

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
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 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
1.1. Традиционные прямые и непрямые методы исследования трансмембранного транспорта в интактных органеллах и клетках.....	19
1.2. Митохондрии печени крысы и дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – удобные модельные объекты исследований	24
1.3. Транспортёры митохондрий млекопитающих и митохондрий <i>S. cerevisiae</i>	33
1.4. Сопрягающая мембрана митохондрий печени крысы и плазмалемма <i>S. cerevisiae</i> , протонные помпы, протонофорный цикл	40
1.5. Структура и механизм мембранотропного действия пороформеров аламетицина, мелиттина и мастопарана	44
1.6. Медицинское значение пороформеров аламетицина, мелиттина и мастопарана.....	65
1.7. Молекулярные характеристики транспортёров C ₄ -дикарбоксилатов и механизм транслокации.....	69
1.7.1. Транспортёры дикарбоксилатов. Общие сведения, роль в метаболизме	69
1.7.2. Первичная структура транспортёров дикарбоксилатов.....	73
1.7.3. Вторичная структура транспортёров дикарбоксилатов	75
1.7.4. Механизм транспорта и специфичность переносчиков	80
1.7.5. Реконструкция трехмерной структуры активного центра и механизм транслокации	84
1.7.6. Предполагаемая третичная структура транспортёров дикарбоксилатов.....	91
1.8. Трехмерные структуры трансмембранных транспортёров	92

1.9. Теоретическое обоснование некоторых используемых в работе методических приемов	97
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	104
2.1. Реагенты	104
2.2. Модельные организмы.....	105
2.3. Условия выращивания и предобработки клеток <i>S. cerevisiae</i>	105
2.4. Выделение митохондрий дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	107
2.5. Выделение митохондрий печени крысы. Получение субмитохондриальных частиц (СМЧ) и митохондрий с поврежденной мембраной	108
2.5.1. Выделение митохондрий печени крысы.....	108
2.5.2. Получение митопластов и субмитохондриальных частиц (СМЧ) из митохондрий печени крысы	109
2.5.3. Измерение активности сукцинатдегидрогеназы СМЧ.....	110
2.5.4. Получение митохондрий с поврежденной внешней мембраной	111
2.6. Выделение мастопарана и мелиттина	111
2.7. Определение количества белка митохондрий.....	112
2.8. Определение количества глюкозы	112
2.9. Измерение скорости поглощения кислорода клетками <i>S. cerevisiae</i> , митохондриями печени крысы и митохондриями дрожжей	112
2.10. Регистрация потенциала, генерируемого на внутренней мембране митохондрий	113
2.11. Измерение набухания митохондрий и определение концентрации амфифила, вызывающей лизис митохондрий	114
2.12. Определение доли доступной мембранной фазы клеток.....	115
2.13. Синтез производных малата и малоната	116
2.14. Определение коэффициентов распределения О-ацил-L-малатов в системе октанол/среда	117
2.15. Определение размеров молекул	117
2.16. Расчет действующей концентрации амфифильных пептидов	118

2.17. Определение кинетических параметров	118
2.18. Молекулярно-генетические методы.....	119
2.19. Представление результатов.....	122
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	124
3.1. Митохондрии печени крысы – биосенсоры трансмембранного тока...	124
3.1.1. Оценка гомогенности и стабильности митопластов, образующихся из митохондрий печени крысы при действии индукторов проницаемости	124
3.1.2. Особенности активации v_4 митохондрий печени крысы в монокалийевой среде валиномицином и мелиттином	125
3.2. Непрямые методы измерения трансмембранного транспорта в митохондриях печени крысы и в клетках <i>S. cerevisiae</i>	131
3.2.1. Сукцинатоксидазная система препарата митохондрий печени крысы в присутствии протонофора – эндогенная сопряженная система для измерения транспорта интактным дикарбоксилатным транспортером (ДКТ).....	131
3.2.2. Эндогенная сопряженная система клеток для изучения транспорта сукцината и пирувата через плазмалемму <i>S. cerevisiae</i>	133
3.2.2.1. Подбор условий для измерения низкой скорости окисления сукцината клетками <i>S. cerevisiae</i>	134
3.2.2.2. Эквивалентность прямого и непрямого методов измерения транспорта пирувата в клетки <i>S. cerevisiae</i>	136
3.2.2.3. Измерение транспорта сукцината в клетки <i>S. cerevisiae</i>	139
3.2.2.4. Непроницаемость плазматической мембраны <i>S. cerevisiae</i> для ингибиторов транспорта.....	145
3.3. Характеристики пороформеров мелиттина, аламетицина и мастопарана и тетраацетилмелиттина в сопрягающей мембране интактных митохондрий печени крысы.....	150
3.3.1. Природа стадии, лимитирующей активацию v_4 митохондрий печени крысы мелиттином, мастопараном и тетраацетилмелиттином (ТАМ)	150
3.3.2. Природа двуфазной зависимости от времени активации v_4 митохондрий печени крысы аламетицином	155

3.3.3. Природа стадии, лимитирующей первую фазу активации v_4 митохондрий печени крысы аламетицином	158
3.4. Энзимологическая характеристика нового транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i>	161
3.4.1. рН профиль транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i>	174
3.4.2. Регуляция транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> катионами	177
3.5. Моделирование конформации 2-алкилмалонатов и О-ацил-L-малатов с минимальной потенциальной энергией	182
3.6. Использование амфифильных производных субстратов для изучения активного центра транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	185
3.7. Методические принципы и подходы, использованные в работе	189
3.8. Методические достижения и анализ новых свойств пороформеров	190
3.9. Уникальные свойства транспортера дикарбоксилатов плазматической мембраны <i>S. cerevisiae</i>	197
3.10. Липофильный профиль канала переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы <i>S. cerevisiae</i> , сравнение с липофильным профилем канала ДКТ митохондрий печени крысы	201
3.11. Перспективы изучения липофильных профилей ионных каналов с точечными мутациями	206
3.12. Преимущества использования эндогенных сопряженных систем по сравнению с традиционными прямыми методами измерения трансмембранного транспорта	210
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	213
ВЫВОДЫ	215
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	217

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЛМ	–	бислойная липидная мембрана;
БСА	–	бычий сывороточный альбумин;
ДК	–	дыхательный контроль;
ДКТ	–	дикарбоксилатный транспортер;
ДМСО	–	диметилсульфоксид;
КЛМ	–	концентрация, вызывающая лизис митохондрий;
СМЧ	–	субмитохондриальные частицы;
ТАМ	–	тетраацетилмелиттин;
ЭСС	–	эндогенная сопряженная система;
ЭТЦ	–	электрон-транспортная цепь;
A_{200}	–	концентрация пептида, активирующая v_4 на 200%;
C_m	–	равноэффективная мембранная концентрация пептида, соответствующая A_{200} ;
N		порядок реакции
NADH	–	восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида;
NAD ⁺	–	окисленная форма никотинамидадениндинуклеотида;
F	–	флуоресценция;
FCCP	–	(англ. carbonylcyanide(4-trifluoromethoxy)phenylhydrazone) – карбонилцианид(4-флюорометокси)фенилгидразон;
FDA	–	(англ. Food and Drug Administration) – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств;
HEPES	–	(англ. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)-4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота;
I_{50}	–	концентрация ингибитора, вызывающая полумаксимальный эффект;
K_i	–	константа ингибирования;
K_M	–	константа Михаэлиса;

K_p	–	коэффициент распределения амфифильного эффектора между митохондриями печени крысы и средой;
MES	–	(англ. 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота;
n	–	количество атомов углерода в алкильном или ацильном заместителе в формуле ингибитора ДКТ
NaCT	–	Na ⁺ -цитратный транспортер;
NaDCT	–	Na ⁺ -дикарбоксилатный симпортер;
K_n	–	коэффициент распределения O-ацил-L-малатов в системе октанол/среда;
SF	–	3,5-ди- <i>трет</i> -бутил-4-оксибензилиденмалонитрил,
V_{max}	–	максимальная скорость дыхания
V_0	–	скорость дыхания до добавления эффектора
V_e	–	скорость эндогенного дыхания
V_4	–	скорость дыхания в отсутствие эффектора
V_i	–	скорость дыхания в присутствии ингибитора
TMC	–	трансмембранный сегмент;
Tris	–	(англ. Tris(hydroxymethyl)aminomethane) – трис(гидроксиметил)аминометан;
YNB	–	(англ. Yeast Nitrogen Base) среда выращивания дрожжей.
λ	–	удельное содержание липида в митохондриях
$\Delta\psi$	–	потенциал, генерируемый на внутренней митохондриальной мембране.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Наряду с неоспоримыми достоинствами методов изучения качественных показателей трансмембранного транспорта на модельных системах (липосомах и бислойных липидных мембранах (БЛМ)) большинство широко используемых прямых методов количественного исследования трансмембранного транспорта соединений обладает рядом не устранённых до настоящего времени недостатков. Изучению количественных параметров мешает гетерогенность 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].

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

Митохондрии печени крысы и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* признаны удобными модельными объектами исследований. Сукцинатоксидазная ферментативная система митохондрий печени крысы включает дикарбоксилатный транспортер (ДКТ), сукцинатдегидрогеназный комплекс (далее, для краткости, сукцинатдегидрогеназа и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазу (далее убихинолксидазную систему). Причем активность компонентов в этом ряду возрастает. Величина K_M для сукцината у переносчика более чем на порядок превышает величину K_M для сукцината в

реакции, катализируемой сукцинатдегидрогеназой, т.е. природа «сконструировала» почти идеальную эндогенную сопряженную систему (ЭСС) для измерения в стационарном режиме концентрации сукцината в митохондриях. Поэтому дыхательную цепь можно рассматривать как ЭСС для измерения транспорта сукцината в митохондрии. При изучении транспорта окисляемых субстратов в клетки *S. cerevisiae* в качестве ЭСС могут быть использованы митохондрии этих клеток. Митохондрии защищены от непроникающих в клетку ингибиторов и находятся в среде (цитоплазме) со стабильным рН и ионным составом, благодаря системам гомеостаза клетки. Это позволяет изучать влияние этих внешних эффекторов только на трансплазмалемный транспорт.

В настоящее время в связи с появлением штаммов патогенных микроорганизмов, резистентных к антибиотикам, увеличивается интерес медиков к давно известным лекарственным препаратам – пороформерам, в том числе аламетицину, мелиттину и мастопарану. Несмотря на многочисленные исследования, механизм антимикробного действия пороформеров до конца не ясен. Показано антибактериальное, антигрибковое, антипаразитарное и противоопухолевое действие аламетицина [Collins et al., 2023; Torre et al., 2023], что связывают с порообразующим действием этого пептида. Мастопаран предотвращает метастазирование в модельных экспериментах и индуцирует апоптоз опухолевых клеток мочевого пузыря [Ren et al., 2023]. Мелиттин рассматривается как малотоксичный противоопухолевый препарат [Zhang et al., 2016; Pandey et al., 2023], воздействующий на процессы апоптоза, метастазирования, ангиогенеза [Liu et al., 2016]. Показано антимикробное [Huang et al., 2024; Stephani et al., 2024] и нейропротекторное действие мелиттина [Xing et al., 2024]. Мелиттин ингибирует *in vitro* рост устойчивой к метициллину бактерии *Staphylococcus aureus* и в сочетании с оксациллином эффективен *in vivo* при лечении инфекций, вызванных *S. aureus* [Pereira et al., 2023]. Мелиттин и грамицидин *S in vitro* показали антивирусную активность

в отношении SARS-CoV-2, и они рассматриваются в качестве потенциальных противовирусных препаратов [Enayathullah et al., 2022]. Одним из нерешенных вопросов в выяснении механизма порообразования является определение концентрационного порядка лимитирующей стадии этого процесса. Очевидна необходимость разработки методических подходов для исследования действия пороформеров на митохондрии при генерации ими мембранного потенциала ($\Delta\psi$).

C_4 -дикарбоксилаты играют важную роль в метаболизме эукариот. В частности, сукцинат и L-малат являются интермедиатами цикла Кребса и обеспечивают взаимосвязь между обменом в пероксисомах и митохондриях. Показана важная роль транспортеров дикарбоксилатов (ДКТ) в обменных процессах, связанных с возникновением системных патологий, таких как диабет, ожирение печени, а также онкологических заболеваний [Korpe et al., 2021; Akhtar et al., 2022; Selim et al., 2023]. Структура активного центра ДКТ не изучена. В зависимости от возможной ориентации трансмембранные сегменты переносчика могут сформировать как гидрофильный, так и в значительной мере липофильный трансмембранный канал. Степень его липофильности не изучена, так как ни для одного из переносчиков дикарбоксилатов эукариот третичная структура не установлена. Описано лишь моделирование трехмерной структуры Na^+ -зависимого ДКТ человека – NaDC3 [Schlessinger, et al., 2014] на основе переносчика цитрата и глутамата *Vibrio cholera* [Mancusso et al., 2012], что позволило предположить локализацию точек связывания субстратов и Na^+ на противоположных доменах молекулы и подтвердить предположение проведенным мутагенезом [Colas et al., 2017].

Показано, что точка связывания субстрата в ДКТ митохондрий печени крысы экспонирована в просвет канала [Шольц и др., 1990], что позволяет использовать для оценки степени липофильности канала ингибиторный анализ транспорта с помощью серии алкильных и ацильных производных субстрата разной длины [Sholtz et al., 1993; Бондаренко и др., 1996]. Для этой

оценки необходимо было разработать или усовершенствовать методы исследования взаимодействия этих амфифильных соединений с митохондриями и клетками без потери интактности ЭСС.

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

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

Цель работы и основные задачи исследования.

Цель работы – изучение особенностей порообразования пептидными индукторами катионной проницаемости с использованием митохондрий печени крысы, а также изучение свойств, кинетических параметров и структуры активного центра нативного транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей *S. cerevisiae*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

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

2. Получить количественные соотношения между активацией дыхания митохондрий печени крысы и катионным током, индуцированным во внутренней мембране валиномицином, аламетицином, мелиттином,

тетраацетилмелиттином (ТАМ) и мастопараном; определить скорость-лимитирующую стадию порообразования для этих пептидов.

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

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

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

Основные положения, выносимые на защиту:

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

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

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

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

Научная новизна работы.

Получены новые данные, характеризующие первые этапы порообразования для мелиттина, мастопарана и аламетицина в митохондриях печени крысы, генерирующих $\Delta\psi$. Показана возможность использования суспензии прочносопряженных митохондрий в оксиметрической ячейке в качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока, индуцированного пептидами-пороформерами. Доказано, что проводимость, индуцированная во внутренней мембране митохондрий печени крысы, и степень активации окисления ими сукцината связаны линейной зависимостью. Показано, что с помощью такого подхода можно измерить стационарную калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм при генерации $\Delta\psi$, в условиях низких пептид/липидных соотношений и оценить диаметр поры. Определено соотношение степеней активации дыхания аламетицином, мелиттином или мастопараном в монокалиевой и монолитиевой средах при одинаковом значении $\Delta\psi$. Высказано предположение о том, что в присутствии аламетицина и тетраацетилмелиттина проводимость лимитируются реакцией образования поры, а в присутствии мелиттина или мастопарана – стадией, предшествующей порообразованию. На основании обобщения многолетнего экспериментального материала разработана методология использования амфифильных эффекторов и изучения нативных транспортеров в интактных системах, методы измерения кинетических параметров интактных переносчиков *in situ*, основанные на использовании

эндогенных систем окисления субстратов в качестве сопряженных систем измерения транспорта этих соединений. Подобраны условия, при которых митохондрии в клетках *S. cerevisiae* могут служить ЭСС для измерения стационарных скоростей транспорта сукцината и пирувата через плазмалемму. Показано, что в диапазоне от pH 5,5 до pH 7,5, транспорт сукцината через плазмалемму *S. cerevisiae* опосредован O-пальмитоил-L-малат чувствительным транспортером с уникальными и нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами: широкой субстратной специфичностью, оптимумом в области щелочных значений pH, pH-зависимым модулированием транспорта однозарядными катионами; механизм транспорта – незлектрогенный унипорт. Впервые с помощью непроникающих в клетку конкурентных ингибиторов 2-алкилмалонатов изучена структура канала транспортера вблизи точки связывания субстрата. Скорректированы модели трехмерных структур переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* и ДКТ митохондрий печени крысы с разным механизмом функционирования.

Практическая значимость.

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

Методический подход, основанный на использовании суспензии прочносопряженных митохондрий в оксиметрической ячейке в качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока, примененный нами при изучении четырех пептидов-пороформеров, можно в перспективе применить для изучения побочных эффектов 10-ти широко используемых в современной медицине пороформеров-антибиотиков и двух десятков пороформеров, которые по данным FDA (Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств) находятся на второй стадии клинических испытаний. Эффективность использованного подхода подтверждена возможностью измерения стационарной калиевой проводимости, индуцированной в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм при генерации $\Delta\psi$ при низких пептид/липидных соотношениях и оценки диаметра поры. Полученные результаты расширяют представление о механизмах возможного токсического действия пептидов-пороформеров и должны учитываться при разработке на их основе препаратов медицинского назначения.

Методология и методы исследования.

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

Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов обусловлена репрезентативным объемом экспериментального материала, подтверждается воспроизводимостью

результатов, полученных разными методами, соответствующими поставленным задачам. Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли в соответствии с общепринятыми алгоритмами.

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

Апробация работы.

Результаты и основные положения диссертации доложены и обсуждены на 25 российских и международных конференциях, конгрессах и симпозиумах, в том числе, Симпозиуме ESF-EMBO «Comparative genomics of eukaryotic microorganisms. Eucaryotic genome evolution, approaches with yeasts and fungi» (Каталония, Испания, 2005), III-м и IV-м Съездах Общества биохимиков и молекулярных биологов России (Санкт-Петербург, 2002 и Новосибирск, 2008), Московских международных научных конференциях «Биотехнология – окружающей среде» (Москва, 2004, 2005 и 2006), Московском Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2009), 2-м Международном конгрессе Биотехнология – 2011 (Филадельфия, США), IV-й международной конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2011 (Малага, Испания, 2011), V-ой международной конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology BioMicroWorld2013 (Мадрид, Испания, 2013), 27-ой конференции FEBS/PABMB (Лиссабон, Португалия, 2001) Европейских Биоэнергетических конференциях (ЕВЕС) (Москва, 2006 и Дублин,

Ирландия, 2008), 38-ой конференции FEBS (Санкт-Петербург, 2013) и 39-ой конференции FEBS-EMBO (Париж, Франция, 2014), VI конференции Environmental, Industrial and Applied Microbiology - BioMicroWorld2015 (Барселона, Испания, 2015), VI Съезде биохимиков России (Сочи, 2019), VII-м Съезде биохимиков России и X-м Российском симпозиуме "Белки и пептиды" (Сочи–Дагомыс, 2021), Всероссийской конференции с международным участием «Теоретические и практические аспекты действия естественной и искусственной гипотермии на организм» (Махачкала, 2023).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 47 работ, в т.ч. 24 статьи в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, из них 22 – в научных журналах, индексируемых в базе данных Web of Science. В соавторстве получены 2 российских патента на изобретение. Данные диссертации представлены в 5 статьях, включенных в книги зарубежных издательств, в том числе, в качестве глав: “Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology” выпущенной издательством “Formatex Research Center”, Spain, 2010; “Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges”, издательством World Scientific Publishing Co., USA, UK, 2012, “Industrial, medical and environmental applications of microorganisms. Current status and trends”, издательством Wageningen Academic Publishers, the Netherlands, 2014, "Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms", издательством BrownWalker Press, 2016.

Финансовая поддержка

Работа была поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№№ 04-04-49670а, 07-04-00225а (руководитель Д.А. Аливердиева), 06-04-03078б, 07-04-05024б, 08-04-05002б (руководитель член-корреспондент РАН М-Р.Д. Магомедов).

Место проведения работы

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

Структура и объем диссертационной работы

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

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

Клеточная мембрана (плазмалемма, плазматическая мембрана) отделяет содержимое клетки от внешней среды, обеспечивая её целостность и регулируя обмен между клеткой и средой. Одной из её 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 (в клетках животных, в растениях и грибах – в глиоксисомах), важные этапы метаболизма аминокислот и электрон-транспортная цепь, необходимая для выполнения основной функции митохондрий – окислительного фосфорилирования. Взаимозависимость биохимических процессов, протекающих в митохондриях и цитозоле, обеспечивается 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-транспортёрами. Нативность белков и гомогенность их популяции в препарате

В отличие от очищенных ферментов, измерение трансмембранного транспорта очищенными 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 внутренний объем, и при измерении K_M транспорта субстрата, перенесенного из среды в липосомы, концентрация его в липосомах всегда будет существенно большей. А при транспорте субстрата из липосом в среду концентрация субстрата внутри липосом слишком быстро убывает. Кроме того, правильность их встраивания в мембрану не гарантирована.

Биологическая мембрана отличается от искусственной липидным составом и возможной асимметрией между наружным и внутренним лепестками [van der Rest et.al., 1995; Andrews and Corrotte, 2018]. Наиболее простые в получении и гомогенные малые моноламеллярные везикулы 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 солюбилизованных, очищенных и реконструированных в липосомы трикарбоксилатного транспортера [Bisaccia et.al., 1993] и ADP/ATP антипортера [Majima et.al., 2002] от свойств нативных транспортеров. Восстановление активности интегрального белка биологической мембраны после реконструкции в БЛМ также не гарантирует воссоздание всех его функциональных характеристик.

Так АТР-ингибируемый K^+ -канал теряет в искусственной системе зависимость ингибирующего эффекта от Mg^{2+} [Негода и соавт., 2005].

Внутренняя (сопрягающая) мембрана митохондрий состоит преимущественно из белков (75% по весу), но в то же время доля погруженной в бислой «белковой массы» не так велика. Тем не менее, существенную часть гидрофобного матрикса мембраны составляют боковые цепи гидрофобных аминокислот и ассоциированные с ними липиды с нарушенной бислойной организацией [Fattal and Ben-Shaul, 1993; Gil et.al., 1998]. В частности, количество липидов, ассоциированных с самым распространенным интегральным белком митохондрий – ADP/АТР антипортером митохондрий (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.

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 супернатанте после осаждения клетки (или субструктуры), а также как разницу с количеством субстрата, оставшегося в осадке (например, [Sousa et.al., 1992; Akita et.al., 2000]). В ряде случаев возникают методические проблемы, например, измерение в клетках прямыми методами малоактивных транспортеров со

средством к субстрату порядка нескольких миллимолей для метаболизирующегося субстрата, затруднено. Увеличение времени измерения увеличивает количество перенесенного в клетку субстрата, но при этом возрастает и ошибка из-за возможной конверсии субстрата (например, меченый углерод теряется в виде CO_2) [Teusink et.al., 1998]. Если из-за высокого значения K_M , используются большие концентрации субстрата, то увеличивается неспецифическая сорбция на поверхности клеток и удерживание части субстрата в периплазме [Benito and Lagunas, 1992]. Радиоизотопный метод основан на использовании радиоактивных и стабильных изотопов в качестве метки химических элементов, что позволяет следить за их поведением в системе. С помощью счетчика радиоактивности измеряют количество радиоактивного субстрата в супернатанте или в осадке, полученном центрифугированием сразу после остановки транспортного процесса. Добавление к супернатанту экзогенной сопряженной системы (например, лактатдегидрогеназы и NADH) позволяет определить количество пирувата, оставшегося после транспорта, по убыванию вещества с высокой молярной экстинкцией (NADH), затраченного на превращение пирувата в лактат.

Метод локальной фиксации потенциала, пэтч кламп (*англ.* «patch-clamp») – один из методов электрофизиологии для изучения ионных каналов. Метод позволяет в контролируемых условиях измерять ионный ток через каналы в изолированном фрагменте биологической мембраны [Suk HJ et al., 2019]. Метод patch-clamp, успешный во многих отношениях, требует гигантских митохондрий [Antonenko et.al., 1991], что связано с изменением под действием купризона нативного липидного состава этих органелл или модификаций клеток под действием цефалексина – блокатора образования клеточных перегородок. Метод пэтч-кламп позволяет применять эффекторы только с внутренней стороны биомембраны, непригоден для измерения электронейтрального антипорта и мало приспособлен для измерения низких транспортных активностей [Festa, 2022; Bazzone et al., 2023]. 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 транспортеров плазмалеммы или внутриклеточных органелл.

Измерение катионного транспорта, индуцированного самособирающимися пороформирующими пептидами

Пороформеры – это группа липофильных или амфипатических соединений различной природы (пептиды, липопептиды, гликолипиды 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 α -спирализованных мономеров в трансмембранном состоянии в присутствии трансмембранного потенциала более 50 мВ [de Kroon et.al., 1991; Bechinger, 1997]. 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. Важным преимуществом планарных мембран, является возможность проведения с их помощью измерений, позволяющих изучить влияние электрохимических свойств границы раздела БЛМ - раствор электролита, свойства двойного электрического слоя, влияние заряженных частиц на проводимость, индуцированную искусственными и биологическими индукторами проницаемости, включая белки-переносчики [Kasbauer, 1999; Bechinger, 1997]. Однако данная система малоприспособлена 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 [Schwarz et.al., 1992; Takei et.al., 1999].

При этом необходимо измерять проницаемость в момент добавления пороформера, пока еще не произошла декомпенсация $\Delta\psi$ [Polozov et al., 1997]. Поэтому желательно использовать объемную мембранную структуру со «встроенным генератором $\Delta\psi$ ». Об этом будет подробнее написано 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 результат. Наиболее распространенными биосенсорами являются сенсоры на основе ферментов (например, глюкозооксидазы для прослеживания уровня сахара в крови диабетиков). В качестве биосенсоров могут быть использованы клетки микроорганизмов или препараты митохондрий [Gonzalez-Suarez et al., 2014]. Устройством, преобразующим наблюдаемые изменения в электрический сигнал, величина которого пропорциональна концентрации определяемого вещества, в последнем случае может быть амперометрическая ячейка с закрытым электродом Кларка, позволяющая измерять с высокой точностью скорости поглощения кислорода.

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

Митохондрии являются важнейшими внутриклеточными органеллами, участвующими в жизненно важных клеточных процессах и имеющими решающее значение для выживания и смерти клеток. Помимо их самой известной функции, которая заключается в удовлетворении острых и хронических энергетических потребностей через генерацию АТФ, они полностью интегрированы в клеточный метаболизм, необходимый для роста пролиферации и дифференциации клеток [Zhang et al., 2022],

поддерживая гомеостаза кальция [De Brito and Scorrano, 2008; Walsh et al., 2009], регуляция адаптации клеток к внешним факторам стресса [Zhu et al., 2020]. Они участвуют в точном иммунном ответе клетки [Pinegin et al., 2018], модуляции сигналов активных форм кислорода (АФК) и поддержании редокс- гомеостаза [Collins et al., 2012], регуляции апоптоза путем секвестрации цитохрома с в нормальных здоровых условиях и организации его высвобождения в условиях стресса [Galluzzi et al., 2015; Manczak et al., 2019; Fisher et al., 2020; Harrington et al., 2023].

Существует мнение, что именно митохондрии являются основным источником АФК, особенно при их дисфункции. 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; Uoselis et al., 2023], болезней сердечно-сосудистой системы, легких, кожи и многих других [Suomalainen, 2011; Ali et al., 2023].

Общепринятое представление о строении митохондрии приведено на Рис. 1.1., однако существует большое количество фенотипов митохондрий, отличающихся многообразием форм и размеров. Митохондрии характерны две мембраны, внешнюю и внутреннюю, межмембранное пространство и матрикс, ограниченный внутренней мембраной.

Складки, образуемые внутренней мембраной, называют кристами. Количество крист и их форма определяют энергетическое состояние клетки, поскольку это то место, где находится большинство ответственных за окислительное фосфорилирование (ОКСФОС) белков. Новые 3D технологии, электронно-микроскопическая томография дают возможность получить объемное изображение митохондрии (Рис. 1.2.), что расширяет наши представления о внутренней структурной организации органеллы [Frey and Mannella, 2000].

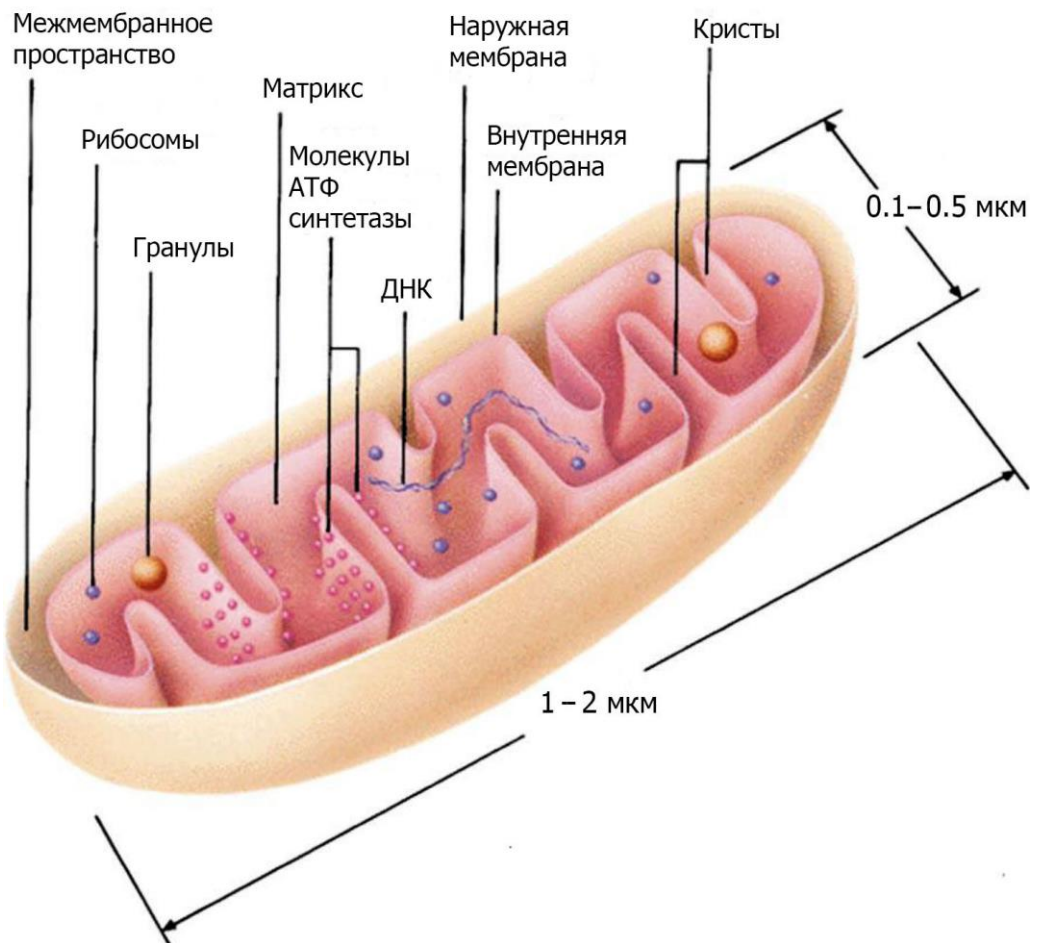


Рис. 1.1. Схема строения митохондрии

по данным [Palade, 1952; Lodish et al., 2016; Guan et al., 2022].

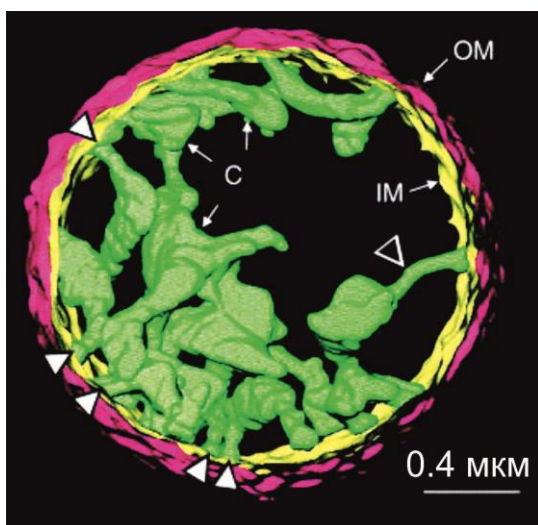


Рис. 1.2. Электронно-микроскопическая томография структуры митохондрии печени крысы. 3D изображение, С – кристы, IM – внутренняя мембрана, OM – наружная мембрана. Треугольники указывают на места прикрепления крист к внутренней мембране и друг к другу, адаптировано из [Frey and Mannella, 2000].

Удобной экспериментальной моделью для исследований признаны и дрожжи *S. cerevisiae* [Nielsen, 2019] 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 приведено на Рис. 1.1., однако существует большое количество фенотипов митохондрий, отличающихся многообразием форм и размеров. Митохондрии содержат две мембраны, внешнюю и внутреннюю, межмембранное пространство и матрикс, ограниченный внутренней мембраной.

Для изучения влияния пептидов-пороформеров на трансмембранный ток в препарате митохондрий необходим высокий уровень целостности внутренней мембраны органелл и минимальный уровень эндогенных трансмембранных проводимостей («паразитных утечек» этого тока), которые оценивают по достаточно высокому уровню дыхательного контроля – соотношения скоростей дыхания в присутствии и отсутствие ADP.

Митохондрии из мягких тканей (мозга, бурого жира, надпочечников), а также митохондрии сердца отвечают этому критерию [Justo et al., 2005; Wolkow and Iser, 2006; Fišar and Hroudová, 2016], однако эти органеллы содержат эндогенные поры, а также переносчики калия и натрия, которые не подавляются 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 инкубационной среде) препарат митохондрий печени крысы характеризуется высоким значением ДК, показателем степени интактности органеллы [Мосолова и соавт., 1971]. Таким образом, препарат митохондрий печени крысы идеально подходит для изучения индукцию проводимости добавленными пептидами-пороформерами. Митохондрии в этом случае можно рассматривать в качестве биосенсора трансмембранного тока, индуцируемого пороформирующими пептидами. Биосенсор на основе митохондрий имеет ряд преимуществ перед искусственными системами. Потенциал, создаваемый на внутренней мембране митохондрий ферментами комплексов I, III и IV системой 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 может приводить к набуханию органелл и разрыву их внешней мембраны с образованием митопластов. В лаборатории биоэнергетики ИНБИ РАН была разработана методика получения препаратов митохондрий печени крысы, обогащенного крупными органеллами [Мосолова и соавт., 1971], для которых теоретическое время набухания без разрыва внутренней мембраны велико. Тем не менее, при изучении действия пороформеров на митохондрии, было необходимо разработать экспериментальную методику оценки целостности их внутренней мембраны. Именно для митопластов печени крысы при окислении сукцината была продемонстрирована столь же эффективная система генерации протонного градиента (a , следовательно, и $\Delta\psi$), что и для

неповрежденных органелл (соотношение H^+/O $4,6 \pm 0,18$ и $5,9 \pm 0,2$, соответственно [Hendler and Shrager, 1987]). 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 измерения транспорта сукцината и требования к ней

Дикарбоксилатный транспортер митохондрий печени крысы хорошо изучен как в нативной системе – в митохондриях, так и реконструированный в липосомы [Passarella and Quagliariello, 1976; Meijer and van Dam, 1981; Indiveri et al., 1993]. Сукцинатоксидазная ферментативная система препарата митохондрий печени крысы в присутствии протонофора (SF) может быть удобной ЭСС для измерения транспорта сукцината интактным ДКТ. Суммарная активность сукцинатоксидазной системы митохондрий может определяться в разных условиях скоростью переноса сукцината через мембрану посредством ДКТ, активностью сукцинатдегидрогеназы и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) (Рис. 1.3.).

Важно, что эндогенное дыхание митохондрий печени крысы в присутствии ротенона (ингибитора комплекса I ЭТЦ) составляло не более 0,8% от максимально возможной скорости окисления сукцината, измеряемой в присутствии протонофора, т.е. такое соотношение сигнал/фон в этом

потенциальном биосенсоре позволяет уверенно проводить измерения [Шольц и Мамаев, 1985].

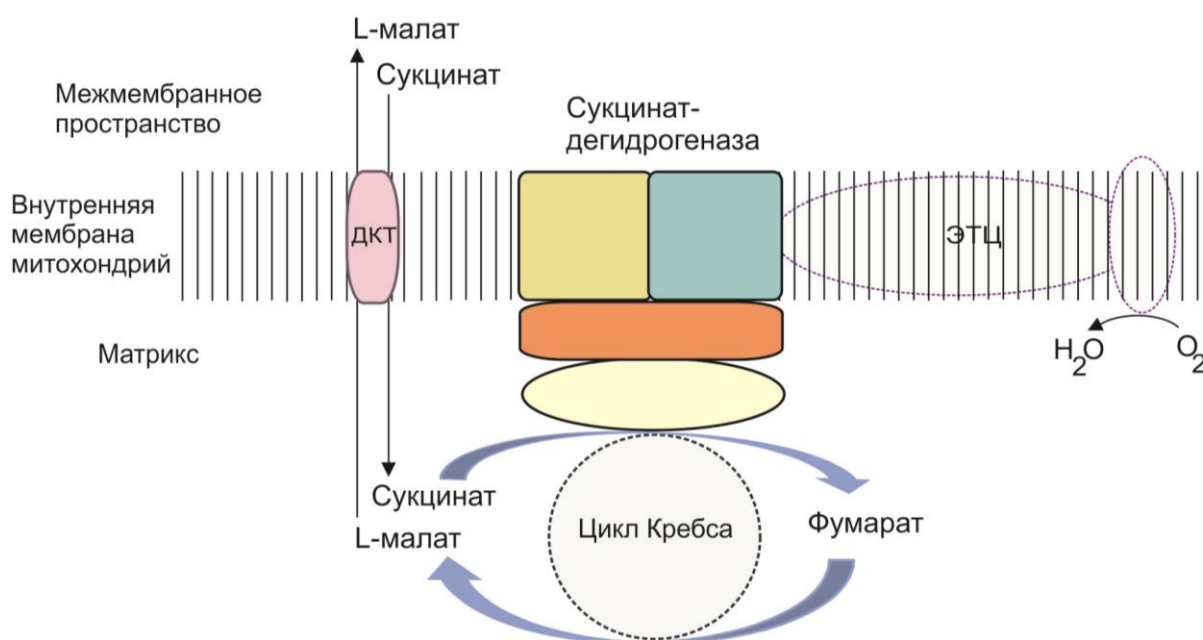


Рис 1.3. Транспорт сукцината дикарбоксилатным транспортером и окисление этого субстрата митохондриями печени крысы (схема)

ЭСС митохондрий печени крысы имеет все признаки хорошей сопряженной системы для измерения трансмембранного транспорта сукцината: на порядок меньшую величину K_M для ДКТ, по сравнению с сукцинатдегидрогеназой [Passarella and Quagliariello, 1976]. величина K_M для сукцината сукцинатдегидрогеназной системы, равная $1,01 \pm 0,21$ мМ, и величина K_i для непроникающего в митохондрии конкурентного ингибитора бутилмалоната, равная $0,17 \pm 0,025$ мМ, были близки к результатам, полученным для ДКТ прямыми методами измерения транспорта сукцината в органеллы ($K_M = 1,17$ мМ [Palmieri et al., 1971; Passarella and Quagliariello, 1976], $K_i = 0,15$ мМ [Meijer and van Dam, 1981]). При изучении влияния групп эффекторов на транспорт необходимо проверять отсутствие их побочного действия на компоненты ЭСС, чтобы не нарушалось лимитирование транспортером сукцинатоксидазной системой митохондрий

(соответствующие тесты описаны в разделе Материалы и методы исследования).

Клетки *S. cerevisiae* и потенциальный транспортер дикарбоксилатов плазмалеммы. Несколько эндогенных сопряженных систем клетки и требования к ним

Для измерения скорости транспорта сукцината в интактных клетках можно использовать эндогенную сопряженную систему окисления сукцината (далее – сукцинатоксидазную систему клеток), которая состоит из предполагаемого переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы, ДКТ митохондрий, сукцинатдегидрогеназного комплекса и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазы (Рис. 1.4.).

На Рис. 1.4. показаны возможные субстраты предполагаемого транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae*. В работах, предшествующих нашей, на такую возможность косвенно указывал тот факт, что несмотря на значение рН цитоплазмы в нейтральной области, не способствующее диффузии дикарбоксилатов через плазмалемму 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 проводимой 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 АТР-зависимый транспорт.

Важной особенностью дышащих клеток *S. cerevisiae* является поддержание в цитоплазме постоянного значения рН и постоянного соотношения концентраций K^+ и Na^+ при значительных колебаниях этих параметров вне клеток [Yenush, 2016; de Nadal et al., 1999]. Это позволяет исследовать одностороннее влияние на активность переносчиков

плазматической мембраны, измеренную с помощью ЭСС клетки, не действуя непосредственно на ЭСС.

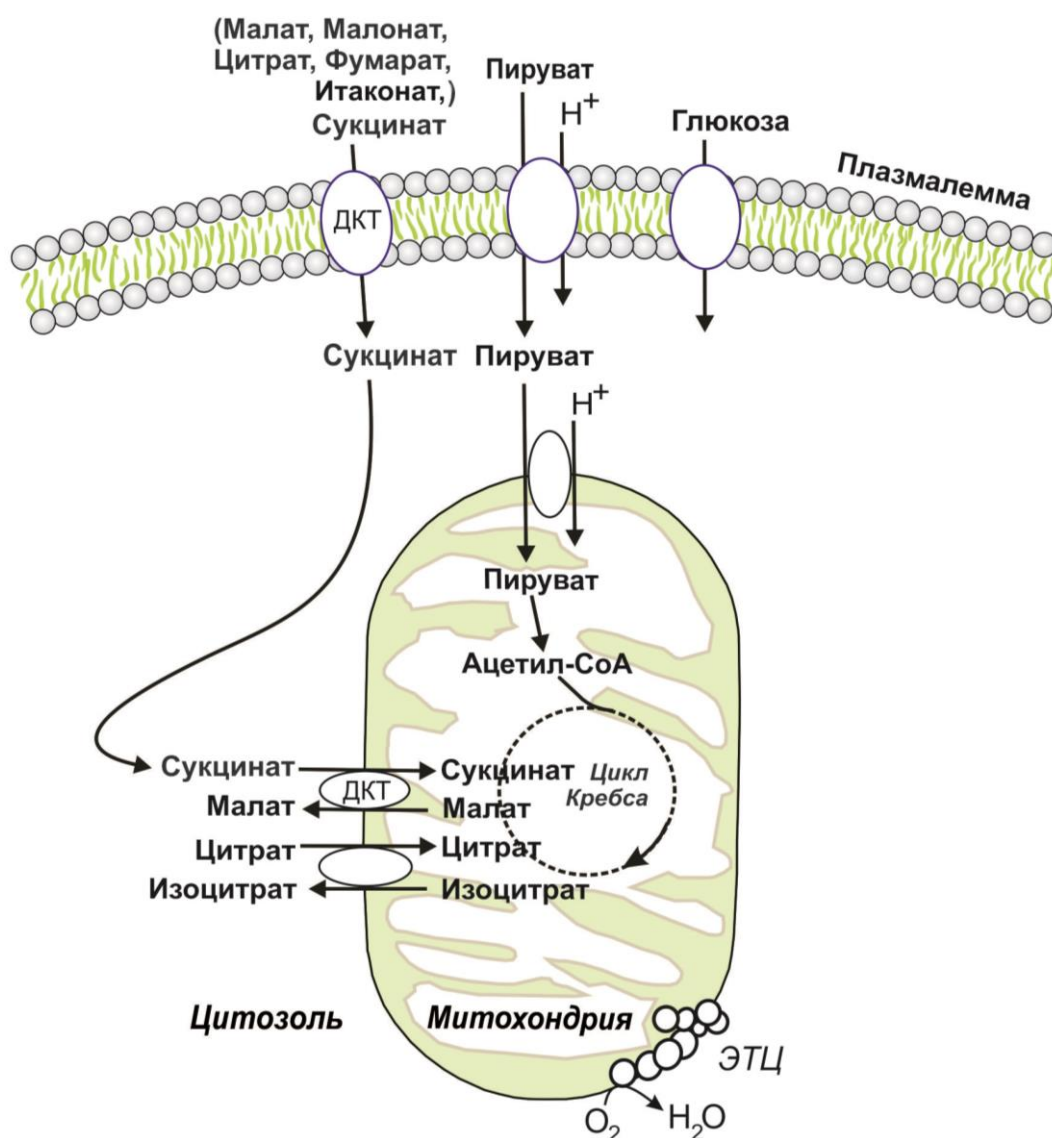


Рис. 1.4. Транспорт и окисление субстратов клетками *S. cerevisiae* (на основе информации из [van der Rest et al., 1995; Machicka et al., 2004; Casal et al., 2016] и собственных результатов).

Система поддержания кислотного и катионного гомеостаза в цитоплазме надежна и тщательно изучена у дрожжей *S. cerevisiae* (Рис. 1.5.) [Yenush, 2016; Locascio et al., 2019]. На схеме стрелками показаны основные сигнальные пути, обеспечивающие гомеостаз по принципу обратной связи. Видно, что эти механизмы контроля дублированы.

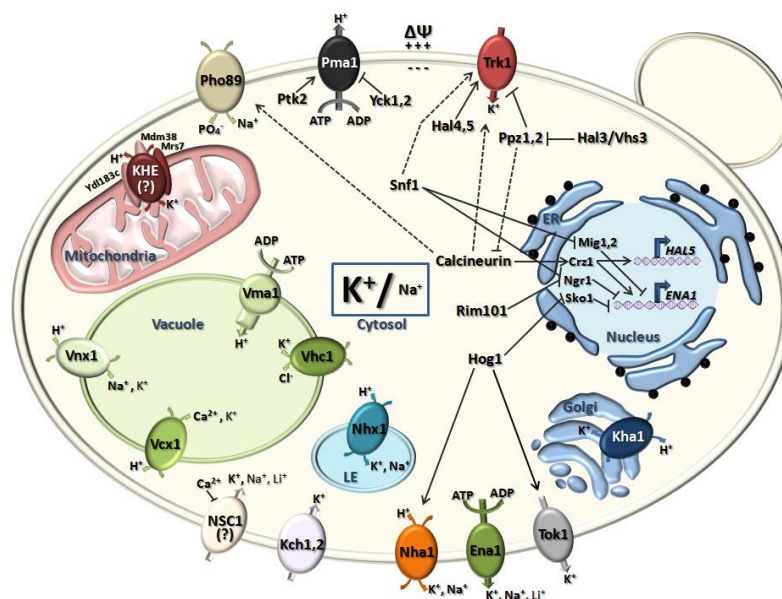


Рис. 1.5. Транспортеры и регуляторы калиевого и натриевого транспорта в клетках *S. cerevisiae*, адаптировано из [Yenush, 2016].

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 его концентрацию [Yenush, 2016; Marquez and Serrano, 1996]. В уменьшении pH цитоплазмы участвует вакуолярная АТФ-за Vma1, а в увеличении – протонные помпы митохондрий [Yenush, 2016].

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

Митохондриальные транспортеры метаболитов: особенности структуры, значение в метаболизме клетки. Генетически охарактеризованные переносчики митохондрий млекопитающих и их ортологи в митохондриях *S. cerevisiae*

Внутренняя митохондриальная мембрана митохондрий непроницаема даже для протонов, поэтому все необходимые для функционирования митохондрий метаболиты, нуклеотиды, кофакторы и неорганические ионы,

транспортируются с помощью специализированных транспортеров (переносчиков) – семейства кодируемых в ядре небольших белков (около 300 аминокислотных остатков). Уникальной особенностью этих транспортеров является их структура, состоящая из трех частей и содержащая 6 трансмембранных α -спирализованных сегментов и общую характерную для всех членов семейства последовательность (мотив) (Pro-X-[Asp/Glu]-X-X-[Lys/Arg]-X-[Lys/Arg]-X₂₀₋₃₀-[Asp/Glu]-Gly-X-X-X-X-[Trp/Tyr/Phe]-[Lys/Arg]-Gly), содержащуюся в каждом из 3-х частей молекулы; N- и C- концы локализованы на цитозольной стороне внутренней мембраны [Palmieri and Monne, 2016].

Переносчики внутренней мембраны митохондрий связывают метаболические пути, локализуясь по разные стороны митохондриальной мембраны, играют важную роль в интеграции внутриклеточных биохимических процессов.

Несмотря на структурное сходство митохондриальные переносчики транспортируют различающиеся по размерам и структуре молекулы, могущие 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⁺.

Начиная с 1996 г. генетически охарактеризованы следующие переносчики митохондрий млекопитающих: переносчик глутамата, антипортер ATP-Mg/фосфата, ADP/ATP антипортер, переносчик CoA и 3'-фосфоаденозин 5'-фосфата, пероксисомальный переносчик CoA, FAD и NAD⁺, антипортер четырехуглеродных метаболитов/фосфата, переносчики основных аминокислот. Также охарактеризованы переносчики митохондрий млекопитающих и их ортологи в *S. cerevisiae*: дикарбоксилатный переносчик, переносчики тиаминпирофосфата, S-аденозилметионина, пиримидиновых нуклеотидов, карнитина, оксалоацетата, антипортеры

оксалоацетат/сульфатный, аспартат/глутаматный, оксоглутарат/малатный антипортер; переносчики митохондрий *S. cerevisiae*: орнитина, аденозин 5'-фосфосульфата, NAD^+ , антипортеры GTP/GDP, цитрат/оксоглутаратный, а также пероксисомальный переносчик адениновых нуклеотидов [Palmieri and Monne, 2016]. Мы перечислили только хорошо 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. В связи со спецификой диссертации большее внимание будет 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 называемый Dic1p, транспортирует (по механизму антипорта) дикарбоксилаты – малат, сукцинат и малонат, неорганический фосфат, сульфат и тиосульфат [Palmieri et al., 1996]. Аналогичная специфичность описана для DIC, выделенного из изолированных митохондрий печени крысы [Palmieri et al., 1971]. В опытах на мутантах дрожжей *S. cerevisiae* показано, что Dic1p крайне необходим для роста клеток на этаноле и ацетате [Palmieri et al., 1999]. Рост восстанавливается при добавлении оксалоацетата, аспартата, глутамата и цитрата в низких концентрациях, [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. 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].

Показано, что у человека дикарбоксилатный переносчик DIC экспрессируется в печени, почках, сердце, мозге, легких, поджелудочной железе и жировой ткани [Huizing et al., 1998; Das et al., 1999]. При определенных физиологических условиях важность переносчика отмечена и для некоторых других тканей.

