Membr Biol. – 1997. – V. 155, No 2. – P. 167-174.
- 86. Brueckner H., Przybylski M. Isolation and structural characterization of polypeptide antibiotics of the peptaibol class by high-performance liquid chromatography with field desorption and fast atom bombardment mass spectrometry // J Chrom. – 1984. – V. 296. – P. 263- 275.
- Brumfeld V., Miller I.R. Electric Field Dependence of Alamethicin Channels // Biochim Biophys Acta. – 1990 – V. 1024, No 1. – P. 49-53.
- Bulat S.A., Mironenko N.V. Identification of fungi and analysis of their genetic diversity by polymerase chain reaction (PCR) with gene-specific and non-specific primers. // Russ J Genet. – 1996. – V. 32. – P. 143-159.
- Bulat S.A., Lubeck M., Mironenko N., Jensen D.F. and P.S. Lubeck. UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of *Trichoderma* and *Gliodadium //* Mycol Res. – 1998. – V.102, No 8. – P. 933-943.
- 90. Bulman Z. P, Sutton M. D, Ly N. S, Bulitta J.B, Holden P.N, Nation R. L., Li J., Tsuji B.T. Emergence of Polymyxin B resistance influences pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa* mutators // Antimicrob Agents Chemother. 2015. V. 59, No 7. P. 4343-4346.

- 91. Cabrera M.P.S., Cabrera M.P.S., Costa S.T.B., de Souza B.M., Palma M.S., Ruggiero J. R., Neto J. R. Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1 // Eur Biophys J. 2008. V. 37, No. 6. P. 879-891.
- 92. Campagno R.V., Severin M.J., Nosetto E.C., Brandoni A., Torres A.M. Renal expression and urinary excretion of Na⁺/dicarboxylate cotransporter 1 (NaDC1) in obstructive nephropathy: a candidate biomarker for this pathology // Pflugers Arch. – 2018. – V. 470, No 12. – P. 1777-1786.
- 93. Cappello A.R., Curcio R., Miniero V.D. Stipani I., Robinson A. J., Kunji E.R.S., Palmieri F. Functional and structural role of amino acid residues in the even-numbered transmembrane alpha-helices of the bovine mitochondrial oxoglutarate carrier // J Mol Biol. 2006. V. 363, No 1. P. 51-62.
- 94. Casal M., Queirós O., Talaia G., Ribas D., Paiva S. Carboxylic acids plasma membrane transporters in *Saccharomyces cerevisiae* // Adv Exp Med Biol. – 2016. – V. 892. – P. 229-251.
- 95. Cascio M., Mayor J.A., Kaplan R.S. Analysis of the secondary structure of the cys-less yeast mitochondrial citrate transport protein and four single-cys variants by circular dichroism // J Bioenerg Biomembr. – 2004. – V. 36, No 5. – P. 429-438.
- Cascio M., Wallace B.A. Conformation of alamethicin in phospholipid vesicles: implications for insertion models // Proteins. 1988. V. 4, No. 2. P. 89-98.
- 97. Cássio F., and Leão C. A comparative study on the transport of L(-)malic acid and other short-chain carboxylic acids in the yeast *Candida utilis*: evidence for a general organic acid permease // Yeast. 1993. V. 9, No 7. P. 743-752.
- 98. Cássio F., Côrte-Real M., Leão C. Quantitative analysis of proton movements associated with the uptake of weak carboxylic acids. The

yeast *Candida utilis* as a model // Biochim Biophys Acta. – 1993. – V. 1153, No 1. – P. 59-66.

- 99. Cássio F., Leão C., van Uden N. Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Appl Environ Microbiol. – 1987. – V. 53, No 3. – P. 509-513.
- 100. Castiglione-Morelli M.A., Ostuni A., Croce F. Solution structure of the fifth and sixth transmembrane segments of the mitochondrial oxoglutarate carrier // Mol Membr Biol. – 2005. – V. 22, No 3. – P. 191-201.
- 101. Ceremuga M., Stela M., Janik E., Gorniak L., Synowiec E., Sliwinski T., Sitarek P., Saluk-Bijak J., Bijak M. Melittin-A Natural peptide from bee venom which induces apoptosis in human leukaemia cells // Biomolecules. – 2020. – V. – 10, No 2. – P. 247-261.
- Cernescu A., Luchian T. Biophysical changes induced by cholesterol on phosphatidylcholine artificial biomembranes containing alamethicin oligomers// Central European Journal of Physics. – 2006. – V.4. – P. 155-167.
- 103. Chance B., Williams G.R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation // Nature. – 1955. – V. 175. – P. 1120-1121.
- 104. Chen F-Y., Lee M-T., Huang H.W. Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin // Biophys. J. – 2002. – V. 82, No. 2. – P. 908-914.
- 105. Chen J., Guan S.M., Sun W., FuHaberm H. Melittin, the major painproducing substance of bee venom // Neurosci Bull. – 2016. – V. 32, No. 3. – P. 265-272.
- 106. Chiriac R., Luchian T. pH modulation of transport properties of alamethicin oligomers inserted in zwitterionic-based artificial lipid membranes // Biophys Chem. – 2007. – V. 130, No. 3. – P. 139-147.
- 107. Chiriac R., Luchian T. Single-molecule investigation of the influence played by lipid rafts on ion transport and dynamic features of the pore-

forming alamethicin oligomer // J Membr Biol. – 2008. – V. 224, No. 1-3. – P. 45-54.

- 108. Colombo R. Liquid-phase synthesis of naturally occurring peptides, II. Syntheses of three mast cell degranulating tetradecapeptide amides from wasp venoms // Hoppe Seylers Z Physiol Chem. – 1981. – V. 362, No. 10. – P. 1393-1403.
- Côrte-Real M., Leão C., van Uden N. N. Transport of L(-)malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Candida sphaerica* // Appl Microbiol Biotechnol. – 1989. – V. 31. – P. 551-555.
- 110. Cotton F.A., Wilkinson G. Advanced inorganic chemistry, 4th ed. New York.: Wiley, 1980. 1396 p.
- Crompton M., Palmieri F., Capano M., Quagliariello E. The transport of sulphate and sulphite in rat liver mitochondria // Biochem J. – 1974. – V. 142, No 1. – P. 127-137.
- 112. Cui Y., Zhao S., Wang J., Wang X., Gao B., Fan Q., Sun F., Zhou B. A novel mitochondrial carrier protein Mme1 acts as a yeast mitochondrial magnesium exporter // Biochim Biophys Acta. – 2015. – V. 1853, No 3. – P. 724-732.
- 113. Cwerman-Thibault H., Sahel J.A., Corral-Debrinski M. Mitochondrial medicine: to a new era of gene therapy for mitochondrial DNA mutations // J Inherit Metab Dis. 2011. V. 34, No 2. P. 327-344.
- 114. Dahl S.G., Sylte I., Ravna A.W. Structures and models of transporter proteins // J Pharmacol Exp Ther. 2004. V. 309, No 3. P. 853-860.
- 115. Das K., Lewis R.Y., Combatsiaris T.P., Lin Y., Shapiro L., Charron M.J., Scherer P.E. Predominant expression of the mitochondrial dicarboxylate carrier in white adipose tissue // Biochem J. – 1999. – V. 344, No 2. – P. 313-320.
- 116. Dave P.C., Billington E., Pan Y-L., Straus S.K. Interaction of alamethicin with ether-linked phospholipid bilayers: oriented circular dichroism, 31P

solid-state NMR, and differential scanning calorimetry studies // Biophys J. – 2005. – V. 89. – P. 2434-2442.

- 117. Dawson R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., and Jones, K.M. (1986) in Data for biochemical research. 3rd edition. Oxford: Clarendon Press. 580 p.
- 118. de Kroon A., de Gier J, de Kruijff B. The effect of a membrane potential on the interaction of mastoparan X, a mitochondrial presequence, and several regulatory peptides with phospholipids vesicles // Biochim Biophys Acta. – 1991. – V. 1068, No. 2. – P. 111-124.
- 119. de Nadal E., Calero F., Ramos J., Ariño J. Biochemical and genetic analyses of the role of yeast casein kinase 2 in salt tolerance // J Bacteriol. 1999. V. 181, No 20. P. 6456-6462.
- 120. De Palma A., Prezioso G., Scalera V. Kinetic evidence for the uniport mechanism hypothesis in the mitochondrial tricarboxylate transport system // J Bioenerg Biomembr. – 2005. – V. 37, No 5. – P. 279-287.
- 121. Dempsey C.E., Handcock L.J. Hydrogen bond stabilities in membranereconstituted alamethicin from amide-resolved hydrogen-exchange measurements // Biophys J. – 1996. – V. 70, No. 4. – P. 1777-1788.
- Devés R., Angelo S., Rojas A.M. System y+L: the broad scope and cation modulated amino acid transporter // Exp Physiol. – 1998. – V. 83, No 2. – P. 211-220.
- Devés R., Boyd C.A. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function // Physiol Rev. 1998. –V. 78. No 2. P. 487-545.
- 124. Diatloff E., Roberts M., Sanders D., Roberts S. K. Characterization of anion channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* epidermal root cells and the identification of a citrate-permeable channel induced by phosphate starvation // Plant Physiol.– 2004. – V. 136. No 4. – P. 4136-49.

- 125. Dolce V., Cappello A.R., Capobianco L. Mitochondrial tricarboxylate and dicarboxylate-tricarboxylate carriers: from animals to plants // IUBMB Life. – 2014. – V. 66, No 7. – P. 462-471.
- 126. Doyle D.A. Structural changes during ion channel gating // Trends Neurosci. – 2004. –V. 27, No 6. – P. 298-302.
- 127. Doyle D.A. Structural themes in ion channels // Eur Biophys J. 2004. –
 V.33, No 3. P. 175-179.
- 128. Doyle D.A., Cabral J.M., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity // Science. 1998. V. 280, No 5360. P. 69-77.
- Duclohier H. Antimicrobial peptides and peptaibols, substitutes for conventional antibiotics // Curr Pharm Des. – 2010. – V. 16, No. 28. – P. 3212-3223.
- Duclohier H., Wróblewski H. Voltage-dependent pore formation and antimicrobial activity by alamethicin and analogues // J Membr Biol. – 2001. – V. 184, No 1. – P. 1-12.
- Dufour S. Rousse N. Canioni P. Dioles P. 1996 Top-down control analysis of temperature effect on oxidative phosphorylation // Biochem. – 1996. – V. 314. – P. 743-751.
- 132. Duszkiewicz-Reinhard W., Gniewosz M., Błażejak S., Bańkowski A. Studies into Saccharomyces cerevisiae baker's yeast capacity for binding magnesium under batch conditions // Pol J Food Nutr Sci. – 2005. –V. 55, No 3. – P. 249–255.
- 133. Ehala S., Kasicka V., Makrlík E. Determination of stability constants of valinomycin complexes with ammonium and alkali metal ions by capillary affinity electrophoresis // Electrophoresis. – 2008. – V. 29, No 3. – P. 652-657.

- 134. Emaus R.K., Grunwald R., Lemasters J.J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties // Biochim Biophys Acta. – 1986. – V. 850. – P. 436-448.
- 135. Emmerlich V., Linka N., Reinhold T. The plant homolog to the human sodium/dicarboxylic cotransporter is the vacuolar malate carrier // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – V. 100, No 19. – P. 11122-11126.
- 136. Eshaghi S., Niegowski D., Kohl A., Martinez M.D., Lesley S.A., Nordlund P. Crystal structure of a divalent metal ion transporter CorA at 2.9 angstrom resolution // Science. – 2006. –V. 313. – P. 354-357.
- 137. Evtodienko V.Y., Bondarenko D.I., Antonenko Y.N. Permeation of dicarboxylic acids with different terminal position of two carboxylic groups through planar bilayer lipid membranes // Biochim Biophys Acta. - 1999. - V. 1420, No 1-2. - P. 95-103.
- Fattal D.R., Ben-Shaul A. A molecular model for lipid-protein interaction in membranes: the role of hydrophobic mismatch // Biophys. – 1993. – V. 65. – P. 1795-1809.
- 139. Fehri L.F., Wroblewski H., Blanchard A. Activities of antimicrobial peptides and synergy with enrofloxacin against *Mycoplasma pulmonis* // Antimicrob Agents Chemother. – 2007. – V. 51, No 2. – P. 468-474.
- 140. Fei Y.J., Inoue K., Ganapathy V. Relevance of NAC-2, an Na⁺-coupled citrate transporter, to life span, body size and fat content in *Caenorhabditis elegans* // J Biol Chem. – 2004. – V. 379, No 1. – P. 191-198.
- 141. Feigin A.M, Takemoto J.Y., Wangspa R., Teeter J.H., Brand J.G. Properties of voltage-gated ion channels formed by syringomycin E in planar lipid bilayers // J Membr Biol. – 1996. – V. 149, No 1. – P. 41-47.
- 142. Fiermonte G., Dolce V., Arrigoni R., Runswick M.J., Walker J.E., Palmieri F. Organization and sequence of the gene for the human

mitochondrial dicarboxylate carrier: evolution of the carrier family // Biochem J. – 1999. – V. 344, No 3. – P. 953-960.