DIC включается в анаплеротический приток интермедиатов в цикл 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-сукцинатлиазы. Этот переносчик участвует в синтезе жирных кислот, когда экспортируемый малат в ходе цитрат-пируватного шаттла приводит к выходу цитрата из митохондрий и образованию NADPH в цитозоле [Palmieri, 2004]. Поскольку описана сверхэкспрессия DIC в различных раковых опухолях, предполагается, что его нокдаун может быть одним из вариантов терапии при канцерогенезе [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, небольшие количества тиосульфата образуются и в митохондриях из сероводорода, после выхода из митохондрий с помощью DIC сульфит окисляется вне органелл [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]

Другие переносчики C₄- дикарбоксилатов 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 ($K_M = 2$ мМ).

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 белков человека UCP, только UCP1 транспортирует протон и является разобщающим белком митохондрий [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]. Нокадаун UCP2 в клетках гепатокарциномы человека (HepG2) усиливал окисление глюкозы и уменьшал продолжительность гликолиза [Vozza et.al., 2014].

Оксидикарбоксилатные переносчики млекопитающих и оксидикарбоксилатный переносчик (ODC1) *S. cerevisiae*

Гены *ODC1* и *ODC2* *S. cerevisiae* 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, что в почках крысы идентифицирован несколько отличающийся по первичной структуре на С-конце оксидикарбоксилатный транспортер, нокдаун гена, кодирующего этот переносчик, приводил к уменьшению накопления липидов [Niimi et.al., 2009]. Сверхэкспрессия DIC и оксоглутаратного переносчика в культуре клеток почечных проксимальных канальцев (NRK-52E) радикально улучшала транспорт глутатиона в митохондрии, что позволило автору высказать 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 митохондрий *S. cerevisiae*, реконструированный в липосомы, характеризовался величиной K_M для цитрата, равной 0,36 мМ и способностью 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, подавлял также цитрат-изоцитратный обмен, катализируемый переносчиком,

выделенным из митопластов печени крысы и реконструированным в липосомы [Kaplan et.al., 1990].

Существенные для этой работы митохондриальные транспортеры Mg^{2+} и пирувата *S. cerevisiae* и митохондриальный транспортер пирувата млекопитающих

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

Митохондриальные транспортер пирувата *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 [Tavoulari et.al., 2019]. Потеря MPC1 *S. cerevisiae* приводила к ухудшению метаболизма пирувата, накоплению предшествующих метаболитов и уменьшению интермедиатов цикла Кребса. Транспортер пирувата (или монокарбоксилатный транспортер) митохондрий *S. cerevisiae* был очищен с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованным специфическим ингибитором этого переносчика 2-циано-4-гидроксициннаматом, переносчик катализировал антипорт пируват/ацетоацетат с величиной K_M для пирувата, равной 0,8 мМ [Nalecz, 1991]. Переносчик транспортировал также 2-оксокапроат, 2-оксоизовалерат и

2-оксо-3-метилвалерат, но не цитрат, сукцинат или цитрат [Nałecz, 1991]. Из митохондрий сердца быка аналогичным методом выделили и очистили 2 переносчика, способные транспортировать кетокислоты, но с разным механизмом. Один из них (с молекулярной массой, равной 31,5 кДа) катализировал электронеutralный обмен 2-оксоглутарата на 2-оксоглутарат, а второй (с молекулярной массой, равной 34 кДа) транспортировал пируват и другие кетокислоты, но не ди- и трикарбоновые кислоты по механизму, чувствительному к градиенту pH (не электронеutralному) [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 чувствительность 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, протоннофорный 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 (сопрягающей) мембраны интактных митохондрий печени крысы и плазмалеммы клеток *S. cerevisiae*.

Сопрягающая мембрана – биологическая мембрана, способная генерировать и поддерживать трансмембранный потенциал. Внутренняя мембрана митохондрий представляет отдельный интерес, так как в ней находятся ферменты системы ОКСФОС. Структура и функции суперкомплексов дыхательной цепи в настоящее время продолжает быть предметом исследования крупнейших лабораторий мира [Guan et al., 2022; Maclean et al., 2022]. На Рис. 1.6. показаны комплексы дыхательной цепи и протонные помпы внутренней мембраны митохондрий млекопитающих:

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.

Внутренняя мембрана митохондрий в препарате прочно сопряженных митохондрий печени крысы имеет высокое сопротивление и самоподдерживающийся в присутствии субстрата дыхания $\Delta\psi$ (на уровне около 180-200 мВ) Постоянная работа протонных насосов, поддерживающая уровень $\Delta\psi$, существенна для достижения поставленных в работе целей.

Эндогенные катионные проводимости или утечки тока (и уменьшение величины $\Delta\psi$) могут индуцировать поры (каналы), присутствующие во внутренней мембране и открывающиеся при определенных условиях.

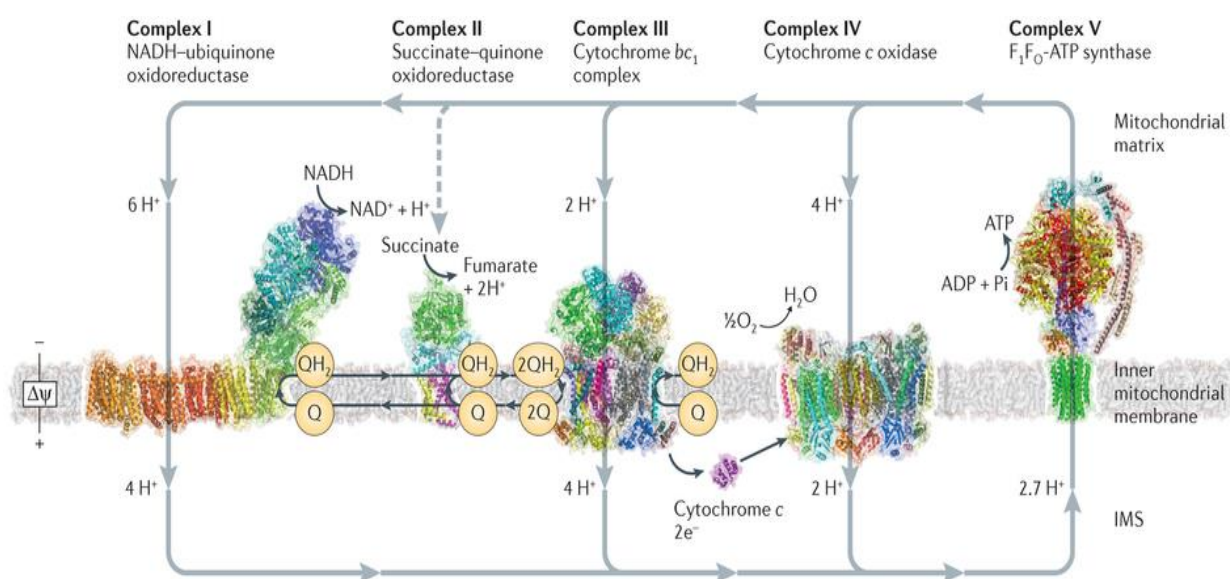


Рис. 1.6. Комплексы дыхательной цепи и протонные насосы внутренней мембраны митохондрий млекопитающих. Адаптировано из [Sazanov, 2015; Vercellino and Sazanov, 2022].

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 функционируют как протонные помпы, и АТФ – синтетаза является “потребителем” мембранного потенциала [Guan et al., 2022; Maclean et al., 2022]. Получены структуры комплексов дыхательной цепи с высоким разрешением, предложена схематическая модель локализации в мембране белков системы ОКСФОС [Guo et al., 2018].

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 сред, не содержащих Ca^{2+} , и/или добавлением ЭДТА (комплексона кальция). В отличие от Ca^{2+} , Mg^{2+} не эффективен в образовании неспецифической липидной поры с пальмитатом [Agafonov et al., 2003]. Кроме того, унипортер Ca^{2+} ингибируется в присутствии магния [Litsky et al., 1997]. Для митохондрий печени крысы показано, что воздействие $30\mu\text{M Ca}^{2+}$, который может выйти из митохондрий, обращается добавлением 5 mM Mg^{2+} . Анионный канал внутренней мембраны также ингибируется Mg^{2+} [Beavis and Powers, 2004]. При изучении трансмембранного калиевого тока (в монокалиевой среде инкубации), индуцированного экзогенными пороформерами, необходимо блокировать присутствующие во внутренней мембране митохондрий собственные транспортеры калия. В митохондриях существуют 4 таких транспортера, причем mitoВКСа существует только в митохондриях скелетных мышц, а TASK-3 – в митохондриях лимфоцитов [Szewczyk et al., 2009]. В митохондриях печени крысы обнаружены АТФ-зависимый унипортер и электронейтральный K^+/H^+ - антипортер, активности обоих в присутствии 6 mM магния были полностью подавлены [Szewczyk et al., 2009]. Неспецифический натрий - протонный антипортер, способный переносить литий (что существенно для проводимых нами экспериментов), также подавлялся магнием [Jezek et al., 1990]. Существование в митохондриях печени крысы высокоспецифичного натрий - протонного антипортера

требует исключения сред, содержащих натрий [Brierley et al., 1994], хотя он также блокировался магнием [Bernardi et al., 1990].

Таким образом, внутренняя мембрана митохондрий печени крысы не содержит не подавляемых магнием каналов, за исключением нескольких, нуждающихся для своей активации в Ca^{2+} . Следовательно, в калиевой среде инкубации, дополненной Mg^{2+} , 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.

Протонная помпа и транспортеры – потребители трансмембранного потенциала в плазмалемме *S. cerevisiae*

Плазмалемма *S. cerevisiae* является сопрягающей мембраной, где протонной помпой является АТРаза Р-типа – доминирующий белок этой мембраны [van der Rest et al., 1995]. В этой мембране присутствуют три Na^+/H^+ антипортера (Ena1-4p, Nha1p, Nhx1p), участвующие также в транспорте K^+ [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) – к ее гиперполяризации [Kinclova-Zimmermannova et al., 2006]. Протонный потенциал активно используется клеткой для транспорта необходимых веществ в форме симпорта с протоном. Этот тип транспорта показан, например, для переносчиков аминокислот и фосфата с механизмом, непосредственно зависящим от $\Delta\psi$ [Kschischo et al., 2016]. Для нашей работы представляют интерес три переносчика с натрий-зависимым механизмом действия: аллантииновый, переносящий уреидосукцинат [Turoscy and Cooper, 1987], переносчик кислых аминокислот, переносящий аспартат [Regenberg et al., 1998] и монокарбоксилатный переносчик, переносящий пируват [Akita et al., 2000].

Все выше перечисленные переносчики подавляются протонофорами [van der Rest et al., 1995], слабыми амфифильными кислотами или основаниями, способными проникать через бислой [Terada, 1990]. Косвенно протонофоры подавляют и АТР-зависимые транспортеры (АТР-зависимый транспортер натрия, Рис. 1.9.), поскольку проникая в клетки, они распределяются по всем внутриклеточным мембранам [Beauvoit et al., 1991].

Деэнергизацию плазмалеммы можно использовать в качестве теста на способность амфифильной кислоты проникать в клетку. Необходимо заметить, что оба транспортера плазмалеммы (Jen1 и Ady2), способные переносить пируват являются протонными симпортерами [Casal et al., 2016]. До настоящей работы было принято считать, что в плазмалемме *S. cerevisiae* отсутствует активная (детектируемая стандартными радиоизотопными методами) опосредованная белком система транспорта С₄- дикарбоксилатов [Lodi et al., 2004]. При рН 3,0 был показан только транспорт непротонированной формы L-малата по механизму диффузии [Salmon, 1987]. По-видимому, механизм функционирования потенциального транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы надо искать в перечне механизмов для переносчиков, характерных для плазмалеммы *S. cerevisiae* [Kschischo et al., 2016], а именно: симпорт с протоном, симпорт с натрием, электрогенная диффузия через канал, неэлектрогенная диффузия через канал, АТР-зависимый транспорт. Подробнее о транспортерах дикарбоксилатов 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 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 [Bechinger and Gorr, 2017]. Исследования последних лет с применением методов двумерной флуоресцентной микроскопии [Wang et al., 2022], криоэлектронной томографии, атомно-силовой микроскопии [Chen et al., 2023], а также моделирования атомных структур методом молекулярной динамики [Sun et al., 2022] показали, что в зависимости от концентрации пороформера, условий опыта и липидного состава мембраны для одного и того же пептида возможны различные механизмы порообразования.

Самосборка из мономеров пептидов в олигомер в мембране характерна для некоторых мембранных белков

Общее свойство вышеназванных пороформирующих пептидов – это их самосборка в канал из α -спирализованных мономеров в трансмембранном 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. 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 сегмента, только один из которых непосредственно участвует в связывании магния [Maguire, 2006]. Показано также образование трансмембранной поры путем самоассоциации 8-ми α -спирализованных пептидов длиной 35 аминокислотных остатков 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 структура, коэффициент 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 фенилаланинола (Phol (2-амино-3-фенил-1-пропанола)). Коэффициент 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), 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 аминокислота ацетилирована, на C-конце локализован остаток фенилаланинола. Из-за большого количества остатков Aib и восстановленного C-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 около 5,5) [Wu et al., 1995]. Половина положительного заряда аламетицина Rf50 сосредоточена на N-, отрицательного – на C-конце молекулы [Bechinger, 1997]. Благодаря этому молекула имеет небольшой дипольный момент (60–79 D в октанолу [Bechinger, 1997]) и небольшую энергию перехода пептида в транс-положение в мембране из поверхностно-ориентированного (1,5-2 ккал/моль) [Kessel et al., 2004]. 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 3_{10} -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 C-конец (15-20 аминокислотных остатков) - β -конформацию [Szekeres et al., 2005]. В гидрофобном окружении (этанол, мицеллы детергента, липидные мембраны) кластер из 2-12 аминокислотных остатков молекулы аламетицина приобретал конформацию α -спирали [Kouzayha, 2009].

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 кругового дихроизма и ЯМР-спектроскопии показано, что в спиртах (метаноле, этаноле, бутаноле, октаноле) аламетицин присутствовал в виде мономеров, а 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]. Замена Pro на Gly радикально меняла характеристики формируемого аламетицином трансмембранного канала [Molle et al., 1991]. При формировании транс-конформации под действием $\Delta\psi$ или при высоком пептид/липидном соотношении степень спирализации молекулы также увеличивалась [Brumfeld and Miller, 1990].

Структура каналов, образованных аламетицином: прямые методы визуализации структуры и косвенные методы ее подтверждения

Под действием $\Delta\psi$ аламетицин формирует в мембране трансмембранные каналы [Su et al., 2018; Wei and Pohorille, 2023] 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 мог быть визуализирован в БЛМ с помощью нейтронного сканирования [Czernek and Brus, 2021] или дифракции рентгеновских лучей [Qian et al., 2008]. Пора из 8-ми мономеров аламетицина имела внутренний диаметр 19,5 Å. Согласно данным [Qian et al., 2008], стенки поры не содержали липидов, а их толщина соответствовала диаметру α -спирали аламетицина (1,1 нм). Методом молекулярной динамики показано, что селективность гексамера аламетицина определяется сайтом, содержащим остатки Gln7, с диаметром самого узкого участка 1,6 Å [Wei and Pohorille, 2023]. Прямые методы изучения структуры нуждались в жесткой предобработке мембраны: для контрастирования использовали тяжелую воду [He et al., 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 высокоолигомерного канала, полученная прямыми, но жесткими методами, подтверждена косвенными методами: показано существование в центре канала обводненной полости [Vodyanoy et al., 1993]. Методом молекулярной динамики показано, что каналы аламетицина (гексамерный, гептамерный и октамерный) способны к ионной проводимости, причем самым низкоолигомерным состоянием канала является гексамер с радиусом в области Gln7 около 1,6 Å [Wei and Pohorille, 2023].

Изучение влияния $\Delta\psi$ на индуцированную аламетицином проводимость обычно осуществляли на БЛМ 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 осмотическое давление, а для высшего проводящего состояния объем жидкости внутри поры («исключенный объем») для непроникающих полимеров согласуется с объемом поры, оцененной по проводимости [Vodyanov 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} см²/сек) [Woolley et al., 1997], который близок к определенному в водном растворе ($1-3 \times 10^{-5}$ см²/сек) [Тимофеева и соавт., 2003]. Высокоолигомерные поры способны 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 прямых и косвенных методов.

Оценить характеристики низкоолигомерных пор можно только с помощью косвенных методов, по изучению их проводимости. Нижнее субсостояние проводимости аламетициновой поры характеризовалось катионной селективностью, в частности, оно было лишено способности пропускать катионы Ca^{2+} и $Tris^+$ [Hanke and Boheim, 1980] (Рис. 1.17.).

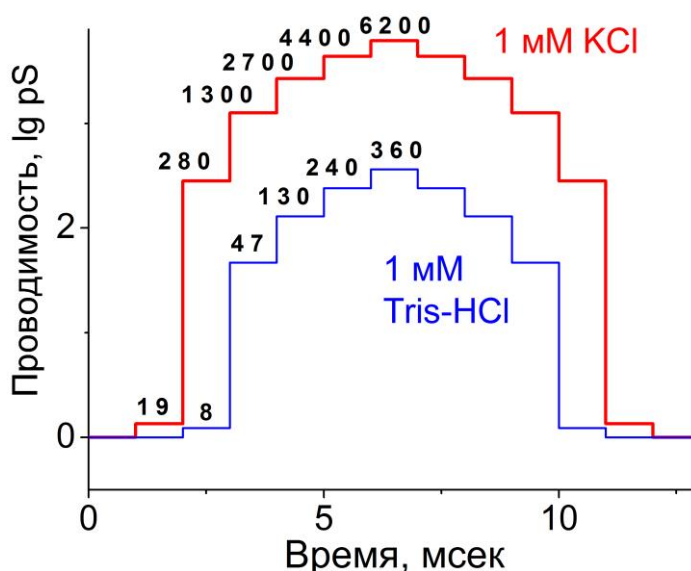


Рис. 1.7. Флуктуации проводимости, индуцированные аламетицином в БЛМ, схема адаптирована из [Hanke and Boheim, 1980]); время жизни каждого состояния для наглядности принято одинаковым.

Соотношения между субсостояниями проводимости аламетицина объясняли в рамках агрегационной теории, а изменение степени олигомеризации канала с прибавлением или отщеплением мономера с соответствующим изменением внутреннего диаметра поры [Duclohier, 2010] – переходом от одного субсостояния многоуровневой флуктуации проводимости к другому.

Стационарная трансмембранная проводимость (макро-проводимость), индуцированная аламетицином, нелинейная но для каждого субсостояния проводимости, каждого одиночного канала имела место линейная зависимость тока от потенциала, начиная с определенного напряжения. Это обуславливало постоянное соотношение амплитуд в пирамидке (снизу вверх: 1:4:20:45:75:110 [Hanke and Boheim, 1980], Рис. 1.17.). Причем это соотношение (но не время жизни и количество ступенек) не зависело от ионной силы раствора и заряда липидных головок [Duclohier, 2010]. На Рис. 1.17. видно, что в растворе Tris-HCl наименьшая ступенька исчезала (5 ступенек вместо 6-ти в растворе KCl). При этом в отсутствие $\Delta\psi$ при высоких соотношениях пептид/липид среди высокоолигомерных пор в виде

небольшой фракции всегда выявлялись мономеры аламетицина, а при низких соотношениях такие мономеры составляли большинство.

Агрегационная теория пороформирования и две альтернативные модели структуры пор (каналов), образуемых пороформирующими пептидами. Предполагаемый механизм действия аламетицина

Относительно механизма действия пороформирующих белков на искусственные и биологические мембраны наиболее разработаны две группы моделей: модель «бочонка» (*англ.* «barrel-stave») и тороидальная модель [Duclohier, 2010; Mihajlovic and Lazaridis, 2010]. В соответствии с этими моделями, образуемые поры можно разделить на два основных вида: бочкообразные (или цилиндрические), 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 собиралась из молекул аламетицина, образуя водную пору внутри замкнутой цепочки этих молекул. Изменение числа мономеров, образующих канал, приводило к изменению его проводимости. Встраивание каждой новой молекулы увеличивает периметр канала на 0,66 нм [He et al., 1996]. Авторы допускали, 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].

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 [He et al., 1996]. Такая модель хорошо объясняет крутую зависимость проводимости от концентрации аламетицина, концентрации электролита и трансмембранного потенциала. 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, Wei and Pohorille, 2023].

Самое узкое место канала, образованного аламетицином – в области кольца водородных связей, образованных Gln-7 [Wei and Pohorille, 2023]. Снаружи канал гидрофобен, длина его вдоль оси олигомера – 3,2 нм. Существенной 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 аминокислотные остатки Gln-7, Aib-10, Gly-11 и Glu -18.

Результаты молекулярно-динамического моделирования и анализа конформации молекул свидетельствовали о том, что аламетициновая пора не соответствует строго модели «бочонка», а представляет собой менее упорядоченную структуру [Thøgersen et al., 2008]. Согласно другой модели, головки липидов, смыкающихся лепестков мембраны, в промежутках между мономерами пороформирующих белков (пептидов) образуют тороидальную поверхность [Sengupta, et al., 2008]. При этом происходит инвагинация внешнего монослоя бислойной мембраны так, что гидрофильные головки липидного бислоя участвуют в формировании поры и направлены внутрь нее. Принципиальной особенностью этой модели по сравнению с моделью «бочонка» является возможность иметь больший внутренний диаметр поры при меньшей степени олигомеризации [Sengupta, et al., 2008], а так же

облегченный флип-флоп пептида во внутренний лепесток с возможной антипараллельной димеризацией [Mottamal and Lazaridis, 2006].

Методами ЯМР и КД-спектроскопии показано, что аламетицин образует наряду с цилиндрическими (как в модели «бочонка») в мембранах из POPC (1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина) и тороидальные поры в мембранах, состоящих из DHPC (1,2-О-дигексадецил-sn-глицеро-3-фосфохолина) [Dave et al., 2005]. Способность аламетицина формировать наряду с цилиндрическими, пор менее упорядоченной 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; Wei and Pohorille, 2023]. 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 [Kessel et al., 2004].

Необходимо отметить, что теории молекулярного механизма ионного транспорта и особенностей порообразования были сформулированы на основе данных, полученных области пептид/липидных соотношений от 1/20 до 1/150 [Kouzayha et al 2009]. Полученные закономерности экстраполировали на область более низких соотношений пептид/липид [Huang, 2006; Woolley, 2007; Leitgeb et al., 2007; Qian et al., 2008].

Попытки калибровки размеров поры, образованной аламетицином, и выявления проводимости низкоолигомерных пор

Необходимо отметить, что $\Delta\psi$, 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 припептидным липидом, уменьшалась, и концентрационный порядок реакции олигомеризации можно было связать с ее молекулярностью [Duclohier, 2010]. Поскольку низкоолигомерные поры обладали существенно меньшей проводимостью, структура пор аламетицина с меньшей степенью олигомеризации и область низких пептид/липидных соотношений приходилось изучать косвенными и менее доказательными методами. Необходимо заметить, что объяснение низких концентрационных порядков (от 2-х до 4-х) для проводимости, индуцированной аламетицином, в рамках чисто пептидного канала типа «бочонка», необъяснимо в рамках агрегационной теории. 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]. Нижнее проводящее состояние аламетицина имело на 20% меньшую проводимость, чем каналы, образованные грамицидином А [Hanke, 1980], селективные по выше перечисленным катионам и имеющие внутренний диаметр канала 3,8 Å. Поэтому неселективный низкоолигомерный канал аламетицина предположительно должен иметь диаметр не менее 5 Å [Hanke and Boheim, 1980]. Нижнее субсостояние проводимости, выявляемое в калиевой среде, не выявлялось в присутствии катиона Ca^{2+} [Hanke and Boheim, 1980], гидратированный диаметр которого составляет 4,12 Å [Laatikainen et al., 2007]. 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], в отдельных опытах показано, что селективность гексамера аламетицина определялась самым узким участком канала с диаметром 1,6 Å [Wei and Pohorille, 2023]. Пентамер в рамках агрегационной теории должен демонстрировать пятый порядок для зависимости нижнего уровня субпроводимости от концентрации пептида в калиевой среде

[Tieleman et al., 2002]. В связи с тем, что проводимость и время жизни субсостояний существенно различались, представляла интерес оценка концентрационного порядка проницаемости для частиц, больших, чем катион Ca^{2+} . Максимальный концентрационный порядок для аламетицина, определенный по вытеканию из липосом карбоксифлуоресцеина, существенно большего по размеру, чем K^+ , составлял 5,5 [Schwarz and Robert, 1990]. При этом порядок, определенный по входу в липосомы катионов Pr^{3+} составлял 4,0 [Hunt and Jones, 1982].

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

Трудности химической и нехимической фиксации пор разной степени олигомеризации 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 [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 объемом. Поэтому предположение авторов о соответствии нижнего 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 нижнего состояния проводимости с помощью «сшитых» линкерами различной гибкости тетрамеров аламетицина 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 тем, что разное количество липида в стенках поры, зависящее от гибкости сшивки, модулировало диаметр этой тетрамерной поры. Вопрос, тем не менее, остается дискуссионным, поскольку визуализировать пору, соответствующую непосредственно модели «бочонка», можно только для высокоолигомерных пор [Wu et al., 1995; He et al., 1996].

Возможная тороидальная структура низкоолигомерных пор, образуемых аламетицином

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]) использовали представление о пентамере, как наименьшей проводящей поре. Объяснение нижних состояний проводимости в рамках агрегационной теории возможно при тороидальной модели канала. В соответствии с этой моделью часть стенок канала образована липидом, и при меньшем содержании пептида возможен больший диаметр канала, по крайней мере, для нижних проводящих состояний. В работе [Cernescu and Luchian, 2006] это обсуждается влияние холестерина, замедляющего скорость агрегации мономеров аламетицина, на время жизни нижних уровней проводимости

[Cernescu and Luchian, 2006]. Можно предположить, что второй концентрационный порядок для нижнего проводящего состояния действительно отражал его молекулярность по пептиду [Шольц и др., 1983]. В этом случае неизбежное включение липида в состав канала гармонирует с данными по максимальной чувствительности этого субсостояния к рН-модулированию дипольного момента мембраны [Chiriac and Luchian, 2007]. Для аламетицина показано влияние рН - зависимого поверхностного заряда мембраны и модуляторов мембранного дипольного потенциала на время жизни нижних субсостояний проводимости (и, соответственно, низкоолигомерных пор) [Mereuta et al., 2011]. Любопытно выглядит моделирование первого проводящего состояния аламетицина с использованием пептида с упрощенной подобной аламетицину структурой без остатка Pro: Ac-(Aib-Lys-Aib-Ala)₅-NH₂, где наблюдали флуктуацию 50 pS при 100 мВ в растворе 100 мМ KCl при рН 7,4 [Taira et al., 2009]. К сожалению, исследование зависимости проводимости от концентрации искусственного пептида авторы не привели

Мелиттин. Первичная структура, коэффициент распределения, дипольный момент и влияние $\Delta\psi$, существенные элементы

Мелиттин - порообразующий 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 [Dempsey, 1990]. 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 положительный заряд, уменьшало сродство к подобным липидам [Stankowski and Schwarz, 1990], но не мешало образованию каналов. 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: также близки, и это, по-видимому, определило малоэнергетичский сдвиг равновесия мембраносвязанного пороформера в сторону трансмембранной конформации в присутствии потенциала [Wackerbauer, 1996]. На БЛМ и липосомах [Schwarz and Robert, 1990] показано, что потенциал ускоряет порообразование, индуцированное мелиттином. Если в отсутствие $\Delta\psi$ почти полная трансмембранная локализация пептида достигается при его молекулярном соотношении к липиду, равном 1/10, то в присутствии $\Delta\psi$ соотношение становится порядка 1/300 [Sengupta et al., 2008]. На БЛМ индукция проводимости была более эффективна при добавлении пептида с положительно заряженной стороны мембраны [Pawlak et al., 1991]. Степень деформации мембран липосом под действием мелиттина в сравнении с другими пороформирующими пептидами связывают с особенностями их вторичной структуры [Izumi et al., 2023].

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 преагрегация 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 было 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 одномерных пор [Lee et al., 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 A_l – связанный с липидом (L) пептид, m – количество мономеров, P – пора.

$$1/\tau = k_{as} c_L + k_{dis}$$

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

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

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. Авторы [Schwarz et al., 1992] предположили, что образование агрегированных форм (димеров) мелиттина в мембране играет существенную роль в пермеабиллизации мембран.

В работе [Takei et al., 1999] были использованы вышеописанные липосомы, обладающие концентрационным градиентом K^+ на мембране, который сохранялся на первых этапах действия мелиттина. Авторы показали, 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.

Первоначально считалось, что мелиттин индуцирует, в основном, цилиндрические поры, соответствующие модели «бочонка», однако большинство исследователей считает, что мелиттин образует тороидальные поры [Mihajlovic and Lazaridis, 2010; Lee et al., 2013; Miyazaki and Shinoda, 2022]. Результаты моделирования методами молекулярной динамики также свидетельствовали о тороидальном механизме формирования пор [Lin and Baumgaertner, 2000]. В мембранах из димиристоил-фосфатидилхолина/димиристоил-фосфатидилглицерола (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] предполагалось, что предпора, формируемая мелиттином, индуцировала дефект-впадину в бислое, и это утончение бислоя в ходе последующей электропорации (пробоя) под действием потенциала могло образовать липидную пору, инкрустированную мелиттином. Этот пептид формировал несколько видов крупноразмерных пор, диаметр которых оценивали разными методами в диапазоне 25-30Å [Ladokhin et al., 1997] или 35-40Å [Park et al., 2006], при этом 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 с меньшими 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 поры, образованные мелиттином, соответствовали тороидальной модели, с внутренним диаметром 44 Å. Формирование такой поры в соответствии с тороидальной моделью косвенно подтверждалось корреляцией между порообразованием и облегченным флип-флопом 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 большая амплитуда флуктуаций проводимости, индуцированной ТАМ в БЛМ из дифосфатидилхолина, по сравнению с немодифицированным мелиттином и сравнительно большее время жизни этой флуктуации [Das et al., 1985]. Это,

по-видимому, свидетельствует о существовании индуцированной ТАМ долгоживущей крупноразмерной поры.

Мастопаран. Первичная структура, коэффициент распределения, влияние $\Delta\psi$, существенные элементы вторичной структуры. Мастопараны – пептиды, входящие в состав ядов шершней. Для них характерна последовательность из 14 L-аминокислот с блокированной амидом C-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).

Мастопаран – полипептид, выделенный из яда шершня *V. orientalis* [Мирошников и др., 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] и синтезированы [Colombo, 1981] другие мастопараны, отличающиеся по аминокислотному составу. Наличие C-концевого лейцамидного остатка и присутствие остатков Lys является характерным для этих пептидов. Наличие этого остатка обеспечивает молекуле стабилизацию ее вторичной структуры и биологические свойства [Cabrera et al., 2004]. Кластер из 5 остатков гидрофобных аминокислот в средней части молекулы обеспечивает амфифильность этих соединений [Shakibaie et al., 2023]. Замена аминокислот C-конца уменьшали протяженность α -спирального участка молекулы, антибактериальная и гемолитическая активность мастопарана при этом снижалась [Rungsa et al., 2022].

Существование магнитного момента, 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]. В работе [Tucker et al., 2005]

использовали содержащий триптофан мастопаран X из *Vespa xanthoptera* с модифицированным p-цианофенилаланином 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 с использованием дейтерированных 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* выявило α -спирализованную структуру участка от 2 до 14 аминокислотных остатков пептида, погруженного в мембрану [Yu et al., 2001]. При солюбилизации неионным детергентом октилгликозидом, мастопаран X имел такую же α -спирализацию, как и связи с липосомами, где фосфолипиды имели заряженные головки [Hellmann and Schwarz, 1998]. Сделан вывод, что электростатическое взаимодействие важно для локализации, но не для α -спирализации пептида. Методом тушения флуоресценции триптофана в гигантских фосфолипидных везикулах показано, что диффузионный калиевый потенциал увеличивал формальную скорость связывания мастопарана X с мембраной [de Kroon et al., 1991].

Обоснование тороидальной структуры поры и калибровка пор, образуемых мастопараном. 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] показано, что мастопаран X усиливал быстрый флип-флоп отрицательно заряженных и нейтральных липидов, и это коррелировало с порообразованием и транслокацией самого пептида. Эти данные свидетельствуют 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, соответственно. Диаметр пор для мастопарана X при меньших 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 [Fujita et al., 1994; Schwarz and Reiter, 2001]. В опытах по изучению связывания пептида с липосомами [Schwarz and Reiter, 2001] авторы на основании этих косвенных данных предположили агрегацию мастопарана в мембране перед порообразованием. В работе [Fujita et al., 1994] авторы модифицировали мастопаран X, присоединив к С-концу антрильную группу. Это позволило по форме зависимости от концентрации модифицированного пептида FRET сигнала и деполяризации флуоресценции предположить самоассоциацию мастопарана в липидном бислое. Однако ни в одной из более поздних работ не сообщалось о существовании димерной предпоры для мастопарана, характерной для мелиттина, что возможно связано с методическими трудностями (см. выше).

Изучение предпорообразования мастопарана. Изучение 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. Методом stop-flow по изменению флуоресценции триптофана показаны фазы длительностью 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 олигомеризации (количество мономеров в ассоциате) корректными экспериментальными методами не установлена [Cabrera et al., 2019]. Качественно тенденция к агрегации мембраносвязанного мастопарана показана в работах [Fujita et al., 1994; Schwarz and Reiter, 2001]. 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 [Pandey et al., 2023; Ren et al., 2023], однако пептидов, имеющих хорошо изученный механизм функционирования и в то же время используемых в медицине, немного [Pereira et al., 2023]. Антибиотики пороформеры – группа антибактериальных, противогрибковых и противовирусных препаратов, обладающих уникальной особенностью: по сравнению с традиционными антибиотиками - к ним практически не вырабатывается резистентность патогенных штаммов микроорганизмов. Пороформеры способны разрушать микробные клеточные мембраны и это делает их идеальными кандидатами для комбинированной терапии с традиционными антибиотиками [Hollmann et al., 2018]. Препараты на основе антимикробных пептидов пороформеров рассматривают как перспективные лекарства для лечения и профилактики ряда заболеваний. Показано антибактериальное, антигрибковое, антипаразитарное и противоопухолевое действие пептаиболов, в том числе, аламетицина [Collins et al., 2023; Torre et al., 2023]. Некоторые пороформирующие пептиды оказывают противоопухолевое действие [Jin, 2019]. Мастопаран и мелиттин рассматриваются как перспективные и малотоксичные средства для лечения онкологических заболеваний [Zhang et al., 2016; Nakue et al., 2023; Pandey et al., 2023]. Мастопаран индуцировал апоптоз опухолевых клеток мочевого

пузыря в модельных экспериментах [Ren et al., 2023], мелиттин подавлял пролиферацию опухолевых клеток, процессы апоптоза, метастазирования, ангиогенеза [Liu et al., 2016]. Для мелиттин и грамицидина *S in vitro* была показана их активность в отношении SARS-CoV-2 [Enayathullah et al., 2022]. В комбинации с оксациллином мелиттин был эффективен *in vivo* при лечении инфекций, вызванных устойчивой к метициллину бактерии MRSA [Pereira et al., 2023].

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 В, полимиксин Е (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 [Boutinbaïar et al., 1994]. Антимикробное [Huang et al., 2024; Stephani et al., 2024] и нейропротекторное действие мелиттина [Xing et al., 2024] известно много десятилетий. 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. Считается, что действие пороформирующих пептидов преимущественно направлено на липидный бислой 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 пермеабиллизации из-за ухудшения связывания даптомицина с мембраной с измененным липидным составом [Bayer et al., 2013]. У штаммов *Streptococcus mitis/oralis*, устойчивых к даптомицину, в мембране отсутствуют фосфатидилглицерин, кардиолипин и микродомены с анионными фосфолипидами [Mishra et al., 2017]. Аналогичное понижение доли фосфатидилглицерина описано для резистентных штаммов *Corynebacterium striatum* [Goldner et al., 2018]. Описана *mprF* мутация с увеличенным количеством лизилфосфатидилглицерина в мембране резистентного штамма [Gómez Casanova et al., 2018]. Колистин устойчивые штаммы *A. baumannii* грамотрицательных патогенов лишены возможности синтезировать липополисахариды, с которыми связывается антибиотик, а также в этих штаммах понижено содержание катионных липидов, таких как фосфатидилэтаноламин [Stokes et al., 2017]. В обоих случаях такие штаммы теряют патогенность. Штаммы *P. aeruginosa*, устойчивые к полимиксину В, также теряют вирулентность [Vulman 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 лекарствами [Han et al., 2018]. Резистентные к амфотерицину В штаммы *Leishmania sp.* содержат дефектные

ферменты в цепочке синтеза эргостерина – 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 и аламетицин - потенциальные 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, 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 противовоспалительные и антиартритные свойства пчелиного яда, индуцирует апоптоз в апоптозоустойчивых синовиоцитах и имеет перспективы как лекарство от ревматоидного артрита [Son et al., 2007]. 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, лечению атеросклероза, острой печеночной недостаточности [Park et al., 2012]. Как было сказано выше, мелиттин рассматривают как перспективное лекарство для лечения

различных видов онкологических заболеваний [Pandey et al., 2023], в том числе лейкемии и злокачественных опухолей легких. Пептид индуцирует апоптоз в культуре лейкемических клеток [Seremuga, 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 путем активации митохондриального пути апоптоза и запуска каспазозависимой апоптотической гибели опухолевых клеток [Lv et al., 2019]. Мастопаран ингибирует метастазирование 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 [Pandey et al., 2023].

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 клеток к лекарствам, их ключевая роль в старении организма, процессах апостола. Нейродегенеративные и онкологические болезни также тесным образом связаны с энергетическим обменом и дисфункцией митохондрий.

1.7. Молекулярные характеристики переносчиков C_4 -дикарбоксилатов и механизм транслокации

1.7.1. Транспортёры дикарбоксилатов. Общие сведения, роль в метаболизме. C_4 - дикарбоксилаты, прежде всего L-малат и сукцинат, играют

важную роль в метаболизме эукариотической клетки. Они являются интермедиатами цитратного цикла, локализованного в митохондриях. Окисление C_4 -дикарбоксилатов необходимо для окислительного фосфорилирования, основного поставщика АТФ в клетке. Особую роль играет специфический транспорт этих метаболитов через биологические мембраны. Например, транспорт L-малата через митохондриальную мембрану связан с 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, вызывающему атрофию мускулатуры позвоночника из-за токсического повреждения соответствующих моторных нейронов [Wozonadi 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 C_4 -дикарбоксилатов у многоклеточных организмов регулируются гормонами [Strungaru et al., 2011] например, фактор транскрипции PITX2 непосредственно регулирует экспрессию Na-зависимого дикарбоксилатного транспортера (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 цитрат-изоцитратного 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 медицинскую сторону исследования последствий мутаций дикарбоксилатных транспортеров человека. Ключевые для потери функционирования мутации в Na^+ -зависимом дикарбоксилатном переносчике связывают с эпилептической энцефалопатией новорожденных [Lu, 2019].

У микроорганизмов транспортеры дикарбоксилатов иногда индуцируются собственно дикарбоксилатами [Karinou et al., 2017] и подавляются глюкозой в высокой концентрации [Côte-Real et al., 1989]. Показано, что глюкозной репрессии подвержен 2-оксоглутаратный 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 малатом после снижения концентрации глюкозы и смены дрожжами 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 [Wojunga et al., 1998]. При выращивании в присутствии низких концентраций глюкозы функционирует дикарбоксилатный транспортер митохондрий, не способный транспортировать фумарат [Kakhniashvili et al., 1997]. Многие бактерии содержат мембраносвязанные сенсоры C_4 -ДКБ, имеющие домен-связывающий дикарбоксилат и домен, являющийся гистидинкиназой, который контролирует синтез ферментов, связанных с C_4 -ДКБ 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 комплекса необходимо для рецепции C_4 -ДКБ в *Bacillus subtilis* [Graf et

al., 2014]. Приведенные факты свидетельствуют о существенной роли транспорта C_4 - дикарбоксилатов.

Переносчики C_4 - дикарбоксилатов обнаружены во 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], 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], разнообразные транспортеры C_4 - дикарбоксилатов обнаружены у бактерий [McClelland M., 2001; Fraser et al., 1998; Kaneko et al., 2002; Hall and Pajor, 2007; Karinou et al., 2017]. Охарактеризованы транспортеры C_4 - дикарбоксилатов в мембранах митохондрий [Cappello et al., 2006; Spagnoletta et al., 2006; Ma et al., 2007; Wozonadi et al., 2018; Zhao et al., 2018], пероксисом [Visser W.F., 2006], хлоропластов [Zhao et al., 2018], тонопласта [Frei et al., 2018]. Увеличивающееся количество публикаций, посвященных транспорту C_4 - дикарбоксилатов, свидетельствует о возрастании интереса к этим переносчикам.

За последние десять лет получены первичные структуры для большого числа митохондриальных и плазмалеммных транспортеров дикарбоксилатов, а также переносчиков бактерий и изучен их кинетический механизм и параметры транспорта. Однако отсутствуют обзоры, посвященные сравнению всех видов транспортеров C_4 - дикарбоксилатов в связи их структурной организацией, взаимосвязью субстратной специфичности и механизма транслокации с особенностями структуры 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 дикарбоксилатов и канал, по которому осуществляется транслокация.

Представляет интерес поиск связей между особенностями первичной и вторичной структуры, а также существенными аминокислотными остатками транспортеров C_4 - дикарбоксилатов, 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 C_4 - дикарбоксилатов с обоими ионизированными карбоксилатами («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 сохраняли традиционное название цитратный (формально трикарбоксилатный) транспортер. Если в литературе использованы несколько названий для одного и того же переносчика, мы выбирали название, содержащее указание на механизм транспорта, например, α -кетоглутарат/малатный антипортер хлоропластов шпината [Pos et al., 1998].

1.7.2. Первичная структура транспортеров дикарбоксилатов.

Исследования транспортеров дикарбоксилатов митохондрий растений [Spagnoletta et al., 2006], животных [Kaplan et al., 1995; Fiermonte et al., 1998] и грибов [Palmieri et al., 1997; Pallotta et al., 1999; Palmieri et al., 2001; Ma et al., 2007] показали, что они содержат около 300 аминокислотных остатков. Аминокислотная последовательность всех митохондриальных переносчиков состоит из трех примерно равных частей, в которых порядок аминокислотных остатков в значительной мере повторяется. Консервативный участок последовательности $R_x(D/E)_x(V/I/A/M)(K/R)_x(R/K)$, начинающийся с пролина и содержащий два близко расположенных положительно заряженных остатка аргинина или лизина, повторяется 2-3 раза у всех митохондриальных переносчиков [Fiermonte et al., 1998; Cappello et al., 2006]. Присутствие отрицательно заряженных остатков вблизи N-конца также характерно для всех митохондриальных транспортеров [Runswick et

al., 1990; Kaplan et al., 1993; Kaplan et al., 1995; Kakhniashvili et al., 1997; Fiermonte et al., 1998].

Степень идентичности митохондриального дикарбоксилатного транспортера печени крысы с аналогичными транспортерами мыши, *C. 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, *C. elegans* и *S. cerevisiae* на 88, 89, 57 и 36% [Fiermonte et al., 1999]. Степень гомологии цитратного транспортера митохондрий *S. 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.

В настоящее время установлена первичная структура более двухсот бактериальных транспортеров C_4 - дикарбоксилатов. В отличие от митохондриальных транспортеров дикарбоксилатов размер большинства аналогичных бактериальных транспортеров значительно больше и составляет около 420 – 450 аминокислотных остатков, вне зависимости от механизма функционирования. Такой размер характерен для симпортеров, транспортирующих C_4 - дикарбоксилатов 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 H^+ -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 leguminosarum*) [Baker et al., 1996]. Сравнение 18-ти H^+ -зависимых дикарбоксилатных транспортеров группы DctA позволяет выделить две консервативных области (мотива): на участках 35 – 54 аминокислотных остатков (KPxGDxFxxLxKMxIxPxIF) и 291 – 318

аминокислотных остатков (VGLVxPTGYSFNLDGTxIYxFxAxxFxAQ) [Janausch et al., 2002]. Однако подобные мотивы отсутствуют у иных транспортеров С₄- дикарбоксилатов. У протонзависимых транспортеров С₄- дикарбоксилатов «дикарбоксилатный мотив» выделить не удастся [Lolkema et al., 2005].

Переносчики С₄-ДКБ плазмалеммы эукариот 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]. Таким образом, «дикарбоксилатная» специфичность не влияет на средний размер молекулы переносчика, он остается типичным для конкретной мембраны: для плазматической – 500 – 600 аминокислотных остатков, митохондриальной – 300 аминокислотных остатков, бактериальной цитоплазматической – 400 – 420 аминокислотных остатков.

Таким образом, способность переносить С₄- дикарбоксилатов для транспортеров из всех изученных типов мембран в различных группах организмов не коррелирует с характерными изменениями в молекулярном весе или первичной последовательности переносчиков.

1.7.3. Вторичная структура транспортеров дикарбоксилатов.

Одним из способов выявления особенностей вторичной структуры транспортеров является анализ гидропатического профиля на основе его первичной структуры [Horst and Lolkema, 20]. Метод основан на установлении зависимости от номера аминокислотных остатков среднего индекса липофильности аминокислотных остатков, соседствующих в первичной последовательности белка в пределах окна (короткого участка полипептидной цепи протяженностью 7 – 15 аминокислотных остатков). 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 аминокислотных остатков, образуют α -спирализованные трансмембранные сегменты в молекуле интегрального мембранного белка. Промежуточные гидрофильные участки профиля, условно называемые «петлями», экспонированы в раствор. Существенно, что предсказанные по гидропатическим профилям 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 участка. Анализ гидропатических профилей (см. выше) указывает на существование двух возможных трансмембранных α -спирализованных сегментов 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 трансмембранного сегмента 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 трансмембранных сегментов транспортера было осуществлено сканирование с помощью анализа доступности проникающих сульфогидрильных реагентов к мутантным цистеинсодержащим аминокислотным остаткам в петлях. Сохранившие активность двадцать

мутантных по IV трансмембранному сегменту 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 трансмембранного сегмента были получены аналогичные результаты [Ma et al., 2006].

У транспортеров дикарбоксилатов митохондриального семейства, содержащих шесть трансмембранных сегментов, между липофильными I и II, III и IV, V и VI трансмембранных сегментов 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 аминокислотных остатков, как в липофильных, так и в гидрофильных участках транспортера, находятся вблизи поверхности мембраны. Аналогичную структуру демонстрируют митохондриальные переносчики животных [Kaplan et al., 1993] и высших растений [Spagnoletta et al., 2006].

Все три транспортера хлоропластов *Arabidopsis thaliana*, способных транспортировать C_4 - дикарбоксилатов по обменному механизму (дикарбоксилатный, оксалоацетатный и 2-оксоглутарат/малатный) содержат 12 трансмембранных сегментов [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 трансмембранных сегментов [Lodi et al., 2004; Rajor et al., 2006]. Большая гидрофильная петля между III и IV трансмембранных сегментов, локализованная на наружной стороне мембраны, содержит участок гликозилирования. Предполагается,

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 с помощью анализа доступности проникающих сульфогидрильных реагентов к мутантным цистеинсодержащим аминокислотным остаткам в петлях. Уточненная модель вторичной структуры содержала 11 трансмембранных сегментов [Bai et al., 2007].

Как и в митохондриальных транспортерах, в Na^+ -дикарбоксилатных симпортерах плазматических мембран кишечника *X. laevis*, почек человека, крысы и кролика консервативные аминокислотные остатки группируются вблизи примембранных участков гидрофильных петель и липофильных трансмембранных сегментов [Pajor, 1996]. Интересно, что переносчики C_4 -дикарбоксилатов плазмалеммы животных, функционирующие по механизму электронейтрального обмена, также имеют 12 трансмембранных сегментов, 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].

Гидропатический профиль дикарбоксилатных транспортеров бактерий более консервативен, чем их первичная структура [Lolkema et al., 2005]. В области трехсотого аминокислотного остатка семь трансмембранных сегментов N-конца отделены длинным гидрофильным регионом от пяти трансмембранных сегментов C-конца, причем аналогичная структура сохраняется у переносчиков с различным механизмом транспорта. Подобной структурой обладают антипортеры [Krom and Lolkema, 2003] протонные [Tunecka et al., 2001] и натриевые [Hall and Pajor, 2007] симпортеры и переносчики, функционирующие 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 связываются с внутри- и внеклеточными 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. По-видимому, некоторые петли способны образовать структуру, более гидрофильную с одной стороны и более гидрофобную – с другой. Так, петля между VIII и IX трансмембранными сегментами цитратного транспортера (*citS*) *Klebsiella pneumoniae* по результатам сканирования с помощью проникающих сульфогидрильных реагентов содержит доступные и недоступные для гидрофильных агентов аминокислотные остатки. Поскольку ряд аминокислотных остатков на петле определяет сродство к субстрату и скорость транспорта, предполагают, что эта структура 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 трансмембранных сегментов для митохондриальной мембраны, и для плазмалеммы, хлоропласта, тонопласта и бактериальной мембраны – 11 - 12 трансмембранных сегментов. Подобная закономерность характерна и для переносчиков других субстратов, локализованных в этих типах мембран.

Третичная структура транспортеров дикарбоксилатов не изучена, хотя для транспортеров митохондрий дрожжей (2-оксоглутаратного [Carpello et al., 2006] и цитрат-изоцитратного [Ma et al., 2007]) были предприняты попытки реконструировать ее, опираясь на предположение, что все митохондриальные транспортеры имеют третичную структуру, сходную с ADP/АТР антипортером митохондрий (подробнее – в разделе 1.8.). Имеются сведения о четвертичной структуре некоторых транспортеров. 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 сольюбилизации в растворе детергента или реконструкции в липосомы. Такими свойствами обладает вышеупомянутый транспортер (citS) *K. pneumoniae* [Kastner et al., 2003]. Оксоглутаратный транспортер митохондрий млекопитающих также существует в липосомах в виде гомодимера [Bisaccia et al., 1996]. Для объяснения электронейтрального антипорта переносчиком, имеющим одну точку связывания дикарбоксилата на мономер, предполагают кооперативное взаимодействие субъединиц в гомодимере. Авторы допускают, что в то время как одна субъединица гомодимера транспортирует C₄-дикарбоксилатов в одну сторону, вторая переносит другой C₄-дикарбоксилатов в противоположную [De Palma et al., 2005].

1.7.4. Механизм транспорта и специфичность переносчиков.

Транспорт C₄- дикарбоксилатов 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 C₄-дикарбоксилатов транспортеры можно объединить в группы, имеющие широкую (6 - 12 переносимых субстратов) или узкую субстратную специфичность (2 – 3 субстрата). Кроме того, можно сгруппировать переносчики по их способности связывать и транспортировать C₄-дикарбоксилаты в малеатной [Spagnoletta et al., 2006], или фумаратной конформации [Pallotta et al., 1999; Hafke et al., 2003; Inoue et al., 2004; Knauf et al., 2006; Kaufhold et al., 2011; Karinou et al., 2017;]. Описаны отдельные транспортеры, переносящие кроме C₄- дикарбоксилатов (L-малат, сукцинат, оксоглутарат, оксалоацетат, фумарат, малеат), дианионы цитрата, изоцитрата, *cis*-аконитата) [Knauf et al., 2006; Spagnoletta et al., 2006],

кислые аминокислоты [Zhao et al, 2018], а иногда также их N-ацетилы [Yodoya et al., 2006], и, в виде исключения неорганические дианионы (ортофосфат, сульфат, тиосульфат) [Palmieri et al., 2008]), изредка малонат [Indiveri et al., 1993], тартрат [Kim and Uden, 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., 1993] 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.

Канал тонопласта листьев одного из видов коланхоэ с близкой эффективностью транспортировал малат ($K_M - 2,5$ мМ) и фумарат, а дианион цитрата и малеата существенно хуже [Hafke et al., 2003]. Канал открывался под действием отрицательного потенциала (величина «полуоткрытия» равна 43 мВ), проводимость одиночного канала, измеренного с помощью электрофизиологической техники, составляла 3рS [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, уменьшал накопление малата и цитрата в листьях, без изменения способности к фотосинтезу [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 [Rajor, 2006]. Они отличаются от аналогичных по механизму бактериальных симпортеров иным соотношением Na^+ /дикарбоксилат (3 – 4 [Rajor, 2006], а не 2 [Hall and Rajor, 2007], как у бактерий), поэтому импорт у эукариот – электрогенный. В то же время, в плазмалемме эпителия почечных канальцев обнаружены электронейтральные антипортеры, такие как rOat5 [Lim et al., 2012], а также rOat8 [Yokooyama et al., 2008].

На плазмалемме дрожжей создается градиент H^+ , и для этой мембраны характерны протонные симпортеры, которые ингибируются протонфорами – 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 C_4 - дикарбоксилатов.

В плазмалемме животных C_4 - дикарбоксилатов транспортеры можно объединить в три группы по сродству 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 [Rajor and Randolph, 2007]. Однако особенности вторичной структуры и механизм (импорт с Na^+), остаются одинаковыми во всех трех случаях [Rajor, 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.

Сродство к субстрату, как правило, связано 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 C_4 - дикарбоксилатов плазмалеммы животных в начальных

отделах выделительной системы, в то же время, у переносчиков в дистальных отделах почечных канальцев, связанных с ресорбцией C_4 -дикарбоксилатов из первичной мочи, сродство к сукцинату больше на два порядка [Pajor, 2006]. Величина K_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 C_4 -дикарбоксилатов, 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 трансмембранных сегмента (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 трансмембранных сегментов переносчики отличаются только одним аминокислотным остатком (у мыши Ala504, а 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 трансмембранного сегмента. 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 аминокислотных остатков 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]. Поэтому положение области, определяющей селективность относительно начала или конца канала невозможно предсказать в результате анализа положения инвариантных или существенных аминокислотных остатков в первичной структуре, особенно, если отдельные принципиальные для средства аминокислотные остатки принадлежат к разным трансмембранным сегментам.

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. 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 дикарбоксилатов, должны иметь достаточное сопротивление, чтобы удерживать потенциал порядка 150 – 200 мВ. Переносчики крупных гидрофильных молекул, в том числе, транспортеры C₄- дикарбоксилатов, 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 аминокислотных остатков, выстилающих канал. Если третичная структура переносчика не получена

методом рентгеноструктурного 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 трансмембранного сегмента, приводила к необратимой потере активности. Аналогичным методом показано, что Na⁺-глутаматный симпортер плазмалеммы нейронов содержит консервативный остаток Arg479, ответственный за специфичность к глутамату и аспартату в составе 8-го трансмембранного сегмента [Vendahan et al., 2000]. В VII-м трансмембранного сегмента 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 изменяла активность транспортера, но увеличивала в 6 раз его K_M для сукцината [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-дикарбоксилатов транспортеров бактерий (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) анализ последовательностей трансмембранных сегментов показал, что в центре хотя бы одного трансмембранного сегмента (ТМС) содержится хотя бы один остаток аргинина. Переносчик дрожжей С₄-дикарбоксилатов *K. lactis* имеет остаток Arg127 во II-ом трансмембранном сегменте 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.

Для цитратного переносчика митохондрий дрожжей изучили функцию большинства аминокислотных остатков, экспонированных в канал. Сканирование поверхности III-го и IV-го трансмембранных сегментов с помощью точечной замены на цистеиновые остатки и изучение доступности аминокислотных остатков, 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, созданной на базе трехмерной структуры ADP/ATP антипортера митохондрий [Walters and Kaplan, 2004]. Для 30-ти белков с заменой на цистеиновые остатки, способных осуществлять транспорт, определили K_M и V_{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_M . Это остатки Arg189 IV-го трансмембранного сегмента, Arg87 II-го трансмембранного сегмента (согласно модели они образуют солевые мостики с ионизированными дикарбоксилатами) и Lys83 III-го трансмембранного сегмента. Эту группу назвали первым субстрат-связывающим центром. В 0,2 нм от начала транспортного пути такой связывающий центр образуют остатки Lys37 I-го трансмембранного сегмента, Arg181 IV-го трансмембранного сегмента, Lys239 V-го трансмембранного сегмента, Arg276 и Arg279 VI-го трансмембранного сегмента. Девять из десяти аминокислотных остатков, замещение которых ухудшало сродство к субстрату, оказались эволюционно консервативными. Поскольку длина молекулы цитрата – 0,9 нм, авторы предположили существование двух неперекрывающихся центров связывания на пути

транслокации субстрата. Кроме того, суммарная протяженность обеих 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 отрицательно заряженные полярные остатки, которые, не меняя существенно K_M , радикально уменьшали V_{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 значение K_M восстанавливалось до величины, характерной для «нативного» транспортера или даже уменьшалось, а величина V_{max} сохранялась пониженной. Такая «прецизионность» положительных зарядов, участвующих в связывании дикарбоксилатов, может свидетельствовать о конформационной «жесткости» канала или о «машиноподобном» механизме транслокации, при котором удлинение любого «шарнира» недопустимо. Консервативные остатки Lys37, Arg181, Lys239, Arg276, 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 аминокислотных остатков. Однако измерение только начальных скоростей переносчиков не позволило авторам отличить влияние точечной мутации на сродство к субстрату 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, был сделан вывод об одной точке связывания субстрата в канале транспортера [Stipani et al., 2001]. Замена этих остатков не только на цистеины, но и на некоторые другие алифатические остатки также радикально ухудшала 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- дикарбоксилатов 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 переноса внешнего субстрата 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- дикарбоксилатов переносчиков можно предположить разный механизм транслокации. или использовать независимый метод характеристики внутренней поверхности канала и количества точек связывания в нем. с С помощью набора конкурентных ингибиторов такой подход был осуществлен на дикарбоксилатном переносчике печени крысы в работах

Шольца и сотрудников [Sholtz et al., 1993]. Было сделано предположение, что точка связывания гидрофильного субстрата (сукцината) экспонирована в канал дикарбоксилатного переносчика, так же, как это было продемонстрировано для двух других митохондриальных переносчиков дикарбоксилатов – цитратного [Ma et al., 2007] и 2-оксоглутаратного [Carrello 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 (О-ацил-L-малаты). Изменение констант ингибирования этих соединений ($\Delta K_i = K_{i(n)} - K_{i(n-1)}$) при удлинении на одно метиленовое звено характеризовало степень липофильности в районе связывания активным центром переносчика конечной метильной группы ингибитора, где «*n*» - число атомов углерода в алифатической цепи [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 константы 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, поэтому трудно заключить, подтверждают или противоречат друг другу полученные результаты. На Na^+ -симпортерах плазмалеммы животных методом «белковых химер» было продемонстрировано, что крупные домены, формирующие канал переносчика, ответственны за сравнительно небольшое 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 аминокислотных остатков, выстилающих канал переносчика, на транспорт было систематически изучено для 2-х небольших митохондриальных переносчиков *S. cerevisiae*: цитратного [Ma et al., 2007] и 2-оксоглутаратного [Stipani et al., 2001; Cappello et al., 2006]. 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 активного центра, ответственные за связывание и транслокацию нескольких отличающихся субстратов. Более того, именно эти дрожжевые C₄-дикарбоксилатов 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]. 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]. 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 трансмембранных сегментов в молекуле переносчика или характер специфичности не определяют 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 C₄- дикарбоксилатов.

Представлений о конкретных путях транслокации дикарбоксилата внутри канала переносчика, опирающихся на экспериментальный материал, немного.

1.7.6. Предполагаемая третичная структура дикарбоксилатных транспортеров. Единственная к настоящему времени 3D структура C₄-дикарбоксилатов транспортера получена для бактериального Na⁺-зависимого дикарбоксилатного транспортера vcINDY из *V. cholerae* с разрешением 3.2 Å [Mancusso et al., 2012]. Найдено, что переносчик имеет специфичность для A⁺, Li⁺, но для K⁺ и транспорт сукцината ингибируется сукцинатом, малатом и фумаратом, но не цитратом, глутаматом или сульфатом, т.е. vcINDY – это высокоспецифичный переносчик C₄-дикарбоксилатов. 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 [Mancusso et al., 2012].

В работе [Rosa et al., 2019] на основе сравнения первичных структур показано, что белок сенсор MatC (RPA3494) *Rhodospseudomonas 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, можно рассматривать как модель для объяснения субстратной специфичности дикарбоксилатных переносчиков. Триптофановая 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]. Более высокое сродство к малату 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) аминокислотные остатки [Rosa et al., 2019].

1.8. Трехмерные структуры трансмембранных транспортеров.

Возможность получения рентгеноструктурных моделей трансмембранных транспортеров гидрофильных субстратов с высоким разрешением. Аквапорин. Известно более пятидесяти рентгеновских структур переносчиков гидрофильных субстратов [Mancusso et al., 2012; Rosa et al., 2019]. Ни одна из них не имеет достаточного разрешения (1,2 Å), чтобы установить точные координаты аминокислотных остатков, выстилающих канал транспортера, и поэтому при построении модели авторы часто поворачивают элементы вторичной структуры, в соответствии с априорными представлениями о гидрофобности (или гидрофильности) канала [Dahl et al., 2004]. По-видимому, гидрофильные области молекулы, экспонированные в раствор, по обе стороны гидрофобного трансмембранного участка, мешают качественной кристаллизации (количество полностью мембранных или растворимых белков, полученных с высоким разрешением, существенно). Исключение составляет аквапорин, N- и C- концы которого не участвуют в кристаллообразовании, и их конформация не влияет на упаковку в кристалле [Fischer et al., 2009]. 3D структура дрожжевого аквапорина, Aqp1, из *Pichia pastoris* получена с

разрешением 1,15 Å [Fischer et al., 2009]. Тетрамер в кристалле состоит из 4-х независимых водных каналов, а каждый мономер образован 6-ю трансмембранными спиральями, формирующими конструкцию, похожую на песочные часы [Fischer et al., 2009]. На увеличенном участке показаны гидрофобные аминокислотные остатки 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 [Fischer et al., 2009]. Сужение водной поры на внеклеточной стороне вблизи ароматической/аргининовой конструкции (Рис. 1.18а.), по-видимому, служит селективным фильтром, а гидроксильная группа Tyr31 в сочетании с карбонильными группами Gly108 и Gly109 – “запором”, образующим сужение размером около 0,8 Å [Fischer et al., 2009].

Таким образом, за исключением 2-х аминокислотных остатков, 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].

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 гипотезой, крупное конформационное изменение молекулы бензилгидантоин транспортера Mhp1 из *Microbacterium liquefaciens*, сопровождается сменой обводненной воронки с субстратсвязывающим центром на дне, открытой наружу, на открытую во внутрь. Вопрос о пути продвижения субстрата сквозь молекулу транспортера при этом вообще не рассматривался [Weyand et al., 2008]. Эту модель авторы предлагают и для транспортера лейцина, LeuT, и переносчика галактозы, vSGLT.

В рамках второй гипотезы предполагается существование протяженного трансмолекулярного «проводящего пути», включающего обводненную воронку, втягивающую ион в канал за счет

электростатических взаимодействий, диполи на трансмембранных спиральных элементах, обеспечивающих узнавание иона и гидрофобный проход, приводящих ион в движение сквозь канал [Doyle, 2004a; Doyle, 2004b]. Автор применил 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 АТР-зависимых кассетных транспортеров [Locher, 2009].

В хорошо разрешенных структурах: концентрационного транспортера нуклеозидов из *V. cholerae* с разрешением 2,4 Å [Johnson et al., 2012], лактозной пермиазы *E. coli* с разрешением 3,5 Å [Jiang et al., 2016], Na⁺-независимого карнитин/бутиробетаин антипортера CaiT, *Proteus mirabilis* [Schulze et al., 2010] с разрешением 2,3 Å, глутамат/аминобутират антипортера, GadC, *E. coli* с разрешением 3,1 Å [Ma D. et al, 2012], урацил/H⁺- симпортера, UraA, *E. coli* с разрешением 2,8 Å [Lu et al., 2011] и многих других особое внимание было уделено месту и структуре субстрат-связывающего центра.

Вторая модель была использована для объяснения кристаллической структуры транспортера дивалентных катионов, CorA, *Thermotoga maritima* с высоким разрешением (2,9 Å). Авторы обратили 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]. Было высказано предположение, что путь субстрата внутри транспортера содержит 4 участка связывания ацетата, разделенные 3-мя гидрофобными областями, а предполагаемый способ перекрытия канала – «шибер поворотный (вьюшка)» из ароматического кольца Phe17 [Qiu et al., 2018]. Показана гидрофобная область, сформированная Phe17, Tyr72 и Leu131 с диаметром 2,0 Å и протяженностью 15 – 20 Å.

В работе [Payandeh et al., 2011] было высказано предположение о том, что 3D структура электрически управляемого Na^+ -канала из *Arcobacter butzleri*, NavAb, полученная для закрытой конформации с разрешением 2,7 Å, может быть общей моделью для значительного количества транспортеров щелочных катионов и некоторых небольших анионов. Модель предполагает наличие внеклеточной воронки (вход в канал), селективный фильтр, центральную полость канала и активируемые ворота (выход внутрь клетки), короткий селективный фильтр NavAb (4,6 Å), содержащий 4 кислых остатка Glu, непосредственно участвующих в дегидратации Na^+ , а стороны внутренней части поры, отвечающие за «изгнание катиона» выстланы гидрофобными аминокислотными остатками, в том числе центральная полость [Payandeh et al., 2011].

Аналогичная гидрофобная зона канала показана для двупорового канала, TRP1, из *A. thaliana*, где центральная полость содержит Leu301, Val668, Tyr305 и Leu672 [Kintzer and Stroud, 2016].

На структурной модели эпителиального кальциевого канала TRPV6 крыс, полученного с разрешением 3,25 Å, авторы указали на «подобную K^+ -каналам» гидрофильную воронку, обращенную наружу, селективный фильтр из остатков Asp и гидрофобную центральную полость после нее [Saotome et al., 2016].

3D структура пентамерного кальций-активируемого хлоридного канала цыпленка (CaCC), полученного с разрешением 2,85 Å, также предполагает наличие обводненной гидрофильной воронки, обращенной во внеклеточное пространство. После нее – имеется гидрофобную зону канала, содержащая аминокислотные остатки Ile 76, Phe 80 и Phe 84 каждой из 5-ти S2b спиралей, окаймляющих канал, а затем ближе к внутриклеточному пространству – гидрофильную полость [Kane Dickson et al., 2014].

Таким образом, переносчики и каналы со второй моделью функционирования, переносящие 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* [Doyle et al., 1998] (Рис.1.8.).

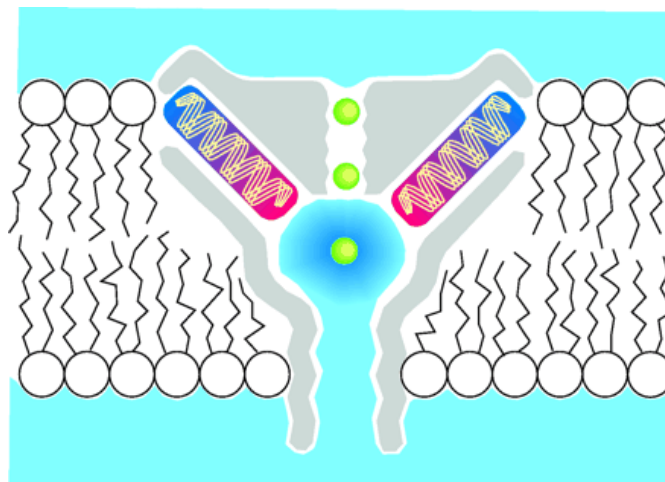


Рис. 1.8. Модель калиевого канала *S. lividans*, полученная на основе рентгеноструктурного анализа данных с разрешением 3,2 Å. В крупной обводненной полости катион (зеленые шарики) стабилизируется и ориентируется за счет частично отрицательных зарядов карбоксилатов (красный цвет). Серым цветом показана гидрофобная зона. По данным [Doyle et al., 1998].

ADP/ATP антипортер митохондрий – структурная модель всех митохондриальных переносчиков с 6-ю трансмембранными сегментами. Современный взгляд, основанный на рентгеноструктурном анализе ADP/ATP антипортера митохондрий, 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 вышеописанного переносчика митохондрий быка в комплексе с карбоксиаттрактилазидом была получена с разрешением 2,2 Å [Rebay-

PeYROULA et al., 2003] и все модели митохондриальных транспортеров основаны на ней [Walters and Kaplan, 2004].

Принципиальных различий во взаиморасположении трансмембранных сегментов у транспортеров, имеющих разные механизмы, не выявлено, поэтому в качестве основы модели дикарбоксилатных переносчиков, анализируемой в работе с помощью ингибиторного анализа, использовали модель ADP/ATP антипортера митохондрий (единственной структуры, полученной с высоким разрешением для митохондриальных антипортеров) и упрощенную модель, предложенную [Doyle et al., 1998] для калиевого канала *S. lividans*.

1.9. Теоретическое обоснование некоторых используемых в работе методических приемов.

Коэффициент распределения амфифильных эффекторов между мембраной органелл или клеток и средой инкубации.

Согласно закону Бергмана-Нернста, соотношение между концентрациями вещества в липофильной фазе биологических мембран (C_m) и водной средой (C_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). Для практически непроникающих через мембрану (в той области pH, в которой мы работали) производных дикарбоксилатов распределение происходит 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 формально применять математические расчеты не только для митохондрий, но и для клеток дрожжей с мощной (потенциально сорбирующей) оболочкой. Согласно расчетам, сделанным в работе [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. Мембраноактивные пептиды – пороформеры образуют каналы внутри бислоя мембраны (подробнее – в разделе 1.5.) и их действующей концентрацией является та, что в мембране, которую рассчитывали по формуле: $C_m = A_{200}/(1/K_p + \lambda B)$ [Шольц и Захарова, 1980], где λ – удельное содержание доступной эффектору гидрофобной фазы (удельное содержание липида в митохондриях), равное 0,001 мг/мл, а B – концентрация митохондрий (подробнее см. Материалы и методы).

Протонофорный цикл. Протонофоры как инструмент исследования. Протонофор – это 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 своеобразным катализатором трансмембранного переноса заряда, протонофоры способны эффективно уменьшать $\Delta\psi$ в наномолярных концентрациях т.е. меньших, чем например, приведенная (к 0,5 мг митохондриального белка/мл) концентрация компонентов электрон-транспортной цепи в митохондриях [Terada, 1990]. Это позволяет пренебречь побочными действиями протонофоров на цитохромоксидазу и их связыванием с гидрофобной площадкой в убихинол связывающем центре bc1 комплекса [Saitoh et al., 1992]. Каталитический

цикл, называемый протонофорным (Рис. 1.9.), 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].

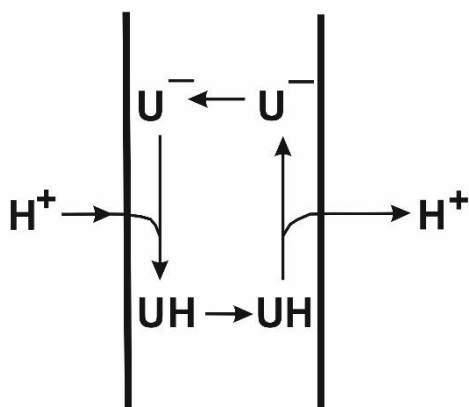


Рис. 1.9. Протонофорный цикл для слабой амфифильной кислоты. U^- – анионная форма разобщителя. По данным [Terada, 1990].

Эффективность цикла для SF-6847, 3,5-ди-*трет*-бутил-4-оксибензилиденмалонитрила, 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, производные фенолов, например, FCCP – карбонилцианид(4-флюорометокси)фенилгидразон, тоже имеющие механизм шаттла (*англ.* shuttle-type mechanism) [Miyoshi et al., 1987].

Эти общие особенности механизма подтверждаются наличием линейной корреляцией между коэффициентом распределения протонофора и его активностью [Terada, 1990]. Казалось бы, чем эффективнее протонофор, тем лучше – меньше побочных действий, которые в общем случае умножаются с ростом его концентрации. SF-6847 и FCCP, радикально различающиеся по структуре, оказывают одинаковое действие на $\Delta\psi$ -зависимую активность. С помощью циклической вольтамметрии

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, поэтому целесообразно 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 и D-изовалерата [Huang, et al., 2021], способен образовывать эквимольные комплексы с высоким сродством к K^+ (в этаноле константа ассоциации (K_a) составляет 2×10^6 [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 относительно простым, хорошо изученным, механизмом транспорта: электрофоретическим движением этих комплексов по градиенту трансмембранного потенциала [Ovchinnikov et al., 1974; Naumowicz et al., 2006; Huang et al., 2021].

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 уменьшал [Bittman et al., 1986], увеличение степени насыщенности кислот в липидах увеличивал [Scarpa and Gier, 1971], а в моноолеиллипидах, подвижность была больше, чем в диолеиллипидах [Stephen et al., 1972]. Качественно трансмембранный перенос K^+ в митохондриях печени крысы, индуцированный низкими концентрациями валиномицина (в среде содержащей фосфат в качестве проникающего аниона), был впервые показан в работе [Pressman, 1968]. Это было оценено по набуханию органелл, причем эффект сопровождался

активацией дыхания. Был определен коэффициент распределения пептида между этой средой и дышащими митохондриями – K_p , равный $(1,8 \pm 0,2) \times 10^5$ (Шольц и др., 1985). Содержание пептида в митохондриальной мембране с учетом этого коэффициента варьирует в вышеописанном опыте от 0,4 до 2,0 нмоль/мг [Шольц и др., 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. Побочное действие валиномицина на митохондрии печени крысы невелико. Таким образом, валиномицин является удобным инструментом для исследования зависимости индуцированного им трансмембранного тока в калий-содержащей среде на параметры дыхания митохондрий печени крысы.

Пошаговое зондирование активного центра дикарбоксилатного переносчика митохондрий печени крысы

Ранее была изучена топография канала активного центра дикарбоксилатного переносчика митохондрий печени крысы [Шольц и др., 1987; Шольц и др., 1990]. С этой целью использовали 17 конкурентных ингибиторов транспортера, относящихся к одному классу соединений – 2-моноалкилмалонатов от 2-метилмалоната до 2-гептадецилмалоната. Изменение 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 др., 1990]. Подтверждающие эти результаты данные были получены с использованием производных другого субстрата переносчика – L-малата (O-ацил-L-малаты) [Sholtz et al., 1993]. Однако вопросы о форме алифатического заместителя внутри канала переносчика и о форме

обнаруженной липофильной области вблизи точки связывания малоната в переносчике, оставались открытыми.

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

Геносистематика близкородственных видов с использованием метода полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами (УП-ПЦР). Для установления генетического родства между видами и родами дрожжей используются методы, основанные на сравнении последовательностей генов, кодирующих рРНК (5S, 18S, 26S), наиболее часто 18S.

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 дрожжей-аскомицетов [Kurtzman and Robnett, 1998] позволило создать компьютерную базу данных для определения таксономического положения новых штаммов. Различия по 6-ти и более нуклеотидам в районе D1/D2 обычно указывают на принадлежность штаммов к разным видам [Guadet J, 1989], а конспецифичные штаммы имеют идентичные последовательности или различаются по 1-3 нуклеотидам [Naumova et al., 2003].

Для классификации дрожжей использовали и другие молекулярные методы: определение мольного содержания суммы гуанина и цитозина (ГЦ) в процентах от общего количества оснований ДНК у разных объектов (Kurtzman and Robnett, 1998), молекулярное кариотипирование (Boekhout et al., 1993), изоферментный анализ (Kurtzman and Robnett, 1998; Yamazaki et al., 2005). Благодаря универсальному дизайну универсальных праймеров удается амплифицировать видоспецифичные ПЦР-профили, а различия по отдельным фрагментам позволяют дифференцировать штаммы внутри одного вида. Молекулярное кариотипирование использовали, в основном, для дифференциации филогенетически отдаленных видов. ПЦР-анализ с универсальными праймерами позволял дифференцировать как филогенетически далекие таксоны, так и близкородственные виды [Bulat et al., 1998].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Реагенты

Реактивы и материалы. В работе использовали валиномицин, N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфо кислота (HEPES), литиказу, мерсалил, родамин 123, флавоин, L- и D-яблочную кислоту, (Sigma, Германия), D-глюкозу моногидрат, D-маннит, D-сорбит, (Merk, Германия), бычий сывороточный альбумин; 2-оксибутират натрия (Ferak, Германия), («Calbiochem», США), антимицин А, бензилдиметилдодециламмония хлорид, кумасси бриллиантовый голубой, морфолино-этан-сульфо кислоту (MES), ротенон, Tris(оксиметил)аминометан (Tris), цитохром с (Serva, Германия), бакто-агар, дрожжевой экстракт, пептон, среду YNB без аминокислот и сульфата аммония (BD, Difco Laboratories, США), аспарагин, динатриевую соль аденозин-5-дифосфорной кислоты, этилендиаминтетрауксусную кислоту или ее динатриевую соль, (Reanal, Венгрия), протонофоры (3,5-ди-трет-бутил-4-оксибензилиденмалонитрил (SF-4867, далее SF) (Sumitomo Chem. Co., Япония) и (карбонил-цианид-4-трифторметокси)фенилгидразон (FCCP) (Sigma, Aldrich), малонат натрия (ICN, США), аламетицин из *Trichoderma viride* («Fluka», Швейцария), эндонуклеазы *HaeIII* и *HpaII* (Fermentas, Литва); остальные реактивы отечественного производства квалификации х.ч. и о.с.ч. 2-Алкилмалонаты, 2,2-диалкилмалонаты, α,ω -алкилендималонаты и О-ацил-L-малаты были синтезированы и очищены Д.И. Бондаренко в лаборатории биоэнергетики ИНБИ РАН. Аламетицин был любезно предоставлен проф. К.Л. Райнхартом (Иллинойский университет, США), этот препарат использован в большинстве опытов. Грамицидин S, полученный от проф. Г.Ф. Гаузе, перекристаллизован из этилового спирта. Мелиттин из *Apis mellifera* и мастопаран из *Vespa orientalis*, были любезно предоставлены Л.Г. Снежковой (ИБХ РАН). Родамина 19 бутиловый эфир, SkQ1 (10-(4,5-диметил-3,6-диоксо-1,4-циклогексадиен-1-ил)децилтрифенилфосфоний) и

SkQThy (10-(2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинонил-6)децилтрифенил-фосфоний) были любезно предоставлены Г.А. Коршуновой, SkQ3 (10-(2,4,5-триметил-3,6-диоксо-1,4-циклогексадиен-1-ил)децилтрифенилфосфоний) и MitoQ (10-(4,5-диметокси-2-метил-3,6-диоксо-1,4-циклогексадиен-1-ил)децилтрифенил-фосфоний) – Д.С. Есиповым, Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ.

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 Y-502, Y-503, Y-5030, YNN 295, *S. paradoxus* N17, *S. bayanus* МСУС 623, YBS618, YBS817 и YBS24 из коллекции ВКПМ и ГосНИИ Генетика НИЦ Курчатовский институт (Россия), и штамм S288c, использованный для секвенирования генома *S. cerevisiae* (SGD <https://www.yeastgenome.org/>), от проф. Л. Малле (Франция). Для генетической и молекулярной идентификации штамма Y-503 использовали стандартные гаплоидные штаммы *S. cerevisiae* S288c (α SUC2gal2), X2180-1A (α 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*

Инокулят выращивали при 28°C в полусинтетической жидкой среде, содержащей 0,2%-ный дрожжевой экстракт, 1%-ную глюкозу, 0,21% КН₂РО₄ (рН 4,5), в отдельных случаях без добавления фосфата. После 12-ти часов выращивания инокулят медленно охлаждали до 4°C не менее суток для «мягкой» синхронизации культуры, в ходе которой при охлаждении до 0 – 2°C все клетки задерживались в G₁-фазе клеточного цикла [Узбеков, 2004]. Синхронизации культуры клеток способствовал также и посев инокулята, выращенного при высокой концентрации глюкозы, в среду с

низким ее содержанием. В этом случае синхронизация происходила путем переключения энергетического обмена с гликолитического на окислительный [Узбеков, 2004]. Мягкая синхронизация культуры была важна для использования клеток в качестве биосенсора для измерения транспорта субстратов через плазмалемму клеток дрожжей.

Для достижения накопления максимального количества митохондрий в клетке (и активности соответствующих оксидаз), клетки выращивали при 28°C в той же среде, но с 0,1%-ной глюкозой или в синтетической среде 0,17% Yeast Nitrogen Base (YNB) (pH 4,5), с добавлением 0,1%-ого K_2HPO_4 , 0,1%-ого аспарагина в течение 10-ти или 12 ч до фазы роста, совпадающей с истощением глюкозы в среде выращивания (Рис. 2.1.).

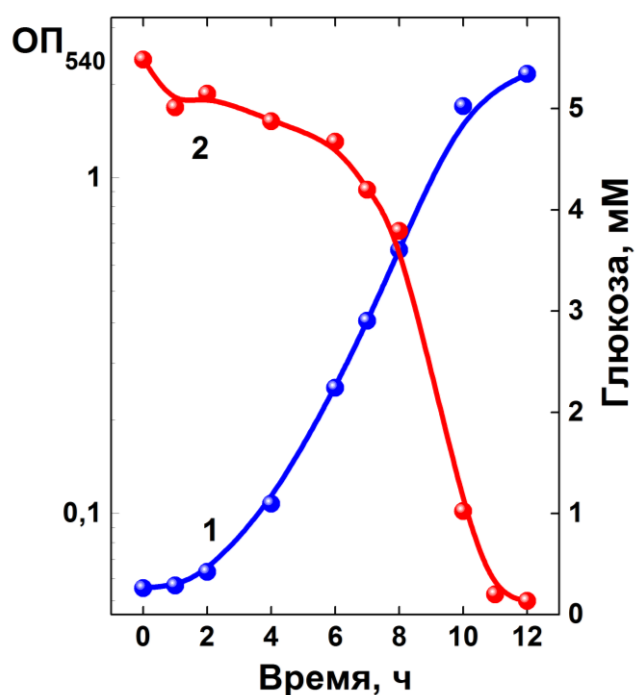


Рис. 2.1. Рост клеток *S. cerevisiae* (1) и изменение концентрации глюкозы (2) в среде выращивания. Среда выращивания содержала 0,2%-ный дрожжевой экстракт, 0,1%-ную глюкозу, 0,21% K_2HPO_4 (pH 4,5).

Клетки осаждали при 2700 g в течение 3 мин, трижды промывали дистиллированной водой (при 0°C), суспендировали в 10 mM калий-фосфатного буфера (pH 5,5) до концентрации 0,5 г сырого веса в 1 мл (далее – г/мл). Суспензию клеток преинкубировали при 0°C в пробирке при интенсивном перемешивании.

Для изучения морфологических параметров и скорости роста культуры клеток использованных в работе штаммов дрожжей различной плоидности, их выращивали дополнительно в средах различного состава, контролируя изменения значения рН среды (данные не приведены). Тетраплоиды обладали большими, чем у диплоидов активностями систем окисления субстратов [Galitski et.al, 1999], поэтому система окисления сукцината в клетках полиплоидных штаммов была удобна для изучения в качестве эндогенной сопряженной системы (ЭСС) измерения транспорта субстратов через плазмалемму.

2.4. Выделение митохондрий дрожжей *S. cerevisiae*

Клетки дрожжей *S. cerevisiae* выращивали (как описано в п. 2.3.) в течение 10 ч при 28° при температуре 2°С. Полученную биомассу осаждали при 5000 g в течение 5 мин и трижды промывали ледяной дистиллированной водой в тех же условиях.

Биомассу (1 г) суспендировали в 10 мл среды, содержащей 50 мМ Tris-HCl, рН 8,9, дитиотреитол (1,5 мг/мл, добавляли непосредственно перед опытом) для восстановления S-S связей белков клеточной стенки и разрыхления ее, перемешивали полученную суспензию на магнитной мешалке в течение 30 мин при 20°С. Биомассу осаждали при 5000 g в течение 5 мин и промывали дважды ледяной дистиллированной водой.

Для получения сферопластов (клеток с частично лизированной клеточной стенкой, но ненарушенной плазмалеммой) осадок клеток суспендировали в 10 мл среды, содержащей 1 М сорбит, 50 мМ ЭДТА, 10 мМ КН₂РО₄, рН 7,5, вносили раствор литиказы (комплекс литических ферментов для разрушения клеточной стенки, 1 мг на 1 г осадка). И инкубировали при мягком перемешивании при 28°С. Образование сферопластов контролировали, отбирая 100-мкл аликвоты суспензии, вносили их в 3 мл воды и фотометрировали при 540 нм. Измерения проводили каждые 5 мин. Когда оптическая плотность суспензии снижалась

(за счет разрушения образовавшихся сферопластов в воде) в 2,5 раза (примерно через 15 мин), полученные сферопласты осаждали при 4000 g в течение 10 мин и дважды промывали в 50 мл среды, содержащей 1,2 M сорбит, 20 mM ЭДТА, 10 mM MES, pH 6,5, осаждая биомассу при 3500 g в течение 12 мин. Митохондрии дрожжей выделяли, как описано [Bazhenova, et al., 1998]. Сферопласты разрушали в среде содержащей 0,4 M маннит, 1 mM ЭДТА, 0,1% БСА, 10 mM Tris-HCl, pH 6,5 с использованием гомогенизатора Даунса. Полученный гомогенат переносили в 50 мл среды, содержащей 0,6 M маннит, 1 mM ЭДТА, 10 mM MES, pH 6,5, центрифугировали при 3200 g в течение 12 мин. Осадок полученных митохондрий ресуспендировали в равном весу осадка объеме этой же среды. В отдельных опытах в среде промывания протопластов фосфат заменяли на 3 mM HEPES и добавляли 5 mM MgCl₂, в среду промывания митохондрий добавляли 5 mM MgCl₂ и исключали БСА. Митохондриальные препараты, выделенные таким образом, были полностью активны в течение более 5 часов при хранении их при 0°C.

2.5. Выделение митохондрий печени крысы. Получение субмитохондриальных частиц (СМЧ) и митохондрий с поврежденной внешней мембраной

2.5.1. Выделение митохондрий печени крысы

Прочносопряженные митохондрии печени крысы выделяли методом дифференциального центрифугирования по методике, как рекомендовано [Мосолова и соавт., 1971]. Печень крысы помещали на 20 мин в ледяной раствор 250 mM сахарозы. Охлажденную печень гомогенизировали в 3 мл среды выделения, содержащей 250 mM сахарозу, 2 mM ЭДТА, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 или 10 mM HEPES, pH 7,5, и после тщательного перемешивания доводили гомогенат этой же средой до концентрации 10%. Полученную суспензию дважды по 5 мин центрифугировали при 2700 g, а супернатант центрифугировали при 6000 g в течение 10 мин для получения

митохондрий. Полученный осадок ресуспендировали в 70 мл той же среды выделения и осаждали еще раз при тех же условиях. Полученный осадок ресуспендировали в равном весу осадка объеме этой же среды.

Выделенные таким образом митохондриальные препараты были активны в течение часов при хранении их при 0°C. Величина дыхательного контроля выделенных препаратов митохондрий в среде, содержащей 125 mM сахарозу, 2 mM EDTA, 20 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM KH₂PO₄, 10 mM сукцинат Na, ротенон (2мкг/мг белка), 20 mM Tris-HCl, pH 7,2, составляла – $5,14 \pm 0,65$, в опытах с ингибиторами ДКТ – $4,57 \pm 0,65$. Скорость окисления сукцината митохондриями в состоянии 4 (v_4) при этом составляла $11,43 \pm 0,5$ нмоль/мин мг белка, величина эндогенного дыхания в присутствии ротенона составляла не более 6% от величины v_4 . В пределах каждой серии опытов на одном препарате митохондрий, изменение этой величины не превышало 4%, а в пределах одной кривой 2 – 3%. Величины дыхательного контроля в среде, содержащей 194 mM сахарозу, 2 mM ЭДТА, 6 mM MgCl₂, 10 mM сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 10 mM Hepes, pH 7,5, при замене 0,3 mM KH₂PO₄ на 0,3 mM LiH₂PO₄, а также в средах, содержащих 209 mM сахарозу, 2 mM EDTA, 20 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 1 mM KH₂PO₄, 10 mM сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 30 mM Tris-HCl, pH 7,2 или 70 mM Tris-HCl были одинаковыми. Стандартная концентрация митохондрий печени крысы в оксиметрической ячейке, если не отмечено специально, составляла 0,25 мг белка/мл.

2.5.2. Получение митопластов и субмитохондриальных частиц (СМЧ) из митохондрий печени крысы

Для получения митопластов (митохондрий, лишенных внешней мембраны) митохондрии (200 мг белка) суспендировали в гипотонической среде, содержащей 5 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM ЭДТА, 15 mM KCl, выдерживали 20 мин при 0°C и добавляли сахарозу до конечной

концентрации 250 мМ и осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 6000 g 10 мин.

СМЧ (субмиохондриальные частицы) получали по модифицированной методике, как описано в [Aliverdieva, 2012]. Для этого осадок митопластов суспендировали в 5 мл среды, содержащей 250 мМ сахарозу, 2 мМ ЭДТА, 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4 или 10 мМ HEPES, pH 7,5, добавляли 2,4 нмоль цитохрома с, перемешивали и подвергали обработке на ультразвуковом дезинтеграторе (MSE, Великобритания) при 0,8 А при 0°C в 2 приема по 2 мин. Дезинтеграт разбавляли той же средой до 25 мл и центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при 0°C. Супернатант центрифугировали при 105000 g в течение 30 мин при 0°C. Осадок ресуспендировали в небольшом количестве (600 мкл) той же среды. Митопласты, полученные таким образом, были полностью активны не менее 5 часов (при хранении их при 0°C).

2.5.3. Измерение активности сукцинатдегидрогеназы СМЧ

Сукцинат:феррицианид-редуктазную активность СМЧ печени крысы измеряли фотометрически при 420 нм на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) в среде, содержащей 125 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ Tris-HCl, pH 7,2, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 10 мМ KН₂PO₄, 10 мМ сукцинат Na, ротенон (2 мкг/мг белка), протонофор 3,5-ди-*трет*-бутил-4-оксибензилиденмалонитрил (0,2 мкМ) с 0,5 мг белка в 1 мл) с добавлением 1 мкМ антимицина А, 1 мМ цианида калия и 1 мМ феррицианида калия как рекомендовано [Шольц и др., 1990]. Для изучения зависимостей скорости окисления от концентрации сукцината реакцию инициировали добавлением сукцината, для изучения зависимостей от концентрации ингибиторов в присутствии постоянной концентрации сукцината, реакцию инициировали добавлением суспензии СМЧ. Алкилмалонаты добавляли в виде водных растворов их калиевых солей, pH 7,2.

2.5.4. Получение митохондрий с поврежденной внешней мембраной

Митохондрии с поврежденной внешней мембраной получали в ячейке для измерения кислорода, при этом митохондрии печени крысы добавляли в гипотоническую среду, содержащую 10 мМ сукцинат, 2 мМ ЭДТА, 2,5 мМ $MgCl_2$ и 10 мМ Tris-HCl, pH 7,2, и прибавляя 100 мМ сахарозу через 1 мин как рекомендовано [Шольц и др., 1985]. Почти полное (на 95%) ингибирование скорости окисления сукцината митохондриями 2,2-дигексилмалонатом при сохранении линейности (однофазности) в координатах Диксона выявляло долю митохондрий с неповрежденной внутренней мембраной и позволяло измерить параметры нативного ДКТ с высокой точностью [Бондаренко и соавт., 1996]. Для проверки отсутствия влияния эффекторов на убихинол-цитохром с-оксидоредуктазу использовали в качестве тестирующей системы ферментативный путь окисления 3-оксибутирата – 3-оксибутиратоксидазу митохондрий печени крысы, а на сукцинатдегидрогеназу – 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 использовали разницу в концентрациях, вызывающих полуингибирование сукцинатоксидазной системы в присутствии протонофора и полуактивацию окисления 2-оксибутирата в его отсутствие [Бондаренко и соавт., 1996].

2.6. Выделение мастопарана и мелиттина

Мастопаран из яда шершня *Vespa orientalis* и мелиттин из *Apis mellifera*, не содержащий фосфолипазу, были выделены Снежковой Л.Г. (ИБХ РАН) как рекомендовано [Gauldie et al., 1976] с использованием гель-фильтрации на сефадексе G-75 и тонкослойной адсорбционной хроматографии на целлюлозе [Мирошников и др., 1981], определение

молекулярного веса пептидов проводили диск-электрофорезом в полиакриламидном геле по методу [Rato K., et.al., 1975].

2.7. Определение количества белка митохондрий

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

2.8. Определение количества глюкозы

Глюкозу в культуральной жидкости определяли с глюкозооксидазой при амперометрической регистрации кислорода, как описано в литературе [Okuda and Miwa, 1973] после удаления клеток фильтрованием (диаметр пор 0,3 мкм).

2.9. Измерение скорости поглощения кислорода клетками, митохондриями печени крысы и митохондриями дрожжей

Скорости поглощения кислорода измеряли амперометрически с закрытым кислородным электродом типа Кларка в термостатируемой ячейке с рабочим объемом 1 мл [Шольц и Островский, 1975]. Используемый в работе оксиметр позволял достоверно измерять скорости окисления порядка 0,2 нмол O_2 /мин и разницу концентраций O_2 – 2 нМ. Величину дыхательного контроля рассчитывали, как рекомендовано [Chance and Williams, 1955]. Клетки *S. cerevisiae* инкубировали при 28 и 30°C, митохондрии – при 25°C. Состав сред инкубации клеток дрожжей, митохондрий дрожжей и митохондрий печени крысы указан в подписях к рисункам. Валиномицин, аламетицин, ротенон добавляли в виде концентрированного раствора в этаноле, а родамин 123 – в виде раствора в диметилсульфоксиде, мелиттин, ТАМ, мастопаран, цитохром с – в виде концентрированного водного раствора.

2.10. Регистрация потенциала, генерируемого на внутренней митохондриальной мембране

Генерацию мембранного потенциала ($\Delta\psi$) митохондриями печени крысы измеряли по [Emaus et al., 1986]. Потенциал регистрировали на флуориметре Shimadzu RF-5301 PC (Япония) по изменению величины флуоресценции родамина 123 (поглощение – 503 нм, испускание – 527 нм), как рекомендовано [Emaus et al., 1986; Scaduto and Grotyohann, 1999] в тех же средах инкубации, в которых измеряли скорость поглощения кислорода. В контрольном опыте показали, что аламетицин, вызывающий набухание митохондрий, не искажал флуоресценцию за время измерения (Рис. 2.2.). Для сравнения использовали протонофор SF (3,5-ди-*трет*-бутил-4-оксибензилиденмалонитрил), как агент, не вызывающий набухание митохондрий.

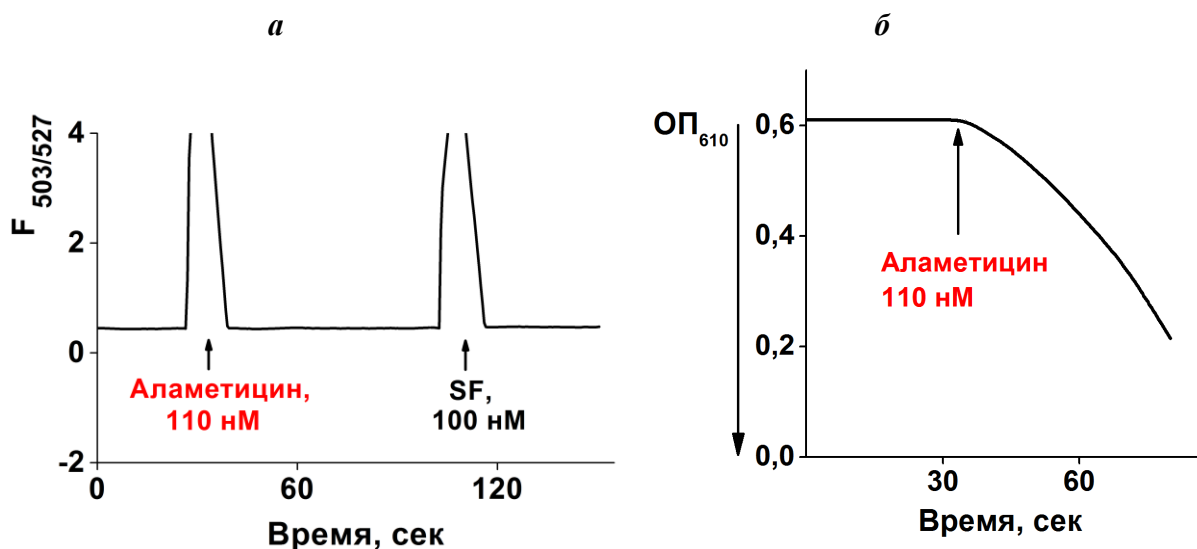


Рис. 2.2. Влияние аламетицина и протонофора SF на флуоресценцию родамина 123 (а). Изменение оптической плотности суспензии митохондрий печени крысы после добавления аламетицина, вызывающего набухание митохондрий (б). $F_{503/527}$ – флуоресценция родамина 123, $ОП_{610}$ – оптическая плотность при 610 нм. Среда инкубации содержала 125 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ $MgCl_2$, 10 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ сукцинат Na, 4 мкМ цитохром с, ротенон (2 мкг/мг белка), 20 мМ Tris-HCl (pH 7,2), 0,4 мкМ родамин 123, добавки: 110 нМ аламетицин (а,б), нМ 100 SF (а), митохондрии (0,25 мг белка/мл) (б).

2.11. Измерение набухания митохондрий и определение концентрации амфифила, вызывающей лизис митохондрий

Набухание митохондрий регистрировали турбидиметрически по изменению оптической плотности суспензии митохондрий при 610 нм [Aliverdieva et al., 2012]. Измерения проводили в тех же средах, в которых измеряли скорости дыхания митохондрий. В зависимости от задач опыта измерения проводили также в среде, содержащей 80 мМ K_2HPO_4 или 240 мМ сахарозу (или манит, раффинозу, сорбит), 2 мМ ЭДТА, 2 мМ $MgCl_2$, рутинно (2 мкг/мг белка), 1 мкМ антимицин А и 10 мМ HEPES (pH 7,55). Концентрацию амфифильного пептида, вызывающего лизис митохондрий (КЛМ), определяли по изменению оптической плотности суспензии митохондрий, инициированной добавлением эффектора в присутствии антимицина А.

В отдельных опытах (Рис. 2.3.) для проверки препарата прочно сопряжённых митохондрий печени крысы в качестве тест-системы

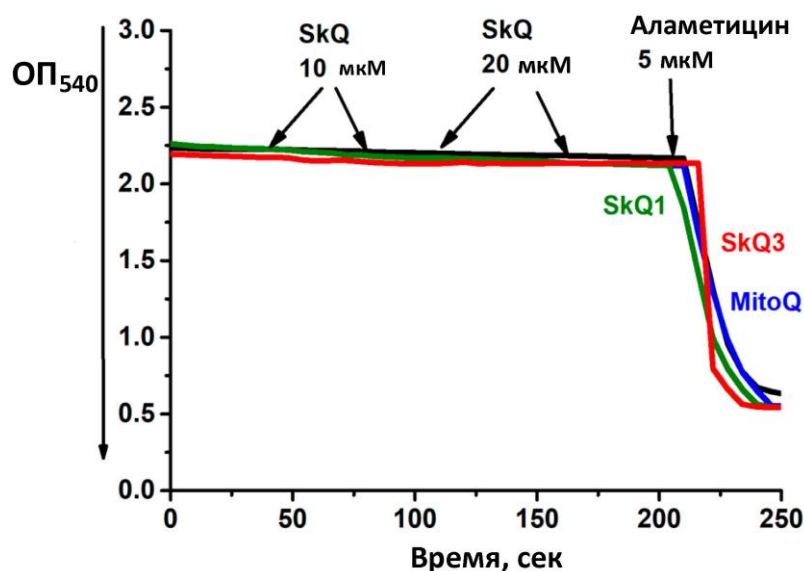


Рис. 2.3. Влияние SkQ3, SkQ1 и MitoQ на набухание митохондрий печени крысы. OP_{540} - оптическая плотность при 540 нм. В среду инкубации, содержащую 0,21 М маннит, 0,09М сахарозу and 2 мМ Tris-HCl буфер (pH 7,2), были добавлены 20 мМ Tris-сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 0,5 мМ ЭГТА, 5 мкМ аламетицин, 40 мМ KCl и митохондрии (0,5 мг белка/мл).