- 143. Fiermonte G., Dolce V., Palmieri L., Ventura M., Runswick M.J., Palmieri F., Walker J.E. Identification of the human mitochondrial oxodicarboxylate carrier. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal location // J Biol Chem. – 2001. –V. 276, No 11. – P. 8225-8230.
- 144. Fiermonte G., Palmieri L., Dolce V., Lasorsa F.M., Palmieri F., Runswick M.J., Walker J.E. The sequence, bacterial expression, and functional reconstitution of the rat mitochondrial dicarboxylate transporter cloned via distant homologs in yeast and *Caenorhabditis elegans* // J Biol Chem. 1998. V. 273, No 38. P. 24754-24759.
- 145. Filosto M., Scarpelli M., Cotelli M.S., Vielmi V., Todeschini A., Gregorelli V., Tonin P., Tomelleri G., Padovani A. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases // J Neurol. – 2011. – V. 258, No 10. – P. 1763-1774.
- Fišar Z., Hroudová J. Pig Brain Mitochondria as a Biological Model for Study of Mitochondrial Respiration // Folia Biol. – 2016. – V. 62. – P. 15-25.
- 147. Fischer G., Kosinska-Eriksson U., Aponte-Santamaría C., Palmgren M., Geijer C., Hedfalk K., Hohmann S., de Groot B.L., Neutze R., Lindkvist-Petersson K. Crystal structure of a yeast aquaporin at 1.15 angstrom reveals a novel gating mechanism // PLoS Biol. – 2009. – V. 7, No 6: e1000130.
- 148. Fox R.O. Jr, Richards F.M. A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-A resolution // Nature. – 1982 – V. 300, No. 5890. – P. 325-330.
- 149. Fraser C. M., Norris S. J., Weinstock G. M., White O., Sutton G. G., Dodson R., Gwinn M., Hickey E. K., Clayton R., Ketchum K. A.,

Sodergren E., Hardham J. M., McLeod M. P., Salzberg S., Peterson J., Khalak H., Richardson D., Howell J. K., Chidambaram M., Utterback T., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Cotton M. D., Fujii C., Garland S., Hatch B., Horst K., Roberts K., Sandusky M., Weidman J., Smith H. O., Venter J. C. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the Syphilis spirochete // Science. – 1998. – V. 281, No 5375. P. – 375-388.

- 150. Frei B., Eisenach C., Martinoia E., Hussein S., Chen X.Z., Arrivault S., Neuhaus H.E. Purification and functional characterization of the vacuolar malate transporter tDT from Arabidopsis // J Biol Chem. – 2018. – V. 293, No 11. – P. 4180-4190.
- Frey T.G., Mannella C.A. The internal structure of mitochondria // Trends Biochem Sci. – 2000. – V. 25, No 7. – P.319-324.
- Fringeli U.P., Fringeli M. Pore formation in lipid membranes by alamethicin // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1979. – V. 76, No. 8. – P. 3852-3856.
- 153. Fujita K., Kimura S., Imanishi Y. Self-assembly of mastoparan X derivative having fluorescence probe in lipid bilayer membrane // Biochim Biophys Acta. 1994. V. 1195, No. 1. P. 157-163.
- Galitski T., Saldanha A.J., Styles C.A., Lander E.S., Fink G.R. Ploidy regulation of gene expression // Science. – 1999. – V. 285, No 5425. – P. 251-254.
- 155. Gallmetzer M., Müller B., Burgstaller W. Net efflux of citrate in *Penicillium simplicissimum* is mediated by a transport protein // Arch Microbiol. – 1998. – V. 169, No 4. – P. 353-359.
- 156. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Alnemri E.S., Altucci L.rews D., Annicchiarico-Petruzzelli M., Baehrecke E.H., Bazan N.G Bertrand M.J., Bianchi K., Blagosklonny M.V., Blomgren K., Borner C., Bredesen D.E., Brenner C., Campanella M., Candi E., Cecconi F., Chan F.K., Chandel N.S., Cheng

E.H., Chipuk J.E., Cidlowski J.A., Ciechanover A., Dawson T.M., Dawson V.L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin K.M., Di Daniele N., Dixit V.M., Dynlacht B.D., El-Deiry W.S., Fimia G.M., Flavell R.A., Fulda S., Garrido C., Gougeon M.L., Green D.R., Gronemeyer H., Hajnoczky G., Hardwick J.M., Hengartner M.O., Ichijo H., Joseph B., Jost P.J., Kaufmann T., Kepp O., Klionsky D.J., Knight R.A., Kumar S., Lemasters J.J., Levine B., Linkermann A., Lipton S.A., Lockshin R.A., López-Otín C., Lugli E., Madeo F., Malorni W., Marine J.C., Martin S.J., Martinou J.C., Medema J.P., 140 Meier P., Melino S., Mizushima N., Moll U., Muñoz-Pinedo C., Nuñez G., Oberst A., Panaretakis T., Penninger J.M., Peter M.E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J.H., Puthalakath H., Rabinovich G.A., Ravichandran K.S., Rizzuto R., Rodrigues C.M., Rubinsztein D.C., Rudel T., Shi Y., Simon H.U., Stockwell B.R., Szabadkai G., Tait S.W., Tang H.L., Tavernarakis N., Tsujimoto Y., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Villunger A., Wagner E.F., Walczak H., White E., Wood W.G., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Melino G., Kroemer G. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015 // Cell Death Differ. – 2015. - V. 22, No 1. - P. 58-73.

- 157. Gancedo C., Cerrano R. Energy yielding metabolism in yeast / In Rose, A.H. and Harrison, J.S., eds. // The yeasts, 2nd ed. – London: Academic Press, 1989. – V. 3. – P. 205-259.
- 158. Gauldie J., Hanson J.M., Rumjanek F.D., Shipolini R.A., Vernon C.A. The peptide components of bee venom // Eur J Biochem. – 1976. – V. 61, No 2. – P. 369-376.
- 159. Gil T., Ipsen J.H., Mouritsen O.G., Sabra M.C., Sperotto M.M., Zuckermann M.J. Theoretical analysis of protein organization in lipid membranes // Biochim Biophys Acta. – 1998. – V. 1376. – P. 245-266.

- 160. Goa J. A micro biuret method for protein determination; determination of total protein in cerebrospinal fluid // Scand J Clin Lab Invest. 1953. V. 5, No 3. P. 218-222.
- 161. Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G. Life with 6000 genes // Science. – 1996. – V. 274, No 5287. – P. 546-567.
- 162. Goldner N. K , Bulow C., Cho K., Wallace M., Hsu F-F., Patti G. J., Burnham C A, Schlesinger P., Dantas G. Mechanism of high-level daptomycin resistance in *Corynebacterium striatum //* mSphere. – 2018. – V. 3, No 4:e00371-18.
- 163. Gómez-Casanova N., Bellido A., Espinosa-Texis A., Cueva R., Ciudad T., Larriba G. *Candida tropicalis* isolates from mexican republic exhibit high susceptibility to bleomycin and variable susceptibility to hydrogen peroxide // Microb Drug Resist. – 2018. – V. 24, No 7. – P. 1031-1039.
- 164. Gonzalez-Suarez I., Sewer A., Walker P., Mathis C., Ellis S., Woodhouse H., Guedj E., Dulize R., Marescotti D., Acali S., Martin F., Ivanov N.V., Hoeng J., Peitsch M.C. Systems biology approach for evaluating the biological impact of environmental toxicants *in vitro* // Chem Res Toxicol. 2014. V. 27, No 3. P. 367-376.
- 165. Gracheva O.A., Sokolova A.E., Privalov P.L., Lev A.A. Development of salt-dependent and cation-specific states of lipid bilayer in the presence of valinomycin // Dokl Akad Nauk SSSR. – 1979. – V. 246. – P. 986-990.
- 166. Graf S., Schmieden D., Tschauner K., Hunke S., Unden G. The sensor kinase DctS forms a tripartite sensor unit with DctB and DctA for sensing C4-dicarboxylates in *Bacillus subtilis* // J Bacteriol. – 2014. – V. 196, No 5. – P. 1084-1093.
- 167. Greber K.E., Dawgul M. Antimicrobial peptides under clinical trials // Curr Top Med Chem. – 2017. – V.17, No 5. – P. 620-628.

- 168. Griffith D.A., Pajor A.M. Acidic residues involved in cation and substrate interactions in the Na⁺/dicarboxylate cotransporter, NaDC-1 // Biochemistry. – 1999. – V. 38, No 23. – P. 7524-7531.
- 169. Grobler J., Bauer F., Subden R.E., van Vuuren H.J.J. The mae1 gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C4 dicarboxylic acids // Yeast. – 1995. – V. 11, No 15. – P. 1485-1491.
- 170. Guadet J., Julien J., Lafey J.F., Brygoo Y. Phylogeny of some Fusarium species, as determined by large subunit rRNA sequence comparison // Mol Biol Evol. 1989. V. 6, No 3. P. 227-242.
- Guha S., Ghimire J., Wu E., Wimley W.C. Mechanistic landscape of membrane-permeabilizing peptides // Chem Rev. – 2019. – V. 119. – P. 6040-6085.
- 172. Gunzel D., Hintz K., Durry S., Schlue W-R. Mg²⁺-malate co-transport, a mechanism for Na⁺-independent Mg²⁺ transport in neurons of the leech Hirudo medicinalis // J Neurophysiol. – 2005. – V. 94, No 1. – P. 441-453.
- 173. Guo Z., Miyoshi H., Komyoji T., Haga T., Fujita T. Quantitative analysis with physicochemical substituent and molecular parameters of uncoupling activity of substituted diarylamine // Biochim Biophys Acta. – 1991. – V. 1059, No 1. – P. 91-98.
- 174. Habermann E. Bee and wasp venoms // Science. 1972. V. 177, No. 4046. P. 314-322.
- 175. Habermann E., Kowallek, H. Modifications of amino groups and tryptophan in melittin as an aid to recognition of structure-activity relationships // Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem. – 1970. – V. 351. – P. 884-890.
- 176. Hafke J. B., Hafke Y., Smith J. A. C., et al Vacuolar malate uptake is mediated by an anion-selective inward rectifier // Plant J. – 2003. – V. 35, No 1. – P. 116-129.

- 177. Hall J.A., Pajor A.M. Functional reconstitution of SdcS, a Na⁺-coupled dicarboxylate carrier protein from *Staphylococcus aureus* // J Bacteriol. 2007. V. 187, No 3. P. 5189-5194.
- 178. Han M-L, Zhu Y, Creek D J, Lin Y-W, Anderson D, Shen H-H, Tsuji B, Gutu A. D, Moskowitz S.M., Velkov T, Li J. Alterations of metabolic and lipid profiles in polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* // Antimicrob Agents Chemother. – 2018. – V. 62, No 6:e02656-17.
- Hanke W., Boheim G. The lowest conductance state of the alamethicin pore // Biochim. Biophys. Acta. – 1980. – V. 596, No. 3. – P. 456-462.
- 180. Hanke W., Methfessel C., Wilmsen H.U., Katz E., Jung G., Boheim G. Melittin and a chemically modified trichotoxin form alamethicin-type multi-state pores // Biochim Biophys Acta. – 1983. – V. 727, No. 1. – P. 108-114.
- 181. Harrod C.J., Rodriguez S.B., Thornton R.J. Derepressed utilization of Lmalic acid and succinic acid by mutants of *Pachysolen tannophilus* // J Ind Microbiol Biotechnol. – 1997. – V. 18, No 6. – P. 379-383.
- 182. Hatefi Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system // Annu. Rev. Biochem. – 1985. – Vol. 54, No 1. – P. 1015–1069.
- 183. Hauser H., Finer E.G., Chapman D. Nuclear magnetic resonance studies of the polypeptide alamethicin and its interaction with phospholipids // J Mol Biol. – 1970. – V. 53, No 3, P. 419-428.
- 184. He K., Ludtke S.J., Heller W. T., Huang H.W. Mechanism of alamethicin insertion into lipid bilayers // Biophys J. – 1996 – V. 71. – P. 2669-2679.
- 185. He K., Ludtke S.J., Worcester D.L., Huang H.W. Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores // Biophys J. – 1996. – V. 70, No. 6. – P. 2659-2666.
- 186. Heirwegh K.P.M., Meuwissen J.A.T.P., Vermeier M., De Smedt H. Liposomes as carriers of poorly water-soluble substrates: linear modeling

of membrane systems with catalytic or binding sites of different facedness // Biochem J. – 1988. – V. 254, No 1. – P. 101-108.