по выявлению возможных побочных эффектов потенциальных лекарств, нами были использованы модельные митохондриально-направленные антиоксиданты SkQ1, SkQ3, SkQThy и MitoQ. Набухание митохондрий регистрировали спектрофотометрически на спектрофотометре Varian Cary 300 Bio (США) по уменьшению оптической плотности митохондриальной суспензии при 540 нм [Goleva et al., 2019; Rogov et al., 2024]. Состав среды инкубации приведен в подписи к Рис. 2.3. В опытах по изучению действия бензалкония хлорида на митохондрии печени крыс, набухание митохондрий измеряли также по уменьшению оптической плотности при 540 нм на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония) в среде, содержащей 0,18 М маннит, 0,07 М сахарозу, 0,2 мМ Tris-фосфат, pH 7.2, Tris-сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 0,5 мМ ЭГТА, 40 мМ KCl и митохондрии 0,5 мг белка/мл. Аламетицин, как агент, вызывающий набухание митохондрий, использовали во всех проводимых опытах в качестве положительного контроля.

2.12. Определение доли доступной мембранной фазы клеток.

Определение доли доступной для эффектора липофильной фазы (соотношение β_a/β_0), основано на прямом определении его равновесной концентрации в водной фазе в системе клетки/среда. Метод разработан автором совместно с коллегами [Бондаренко и др., 2004]. К 2,0 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 5,5), содержащего исследуемое соединение добавляли суспензию дрожжей (50 мкл), выдерживали 3 мин, периодически перемешивая, и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. К осадку клеток добавляли 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 5,5), содержащий 40%-ный ДМСО, выдерживали 5 мин, периодически перемешивая, и центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. К осадку добавляли 2,0 мл среды с исследуемым соединением (О-пальмитоил-L-малатом или протонофором), выдерживали еще 3 мин, периодически перемешивая, центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин.

Для определения содержания О-пальмитоил-L-малата 0,5 мл супернатанта смешивали с 1,0 мл 0,05% метиленового синего в 0,1 М калий-фосфатном буфере с рН 5,5 и экстрагировали хлороформом (2,0 мл). Экстракт фотометрировали при 650 нм.

Для определения содержания протонофора к 1,0 мл супернатанта добавляли 50 мкл 0,5 М КОН и фотометрировали при 455 нм.

Доля доступной для амфифила липофильной фазы клеток *S. cerevisiae* определяли по уравнению:

$$\beta_a/\beta_0 = (C_0'/C_w' - 1)/(C_0''/C_w'' - 1),$$

где β_0 и β_a – содержание объема общей и доступной для амфифильного 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 пермеабилizованных ДМСО клеток. Так как значения оптического поглощения (ОП₆₅₀ или ОП₃₅₇) пропорциональны С, уравнение принимало вид:

$$\beta_a/\beta_0 = (ОП_0'/ОП_w' - 1)/(ОП_0''/ОП_w'' - 1)$$

С помощью этого уравнения рассчитывали долю доступной липофильной фазы клеток *S. cerevisiae* для О-пальмитоил-L-малата [Бондаренко, Аливердиева и др., 2004] и протонофора FCCP.

2.13. Синтез производных малата и малоната

Производные субстратов дикарбоксилатных транспортеров L-малата, и малоната (2-алкилмалонаты, 2,2-диалкилмалонаты, О-ацил-L-малаты и α,ω -алкилендималонаты) были синтезированы Д.И. Бондаренко в лаборатории биоэнергетики, в группе К.Ф. Шольца ИНБИ РАН: 2-метилмалонат, 2-этилмалонат, 2-пропилмалонат, 2-бутилмалонат, 2-пентилмалонат, 2-гексилмалонат, 2-гептилмалонат, 2-октилмалонат, 2-нонилмалонат, 2-децилмалонат, 2-ундецилмалонат, 2-додецилмалонат, 2-тридецилмалонат, 2-тетрадецилмалонат, 2-пентадецилмалонат, 2-гексадецилмалонат; диметилмалонат, диэтилмалонат, дипропилмалонат; О-

этил-L-малат, О-бутироил-L-малат О-валероил-L-малат, каприлоил-L-малат каприноил-L-малат, лауроил-L-малат, миристоил-L-малат, пальмитоил-L-малат, стеароил-L-малат; α,ω -алкилендималонаты: дималонат, 1,2-этилендималонат, 1,6-гексилендималонат, 1,8-октилендималонат, 1,11-ундецилендималонат. 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).

2.14. Определение коэффициентов распределения О-ацил-L-малатов в системе октанол/среда

Коэффициенты распределения (R_i) О-ацил-L-малатов в системе октанол/среда (10 мМ калий-фосфатный буфер, рН 7,2 или 5,5) определяли с использованием метиленового синего как описано [Бондаренко, Аливердиева и др., 2004].

Концентрацию ингибитора в водной фазе определяли с метиленовым синим. Коэффициент распределения соответствующей кислоты (R) рассчитывали по формуле:

$$R = (C_0 - C_w)v_w / C_w v_o$$

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 калий-фосфатный буфер от количества атомов углерода (n) в алифатической цепи этих соединений при рН 5,5 (рН среды инкубации клеток *S. cerevisiae*) и 7,2 (рН среды инкубации митохондрий). Эти зависимости описывались уравнениями с близкими инкрементами $\lg R$:

$$\lg R = 0,416n - 3,46 \quad (\text{для рН } 5,5)$$

$$\lg R = 0,406n - 5,42 \quad (\text{для рН } 7,2).$$

2.15. 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 и расчет минимальной энергии конформации с помощью метода MM2. Модели строили с помощью последовательного удлинения предыдущего соединения на одно метильное (для 2-алкилмалонатов) и этильное (для O-ацил-L-малатов) звено. Эту величину принимали за длину молекулярного зонда.

2.16. Расчет действующей концентрации амфифильных пептидов и коэффициента их распределения (K_p) между митохондриями печени крысы и средой инкубации, определяли, как рекомендовано [Шольц и др., 1985], но в условиях, исключающих индукцию эндогенных проводимостей в сопрягающей мембране митохондрий печени крысы, как рекомендовано [O'Rourke, 2007]. Состав сред инкубации указан в подписях к рисункам.

2.17. Определение кинетических параметров

Константы ингибирования (K_i) рассчитывали по формулам:

$$K_i = IK_M / (K'_M - K_M)$$

или

$$K_i = I_{50}K_M / (S + K_M),$$

где K_M и K'_M – константы Михаэлиса для субстрата (определенные в координатах Лайнуивера – Берка в отсутствие и в присутствии ингибитора, соответственно); I_{50} и I – концентрации ингибитора: вызывающая 50%-ное ингибирование (определена в координатах Диксона) и использованная, соответственно; S – концентрация субстрата. Средние 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 как рекомендовано [Шольц и Захарова, 1980]:

$$pK_i' = pK_i + \lg(R\lambda + 1),$$

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

Инкременты свободной энергии переноса ($\Delta\Delta G_m$) метиленовой группы алкилмалонатов из среды в липидную фазу митохондрий рассчитывали по формуле:

$$\Delta\Delta G_m = RT \ln (R_n / R_{n+1}),$$

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:

$$\Delta\Delta G_b = RT \ln (K_i'_{(n)} / K_i'_{(n+1)})$$

2.18. Молекулярно-генетические методы

Молекулярная идентификация штаммов дрожжей была проведена в лаборатории д.б.н. Е.С. Наумовой (ГосНИИ Генетика НИЦ Курчатовский институт) с помощью следующих методов: секвенирования части гена 26S рРНК; рестриктазного анализа амплифицированного 5.8S-ITS фрагмента, включающего 5.8S рДНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2 по; 3) пульс-электрофореза нативных хромосомных ДНК как рекомендовано [Naumov et.al., 2000; 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 [Naumov et al., 2000]. Для сравнения использовали типовые культуры *S. cerevisiae*. Амплификацию 5.8S-ITS-фрагмента провели у штамма Y-503, штамма Y-5030 и видовых тестеров *S. cerevisiae* Y-502, *S. paradoxus*: N17 и *S. bayanus*: МСУС 623. Продукты ПЦР анализировали с помощью ферментативного расщепления эндонуклеазами *Hae*III и *Hpa*II. Тест-штамм *S. cerevisiae* Y-502 и штамм Y-503 имели по четыре *Hae*III-фрагмента размером примерно 320, 230, 170 и 130 п.н. (Рис. 2.3.а., дорожки 1-5) и два *Hpa*II-фрагмента размером примерно 730 и 120 п.н. (Рис. 2.3.б., дорожки 1-5).

Пульс-электрофорез нативных хромосомных ДНК или молекулярное кариотипирование проводили по методу, описанному в [Naumova et al., 2003]. Для разделения хромосомной ДНК использовали прибор CHEF-DR III (Bio-Rad, США). В качестве кариотипического стандарта использовали штамм *S. cerevisiae* YNN 295 (Рис. 2.4.), имеющий известный порядок и размеры хромосом. Использовали буфер, содержащий: 45 мМ Tris, 10 мМ ЭДТА, 45 мМ борная кислота, охлажденный до 14°C. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Генетическую идентификацию штамма Y-503 проводили, определяя фертильность гибридов исследуемых штаммов с тестовыми штаммами 6-ти известных биологических видов рода *Saccharomyces*, как рекомендовано [Naumov et al., 2000]. Для идентификации штаммов были использованы два стандартных гаплоидных генетических штамма *S. cerevisiae* противоположных типов спаривания: S288c (α *SUC2gal2*) и X2180-1A (*aSUC2gal2*). Через двое суток была проанализирована выживаемость спор

27 тетрад. Споруляцию полученных гибридных штаммов изучали в среде, содержащей 1%-ый CH_3COONa , 0,5%-ный KCl и 2%-ый агар-агар.

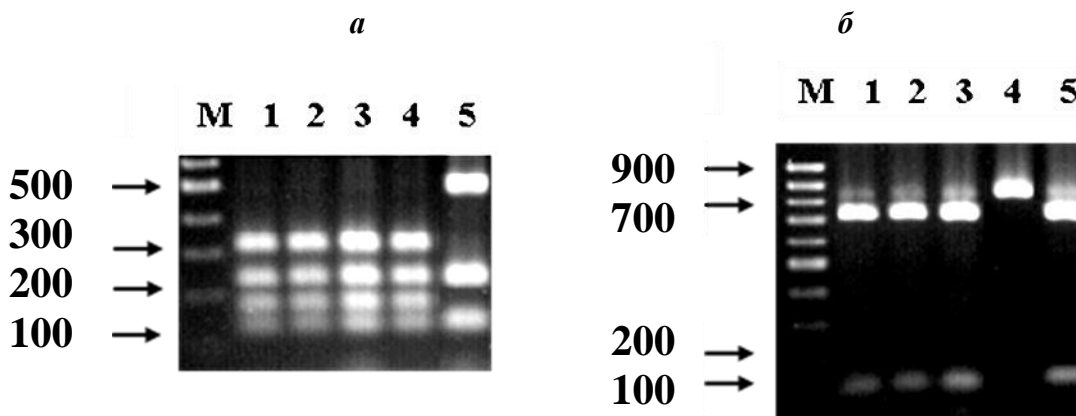


Рис. 2.4. Рестрикционный анализ амплифицированных 5.8S-ITS-фрагментов рДНК штаммов *Saccharomyces* с помощью эндонуклеаз *HaeIII* (А) и *HpaII* (В).

S. cerevisiae: 1 - Y-502, 2 – Y-503, 3 – Y-5030; 4 – *S. paradoxus* N17; 5 – *S. bayanus* МСУС 623. М – маркер молекулярных весов (п.н.) «100 bp DNA Ladder» («Fermentas», Литва)

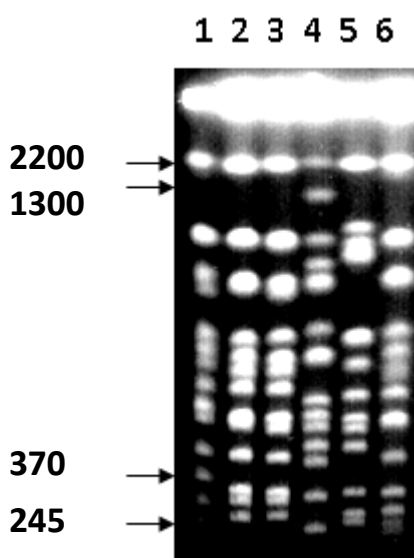


Рис. 2.5. Молекулярные кариотипы штаммов *Saccharomyces*. Дорожки: 1 – *S. cerevisiae* YNN 295; 2 – Y-502, 5 – Y-5030; 6 – Y-503; 3 – *S. paradoxus* N17, 4 – *S. bayanus* МСУС 623. Размеры хромосомных ДНК соответствовали стандартному штамму YNN 295.

Идентификация штамма методом ПЦР с использованием универсальных праймеров. Штамм Y-503 тестировали с помощью метода полимеразной цепной реакции в лаборатории генетики эукариот ПИЯФ РАН, как описано в [Bulat et al., 1998] с использованием универсальных праймеров:

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

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

Для определения молекулярно-генетических характеристик штаммов *S. cerevisiae* провели тестирование типа их спаривания методом половой агглютинации с клетками тестовых штаммов. Данный тест проводили, как описано [Sherman et al., 1986] с использованием в качестве половых партнеров клеток штаммов YBS817 (а *ura3*) и YBS24 (α *ura3*) (штаммы получены от С.В. Беневоленского (ГосНИИ Генетика НИЦ Курчатовский институт); анализ споруляционных свойств штаммов проводили, как описано [Sherman et al., 1986]. Определение удельного содержания хромосомной ДНК штамма Y-503, а также YBS618 (гаплоидный контроль), процедуры, связанные с разрушением клеток, выделением и очисткой суммарной клеточной ДНК, проводили, как описано в [Hoffman and Winston, 1987].

2.19. Представление результатов

Как было показано в контрольных опытах, величина скорости окисления субстратов митохондриями печени крысы или клетками дрожжей стабилизировалась в течение 1-3 мин и оставалась неизменной в течение 30 мин. Это позволило получить зависимости этих скоростей от концентраций эффектора в одной оксиграмме, последовательно добавляя аликвоты эффектора. Поэтому разброс значений указан не на графиках, описывающих результаты преобразования оксиграммы, а для концентраций субстратов или эффекторов, полученных в независимых экспериментах. Для относительной активации v_4 митохондрий ($v_{+\text{эффектор}}/v_4$), а также величин I_{50} , K_i , K_M или V_{\max} разброс значений указан в тексте. Для α,ω -алкилендималонатов (опыты с митохондриями печени крысы) и прототонофоров (опыты с клетками дрожжей) каждую константу определяли не менее, чем в 3-х независимых экспериментах. При изучении дрожжей и выделенных из них митохондрий из скорости окисления экзогенных субстратов (v) вычитали величину эндогенного дыхания (v_e). Она оставалась неизменной в течение всего времени эксперимента.

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

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

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли в соответствии с общепринятыми алгоритмами.

ГЛАВА 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 набухали, их внешняя мембрана могла повредиться, и митохондрии могли стать митопластами (лишенными внешней мембраны). В контрольных опытах было показано (Рис. 3.1.), что протонфор SF существенно активировал скорость окисления сукцината митохондриями, и активность сукцинатоксидазной системы на 90% ингибировалась 2,2-дигексилмалонатом при сохранении линейности (однофазности) в координатах Диксона, что свидетельствовало о том, что доля митохондрий с неповрежденной внутренней мембраной составляет около 88 % препарата.

Ранее было показано, что дикарбоксилатный транспортер (ДКТ) и сукцинатдегидрогеназа митохондрий печени крысы радикально (на 6 порядков) отличались по чувствительности к 2,2-дигексилмалонату [Шольц и др., 1990; Бондаренко и др., 1996]. Это подтверждалось тем, что доля нечувствительной к 2,2-дигексилмалонату системы окисления сукцината увеличивалась в субмитохондриальных частицах (СМЧ), полученных в результате обработки митопластов ультразвуком (результат получен в соавторстве с Д.В. Мамаевым [Aliverdieva et al., 2012]).

На Рис. 3.1. показано, что за 14 мин действия на митохондрии валиномицина в максимально активирующей концентрации (3 нМ), эта доля возрастала незначительно. Так как максимальный эффект индукторов проницаемости (в том числе, пороформеров) в наших опытах измеряли не дольше 3 мин, то примесь «дефектных» митопластов пренебрегали.

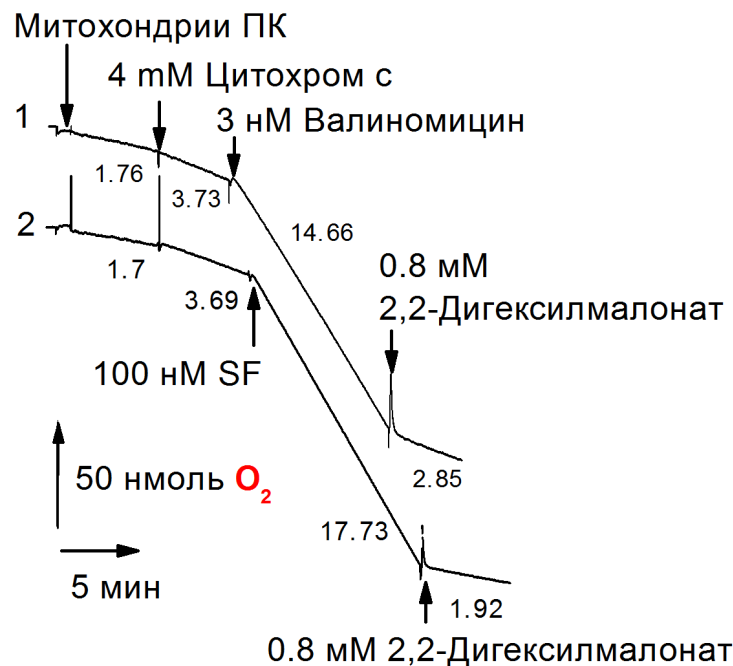


Рис. 3.1. Активация v_4 митохондрий печени крысы валиномицином (1) или протонофором SF (2). Цифры при оксиграммах – скорости окисления в нмоль O₂/мин. Среда инкубации содержала 125 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 10 мМ KH₂PO₄, 10 мМ сукцинат Na, ротенон (2 мкг/мг белка), 20 мМ Tris-HCl (pH 7,2), митохондрии (0,25 мг белка/мл) и дополнительно 4 мкМ цитохром с (1).

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

При измерении калиевого трансмембранного тока в митохондриях печени крысы использовали валиномицин, который имеет простой механизм индукции калиевого тока [Овчинников и др., 1974]. Согласно данным литературы, при избытке K⁺ калиевый трансмембранный ток пропорционален концентрации пептида в мембране [Naumowicz et al., 2006], и благодаря высокому коэффициенту распределения (K_p) пептида между средой и митохондриями ($(1,25 \pm 0,2) \times 10^5$ [Шольц и др., 1985]) – общей концентрации пептида в системе. На Рис. 3.2a. представлена зависимость относительной скорости активации v_4 митохондрий печени крысы от концентрации валиномицина в присутствии разных концентраций

K^+ в среде инкубации. Зависимость этих скоростей от концентрации пептида получали в одной оксиграмме, последовательно добавляя его. Эта скорость была стабильна в течение 2-16 мин. Стационарную активацию v_4 измеряли при стабильном значении $\Delta\psi$ (Рис. 3.2б.).

Способность валиномицина активировать v_4 митохондрий печени крысы была показана в среде инкубации, содержащей 125 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 10 мМ KН₂PO₄, 10 мМ сукцинат Na, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 20 мМ Tris-HCl (pH 7,2), митохондрии (0,25 мг белка/мл). Содержание в этой среде инкубации 6 мМ Mg²⁺ приводило к подавлению активности эндогенных транспортеров K^+ в митохондриях [Belosludtsev et al., 2006; O' Rourke, 2007; Szewczyk et al., 2009].

При измерении величины мембранного потенциала в присутствии валиномицина и пороформеров мы отказались от использования сафранина, поскольку он влиял на действие исследуемых пороформеров (возможно, взаимодействуя с ними). В отдельных опытах нами было также показано, что бутиловый эфир родамина 19 в низких неразобшающих концентрациях увеличивал разобшающую активность жирных кислот и способствовал открытию неспецифической Ca²⁺/Pi-зависимой поры. Использовали родамин 123 как рекомендовано [Emaus et al., 1986; Scaduto and Grotyohann, 1999], который был лишен этих недостатков. Согласно данным, приведенным на Рис. 3.2а., активация v_4 валиномицином была пропорциональна его концентрации. Стационарную активацию v_4 валиномицином измеряли при стабильном значении $\Delta\psi$. Линейный характер зависимости степени активации v_4 валиномицином от его концентрации сохранялся и при титровании митохондрий печени крысы валиномицином в одной кривой во всех использованных нами средах инкубации, содержащих K^+ . Поэтому можно утверждать, что в каждом отдельно взятом опыте препарат митохондрий имел пропорциональный концентрации валиномицина параметр – степень активации v_4 пептидом.

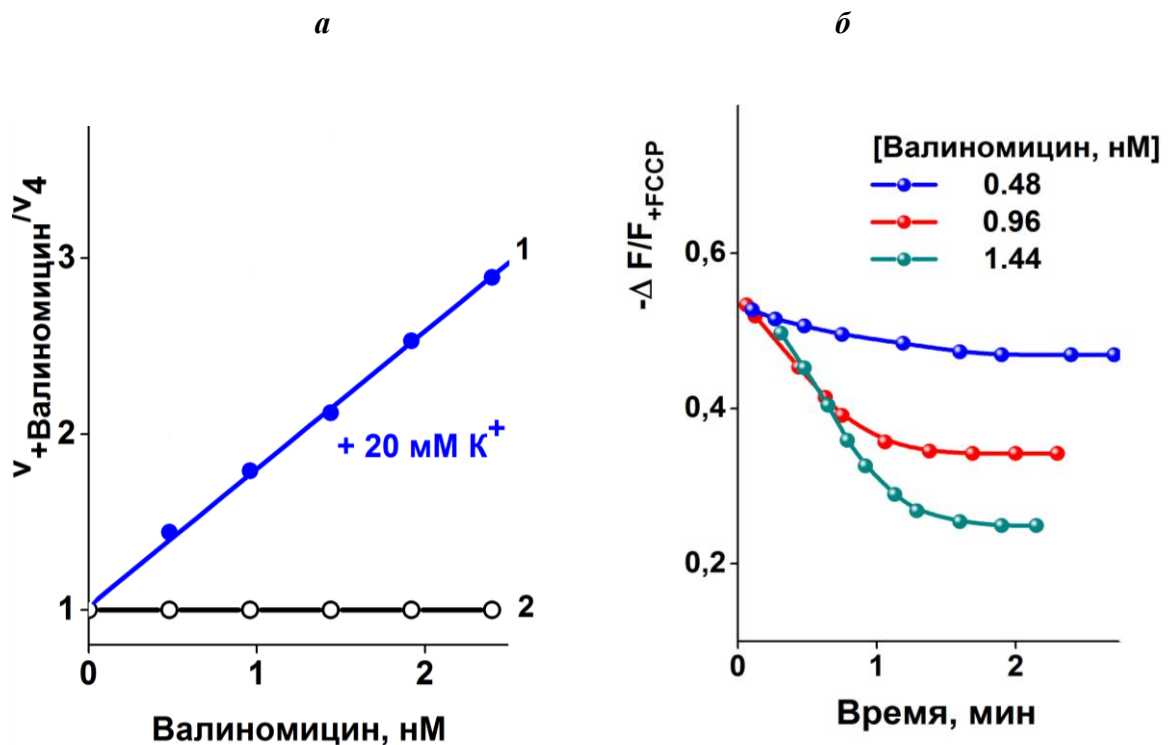


Рис. 3.2. Активация v_4 митохондрий печени крысы валиномицином (а). Влияние различных концентраций валиномицина на величину мембранного потенциала, генерируемого митохондриями печени крысы (б). Среда инкубации (а) содержала: 209 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 1 мМ KН₂PO₄, 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 30 мМ Tris-HCl, pH 7,2 (кривая 1) или не содержала 20 мМ KCl (кривая 2), и митохондрии (0,25 мг белка/мл). Среда инкубации (б), как на рис. (а, кривая 1), но была дополнена 0,4 мкМ родамином 123.

Необходимо отметить, что в разных средах менялся угол наклона зависимости к оси абсцисс, величины v_4 и дыхательного контроля препарата митохондрий печени крысы, но линейный характер зависимости сохранялся всегда (данные не приведены). Так как содержание усредненного липида в митохондриях печени крысы составляет 250 нмоль/мг белка митохондрий [Lenton et al., 1995], то молярное соотношение валиномицин/липид в наших опытах (Рис. 3.1. и 3.2.) варьировало от 1/625 до 1/125. Эти соотношения – меньше нижней границы (1/100), определяющей существенное влияние

пептида на структуру бислоя и на порядок ниже, чем соотношение, влияющее на спектр цитохромоксидазы [Steverding and Kadenbach, 1990].

Принималось, что коэффициент пропорциональности между током и концентрацией валиномицина одинаков для фиксированной величины $\Delta\psi$ и зависит от диффузионных характеристик комплекса валиномицина с K^+ в данной мембране и концентрации проникающего аниона (фосфата), которую мы варьировали в разных средах инкубации. Величина относительной флуоресценции родамина 123, пропорциональная $\Delta\psi$, менялась после добавления той или иной концентрации валиномицина (Рис. 3.2б.), но остальные свойства системы (среда, концентрация митохондрий, свойства митохондрий) были неизменны. Согласно Рис. 3.2а., препарат органелл имел пропорциональный концентрации валиномицина параметр – относительную активацию пептидом v_4 . Было высказано предположение, что и величина калиевого трансмембранного тока пропорциональна этой активации и эта пропорциональность не зависит от природы индуктора трансмембранного тока.

Для проверки этого предположения определили концентрационный порядок реакции, лимитирующей калиевый ток, индуцированный мелиттином. На Рис. 3.3а. показано, что относительная активация v_4 митохондрий мелиттином стабилизировалась на 5 – 6 мин, синхронно стабилизировалась и величина $\Delta\psi$ (Рис. 3.3б.). При этом степень активация v_4 менялась с изменением концентрации пептида более радикально, чем величина равновесного потенциала.

Если принять, что относительная активация v_4 митохондрий пропорциональна величине калиевого трансмембранного тока, и мелиттин не имел побочных действий на митохондрии печени крысы, то концентрационный порядок реакции, лимитирующий v_4 при действии пептида, должен быть близок к 2.

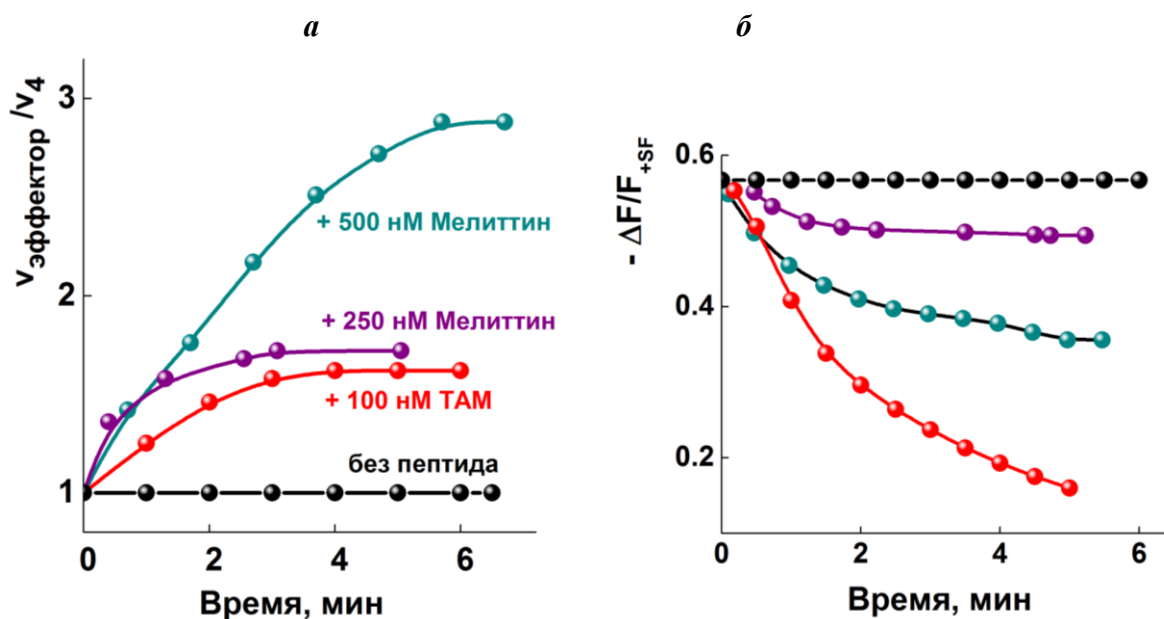


Рисунок 3.3. Активация v_4 митохондрий митохондрий печени крысы 250, 500 нМ мелиттином и 100 нМ ТАМ (а). Влияние мелиттина и ТАМ на величину мембранного потенциала, генерируемого митохондриями печени крысы (б). Среда инкубации (а) содержала: 176 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 10 мМ KН₂PO₄, 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 10 мМ HEPES (pH 7,5) и митохондрии (0,25 мг белка/мл). Среда инкубации (б) содержала 194 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 1 мМ KН₂PO₄, 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 10 мМ HEPES (pH 7,5), 0,4 мкМ родамин 123 и митохондрии (0,25 мг белка/мл).

Именно такая величина порядка реакции была определена в модельной системе прямым методом по скорости вызванного пептидом выхода из липосом репортерного красителя [Takei et al, 1999].

Концентрационный порядок активации v_4 митохондрий печени крысы мелиттином составил 2,16 (среднее – 2,01±0,15) (Рис. 3.4.) (измерения проводили в условиях, исключающих индукцию иных эндогенных проводимостей [Belosludtsev et al., 2006; O'Rourke et al., 2007; Szewczyk et al., 2009]).

Благодаря высокому значению K_p для мелиттина [Шольц и др., 1980] весь пептид, вероятно, связан с внутренней мембраной органелл,

содержащей большую часть их липида. По сравнению с мелиттином, величина $\Delta\psi$ в зоне стационарной активации дыхания (3,5 – 6 мин)

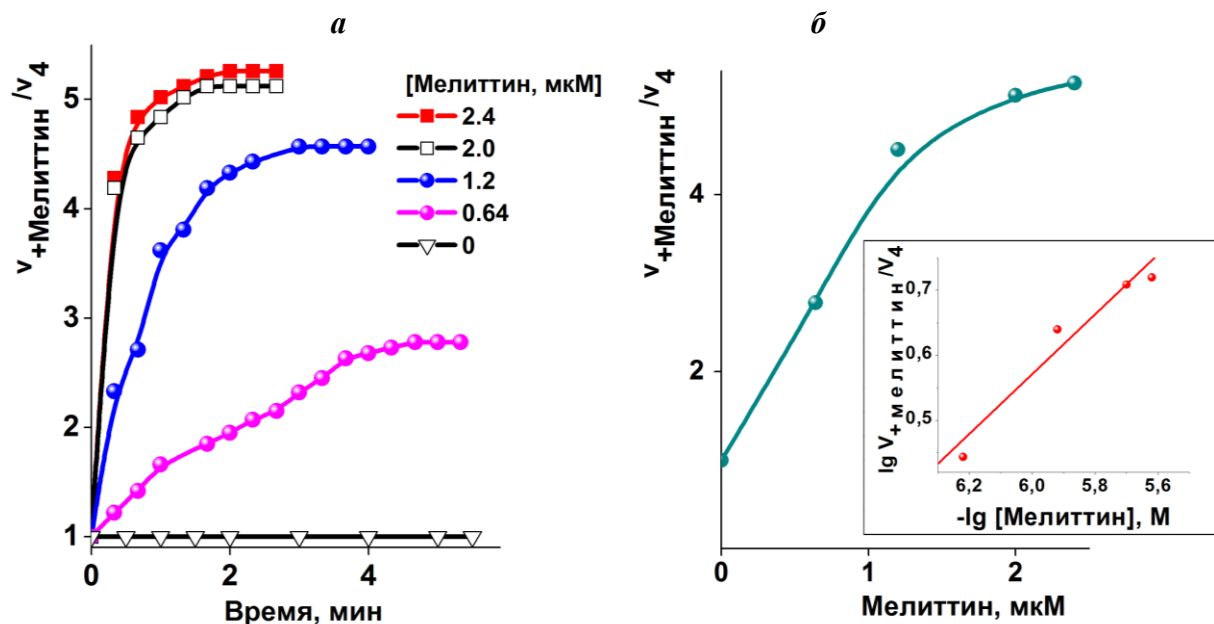


Рис. 3.4. Активации v_4 митохондрий печени крысы в присутствии различных концентраций мелиттина (а). Зависимость максимальной активации v_4 от концентрации мелиттина (б). Среда инкубации содержала: 176 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 10 мМ KH₂PO₄, 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 10 мМ HEPES (pH 7,5) и митохондрии (0,25 мг белка/мл).

тетраацетилмелиттина (ТАМ) при этом монотонно уменьшалась (Рис. 3.3б.). 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]). По-видимому, катионный трансмембранный ток, индуцированный ТАМ, в отличие от нативного пептида, не лимитировался скоростью образования димерной предпоры [Sengupta et al., 2008; Klocek et al., 2009].

Линейная зависимость активации v_4 от концентрации валиномицина, полученная в той же среде, была использована как быстрый тест на пропорциональность активации v_4 митохондрий печени крысы и калиевого трансмембранного тока в средах инкубации митохондрий, содержащих

калий. Такой характер зависимости сохранялся вплоть до 4-х кратной активации v_4 от концентрации валиномицина во всех используемых нами средах инкубации. Таким образом, препарат митохондрий печени крысы и оксиметр можно использовать как биосенсор калиевого трансмембранного тока, индуцированного пороформерами во внутренней мембране органелл.

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

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

Суммарная активность сукцинатоксидазной системы митохондрий может определяться в разных условиях как скоростью переноса сукцината через мембрану посредством ДКТ, так и активностями сукцинатдегидрогеназного комплекса и убихинолоксидазной системы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) (Введение и Рис. 1.3.).

Лимитирование сукцинатоксидажной системы митохондрий ДКТ показали двумя независимыми способами. Специфический ингибитор 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 сукцинатоксидажной системы, и лимитирующим звеном в ней становилась убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза [Шольц и др., 1985], которая демонстрировала отклонение от линейной зависимости для бутилмалоната – специфического ингибитора ДКТ, в присутствии экзогенного цитохрома с линейность восстанавливалась [Мамаев, Аливердиева и др., 2006] и становилась такой же, как у интактных

митохондрий. Это означало, что в присутствии ингибитора транспортер продолжал быть лимитирующим звеном стстемы окисления сукцината.

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

В специальных опытах было показано, что активность сопряженной системы окисления сукцината митохондрий существенно превышала активность транспортера. Степень ингибирования О-ацил-L-малатами значительно снижалась при пермеабиллизации митохондрий пороформером грамицидином S [Мамаев, Аливердиева и др., 2006]. Грамицидин S в концентрациях ниже литической индуцировал проницаемость бактериальной мембраны для крупных ионов [Капрельянц и др., 1977]. В наших условиях используемая концентрация грамицидина S была ниже литической более чем на порядок [Мамаев, Аливердиева и др., 2006]. Полученный результат связывали с появлением проницаемости для сукцината, не зависящей от дикарбоксилатного транспортера. Присутствующий в среде разобшитель предотвращал вызванное грамицидином S набухание митохондрий, а сукцинат обеспечивал ненасыщенность по субстрату ДКТ ($K_M = 1,17$ мМ [Palmieri et al., 1971; Passarella and Quagliariello, 1976], но не сукцинатдегидрогеназы ($K_M = 0,1$ мМ [Шольц и др., 1990])). Таким образом,

ЭСС митохондрий печени крысы имела два признака хорошей сопряженной системы для измерения трансмембранного транспорта сукцината: на порядок меньшую величину K_M транспортера и активность электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) большую, чем измеряемая с ее помощью транспортная [Мамаев, Аливердиева и др., 2006].

При изучении влияния эффекторов на транспорт сукцината проверяли отсутствие их побочного действия на компоненты ЭСС. Известно, что все 2-моно- и 2,2-диалкилмалонаты ингибировали сукцинатдегидрогеназу более чем на порядок эффективнее, чем ДКТ [Шольц и др., 1990]. Было показано, что О-ацил-L-малаты или не проникали в матрикс митохондрий к сукцинатдегидрогеназе (активный центр которого экспонирован в матрикс митохондрий), или действовали на нее слабее, чем на ДКТ (результат получен в соавторстве с Д.В. Мамаевым [Мамаев, Аливердиева и др., 2006]). В настоящей работе во всех проведенных опытах для каждого эффектора (ингибитора) проверяли отсутствие его влияния на убихинол-цитохром с-оксидоредуктазу и на сукцинатдегидрогеназу (Материалы и методы исследования, 2.5.3. и 2.5.4.). Все ингибиторы (амфифильные соединения), использованные в наших исследованиях, проведенных на митохондриях печени крысы, являлись слабыми протонофорами. Величина A_{200} (концентрация пептида, активирующая v_4 на 200%) значительно превышала I_{50} конкурентного ингибирования системы окисления сукцината этих митохондрий, т.е. в зоне ингибирования использованные амфифильные соединения не проникали в митохондрии и действовали на ДКТ митохондрий только с цитоплазматической стороны. Непроницаемость плазмалеммы дрожжей для использованных ингибиторов транспорта дикарбоксилатов показали в специальных опытах (раздел 3.2.2.).

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

3.2.2.1. Подбор условий для измерения низкой скорости окисления сукцината клетками *S. cerevisiae*

Сукцинатоксидазная ферментативная система клеток состояла из предполагаемого переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы, ДКТ митохондрий, сукцинатдегидрогеназного и убихинол-цитохром с-оксидоредуктазного комплексов ЭТЦ (Обзор литературы, раздел 1.2., Рис. 1.4.). Однако такие клетки имели высокий уровень эндогенного (фонового) дыхания (v_e).

Клетки тетраплоидного штамма *S. cerevisiae* Y-503 выращивали при низких концентрациях глюкозы, вплоть до полного ее исчерпания, т.е. в отсутствие так называемой глюкозной репрессии, блокирующей функционирование митохондриальной системы окислительного фосфорилирования (Рис. 2.1.).

На первом этапе исследований были подобраны условия для измерения транспорта дикарбоновых кислот (сукцинат и малат) через плазмалемму дрожжевой клетки, когда диффузия протонированной, т.е. незаряженной формы дикарбоксилатов практически отсутствовала (значения pH 5,5 и выше). Основная трудность измерения скорости окисления добавленного сукцината дрожжевыми клетками, выращенными при низкой концентрации глюкозы, была связана с высоким уровнем эндогенного (фонового) дыхания (v_e) клеток дрожжей (Рис. 3.5. и 3.6.), которое маскировало низкую скорость окисления сукцината клетками. Было показано, что при инкубации клеток при 0°C в аэробных условиях в течение 20 часов скорость эндогенного дыхания клеток снижалась (Рис. 3.5.). На Рис. 3.6. показана зависимость величины эндогенного дыхания клеток от времени аэробной преинкубации клеток при 0°C. При этом быстрая фаза дыхания через 5-7 мин сменялась медленной, которая стабилизировалась через 15 мин после начала измерения. Несмотря на то, что скорость окисления эндогенных субстратов существенно снижалась при описанной выше обработке клеток, ею нельзя было пренебречь при измерении дыхания

на сукцинате. Поэтому при проверке действия исследуемых эффекторов вычитали ее величину из измеряемой скорости окисления в присутствии сукцината. Эту приведенную скорость называли скоростью окисления сукцината. Сопоставимые скорости окисления сукцината в этих условиях получили для всех исследованных штаммов, в том числе, для S288с и Y-503.

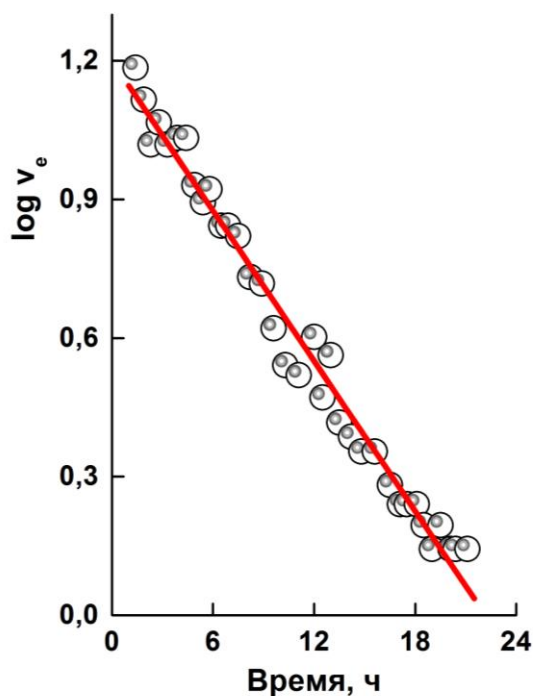


Рис. 3.5. Зависимость скорости эндогенного дыхания от времени инкубации клеток при 0°C. Среда инкубации содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5) и клетки 5 мг/мл.

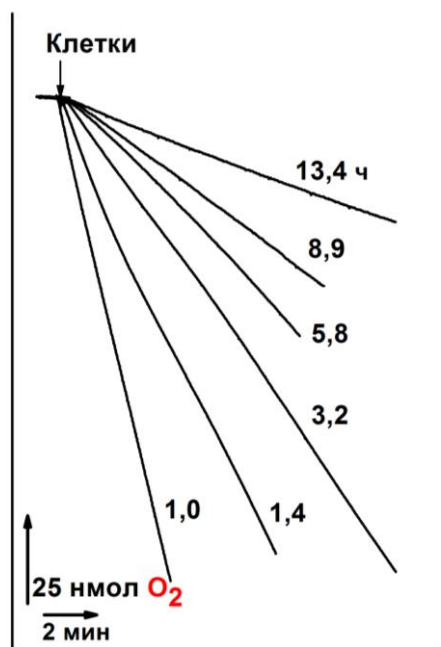


Рис. 3.6. Кинетика эндогенного дыхания клеток *S. cerevisiae*.

Потребление кислорода через 1,0 – 13,4 ч после перевода клеток из культуральной жидкости в среду инкубации при 0°C. Среда инкубации содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5) и клетки 5 мг/мл.

Важно, что скорость дыхания клеток в присутствии сукцината за вычетом скорости окисления эндогенных субстратов после преинкубации

клеток в течение 10 и более часов практически не менялась (Рис. 3.7а,б.). Это свидетельствовало о том, что снижение скорости дыхания не было связано с гибелью клеток в ходе преинкубации. При этом антимицин А (ингибитор убихинолоксидазной системы митохондрий) полностью подавлял дыхание таким образом обработанных клеток при добавлении сукцината, глюкозы и пирувата. Это свидетельствовало о том, что митохондриальные окислительные системы – единственный путь окисления этих субстратов в клетке в условиях наших опытов.

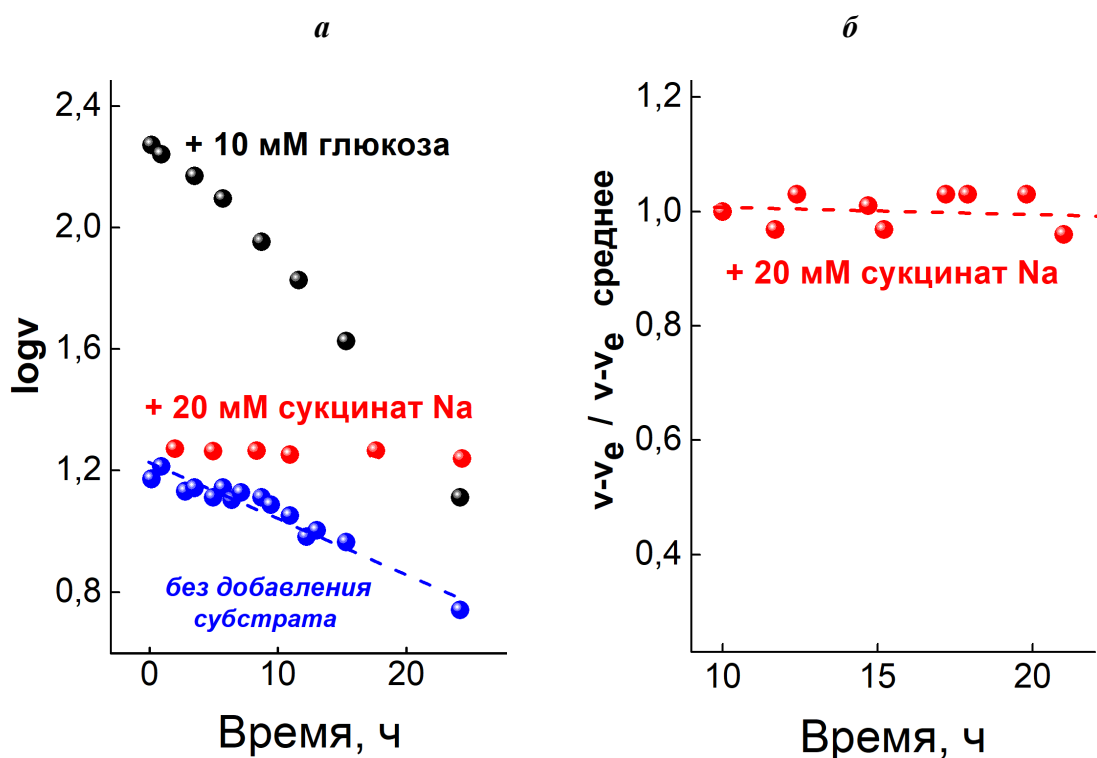


Рис. 3.7. Окисление клетками *S. cerevisiae* эндогенных субстратов (v_0), 10 мМ глюкозы и 20 мМ сукцината натрия при 30°C от времени аэробной преинкубации при 0°C (а). Окисление 20 мМ сукцината натрия в ходе аэробной преинкубации при 0°C (б). Среда инкубации содержала 50 мм калий - фосфатный буфер (рН 5,5), клетки 5 мг/мл.

3.2.2.2. 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 сопоставления результатов, полученных прямым и непрямым 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. 3.8.) скорость окисления пирувата Na была полностью активирована в присутствии 20 мМ субстрата, но была использована и 4 мМ концентрация для того, чтобы транспорт через плазмалемму лимитировал скорость его окисления.

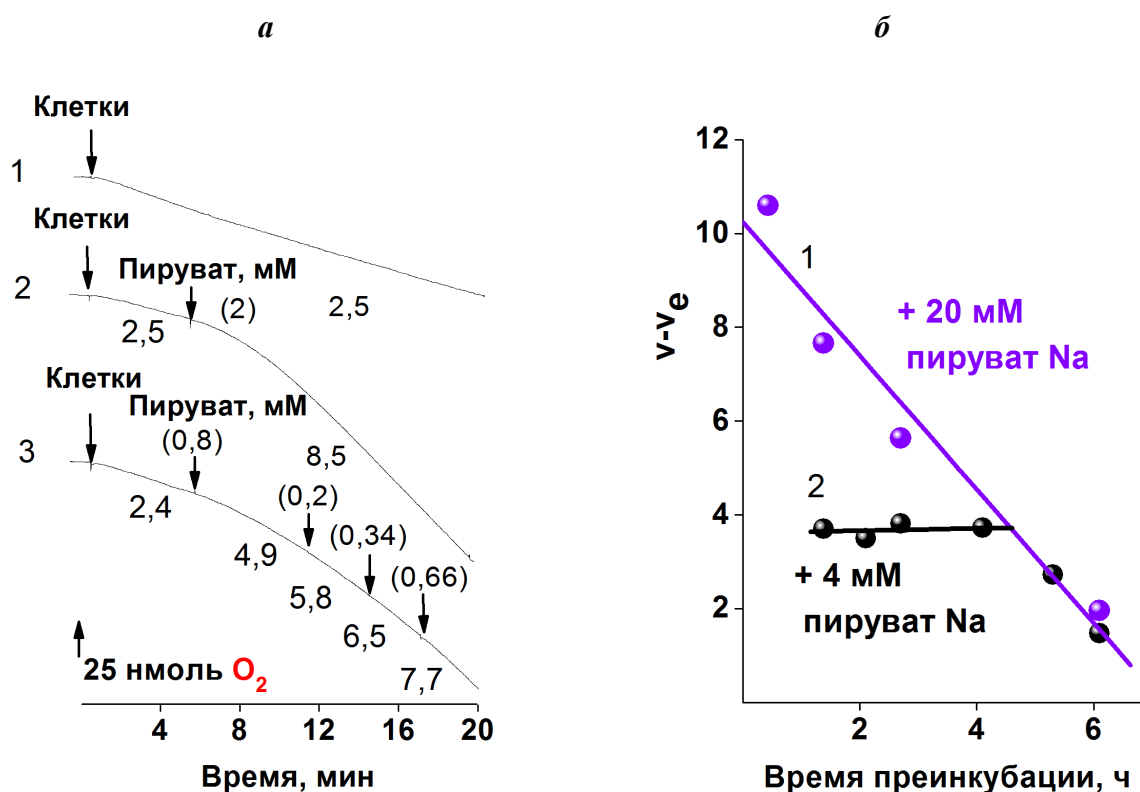


Рис. 3.8. Поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae* в отсутствие и в присутствии пирувата натрия (а). Окисление 4 мМ или 20 мМ пирувата натрия клетками *S. cerevisiae* в зависимости от времени их аэробной преинкубации при 0°C (б). Среда инкубации, содержащая 50 мм калий - фосфатный буфер (pH 5,5), была дополнена клетками (1,5 мг/мл). Цифры при оксиграммах – скорости окисления в нмоль O₂/мин. Время аэробной преинкубации клеток при 0°C 1,4, 2,1 и 2,7 ч (кривые 1, 2 и 3, соответственно).

В клетках штамма Y-503, выращенных на синтетической среде, в течение 12 ч при специальной подготовке дрожжей (дополнительный 0,1%-ный фосфат в инокуляте и быстрое охлаждение культуры перед концентрированием), скорость эндогенного дыхания (v_e) стабилизировалась уже через полтора часа (Рис. 3.8а., оксиграмма 1).

Время установления стационарной скорости в присутствии пирувата на составляло 6 мин, стабильная скорость сохранялась в течение 11 мин (Рис. 3.8а., оксиграмма 2). Это позволило измерить скорость дыхания в присутствии 4-х концентраций пирувата в одной оксиметрической кривой (Рис. 3.8а., оксиграмма 3). Начиная со второй добавки, стационарная скорость окисления пирувата стабилизировалась в течение 1,5 мин. Скорость пируватоксидазной системы в присутствии 4 мМ пирувата не зависела от времени преинкубации дрожжей в течение 4-х часов (Рис. 3.8б., плато на кривой 2). В то же время скорость с насыщающей концентрацией субстрата (20 мМ) неуклонно снижалась (Рис. 3.7., кривая 1).