- 187. Hellmann N., Schwarz G. Peptide-liposome association. A critical examination with mastoparan-X // Biochim Biophys Acta. – 1998. – V. 1369, No. 2. – P. 267-77.
- 188. Helluin O., Dugast J.Y., Molle G., Mackie A.R., Ladha S., Duclohier H. Lateral diffusion and conductance properties of a fluorescein-labelled alamethicin in planar lipid bilayers // Biochim Biophys Acta. – 1997. – V. 1330, No. 2. – P. 284-292.
- 189. Henderson J.M., Waring A.J. Separovic F., Lee K.Y.C. Antimicrobial peptides share a common interaction driven by membrane line tension reduction // Biophysical Journal. – 2016. – V. 111, No. 10. – P. 2176-2189.
- 190. Hendler R.W., Shrager R.I. Problems in the experimental determination of substrate-specific H⁺/O ratios during respiration // J Bioenerg Biomembr. 1987. V. 19. P. 551-569.
- 191. Herick K., Krämer R. Kinetic and energetic characterization of solute flux through the reconstituted aspartate/glutamate carrier from beef heart mitochondria after modification with mercurials // Biochim Biophys Acta. - 1995. - V. 1238, No 1. - P. 63-71.
- 192. Hilchie A.L., Sharon A.J., Haney E.F., Hoskin D.W., Bally M.B., Franco O.L., Corcoran J.A., Hancock R.E.W. Mastoparan is a membranolytic anti-cancer peptide that works synergistically with gemcitabine in a mouse model of mammary carcinoma // Biochim Biophys Acta. 2016. V. 1858, No 12. P. 3195-3204.
- 193. Hildebrandt T.M., Grieshaber M.K. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria // FEBS J. – 2008. – V. 275, No 13. – P. 3352-3361.

- 194. Hirai Y., Yasuhara T., Yoshida H., Nakajima T., Fujino M., Kitada C. A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii* // Chem Pharm Bull. – 1979. – V. 27. – P. 1942-1944.
- 195. Ho C.L., Hwang L.L. Structure and biological activities of a new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa basalis* // Biochem J. 1991. V. 274 P. 453-456.
- 196. Hoekenga O.A., Maron L.G., Piñeros M.A., et al AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2006. –V.103, No 25. – P. 9749-9750.
- 197. Hoffman C.S., Winston F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli* // Gene. – 1987. – V.57, No 2-3. – P.267-272.
- 198. Hollmann, A.; Martinez, M.; Maturana, P.; Semorile, L.C.; Maffia, P.C. Antimicrobial peptides: Interaction with model and biological membranes and synergism with chemical antibiotics // Front Chem. – 2018. V. 6. – P. 204.
- 199. Hori Y., Demura M., M. Iwadate M., Ulrich A. S., Niidome T., Aoyagi H., Asakura T. Interaction of mastoparan with membranes studied by 1H-NMR spectroscopy in detergent micelles and by solid-state 2H-NMR and 15N-NMR spectroscopy in oriented lipid bilayers // Eur J Biochem. 2001. V. 268, No. 2. P. 302-309.
- 200. Horvath L.I., Dress M, Beyer K, Klingenberg M, Marsh D. Lipid-Protein Interaction in ADP-ATP Carrier/Egg Phosphatidylcholine Recombinants Studied by Spin-Label ESR Spectroscopy // Biochemistry. – 1990. – V. 29. – P. 10664-10669.
- 201. Huang H.W. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity // Biochim Biophys Acta. – 2006. – V. 1758, No. 9. – P. 1292-1302.

- 202. Huey W., Huang H.W. Free energies of molecular bound states in lipid bilayers: lethal concentrations of antimicrobial peptides // Biophys J. – 2009. – V. 96, No 8. – P. 3263-3272.
- 203. Huizing M., Ruitenbeek W., van den Heuvel L.P., Dolce V., Iacobazzi V., Smeitink J.A., Palmieri F., Trijbels J.M. Human mitochondrial transmembrane metabolite carriers: tissue distribution and its implication for mitochondrial disorders // J Bioenerg Biomembr. – 1998. – V. 30, No 3. – P. 277-284.
- 204. Hunt G.R., Jones I.C. Lanthanide-ion transport across phospholipid vesicular membranes: a comparison of alamethicin 30 and A23187 using 1H-NMR spectroscopy // Biosci Rep. – 1982. – V. 2, No. 11. – P. 921-928.
- 205. Hunt G.R., Jones I.C., Veiro J.A. Phosphatidic acid regulates the activity of the channel-forming ionophores alamethicin, melittin, and nystatin: a 1H-NMR study using phospholipid membranes // Biosci. Rep. – 1984. – V. 4 – P. 403-413.
- 206. Hunter F.E., Smith J.E.E. Measurement of mitochondrial swelling and shrinking - high amplitude // Methods in Enzymol. – 1967. – V.10. – P. 689-692.
- 207. Indiveri C., Capobianco L., Krämer R., Palmieri F. Kinetics of the reconstituted dicarboxylate carrier from rat liver mitochondria // Biochim Biophys Acta. – 1989. –V. 977, No 2. – P. 187-193.
- 208. Indiveri C., Capobiano L., Palmieri F. Kinetics of the mitochondrial dicarboxylate carrier reconstituted into liposomes // Int J Biochem. – 1988. – V. 37. – P. 321A-323A.
- 209. Indiveri C., Prezioso G., Dierks T. Kinetic discrimination of two substrate binding sites of reconstituted dicarboxylate carrier from rat liver mitochondria // Biochim Biophys Acta. – 1993. – V. 977, No 2. – P. 194-199.

- 210. Inoue K., Fei Y.J., Zhuang L. Functional features and genomic organization of mouse NaCT, a sodium-coupled transporter for tricarboxylic acid cycle intermediates // Biochem J. – 2004. – V. 378, No 3. – P. 949-957.
- 211. Inoue K., Zhuang L., Maddox D.M. Structure, function, and expression pattern of a novel sodium-coupled citrate transporter (NaCT) cloned from mammalian brain // J Biol Chem. – 2002. – V. 277, No 42. – P. 39469-39476.
- Izawa T., Unger A.K. Isolation of mitochondria from Saccharomyces cerevisiae // Methods Mol Biol. 2017. V. 1567. P. 33-42.
- 213. Jamalzadeh E., Verheijen P.J.T., Heijnen J.J., van Gulik W.M. pHdependent uptake of fumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic conditions // Appl Environ Microbiol. – 2012. – V. 78, No 3. – P. 705-716.
- Janausch I.G., Zients E., Tran Q.H. C4-dicarboxilate carriers and sensors in bacteria // Biochim Biophys Acta. – 2002. – V. 1553, No 1-2. – P. 39-56.
- 215. Jezek P., Mahdi F., Garlid K.D. 1990 Reconstitution of the beef heart and rat liver mitochondrial K⁺/H⁺ (Na⁺/H⁺) antiporter // J Biol Chem. 1990.
 –V. 265, No 18. P. 10522-10526.
- 216. Jiang X., Smirnova I., Kasho V., Wu J., Hirata K., Ke M., Pardon E., Steyaert J., Yan N., Kaback H.R. Crystal structure of a LacY-nanobody complex in a periplasmic-open conformation // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2016. – V. 113, No 44. – P. 12420-12425.
- 217. Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels // Nature. 2002. V. 417, No 6888. P. 523-526.
- Jin, G.; Weinberg, A. Human antimicrobial peptides and cancer // Semin Cell Dev Biol. – 2019. – V. 88. – P. 156-162.

- 219. Johnson Z.L., Cheong C.-G., Lee S.-Y. Crystal structure of a concentrative nucleoside transporter from *Vibrio cholerae* at 2.4 Å // Nature. 2012. V. 483, No 7390. P. 489-493.
- 220. Joseph J.W., Jensen M.V., Ilkayeva O., Palmieri F., Alárcon C., Rhodes C.J., Newgard C.B. The mitochondrial citrate/isocitrate carrier plays a regulatory role in glucose-stimulated insulin secretion // J Biol Chem. 2006. V. 281, No 47. P. 35624-35632.
- 221. Jozefiak A.; Engberg R.M. Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review // J Anim Feed Sci. – 2017. – V. 26. – P. 87-99.
- 222. Jung G., Redemann T., Kroll K., Meder S., Hirsch A., Boheim G. Template-free self-assembling fullerene and lipopeptide conjugates of alamethicin form voltage-dependent ion channels of remarkable stability and activity // J Pept Sci. – 2003. – V. 9, No. 11-12. – P. 784-798.
- 223. Justo R., Oliver J., Gianotti M. Brown adipose tissue mitochondrial subpopulations show different morphological and thermogenic characteristics // Mitochondrion. – 2005. – V. 5. – P. 45-53.
- 224. Kahn E.S., Pajor A.M. Determinants of substrate and cation affinities in the Na⁺/dicarboxylate cotransporter // Biochemistry. 1999. V. 38, No 19. P. 6151-6156.
- 225. Kakhniashvili D., Mayor A.I., Gremse D.A. Identification of a novel gene encoding the yeast mitochondrial dicarboxylate transport protein via overexpression, purification, and characterization of its protein product // J Biol Chem. – 1997. – V. 272, No 7. – P. 4516-4521.
- 226. Kamath L, Meydani A, Foss F, Kuliopulos A. Signaling From proteaseactivated receptor-1 inhibits migration and invasion of breast cancer cells // Cancer Res. – 2001. V. 61, No 15. – P. 5933-5940.
- 227. Dickson V. K., Pedi L., Long S.B. Structure and insights into the function of a Ca(²⁺)-activated Cl(⁻) channel // Nature. 2014. P. 516, No 7530. V. 213-218.
- 228. Kaneko T., Nakamura Y., Sato S. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 // DNA Res. – 2002. – V. 9, No 6. – P. 189-197.
- 229. Kaplan R.S., Mayor J.A., Brauer D., Kotaria R., Walters D.E., Dean A.M. The yeast mitochondrial citrate transport protein. Probing the secondary structure of transmembrane domain iv and identification of residues that likely comprise a portion of the citrate translocation pathway // J Biol Chem. – 2000. – V. 275, No 16. – P. 12009-12016.
- 230. Kaplan R.S., Mayor J.A., Gremse D.A., Wood D.O. High level expression and characterization of the mitochondrial citrate transport protein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // J Biol Chem. – 1995. – V. 270, No 8. – P. 4108-4114.
- 231. Kaplan R.S., Mayor J.A., Johnston N., Oliveira D.L. Purification and characterization of the reconstitutively active tricarboxylate transporter fromr rat liver mitochondria // J Biol Chem. – 1990. – V. 265, No 22. – P. 13379-13385.
- 232. Kaplan R.S., Mayor J.A., Wood D.O. The mitochondrial tricarboxylate transport protein. cDNA cloning, primary structure, and comparison with other mitochondrial transport proteins // J Biol Chem. 1993. V. 268, No 18. P. 13682-13690.
- 233. Karinou E., Hoskisson P.A., Strecker A., Unden G., Javelle A. The E. coli dicarboxylic acid transporters DauA act as a signal transducer by interacting with the DctA uptake system // Sci Rep. 2017. V. 7, No 1. P. 16331.
- 234. Kartasheva N.N., Kuchin S.V., Benevolensky S.V. Genetic aspects of carbon catabolite repression of the STA2 glucoamylase gene in

Saccharomyces cerevisiae // Yeast. – 1996. – V. 12, No 13. – P.1297-1300.

- 235. Kasbauer M., Bayer T.M. Formation of domains of cationic or anionic lipids in binary lipid mixtures increases the electrostatic coupling strength of water-soluble proteins to supported bilayers // Biochemistry. – 1999. – V. 38. – P. 15258-15263.
- 236. Kastner C.N, Prummer M., Sick B. The citrate carrier CitS probed by single-molecule fluorescence spectroscopy // Biophys J. – 2003. – V.84, No 3. – P. 1651-1659.
- 237. Kaufhold M., Schulz K., Breljak D., Gupta S., Henjakovic M., Krick W., Hagos Y., Sabolic I., Burckhardt B. C., Burckhardt G. Differential interaction of dicarboxylates with human sodium-dicarboxylate cotransporter 3 and organic anion transporters 1 and 3. // Am J Physiol Renal Physiol. – 2011. – V. 301, No 5. – P. 1026-1034.
- 238. Kempf C., Klausner R.D., Weinstein J.N., Renswoude J.V., Pincus M., Blumenthal R. Voltage-dependent trans-bilayer orientation of melittin // J Biol Chem. – 1982. – V. 257, No. 5. – P. 2469-2476.
- 239. Kessel A., Cafiso D.S., Ben-Tal N. Continuum solvent model calculations of alamethicin-membrane interactions: thermodynamic aspects // Biophysical Journal. 2000. V. 78, No. 2. P. 571-583.
- 240. Kessel A., Tieleman D.P., Ben-Tal N. Implicit solvent model estimates of the stability of model structures of the alamethicin channel // Eur Biophys J. – 2004. – V. 33, No 1. – P. 16-28.
- 241. Kim O.B., Unden G. The L-Tartrate/Succinate Antiporter TtdT (YgjE) of L-Tartrate Fermentation in *Escherichia coli* // J Bacteriol. – 2007. – V.189, No 5. – P. 1597-1603.
- 242. Kim S.J., Park, J.H., Kim K.H., Lee W.R., Kim K.S., Park K.K. Melittin inhibits atherosclerosis in LPS/high-fat treated mice through

atheroprotective actions // J Atheroscler Thromb. – 2011. – V. 18, No 12. – P. 1117-11126.

- 243. Kim S-K., Park K-Y., Yoon W-C., Park S-H., Park K-K., Yoo D-H., Choe J-Y. Melittin enhances apoptosis through suppression of IL-6/sIL-6R complex-induced NF-κB and STAT3 activation and Bcl-2 expression for human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis // Joint Bone Spine. 2011. 78, No 5. P. 471-477.
- 244. Kinclova-Zimmermannova O, Gaskova D, Sychrova H. 2006 The Na⁺,K⁺/H⁺ -antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Yeast Res. 2006. V. 6. P. 792-800.
- 245. Kinnally K.W., Antonenko Y.N., Zorov D.B. Modulation of inner mitochondrial membrane channel activity // J Bioenerg Biomembr. – 1992. –V. 24. – P. 99-110.
- 246. Kintzer A.F., Stroud R.M. Structure, inhibition and regulation of two-pore channel TPC1 from *Arabidopsis thaliana* // Nature. – 2016. – V. 531, No 7593. – P.258-262.
- 247. Klingenberg M. Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria // Arch Biochem Biophys. 1989. V. 270, No 1. P. 1-14.
- 248. Klingenberg M., Winkler E. The reconstituted isolated uncoupling protein is a membrane potential driven H⁺ translocator // EMBO J. – 1985. –V. 4, No 12. – P. 3087-3092.
- 249. Klocek G., Schulthess T., Shai Y., Seelig J. Thermodynamics of melittin binding to lipid bilayers. Aggregation and pore formation // Biochemistry. -2009. – V. 48, No. 12. – P. 2586-2596.
- Knauf F., Mohebbi N., Teichert C. The life-extending gene Indy encodes an exchanger for Krebs-cycle intermediates // Biochem J. – 2006. – V. 397, No 1. – P. 25-29.

- 251. Knauf P.A.M., Nancy A. Use of niflumic acid to determine the nature of the asymmetry of the human erythrocyte anion exchange system // J Gen Physiol. – 1984. – V. 83, No 5. – P. 703-725.
- 252. Kotlyar A.B., Maklashina E., Cecchini G. Absence of NADH channeling in coupled reaction of mitochondrial malate dehydrogenase and Complex I in alamethicin-permeabilized rat liver mitochondria // Biochem Biophys Res Commun. – 2004. – V. 318, No 4. – P. 987-991.
- 253. Kouzayha A., Nasir M.N., Buchet R., Wattraint O., Sarazin C., Besson F. Conformational and interfacial analyses of K3A18K3 and alamethicin in model membranes // J Phys Chem B. – 2009. – V. 113, No. 19. – P. 7012-7019.
- 254. Kouzayha A., Wattraint O., Sarazin C. Interactions of two transmembrane peptides in supported lipid bilayers studied by a (31)P and (15)N MAOSS NMR strategy // Biochimie. – 2009. – V. 91, No. 6. – P. 774-778.
- 255. Kovermann P., Meyer S., Hörtensteiner S., et al The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family // Plant J. 2007. V. 52, No 6. P. 1169-1180.
- 256. Krom B.P., Lolkema J.S. Conserved residues R420 and Q428 in a cytoplasmic loop of the citrate/malate transporter CimH of *Bacillus subtilis* are accessible from the external face of the membrane // Biochemistry. 2003. V. 42, No 2. P. 467-474.
- 257. Kschischo M., Ramos J., Sychrová H. Membrane transport in yeast, an introduction // Adv Exp Med Biol. – 2016. – V. 892. – P. 1-10.
- 258. Kunji E.R., Crichton P.G. Mitochondrial carriers function as monomers // Biochim Biophys Acta. – 2010. – V. 1797, No 6-7. – P. 817-831.
- 259. Kurtzman C.P., Robnett C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences // Antonie van Leeuwenhoek. – 1998. – V. 73. – P. 331-371.

- 260. Kwon Y.B., Ham T.W., Kim H.W., Roh D.H., Yoon S.Y., Han H.J. et al. Water soluble fraction (<10 kDa) from bee venom reduces visceral pain behavior through spinal alpha 2-adrenergic activity in mice // Pharmacol Biochem Behav. – 2005. – V. 80, No 1. – P. 181-187.
- 261. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein // J. Mol. Biol. 1982. V.157, No 1. P. 105-132.
- 262. Laatikainen M., Sainio T., Davankov V. Modeling of size-exclusion chromatography of electrolytes on non-ionic nanoporous adsorbents // Journal of chromatography. – 2007. – V. 1149, No. 2. – P. 245-253.
- 263. Ladokhin A.S., Selsted M.E., White S.H. Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of co-encapsulated markers: pore formation by melittin // Biophys. J. – 1997. – V. 72, No 4. – P. 1762-1766.
- 264. Lash L.H. Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications // Chem Biol Interact. 2006.
 V. 163, No 1-2. P. 54-67.
- 265. Lee M.T., Hung W.C., Chen F.Y., Huang H.W. Mechanism and kinetics of pore formation in membranes by water-soluble amphipathic peptides // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2008. – V. 105, No. 13. – P. 5087-5092.
- 266. Lee M.T., Sun T.L., Hung W.C., Huang, H.W. Process of inducing pores in membranes by melittin // Proc Natl Acad Sci USA. – 2013. – V. 110, No 35. – P. 14243-14248.
- 267. Lehninger A.L., Neubert D. Effect of oxytocin, vasopressin, and other disulfide hormones on uptake and extrusion of water by mitochondria // Proc Natl Acad Sci USA. – 1961. – V. 47, No 12. – P. 1929-1936.
- 268. Lei J., Sun L., Huang S., Zhu C., Li P., He J., Mackey V., Coy D. H., He Q. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications // Am J Transl Res. 2019. V. 11, No 7. P. 3919-3931.

- 269. Leitgeb B., Szekeres A., Manczinger L., Vágvölgyi C., Kredics L. The history of alamethicin: a review of the most extensively studied peptaibol // Chem Biodivers. – 2007. – V. 4, No. 6. – P. 1027-1051.
- 270. Lenton L.M., Behm C.A., Bygrave F.L. Aberrant mitochondrial respiration in the livers of rats infected with Fasciola hepatica: the role of elevated non-esterified fatty acids and altered phospholipid composition // Biochem J. – 1995. – V. 307, No 2. – P. 425-431.
- Leveritt J.M., Pino-Angeles A., Lazaridis T. The structure of a melittinstabilized pore // Biophysical Journal. – 2015. – V. 108, No. 10. – P. 2424-2426.
- 272. Li J., Ke T., He C., Cao W., Wei M., Zhang L., Zhang J-X., Wang W., Ma J., Wang Z-R., Shao Z-J. The anti-arthritic effects of synthetic melittin on the complete Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis model in rats // Am J Chin Med. – 2010. – V. 38, No 6. – P. 1039-1049.
- 273. Lim C.H., Jeong W., Lim W., Kim J., Song G., Bazer F.W. Biol Reprod. Differential expression of select members of the SLC family of genes and regulation of expression by microRNAs in the chicken oviduct // Biol Reprod. – 2012. – V. 87, No 6. – P. 145.
- Lin, J.H., Baumgaertner A. Stability of a melittin pore in a lipid bilayer: a molecular dynamics study // Biophysical Journal. 2000. V. 78. P. 1714-1724.
- 275. Litsky M.L., Pfeiffer D.R. Regulation of the mitochondrial Ca2⁺ uniporter by external adenine nucleotides: the uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations // Biochemistry. – 1997. – V. 36, No 23. – P. 367071-7080.
- 276. Liu C.C., Hao D.J., Zhang Q., An J., Zhao J.J., Chen B., Zhang L.L., Yang H. Application of bee venom and its main constituent melittin for cancer treatment // Cancer Chemother Pharmacol. – 2016. – V. 78, No 6. – P. 1113-1130.

- 277. Locher K.P. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 2009. – V. 364, No 1514. – P. 239-245.
- 278. Lodi T., Fontanesi F., Ferrero I. and Donnini C. Carboxylic acids permeases in yeast: two genes in *Kluyveromyces lactis* // Gene. – 2004. – V. 339. – P. 111-119.
- 279. Lodish, H.F., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., Martin K. C., eds. // Molecular Cell Biology, 8rd ed. – New York: W.H. Freeman-Macmillan Learning, 2016. – 1170 p.
- 280. Lolkema J.S., Sobczak I., Slotboom D.J. Secondary transporters of the 2HCT family contain two homologous domains with inverted membrane topology and trans re-entrant loops // FEBS J. – 2005. – V. 272, No 9. – P. 2334-2344.
- 281. Lu F., Li S., Jiang Y., Jiang J., Fan H., Lu G., Deng D., Dang S., Zhang X., Wang J., Yan N. Structure and mechanism of the uracil transporter UraA // Nature. 2011. V. 472, No 7342. P. 243-246.
- 282. Lu M. Structure and mechanism of the divalent anion/Na⁺ symporter // Int J Mol Sci. – 2019. – V. 20, No 2. – P. 440.
- 283. Lv C., Zhang Z., Zhao T., Han M-F., Jia D-P., Su L-Z., Huang F., Wang F-Z., Fang F-F., Li B. The anti-tumour effect of Mel and its role in autophagy in human hepatocellular carcinoma cells // Am J Transl Res. 2019. V. 11, No 2. P. 931-941.
- 284. Ma C., Kotaria R., Mayor J.A. The mitochondrial citrate transport protein: probing the secondary structure of transmembrane domain III, identification of residues that ortion of the citrate transport pathway, and development of a model for the putative TMDIII-TMDIII' interface // J Biol Chem. – 2004. – V. 279, No 2. – P. 1533-1540.
- 285. Ma C., Remani S., Kotaria R. The mitochondrial citrate transport protein: evidence for a steric interaction between glutamine 182 and leucine 120

and its relationship to the substrate translocation pathway and identification of other mechanistically essential residues // Biochim Biophys Acta. -2006. - V. 1757, No 9-10. - P. 1271-1276.

- 286. Ma C., Remani S., Sun J., Kotaria R., Mayor J.A., Walters D.E., Kaplan R.S. Identification of the substrate binding sites within the yeast mitochondrial citrate transport protein // J Biol Chem. 2007. V. 282, No 23. P.17210-17220.
- 287. Ma D., Lu P., Yan C., Fan C., Yin P., Wang J., Shi Y. Structure and mechanism of a glutamate-GABA antiporter // Nature. – 2012. – V. 483, No 7391. – P. 632-636.
- 288. Machicka B., Grochowalska R., Boniewska-Bernacka E., Slominska L., Lachowicz T.M. Acid excreting mutants of yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Biochem Biophys Res Commun. – 2004. – V. 325. – P. 1030-1036.
- 289. Maguire M.E. Magnesium transporters: properties, regulation and structure // Front Biosci. – 2006. – V. 1, No. 11. – P. 3149-3163.
- 290. Mahendran K., Niitsu A., Kong L. A monodisperse transmembrane αhelical peptide barrel // Nature Chem. – 2017. – V. 9, No. 5. – P. 411-419.
- 291. Majima E., Takeda M., Miki S., Shinohara Y., Terada H. Close location of the first loop to the third loop of the mitochondrial ADP/ATP carrier deduced from cross-linking catalyzed by copper-o-phenanthroline of the solubilized carrier with Triton X-100 // J Biochem. – 2002. – V. 131. – P. 461-468.
- 292. Mancusso R., Gregorio G., Liu Q., Wang D. Structure and mechanism of a bacterial sodium-dependent dicarboxylate transporter // Nature. – 2012.
 - V. 491, No 7425. – P. 622-666.
- 293. Manna M., Mukhopadhyay C. Cause and effect of melittin-induced pore formation: a computational approach // Langmuir. 2009. –V. 25, No. 20. P. 12235-12242.

- 294. Mannella C.A. Introduction: our changing views of mitochondria // J Bioenerg Biomembr. – 2000. – V.32, No 1. – P. 1-4.
- 295. Marquez J.A., Serrano R. Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene PMR2/ENA1 during salt stress in yeast // FEBS Lett. – 1996. – V. 382 – P. 89-92.
- 296. Marty I., Brandolin G., Gagnon J., Brasseur R., Vignais P.V. Topography of the membrane-bound ADP/ATP carrier assessed by enzymatic proteolysis // Biochemistry. – 1992. – V. 31, No 16. – P. 4058-4065.
- 297. Mathew M.K., Balaram P.A. Helix dipole model for alamethicin and related transmembrane channels // FEBS Lett. – 1983. – V. 157, No. 1. – P. 1-5.
- 298. Matsuzaki K., Yoneyama S., Miyajima K. Pore formation and translocation of melittin // Biophys J. 1997. V. 73, No 2. P.831-838.
- 299. Matsuzaki K., Yoneyama S., Murase O., Miyajima K. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation // Biochemistry. – 1996. – V. 35, No. 25. – P. 8450-8456.
- 300. Matthews B.J., Vosshall L.B. How to turn an organism into a model organism in 10 'easy' steps // J Exp Biol. – 2020. – V. 7. – V. 223, No 1. – P.jeb218198.
- McClelland M., Sanderson K.E., Spieth J. Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2 // Nature. – 2001. – V. 413, No 6858. – P. 852-856.
- 302. McDonald A. E., Niere J. O., Plaxton W. C. Phosphite disrupts the acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to phosphate starvation // Can J Microbiol. – 2001. – V. 47, No 11. P. 969-978.
- 303. Medeiros D.B., Barros K.A., Barros J.A.S., Omena-Garcia R.P., Arrivault S., Sanglard L.M.V.P., Detmann K.C., Silva W.B., Daloso D.M., DaMatta F.M., Nunes-Nesi A., Fernie A.R., Araújo W.L. Impaired malate and fumarate accumulation due to the mutation of the tonoplast dicarboxylate

transporter has little effects on stomatal behavior // Plant Physiol. – 2017. – V. 175. – P. 1068-1081.