Обработка оксиграммы 3 из Рис. 3.8а. приведена на Рис. 3.9. (кривая 2). Она позволила рассчитать $V_{max} = 25$ нмоль O_2 /мин и $K_M = 4,2$ мМ (среднее из трех опытов – $5,2 \pm 1,0$ мМ) для системы транспорта пирувата через плазмалемму дрожжей.

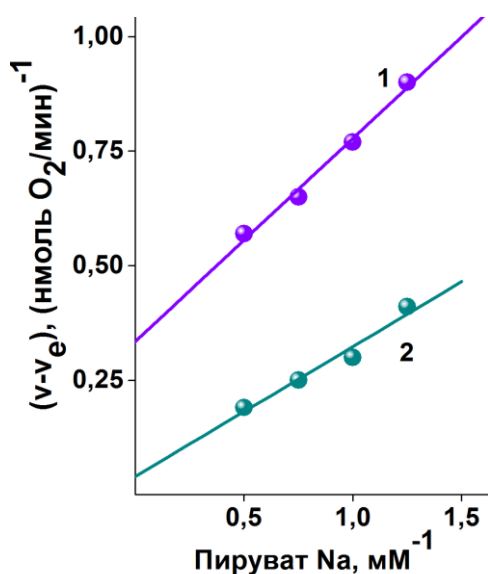


Рис. 3.9. Окисление пирувата натрия клетками *S. cerevisiae* в координатах Лайнуивера-Берка.

Время аэробной преинкубации клеток *S. cerevisiae* при 0°C – 6,1 ч (кривая 1) или 2,7 ч (кривая 2). Среда инкубации содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (pH 5,5), клетки – 1,5 мг/мл.

Эта величина близка к K_M , измеренной прямым методом для монокарбоксилатного H^+ -симпортера плазматической мембраны *S. cerevisiae*: $K_M = 5,6$ и $4,1$ мМ при рН 4,0 и 6,0, соответственно [Akita et al., 2000].

Аналогично на клетках после 6 ч преинкубации при 0°C рассчитанная величина K_M составляла $1,19 \pm 0,23$ мМ. Эта величина близка к величине K_M для монокарбоксилатного переносчика митохондрий (0,8 мМ [Nałecz et al., 1991]), измеренной прямым методом. Применение такого подхода к изученному прямым методом монокарбоксилатному транспортеру дрожжей *S. cerevisiae* [Akita et al., 2000] позволило получить кинетические параметры транспорта в клетку пирувата, близкие к полученным прямым методом. Мы применили этот подход к неисследованному ранее транспортеру сукцината плазмалеммы *S. cerevisiae*. Наш подход при изучении транспорта сукцината через плазмалемму дрожжевых клеток предполагает соблюдение нескольких условий: низкую и постоянную скорость эндогенного дыхания (v_e) клеток в ходе измерения, постоянство активности эндогенной оксидазной системы и постоянство скорости окисления субстрата в условиях лимитирования его переноса через плазмалемму. Применение такого подхода позволило получить кинетические параметры транспорта в клетку сукцината.

3.2.2.3. Измерение транспорта сукцината в клетки *S. cerevisiae*

В специальных экспериментах было показано, что пермеабиллизация мембран ДМСО не влияла на накопление клетками протонофора карбонилцианид(4-флюорометокси)фенилгидразона (FCCP) (известно, что протонофоры легко проникают в неповрежденные клетки [Beauvoit et al., 1991]), но существенно увеличивала стационарное накопление ингибитора О-пальмитоил-L-малата, который, по-видимому, не проникал в неповрежденную клетку. Для проверки этого предположения был разработан метод определения доли доступной для этого амфифильного

соединения мембранной фазы клеток [Бондаренко, Аливердиева и др., 2004]. При разработке совместно с коллегами этого метода было показано, что доля доступной липофильной фазы клеток дрожжей (β_a/β_0) для О-пальмитоил-L-малата была значительно меньше единицы. Для сравнения были получены данные для протонофора FCCP. Как следует из данных Таблицы 3.1., соотношение β_a/β_0 для протонофора FCCP в тех же условиях составляло величину, близкую к единице (1,013). Это означало, что данное соединение быстро приникало в клетку, то есть, по крайней мере, за 2 мин вся липофильная фаза становилась доступной для него. Пермеабиллизация не повлияла на накопление клетками протонофора FCCP, поскольку этот протонофор свободно распределяется и по мембранам неповрежденной клетки [Beauvoit et al., 1991].

Таблица 3.1. Определение доли доступной липофильной фазы (β_a/β_0) клеток *S. cerevisiae* для протонофора FCCP (12,5 мкМ).

Соединение	Клетки (мг/мл)	ОП ₀ ''	ОП ₀ '	ОП _w ''	ОП _w '	β_a/β_0
FCCP, ОП ³⁵⁷ , относительно линии 303 - 450 нм	25,0	0,2	0,218	0,130	0,140	1,012
	25,0	0,2	0,2	0,148	0,15	1,014
	Среднее:					1,013
О-Пальмитоил-L-малат, ОП ⁶⁵⁰	Среднее:					0,362*

β_a/β_0 – постоянно в течение 2 – 20 мин

Примечание. Доля доступной для протонофора липофильной фазы клеток *S. cerevisiae* $\beta_a/\beta_0 = (\text{ОП}'_0/\text{ОП}'_w - 1)/(\text{ОП}''_0/\text{ОП}''_w - 1)$, где β_0 и β_a – приведенный объем общей и доступной для соединения липофильной фазы клеток (в мл/мг), ОП₀' и ОП_w' – исходные значения оптического поглощения среды инкубации в присутствии соединения; ОП₀''/ОП_w'' – то же в присутствии пермеабиллизованных ДМСО клеток. Среда инкубации клеток содержала 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 5,5) и клетки *S. cerevisiae*.

* Бондаренко, Аливердиева и др., 2004.

В условиях наших опытов в течение 2 мин О-пальмитоил-L-малат не проникал в неповрежденные клетки. Пермеабиллизация клеток привела к увеличению вдвое накопления в клетках ингибитора. При увеличении времени выдержки клеток с О-пальмитоил-L-малатом с 2 до 20 мин величина β_a/β_0 практически не изменялась. По-видимому, эта величина является соотношением доступного из среды объема внешнего лепестка плазматической мембраны клетки к общему объему ее лиофильной фазы, так как ДМСО вызывает пермеабиллизацию не только плазматической мембраны клеток, но и мембран субклеточных структур.

Стабильные в течение длительного времени скорости эндогенного дыхания и окисления сукцината в отсутствие и в присутствии непроникающего ингибитора О-пальмитоил-L-малата (Рис. 3.10а., оксиграммы 1 и 2, соответственно) позволили рассчитать зависимости скоростей дыхания от концентраций субстрата и ингибитора на одной оксиграмме (Рис. 3.10б.).

В координатах Лайнуивера-Берка (Рис. 3.11) и Диксона (Рис.3.12.), они составили K_M (5,6 мМ), среднее значение из трех независимых опытов - $7,3 \pm 2,1$ мМ, V_{max} (4,17 нмол O_2 /мин) и I_{50} для О-пальмитоил-L-малата (37,3 мкМ). Время установления стационарной скорости после первой добавки сукцината составляло 4 мин, а при дальнейших добавках – 1,5 мин (Рис. 3.10.).

В отличие от традиционных прямых методов определения сродства к субстрату переносчиков дикарбоксилатов плазмалеммы разных видов дрожжей (например, [Cássio et al., 1993, Queiros et al., 1998]), зависимость для определения K_M получали в одной кривой всего за 30 мин. Линейная зависимость ингибирования сукцинатоксидазного комплекса клеток в координатах Диксона (Рис. 3.12.) свидетельствовала о его действии на лимитирующее звено ЭСС и о связывании ингибитора с ней в одной точке.

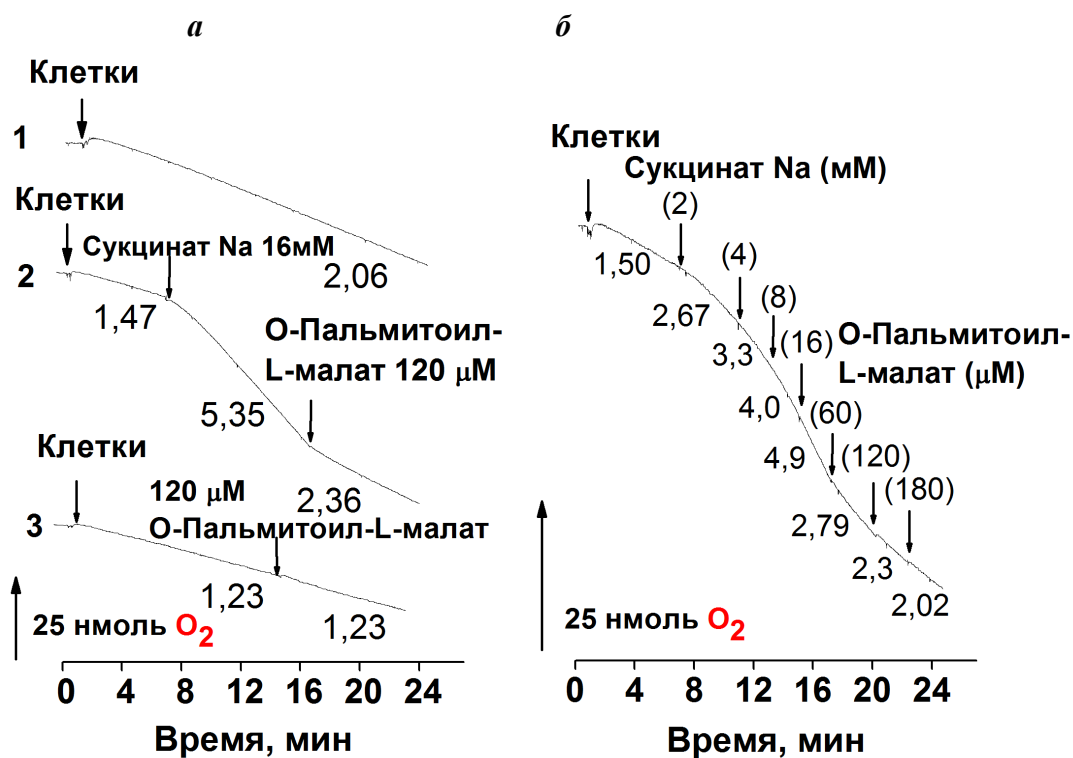


Рис. 3.10. Поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae*. в отсутствие эффекторов (кривая 1), в присутствии сукцината натрия и О-пальмитоил-L-малата (кривая 2) и в присутствии О-пальмитоил-L-малата (кривая 3) (а). Поглощение кислорода клетками *S. cerevisiae* при последовательном добавлении сукцината и О-пальмитоил-L-малата (б). Среда инкубации (а) содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5). Добавки: 16 мМ сукцинат натрия, 120 мкМ О-пальмитоил-L-малат, клетки (5 мг/мл). Время аэробной преинкубации клеток при 0°C – 18,5 ч. Среда инкубации (б) содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5). Добавки: 16 мМ сукцинат натрия, 120 мкМ О-пальмитоил-L-малат, клетки (5 мг/мл). Время аэробной преинкубации клеток при 0°C – 17,5, 18 и 20 ч (кривые 1, 2 и 3, соответственно). Цифры при оксиграммах – скорости окисления в нмоль O₂/мин.

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*, определяли скорость транспорта субстрата через плазмалемму и K_M транспортера.

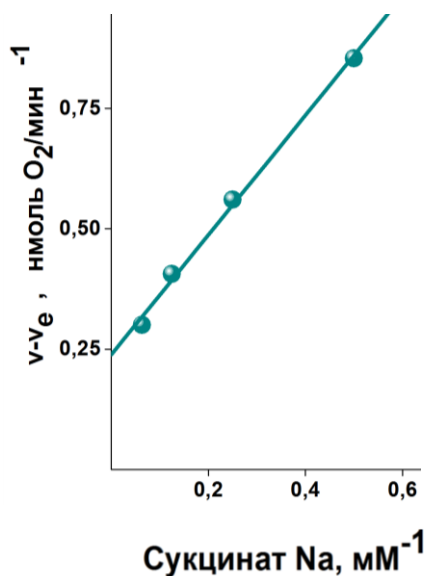


Рис. 3.11. Окисление сукцината натрия клетками *S. cerevisiae*, зависимость рассчитана по оксиграмме на Рис. 3.10б., координаты Лайнуивера-Берка. Среда инкубации содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), сукцинат натрия, клетки (5 мг/мл).

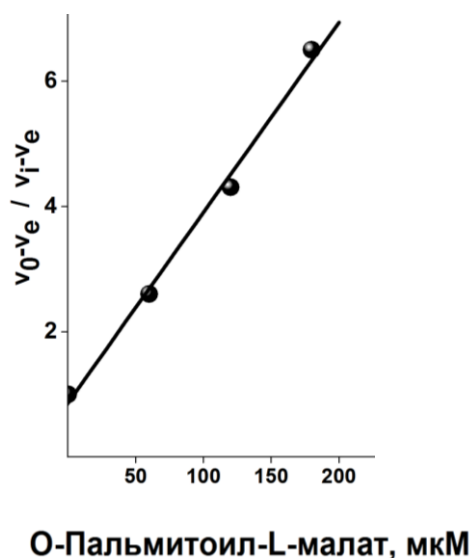


Рис. 3.12. Влияние О-пальмитоил-L-малата на окисление сукцината натрия клетками *S.cerevisiae*, зависимость рассчитана по оксиграмме на Рис. 3.10б., координаты Диксона. Среда инкубации содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), добавки: 16 мМ сукцинат натрия, клетки (5 мг/мл).

Линейный характер ингибирования в координатах Диксона и одинаковые величины K_M имели место во всех опытах, когда скорость окисления сукцината была максимальной и не зависела от дальнейшей преинкубации клеток при 0°C (плато на Рис. 3.7б.). При линейном характере ингибирования в координатах Диксона скорость окисления сукцината в клетками лимитирована транспортом через плазмалемму. Получение такой зависимости при каждом изменении условий подготовки и инкубации клеток необязательно. Это исключало трудоемкое получение зависимости активности сукцинатоксидазной активности клеток от времени

преинкубации в каждой серии опытов. Многочисленные опыты подтвердили, что скорость окисления сукцината лимитирована транспортом в каждой оксиметрической кривой (типичный результат на Рис. 3.10б., Рис. 3.11.).

Значение I_{50} для О-пальмитоил-L-малата линейно зависело от концентрации клеток в пробе (Рис. 3.13.). Ингибирующей концентрацией этого соединения конкурентного к гидрофильному субстрату (сукцинату) являлась его концентрация в среде, а не в мембране. Экстраполяция прямой на Рис. 3.14. к нулевой концентрации клеток позволила рассчитать величину K_i , равную 1,9 мкМ (среднее из трех опытов $3,1 \pm 1,2$).

Необходимо отметить, что воспроизводимость значений 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 клеток величина I_{50} не зависела от их концентрации.

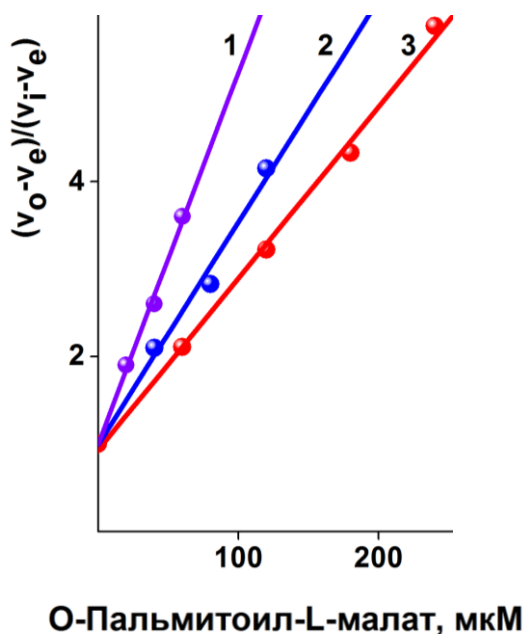


Рис. 3.13. Влияние О-пальмитоил-L-малата на скорость окисления сукцината натрия при разных концентрациях клеток *S. cerevisiae*. Среда инкубации – 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), добавки: 20 мМ сукцинат натрия, клетки (мг/мл): 5 (кривая 1), 10 (кривая 2), 15 (кривая 3).

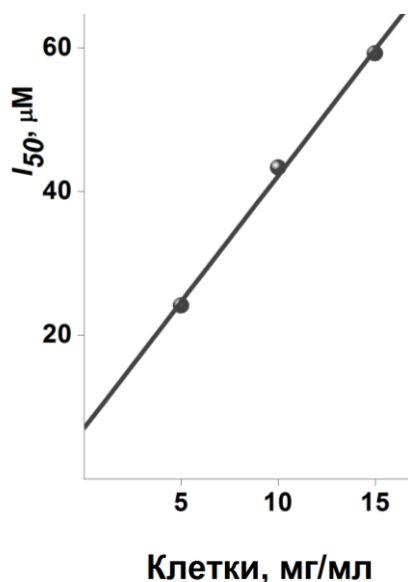


Рис. 3.14. Зависимость I_{50} О-пальмитоил-L-малата от концентрации клеток *S. cerevisiae*. Среда инкубации – 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), добавки: 20 мМ сукцинат натрия.

Таким образом, транспорт сукцината через плазмалемму является лимитирующим звеном системы окисления сукцината в клетках. Линейность ингибирования в координатах Диксона и одинаковые величины K_M имели место во всех опытах, когда сукциноксидазная ферментативная система была максимально активирована и не зависела от дальнейшей преинкубации клеток при 0°C (плато на Рис. 3.7б.). Можно утверждать, что ферментативная система окисления сукцината при линейности ингибирования в координатах Диксона лимитирована транспортом сукцината через плазмалемму.

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

Использование пермеабиллизации дрожжей для оценки способности амфифильного эффектора проникать в клетку занимает много времени. Мы предположили, что тестом на протонофорную активность эффектора в клетках *S. cerevisiae* и деэнергизацию плазмалеммы может быть ингибирование монокарбоксилатного H^+ - симпортера плазмалеммы [Akita et al., 2000], а, следовательно, пируватоксидазной системы клеток. 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 этого моносахарида через плазмалемму [van der Rest et al., 1995]. Протонофор FCCP активировал глюкозоксидазную систему клеток *S. cerevisiae* (Рис. 3.15а., кривая 1). Поскольку время установления стационарной скорости не превышало 1 мин, это свидетельствовало о быстром проникновении FCCP в клетку к митохондриям в условиях наших опытов.

Величина I_{50} ингибирования пируватоксидазной системы протонофором FCCP (Рис. 3.15а., кривая 3) была примерно в 5 раз ниже величины A_{50} (концентрация, вызывающая полумаксимальную активацию) активации им ферментативного пути окисления глюкозы (соответственно, 0,21 и 1,0 мкМ, см. Рис. 3.15а.). Сходное соотношение A_{50}/I_{50} (равное 4), получили для протонофора SF с другой химической структурой, т.е. подавление пируватоксидазной системы было связано именно с протонофорностью эффектора, а не иным ингибирующим действием. 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 в цитоплазму через плазмалемму, осуществляемый в симпорте с протоном [Cássio et al., 1993], 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 – активировал (Рис. 3.15а.). По-видимому, в отличие от пирувата, транспорт этого дикарбоксилата через плазматическую мембрану осуществлялся не в симпорте с протоном. Окисление сукцината дрожжевыми клетками, в отличие от окисления пирувата и глюкозы, почти полностью ингибировалось О-пальмитоил-L-малатом 3.15б.

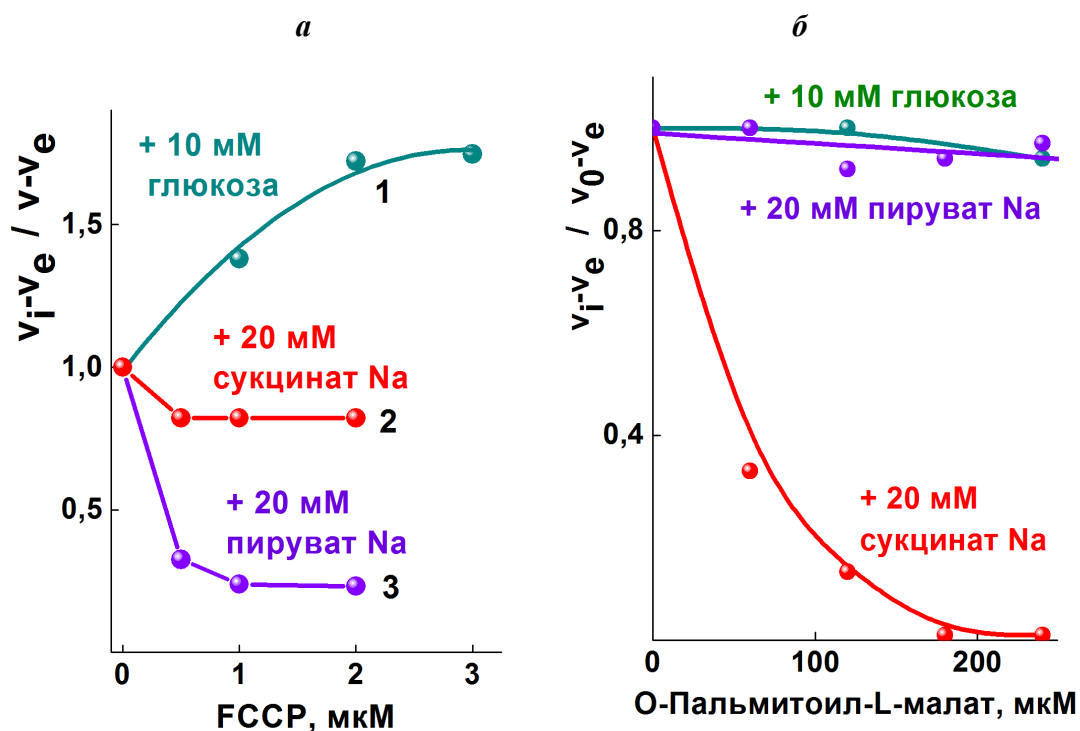


Рис. 3.15. Влияние протонофора FCCP на окисление клетками *S. cerevisiae* глюкозы, сукцината натрия или пирувата натрия (а). Влияние О-пальмитоил-L-малата на окисление клетками *S. cerevisiae* глюкозы, пирувата натрия или сукцината натрия (б). Среда инкубации (а) содержащая 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5) и клетки (10 мг/мл), была дополнена 10 мМ глюкозой, 20 мМ сукцинатом натрия или 20 мМ пируватом натрия. Клетки аэробно преинкубировали при 0°С – 10 - 14 ч. Субстрат добавляли после протонофора. Скорости окисления в присутствии FCCP, сукцината натрия, пирувата натрия и глюкозы стабилизировались соответственно через 3, 4, 10 и 2 мин после добавления эффектора. Время аэробной преинкубации клеток при 0°С – 10 - 14 ч. Среда инкубации (б), содержащая 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), клетки (5 мг/мл), была дополнена 10 мМ глюкозой, 20 мМ сукцинатом натрия или 20 мМ пируватом натрия. Клетки аэробно преинкубировали при 0°С в течение 10 - 14 ч.

При используемых концентрациях О-пальмитоил-L-малат (не проникающий в клетку) не ингибировал окисление пирувата (см. Рис. 3.15б.), и, следовательно, не был протонофором.

Окисление пирувата дрожжевыми клетками ингибировалось 2-ундецилмалонатом в концентрациях, существенно превышающих I_{99} этого ингибитора для окисления сукцината (Рис. 3.16а). Так как протонофорный

механизм FCCP связан с проницаемостью протонированной формы агента через мембрану, мы интерпретируем полученный результат, как неспособность вещества проникать в клетку при концентрациях, ингибирующих окисление сукцината. Доля протонированной 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. 3.16a.). В дальнейшем мы использовали этот ингибитор окисления сукцината, как агент, не проникающий в клетку при значениях pH выше 5,5.

Тестом на протонофорную активность эффекторов – амфифильных соединений – использованных нами ингибиторов транспорта в клетках *S. cerevisiae* и деэнергизацию ее плазмалеммы, может быть ингибирование монокарбоксилатного H^+ -симпортера плазматической мембраны [Akita et al., 2000], а, следовательно, пируватоксидазы клеток. Для изучения транспорта сукцината через плазмалемму использовали конкурентные ингибиторы – 2-алкилмалонаты и О-ацил-L-малаты. Их неспособность проникать в клетки в зоне концентраций, вызывающих 99% ингибирование окисления сукцината (I_{99}) клетками *S. cerevisiae* была проверена с помощью теста на их протонофорную активность. Отдельные результаты приведены на Рис. 3.16б. Ингибиторы были использованы в концентрациях, вызывающих максимальный эффект на окисление сукцината клетками. Было показано также, что 2-ундецилмалонат не влиял на пируватоксидазу клеток и был наиболее эффективным ингибитором сукцинатоксидазной системы, действие которого не зависило от количества дрожжевых клеток.

На Рис. 3.16a видно, что при полном ингибировании 2-ундецилмалонатом окисления сукцината клетками дрожжей пируватоксидазная система не ингибировалась ни при pH 5,5, ни при pH 6,5 (в концентрациях до 0,4 и 0,6 мМ, соответственно).

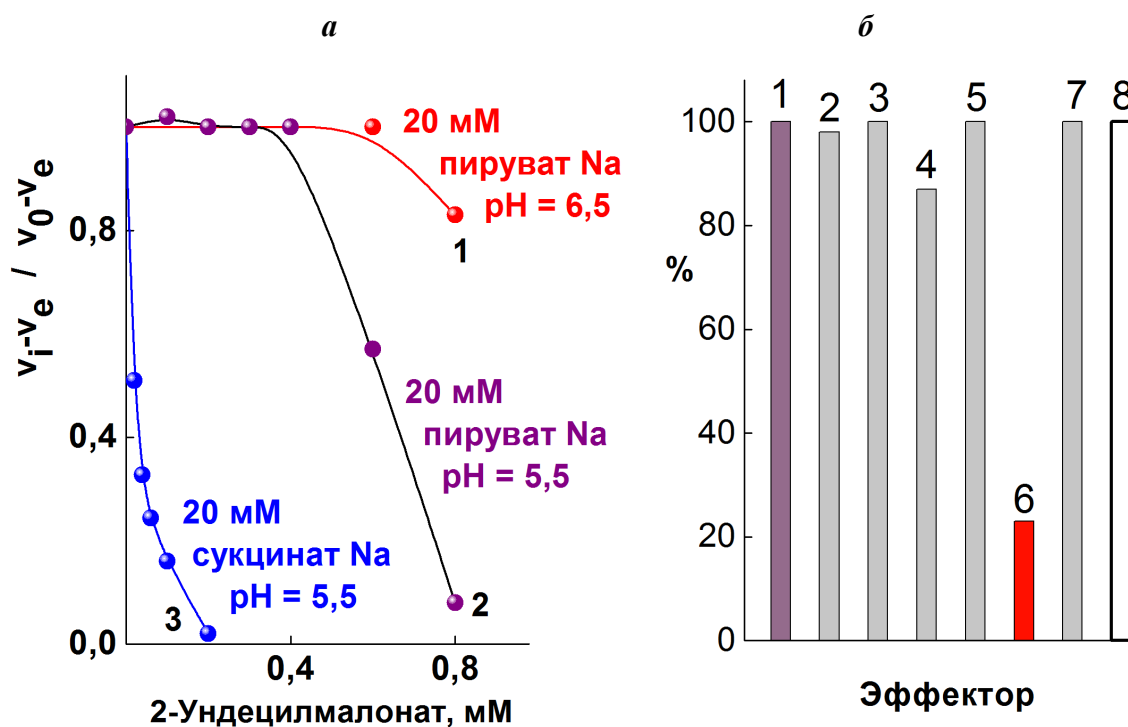


Рис. 3.16. Влияние 2-ундецилмалоната на окисление клетками *S. cerevisiae* пирувата натрия или сукцината натрия (а). Активность пируватоксидазной системы клеток в отсутствие эффектора (1) и в присутствии 8 мМ 2-пентилмалоната (2), 4 мкМ 2-пентадецилмалоната (3), 600 мкМ О-лауроил-Л-малата (4), 40 мкМ О-стеароил-Л-малата (5), 1 мкМ FCCP (6), 250 мкМ О-пальмитоил-Л-малата (7) и 200 мкМ 2-ундецилмалоната (8) (б).

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

Характерным действием протонифора на пируватоксидазу клеток *S. cerevisiae* было резкое снижение дыхательной активности при небольшом увеличении его концентрации (Рис. 3.16а., кривая 3), которое наступало при концентрациях 2-ундецилмалоната, существенно превышающих величину I_{99} (Рис. 3.16а.). В модельных опытах было показано [Evtodienko et al., 1999], что доля незаряженной протонированной формы 2-ундецилмалоната,

способной проникать через БЛМ, снижалась с увеличением значений pH от 5,5 до 6,5, что объясняет ингибирование пируватоксидазной системы при pH 6,5 вдвое большими концентрациями этого алкилмалоната.

Если ингибиторы транспорта сукцината через плазмалемму не проникали в клетку к митохондриям (Рис. 1.4.), то побочные действия этих ингибиторов на сопряженную систему должны гарантированно отсутствовать. Используя препараты митохондрий *S. cerevisiae*, мы получили дополнительное свидетельство того, что ингибиторы транспорта сукцината не проникали через плазмалемму клеток *S. cerevisiae*. О-Пальмитоил-L-малат и О-миристоил-L-малат подавляли окисление сукцината в митохондриях гораздо более эффективно, чем в клетках (Таблица 3.2.).

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

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

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

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

Известно, что мелиттин, мастопаран и ТАМ образуют крупноразмерные поры [Stankowski et al., 1991; Matsuzaki et al., 1997; Huang, 2006]. Для оценки размера пор, образуемых мастопараном, использовали способность митохондрий быть микроосмометром [Lehninger and Neubert, 1961]. Если в присутствии эффектора (пороформера) определенные молекулы инкубационной среды становились осмотически активными, то можно предполагать индукцию в мембране пор соответствующего диаметра. Ранее было показано, 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 [Шольц и др., 1983], то есть молекулы этих соединений приобретали благодаря мастопарану осмотическую активность. Следовательно, величина пор, образованных мастопараном, а также мелиттином и ТАМ (образующим крупноразмерные поры) не должна ограничивать подвижность ионов K^+ и Li^+ . Если бы индуцированная мелиттином проводимость определялась скоростью прохождения катионов через пору, то соотношение степеней активации v_4 в монокалиевой и монолитиевой средах было бы близко к соотношению чисел переноса этих катионов в растворе при 35 мМ концентрации катиона при 25°C (1,53), согласно справочным данным [Тимофеева и др., 2003]. Однако средние значения этого соотношения для мелиттина и мастопарана составляли соответственно 1,09 (среднее – $1,12 \pm 0,03$) (Рис. 3.17а.) и $1,18 \pm 0,02$ (Рис. 3.18а). Это свидетельствовало о том, что активацию v_4 (и катионного трансмембранного тока) мелиттином и мастопараном лимитировала стадия, предшествующая порообразованию. Для мелиттина на липосомах показано, что формирование поры лимитировано предпоровыми стадиями [Takei et al., 1999]. Для мастопарана такие данные в литературе отсутствуют.

Согласно Рис. 3.17б., среднее соотношение степеней активации v_4 в монокалиевой и монолитиевой средах для ТАМ составило 1,4 (среднее из

трех измерений – $1,39 \pm 0,01$). Это согласуется с данными [Stankowski et al., 1991] по оценке времени жизни канала.

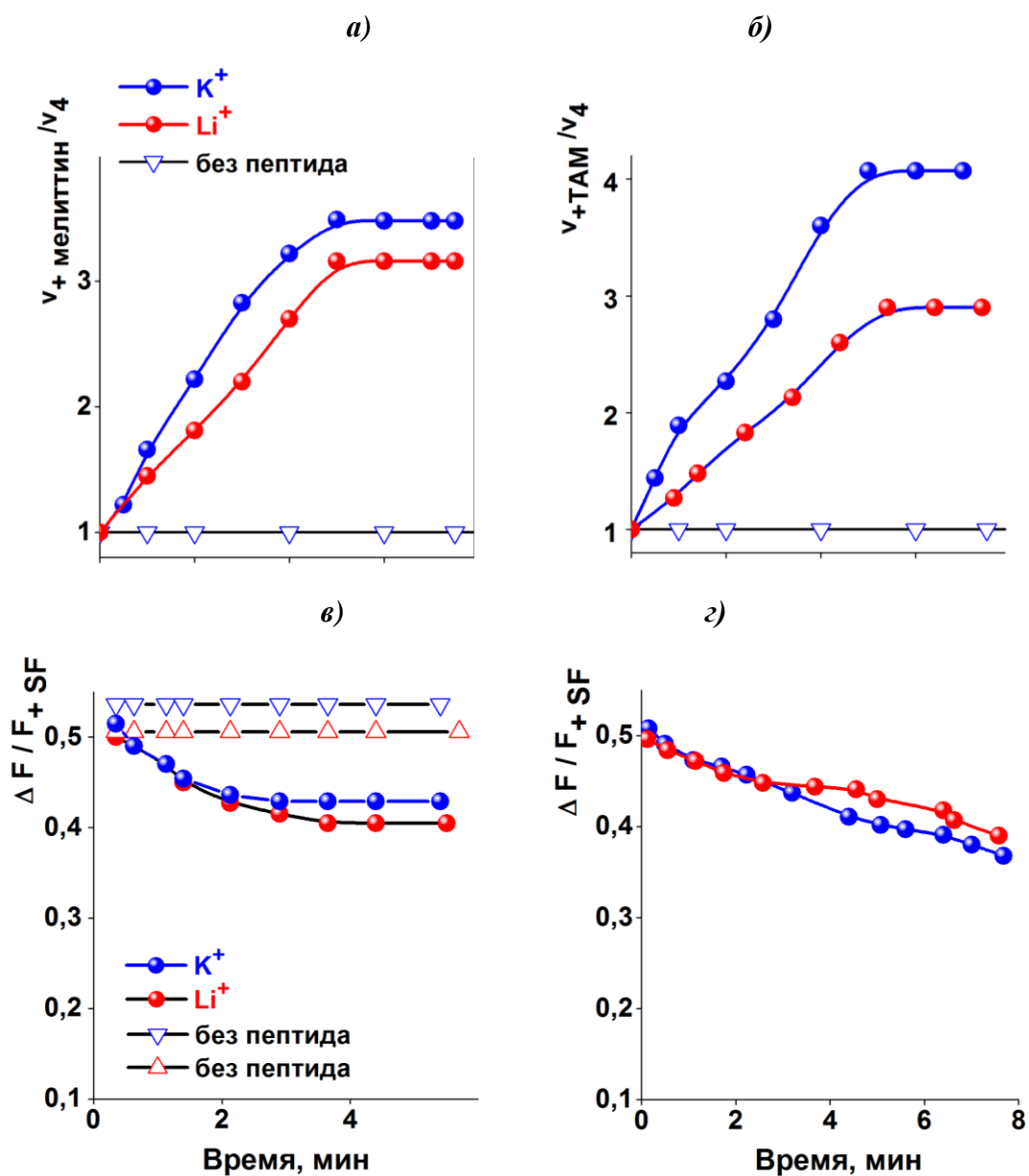


Рис. 3.17. Активация v_4 митохондрий печени крысы мелиттином (а) и ТАМ (б). Влияние мелиттина и ТАМ на величину мембранного потенциала, генерируемого митохондриями печени крысы (в, г).

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

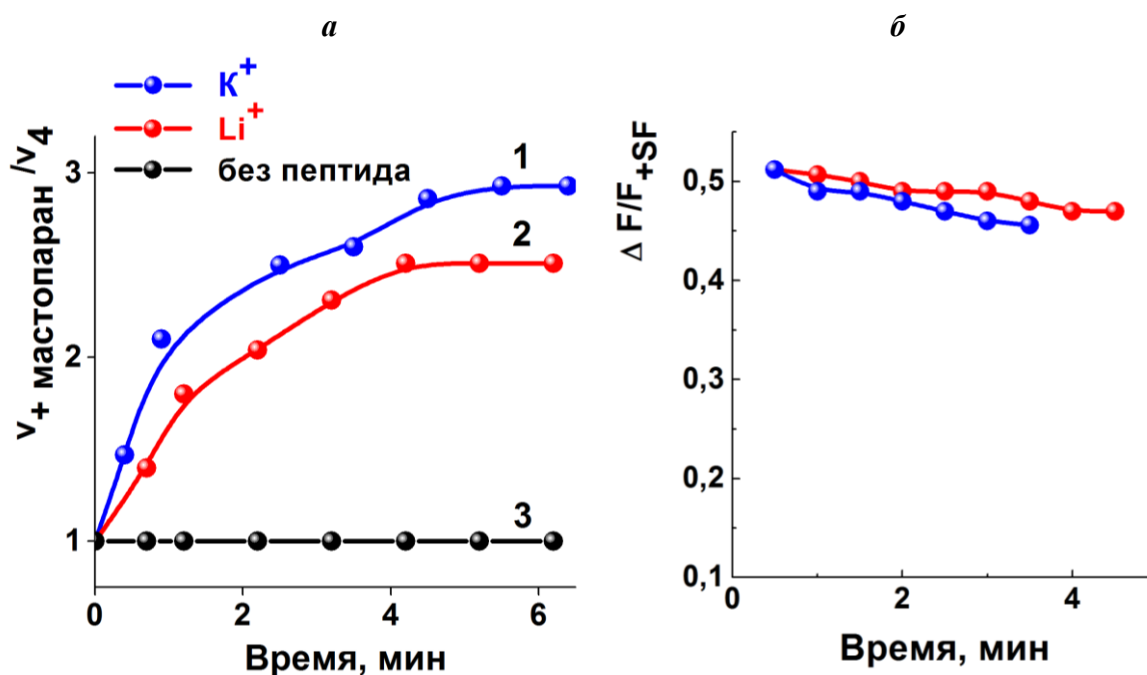


Рис. 3.18. Активация v_4 митохондрий печени крысы мастопараном (а). Влияние мастопарана на величину мембранного потенциала, генерируемого митохондриями печени крысы (б).

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

По-видимому, для ТАМ лимитирующей стадией являлось порообразование, при этом величину $\Delta\psi$ в области стабилизированной активации v_4 в монолитиевой и монокалиевой средах можно считать практически неизменной (Рис. 3.17.в,г.). первые несколько минут измерения, но при увеличении времени воздействия в отличие от мелиттина или мастопарана, величина $\Delta\psi$ радикально уменьшалась.

В присутствии ТАМ, как и мелиттина, активация дыхания митохондрий в диапазоне от 0,1 до 2 мг/мл не зависела от концентрации органелл. Оба пептида имели близкие значения K_p [Шольц и Захарова, 1980]. Следовательно, они преимущественно сосредоточены в мембране.

Тенденция к агрегации мастопарана качественно показана в работах [Fujita et al., 1994; Schwarz and Robert, 2001]. Использование модели,

основанной на выходе репортерного красителя из липосом, сформулированной для мелиттина в работе [Schwarz and Robert, 1992], для мастопарана затруднено [Cabrera et al., 2008], так как время существования поры существенно меньше, чем временная шкала измерения скорости выхода красителя. Развитие эффекта мастопарана на дыхание митохондрий во времени показано на Рис. 3.19.

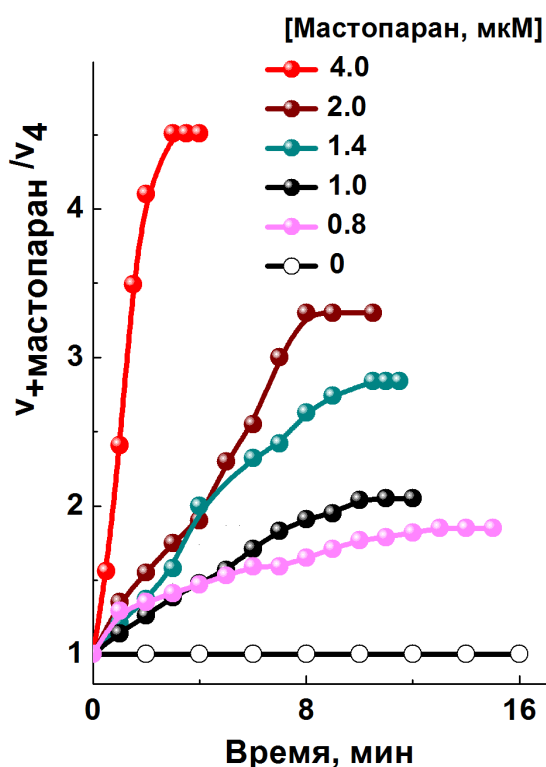


Рис. 3.19. Активация v_4 митохондрий печени крысы разными концентрациями мастопарана

Среда инкубации содержала 194 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 1 мМ KH₂PO₄, 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 10 мМ HEPES-KOH (pH 7,5), митохондрии (0,25 мг белка/мл.)

Рассчитанный как для мелиттина, концентрационный порядок реакции, лимитирующей трансмембранный катионный ток, индуцированный мастопараном, составил $1,83 \pm 0,23$ (измерения проводили в более корректных условиях, исключая индукцию иных эндогенных проводимостей [Belosludtsev et al., 2006; O'Rourke, 2007; Szewczyk et al., 2009], в отличие от [Шольц и др., 1983]). Это позволило предположить, что аналогично мелиттину предпора, лимитирующая стадия порообразования мастопарана – димер. При действии мастопарана, так же, как и мелиттина, имела место синхронная со стабилизацией активированного дыхания

стабилизация величины $\Delta\psi$, генерируемая митохондриями печени крысы (Рис. 3.18б.).

3.3.2. Природа двухфазной активации v_4 митохондрий печени крысы аламетицином

Временная зависимость активации v_4 под действием аламетицина (40 нМ и выше) двухфазная (Рис. 3.20.). Измерения проводили в условиях, исключающих индукцию иных эндогенных проводимостей.

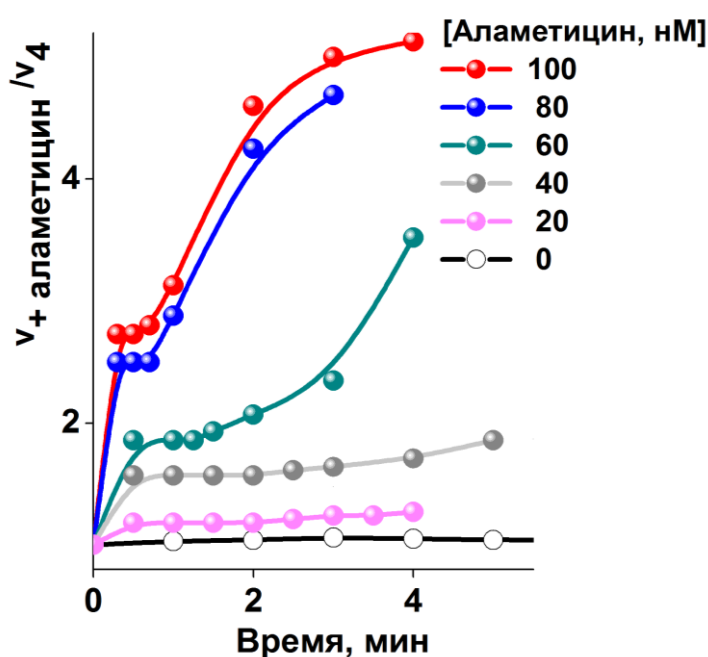


Рис. 3.20. Активация v_4 митохондрий печени крысы разными концентрациями аламетицина. Среда инкубации содержала 194 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 1 мМ KН₂PO₄, 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 10 мМ NEPES-KOH (pH 7,5), митохондрии (0,25 мг белка/мл.)

На Рис. 3.21а видно, что в монотрисовой среде первая фаза (отражающая, вероятно, проводимость пор с наименьшей степенью олигомерности) отсутствует, и она появляется после добавления в среду KCl.

На БЛМ было показано, что субсостояние минимальной проводимости (которое наблюдали в среде с K^+) исчезало из флуктуации проводимости одиночного канала, индуцированного пептидом, в средах, содержащих только катионы $Tris^+$ или Ca^{2+} (Рис. 1.7. [Hanke and Boheim 1980]).

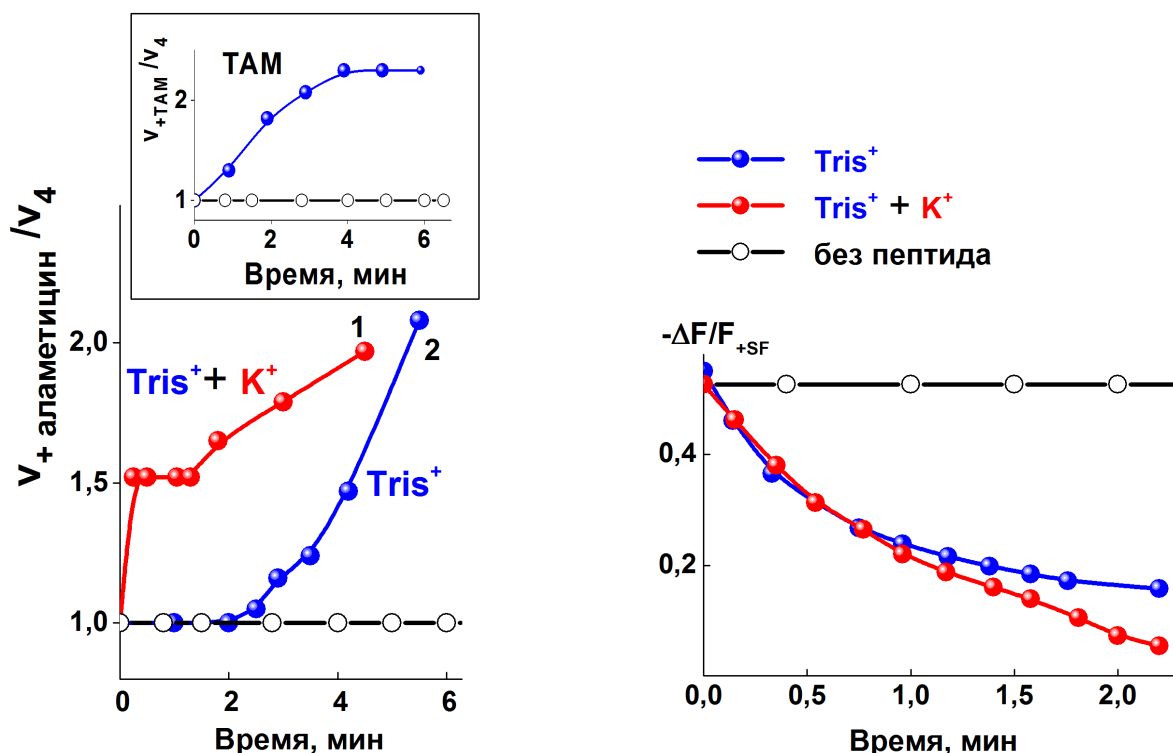


Рис. 3.21. Активация v_4 митохондрий печени крысы 110 нМ аламетицином в присутствии и в отсутствие 20 мМ KCl (a). Влияние аламетицина на величину мембранного потенциала, генерируемого митохондриями печени крысы (б). Среда инкубации содержала: 209 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 6 мМ $MgCl_2$, 1 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, 30 мМ Tris-HCl (pH 7,2) и митохондрии (0,25 мг белка/мл) или дополнительно 20 мМ KCl; к обеим средам добавляли 0,4 мкМ родамин 123 (б). На врезке – активация v_4 200 нМ TAM в отсутствие KCl.

В качестве своеобразного контроля исследовали активацию v_4 митохондриями печени крысы под действием TAM, образующего поры, которые не “самоорганизуются” с помощью последовательного

присоединения мономеров. На врезке на Рис. 3.21а показано, что кривая активации v_4 200 нМ ТАМ в среде, содержащей Tris^+ в качестве основного катиона (далее – монотрисовой среде) имела однофазный характер. Появление первой фазы активации дыхания в присутствии аламетицина при добавлении K^+ в среду инкубации (Рис. 3.21а) согласуется с результатами, полученными в искусственной системе (БЛМ), но митохондрии позволяют наблюдать первую фазу активации дыхания в минутном диапазоне времени в отличие от опытов на БЛМ (Рис. 1.7.) [Hanke and Voheim 1980]. Увеличение концентрации Tris^+ с 30 до 70 мМ не меняло характер зависимостей (данные не приведены).

Поскольку гидратированный диаметр присутствующего в средах инкубации Mg^{2+} больше, чем таковой Ca^{2+} [Laatikainen et al., 2007], этот катион не проникал в митохондрии через низкомолекулярные поры аламетицина. В его присутствии синхронная к оксиграмме зависимость для величины $\Delta\psi$ (Рис. 3.21б) неуклонно снижалась, что согласуется с литературными данными [Duclohier, 2001; Woolley, 2007] о том, что именно порообразование аламетицином лимитировало трансмембранный катионный ток. Опираясь на это заключение, по зависимости проницаемости от концентрации индуктора оценивали молекулярность реакции (например, для синрингомицина в [Feigin et al., 1996] или транспортного комплекса-димера А23187 с Ca^{2+} в [Prabhananda et al., 1998]). Необходимым условием для такого подхода было то, что аламетициновые каналы, не проницаемые для Tris^+ , согласно модельным экспериментам [Hanke and Voheim, 1980], однотипны, и катионный трансмембранный ток через них можно считать равным сумме токов через каждый единичный канал.

Величина K_p аламетицина, равная $(0,76 \pm 0,01) \times 10^3$ [Шольц, Аливердиева и др., 1985], позволила нам считать практически весь добавленный аламетицин находящимся в водной фазе, а небольшое

количество мембраносвязанного пептида (от 5 до 20%) пропорциональным его общей концентрации.