- Meijer A.J., van Dam K. Mitochondrial ion transport. In: Membrane Transport (eds. Bonting, S. and De Pont J.) // Elsevier, 1981. – P. 235-255.
- 305. Menestrina G., Voges K.P., Jung G., Boheim G. Voltage-dependent channel formation by rods of helical polypeptides // J Membr Biol. – 1986. – V. 93, No. 2. – P. 111-132.
- 306. Mereuta L., Asandei A., Luchian T. Meet me on the other side: transbilayer modulation of a model voltage-gated ion channel activity by membrane electrostatics asymmetry // PLoS One. – 2011. – V. 6, No. 9: e25276.
- 307. Meyer C.E., Reusser F. A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride //* Experientia. – 1967. – V. 15, No. 23. – P. 85-86.
- Mihajlovic M., Lazaridis T. Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores // Biochim Biophys Acta. – 2010. – V.1798, No. 8. – P. 1485-1493.
- 309. Mihajlovic M., Lazaridis T. Charge distribution and imperfect amphipathicity affect pore formation by antimicrobial peptides // Biochim Biophys Acta. – 2012. – V. 1818, No. 5. – P. 1274-1283.
- 310. Mishra N. N., Tran T. T., Seepersaud R., Garcia-de-la-Maria C., Faull K., Yoon A., Proctor R., Miro J. M., Rybak M. J., Bayer A. S., Arias C. A., Sullam P. M. Perturbations of phosphatidate cytidylyltransferase (CdsA) mediate daptomycin resistance in *Streptococcus mitis/oralis* by a novel mechanism // Antimicrob Agents Chemother. – 2017. – V. 61, No 4: e02435-16.
- 311. Miyoshi H., Nishioka T., Fujita T. Quantitative relationship between protonophoric and uncoupling activities of analogs of SF6847 (2,6-di-t-

butyl-4-(2',2'-dicyanovinyl)phenol) // Biochim Biophys Acta. – 1987. – V. 891, No 1. – P. 293-299.

- 312. Miyoshi H., Tsujishita H., Tokutake N., Fujita T. Quantitative analysis of uncoupling activity of substituted phenols with a physicochemical substituent and molecular parameters // Biochim Biophys Acta. – 1990. – V. 1016, No 1. – P. 99-106.
- 313. Moffatt J. H., Harper M., Harrison P., Hale J. D. F, Vinogradov E., Seemann T., Henry R., Crane B., Michael F. St., Cox A.D, Adler B., Nation R. L., Li J., Boyce J. D. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production // Antimicrob Agents Chemother. – 2010. –V. 54, No 12. – P. 4971-4977.
- 314. Molle G., Duclohier H., Julien S., Spach G. Synthetic analogues of alamethicin: effect of C-terminal residue substitutions and chain length on the ion channel lifetimes // Biochim Biophys Acta. – 1991. – V. 1064, No. 2. – P. 365-369.
- 315. Morel F., Lauquin G., Lunardi J. An appraisal of the functional significance of the inhibitory effect of long chain acyl-CoAs on mitochondrial transports // FEBS Lett. – 1974. – V. 39, No 2. – P. 133-138.
- 316. Mottamal M., Lazaridis T. Voltage-dependent energetics of alamethicin monomers in the membrane // Biophysical Chemistry. – 2006. – V. 122, No. 1. – P. 50-57.
- 317. Muller R.U., Finkelstein A. Voltage-dependent conductance induced in thin lipid membranes by monazomycin // J Gen Physiol. – 1972. – V. 60, No 3. – P. 263-284.
- 318. Mulligan C., Fenollar-Ferrer C., Fitzgerald G.A., Vergara-Jaque A., Kaufmann D., Li Y., Forrest L.R., Mindell J.A. The bacterial dicarboxylate transporter VcINDY uses a two-domain elevator-type mechanism // Nat Struct Mol Biol. – 2016. – V. 23, No 3. – P. 256-263.

- 319. Murphy G.A. Sociodemographic distribution of non-communicable disease risk factors in rural Uganda: a cross-sectional study // Int J Epidemiol. – 2016. – V. 45, No 6. – P. 2209.
- 320. Mwenechanya R., Kovářová J., Dickens N. J., Mudaliar M., Herzyk P., Vincent I. M., Weidt S.K., Burgess K. E., Burchmore R.J.S., Pountain A.W., Smith T.K., Creek D.J , Kim D-H., Lepesheva G.I., Barrett M.P. Sterol 14α-demethylase mutation leads to amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana* // PLoS Negl Trop Dis. – 2017. – V. 11, No 6:e0005649.
- 321. Nałecz M.J., Nałecz K.A., Azzi A. Purification and functional characterisation of the pyruvate (monocarboxylate) carrier from baker's yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) // Biochim Biophys Acta. - 1991. - V. 1079, No 1. - P. 87-95.
- 322. Naumov E.S., Naumov G.I., Molina E.I. Genetic variation among european strains of *Saccharomyces paradoxus*: results from DNA fingerprinting // Syst Appl Microbiol. – 2000. – V. 23, No 1. – P. 86-92.
- 323. Naumov G.I., James S.A., Naumova E.S., Louis E.J., Roberts.I.N. Three new species in the Saccharomyces sensu stricto complex: Saccharomyces cariocanus, Saccharomyces kudriavzevii and Saccharomyces mikatae // Int J Syst Evol Microb. – 2000. – V.50. – P. 931-1942.
- 324. Naumova E.S., Korshunova I.V., Jespersen L., Naumov G.I. Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer // FEMS Yeast Res. – 2003. – V. 3, No 2. – P. 177-184.
- 325. Naumowicz M., Kotynska J., Petelska A., Figaszewski Z. Impedance analysis of phosphatidylcholine membranes modified with valinomycin // Eur Biophys J. – 2006. – V. 35, No 3. – P. 239-246.
- 326. Nicholls D.G. The physiological regulation of uncoupling proteins // Biochim Biophys Acta. – 2006. – V. 1757, No 5-6. – P. 459-466.

- Nicholls D.G., Ferguson S.J. Bioenergetics, 3rd ed. London: Academic Press, 2002. – 288 p.
- 328. Niimi M., Tao L., Lin S.H., Yin J., Wu X., Fukui H., Kambayashi J., Ye J., Sun B. Involvement of an alternatively spliced mitochondrial oxodicarboxylate carrier in adipogenesis in 3T3-L1 cells // J Biomed Sci. 2009. V. 16, No 1. P. 92.
- 329. Nuti R., Goud N. S., Saraswati A. P., Alvala R., Alvala M. Antimicrobial peptides: a promising therapeutic strategy in tackling antimicrobial resistance // Curr Med Chem. – 2017. – V. 24, No 38. P. 4303-4314.
- Okuda J, Miwa I. Newer developments in enzymic determination of Dglucose and its anomers // Methods Biochem Anal. – 1973. – V. 21. – P. 155-189.
- 331. Opsahl L.R., Webbt W.W. Transition of membrane tension by the ion channel alamethicin // Biophys J. – 1994. – V. 66, No. 1. – P. 71-74.
- 332. O'Rourke B., Maack C. The role of Na dysregulation in cardiac disease and how it impacts electrophysiology // Drug Discov Today Dis Models. -2007. -V. 4, No 4. - P. 207-217.
- 333. Oršolić N. Bee venom in cancer therapy // Cancer Metastasis Rev. -2012.
 V. 31, No 1-2. P. 173-194.
- 334. Oshiro N., King S.C., Pajor A.M. Transmembrane helices 3 and 4 are involved in substrate recognition by the Na⁺/dicarboxylate cotransporter, NaDC1 // Biochemistry. – 2006. – V. 45, No 7. – P. 2302-2310.
- 335. Oshiro N., Pajor A.M. Ala-504 is a determinant of substrate binding affinity in the mouse Na(⁺)/dicarboxylate cotransporter // Biochim Biophys Acta. – 2006. – V. 1758, No 6. – P. 781-788.
- 336. Oshiro N., Pajor A.M. Functional characterization of high-affinity Na(⁺)/dicarboxylate cotransporter found in *Xenopus laevis* kidney and heart // Am. J Physiol Cell Physiol. – 2005. – V. 289, No 5. – P. 1159-1168.

- 337. Ostroumova O.S., Kaulin Y.A., Gurnev P.A., Schagina L.V. Effect of agents modifying the membrane dipole potential on properties of syringomycin E channels // Langmuir. – 2007. – V. 23, No. 13. – P. 6889-6892.
- Ovchinnikov I.A. Macrocyclic depsipeptide antibiotics and ion transport through membranes // Usp Sovrem Biol. – 1974. – V. 77, No 2. – P. 103-124.
- Ovchinnikov Y.A., Ivanov V. T., Shkrob A. M. Membrane-active complexones. // Amsterdam: Elsevier, 1974. – V. 12. – P. 464.
- 340. Ozaki S., Kano K., Shirai O. Electrochemical elucidation on the mechanism of uncoupling caused by hydrophobic weak acids // Phys Chem Chem Phys. – 2008. –V. 10. – P. 4449-4455.
- 341. Ozcan S., Dover J., Rosenwald A.G., Wölfl S., Johnston M. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1996. – V. 93, No 22. – P. 12428-12432.
- 342. Pajor A.M. Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters // Pflugers Arch. – 2006. – V. 451, No 5. – P. 597-605.
- 343. Pajor A.M. Molecular cloning and functional expressional a sodiumdicarboxylate cotransporter from human kidney // Am J Physiol. – 1996. – V. 270, – V.4 – P. F642-F648.
- 344. Pajor A.M. Sequence and functional characterization of renal sodium/dicarboxylate cotransporter // J Biol Chem. – 1995. – V. 270, No 11. – P. 5779-5785.
- 345. Pajor A.M., Hirayama B.A., Loo D.F. Sodium and lithium interactions with the Na⁺/dicarboxylate cotransporter // J Biol Chem. – 1998. – V. 273, No 30. – P. 18923-18929.
- 346. Pajor A.M., Kahn E.S., Gangula R. Role of cationic amino acids in the

Na⁺/dicarboxylate co-transporter NaDC-1 // Biochem. J. -2000. - V. 350, No 3. - P. 677-683.

- 347. Pajor A.M., Randolph K.M. Inhibition of the Na⁺/dicarboxylate cotransporter by anthranilic acid derivatives // Mol Pharmacol. – 2007. – V. 72, No 5. – P. 1330-1336.
- 348. Pajor A.M., Sun N., Bai L. The substrate recognition domain in the Na⁺/dicarboxylate and Na⁺/sulfate cotransporters is located in the carboxy-terminal portion of the protein // Biochim Biophys Acta. – 1998. – V. 1370, No 1. – P. 98-106.
- 349. Pajor A.M., Sun N., Valmonte H.G. Mutational analysis of histidine residues in the rabbit Na⁺/dicarboxylate co-transporter NaDC-1 // Biochem J. – 1998. – V. 331, No 1. – P. 257-264.
- 350. Palade G. The fine structure of mitochondria // Anat Rec. 1952. V. 114. – P. 427-451.
- 351. Pallotta M.L., Fratianni A., Passarella S. Metabolite transport in isolated yeast mitochondria: fumarate/malate and succinate/malate antiports // FEBS Lett. – 1999. – V. 462, No 3. – P. 313-316.
- 352. Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications // Pflugers Arch. Eur J Physiol. 2004. V. 447, No 5. P. 689-709.
- 353. Palmieri F., Monne M. Discoveries, metabolic roles and diseases of mitochondrial carriers: A review // Biochim Biophys Acta. – 2016. – V. 1863, No 10. – P. 2362-2378.
- 354. Palmieri F., Prezioso G., Quagliariello E., Klingenberg M. Kinetic study of the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria // Eur J Biochem. – 1971. – V 22, No 1. – P. 66-74.
- 355. Palmieri L., Agrimi G., Runswick M.J. Identification in Saccharomyces cerevisiae of two isoforms of a novel mitochondrial transporter for 2oxoadipate and 2-oxoglutarate // J Biol Chem. – 2001. – V. 276, No 3. –

P. 1916-1922.

- 356. Palmieri L., Lasorsa F.M., De Palma A., Palmieri F., Runswick M.J., Walker J.E. Identification of the yeast ACR1 gene product as a succinate– fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate // FEBS Lett. – 1997. – V. 417, No 1. – P. 114-118.
- 357. Palmieri L., Palmieri F., Runswick M.J., Walker J.E. Identification by bacterial expression and functional reconstitution of the yeast genomic sequence encoding the mitochondrial dicarboxylate carrier protein // FEBS Lett. – 1996. – V. 399, No 3. – P. 299-302.
- 358. Palmieri L., Picault N., Arrigoni R. Molecular identification of three Arabidopsis thaliana mitochondrial dicarboxylate carrier isoforms: organ distribution, bacterial expression, reconstitution into liposomes and functional characterization // Biochem J. – 2008. – V. 410, No 3. – P. 621-629.
- 359. Palmieri L., Runswick M.J., Fiermonte G., Walker J.E., Palmieri F. Yeast mitochondrial carriers: bacterial expression, biochemical identification and metabolic significance // J Bioenerg Biomembr. – 2000 – No 32. – P. 67-77.
- 360. Palmieri L., Vozza A., Hönlinger A., Dietmeier K., Palmisano A., Zara V., Palmieri F. The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as the sole carbon source // Mol Microbiol. 1999. V. 31, No 2. P. 569-577.
- 361. Pandidan S., Mechler A. Nano-viscosimetry analysis of the membrane disrupting action of the bee venom peptide melittin // Sci Rep. – 2019. – V. 9. – No.1:10841.
- 362. Papo N., Shai Y. Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides // Biochemistry. – 2003. – V. 42. – P. 458-466.