Уменьшение протяженности 1-го стационарного участка (первой фазы) с возрастанием концентрации пептида (Рис. 3.20.) хорошо согласуется с предположением об увеличении доли высокоолигомерных агрегатов, диаметр (и соответственно, проводимость) которых выше. Концентрационный порядок реакции, рассчитанный для первой фазы, был равен $1,92 \pm 0,07$ (измерения проводили в более корректных условиях, исключающих индукцию иных эндогенных проводимостей [Belosludtsev et al., 2006; O'Rourke, 2007; Szewczyk et al., 2009], в отличие от [Шольц, Аливердиева и др., 1985]). Это позволило предположить, что пора с наименьшим диаметром, образованная аламетицином, содержит липид (и это позволяет каналу при меньшей степени олигомеризации мономеров пептида иметь больший диаметр). Такая пора, вероятно, является тороидальной, в отличие от чисто пептидных высокоолигомерных пор аламетицина, описываемых «barrel-stave» моделью [Laitgeb et al., 2007; Wei and Pohorille, 2023]. Этот результат соответствует литературным данным по определению в модельных условиях концентрационного порядка, равного 4, для поры аламетицина, проницаемой для крупноразмерного иона Pr^{3+} [Hunt and Jones., 1982]. Согласно геометрическим расчетам, только пентамер (в рамках «barrel-stave» модели) способен свободно пропускать гидратированный ион K^+ [Tieleman et al., 2002]. Соотношение проводимостей каналов аламетицина с разной степенью олигомеризации составляло 1:4:20:45:75:110 [Hanke and Boheim, 1980], при этом даже небольшая примесь высокоолигомерного канала резко увеличивала его проводимость и 1-я фаза активации v_4 митохондрий маскировалась 2-ой.

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

По данным Рис. 3.22а., среднее соотношение активации v_4 аламетицином в монокалевой и монолитиевой средах составляло 1,35 (1,39 \pm 0,04 – среднее из 3-х определений). На рис. 3.22б. видно, что величина $\Delta\psi$ в этих средах в каждый момент времени отличалась, и для расчета соотношения активаций их приводили к значению при одинаковом значении $\Delta\psi$ (детали см. Материалы и методы исследования).

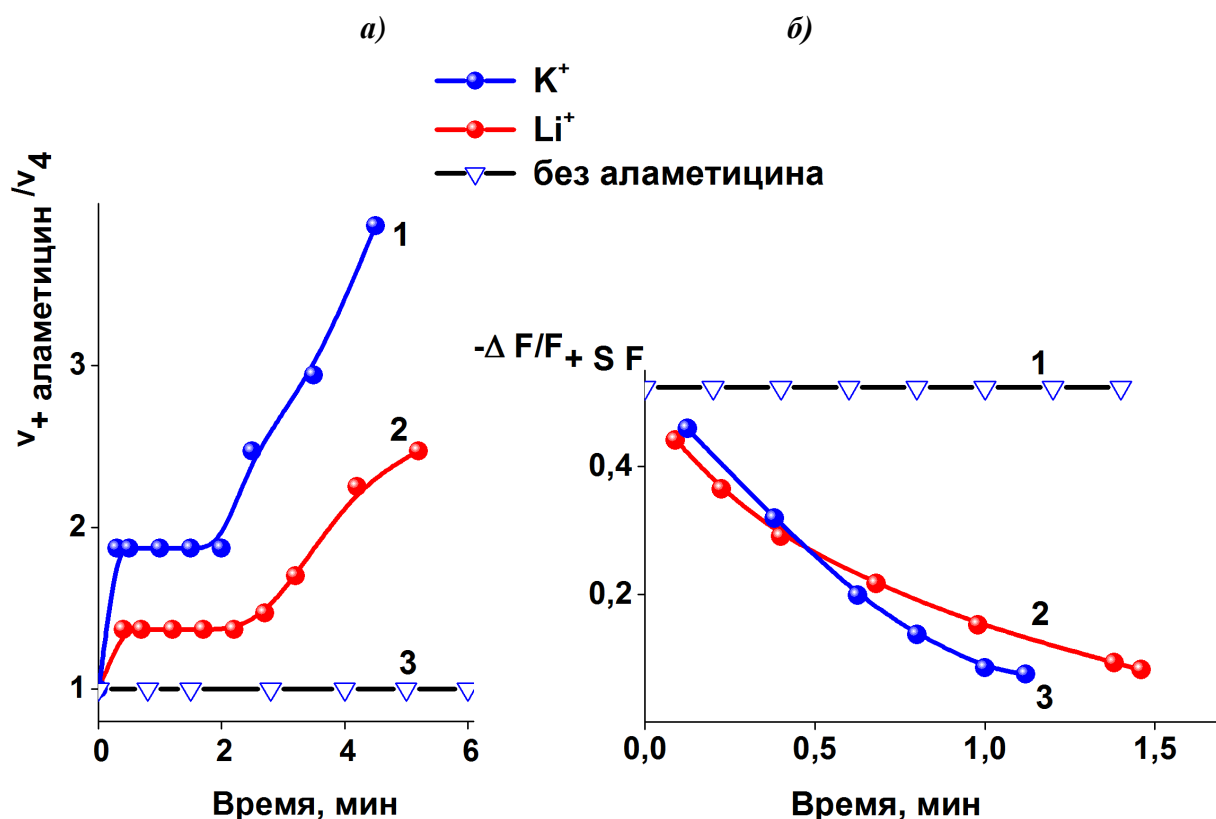


Рис. 3.22. Активация v_4 митохондрий печени крысы аламетицином (а) и влияние аламетицина на величину мембранного потенциала, генерируемого митохондриями печени крысы (б). Среда инкубации (а), содержащая 194 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 6 мМ $MgCl_2$, 10 мМ сукцинат, ротенон (2 мкг/мг белка), 4 мкМ цитохром с, митохондрии (0,25 мг белка/мл), были дополнена 0,3 мМ KH_2PO_4 и 10 мМ HEPES-KOH (pH 7,5) (кривая 1) или 0,3 мМ LiH_2PO_4 и 10 мМ HEPES-LiOH (pH 7,5) (кривая 2), и 110 нМ аламетицином; в контроле (кривая 3) использовали те же среды, но без добавления аламетицина. На Рис (б), использовали те же среды, что на Рис (а), но они были дополнены 0,4 мкМ родамином 123.

Принимая во внимание, что ионный ток в растворе пропорционален разности потенциалов, усредненное «исправленное» соотношение составило 1,59, что весьма близко к соотношению подвижностей K^+ и Li^+ в средах инкубации (1,53, см. 3.3.1). Возможно, отклонение связано с примембранным концентрированием однозарядных катионов (с увеличением ионной силы раствора соотношение чисел переноса увеличивалось), хотя при блокировании двухзарядными катионами (5 мМ) поверхностного заряда, образованного липидными головками, это концентрирование существенно уменьшалось [Muller and Finkelstein, 1972].

Данные, представленные на Рис. 3.2б., 3.3б., 3.17вг., 3.18б, 3.21б., 3.22б. свидетельствовали о том, что по эффективности подавления $\Delta\psi$ митохондрий печени крысы при одинаковой активации v_4 (и, следовательно, трансмембранного катионного тока), исследуемые нами пороформеры подразделялись на две группы. Первая – умеренно (мелиттин и мастопаран), вторая – радикально (ТАМ и аламетицин) влияющие на величину $\Delta\psi$.

Степень активации v_4 , согласно интерпретации данных на Рис. 3.1., служила тестом на сохранение целостности внутренней мембраны митопластов в ходе инкубации с мембраноактивным пептидом. В проведенных экспериментах в конце кривой активации дыхания тем или иным пептидом всегда добавляли протонофор SF в зависимостях, приведенных на Рис. 3.3а., 3.4а., 3.16а., 3.17аб., 3.18а., 3.19., 3.20а и 3.21а.). Во всех случаях степень активации v_4 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. По данным [Kotlyar et al., 2004], после преинкубации митохондрий печени крысы с 2 мкМ аламетицином в течение 5 мин и переосаждения, они не теряли активность малатдегидрогеназы (это существенно большая концентрация аламетицина по сравнению с используемой в наших опытах).

В модельных системах порообразование аламетицином лимитировано образованием каналов и все каналы, как и в наших экспериментах, были свободно проницаемы для K^+ и Li^+ [Woolley, 2007]. Близость справочных величин с величинами, определенными предлагаемым нами методом, можно рассматривать как свидетельство корректности использования препарата митохондрий печени крысы в качестве биосенсора для измерения трансмембранного катионного тока.

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

До настоящей работы было принято считать, что в плазмалемме *S. cerevisiae* отсутствует опосредованная белком система транспорта C_4 -дикарбоксилатов [Lodi et al., 2004]. При pH 3,0 был показан только транспорт L-малата, обусловленный диффузией его непротонированной формы [Salmon, 1987]. Клетки тетраплоидного штамма Y-503 окисляли сукцинат при pH 5,5 (Рис. 3.10б.), когда доля его протонированной формы невелика. Аналогичные данные были получены нами и на стандартном для генетических исследований (<http://www.yeastgenome.org>) штамме S288c. Гиперболическая зависимость окисления клетками сукцината от его концентрации (Рис. 3.10б, 3.11.) и его подавление специфическим ингибитором пальмитоилмалатом (Рис. 3.10б, 3.12.), непроникающим в клетку (см. раздел 3.2.2), позволили предположить существование в плазмалемме специфического транспортера сукцината. Он, в отличие от переносчиков сукцината *P. tannophilus* [Harrod et al., 1997] или *C. utilis* [Cássio et al., 1993] не нуждался в индукции малатом, так как окисление сукцината наблюдалось при выращивании клеток *S. cerevisiae* в синтетической среде, гарантированно не содержащей малат.

Субстратную специфичность переносчика плазмалеммы *S. cerevisiae* исследовали на дрожжевых клетках в условиях, лимитирующих транспорт сукцината через плазмалемму. Максимальная скорость окисления

L-малата составляла не более 13% от таковой сукцината и постепенно уменьшалась в 6 – 8 раз к 18-му часу аэробной преинкубации при 0°C. Это позволило после 18 – 20 ч преинкубации изучить ингибирование окисления сукцината L-малатом, пренебрегая его вкладом в скорость дыхания. Это ингибирование имело линейный характер в координатах Диксона с величиной $K_i = 17,5 \pm 1,1$ мМ (Рис. 3.23.), которая существенно выше величины $K_i = 6,6 \pm 1,3$ мкМ для О-пальмитоил-L-малата (Рис. 3.24.). Из этого следует, что ацильный заместитель существенно улучшил сродство производного субстрата к транспортеру. Из данных Рис. 3.23. видно, что увеличение концентрации сукцината уменьшало величину I_{50} для L-малата. По-видимому, оба субстрата конкурировали за общую точку связывания.

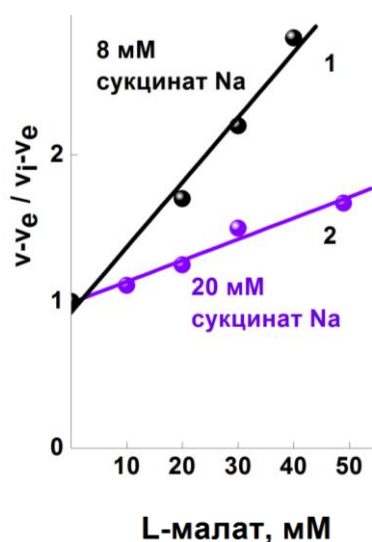


Рис. 3.23. Влияние L-малата на скорость окисления сукцината клетками *S. cerevisiae*, координаты Диксона.

Среда инкубации содержала 50 мМ натрий - фосфатный буфер (pH 5,5), добавки: 8 мМ сукцинат натрия (кривая 1) или 20 мМ сукцинат натрия (кривая 2) (θ), клетки (10 мг/мл). Время аэробной преинкубации клеток *S. cerevisiae* при 0°C – 18 ч.

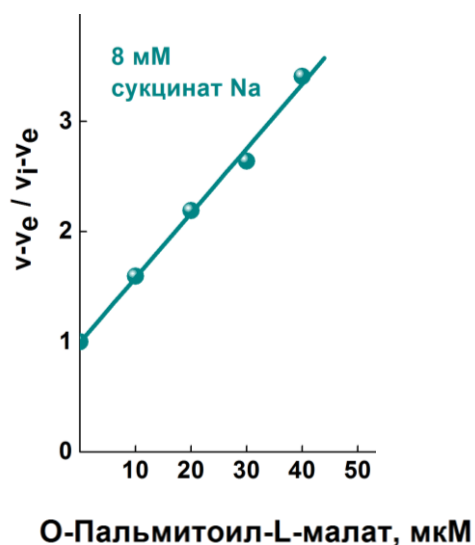


Рис. 3.24. Влияние О-пальмитоил-L-малата на скорость окисления сукцината клетками *S. cerevisiae*, координаты Диксона.

Среда инкубации содержала 50 мМ натрий - фосфатный буфер (pH 5,5), добавки: 8 мМ сукцинат натрия (a), клетки (10 мг/мл). Время аэробной преинкубации клеток *S. cerevisiae* при 0°C – 18 ч.

Итаконат и L-малат, содержащие соответственно, гидрофобную метиленовую и гидрофильную гидроксильную группы во втором положении молекулы субстрата, не активировали эндогенное дыхание *S. cerevisiae* (L-малат, возможно, из-за его насыщающей концентрации цитоплазме, данные не приведены).

На Рис. 3.25. показано, что в условиях, когда транспорт сукцината в клетку лимитировал его окисление, в присутствии итаконата увеличивалась наблюдаемая величина K_M , а V_{max} не менялась.

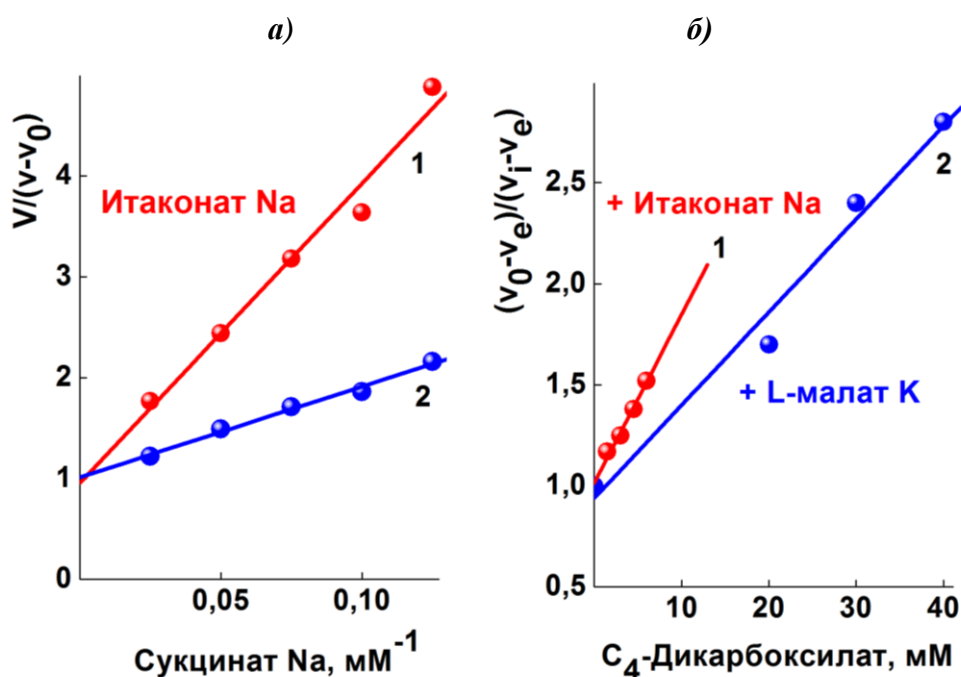


Рис. 3.25. Влияние итаконата натрия на скорость окисления сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* (координаты Лайнуивера–Берка) (а). Влияние итаконата натрия и L-малата калия на скорость окисления сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* (координаты Диксона) (б). Среда инкубации, содержащая 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 5,5), была дополнена 10 мМ итаконатом натрия (зависимость 1) и клетками (5 мг/мл) (а) или 10 мМ сукцинатом натрия, 10 мМ итаконатом натрия (зависимость 1) или 10 мМ L-малатом калия (зависимость 2) и клетками (10 мг/мл) (б). Время аэробной преинкубации клеток *S. cerevisiae* при 0°C – 18 ч.

По-видимому, и итаконат связывается с активным центром переносчика сукцината, конкурентно к этому субстрату (Рис. 3.25б.).

Данные, приведенные на Рис. 3.25б., свидетельствовали о лучшем средстве более гидрофобного конкурентного (Рис. 3.25а.) ингибитора сукцинатоксидазной системы клеток (соответственно $K_i = 4,15 \pm 0,35$ и $17,5 \pm 1,1$ мМ). По-видимому, и итаконат связывался с активным центром переносчика сукцината, конкурентно к этому субстрату (Рис. 3.25б.). Возможно, прилегающая к точкам связывания карбоксилов субстрата гидрофобная область активного центра не взаимодействует с полярной сложноэфирной группой О-ацил-L-малатов, а связывает начальные метиленовые звенья 2-алкилмалонатов.

Соответственно, можно было ожидать на порядок лучшее средство к активному центру переносчика плазмалеммы 2-алкилмалонатов с такой же длиной алифатической цепи, что и О-ацил-L-малаты. О-Пальмитоил-L-малат увеличивал величину K_M для сукцината сукцинатоксидазной системы клеток дрожжей, не изменяя величины V_{max} . (Рис. 3.26.).

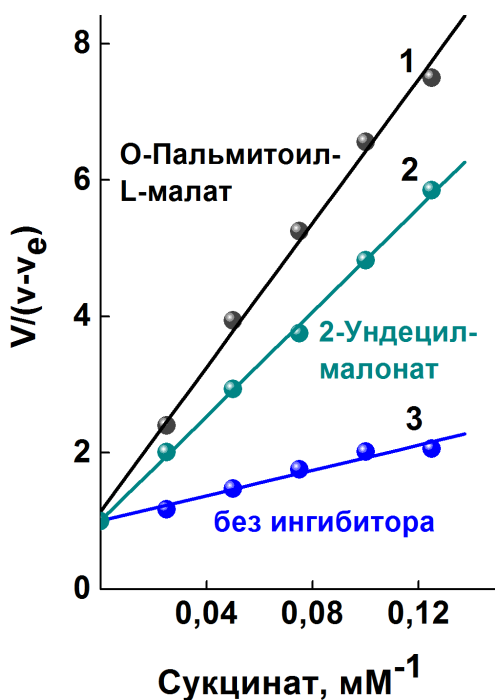


Рис. 3.26. Влияние О-пальмитоил-L-малата и 2-ундецилмалоната на скорость окисления сукцината натрия клетками *S. cerevisiae*, координаты Лайнуивера-Берка.

Среда инкубации содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), добавки: 50 мкМ О-пальмитоил-L-малат (кривая 1), 100 мкМ 2-ундецилмалонат (кривая 2), клетки 10 мг/мл. Время аэробной преинкубации клеток *S. cerevisiae* при 0°C – 18 ч. .

2-Ундецилмалонат (его непроницаемость в митохондрии показана в разделе 3.2.2.4.), как и О-пальмитоил-L-малат, не влиял на v_e клеток, но ингибировал окисление сукцината.

2-Ундецилмалонат (величина K_i составляла $35,6 \pm 4,4$ мкМ) также увеличивал величину K_M сукцинатоксидазной системы клеток дрожжей для сукцината, не изменяя величины V_{max} . (в отсутствие ингибитора $K_M = 8,2$ мМ и $V_{max} = 12,4$ нмоль/мин/мг сухого веса (Рис. 3.26). Конкурентный характер действия обоих ингибиторов означал, что они взаимодействовали с общей точкой связывания субстрата в активном центре переносчика. Линейный характер ингибирования в координатах Диксона означал, что именно транспорт через плазмалемму лимитировал эндогенную сопряженную систему в присутствии каждого из исследованных ингибиторов.

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

С большой степенью вероятности можно утверждать, что при pH 6,5 О-пальмитоил-L-малат не проникал через внутреннюю мембрану митохондрий *S. cerevisiae*. Поэтому, линейная зависимость ингибирования О-пальмитоил-L-малатом окисления сукцината митохондриями *S. cerevisiae* от его концентрации в координатах Диксона (Рис. 3.27.) свидетельствовала о том, что дикарбоксилатный транспортер внутренней мембраны митохондрий являлся лимитирующим звеном сукцинатоксидазной системы митохондрий. 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 ($6,6 \pm 1,3$ мкМ). Это обстоятельство не позволило избирательно ингибировать транспорт сукцината через плазмалемму при кислых значениях pH. Ингибитор эффективно задерживал рост дрожжей при pH 4,5 (по-видимому, диффундируя через бислой плазмалеммы к митохондриям и ингибируя

дикарбоксилатный антипортер внутренней мембраны этих органелл), но не при рН 5,5.

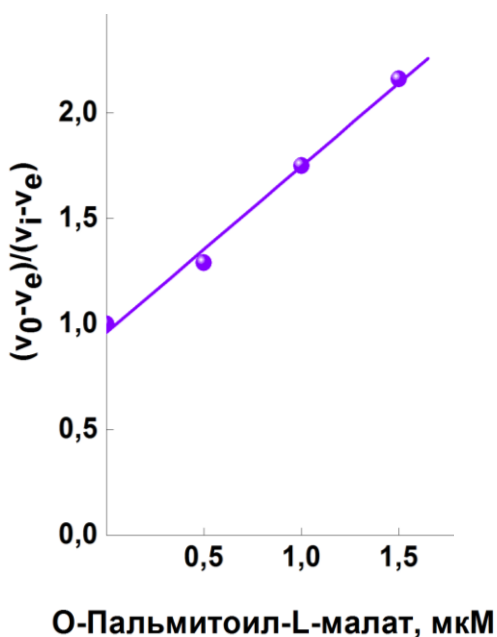


Рис. 3.27. Влияние О-пальмитоил-L-малата на скорость окисления сукцината натрия митохондриями *S. cerevisiae*, координаты Диксона.

Среда инкубации содержала 0,6 М маннит, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ KH₂PO₄, 0,48 мМ ADP, 1 мМ пируват Na, 10 мМ MES, рН 6,5, добавки: 4 мМ сукцинат натрия, 0,025 мкМ SF и митохондрии (0,1 мг белка/мл).

Для крайних членов ряда О-ацил- L-малатов (L-малата и О-стеароил-L-малата) и для 2-алкилмалонатов (2-пентилмалоната и 2-пентадецилмалоната) показана линейность ингибирования скорости окисления сукцината в координатах Диксона (Рис. 3.28. и 3.29.)

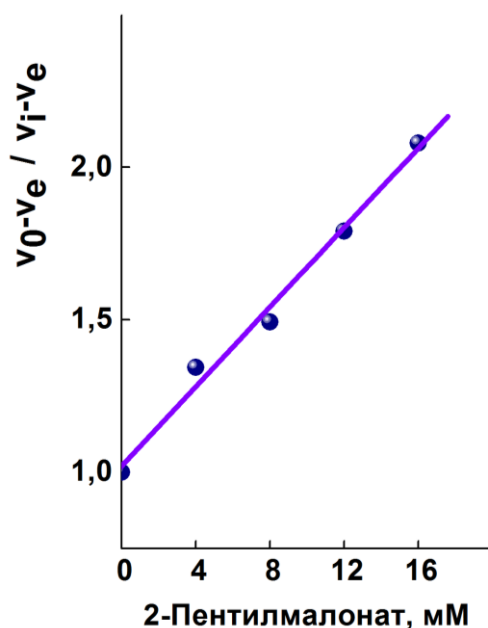


Рис. 3.28. Влияние 2-пентилмалоната на скорость окисления сукцината натрия клетками *S. cerevisiae*, координаты Диксона.

Среда инкубации содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), добавки: 8 мМ сукцинат натрия, клетки (10 мг/мл). Время аэробной преинкубации клеток *S. cerevisiae* при 0°C – 18 ч.

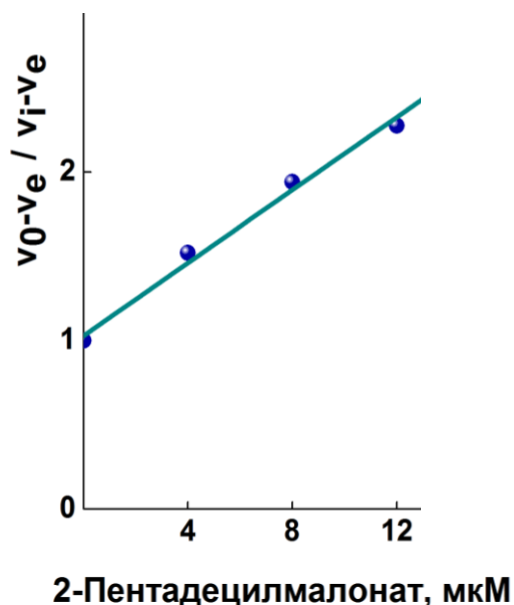


Рис. 3.29. Влияние 2-пентадецилмалоната на скорость окисления сукцината натрия клетками *S. cerevisiae*, координаты Диксона. Среда инкубации содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), добавки: 8 мМ сукцинат натрия, клетки (10 мг/мл). Время аэробной преинкубации клеток *S. cerevisiae* при 0°C – 18 ч.

Такие зависимости получали для всех использованных в исследовании производных субстратов переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы.

Известно, что дикарбоксилатный транспортер митохондрий печени крысы способен связывать малеат, но не фумарат [Palmieri et al., 2000]. На Рис. 3.30б., видно, что фумарат, но не малеат, эффективно подавлял ($K_i = 1,0 \pm 0,1$ мМ) окисление сукцината, конкурентно к нему (Рис. 3.30.).

По-видимому, дикарбоксилаты взаимодействуют с точкой связывания субстратов транспортера *S. cerevisiae* в *транс*-конформации (так как молекула фумарата имеет *транс*-конформацию, малеата – *цис*-конформацию). Влияние конформации субстрата на эффективность ингибирования согласуется с нашими данными по рН-зависимости сродства, свидетельствующими о транспорте сукцината в дианионной форме.

В специальных опытах было показано, что активность сукцинатоксидазной системы клеток увеличивается в ходе длительной преинкубации при 0°C, но остается существенно меньшей, чем пируватоксидазная активность. Известно, что активности

митохондриальных сукцинатоксидазной и пируватоксидазной систем соизмеримы.

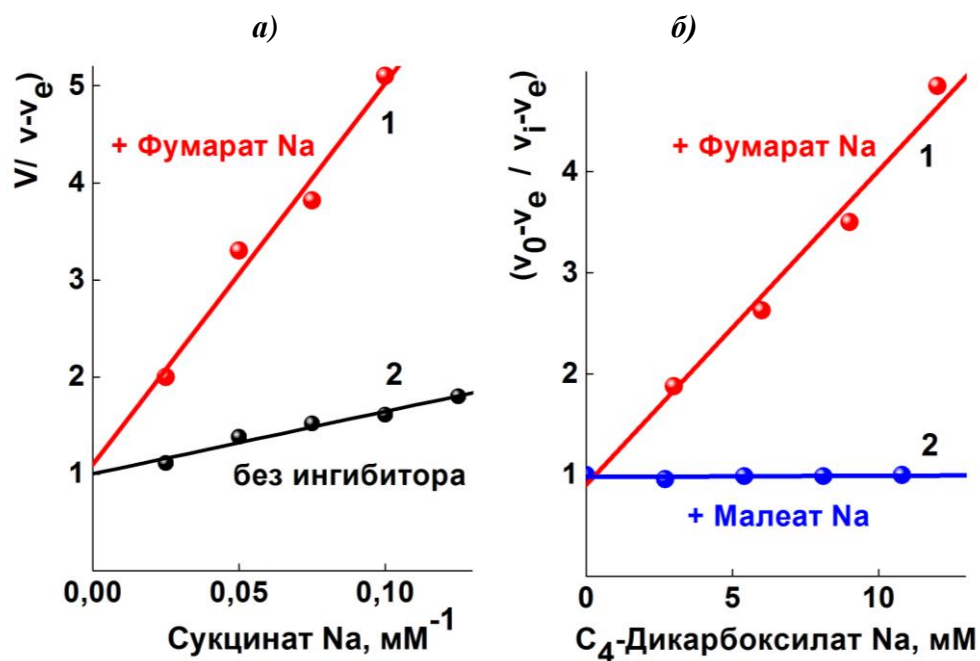


Рис. 3.30. Влияние фумарата натрия на скорость окисления сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* (координаты Лайнуивера–Берка) (а). Окисление клетками *S. cerevisiae* сукцината натрия в присутствии фумарата натрия или малеата натрия (координаты Диксона) (б).

Среда инкубации, содержащая 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 5,5) и 10 мМ сукцинат натрия, была дополнена фумаратом натрия (зависимость 1), клетками (5 мг/мл) (а), или 10 мМ фумаратом натрия (зависимость 1) или 10 мМ малеатом натрия (зависимость 2), клетками (10 мг/мл) (б). Время аэробной преинкубации клеток *S. cerevisiae* при 0°C – 20 ч.

Если бы низкая активность сукцинатоксидазной системы была связана с небольшой примесью клеток с поврежденной плазмалеммой, то стереоспецифичность ее ингибирования в паре фумарат/малеат соответствовала бы митохондриальной. Кроме того, данные, приведенные в Таблице 3.2., свидетельствовали о том, что окисление сукцината митохондриями гораздо чувствительнее к О-миристоил-L-малату и О-пальмитоил-L-малату, чем окисление сукцината клетками. Это означало,

что действием ингибиторов на примесь дрожжей с плазмалеммой, поврежденной в ходе продолжительной предобработки, можно пренебречь.

В условиях, когда скорость окисления сукцината была лимитирована его транспортом через плазмалемму, протониферы FCCP (Рис. 3.15а., зависимость 2) и SF (данные не приведены) почти не влияли на окисление сукцината, в отличие от активации глюкозы (Рис. 3.15а., кривая 1) и ингибирования пирувата (Рис. 3.15., кривая 3). Это позволяет предположить, что транспорт сукцината через плазматическую мембрану осуществлялся не в симпорте с протоном.

На Рис. 3.31. показано, что окисление клетками цитрата (оксиграммы 1 и 2) и сукцината (оксиграмма 3) нечувствительны к действию протонифера FCCP в концентрации (2 мкМ), максимально активирующей окисление глюкозы и подавляющей окисление пирувата (Рис. 3.15а.).

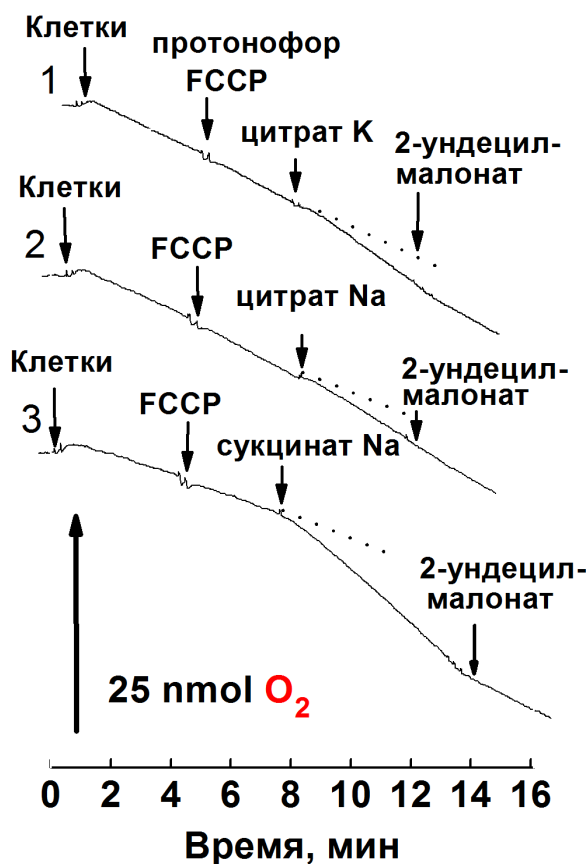


Рис. 3.31. Влияние 2-ундецилмалоната на скорость окисления цитрата и сукцината клетками *S. cerevisiae*.

Среда инкубации содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (pH 5,5) (оксиграмма 1), 50 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 5,5) (оксиграммы 2 и 3), добавки: 2 мкМ FCCP, 20 мМ цитрат калия (оксиграмма 1) или 20 мМ цитрат натрия (оксиграмма 2), или 20 мМ сукцинат натрия (оксиграмма 3), 300 мкМ 2-ундецилмалонат. клетки (10 мг/мл). Время аэробной преинкубации клеток при 0°C – 12 - 18 ч.

Протонофор, добавленный после субстрата, так же не влиял на скорость его окисления. В натрий - фосфатном буфере (рН 5,5) скорость окисления цитрата в 6-7 раз превышала скорость его окисления в калий - фосфатном буфере (рН 5,5) (Таблица 3.3.).

Окисление сукцината зависело от состава ионной среды аналогичным образом. Скорости окисления сукцината и цитрата одинаково эффективно (в 3,5-4 раза) подавлялись непроникающим ингибитором – 2-ундецилмалонатом в присутствии Na^+ (Таблица 3.3.).

Таблица 3.3. Скорости эндогенного дыхания клеток *S. cerevisiae* и скорости окисления цитрата и сукцината при рН 5,5 в присутствии различных катионов (последовательность добавок указана на Рис. 3.31.).

Состав среды инкубации, фосфатный буфер (рН 5,5)	Скорость окисления (пмол O_2 /мин) после добавления					
	Клеток	FCCP (v_1)	Субстрата (v_2)	v_2-v_1	2-Ундецил-малоната (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

Была показана линейная зависимость ингибирования О-пальмитоил-L-малатом окисления сукцината митохондриями *S. cerevisiae* от его концентрации в координатах Диксона (см. Рис. 3.27.). Такой же характер ингибирования показан для окисления сукцината и цитрата клетками 2-ундецилмалонатом (Рис. 3.32. и 3.33.).

Линейный характер ингибирования окисления сукцината и цитрата 2-ундецилмалонатом в координатах Диксона свидетельствовал о том, что ингибитор подавлял стадию, лимитирующую окисление обоих субстратов. Поскольку ингибитор не проникал в клетку, то лимитирующей стадией являлся транспорт обоих субстратов через плазмалемму (Рис. 1.4.), и особенности их окисления (Рис. 3.31.) связаны со свойствами транспортера.

Поэтому далее мы называли скорость окисления субстратов скоростью транспорта через плазмалемму в условиях, когда вышеописанная линейность была подтверждена.

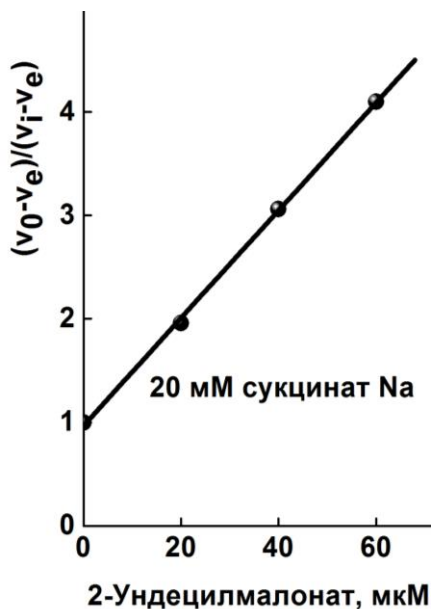


Рис. 3.32. Влияние 2-ундецилмалоната на скорость окисления клетками *S. cerevisiae* сукцината натрия в координатах Диксона.

Среда инкубации содержала 50 мМ калий – фосфатный буфер (pH 5,5). Добавки: 20 мМ сукцинат натрия, клетки: 5 мг/мл. Время аэробной преинкубации при 0°C 14-18 ч.

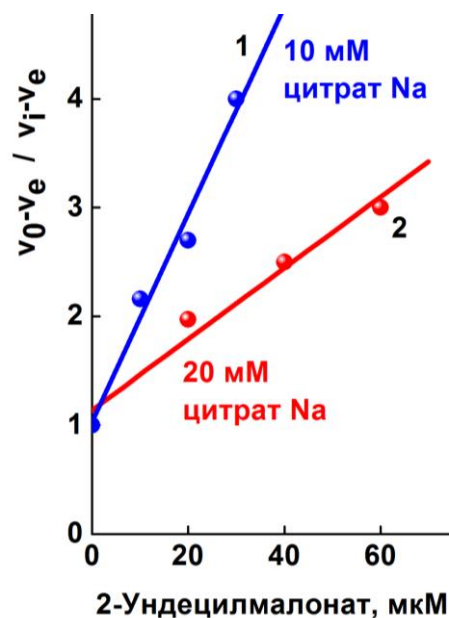


Рис. 3.33. Влияние 2-ундецилмалоната на скорость окисления клетками *S. cerevisiae* цитрата натрия в координатах Диксона.

Среда инкубации содержала 50 мМ калий – фосфатный буфер (pH 5,5). Добавки: 10 мМ или 20 мМ цитрат натрия (кривая 1 или кривая 2, соответственно), клетки: 10 мг /мл (б). Время аэробной преинкубации при 0°C 14-18 ч

Степень ингибирования транспорта цитрата зависела от его концентрации (Рис. 3.33.): при больших концентрациях цитрата (20 мМ)

необходима и большая концентрация ингибитора. 2-Ундецилмалонат увеличивал наблюдаемую величину K_M , не меняя V_{max} как для сукцината (Рис. 3.34., кривая 1), так и цитрата (Рис. 3.35., кривая 1).

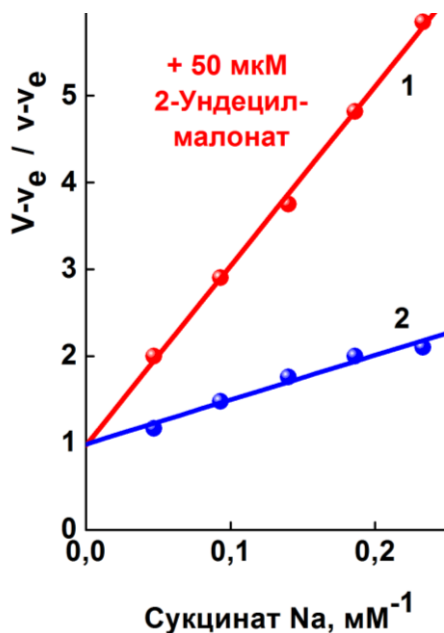


Рис. 3.34. Влияние 2-ундецилмалоната на скорость окисления клетками *S. cerevisiae* сукцината натрия, в координатах Лайнуивера-Берка. Среда инкубации – 50 мМ калий – фосфатный буфер (рН 5,5). Добавки: 50 мкМ 2-ундецилмалонат (кривая 1), клетки: 5 мг/мл. Время аэробной преинкубации при 0°C 18 ч.

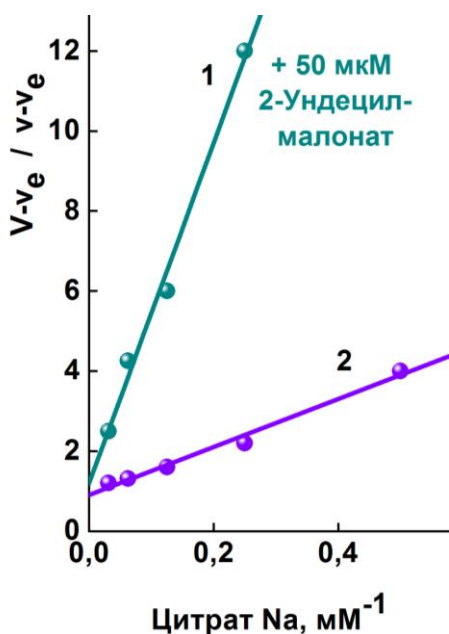


Рис. 3.35. Влияние 2-ундецилмалоната на скорость окисления клетками *S. cerevisiae* цитрата натрия, в координатах Лайнуивера-Берка. Среда инкубации содержала 50 мМ калий – фосфатный буфер (рН 5,5). Добавки: 50 мкМ 2-ундецилмалонат (кривая 1), клетки: 10 мг /мл. Время аэробной преинкубации при 0°C 14 ч .

При этом константы конкурентного ингибирования для транспорта сукцината и цитрата были соизмеримы (K_i 7,8 мкМ и 3,8 мкМ) и сопоставимы с величинами K_i , рассчитанными из данных, представленных

на Рис. 3.33. и Рис. 3.32. 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 (способ показать конкурентность субстратов в активном центре транспортера). Можно полагать, что эти данные и данные, приведенные на Рис. 3.31., 3.32., 3.33., 3.34. и 3.35. с высокой долей вероятности свидетельствовали о том, что сукцинат и цитрат транспортировались в клетку общим переносчиком – активируемым ионами Na^+ при pH 5,5, протонифор-нечувствительным транспортером дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* (Рис. 1.4.).

В контрольных опытах было показано, что ферментативная система окисления цитрата (цитратоксидазная система) препарата митохондрий *S. cerevisiae* не чувствительна к 2-ундецилмалонату (Рис. 3.36.), в отличие от цитратоксидазной системы клеток (Рис. 3.37.), т.е. объектом воздействия ингибитора являлся именно транспортер плазмалеммы. Эти данные дополнительно свидетельствовали о том, что сравнительно низкая активность окисления цитрата клетками не связана с примесью поврежденных клеток.

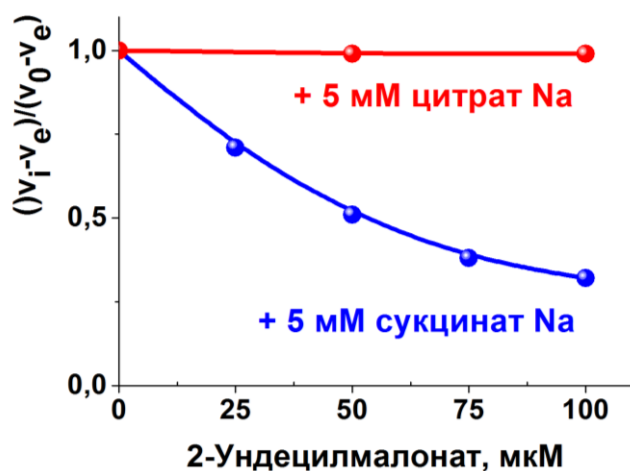


Рис. 3.36. Влияние 2-ундецилмалоната на скорость окисления цитрата натрия или сукцината натрия митохондриями *S. cerevisiae*.

Среда инкубации, содержащая 0,6 М маннит, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ MgCl_2 , 10 мМ KH_2PO_4 , 0,48 мМ ADP, 10 мМ MES (pH 6,5), митохондрии (1,8 мг белка/мл), была дополнена 5 мМ цитратом или 5 мМ сукцинатом натрия.

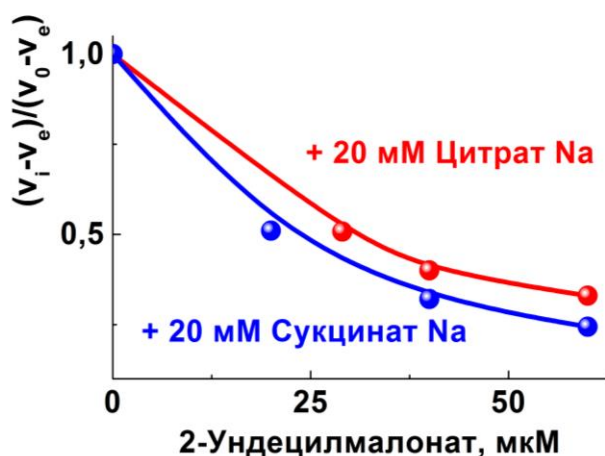


Рис. 3.37. Влияние 2-ундецилмалоната на скорость окисления цитрата натрия или сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* (20 и 5 мг/мл, соответственно) от концентрации 2-ундецилмалоната.

Среда инкубации содержащая 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 6,5) была дополнена 20 мМ цитратом или 20 мМ сукцинатом натрия.

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

3.4.1. рН профиль транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae*.

После каждого определения зависимости активности от концентрации сукцината (типичный график на Рис. 3.38., кривая 1), в той же оксиметрической кривой снимали зависимость от концентрации непроникающего в клетку 2-ундецилмалоната (Рис. 3.39., кривая 1).

Линейность зависимости в координатах Диксона (типичный результат на Рис. 3.36., кривая 1) подтверждала, что скорость окисления при измерении K_M по-прежнему лимитирована активностью переносчика плазмалеммы.

Исследовали влияние рН на K_M и V_{max} транспорта сукцината в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (Таблица 3.4.). В условиях, когда зависимость от 2-ундецилмалоната нелинейна, величина K_M для сукцината не зависела от

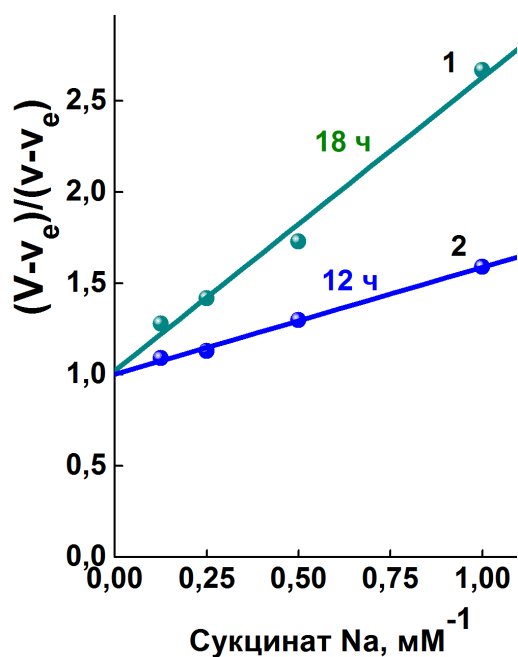


Рис. 3.38. Зависимость скорости окисления сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* от его концентрации в координатах Лайнуивера-Берка. Среда инкубации содержала 50 мМ натрий – фосфатный буфер (рН 7,5), добавки: клетки 5 мг/мл. Время аэробной преинкубации клеток при 0°C: 18 ч (кривая 1) или 12 ч (кривая 2).

рН в диапазоне 5,5 – 7,5 (при которых внутриклеточное значение рН не меняется [Beauvoit et al., 1991]) и составляла $0,84 \pm 0,3$ мМ (типичный график для рН 7,5 приведен на Рис. 3.39., кривая 2).

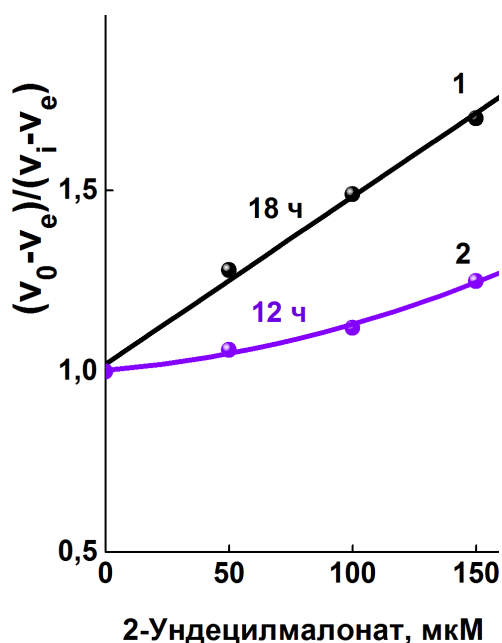


Рис. 3.39. Влияние 2-ундецилмалоната на скорость окисления сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* в координатах Диксона. Среда инкубации содержала 50 мМ натрий – фосфатный буфер (рН 7,5), добавки: 10 мМ сукцинат натрия, клетки 5 мг/мл. Время аэробной преинкубации клеток при 0°C: 18 ч (кривая 1) или 12 ч (кривая 2).

Эта величина не зависела также от вида катиона в среде инкубации при рН 6,5. Приведенное значение хорошо совпадало с величиной K_M для сукцината при окислении этого субстрата препаратом дрожжевых

митохондрий, выделенных нами из клеток *S. cerevisiae* ($0,85 \pm 0,173$ мМ при рН 6,5). Этот результат свидетельствовал о том, что в условиях, когда транспорт субстрата через плазмалемму не лимитирован (Рис. 3.39., кривая 2), дыхание клеток в присутствии сукцината лимитировано скоростью окисления сукцината митохондриями этих клеток. При этом рН-оптимум для V_{\max} находился в щелочной области. Увеличение величины K_M для сукцината с увеличением значения рН, связано, по-видимому, с увеличением доли дианионной формы субстрата. В пересчете на дианион величина K_M оставалась постоянной (Таблица 3.4.).

При рН 4 доля дианионной формы сукцината не превышала 10% (рассчитано по [Dawson et al., 1986]) и сукцинат практически не окислялся. рН оптимум транспорта наблюдали в щелочной области. Вероятно, именно дианионная форма субстрата являлась единственной транспортируемой в клетку формой.

Таблица 3.4. Влияние рН на кинетические параметры транспорта сукцината в клетки *S. cerevisiae* в 50 мМ натрий - фосфатном буфере

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

* В скобках указано количество измерений.

Этот результат согласуется с нашими данными о конкурентном ингибировании окисления сукцината дрожжевыми клетками фумаратом (имеющим *транс*-конформацию), но не малеатом (имеющим *цис*-конформацию) (Рис. 3.30б.). Такая стереоспецифичность ингибирования возможна при связывании дианионной формы субстрата с активным центром переносчика.

3.4.2. Регуляция транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы

S. cerevisiae катионами

Окисление сукцината дрожжевыми клетками зависело не только от рН среды, но и от катиона в среде инкубации (Рис. 3.40.).

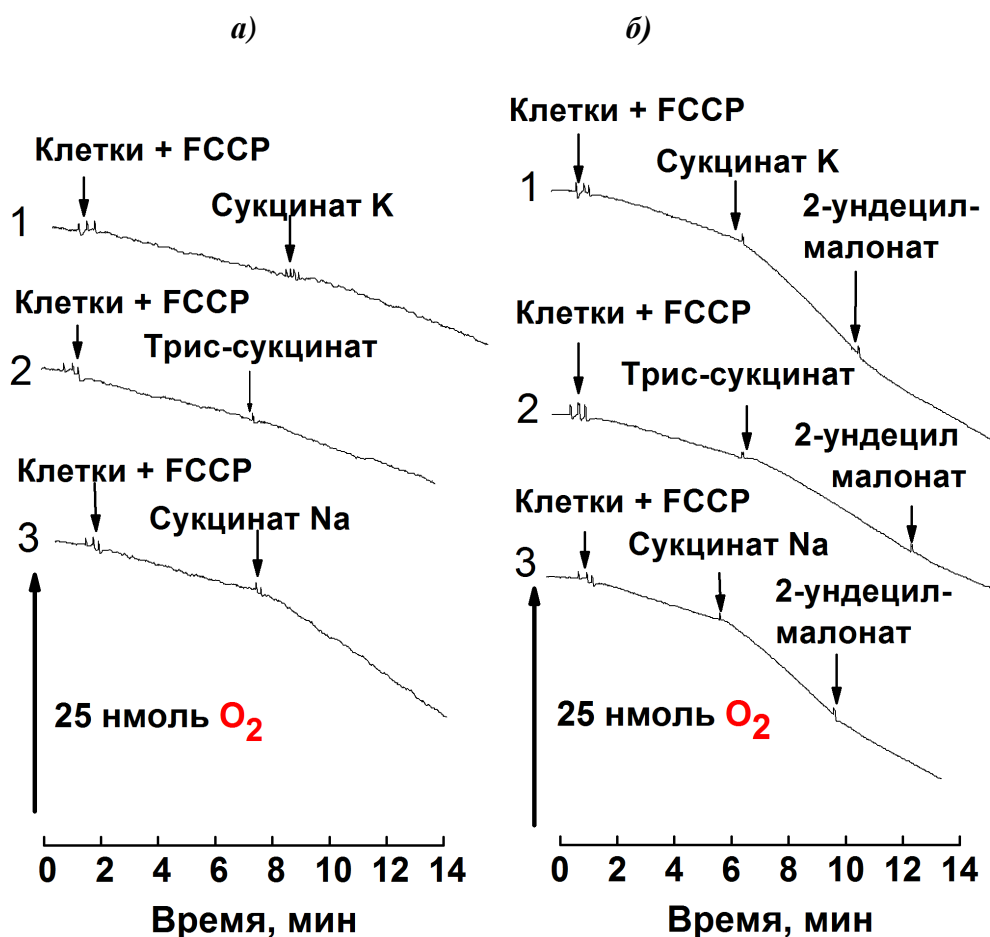


Рис. 3.40. Окисление клетками *S. cerevisiae* сукцината калия (кривые 1), Tris - сукцината (кривые 2) и сукцината натрия (кривые 3).

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

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

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

При pH 5,5 (Рис. 3.40а.) скорость окисления сукцината в присутствии Na^+ была выше, чем в присутствии катионов K^+ или Tris^+ (соответственно нижняя, верхняя и средняя оксиграммы). При pH 6,5 (Рис. 3.40б.) скорость окисления сукцината была существенно выше, чем при pH 5,5, но скорости в присутствии каждого из трех катионов: Na^+ , K^+ и Tris^+ были близки.

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

В моносодиевой среде транспортер дикарбоксилатов имел максимальное сродство к сукцинату и сохранял высокую активность при pH 5,5 (Рис. 3.40а., оксиграмма 3).

Чтобы проверить, не связано ли действие K^+ и Na^+ с изменением сродства транспортера к сукцинату, сопоставили величины K_M при pH 5,5 в K^+ - и Na^+ -содержащих средах. В среде, содержащей K^+ , сукцинат имел вдвое худшее сродство, чем в среде, содержащей Na^+ , V_{\max} была неизменной (Рис. 3.40., таблица 3.5.).

Таблица 3.5. Влияние катионов на скорость окисления сукцината клетками *S. cerevisiae* (последовательность добавок указана на Рис. 3.40.).

Среда инкубации	Скорость (пмол O_2 /мин) после добавления				
	клеток + FCCP (v_1)	сукцината (катион) (v_2)	$v_2 - v_1$	2-ундецил малоната (v_3)	$v_3 - v_1$
К - фосфатный, pH 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, pH 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

Сукцинат Na в 50 мМ калий-фосфатном буфере, исходно содержащем 72 мМ K^+ , имел вдвое худшее сродство, чем в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, исходно содержащем 72 мМ Na^+ . Величины K_M составляли, соответственно, 7,6 и 3,4 мМ, причем, V_{max} практически не изменялась (Рис. 3.41.). Аналогичный результат (Рис. 3.42.) был получен для цитрата (K_M , соответственно, 4,45 и 2,4 мМ). Модулирование сродства

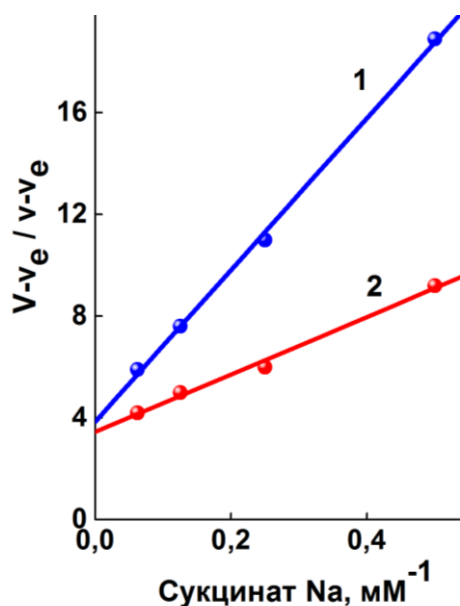


Рис. 3.41. Зависимость скорости окисления сукцината натрия клетками *S. cerevisiae* от его концентрации, координаты Лайнуивера–Берка
Среда инкубации содержала: 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), добавки: клетки 5 мг/мл (кривая 1) или 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 5,5), клетки 10 мг/мл (кривая 2). Время аэробной преинкубации клеток при 0°C 18 ч.

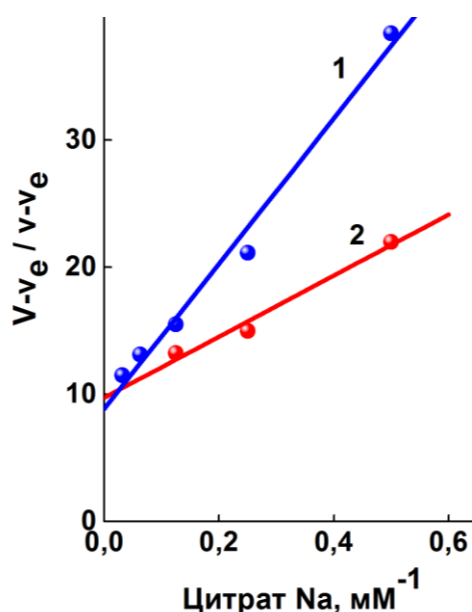


Рис. 3.42. Зависимость скорости окисления цитрата натрия клетками *S. cerevisiae* от его концентрации, координаты Лайнуивера–Берка.
Среда инкубации содержала: 50 мМ калий - фосфатный буфер (рН 5,5), добавки: клетки 5 мг/мл (кривая 1) или 50 мМ натрий - фосфатный буфер (рН 5,5), клетки 10 мг/мл (кривая 2). Время аэробной преинкубации клеток при 0°C 14 ч (б).

транспортера к сукцинату и цитрату катионами носило квазиконкурентный характер, так как маловероятно связывание в одной точке противоположно заряженных соединений – катиона и дикарбоксилата (аниона).

В то же время катионы по-разному влияли на ингибирование окисления сукцината 2-ундецилмалонатом (максимальное в среде с Tris^+ , минимальное – в среде с Na^+ (Таблица 3.5.)).

Двухзарядные катионы не активировали транспорт сукцината, а их отсутствие не приводило к ингибированию транспорта

Согласно литературным данным, значение рН цитоплазмы дышащих клеток не менялось при вариации рН среды инкубации от 4 до 8 [Beauvoit et al., 1991], а изменение концентраций добавленного к клеткам Na^+ в количестве от 0 до 300 мМ не влияло на концентрацию внутриклеточного Na^+ [de Nadal et al., 1999]. Это означало, что скорость и кинетические параметры окисления сукцината митохондриями в клетке могли оставаться неизменными при использованных нами значениях рН, катионного состава среды и времени преинкубации клеток в течение 8 - 18 ч при 0°C. Исследуя механизм транспорта дикарбоксилатов через плазмалемму *S. cerevisiae*, мы первоначально предложили в качестве наиболее вероятного механизма облегченную диффузию, экспериментально отвергнув остальные 4 возможных способа функционирования переносчика: симпорт дикарбоксилатов с протоном или катионом, АТР-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 виде электронейтрального комплекса с Mg^{2+} . Известен также электрогенный, H^+ -зависимый переносчик комплекса магния и цитрата (CitM) *Bacillus subtilis* [Boorsma A. et al., 1996].

Клетки *S. cerevisiae* содержат Mg^{2+} 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 Mg^{2+} [Pisat et al., 2009], соответственно. Не исключено, что в ходе длительной аэробной преинкубации при $0^{\circ}C$ суспензии клеток, из них могли выходить катионы двухвалентных металлов (Me^{2+}). Если механизм транспорта комплекса $[Me^{2+} \text{сукцинат}^{2-}]$ возможен, то добавление к клеткам Mg^{2+} или EDTA, который мог бы связать вышедшие из клетки Me^{2+} , должно было бы существенно влиять на скорость окисления сукцината.

На Рис. 3.43а. показано, что добавление 5 мМ $MgCl_2$ не увеличивало скорость окисления 3 и 20 мМ сукцината, Mg^{2+} практически не уменьшал сродство к сукцинату: $K_M = 3,8 \pm 0,6$ мМ и $4,2 \pm 0,5$ мМ (в присутствии и в отсутствие 5 мМ $MgCl_2$, соответственно).

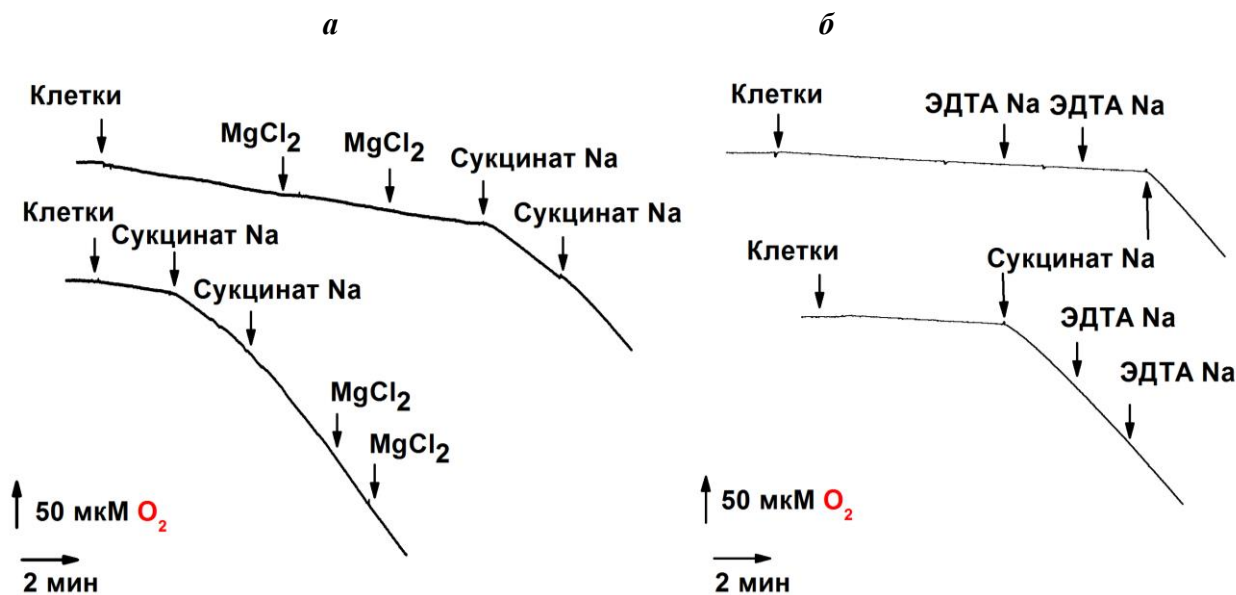


Рис. 3.43. Зависимость от времени скорости окисления сукцината Na клетками *S. cerevisiae* в присутствии и в отсутствие $MgCl_2$ (а) или ЭДТА (б). Среда инкубации содержала 50 мМ калий - фосфатный буфер (pH 6,5), добавки: 5 мМ $MgCl_2$, 3 мМ и 17 мМ сукцинат Na (первая и вторая добавки) (а) или 0,4 мМ ЭДТА Na, 20 мМ сукцинат Na (б), клетки 1,38 мг/мл. Клетки выращивали в полусинтетической среде 12 ч и преинкубировали при $0^{\circ}C$ 22–26 ч.

По-видимому, транспорт сукцината в виде комплекса с Mg^{2+} маловероятен. На Рис. 3.43б. показано, что добавление 0,8 мМ ЭДТА (концентрации достаточной, чтобы связать катионы двухвалентных металлов не уменьшало скорость окисления. По-видимому, транспорт сукцината в виде комплекса с любым из перечисленных Me^{2+} , также маловероятен. Данные Рис. 3.43. противоречат также механизму диффузии через канал, активируемый двухзарядными катионами Me^{2+} , как это описано для 32pS анионного канала в тонопласте *Conocerphalum conicum* [Trebacz et al., 2007].

3.5. Моделирование конформации 2-алкилмалонатов, O-ацил-L-малатов и α,ω -алкилендималонатов с минимальной потенциальной энергией с помощью программы Chemoffice

Большинство белков – переносчиков низкомолекулярных соединений имеют внутримолекулярный канал, через который и происходит трансмембранный транспорт [Dahl et al., 2004]. При этом «область определения сродства» к субстрату (точка связывания субстрата) экспонирована в канал или находится в его устье [Dahl et al., 2004]. Это позволило 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 было показано [Аливердиева, Мамаев и др., 2007], 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 ингибитора (молекулярного зонда) в вакууме, поскольку уравнивающее влияние микроокружения эквивалентно отсутствию этого влияния. Вытянутая конформация характерна для состояния молекулы амфифильного соединения в вакууме с

наименьшей суммой энергий связывания и отталкивания между атомами в молекуле (то есть конформации при наиболее стабильном и энергетически выгодном расположении атомов в молекуле). Исходя из изложенного выше, было проведено моделирование молекулы-зонда с помощью программы Chemoffice, и рассчитана минимальная потенциальная энергия конформации с помощью метода молекулярной механики (ММ2). Модели строили путем последовательного удлинения предыдущего соединения на одно метильное (для 2-алкилмалонатов) и этильное (для О-ацил-L-малатов) звено. Конформацию молекулы ингибитора намеренно искажали, из нескольких альтернативных вариантов расположения молекулы выбирали вариант с наименьшей потенциальной энергией. Сравнение между рядами соединений позволили заметить, что разница в длине между О-ацилмалатами и 2-алкилмалонатами с одинаковым алифатическим заместителем – 0,229 нм. (Таблицы 3.6., 3.7. и 3.8.)

Таблица 3.6. Моделирование конформации 2-алкилмалонатов.

2-Алкилмалонат	Длина от C _n до O ₁ , O ₂ , O ₃ , O ₄ (нм)	Средняя длина (нм)	Энергия (Дж/моль)
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

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.

Таблица 3.7. Моделирование конформации О-ацил-L-малатов.

О-ацил-L-малат	Длина от C _n до O ₁ , O ₂ , O ₃ , O ₄ (нм)	Средняя длина (нм)	Энергия (Дж/моль)
О-ацетиоил-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.

Таблица 3.8. Моделирование конформации α,ω- алкилендималонатов.

α,ω-Алкилендималонат	Длина O ₁ -O ₁ , O ₂ -O ₂ , O ₃ -O ₃ , O ₄ -O ₄ * (нм)	Средняя длина (нм)	Энергия (Дж/моль)
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

Примечания: * Расстояния между симметричными атомами кислорода карбоксилон первой и второй малоновых группировок в α,ω-алкилендималонатах.

Поскольку алифатический заместитель в молекуле субстрата не содержал атомов с неспаренными электронами, расчета с помощью метода ММ2, учитывающего 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.

3.6. Использование амфифильных производных субстратов для изучения активного центра транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы дрожжей *S. cerevisiae*

Ранее в группе К.Ф. Шольца (лаборатория биоэнергетики ИНБИ РАН) для моно- и диалкилмалонатов, О-ацил-L-малатов и α,ω -алкилендималонатов были получены линейные зависимости в координатах Диксона подавления этими ингибиторами сукцинатоксидазной системы митохондрий печени крысы, что свидетельствовало о том, что K_i характеризует лимитирующее звено – ДКТ [Шольц и др., 1990; Бондаренко и др., 1996]. Было показано, что ингибиторы повышали величину K_M окисления сукцината митохондрий, не меняя величины V_{max} [Шольц и др., 1990]. Конкурентный характер действия всех этих ингибиторов означал, что они взаимодействуют с точкой связывания субстрата в активном центре переносчика. Было высказано предположение о том, что критически важные для связывания субстрата остатки аргинина экспонированы в просвет канала у всех митохондриальных переносчиков дикарбоксилатов [Xu et al., 2000; Stipani et al., 2001; Cappello et al., 2006; Ma et al., 2007], а также, что третичная структура канала транспортеров представляет собой цилиндрическую полость [Walters and Kaplan, 2004]. В наших опытах 2-алкилмалонаты и О-ацил-L-малаты служили в качестве молекулярной линейки (или зонда) для измерения длины липофильной зоны канала переносчика. Изменение констант ингибирования производными малата и малоната с алифатическим заместителем ($\Delta \lg K_i = \lg K_{i(n)} - \lg K_{i(n-1)}$) при удлинении на одно метиленовое звено характеризовало степень липофильности в районе связывания последней метильной группы. При этом зонд измерял удаленность этого района от остатков аргинина точки

связывания субстрата [Шольц и др., 1990]. Зависимость $\lg K_i$ от n далее называли «липофильным профилем» (Рис. 3.44.). Было сделано предположение, что «липофильный профиль» характеризовал внутреннюю поверхность канала. В случае с бифункциональными ингибиторами – α,ω -алкилендималонатами при их удлинении предполагалось обнаружить дополнительную точку связывания дикарбоксилата в канале переносчика. Показано, что «липофильные профили» канала переносчика митохондрий печени крысы для *O*-ацил-*L*-малатов и 2-алкилмалонатов имели большое сходство. Обе кривые имели площадку для n от 4 до 8 (связывание с полярной зоной) и область уменьшения $\lg K_i$ для n от 8 до 15 (связывание с «большим липофильным участком») (результат получен в соавторстве с Д.В. Мамаевым [Мамаев, Аливердиева и др., 2006]).

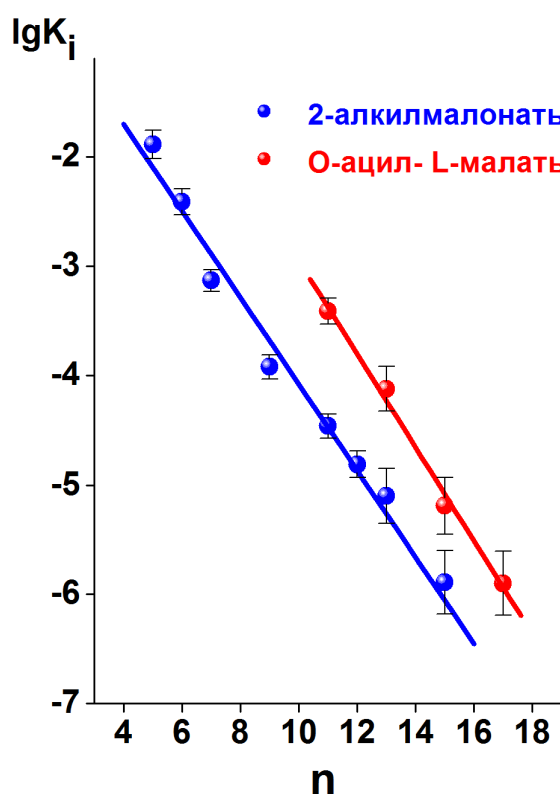


Рис. 3.44. Зависимость константы ингибирования сукцинатоксидазной системы клеток *S. cerevisiae* O-ацил-L-малатами и 2-алкилмалонатами от количества атомов углерода (n) в их алифатической цепи. Среда инкубации, содержащая 50 мМ калий – фосфатный буфер (рН 5,5), клетки (10 мг/мл). Время аэробной преинкубации при 0°C составляло 10-18 ч.

Значение молярной энергии переноса метиленового звена алкильного заместителя в ингибиторе из среды в активный центр переносчика и молярной энергии переноса метиленового звена алкильного заместителя в ингибиторе из среды в октанол (в модельной системе), были близки: $\Delta\Delta G = RT\Delta\lg K_i = 941,5 \pm 277$ Дж/моль, и $\Delta\Delta G = RT\Delta\lg R_n = 999,2 \pm$

270 Дж/моль, (где R – универсальная газовая постоянная, а T – абсолютная температура), соответственно. Это означало, что энергия взаимодействия метильного звена алифатической цепи ингибиторов с аминокислотными остатками, выстилающими канал в активном центре транспортера, была обусловлена только липофильными взаимодействиями.

При изучении активного центра транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* линейные зависимости ингибирования производными субстратов в координатах Диксона, свидетельствующие о лимитировании системы окисления сукцината клеток транспортом через плазмалемму, получали для каждого ингибитора (Рис. 3.44.). Для 2-алкилмалонатов (2-пентилмалоната и 2-пентадецилмалоната) и для L-малата и O-стеароил-L-малата было показано, что ингибиторы повышали величину K_M системы окисления сукцината клеток, не меняя V_{max} процесса.

По различным причинам не все соединения оказались пригодными для зондирования канала переносчика плазмалеммы *S. cerevisiae*. Удалось провести зондирование четырьмя соединениями из ряда O-ацил-L-малатов и впервые для этих целей применить все синтезированные в лаборатории соединения ряда 2-алкилмалонатов. Как следует из данных, приведенных на Рис. 3.44., липофильные профили O-ацил-L-малатов и 2-алкилмалонатов для системы окисления сукцината в клетках *S. cerevisiae* линейны и параллельны друг другу (зависимости для трех соединений O-ацил-L-малатов (для n от 14 до 18) получены совместно с Д.В. Мамаевым [Мамаев, Аливердиева и др., 2006]). Зависимости описываются соответствующими уравнениями: $\lg K_i = -0,427n + 1,323$ и $\lg K_i = -0,396n - 0,115$.

С увеличением степени гидрофобности соединения возрастало его сродство к активному центру. Величины коэффициентов при n в уравнениях для зависимостей $\lg K_i$ (n) для двух рядов ингибиторов были близки. Так же были близки значения молярной энергии переноса метиленового звена алкильного заместителя в ингибиторе из среды в активный центр переносчика плазмалеммы и молярной энергии переноса метиленового

звена алкильного заместителя в ингибиторе из среды в октанол (в модельном эксперименте). Следовательно, энергия взаимодействия метильного звена алифатической цепи ингибиторов с аминокислотными остатками, выстилающими канал в активном центре транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* была обусловлена только липофильными взаимодействиями.

Одновременно это свидетельствовало о том, что стерические препятствия не искажали конформацию алифатического заместителя в молекуле ингибитора, которую она имеет в состоянии с минимальной энергией, иначе бы стерические препятствия связыванию понизили бы энергию взаимодействия. Отсутствие реперной площадки, которая имела место в липофильном профиле переносчика митохондрий печени крысы [Мамаев, Аливердиева и др., 2006], не дало нам возможность предположить одинаковое расположение алифатических заместителей 2-алкилмалонатов и О-ацил-L-малатов в канале активного центра транспортера дикарбоксилатов дрожжей. Мы изучили действие на дыхание *S. cerevisiae* итаконата и L-малата, соответственно, с гидрофобной метиленовой и гидрофильной гидроксильной группой во втором положении молекулы субстрата. Данные на Рис. 3.25. свидетельствовали о лучшем средстве для итаконата ($K_i = 4,15 \pm 0,35$), более гидрофобного конкурентного ингибитора транспортера дикарбоксилатов клеток по сравнению с L-малатом ($K_i = 17,5 \pm 1,1$ мМ) (Рис. 3.25.)

По-видимому, в отличие от митохондриального переносчика, гидроксил L-малата не участвует в связывании с транспортером дикарбоксилатов плазмалеммы, и полярное сложноэфирное звено О-ацил-L-малатов может входить в канал. Это позволило предположить, что вся длина ингибитора участвовала в сканировании этого канала, что свидетельствует о том, что вблизи 2-го атома связываемого С4-дикарбоксилата имеется гидрофобная площадка. Допустив, что полярная сложноэфирная группа О-ацил-L-малатов не вносила вклад в связывание с

активным центром, длину липофильной зоны, отождествляемой с поверхностью канала, рассчитывали как разницу между длинами 2-пентилмалоната и О-стеароил-L-малата (Рис. 3.44.).

3.7. Методические принципы и подходы, использованные в работе

В процессе выполнения работы были разработаны или усовершенствованы методы и подходы к изучению трансмембранного транспорта и свойств нативных транспортеров в биологических мембранах с использованием амфифильных соединений. При этом необходимо учитывать приведенные ниже рекомендации:

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

2. Подбор таких условий подготовки и выращивания дрожжевых клеток, при которых активность эндогенных сопряженных систем окисления субстратов больше активности измеряемого транспорта, и транспорт субстрата через плазмалемму лимитировал скорость его окисления.

3. Подтверждение принципиальных результатов несколькими независимыми способами. Например, лимитирование скорости окисления сукцината его транспортом и для клеток дрожжей, и для митохондрий печени крысы было показано тремя независимыми способами. Транспорт дикарбоксилатов в клетку в дианионной форме доказан по зависимости K_M от величины рН и по наличию стереоспецифичности в паре фумарат/малеат.

4. Подбор условий, в которых эффектор (амфифильное соединение), используемый для изучения транспорта, не проникал через мембрану к измеряющей транспорт системе (в случае трансплазмалемного транспорта в клетки дрожжей) или не влиял на электрон-транспортную цепь (в случае транспорта в митохондриях печени крысы). Разработка простых тестов на такую непроницаемость.

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

3.8. Методические достижения и анализ новых свойств пороформеров

Из данных Таблицы 3.9. следует, что примененный нами подход позволяет исследовать характеристики пороформирующих пептидов в диапазоне от 40 до 4600 мкМ. С учетом данных по содержанию усредненного липида в митохондриях печени крысы (250 нмоль/мг белка митохондрий [Lenton et al., 1995]) и удельного объема липидной фазы (10^{-6} л/мг [Шольц, Захарова, 1980]), это соответствовало соотношениям пептид/липид от 1/625 до 1/54. Для аламетицина эта зона соотношений (вблизи 1/625) не была изучена.

Сопоставление литической и эффективной концентрации (КЛМ/ A_{200}) свидетельствовало о том, что амфифильные пептиды не разрушали митохондрии, используемые в качестве биосенсора. Возможно, липид в бислое полностью дезорганизован при соотношении пептид/липид, близком к КЛМ, так как это преимущественно «припептидный» липид.

Таблица 3.9. Эффект пороформеров на митохондрии печени крысы (сводные данные)

Параметр	Название пептида (среда инкубации, в которой получены характеристики)			
	Мастопаран (а)	Мелиттин (б)	ТАМ (в)	Аламетицин (г)
A_{200} , мкМ	1,15±0,15 (3)	0,385±0,015 (2)	0,08 [**]	0,065±0,004 (2)
K_p	(0,73±0,04) × 10 ⁵ [***] (3)	>>1×10 ⁴ [**]	>>1×10 ⁴ (2)	(0,76±0,01) × 10 ³ [****] (2)
C_m , мкМ	4600	1540	320	40
КЛМ, мкМ	15,6±0,1 [***] (3)	3,8 [**]	0,6 [**]	2,9±0,1 [****] (3)
КЛМ/ A_{200}	13,6	9,9	7,5	44,6
Порядок реакции	1,83±0,23 (3)	2,01±0,15 (2)	–	1,92±0,07 (3)
A_{K^+}/A_{Li^+}	1,18±0,02 (3)	1,12±0,03 (3)	1,39±0,01 (3)	1,39±0,04(1,59*) (3)
Подавление $\Delta\psi$	умеренное стабилизирующееся		радикальное	
Самоассоциат, лимитирующий проводимость	непроводящая предпора		проводящая пора	

Примечания: В скобках при цифрах – количество независимых измерений или ссылка, A_{200} – концентрация пептида, активирующая v_4 на 200%, C_m – равноэффективная мембранная концентрация, соответствующая A_{200} , которую рассчитывали по формуле: $C_m = A_{200}/(1/K_p + \lambda B)$ [Шольц, Захарова, 1980], где λ , равное 0,001мл/мг, – удельное содержание доступной эффектору гидрофобной фазы (удельное содержание липида в митохондриях), B – концентрация митохондрий печени крысы. Для $K_p > 1 \times 10^5$ – рассчитывали по формуле: $C_m = A_{200}/(\lambda B)$, КЛМ – концентрация пептида, вызывающая лизис митохондрий. Среда инкубации содержала: 125 мМ сахарозу, 2 мМ EDTA, 20 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 10 мМ KН₂PO₄, 10 мМ сукцинат Na, ротенон (2 мкг/мг белка), 20 мМ Tris-HCl (pH 7,2) (а), или 176 мМ сахарозу, 10 мМ HEPES (pH 7,5) (б), или 194 мМ сахарозу, 1 мМ KН₂PO₄, 10 мМ HEPES (pH 7,5) (в,г) и митохондрии (0,25 мг белка/мл, кроме графы с K_p).

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

** - Шольц и др., 1980.

*** - Шольц, Аливердиева и др., 1983.

**** - Шольц, Аливердиева и др., 1985.

В таком случае при соотношениях от 1/625 до 1/54 можно игнорировать кооперативный эффект липида бислоя, учитывая при этом, что при генерации $\Delta\psi$ весь мембраносвязанный пептид находится в трансмембранном состоянии. Скорости дыхания измеряли в стационарном

режиме в течение нескольких минут. При этом набухание митохондрий в присутствии пороформеров в течение почти 15 мин не приводило к повреждению внутренних мембран органелл (Рис. 3.1.) и не влияло на их способность генерировать $\Delta\psi$. В этих условиях формальный порядок реакции отражал именно реакцию ассоциации мономеров на лимитирующей стадии порообразования. В этом метод с применением биосенсора имеет неоспоримые преимущества по сравнению с традиционными методами (с использованием модельных систем, например, БЛМ), хотя применим в узком диапазоне температур, ионной силы и вариаций липидного состава мембраны.

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

В литературе сложилась практика распространять на представления о пептидном характере пор, экспериментально обоснованные только для высокоолигомерной поры, и на низкоолигомерные поры. Мы предположили, что низкоолигомерная пора аламетицина содержала липид (см. 3.3.2.). Пептидная пора свободно пропускала гидратированный K^+ в том случае, если она имела пентамерную [Chiriac and Luchian, 2007] или гексамерную [Wei and Pohorille, 2023] структуру. В наших опытах на основании определения порядка реакции для первой фазы активации

дыхания митохондрий, индуцированной аламетицином, показано, что пора, образованная димером аламетицина, может также пропускать гидратированный K^+ . Хотя модель тороидальной (липидсодержащей) поры для аламетицина непопулярна, наши результаты не противоречат некоторым представлениям и экспериментальным данным о взаимодействии аламетицина с липидами бислоя.

Трансмембранный мономер пептида формирует в обоих лепестках бислоя лунку с «утонченным» бислоем, что при столкновении (и сближении) мономеров способствует формированию липид-пептидной поры (Mihajlovic and Lazaridis, 2010) и, по-видимому, ее стабилизации [Kessel et al., 2004], т. е. увеличению её среднего времени жизни, по сравнению с чисто липидной порой. Тороидальная пора с участием аламетицина облегчает переход пептидов из наружного лепестка мембраны во внутренний. При этом дополнительная стабилизация поры может происходить за счет энергетически выгодной ассоциации двух молекул аламетицина в «противофазе»: «голова к хвосту» [Mottamal and Lazaridis, 2006].

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

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

Ключевым в исследовании проницаемости, индуцированной низкоолигомерной формой аламетицина, является разделение во времени калиевого трансмембранного тока через фракции низко- и высокоолигомерных каналов. В модельных системах (БЛМ, например) это удастся только в рамках «метода одиночного канала», который исключает исследование зависимости проводимости от концентрации пептида. Нижнее проводящее субсостояние канала, образованного аламетицином, соответствует флуктуации проводимости с наименьшей амплитудой и это вынуждает исследователей использовать высокие концентрации катионов. Предложено объяснение, почему именно митохондрии позволяют разделить во времени калиевый трансмембранный ток, индуцированный фракциями низко- и высокоолигомерных каналов аламетицина (Рис. 3.21.). Внутренняя мембрана митохондрий обогащена преимущественно гидрофобными белками [Bennet et al., 2022]. В процессе латеральной диффузии, и интегральные мембранные белки, и мономеры пороформеров, погруженные в бислой липидов мембраны, находятся в постоянном взаимодействии. При этом в нативных мембранах по сравнению с БЛМ, возможны неупругие столкновения белково-липидных комплексов, что делает их контакты в момент столкновения относительно долгоживущими. При достаточно низкой (40 мкМ) концентрации аламетицина во внутренней митохондриальной мембране (C_m = соотношение пептид/липид – 1/625) формальный «свободный» пробег между столкновениями собственно мономеров аламетицина может быть существенно больше, чем в БЛМ или липосомах при аналогичном соотношении. Это объясняет возможность измерения калиевой проводимости, индуцированной в митохондриях низкоолигомерной формой (димером) аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм.

Как отмечалось выше, результаты, представленные на Рис. 3.2б, 3.3б, 3.17вг., 3.18б, 3.21б., 3.22б, свидетельствовали о том, что по эффективности снижения величины $\Delta\psi$ в митохондриях печени крысы при одинаковой

активации v_4 (и, следовательно, калиевого трансмембранного тока) исследуемые нами пороформеры подразделяются на 2 группы: умеренно (мелиттин и мастопаран) и радикально (ТАМ и аламетицин) влияющие на величину $\Delta\psi$. Данные о соотношении активации v_4 митохондрий печени крысы этими пороформерами в монокалийевой и монокальциевой средах (см. разделы 3.3.1. и 3.3.3.) свидетельствовали о том, что трансмембранный ток, индуцированный мастопараном и мелиттином, лимитирован самоассоциацией мономеров в непроводящую предпору, а ток, индуцированный ТАМ и низкоолигомерным аламетицином, лимитирован образованием поры.

Исследования последних лет с применением методов двумерной флуоресцентной микроскопии [Wang et al., 2022], криоэлектронной томографии, атомно-силовой микроскопии [Chen et al., 2023], а также моделирования атомных структур методом молекулярной динамики [Sun et al., 2022] показали, что в зависимости от концентрации пороформера, условий опыта и липидного состава мембраны для одного и того же пептида возможны различные механизмы порообразования. На основании новых данных литературы и собственных результатов, нами предложен иной по сравнению с описанным ранее [Шольц и др. 1980, Шольц и др., 1983, Шольц и др., 1985] механизм образования пор пептидами – пороформерами в сопрягающей мембране митохондрий. На Рис. 3.45. представлена модель самоассоциации пептидов – пороформеров в мембране и наиболее вероятные равновесные формы олигомеров.

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

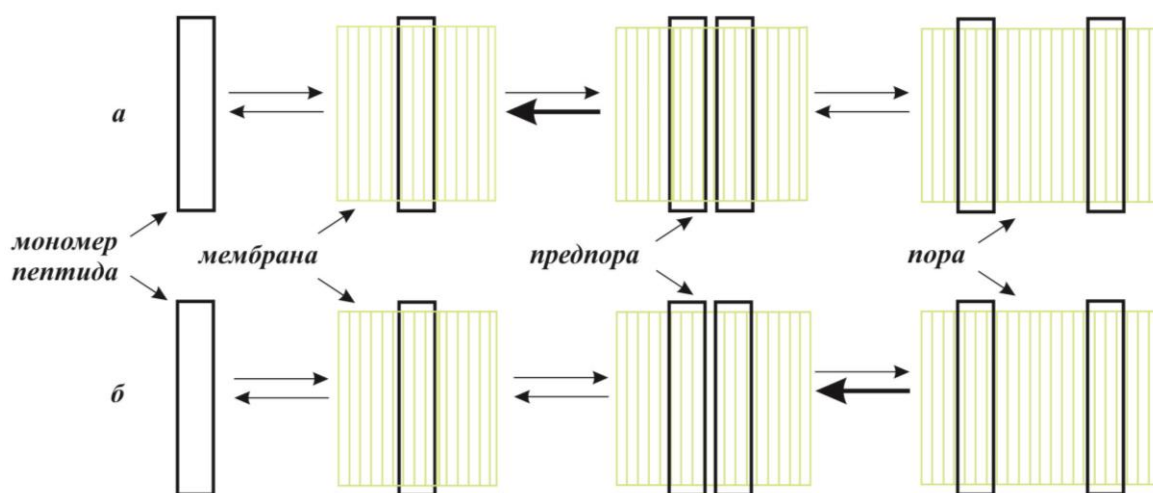


Рис. 3.45. Модель самоассоциации пептидов - пороформеров в мембране: *а* – мелиттина или мастопарана; *б* – аламетицина или ТАМ; выделенная стрелка иллюстрирует сдвиг равновесия.

В отдельных опытах для проверки препарата прочносопряженных митохондрий печени крысы в качестве тест-системы по выявлению возможных побочных эффектов потенциальных лекарств, нами были использованы также и модельные митохондриально-направленные антиоксиданты SkQ1, SkQ3, SkQThy и MitoQ. На митохондриях печени крысы было показано, что эти соединения влияли на величину $\Delta\psi$ и синтез АТФ в строгом соответствии с выявленной разобщающей активностью, специфического ингибирующего эффекта на синтез АТФ обнаружено не было. Ни одно из этих соединений не вызывало высокоамплитудного набухания митохондрий, что свидетельствовало об отсутствии их влияния на неспецифические митохондриальные поры и каналы. Пороформер аламетицин, как агент, вызывающий набухание митохондрий, использовали в этих опытах в качестве положительного контроля (Рис. 2.3.).

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

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

– Окисление сукцината клетками при pH 6,5 и 7,5 (pK_a 4,21 и 5,72) [Dawson et al., 1986] происходило в отсутствие его недиссоциированной формы (Рис. 3.40, Таблица 3.5).

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

– Эффективное конкурентное ($K_i = 6,6 \pm 1,3$ мкМ) ингибирование окисления сукцината не проникающим в клетку ингибитором О-пальмитоил-L-малатом.

– Модулирование катионами и значениями pH среды инкубации величин K_M и V_{max} окисления сукцината клетками.

– Стереоспецифичность ингибирования окисления сукцината в условиях лимитирования транспортом через плазмалемму свидетельствовала о транспорте субстрата в форме дианиона.

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

Cooper, 1987] или аспарат [Regenberg et al., 1998]. Однако активность всех этих переносчиков подавлялась протонофорами, в отличие от окисления сукцината клетками дрожжей. Поскольку зависимость ингибирования окисления сукцината и цитрата непроницающим в клетку ингибитором 2-ундецилмалонатом в координатах Диксона линейная, можно предположить существование общего переносчика этих субстратов. рН профиль активности транспортера (Таблица 3.4.) свидетельствовал о транспорте субстратов в дианионной форме, а ингибирование фумаратом, но не малеатом (Рис. 3.30.) позволило предположить, что субстрат транспортируется в *транс*-конформации.

Широкая субстратная специфичность характерна для известных дикарбоксилатных транспортеров дрожжей [Lodi et al., 2004; Saayman et al., 2000]. Однако способность транспортировать цитрат и влияние катионов на их транспортную активность не были описаны. Исследованный нами транспортер не имеет аналогов среди транспортеров дикарбоксилатов плазмалеммы грибов. Na^+ -зависимые дикарбоксилатные симпортеры плазмалеммы, способные транспортировать цитрат, найдены у животных [Pajor, 2006], растений [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 транспортер дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* переносил L-малат, сукцинат, малонат и фумарат. После опубликованных нами работ были получены экспериментальные свидетельства присутствия в плазмалемме *S. cerevisiae* чувствительного к рН транспортера фумарата [Jamalzadeh et al., 2012].

Свойства изучаемого нами переносчика позволяют высказать предположение о возможном механизме его функционирования. Известны следующие механизмы: симпорт дикарбоксилата с протоном или катионом, АТР-зависимый транспорт, электронейтральный антипорт и унипорт [Lolkema et al., 2005]. Нечувствительность транспорта сукцината к протонофору в концентрациях, деэнергизирующих плазмалемму (Рис. 3.15а, кривая 2) позволяет отвергнуть в качестве механизма симпорт дикарбоксилата 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, 1987] и аспарат [Regenberg et al., 1998]. Окисление сукцината клетками *S. cerevisiae* нечувствительно к действию протонофора в концентрациях, активирующих окисление глюкозы (Рис. 3.15а., кривые 2 и 1, соответственно). Такая активация, по всей вероятности, связана с разобщением митохондрий и сопутствующим этому уменьшением внутриклеточной концентрации АТР. Это же делает маловероятным АТР-зависимый транспорт сукцината. Электронейтральный антипорт в качестве физиологически целесообразного механизма подразумевает соизмеримые концентрации дикарбоксилатов по обе стороны плазмалеммы. Для изучаемого переносчика они должны быть соизмеримы с величиной K_M для сукцината сукцинатоксидазной системы, колеблющейся при рН 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 K_M для сукцината сукцинатоксидазной системы составляют для *P. tannophilus* – 0,064 мМ [Harrod et al., 1997], для *K. marxianus* – 0,031 мМ [Côte-Real et al., 1989], для *C. utilis* – 0,124 мМ

[Cássio, 1993]). Клетки *S. cerevisiae* окисляли сукцинат в среде, в которой единственным катионом является непроникающий катион Tris^+ (Рис. 3.40б, оксиграмма 2). Это делает маловероятным симпорт с катионом в качестве возможного механизма транспорта. Обычно в качестве косубстрата дикарбоксилатные симпортеры используют только катионы щелочных металлов (ссылки в обзоре [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 глюкозы [Ozcan et al., 1996], обладающих сравнительно низкой активностью в клетке *S. cerevisiae*, но высоким сродством к субстрату. Мы также показали, что электронейтральный транспорт дикарбоксилата в комплексе с двухзарядными катионами маловероятен (Рис.3.43.). Наши данные о кинетических свойствах транспортера не противоречат механизму неэлектрогенного унипорта. В рамках этого механизма, однозарядные катионы (Рис. 3.38 и 3.39) могут быть модуляторами сродства дианиона сукцината через гипотетический аллостерический центр, локализованный на внешней стороне плазмалеммы. Катионный состав и рН могут меняться во внешней среде, но не в цитоплазме *S. cerevisiae* [Purwin et al., 1986; de Nadal et al., 1999]. Следовательно, предполагаемый регулирующий центр транспортера, вероятно, может быть экспонирован во внешнюю среду.

В процессе роста клетки *S. cerevisiae* закисляют внешнюю среду за счет выброса протона при функционировании АТР-азы, доминирующего белка плазмалеммы [van der Rest et al., 1995], а значение рН цитоплазмы клеток *S. cerevisiae*, выращенных в присутствии глюкозы, составляет 6,5 – 7,0 [Beauvoit et al., 1991]. Низкая активность транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы и невысокое сродство к субстратам (Таблица 3.4.), характерное, скорее, для переносчиков внутренних органелл [Шольц, 1994], транспорт субстрата в дианионной форме, эффективный при нейтральных

pH, позволяют предположить, что возможная физиологическая роль этого переносчика – рецепция высоких концентраций внешних дикарбоксилатов.

3.10. Липофильный профиль канала переносчика дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae*, сравнение с липофильным профилем канала ДКТ митохондрий печени крысы

Зондирование канала переносчиков вблизи точки связывания субстратов с помощью конкурентных ингибиторов является весьма информативным. Митохондриальные переносчики отличаются от транспортеров плазматической мембраны размером, количеством трансмембранных сегментов и механизмами функционирования. Их объединяет только наличие канала в структуре. Разумно предположить, что этот канал – единственное место в структуре переносчика, где алифатическая цепь конкурентного ингибитора может иметь конформацию с минимальной энергией, как предсказывают углы наклона зависимостей логарифма K_i от длины этой цепи.

Линейность (однофазность) зависимостей в координатах Диксона для О-ацил-L-малатов, О-ацил-D-малатов и α,ω -алкилендималонатов, а также 2-алкилмалонатов и 2,2-диалкилмалонатов для транспортера митохондрий печени крысы [Шольц и др., 1990] свидетельствовала о том, что все они взаимодействуют с единственным белком – ДКТ и конкурируют с его субстратом – сукцинатом. Если при связывании каждого из эффекторов активный центр переносчика находился в одной и той же конформации, то различия в ингибировании определялись бы особенностями субстрат-связывающей точки и ее ближайшего окружения. Опираясь на результаты, полученные ранее в группе К.Ф. Шольца [Шольц и др., 1990; Бондаренко и др., 1996] и на собственные результаты, для О-ацил-L-малатов, 2-алкилмалонатов (Рис. 3.44), можно предположить, что одинаковые участки алифатической цепи ингибиторов связываются одними и теми же участками канала транспортера [Мамаев, Аливердиева, 2006].

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

конформации ингибиторов с наименьшей потенциальной энергией, для внешнего канала антипортера митохондрий были внесены уточнения в расчет длины малого, большого липофильных участков и разделяющей их гидрофильной площадки, которые составили 0,37, 0,76 и 0,49 нм, соответственно.

Трикарбоксилатный, дикарбоксилатный транспортеры и ADP/АТР антипортер митохондрий ингибируются ацилами-КоА конкурентно к своим субстратам [Morel et al., 1974; Ventura et al., 2005]. Качественная зависимость интенсивности ингибирования от числа углеродов в ацильном заместителе (n) до 10-го атома одинакова и линейна в координатах $\lg K_i(n)$ [Morel et al., 1974]. Для дикарбоксилатного транспортера эта закономерность была подтверждена и в опытах по окислению сукцината препаратом митохондрий в присутствии протонофора [Ventura et al., 2005]. Это позволило предположить сходство ближайшего окружения точки связывания в канале для всех трех переносчиков и использовать для описания ДКТ митохондрий печени крысы 3D-модель ADP/АТР антипортера митохондрий, созданную на базе структуры, полученной с разрешением 2,2 Å [Rebay-Peyroula et al., 2003], принятую в качестве архетипа [Walters and Kaplan, 2004] (Рис. 3.46a.).

На модели показано рассчитанное нами с помощью программы Chemoffice MM2 распределение липофильных и гидрофильных зон на внутренней поверхности канала транспортера. Было высказано предположение, что транспортер дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* соответствует модели, которая описывает все известные к настоящему времени специфические переносчики небольших гидрофильных молекул. Модель калиевого канала бактерии *S. lividans* была создана на основе рентгеноструктурных данных с разрешением 3,2 Å [Doyle et al., 1998]. Модель содержит цилиндрическую полость – канал (гидрофобный для K^+ канала), большое гидрофильное устье, обращенное во внешнюю среду и меньшее – в цитоплазму.

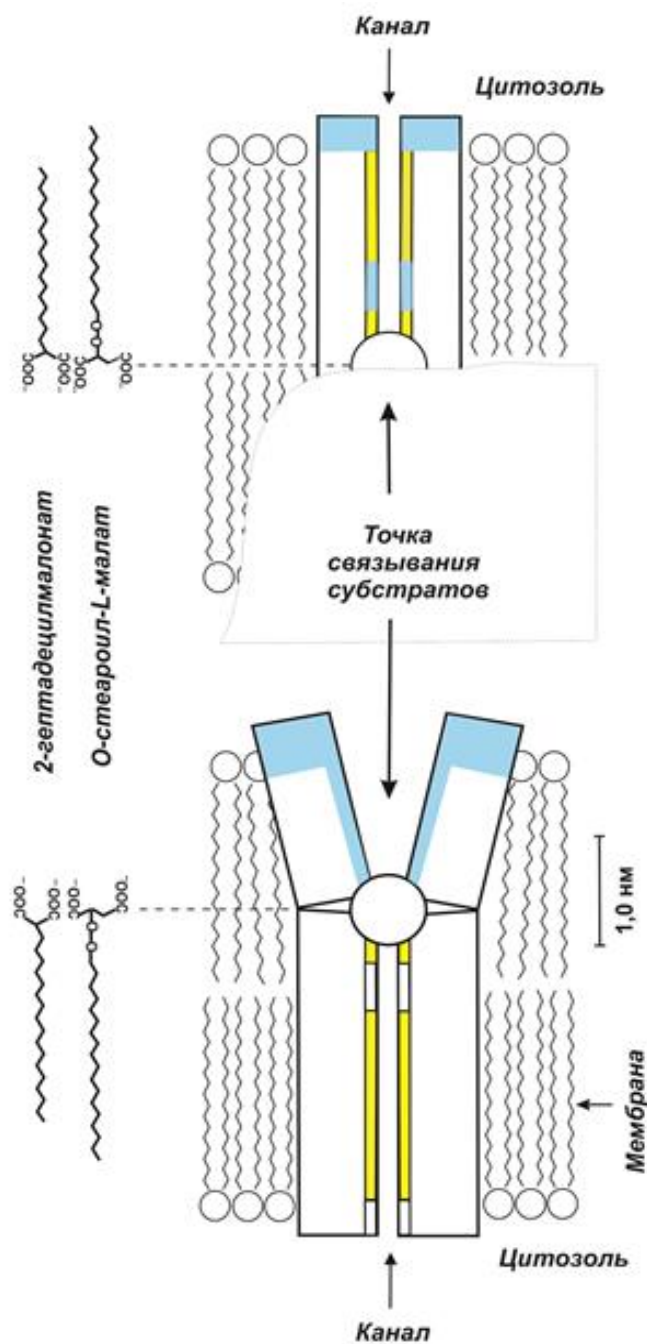


Рис. 3.46.

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

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

Гидрофильная область 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.

Единственная зона, определяющая селективность канала находится в большом устье. Вход и выход из канала окружены выступающим в среду гидрофильным валиком, а канал сформирован преимущественно гидрофобными α -спирализованными трансмембранными сегментами [Doyle et al., 1998].

Модель канала *S. lividans*, созданная [Doyle et al., 1998], позволила предположить, что алифатический заместитель конкурентных ингибиторов

в комплексе с транспортером дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* «опущен» в канал (Рис. 3.46б.). В противном случае, около 80% длины алифатического заместителя наиболее длинных ингибиторов должна была обгибать обширную гидрофильную зону. Липофильный профиль при этом отличался бы от профиля, полученного в данной работе (Рис. 3.44.), и представлял собой прямую, параллельную оси абсцисс, или участок с небольшим наклоном.

В первичной структуре многочисленных переносчиков малата и сукцината цитоплазматической мембраны бактерий и плазмалеммы дрожжей показано наличие консервативных положительно заряженных аминокислотных остатков (например, Arg⁺ [McClelland et al., 2001; Kaneko et al., 2002; Lodi et al., 2004]), играющих важную роль в связывании субстрата.

Если предположить, что карбоксильная группа (малата или малоната в молекуле ингибитора) взаимодействовала с положительно заряженными аминокислотными остатками активного центра транспортера, то канал переносчика плазматической мембраны оставался липофильным на расстоянии 2,56 нм (длина О-стеароил-L-малата) от точки связывания субстрата (Рис. 3.46б.). В непосредственной близости от точки связывания дикарбоксилатов (до 0,72 нм) также имелась липофильная область, о чем свидетельствовало более эффективное ингибирование транспорта итаконатом по сравнению с L-малатом. (Рис. 3.25.).