- 363. Park J.H., Kim K.H., Lee W.R., Han S.M., Park K.K. Protective effect of melittin on inflammation and apoptosis in acute liver failure // Apoptosis. - 2012. - V. 17, No 1. - P. 61-69.
- 364. Park J.H., Kum Y.S., Lee T.I., Kim S.J., Lee W.R., Kim B.I., Kim H.S., Kim K.H., Park K.K. Melittin attenuates liver injury in thioacetamidetreated mice through modulating inflammation and fibrogenesis // Exp Biol Med. – 2011. – V. 236, No 11. – P. 1306-1313.
- 365. Park Y., Park S.N., Park S-C., Shin S.O., Kim J-Y., Kang S-J., Kim M-H., Jeong C-Y., Hahm K-S. Synergism of Leu-Lys rich antimicrobial peptides and chloramphenicol against bacterial cells // Biochim Biophys Acta. – 2006. – V. 1764, No. 1. – P. 24-32.
- 366. Passarella S., Palmieri F., Genchi G., Stipani I., Quagliariello E. Specificity of the carrier of dicarboxylic acids in rat liver mitochondria. I // Boll Soc Ital Biol Sper. – 1972. – V. 48, No 13. – P. 341-345.
- 367. Passarella S., Quagliariello E. The citric cycle intermediates transport in rat liver mitochondria // Biochimie. – 1976. – V. 58, No 8. – P. 989-1001.
- 368. Pastore D., Di Pede S., Passarella S. Isolated durum wheat and potato cell mitochondria oxidize externally added NADH mostly via the malate/oxaloacetate shuttle with a rate that depends on the carriermediated transport // Plant Physiol. – 2003. – V. 133, No 4. – P. 2029-20239.
- 369. Pawlak M., Stankowski S., Schwarz G. Melittin induced voltagedependent conductance in DOPC lipid bilayers // Biochim Biophys Acta. - 1991. - V. 1062, No 1. - P. 94-102.
- Payandeh J., Scheuer T., Zheng N., Catterall W.A. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel // Nature. – 2011. – V. 475, No 7356. – P. 353-358.
- 371. Pebay-Peyroula E., Dahout-Gonzalez C., Kahn R., Trézéguet V., Lauquin G.J., Brandolin G. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in

complex with carboxyatractyloside // Nature. – 2003. – V. 426, No 6962. – P. 39-44.

- 372. Peña A., Cinco G., Gómez-Puyou A., Tuena M. Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae* // Arch Biochem Biophys. – 1972. – V. 153, No 2. – P. 413-425.
- Peruzzo R., Biasutto L., Szabo I., Leanza L. Impact of intracellular ion channels on cancer development and progression // Eur Biophys J. – 2016.
 –V. 45, No 7. – P. 685-707.
- 374. Pfeiffer D.R., Gudz T.I., Novgorodov S.A., Erdahl W.L. The peptide mastoparan is a potent facilitator of the mitochondrial permeability transition // J Biol Chem. – 1995. – V. 270, No 9. – P. 4923-4932.
- 375. Picault N., Palmieri L., Pisano I., et al Identification of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization and tissue distribution // J Biol Chem. – 2002. – V. 277, No 27. – P. 24204-24211.
- 376. Pierre V.V., Jan I., Michejda W., Doussiere J.I. Inhibition by valinomycin of atractyloside binding to the membrane-bound ADP/ATP carrier: counteracting effect of cations // J Bioenerg Biomembr. – 1983. – V. 15, No 5. – P. 243-256.
- Pisat N. P., Pandey A., Macdiarmid C. W. MNR2 regulates intracellular magnesium storage in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. – 2009. – V. 183, No 3. – 873-884.
- 378. Polakis E.S., Bartley W., Meek G.A. Changes in the activities of respiratory enzymes during the aerobic growth of yeast on different carbon sources // Biochemistry. – 1965. – V. 97. – P. 298-302.
- 379. Polozov, I.V., Polozova, A.I., Tytler, E.M., Anantharamaiah, G.M., Segrest, J.P., Woolley, G.A., Epand, R.M. Role of lipids in the

permeabilization of membranes by class L amphipathic helical peptides // Biochemistry. – 1997. – V. 36. – P. 9237-9245.

- 380. Pos K.M., Dimroth P., Bott M. The *Escherichia coli* citrate carrier CitT: a member of a novel eubacterial transporter family related to the 2oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts // J Bacteriol. – 1998. – V. 180, No 16. – P. 4160-4165.
- 381. Prabhananda B.S., Kombrabail M.H. Evidence for dimer participation and evidence against channel mechanism in A23187-mediated monovalent metal ion transport across phospholipid vesicular membrane // Biophys J. - 1998. - V. 75, No 4. - P. 1749-1758.
- 382. Pressman B.C. lonophorous antibiotics as models for biological transport
 // Fed Proc. 1968. V. 27, No 6. P. 1283.
- 383. Purkait B, Kumar A, Nandi N, Sardar A H, Das S, Kumar S, Pandey K, Ravidas V, Kumar M, De T, Singh D, Das P. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani* // Antimicrob Agents Chemother. – 2012. – V. 56, No 2. – P. 1031-41.
- 384. Purwin C., Nicolay K., Scheffers W.A., Holzer H. Mechanism of control of adenylate cyclase activity in yeast by fermentable sugars and carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone // J Biol Chem. – 1986. – V. 261, No 19. – P. 8744-8749.
- 385. Qian S., Wang W., Yang L., Huang H. Structure of the alamethicin pore reconstructed by X-ray diffraction analysis // Biophys J. – 2008. – V. 94, No. 9. – P. 3512-3522.
- 386. Qiu B., Xia B., Zhou Q., Lu Y., He M., Hasegawa K., Ma Z., Zhang F., Gu L., Mao Q., Wang F., Zhao S., Gao Z., Liao J. Succinate-acetate permease from *Citrobacter koseri* is an anion channel that unidirectionally translocates acetate // Cell Res. – 2018. – V. 28, No 6. – P. 644-654.

- 387. Quagliariello E., Passarella S. Transport phenomena across liver mitochondria membranes // Bioelectrochem Bioenerg. – 1974. – V. 1, No 3/4. – V. – P. 275 - 292.
- 388. Queiros O., Casal M., Althoff S. Isolation and characterization of Kluyveromyces marxianus mutants deficient in malate transport // Yeast. -1998. – V.14, No 5. – P.401-407.
- 389. Rady I., Siddiqui I.A., Rady M., Mukhtara H. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy // Cancer Lett. – 2017. – V. 402. – P. 16-31.
- 390. Rato K., Sasaki M., Kimura S. Application of the dansylation reaction in the characterization of low molecular weight peptides by dodecyl sulphate-polyacrylamide-gel electrophoresys // Analyt Biochem. – 1975. – V. 66, No 2. – P. 545-522.
- 391. Redruello B., Valdes E., Luz Lopez M., Rodicio R. Multiple regulatory elements control the expression of the yeast ACR1 gene // FEBS Lett. – 1999. – V. 445, No 2-3. – P. 246-250.
- 392. Regenberg B., Holmberg S., Olsen L.D., Kielland-Brandt M.C. Dip5p mediates high-affinity and high-capacity transport of L-glutamate and Laspartate in *Saccharomyces cerevisiae* // Curr Genet. – 1998. – V. 33. – P. 171-177.
- 393. Renne P., Dressen U., Hebbeker U. The Arabidopsis mutant dct is deficient in the plastidic glutamate/malate translocator DiT2 // Plant J. – 2003. – V. 35, No 3. – P. 316-331.
- 394. Rex S. Pore formation induced by the peptide melittin in different lipid vesicle membranes // Biophys Chem. – 1996. – V. 58, No. 1-2. – P. 75-85.
- 395. Rinehart Jr., K.L., Cook Jr., J.C., Meng H., Olson K.L., Pandey R.C. Mass spectrometric determination of molecular formulas for membranemodifying antibiotics // Nature. – 1977. – V. 269. – P. 832-823.
- 396. Robinson A.J., Kunji E.R. Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state

have a common substrate binding site // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2006. – V. 103, No 8. – P. 2617-2622.

- 397. Romani A. Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells // Arch Biochem Biophys. – 2007. – V. 458, No 1. – P. 90-102.
- 398. Rosa L.T., Dix S.R., Rafferty J.B., Kelly D.J. A New mechanism for highaffinity uptake of C4-dicarboxylates in bacteria revealed by the structure of *Rhodopseudomonas palustris* MatC (RPA3494), a periplasmic binding protein of the tripartite tricarboxylate transporter (TTT) Family // J Mol Biol. – 2019. – V. 431, No 2. – P. 351-367.
- 399. Rossi E., Azzone G.F. Ion transport in liver mitochondria. IV. The relationship between ion translocation and electron transport // J Biol Chem. – 1968. – V. 243, No 7. – P. 1514-1522.
- 400. Runswick M.J., Walker J.E., Bisaccia F. Sequence of the bovine 2oxoglutarate/malate protein: structural relationship to other mitochondrial transport protein // Biochemistry. – 1990. – V. 29, No 50. – P. 11033-11040.
- 401. Saayman M., van Vuuren H.J., van Zyl W.H., Viljoen-Bloom M. Differential uptake of fumarate by *Candida utilis* and *Schizosaccharomyces pombe* // Appl Microbiol Biotechnol. 2000. V. 54, No 6. P. 792-798.
- 402. Saint-Macary M., Foucher B. Comparative partial purification of the active dicarboxylate transport system of rat liver, kidney and heart mitochondria // Biochem Biophys Res Commun. 1985. V. 133, No 2. P. 498-504.
- 403. Saitoh I., Miyoshi H., Shimizu R., Iwamura H. Comparison of structure of quinone redox site in the mitochondrial cytochrome-bc1 complex and photosystem II (QB site). // Eur J Biochem. – 1992. – V. 209, No 1. – P. 73-79.

- 404. Salmon J.M. L-malic-acid permeation in resting cells of anaerobically grown Saccharomyces cerevisiae // Biochim Biophys Acta. – 1987. – V. 901. – P. 30-34.
- 405. Saotome K., Singh A.K., Yelshanskaya M.V., Sobolevsky A.I. 2016 Crystal structure of the epithelial calcium channel TRPV6 // Nature. – 2016. – V. 534, No 7608. – P. 506-511.
- 406. Sazanov L.A. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2015. V. 6. – P. 375-388.
- 407. Scarpa A., Gier J.D. Cation permeability of liposomes as a function of the chemical composition of the lipid bilayers // Biochim Biophys Acta. 1971. V. 241, No 3. P. 789-897.
- 408. Schlessinger A., Sun N.N., Colas C., Pajor A.M. Determinants of substrate and cation transport in the human Na⁺/dicarboxylate cotransporter NaDC3 // J Biol Chem. – 2014. – V. 289, No 24. – P. 16998-7008.
- 409. Schon E.A., DiMauro S. Medicinal and genetic approaches to the treatment of mitochondrial disease // Curr Med Chem. – 2003. – V.10, No 23. – P. 2523-2533.
- 410. Schulze S., Köster S., Geldmacher U., Terwisscha van Scheltinga A.C., Kühlbrandt W. Structural basis of Na(⁺)-independent and cooperative substrate/product antiport in CaiT // Nature. 2010. V. 467, No 7312. P. 233-236.
- 411. Schwarz G., Beschiashvili G. Thermodynamic and kinetic studies on the association of melittin with a phospholipid bilayer // BBA. 1989. V. 979, No. 1. P. 82-90.
- 412. Schwarz G., Reiter R. Negative cooperativity and aggregation in biphasic binding of mastoparan X peptide to membranes with acidic lipids // Biophys Chem. 2001. –V. 90, No. 3. P. 269-277.