Протяженность гидрофобного участка липофильного профиля оценивали как разницу длин О-стеароил-L-малата (2,56 нм) и 2-пентилмалоната (0,72 нм) – самого длинного и самого короткого молекулярных зондов. Она составила 1,84 нм. В этом липофильный канал транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* имеет сходство с каналом калиевого переносчика бактерии *S. lividans* [Doyle et al., 1998], у которого протяженность гидрофобной зоны, рассчитанная из его трехмерной структуры, составляла 2,4 нм. Очевидна перспективность

разработки новых подходов к «сканированию» каналов переносчиков в нативных условиях.

3.11. Перспективы изучения липофильных профилей ионных каналов с точечными мутациями.

Для ряда митохондриальных переносчиков (цитратного [Xu et al., 2000], 2-оксоглутаратного транспортеров [Stipani et al., 2001] и ADP/АТР антипортера [Marty et al., 1992]) показано, что замена инвариантных остатков аргинина, находящихся в глубине трансмембранных сегментов, приводит к необратимой потере активности. У ДКТ митохондрий печени крысы три консервативных 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, какие из этих основных остатков могут участвовать в формировании субстратсвязывающих точек в центре канала дикарбоксилатного транспортера. Линейные зависимости в координатах Диксона для О-ацил-L-малатов, α,ω -алкилендималонатов, а также 2-алкилмалонатов и 2,2-диалкилмалонатов [Шольц и др., 1990] свидетельствовала о том, что все они взаимодействовали с ДКТ конкурентно с его субстратом – сукцинатом.

На основании сравнительного 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 цитрат-изоцитратный [Ma et al., 2007] и 2-оксоглутаратный [Cappello et al., 2006] транспортеры митохондрий дрожжей, получили противоположные данные о количестве точек связывания дианиона субстрата в канале. При этом они применили идентичный подход: сопоставили первичную последовательность

соответствующего переносчика с обобщенной трехмерной моделью антипортера, созданной на базе кристаллографических данных для ADP/ATP антипортера митохондрий [Walters and Kaplan, 2004]. Обе группы исследователей [Ma et al., 2007; Cappello et al., 2006] 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 аминокислотные остатки, определяющие K_M и V_{max} и, соответственно, связанные с путем транслокации цитрата [Kaplan et al., 2000; Ma et al., 2007] и 2-оксоглутарата [Cappello et al., 2006], соответственно. Только для цитрат-изоцитратного, но не 2-оксоглутаратного переносчика путь транслокации субстрата в канале содержал две неперекрывающиеся точки связывания субстрата.

Трехмерные структуры дикарбоксилатных транспортеров не изучены, и для интерпретации результатов применялись модели, созданные на основании рентгеноструктурных данных для иных переносчиков [Doyle et al., 1998; Pebay–Peyroula et al., 2003; Walters and Kaplan, 2004, Jaramillo-Martinez et al., 2021]. Обобщенная модель и примененный нами 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 (мышь [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, по видимому, свидетельствовало, что не все пять остатков серина экспонированы в канал 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 L-малату. 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 α -кетоглутаратного 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 остаток аргинина этого сегмента заведомо экспонирован в канал, и показали, что каждый четвертый остаток от него после замены на остаток цистеина становился доступным для растворимого модифицирующего агента [Kaplan et al., 2000; Stipani et al., 2001]. Рентгеноструктурные данные, полученные с достаточно высоким разрешением, для члена семейства митохондриальных переносчиков [Rebay-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.

α -Спиральные трансмембранные 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 [Rajor et al., 1998]. Для подобных переносчиков зондирование канала вблизи точки связывания

субстратов с помощью ингибиторов – производных этих субстратов, представляется весьма информативным.

В настоящее время переносчик плазмалеммы *S. cerevisiae*, по-видимому, единственный дикарбоксилатный транспортер плазмалеммы дрожжей, для которого охарактеризовали липофильность внутренней поверхности канала. Имеется большое количество 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 расположены в молекуле в одной плоскости и не перпендикулярны плоскости мембраны [Dahl et al., 2004] (Обзор литературы, раздел 1.8.), как это обычно представляют [Majima et al., 2002]. Поэтому, положение субстратсвязывающей точки относительно начала или конца канала сложно предсказать в результате анализа положения остатков аргинина в первичной структуре. Может оказаться информативным искажение линейного липофильного профиля канала (появление площадки, как на липофильном профиле переносчика митохондрий печени крысы [Мамаев, Аливердиева и др., 2006]) в результате точечной мутации (замены гидрофобного аминокислотного остатка на гидрофильный) в переносчике. В то же время известно, что цитрат-изоцитратный транспортер дрожжевых митохондрий с точечной заменой единичного остатка Glu-122 в III трансмембранном сегменте сохранял функциональную активность немодифицированного транспортера после реконструкции в липосомы [Ma et al., 2007].

Надо отметить, что для сканирования каналов переносчиков применяется трудоемкий метод замены аминокислотных остатков на цистеиновые, то есть получением мутантного белка генно-инженерными

методами, его встраиванием в липосомы и изучением транспортной активности громоздкими прямыми методами [Markham et al., 2021].

Это делает перспективным разработку новых подходов к сканированию каналов переносчиков в нативных условиях. Разработка простых подходов к изучению трехмерной структуры позволит сократить разрыв между многочисленными транспортерами с установленной первичной структурой [Wu et al., 2023] и сравнительно немногочисленными переносчиками с изученной третичной структурой.

К настоящему времени известно более 50-ти рентгеновских структур переносчиков гидрофильных субстратов, причем только некоторые из них имеют разрешение (1,2 Å), достаточное для идентификации аминокислотных остатков, выстилающих канал транспортера [Rosa et al., 2019]. Показано, что внутренняя поверхность бактериального калиевого канала [Jiang et al., 2002] и канала переносчика аммония термофильной бактерии *Archaeoglobus fulgidus* [Andrade et al., 2005] выстланы гидрофобными аминокислотными остатками, а ацетилхолинзависимый канал синапсов в открытом состоянии содержит значительное количество полярных остатков [Miyazawa et al., 2003]. При этом вопрос о липофильности ионных каналов нативных переносчиков все еще не решен.

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

Может показаться очевидным, что традиционные (прямые) методы измерения трансмембранного транспорта в клетки предпочтительнее методов непрямых, с использованием ЭСС. Время измерения скорости поглощения кислорода клетками или митохондриями в присутствии одной концентрации субстрата использованным нами непрямой методом, составляет не более 5 мин. Возможность получить значения K_M или I_{50} при

этом в одной оксиметрической кривой позволяла избежать ошибок, связанных с точностью добавления органелл или клеток и определения их количества (см. Материалы и методы исследования). При этом, время измерения скорости транспорта пирувата 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, невозможность изучения транспортного процесса в динамике и корректного измерения его кинетических параметров [Martinez-Crespo et al., 2021]. Метод локальной фиксации потенциала (пэтч-кламп), как отмечалось выше (Обзор литературы, раздел 1.1.), непригоден для измерения электронейтрального антипорта, и мало приспособлен для измерения низких транспортных активностей [Festa et al., 2022; Bazzone et al., 2023]. Поэтому использование непрямых, но количественных и быстрых методов, оправдано. Существует также проблема однородности популяции белков-транспортёров 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 транспортёров не гарантировано. В биологических мембранах единообразие ориентации переносчиков не вызывает сомнений, а

гомогенность популяции органелл или клеток поддается контролю. Кроме того, применение непроникающих в митохондрии и клетки эффлекторов дополнялось возможностью исследования транспортера митохондрий печени крысы или переносчика плазмалеммы *S. cerevisiae* только с одной (внешней) стороны мембраны.

Липофильную зону вблизи субстратсвязывающей точки в активном центре транспортера отождествляли с соответствующей гидрофобной зоной канала транспортера. Есть основания предполагать, что такие зоны есть во многих переносчиках гидрофильных субстратов (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 обоснованы и экспериментально подтверждены методологические подходы к изучению трансмембранного транспорта и измерения активности нативных транспортеров в интактных системах. Предложено использовать ферментативные системы окисления субстратов в препаратах митохондрий и клеток в качестве эндогенных сопряженных систем (ЭСС) для изучения трансмембранного транспорта моно-, ди- и трикарбоновых кислот. С использованием данного подхода показано, что в диапазоне от pH 5,5 до pH 7,5, транспорт сукцината через плазмалемму *S. cerevisiae* опосредован O-пальмитоил-L-малат чувствительным транспортером с уникальными и нетипичными для плазмалеммы грибов свойствами. Предложенный подход применим для изучения и поиска малоактивных переносчиков окисляемых субстратов дрожжей.

Для изучения активного центра нативного транспортера дикарбоксилатов плазмалеммы *S. cerevisiae* проведено зондирование с использованием непроникающих конкурентных ингибиторов, производных субстрата 2-алкилмалонатов с монотонно увеличивающимся алифатическим заместителем. Показано, что в канале активного центра транспортера, переносящего гидрофильный субстрат (дикарбоксилат), выявлена протяженная (1,84 нм) липофильная зона на расстоянии 0,72 нм от точки связывания субстрата. В отсутствие рентгеноструктурных 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 сопоставить информацию о третичной структуре транспортеров в биомембране и в кристалле, что представляет отдельный интерес. Показана возможность использования суспензии прочносопряженных митохондрий в оксиметрической ячейке в

качестве бесконтактного биосенсора трансмембранного катионного тока, индуцированного пептидами - пороформерами. Показано, что с помощью такого подхода можно измерить стационарную калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина на фоне проводимости его высокоолигомерных форм в условиях генерации трансмембранного потенциала при низких соотношениях пептид/липид и оценить диаметр поры. Принимая во внимание исследования последних лет [Sun et al., 2022; Wang et al., 2022; Chen et al., 2023] и опираясь на собственные результаты, предложены два механизма самоассоциации пороформеров в биомембране: с замедлением образования непроводящей димерной предпоры и с замедлением образования транспортирующего канала. Показано влияние пептидов-пороформеров на величину трансмембранного потенциала митохондрий. Полученные результаты расширяют представление о механизмах действия пороформирующих пептидов на митохондрии, а также возможного токсического действия разработанных на их основе препаратов медицинского назначения. Предложенный подход (использование митохондрий в качестве биосенсора трансмембранного катионного тока) на примере 4-х пептидов-пороформеров, можно в перспективе применить для изучения побочных эффектов 10-ти широко используемых в современной медицине пороформеров-антибиотиков и двух десятков пороформеров, которые по данным FDA (Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств) находятся на второй стадии клинических испытаний.

Кроме того, переход мономеров пептидов - пороформеров в трансмембранное положение в присутствии $\Delta\psi$ рассматривают как модель заякоривания трансмембранных сегментов при встраивании белков-переносчиков в мембрану [Stephani et al., 2024]. Среди мембранных белков, в частности, описаны транспортеры, самособирающиеся из двухсегментных мономеров [Maguire, 2006; Uthayabalan et al., 2023]. Это свидетельствует,

что самособирающиеся в пору полипептиды, подобные исследованным в данной работе, и нативные мембранные белки-транспортеры могут иметь общие черты, что важно для понимания механизма их сборки, встраивания в мембрану, функционирования и регуляции.

ВЫВОДЫ

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

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

3. Показано, что стационарную калиевую проводимость, индуцированную в митохондриях низкоолигомерной формой аламетицина, можно измерить на фоне проводимости его высокоолигомерных форм. Пора, образованная аламетицином во внутренней мембране митохондрий, может содержать димеризованный пептид и липид.

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

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аливердиева Д.А., Шольц К.Ф. Количественное определение общего белка митохондрий с кумасси // Прикл биохим и микробиол. – 1984. – Т. 20. – С. 823-830.
2. 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.
3. Бондаренко Д.И., Мамаев Д.В., Шольц К.Ф. Локализация точек связывания субстратов в дикарбоксилатном транспорте митохондрий // Докл Академии наук. – 1996. – Т. 349, № 3. – С. 408-410.
4. Бутылин А.А., Ритов В.Б. Прохождение аденозинтрифосфата через аламетициновые каналы в бислоистой липидной мембране // Докл АН СССР. – 1990. – Т. 310. – С. 731-734.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Негода А.Е., Качаева Е.В., Миронова Г.Д, Чайлахян Л.М. Механизм регуляции митохондриального АТФ-чувствительного калиевого

- канала адениновыми нуклеотидам // Докл Академии наук. – 2005. – Т. 400. – С. 116-118.
9. Новоселова А.В. Методы исследования гетерогенных равновесий. – М.: Высшая школа, 1980. – 166 с.
 10. Самарцев В.Н. Жирные кислоты как разобщители окислительного фосфорилирования // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – С. 991-1005.
 11. 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.
 12. 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.
 13. Шольц К.Ф. Транспорт субстратов в митохондриях // Усп. биол. химии. – 1994. – Т. 34. – С. 167-187.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Шольц К.Ф., Мамаев Д.В. Взаимодействие цитохрома с с белками митохондрий и цибакрон-декстраном // Биохимия. – 1985. – Т. 50, No 11. – С. 1877-1883.
 18. 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.
19. Шольц К.Ф., Мамаев Д.В., Гладких А.Г. Взаимодействие 2-алкилмалонатов с дикарбоксилатным переносчиком в интактных митохондриях // Докл Академии наук СССР. – 1987. – Т. 294. – С. 1509-1514.
 20. Шольц К.Ф., Островский Д.Н. Ячейка амперометрического определения кислорода // В кн.: Методы современной биохимии. – М.: Наука, 1975, – С. 52-58.
 21. 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.
 22. Эггинс Б. Химические и биологические сенсоры – М.: Техносфера, 2005. – 336 с.
 23. 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 Ca^{2+} /palmitic acid complexes // Biochim Biophys Acta. – 2003. – V. 1609, No 2. – P. 153-160.
 24. Akhtar M.J., Khan S.A., Kumar B. Chawla P., Bhatia R., Singh K. Role of sodium dependent SLC13 transporter inhibitors in various metabolic disorders // Mol Cell Biochem. – 2023 – V. 478, No 8. – P. 1669-1687.
 25. 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.
 26. Ali M.A., Ryan R.G., Yang D., Sutton N.R., Tyrrell D.J. Cardiovascular aging: spotlight on mitochondria // Am J Physiol Heart Circ Physiol. – 2024. – V. 326, No2. – H317-H333.

27. Aliverdieva D. A., Mamaev D.V., Snezhkova L. G., Sholtz Ch.F. Evaluation of molecularity of rate-limiting step of pore formation by antimicrobial peptides studied using mitochondria as a biosensor // *Toxicology in vitro*. – 2012. – V. 26. – P. 939-949.
28. 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.
29. Andrews N.W., Corrotte M. Plasma membrane repair // *Curr. Biol*. – 2018. – V. 28, No 8. – P. R392-R397.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. Balderas E., Ateaga-Tlecuil 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.
36. 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.
37. Bandell M., Lolkema J.S. Stereoselectivity of the membrane potential-generating citrate and malate transporters of lactic acid bacteria // *Biochemistry.* – 1999. – V.38. – P. 10352-10360.
38. 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.
39. 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.
40. Bassetti M., Righi E. Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* – 2013. – V. 2013. – P. 428-432.
41. 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.
42. 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.
43. Bazzone A., Barthmes M., George C., Brinkwirth N., Zerlotti R., Prinz V., Cole K., Friis S., Dickson A., Rice S., Lim J., Fern Toh M., Mohammadi M., Pau D., Stone D.J., Renger J.J., Fertig N. A comparative study on the lysosomal cation channel TMEM175 using automated whole-cell patch-clamp, lysosomal patch-clamp, and solid supported membrane-based electrophysiology: functional characterization and high-throughput

- screening assay development // Int J Mol Sci. – 2023. – V. 24, No 16. – P. 12788
44. 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.
 45. 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.
 46. 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.
 47. Bechinger B.; Gorr S.U. Antimicrobial peptides: Mechanisms of action and resistance // J Dent Res. – 2017. – V.96. – P.254-260.
 48. 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.
 49. 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 Ca^{2+} in mitochondria // J Bioenerg Biomembr. – 2006. – V. 38, No 2. – P. 113-120.
 50. 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.
 51. Bennet C.F., Latorre-Muro P., Puigserver P. Mechanisms of mitochondrial respiratory adaptation // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2022. – V. 23, No 12. – P. 817-835.

52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. Bisaccia F., Zara V., Capobianco L. The formation of a disulfide cross-link between the two subunits demonstrates the dimeric structure of the mitochondrial oxoglutarate carrier // Biochim Biophys Acta. – 1996. – V. 1292, No 2. – P. 281-288.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.

60. Boheim G. Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes // *J Membr Biol.* – 1974. – V. 19, No. 3. – P. 277-303.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Bourinbaïar 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.
65. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 248-254.
66. 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.
67. 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.

68. 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.
69. 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.
70. Brumfeld V., Miller I.R. Electric Field Dependence of Alamethicin Channels // *Biochim Biophys Acta.* – 1990 – V. 1024, No 1. – P. 49-53.
71. Bulat S.A., Lubeck M., Mironenko N., Jensen D.F. and P.S. Lubeck. UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of *Trichoderma* and *Glodadium* // *Mycol Res.* – 1998. – V.102, No 8. – P. 933-943.
72. 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.
73. Cabrera M.P.S., Rangel M., Neto J.R., Konno K. Chemical and biological characteristics of antimicrobial α -helical peptides found in solitary wasp venoms and their interactions with model membranes // *Toxins (Basel).* – 2019. – V. 11, No 10. P. 559.
74. 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.
75. Cabrera M.P.S., Souza B.M., Fontana R., Konno K., Palma M.S., de Azevedo W.F., Jr., Ruggiero Neto J. Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: A new antimicrobial peptide from wasp venom // *J. Pept. Res.* – 2004. – V. 64. – P. 95–103.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. 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.

84. 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.
85. Chance B., Williams G.R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation // *Nature*. – 1955. – V. 175. – P. 1120-1121.
86. Chen E. H-L., Wang C-H., Liao Y-T., Chan F-Y., Kanaoka Y., Uchihashi T., Kato K., Lai L., Chang Y-W., Ho M-C., Chen R. P-Y. Visualizing the membrane disruption action of antimicrobial peptides by cryo-electron tomography // *Nat Commun*. – 2023. – V. 14, No 1. – P. 54-64.
87. Chen J., Guan S.M., Sun W., FuHaberm H. Melittin, the major pain-producing substance of bee venom // *Neurosci Bull*. – 2016. – V. 32, No. 3. – P. 265-272.
88. 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.
89. Collins S., Pi J., Yehuda-Shnaidman E. Uncoupling and reactive oxygen species (ROS)—A double-edged sword for β -cell function? “Moderation in all things” // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. – 2012. – V. 26, No 6. – P. 753–775.
90. 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.
91. 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.
92. Cotton F.A., Wilkinson G. *Advanced inorganic chemistry*, 4th ed. – New York.: Wiley, 1980. – 1396 p.

93. Cui Y., Zhao S., Wang J., Wang X., Gao B., Fan Q., Sun F., Zhou B. A novel mitochondrial carrier protein Mm1 acts as a yeast mitochondrial magnesium exporter // *Biochim Biophys Acta*. – 2015. – V. 1853, No 3. – P. 724-732.
94. 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.
95. Czernek J., Brus J. Modeling the structure of crystalline alamethicin and Its NMR chemical shift tensors. // *Antibiotics (Basel)*. – 2021. – V. 2021. – V. 10, No 10. – P. 1265.
96. 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.
97. Das M.K., Basu A., Balaram P. Effects of membrane channel-forming polypeptides on mitochondrial oxidative phosphorylation. A comparison of alamethicin, gramicidin A, melittin and tetraacetyl melittin. // *Biochem Int*. – 1985. – V. 11, No 3. P. 357-363.
98. 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.
99. 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.
100. 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.
101. De Brito O.M., Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria // *Nature*. – 2008. – V. 456, No 7222. – P. 605–610.
102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. Dempsey C.E. The actions of melittin on membranes. // *Biochim Biophys Acta Rev Biomembr*. – 1990. – V. 1031. – P. 143-161.
106. Dempsey C.E., Hancock L.J. Hydrogen bond stabilities in membrane-reconstituted alamethicin from amide-resolved hydrogen-exchange measurements // *Biophys J*. – 1996. – V. 70, No. 4. – P. 1777-1788.
107. 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.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. Doyle D.A. Structural changes during ion channel gating // *Trends Neurosci*. – 2004. – V. 27, No 6. – P. 298-302.
112. Doyle D.A. Structural themes in ion channels // *Eur Biophys J*. – 2004. – V.33, No 3. – P. 175-179.

113. 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.
114. Duclohier H. Antimicrobial peptides and peptaibols, substitutes for conventional antibiotics // *Curr Pharm Des*. – 2010. – V. 16, No. 28. – P. 3212-3223.
115. 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.
116. 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.
117. Duszkiewicz-Reinhard W., Gniewosz M., Błażej 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.
118. 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.
119. 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.
120. 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.
121. Enayathullah M.G., Parekh Y., Banu S., Ram S., Nagaraj R., Kumar B.K., Idris M.M. Gramicidin S and melittin: potential anti-viral therapeutic

- peptides to treat SARS-CoV-2 infection // *Sci Rep.* – 2022. – V. 12, No 1. – P. 3446.
122. 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.
123. 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.
124. 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.
125. 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.
126. 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.
127. 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.
128. Festa M., Minicozzi V., Boccaccio A., Lagostena L., Gradogna A., Qi T., Costa A., Larisch N., Hamamoto S., Pedrazzini E., Milenkovic S., Scholz-Starke J., Ceccarelli M., Vitale A., Dietrich P., Uozumi N., Gambale F., Carpaneto A. Current methods to unravel the functional properties of lysosomal ion channels and transporters // *Cells.* – 2022. – V. 11, No 6. – P. 921.
129. 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.
130. 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.
131. 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.
132. 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.
133. Fišar Z., Hroudová J. Pig Brain Mitochondria as a Biological Model for Study of Mitochondrial Respiration // *Folia Biol.* – 2016. – V. 62. – P. 15-25.
134. 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.
135. Fisher, J.J.; Bartho, L.A.; Perkins, A.V.; Holland, O.J. Placental mitochondria and reactive oxygen species in the physiology and pathophysiology of pregnancy // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2020. – V. 47, No 1. – P. 176–184.
136. 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.
137. 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.
138. Frey T.G., Mannella C.A. The internal structure of mitochondria // *Trends Biochem Sci*. – 2000. – V. 25, No 7. – P.319-324.
139. 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.
140. 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.
141. 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.
142. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Alnemri E.S., Altucci L., Andrews 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., 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.
143. 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.
144. 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.
145. 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.
146. 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.
147. Goleva T.N., Rogov A.G., Korshunova G.A., Trendeleva T.A., Mamaev, D.V., Aliverdieva D.A., Zvyagilskaya R.A. SkQThy, a novel and

- promising mitochondria-targeted antioxidant // *Mitochondrion*. – 2019. – V. 49. P. 206–216.
148. 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.
 149. 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.
 150. 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.
 151. 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.
 152. 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.
 153. 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.
 154. Guan S., Zhao L., Peng R. Mitochondrial respiratory chain supercomplexes: from structure to function // *Int J Mol Sci.* – 2022. – V. 23, No 22. – P. 13880.
 155. 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.

156. Guo R., Gu J., Zong S., Wu M., Yang M. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. // *Biomed J.* – 2018. – V. 41, No 1. P. 9-20.
157. 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.
158. 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.
159. 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.
160. Hanke W., Boheim G. The lowest conductance state of the alamethicin pore // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – V. 596, No. 3. – P. 456-462.
161. Harrington J.S., Ryter S.W., Plataki M., Price D.R., Choi A.M.K. Mitochondria in health, disease, and aging. // *Physiol Rev.* – 2023. – V. 103, No 4. – P. 2349-2422.
162. Harrod C.J., Rodriguez S.B., Thornton R.J. Derepressed utilization of L-malic acid and succinic acid by mutants of *Pachysolen tannophilus* // *J Ind Microbiol Biotechnol.* – 1997. – V. 18, No 6. – P. 379-383.
163. Haque S., Hussain A., Joshi H., Sharma U., Sharma B., Aggarwal D., Rani I., Ramniwas S., Gupta M., Tuli H.S. Melittin: a possible regulator of cancer proliferation in preclinical cell culture and animal models // *J Cancer Res Clin Oncol.* – 2023. – V. 149, No 19. – P. 17709-17726.
164. 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.
165. 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.

166. 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.
167. Hellmann N., Schwarz G. Peptide-liposome association. A critical examination with mastoparan-X // *Biochim Biophys Acta.* – 1998. – V. 1369, No. 2. – P. 267-77.
168. 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.
169. 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.
170. Hender 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.
171. Herianto S., Subramani B., Chen B-R., Chen C-S. Recent advances in liposome development for studying protein-lipid interactions // *Crit Rev Biotechnol.* – 2024. – V. 44, No 1. – P. 1-14.
172. 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.
173. 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.

174. 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.
175. 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.
176. 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.
177. 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.
178. Horst R., Lolkema J. S. Membrane topology screen of secondary transport proteins in structural class ST[3] of the MemGen classification. Confirmation and structural diversity // Biochim Biophys Acta. – 2012. – V. 1818, No 1. – P. 72-81.
179. 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.
180. Huang H.W. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity // Biochim Biophys Acta. – 2006. – V. 1758, No. 9. – P. 1292-1302.
181. Huang S., Su G., Jiang S., Chen L., Huang J., Yang F. New N-terminal fatty-acid-modified melittin analogs with potent biological activity // Int J Mol Sci. – 2024. – V. 25, No 2. – P. 867.

182. 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.
183. 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.
184. 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.
185. 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.
186. 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.
187. Izumi K., Saito C., Kawano R. Liposome deformation induced by membrane-binding peptides // *Micromachines (Basel).* – 2023. – V. 14, No 2. – P. 373.
188. Jamalzadeh E., Verheijen P.J.T., Heijnen J.J., van Gulik W.M. pH-dependent uptake of fumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic conditions // *Appl Environ Microbiol.* – 2012. – V. 78, No 3. – P. 705-716.
189. Janausch I.G., Zients E., Tran Q.H. C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria // *Biochim Biophys Acta.* – 2002. – V. 1553, No 1-2. – P. 39-56.
190. Jaramillo-Martinez V., Ganapathy V., Urbatsch I.L. A home run for human NaCT/SLC13A5/INDI: cryo-EM structure and homology model to predict

- transport mechanisms, inhibitor interactions and mutational defects // Biochemical J. – 2021. – V. 478. – P. 2051-2057.
191. 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.
192. Jiang T., Wen P-C., Trebesch N., Zhao Z., Pant S., Kapoor K., Shekhar M., Tajkhorshid E. Computational dissection of membrane transport at a microscopic level // Trends Biochem Sci. – 2020. – V.45, No3. – P. 202-216.
193. 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.
194. 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.
195. Jin, G.; Weinberg, A. Human antimicrobial peptides and cancer // Semin Cell Dev Biol. – 2019. – V. 88. – P. 156-162.
196. 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.
197. 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.
198. Justo R., Oliver J., Gianotti M. Brown adipose tissue mitochondrial subpopulations show different morphological and thermogenic characteristics // Mitochondrion. – 2005. – V. 5. – P. 45-53.
199. 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.
200. 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.
 201. Kamath L, Meydani A, Foss F, Kuliopulos A. Signaling From protease-activated receptor-1 inhibits migration and invasion of breast cancer cells // *Cancer Res.* – 2001. V. 61, No 15. – P. 5933-5940.
 202. 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.
 203. 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.
 204. 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.
 205. 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.
 206. Kaplan R.S., Mayor J.A., Johnston N., Oliveira D.L. Purification and characterization of the reconstitutively active tricarboxylate transporter from rat liver mitochondria // *J Biol Chem.* – 1990. – V. 265, No 22. – P. 13379-13385.
 207. 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.
208. 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.
209. 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.
210. 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.
211. 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.
212. 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.
213. 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.
214. Kinclova-Zimmermannova O, Gaskova D, Sychrova H. 2006 The $\text{Na}^+, \text{K}^+/\text{H}^+$ -antiporter Nha1 influences the plasma membrane potential of *Saccharomyces cerevisiae* // *FEMS Yeast Res.* – 2006. – V. 6. – P. 792-800.
215. 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.

216. Klingenberg M. Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria // Arch Biochem Biophys. – 1989. – V. 270, No 1. – P. 1-14.
217. 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.
218. 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.
219. Kopel J.J., Bhutia Y.D., Sivaprakasam S., Ganapathy V. Consequences of NaCT/SLC13A5/mINDY deficiency: good versus evil, separated only by the blood-brain barrier // Biochem J. – 2021. – V. 478, No 3. – P. 463-486.
220. 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.
221. 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.
222. 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.
223. 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.
224. 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.

225. Kschischo M., Ramos J., Sychrová H. Membrane transport in yeast, an introduction // *Adv Exp Med Biol.* – 2016. – V. 892. – P. 1-10.
226. Kunji E.R., Crichton P.G. Mitochondrial carriers function as monomers // *Biochim Biophys Acta.* – 2010. – V. 1797, No 6-7. – P. 817-831.
227. 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.
228. 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.
229. 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.
230. 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.
231. Lash L.H. Mitochondrial glutathione transport: physiological, pathological and toxicological implications // *Chem Biol Interact.* – 2006. – V. 163, No 1-2. – P. 54-67.
232. 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.
233. 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.
234. 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.

235. 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.
236. 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.
237. 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.
238. Leveritt J.M., Pino-Angeles A., Lazaridis T. The structure of a melittin-stabilized pore // *Biophysical Journal.* – 2015. – V. 108, No. 10. – P. 2424-2426.
239. 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-arthritis 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.
240. 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.
241. 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.
242. Litsky M.L., Pfeiffer D.R. Regulation of the mitochondrial Ca^{2+} 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.
243. 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.
244. Locascio A., Andres-Colas N., Mulet J.M., Yenush L. *Saccharomyces cerevisiae* as a tool to investigate plant potassium and sodium transporters // *Int J Mol Sci.* – 2019. – V.20, No 9. – P. 2133.
245. 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.
246. 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.
247. 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.
248. 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.
249. Lovisolo D. Patch clamp: the first four decades of a technique that revolutionized electrophysiology and beyond // *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* – 2023. – V. 186. – P. 1-28.
250. 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.
251. Lu M. Structure and mechanism of the divalent anion/Na⁺ symporter // *Int J Mol Sci.* – 2019. – V. 20, No 2. – P. 440.
252. 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.

253. 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.
254. 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.
255. 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.
256. 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.
257. Maclean A.E., Hayward J.A., Huet D., Dooren G.G., Sheiner L. The mystery of massive mitochondrial complexes: the apicomplexan respiratory chain // *Trends parasitol*. – 2022. – V. 38, No 12.– P. 1041-1052.
258. Maguire M.E. Magnesium transporters: properties, regulation and structure // *Front Biosci*. – 2006. – V. 1, No. 11. – P. 3149-3163.
259. Mahendran K., Niitsu A., Kong L. A monodisperse transmembrane α -helical peptide barrel // *Nature Chem*. – 2017. – V. 9, No. 5. – P. 411-419.
260. 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.

261. 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.
262. Manczak, M.; Kandimalla, R.; Yin, X.; Reddy, P.H. Mitochondrial division inhibitor 1 reduces dynamin-related protein 1 and mitochondrial fission activity // *Hum. Mol. Genet.* – 2019. – V. 28, No 2. – P. 177–199.
263. Manna M., Mukhopadhyay C. Cause and effect of melittin-induced pore formation: a computational approach // *Langmuir*. – 2009. –V. 25, No. 20. – P. 12235-12242.
264. Mannella C.A. Introduction: our changing views of mitochondria // *J Bioenerg Biomembr.* – 2000. – V.32, No 1. – P. 1-4.
265. Markham K.J, Tikhonova E.B, Scarpa A.C, Hariharan P., Katsube S., Guan L. Complete cysteine-scanning mutagenesis of the *Salmonella typhimurium* melibiose permease // *J Biol Chem.* – V. 297, No 3. – P.101090.
266. 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.
267. 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.
268. Matsuzaki K., Yoneyama S., Miyajima K. Pore formation and translocation of melittin // *Biophys J.* – 1997. – V. 73, No 2. – P.831-838.
269. 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.
270. Matthews B.J., Voshall 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.
271. 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.
272. 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.
273. 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.
274. Meijer A.J., van Dam K. Mitochondrial ion transport. In: Membrane Transport (eds. Bonting, S. and De Pont J.) // Elsevier, 1981. – P. 235-255.
275. Mereuta L., Asandei A., Luchian T. Meet me on the other side: trans-bilayer modulation of a model voltage-gated ion channel activity by membrane electrostatics asymmetry // PLoS One. – 2011. – V. 6, No. 9: e25276.
276. Meyer C.E., Reusser F. A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride* // Experientia. – 1967. – V. 15, No. 23. – P. 85-86.
277. Mihajlovic M., Lazaridis T. Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores // Biochim Biophys Acta. – 2010. – V.1798, No. 8. – P. 1485-1493.
278. 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.
279. 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 cytidyltransferase (CdsA) mediate daptomycin resistance in *Streptococcus mitis/oralis* by a novel

- mechanism // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2017. – V. 61, No 4: e02435-16.
280. Miyazaki Y., Shinoda W. Cooperative antimicrobial action of melittin on lipid membranes: a coarse-grained molecular dynamics study // *Biochim Biophys Acta Biomembr.* – 2022. – V. 1864, No 9. – P. 183955.
281. 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.
282. 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.
283. 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.
284. 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.
285. Mottamal M., Lazaridis T. Voltage-dependent energetics of alamethicin monomers in the membrane // *Biophysical Chemistry.* – 2006. – V. 122, No. 1. – P. 50-57.
286. 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.
287. 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.

288. 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 14 α -demethylase mutation leads to amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana* // PLoS Negl Trop Dis. – 2017. – V. 11, No 6:e0005649.
289. 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.
290. 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.
291. 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.
292. 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.
293. Nicholls D.G. The physiological regulation of uncoupling proteins // Biochim Biophys Acta. – 2006. – V. 1757, No 5-6. – P. 459-466.
294. Nicholls D.G., Ferguson S.J. Bioenergetics, 3rd ed. – London: Academic Press, 2002. – 288 p.
295. Nielsen J. Yeast systems biology: model organism and cell factory // Biotechnol J. – 2019. – V. 14, No 9: e1800421.
296. 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.

297. Okuda J, Miwa I. Newer developments in enzymic determination of D-glucose and its anomers // *Methods Biochem Anal.* – 1973. – V. 21. – P. 155-189.
298. O'Rourke B. Mitochondrial ion channels // *Annu Rev Physiol.* – 2007. – V. 69. – P. 19-49.
299. 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.
300. Oršolić N. Bee venom in cancer therapy // *Cancer Metastasis Rev.* – 2012. – V. 31, No 1-2. – P. 173-194.
301. 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.
302. 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.
303. 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.
304. Ovchinnikov I.A. Macrocyclic depsipeptide antibiotics and ion transport through membranes // *Usp Sovrem Biol.* – 1974. – V. 77, No 2. – P. 103-124.
305. Ovchinnikov Y.A., Ivanov V. T., Shkrob A. M. Membrane-active complexones. // Amsterdam: Elsevier, 1974. – V. 12. – P. 464.
306. 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.
307. 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.
308. Pajor A.M. Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters // Pflugers Arch. – 2006. – V. 451, No 5. – P. 597-605.
309. Pajor A.M. Molecular cloning and functional expression of a sodium-dicarboxylate cotransporter from human kidney // Am J Physiol. – 1996. – V. 270, – V.4 – P. F642-F648.
310. Pajor A.M. Sequence and functional characterization of renal sodium/dicarboxylate cotransporter // J Biol Chem. – 1995. – V. 270, No 11. – P. 5779-5785.
311. 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.
312. 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.
313. 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.
314. 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.
315. 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.
316. Palade G. The fine structure of mitochondria // Anat Rec. – 1952. – V. 114. – P. 427-451.

317. 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.
318. Pallotta M.L., Valenti D., Iacovino M., Passarella S. Two separate pathways for d-lactate oxidation by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria which differ in energy production and carrier involvement // Biochim Biophys Acta. – 2004. – V. 1608, No 2-3. – P.104-113.
319. Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications // Pflugers Arch. – Eur J Physiol. – 2004. – V. 447, No 5. – P. 689-709.
320. 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.
321. 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.
322. Palmieri L., Agrimi G., Runswick M.J. Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of two isoforms of a novel mitochondrial transporter for 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate // J Biol Chem. – 2001. – V. 276, No 3. – P. 1916-1922.
323. 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.
324. 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.
325. 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.
326. 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.
327. 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.
328. Pandey P., Khan F., Khan M.A., Kumar R., Upadhyay T.K. An updated review summarizing the anticancer efficacy of melittin from bee venom in several models of human cancers // *Nutrients.* – 2023. – V. 15, No 14. – P. 3111.
329. 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.
330. 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.
331. 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.
332. 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.

333. Passarella S., Quagliariello E. The citric cycle intermediates transport in rat liver mitochondria // *Biochimie.* – 1976. – V. 58, No 8. – P. 989-1001.
334. 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 carrier-mediated transport // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 133, No 4. – P. 2029-20239.
335. Pawlak M., Stankowski S., Schwarz G. Melittin induced voltage-dependent conductance in DOPC lipid bilayers // *Biochim Biophys Acta.* – 1991. – V. 1062, No 1. – P. 94-102.
336. 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.
337. 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.
338. Pereira A.F.M., Sani A.A., Zapata T.B., Sousa D.S.M., Rossini B.C., Santos L.D.D., Rall V.L.M., Riccardi C.D.S., Fernandes Júnior A. Synergistic antibacterial efficacy of melittin in combination with oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // *Microorganisms.* – 2023. – V. 11, No 12. – P. 2868.
339. 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.
340. 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.
341. Pinegin B., Vorobjeva N., Pashenkov M., Chernyak B. The role of mitochondrial ROS in antibacterial immunity // *J. Cell. Physiol.* – 2018. – V. 233, No 5. – P. 3745–3754.

342. Pisat N. P., Pandey A., Macdiarmid C. W. MNR2 regulates intracellular magnesium storage in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. – 2009. – V. 183, No 3. – 873-884.
343. 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.
344. 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.
345. Pos K.M., Dimroth P., Bott M. The *Escherichia coli* citrate carrier CitT: a member of a novel eubacterial transporter family related to the 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts // J Bacteriol. – 1998. – V. 180, No 16. – P. 4160-4165.
346. 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.
347. Pressman B.C. Ionophorous antibiotics as models for biological transport // Fed Proc. – 1968. – V. 27, No 6. – P. 1283.
348. 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.
349. 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.
350. 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.
351. Quagliariello E., Passarella S. Transport phenomena across liver mitochondria membranes // *Bioelectrochem Bioenerg.* – 1974. – V. 1, No 3/4. – P. 275 - 292.
352. 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.
353. Răileanu M., Bacalum M. Cancer Wars: Revenge of the AMPs (antimicrobial peptides), a new strategy against colorectal cancer // *Toxins (Basel).* – 2023. – V. 15, No 7. – P. 459.
354. Rato K., Sasaki M., Kimura S. Application of the dansylation reaction in the characterization of low molecular weight peptides by dodecyl sulphate-polyacrylamide-gel electrophoresis // *Analyt Biochem.* – 1975. – V. 66, No 2. – P. 545-522.
355. Regenbreg B., Holmberg S., Olsen L.D., Kielland-Brandt M.C. Dip5p mediates high-affinity and high-capacity transport of L-glutamate and L-aspartate in *Saccharomyces cerevisiae* // *Curr Genet.* – 1998. – V. 33. – P. 171-177.
356. Ren C, Li Y, Cong Z, Li Z, Xie L, Wu S. Bioengineered bacterial outer membrane vesicles encapsulated Polybia-mastoparan I fusion peptide as a promising nanoplatfrom for bladder cancer immune-modulatory chemotherapy. // *Front Immunol.* – 2023. – V. 14 – P. 1129771.
357. 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.
358. Rinehart Jr., K.L., Cook Jr., J.C., Meng H., Olson K.L., Pandey R.C. Mass spectrometric determination of molecular formulas for membrane-modifying antibiotics // *Nature.* – 1977. – V. 269. – P. 832-823.
359. 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.

360. Rosa L.T., Dix S.R., Rafferty J.B., Kelly D.J. A New mechanism for high-affinity 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.
361. 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.
362. Runswick M.J., Walker J.E., Bisaccia F. Sequence of the bovine 2-oxoglutarate/malate protein: structural relationship to other mitochondrial transport protein // *Biochemistry.* – 1990. – V. 29, No 50. – P. 11033-11040.
363. Rungsa P., Peigneur S., Jangpromma N., Klaynongsruang S., Tytgat J., Daduang S. In silico and in vitro structure-activity relationship of mastoparan and its analogs. // *Molecules.* – 2022. – V. 27, No 2. – P. 561.
364. 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.
365. Salmon J.M. L-malic-acid permeation in resting cells of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochim Biophys Acta.* – 1987. – V. 901. – P. 30-34.
366. 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.
367. 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.

368. Scaduto R.C.Jr., Grotyohann L.W. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives // *Biophys. J.* – 1999. – V. 76, No 1. – P.469-477.
369. 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.
370. 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.
371. Schmidt S.G., Gether U., Loland C. J. Elucidating the mechanism behind sodium-coupled neurotransmitter transporters by reconstitution // *Neurochem Res.* – 2022. – V.47, No 1. – P. 127-137.
372. 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.
373. 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.
374. 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.
375. 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.
376. 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.

377. 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.
378. Shakibaie M.R., Modaresi F., Azizi O., Tadjrobehkar O., Ghaemi M.M. Amphiphilic peptide Mastoparan-B induces conformational changes within the AdeB efflux pump, down-regulates adeB gene expression, and restores antibiotic susceptibility in an MDR strain of *Acinetobacter baumannii* // *Proteins.* – 2023. – V. 91, No 9. – P. 1205-1221.
379. Selim M.S., Kassem A.B., El-Bassiouny N.A., Salahuddin A., Abu El-Ela R.Y., Hamza M.S. Polymorphic renal transporters and cisplatin's toxicity in urinary bladder cancer patients: current perspectives and future directions // *Med Oncol.* – 2023. – V. 40, No 2. – P. 80.
380. 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.
381. 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.
382. Sherman F., Fink G.F., Hicks J.B. *Methods in yeast genetics: A Laboratory Course Manual.* – New York: Cold Spring Harbor, 1986. – 186 p.
383. 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.
384. 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.
385. 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.

386. Shpakov A.O. Polycationic peptides as nonhormonal regulators of chemosignal systems // *Z Evol Biokhim Phyziol.* – 2009. – V. 45. – P. 355-367.
387. Six S., Andrews S.C., Uden 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.
388. 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.
389. 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.
390. 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.
391. 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.
392. Spagnoletta A., De Santis A., Tampieri E. Identification and kinetic characterization of HtDTC, the mitochondrial dicarboxylate-tricarboxylate carrier of *Jerusalem artichoke* tubers // *J Bioenerg Biomembr.* – 2006. – V. 38, No 1. – P. 57-65.
393. 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.

394. 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.
395. Stankowski S., Schwarz G. Lipid dependence of peptide–membrane interactions // *FEBS Lett*. – 1989. – V. 250, No. 2. – P.556-560.
396. Stephani J.C., Gerhards L., Khairalla B., Solov'yov I.A., Brand I. How do antimicrobial peptides interact with the outer membrane of Gram-negative bacteria? Role of lipopolysaccharides in peptide binding, anchoring, and penetration // *ACS Infect. Dis*. – 2024. – V. 10. – P. 763-778.
397. 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.
398. 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.
399. 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.
400. 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.
401. 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.
402. 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.
403. 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.
404. Sun L., Wang S., Tian F., Zhu H., Dai L. Organizations of melittin peptides after spontaneous penetration into cell membranes // *Biophys J.* – 2022. – V. 121, No 22. – P. 4368-4381.
405. 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.
406. 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.
407. Szewczyk A., Jarmuszkiewicz W., Kunz W. S. Mitochondrial potassium channels // *IUBMB Life.* – 2009. – V. 61, No 2. – P. 134-143.
408. Taira J., Osada S., Jelokhani-Niaraki M., Ehara T., Kodama H. Ion channel formation of dimeric peptide enhanced by electrostatic inter-helical interactions // *Adv Exp Med Biol.* – 2009. – V. 611. – P. 337-338.
409. 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.
410. Tang P., Huang D., Zheng K-X., Hu D., Dai P., Li C-H., Qin S-Y., Chen G-D., Yao X-S., Gao H. Thirteen new peptaibols with antimicrobial

- activities from *Trichoderma* sp // *Chin J Nat Med.* – 2023 – V. 21, No 11. – P. 868-880.
411. 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.
412. Tavoulari S., Thangaratnarajah C., Mavridou V., Harbour M.E., Martinou J.C., Kunji E.R. The yeast mitochondrial pyruvate carrier is a hetero-dimer in its functional state // *EMBO J.* – 2019. – V. 38, No 10:e100785.
413. 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.
414. 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.
415. Terada H. Uncouplers of oxidative phosphorylation // *Environ Health Perspect.* – 1990. – V. 87. – P. 213-218.
416. 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.
417. 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.

418. 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.
419. 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.
420. 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.
421. Toninello A., Siliprandi D., Siliprandi N. Mg^{2+} restores membrane potential in rat liver mitochondria deenergized by Ca^{2+} and phosphate movements // *FEBS Lett.* – 1982. – V. 142, No 1. – P. 63-66.
422. 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.
423. Torre C.D., Sannio F., Battistella M., Docquier J.-D., Zotti M. Peptaibol analogs show potent antibacterial activity against multidrug resistant opportunistic pathogens // *Int J Mol Sci.* – 2023. – V. 24, No 9. – P. 7997.
424. 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.
425. 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.
426. 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.

427. 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.
428. Uoselis L., Nguyen T.N., Lazarou M. Mitochondrial degradation: Mitophagy and beyond. // Mol Cell. – 2023. – V. 83, No 13. – P. 3404-3420.
429. Uthayabalan S., Vishnu N., Madesh M., Stathopoulos P.B. The human MRS2 magnesium-binding domain is a regulatory feedback switch for channel activity // Life sci Alliance. – 2023. – V. 6, No 4:e202201742.
430. 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.
431. 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.
432. Ventura F.V., Ruiten 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.
433. Vercellino I., Sazanov L.A. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2022. – V. 23, No 2. – P. 141-161.
434. 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.
435. Visser W.F., van Roermund C.W., Ijlst L. First identification of a 2-ketoglutarate/isocitrate transport system in mammalian peroxisomes and its characterization // Biochem Biophys Res Commun. – 2006. – V. 348, No 4. – P. 1224-1231.

436. 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.
437. Voza G. Parisi F. De Leonadis, 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.
438. Wackerbauer G., Weis I., Shwarz G. Preferential partitioning of melittin into the air/water interface: structural and thermodynamic implications // *Biophys. J.* – 1996. – V. 71, No 3.– P. 1422-1427.
439. Wakabayashi T., Kurono C., Asano M. Steroidogenesis in the zona glomerulosa of the adrenal cortex. I. Isolation and some properties of mitochondria from the zona glomerulosa of the bovine adrenal cortex // *J Bioenerg.* – 1976. – V. 8. – P. 27-53.
440. Walde P., Cosentino K., Engel H., Stano P. Giant vesicles: preparations and applications // *Chembiochem.* – 2010. – V. 11, No 7. – P. 848-865.
441. Walsh C.M., Chvanov M., Haynes L.P., Petersen O.H., Tepikin A.V., Burgoyne R.D. Role of phosphoinositides in STIM1 dynamics and store-operated calcium entry // *Biochem. J.* – 2009. – V. 425, No 1. – P. 159–168.
442. 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.
443. Wang R., Shi M-Y., Ma B-B., Sheng J. Mechanism of Leakage in phosphatidylserine-containing membranes by melittin // *Mol Biol (Mosk).* – 2022. – V. 56, No 6. – P. 1085.
444. 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.
445. Wei C., Pohorille A. Multi-oligomeric states of alamethicin ion channel: assemblies and conductance // *Biophys J*. – 2023. – V. 122, No 12. – P. 2531-2543.
446. 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.
447. White J. *Yeast Technology*, 1st ed. – New York: Wiley, Springer US, 1954. – 432 p.
448. 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.
449. Woolley G.A. Channel-forming activity of alamethicin: effects of covalent tethering // *Chem Biodivers*. – 2007. – V. 4, No. 6. – P. 1323-1337.
450. 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.
451. 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.
452. Wu T., Li J., Tian C. Fungal carboxylate transporters: recent manipulations and applications // *Appl. Microbiol*. – 2023. – V. 107, No 19. – P. 5909-5922.

453. Wyborn N.R., Alderson J., Andrews S.C., Kelly D.J. Topological analysis of DctQ, the small integral membrane protein of the C4-dicarboxylate TRAP transporter of *Rhodobacter capsulatus* // FEMS Microbiol. Lett. – 2001. – V. 194, No 1. – P. 13-17.
454. Xing X., Zhang X., Fan J., Zhang C., Zhang L., Duan R., Hao H. Neuroprotective effects of melittin against cerebral ischemia and inflammatory injury via upregulation of MCP1 to suppress NF- κ B activation in vivo and in vitro // Neurochem Res. – 2024. – V. 49, No 2. – P. 348-362.
455. 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.
456. Yamazaki T., Nakagawa Y., Hayakawa M., Iimura Y. Phylogenetic position of the yeast strain *Saccharomyces sinensis* IFO 10111 // J Gen Appl Microbiol. – 2005. – V. 51, No 1. – P. 35-39.
457. Yenush L. Potassium and sodium transport in yeast // Adv Exp Med Biol. – 2016. – V. 892. – P. 187-228.
458. 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.
459. 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.
460. 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.

461. 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.
462. Zhang B., Pan C., Feng C., Yan C., Yu Y., Chen Z., Guo C., Wang X. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation. // *Redox Rep.* – 2022. – V. 27, No 1. – P. 45-52.
463. 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.
464. 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.
465. Zhu X., Wei Y., Yang B., Yin X., Guo X. The mitohormetic response as part of the cytoprotection mechanism of berberine: Berberine induces mitohormesis and mechanisms // *Mol. Med.* – 2020. V. 26, No 1. – P. 10.