- 413. Schwarz G., Robert C.H. Kinetics of pore-mediated release of marker molecules from liposomes or cells // Biophys Chem. – 1992. – V. 42, No 3. – P. 291-296.
- 414. Schwarz G., Robert C.H. Pore formation kinetics in membranes, determined from the release of marker molecules out of liposomes or cells // Biophys J. 1990. V. 58, No. 3. P. 577-583.
- 415. Schwarz G., Savko P. 1982 Structural and dipolar studies of the voltage-dependent pore former alamethicin in octanol/dioxane // Biophys J. 1982. V. 39, No. 2. P. 211-219.
- 416. Schwarz G., Zong R.T., Popescu T. Kinetics of melittin induced pore formation in the membrane of lipid vesicles // Biochim Biophys Acta. – 1992. – V. 1110, No 1. – P. 97-104.
- 417. Sekina T., Cha S.H., Hosoyamada M. Cloning, functional characterization, and localization of a rat renal Na⁺ dicarboxylate transporter // Am J Physiol. – 1998. – V. 275, No 2. – P. F298-305.
- 418. Sengupta D., Leontiadou H., Mark A.E., Marrink S. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder // Biochim Biophys Acta. – 2008. – V. 1778, No 10. – P. 2308-2317.
- 419. Shahidullah K., London E. Effect of lipid composition on the topography of membrane-associated hydrophobic helices: stabilization of transmembrane topography by anionic lipids // J Mol Biol. 2008. V. 379, No 4. P. 704-718.
- 420. Sherman F., Fink G.F., Hicks J.B. Methods in yeast genetics: A Laboratory Course Manual. New York: Cold Spring Harbor, 1986. 186 p.
- 421. Shi M., Wang H-N., Xie S-T., Luo Y., Sun C-Y., Chen X-L., Zhang Y-Z. Antimicrobial peptaibols, novel suppressors of tumor cells, targeted calcium-mediated apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells // Mol Cancer. – 2010. – V. 9. P. 26-41.

- 422. Shipolini R.A., Callewaert G.L., Cottrell R.C., Doonan S., Vernon C.A., Banks B.E. Phospholipase A from bee venom // Eur J Biochem. – 1971. – V. 20. – P. 459-468.
- 423. Sholtz K.F., Bondarenko D.I., Mamaev D.V. Probing the active center of the mitochondrial dicarboxylate transporter // FEBS Lett. 1993. V. 327, No 1. P. 54-56.
- 424. Shpakov A.O. Polycationic peptides as nonhormonal regulators of chemosignal systems // Z Evol Biokhim Phyziol. – 2009. – V. 45. – P. 355-367.
- 425. Sierra J.M., Fusté E., Rabanal F., Vinuesa T., Viñas M. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development // Expert Opin Biol Ther. – 2017. V. 17, No 6. P. 663-676.
- 426. Six S., Andrews S.C., Unden G., Guest I.R. Escherichia coli possesses two homologous anaerobic C4-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct) // J Bacteriol. – 1994. – V. 176, No 21. – P. 6470-6478.
- 427. Smith R., Tanford C. Hydrophobicity of long chain n-alkyl carboxylic acids, as measured by their distribution between heptane and aqueous solutions // Proc Natl Acad Sci. – 1973. – V. 70, No 2. – P. 289-293.
- 428. Sobczak I., Lolkema J.S. Loop VIII/IX of the Na⁺-citrate transporter CitS of *Klebsiella pneumoniae* folds into an amphipathic surface helix // Biochemistry. 2005. V. 44, No 14. P. 5461-5470.
- 429. Son D.J., Lee J.W., Lee Y.H., Song H.S., Lee C.K., Hong J.T. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds // Pharmacol Ther. – 2007. – V. 115, No 2. – P. 246-270.
- 430. Sorgato M.C., Keller B.U., Stühmer W. Patch-clamping of the inner mitochondrial membrane reveals a voltage-dependent ion channel // Nature. – 1987. – V. 330, No 6147. – P. 498-500.

- 431. Sousa M.J., Mota M., Leão C. Transport of malic acid in the yeast Schizosaccharomyces pombe: evidence for a proton-dicarboxylate symport // Yeast. – 1992. – V. 8. – P. 1025-1031.
- 432. Spagnoletta A., De Santis A., Tampieri E. Identification and kinetic characterization of HtDTC, the mitochondrial dicarboxylatetricarboxylate carrier of *Jerusalem artichoke* tubers // J Bioenerg Biomembr. – 2006. – V. 38, No 1. – P. 57-65.
- 433. Stankowski S., Pawlak M., Kaisheva E., Robert C.H., Schwarz G. A combined study of aggregation, membrane affinity and pore activity of natural and modified melittin // Biochim Biophys Acta. 1991. V. 1069, No. 1. P. 77-86.
- 434. Stankowski S., Schwarz G. Electrostatics of a peptide at a membrane/water interface. The pH dependence of melittin association with lipid vesicles // Biochim Biophys Acta. – 1990. – V. 1025, No. 2. – P. 164-172.
- 435. Stankowski S., Schwarz G. Lipid dependence of peptide-membrane interactions // FEBS Lett. - 1989. - V. 250, No. 2. - P.556-560.
- 436. Stark G., Ketterer B, Benz R., Läuger P. The rate constants of valinomycin-mediated ion transport through thin lipid membranes // Biophys J. – 1971. – V. 11, No 12. – P. 981-994.
- 437. Steffgen J., Burckhardt B.C., Langenberg C. Expression cloning and characterization of a novel sodium dicarboxylate cotransporter from winter flounder kidney // J Biol Chem. – 1999. – V. 274, No 29. – P. 20191-20196.
- 438. Stephen W. F.Jr, Smissman E. E., Schowen K.B., Self G. W. Conformational aspects of systems related to acetylcholine. 3. Base-catalyzed and acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of the isomeric dl-3-trimethylammonium-2-acetoxy-trans-decalin halides and the

isomeric dl-1-methyl-3-acetoxy-trans-decahydroquinoline methiodides // J Med Chem. – 1972. – V. 15, No 3. – P. 241-243.

- 439. Steverding D., Kadenbach B. The K(⁺)-ionophores nonactin and valinomycin interact differently with the protein of reconstituted cytochrome c oxidase // J Bioenerg Biomembr. – 1990. – V. 22, No 2. – P. 197-205.
- 440. Stipani V., Cappello A.R., Daddabbo L. The mitochondrial oxoglutarate carrier: cysteine-scanning mutagenesis of transmembrane domain IV and sensitivity of Cys mutants to sulfhydryl reagents // Biochemistry. 2001. V. 40, No 51. P. 15805-15810.
- 441. Stokes J. M., MacNair C. R., Ilyas B., French S., Côté J-P., Bouwman C., Farha M. A., Sieron A. O., Whitfield C., Coombes B. K., Brown E. D. Pentamidine sensitizes Gram-negative pathogens to antibiotics and overcomes acquired colistin resistance // Nat Microbiol. 2017. V. 2. P. 17028.
- 442. Strungaru M.H., Footz T., Liu Y., Berry F.B., Belleau P., Semina E.V., Raymond V., Walter M.A. PITX2 is involved in stress response in cultured human trabecular meshwork cells through regulation of SLC13A3 // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2011. – V. 52, No 10. – P. 7625-7633.
- 443. Su Z., Shodiev M., Leitch J. J., Abbasi F., Lipkowski J. Role of transmembrane potential and defects on the permeabilization of lipid bilayers by alamethicin, an ion-channel-forming peptide // Langmuir. – 2018. – V.34, No. 21. – P. 6249-6260.
- 444. Suk H.J., Boyden E.S., van Welie I. Advances in the automation of whole-cell patch clamp technology // J Neurosci Methods. – 2019. – V. 1, No 326. – P. 108357.

- 445. Suomalainen A. Therapy for mitochondrial disorders: little proof, high research activity, some promise // Semin Fetal Neonatal Med. 2011. V. 16, No 4. P. 236-240.
- 446. Szekeres A., Leitgeb B., Kredics L., Antal Z., Hatvani L., Manczinger L., Vágvölgyi Cs. Peptaibols and related peptaibiotics of Trichoderma. A review // Acta Microbiol Immunol Hung. – 2005. – V. 52, No. 2. – P. 137-168.
- 447. Szewczyk A., Jarmuszkiewicz W., Kunz W. S. Mitochondrial potassium channels // IUBMB Life. 2009. V. 61, No 2. P. 134-143.
- 448. Taira J., Osada S., Jelokhani-Niaraki M., Ehara T., Kodama H. Ion channel formation of dimeric peptide enhanced by electrostatic interhelical interactions // Adv Exp Med Biol. – 2009. – V. 611. – P. 337-338.
- 449. Takei J., Remenyi A., Dempsey C.E. Generalised bilayer perturbation from peptide helix dimerisation at membrane surfaces: vesicle lysis induced by disulphide-dimerised melittin analogues // FEBS Lett. 1999. V. 442, No. 1. P. 11-14.
- 450. Taniguchi M., Taniguchi Y., Kawasaki M., Takeda S., Kato T., Sato S., Tabata S., Miyake H., Sugiyama T. Identifying and characterizing plastidic 2-oxoglutarate/malate and dicarboxylate transporters in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Physiol. – 2002. – V. 43, No 7. – P. 706-717.
- 451. Tavoulari S., Thangaratnarajah C., Mavridou V., Harbour M.E., Martinou J.C., Kunji E.R. The yeast mitochondrial pyruvate carrier is a heterodimer in its functional state // EMBO J. – 2019. – V. 38, No 10:e100785.
- 452. Tenreiro S., Nunes P.A., Viegas C.A., Neves M.S., Teixeira M.C., Cabral M.G., Sa-Correia I. AQR1 gene (ORF YNL065w) encodes a plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily that confers resistance to short-chain monocarboxylic acids and quinidine in

Saccharomyces cerevisiae // Biochem Biophys Res Commun. 2002. – V. 292, No 3. – P. 741-748.

- 453. Terada H. Some biochemical and physicochemical properties of the potent uncoupler SF 6847 (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidenemalononitrile) // Biochim Biophys Acta. 1975. V. 387, No 3. P. 519-532.
- 454. Terada H. Uncouplers of oxidative phosphorylation // Environ Health Perspect. 1990. V. 87. P. 213-218.
- 455. Teusink B., Diderich J.A., Westerhoff H.V., van Dam K., Walsh M.C. Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50% // J Bacteriol. – 1998. – V. 180, No 3. – P. 556-562.
- 456. Thøgersen L., Schiøtt B., Vosegaard T., Nielsen N.C., Tajkhorshid E. Peptide aggregation and pore formation in a lipid bilayer: a combined coarse-grained and all atom molecular dynamics study // Biophysical Journal. – 2008. – V. 95. – P. 4337-4347.
- 457. Tieleman D.P., Hess B., Sansom M.S. Analysis and evaluation of channel models: simulations of alamethicin // Biophys J. 2002. V. 83, No. 5. P. 2393-2407.
- 458. Tillman T.S., Cascio M. Effects of membrane lipids on ion channel structure and function // Cell Biochem Biophys. 2003. V. 38, No 2. P. 161-190.
- 459. Tipgomut C., Wongprommoon A., Takeo E., Ittiudomrak T., Puthong S., Chanchao C. Melittin induced G1 cell cycle arrest and apoptosis in Chago-K1 human bronchogenic carcinoma cells and inhibited the differentiation of THP-1 cells into tumour-associated macrophages // Asian Pac J Cancer Prev. – 2018. V. 19, No 12. – P. 3427–3434.

- 460. Toninello A., Siliprandi D., Siliprandi N. Mg²⁺ restores membrane potential in rat liver mitochondria deenergized by Ca²⁺ and phosphate movements // FEBS Lett. – 1982. – V. 142, No 1. – P. 63-66.
- 461. Tonk, M.; Vilcinskas, A.; Rahnamaeian, M. Insect antimicrobial peptides: potential tools for the prevention of skin cancer // Appl Microbiol Biotechnol. – 2016. – V. 100. – P. 7397-7405.
- 462. Trebacz K., Schönknecht G., Dziubinska H., Hanaka A. Characteristics of anion channels in the tonoplast of the liverwort *Conocephalum conicum* // Plant Cell Physiol. – 2007. – V. 48, No 12. – P. 1747-1757.
- 463. Tucker M. J, Oyola R., Gai F. Conformational distribution of a 14-residue peptide in solution: a fluorescence resonance energy transfer study // J Phys Chem B. – 2005. – V. 109, No 10. – P. 4788-4795.
- 464. Turoscy V., Cooper T.G. Allantoate transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Ureidosuccinate is transported by the allantoate transport system in *Saccharomyces cerevisiae* // J Bacteriol. 1987. V. 169, No 6. P. 2598-2600.
- 465. Turoscy V., Cooper T.G. Allantoate transport in *Saccharomyces cerevisiae* // J Bacteriol. 1979. V. 140, No 3. P. 971-979.
- 466. Turoscy V., Cooper T.G. Ureidosuccinate is transported by the allantoate transport system in *Saccharomyces cerevisiae* // J Bacteriol. 1987. V. 169, No 6. P. 2598-2600.
- 467. Tynecka Z., Korona-Glowniak I., Los R. 2-Oxoglutarate transport system in *Staphylococcus aureus* // Arch Microbiol. – 2001. – V. 176, No 1-2. – P. 143-150.
- 468. Van den Bogaart G., Guzmán J.V., Mika J.T., Poolman B. On the mechanism of pore formation by melittin // J Biol Chem. – 2008. – V. 283, No. 49. – P.33854-33857.
- 469. van der Rest M.E., Kamminga A.H., Nakano A., Anraku Y., Poolman B., Konings W. N. the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*:

structure, function, and biogenesis // Microbiol Rev. – 1995. – V. 59, No 2. – P. 304-322.

- 470. Ventura F.V., Ruiter J., Ijlst L. Differential inhibitory effect of long-chain acyl-CoA esters on succinate and glutamate transport into rat liver mitochondria and its possible implications for long-chain fatty acid oxidation defects // Mol Genet Metab. – 2005. – V. 86, No 3. – P. 344-352.
- 471. Vincent B. M., Lancaster A. K., Scherz-Shouval R., Whitesell L., Lindquist S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B // PLoS Biol. – 2013. – V. 11, No 10:e1001692.
- 472. Visser W.F., van Roermund C.W., Ijlst L. First identification of a 2ketoglutarate/isocitrate transport system in mammalian peroxisomes and its characterization // Biochem Biophys Res Commun. – 2006. – V. 348, No 4. – P. 1224-1231.
- 473. Vodyanoy I., Bezrukov S.M., Parsegian V.A. Probing alamethicin channels with water-soluble polymers. Size-modulated osmotic action // Biophys J. – 1993. – V. 65, No. 5. – P. 2097-2105.
- 474. Vozza G. Parisi F. De Leonardis, Lasorsa F.M., Castegna A., Amorese D., Marmo R., Calcagnile V.M., Palmieri L., Ricquier D., Paradies E., Scarcia P., Palmieri F., Bouillaud F., Fiermonte G. UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation // Proc Natl Acad Sci. U. S. A. – 2014. – V. 111, No 3. – P. 960-965.
- 475. Wada M., Shimada A., Fujita T. Functional characterization of Na⁺ coupled citrate transporter NaC2/NaCT expressed in primary cultures of neurons from mouse cerebral cortex // Brain Res. 2006. V. 1081, No 1. P. 92-100.
- 476. Wakabayashi T., Kurono C., Asano M. Steroidogenesis in the zona glomerulosa of the adrenal coretx. I. Isolation and some properties of

mitochondria from the zona glomerulosa of the bovine adrenal cortex // J Bioenerg. -1976. - V. 8. - P. 27-53.

- 477. Walde P., Cosentino K., Engel H., Stano P. Giant vesicles: preparations and applications // Chembiochem. 2010. V. 11, No 7. P. 848-865.
- 478. Walters D.E., Kaplan R.S. Homology-modeled structure of the yeast mitochondrial citrate transport protein // Biophys. J. – 2004. – V. 87, No 2. – P. 907-911.
- 479. Weerachayaphorn J., Pajor A.M. Sodium-dependent extracellular accessibility of Lys84 in the sodium/dicarboxylate cotransporter // J Biol Chem. – 2007. – V. 282, No 28. – P. 20213-20220.
- 480. Weerachayaphorn J., Pajor A.M. Threonine-509 is a determinant of apparent affinity for both substrate and cations in the human Na(⁺)/dicarboxylate cotransporter // Biochemistry. 2008. V. 47, No 3. P. 1087-1093.
- 481. Weinberg S.E., Chandel N.S. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy // Nat Chem Biol. – 2015. – V. 11, No 1. – P. 9-15.
- 482. Weyand S., Shimamura T., Yajima S., Suzuki S., Mirza O., Krusong K., Carpenter E.P., Rutherford N.G., Hadden J.M., O'Reilly J., Ma P., Saidijam M., Patching S.G., Hope R.J., Norbertczak H.T., Roach P.C., Iwata S., Henderson P.J., Cameron A.D. Structure and molecular mechanism of a nucleobase-cation-symport-1 family transporter // Science. – 2008. – V. 322, No 5902. – P. 709-713.
- 483. White J. Yeast Technology, 1st ed. New York: Wiley, Springer US, 1954. 432 p.
- 484. Wipf D., Ludewig U., Tegeder M. Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals // Trends Biochem. Sci. – 2002. – V. 27, No 3. – P. 139-147.

- 485. Wolkow C.A., Iser W.B. Uncoupling protein homologs may provide a link between mitochondria, metabolism and lifespan // Ageing Res Rev. – 2006. –V. 5. – P. 196-208.
- 486. Woolley G.A. Channel-forming activity of alamethicin: effects of covalent tethering // Chem Biodivers. – 2007. – V. 4, No. 6. – P. 1323-1337.
- 487. Woolley G.A., Biggin P.C., Schultz A., Lien L., Jaikaran D.C., Breed J., Crowhurst K., Sansom M.S. Intrinsic rectification of ion flux in alamethicin channels: studies with an alamethicin dimer // Biophys J. – 1997. – V. 73, No. 2. – P. 770-778.
- 488. Wu Y., He K., Ludtke S.J., Huang H.W. X-ray diffraction study of lipid bilayer membranes interacting with amphiphilic helical peptides: diphytanoyl phosphatidylcholine with alamethicin at low concentrations // Biophys J. – 1995. – V. 68, No. 6. – P.2361-2369.
- 489. Wu Y., Huang H.W., Olah G.A. Method of oriented circular dichroism // Biophys J. – 1990. – V. 57, No. 4. – P. 797-806.
- 490. Wyborn N.R., Alderson J., Andrews S.C., Kelly D.J. Topological analysis of DctQ, the small integral membrane protein of the C4dicarboxylate TRAP transporter of *Rhodobacter capsulatus* //2001 FEMS Microbiol. Lett. – 2001. – V. 194, No 1. – P. 13-17.
- 491. Xu Y., Kakhniashvili D.A., Gremse D.A., Wood D.O., Mayor J.A., Walters D.E., Kaplan R.S. The yeast mitochondrial citrate transport protein. Probing the roles of cysteines, Arg(181), and Arg(189) in transporter function // J Biol Chem. – 2000. – V. 275, No 10. – P. 7117-7124.
- 492. Yajima H., Minamitake Y., Funakoshi S., Hirai Y., Nakajima T. Studies on Peptides. 01. Synthesis of a wasp venom, mastoparan M // Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29, No. 6. P. 1752-1754.

- 493. Yamazaki T., Nakagawa Y., Hayakawa M., Iimura Y. Phylogenetic position of the yeast strain *Saccharomycodes sinensis* IFO 10111 // J Gen Appl Microbiol. – 2005. – V. 51, No 1. – P. 35-39.
- 494. Yang L., Christakou E., Vang J., Lübeck M., Lübeck P.S. Overexpression of a C4-dicarboxylate transporter is the key for rerouting citric acid to C4dicarboxylic acid production in *Aspergillus carbonarius* // Microb Cell Fact. – 2017. – V. 16, No 1. – P. 43-55.
- 495. Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores // Biophys J. – 2001. – V. 81, No. 3. – P. 1475-1485.
- 496. Yantorno R.E., Takashima S., Mueller P. Dipole moment of alamethicin as related to voltage-dependent conductance in lipid bilayers // Biophys. J. 1982. V. 38, No. 2. P. 105-110.
- 497. Yao X., Pajor A.M. The transport properties of the human renal Na(⁺)-dicarboxylate cotransporter under voltage-clamp conditions // Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2000. V. 279, No 1. P. F54-64.
- 498. Yenush L. Potassium and sodium transport in yeast // Adv Exp Med Biol.
 2016. V. 892. P. 187-228.
- 499. Yi, H.Y.; Chowdhury, M.; Huang, Y.D.; Yu, X.Q. Insect antimicrobial peptides and their applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. P. 5807-5822.
- 500. Yibin G., Jiang Z., Hong Z., Gengfa L., Liangxi W., Guo W. et.al. A synthesized cationic tetradecapeptide from hornet venom kills bacteria and neutralizes lipopolysaccharide in vivo and in vitro // Biochem Pharmacol. – 2005. – V. 70, No 2. – P. 209-219.
- 501. Yodoya E., Wada M., Shimada A. Functional and molecular identification of sodium-coupled dicarboxylate transporters in rat primary cultured cerebrocortical astrocytes and neurons // J. Neurochem. – 2006. – V. 97, No 1. – P. 162-173.

- 502. Yokoyama H., Anzai N., Ljubojevic M. Functional and immunochemical characterization of a novel organic anion transporter Oat8 (Slc22a9) in rat renal collecting duct // Cell Physiol. Biochem. – 2008. – V. 21, No 4. – P. 269-278.
- 503. Yu K., Kang S., Kim S.D., Ryu P.D., Kim Y. Interactions between mastoparan B and the membrane studied by 1H NMR spectroscopy // J Biomol Struct Dyn. – 2001. – V. 18, No. 4. – P. 595-606.
- 504. Zara V., Ferramosca A., Robitaille-Foucher P., Palmieri F., Young J.C. Mitochondrial carrier protein biogenesis: role of the chaperones Hsc70 and Hsp90 // Biochem. J. – 2009. – V. 419, No 2. – P. 369-375.
- 505. Zhang Z., Zhang H., Peng T., Li D., Xu J. Melittin suppresses cathepsin S-induced invasion and angiogenesis via blocking of the VEGF-A/VEGFR-2/MEK1/ERK1/2 pathway in human hepatocellular carcinoma // Oncol Lett. – 2016. – V. 11, No 1. – P. 610-618.
- 506. Zhao Y, Luo L, Xu J, Xin P, Guo H, Wu J, Bai L, Wang G, Chu J, Zuo J, Yu H, Huang X, Li. Malate transported from chloroplast to mitochondrion triggers production of ROS and PCD in *Arabidopsis thaliana* // J. Cell Res. – 2018. – V. 28, No 4. – P. 448-461.
- 507. Zheng H., Wisedchaisri G., Gonen T. Crystal structure of a nitrate/nitrite exchanger // Nature. – 2013. – V. 497, No 7451. – P. 647-651.
- 508. Zhou X., Paredes J.A., Krishnan S., Curbo S., Karlsson A. The mitochondrial carrier SLC25A10 regulates cancer cell growth // Oncotarget. – 2015. – V. 6, No 11. – P. 9271-9283.
- 509. Zoratti M., Szabó I. Electrophysiology of the inner mitochondrial membrane // J Bioenerg Biomembr. – 1994. – V. 26, No 10. – P. 543-553.
- 510. Zuniga F.A., Shi G., Haller J.F., Rubashkin A., Flynn D.R., Iserovich P., Fischbarg J. A Three-Dimensional Model of the human facilitative glucose transporter Glut1 // J Biol Chem. – 2001. – V. 276, No 48. – P. 44970-44975.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность научному консультанту – доктору биологических наук, професору Ренате Александровне Звягильской за ценные научные консультации, постоянную помощь и поддержку, благожелательное внимание на протяжении всего периода выполнения работы.

Решающая роль в выборе направления исследований, разработке методологии и использованных в работе методов биоэнергетики принадлежит научному руководителю моей кандидатской диссертации, кандидату биологических наук Кристофору Францевичу Шольцу, память о котором всегда будет жить в сердцах его коллег и учеников.

Искренне благодарю доктора биологических наук, професора Сумбатовича Капрельянца за Арсения конструктивные замечания, рекомендации и доброжелательность, члена-корреспондента РАН Илью Артемьевича Захарова (ИОГЕН РАН) за научные консультации и внимание к моей работе, доктора химических наук, профессора Бориса Ивановича Курганова за ценные замечания и рекомендации, доктора биологических наук Елену Сергеевну Наумову (ГосНИИ Генетики), доктора биологических наук Сергея Алексеевича Булата (ПИЯФ РАН) и кандидата биологических наук Сергея Владимировича Беневоленского за помощь в проведении генетической идентификации дрожжей. Автор выражает благодарность академику PAH Анатолию Ивановичу Мирошникову (ИБХ РАН) за предоставление пептидов – мастопарана, мелиттина и тетраацетилмелиттина.

Благодарю коллектив и руководство Прикаспийского института биологических ресурсов ДФИЦ РАН, кандидата биологических наук Светлану Цалистиновну Котенко за предоставленный коллекционный штамм дрожжей, члена-корреспондента РАН Магомед-Расула Дибировича Магомедова за поддержку на всех этапах выполнения работы.

323

Отдельную благодарность автор выражает старшему научному сотруднику лаборатории биоэнергетики, кандидату биологических наук Дмитрию Владимировичу Мамаеву за плодотворные научные дискуссии, анализ полученных результатов и непосредственное участие в выполнении экспериментальной работы. Искренне благодарю Дмитрия Иосифовича Бондаренко за синтез ингибиторов дикарбоксилатного транспортера.

Благодарю мою семью, коллектив лаборатории биоэнергетики ИНБИ РАН, всех моих коллег и друзей за поддержку, внимание и доброжелательность.