

**Остроумова
Ольга Сергеевна**

**МНОГОУРОВНЕВАЯ ПРОВОДИМОСТЬ ИОННЫХ КАНАЛОВ,
ОБРАЗОВАННЫХ ЦИКЛИЧЕСКИМИ ЛИПОДЕПСИПЕПТИДАМИ
PSEUDOMONAS SYRINGAE В ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ**

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Санкт-Петербург
2007**

Работа выполнена в Институте цитологии
РАН, Санкт-Петербург

Научные руководители:

доктор биологических наук
Людмила Владимировна Шагина,
Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург

кандидат физико-математических наук
Сергей Михайлович Безруков,
Национальные институты
здравоохранения, Бетезда, США

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Елена Валентиновна Казначеева,
Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург

кандидат биологических наук
Елена Аврамовна Котова,
Институт физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского, МГУ

Ведущая организация:

Санкт-Петербургский
институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова РАН

Защита состоится 30 мая 2007 года в ___ ч. на заседании
Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН
по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4
<http://www.cytspb.rssi.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Реферат разослан “___” апреля 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Актуальность изучения многоуровневой проводимости ионных каналов, образованных циклическими липодепсипептидами бактерий *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* в липидных бислоях, имеет несколько аспектов.

Прежде всего, следует отметить широкий спектр медико-биологической активности этих соединений. Циклические липодепсипептиды способны предотвращать грибковые заболевания растений, поэтому штаммы *Pseudomonas syringae syringae* могут быть использованы в сельском хозяйстве для создания систем биологического контроля сохранности урожая [1,2]. Следует отметить, что липодепсинанопептид сирингомицин E (СМЕ) ингибирует и рост клинически важных возбудителей грибковых заболеваний человека [3,4]. Показано, что образование пор в мембранах клеток-мишеней является общим механизмом токсического действия всех бактериальных липопептидов [5-9]. Поэтому изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе каналообразующей активности СМЕ и родственных соединений, необходимо в интересах применения липопептидов в биотехнологии, практической фармакологии, медицине и сельском хозяйстве. Особый интерес для понимания механизмов функционирования токсинных каналов представляет природа их многоуровневой проводимости. Установление факторов, способных влиять на свойства подсостояний проводимости каналов, открывает широкие перспективы направленного изменения противогрибковой активности липодепсипептидов.

С другой стороны, многоуровневая проводимость – широко распространенное явление, свойственное большому числу ионных каналов клеточных мембран. Поэтому каналы, образуемые циклическими липодепсипептидами *Pseudomonas syringae*, могут выступать в качестве адекватной модели для исследования механизмов функционирования ионных каналов клеточных мембран, что является одним из фундаментальных направлений клеточной биологии. Изменение многоуровневой проводимости каналов в результате воздействия каких-либо эндогенных или экзогенных факторов может быть одним из регуляторных механизмов в клетке.

Для получения надежных результатов, позволяющих выяснить принципы молекулярной организации и функционирования токсинных каналов, необходимо широкое варьирование условий эксперимента, что в случае лабильных клеточных мембран не представляется возможным. Поэтому для решения этих вопросов представляется актуальным исследование модифицированных каналоформерами липидных бислоев.

Цели и задачи исследования. Цель данной работы – установление механизмов многоуровневой проводимости ионных каналов, образованных циклическими липодепсипептидами, сирингомицином E (СМЕ) и сирингостатином A (ССА). Для достижения поставленной цели решались следующие экспериментальные задачи:

- 1) изучить потенциал-зависимость кинетических параметров и кооперативности функционирования СМЕ- и ССА-каналов;
- 2) выяснить влияние поверхностного заряда липидных бислоев, спонтанной кривизны липидных молекул, ионной силы околосмембранных растворов и дипольного потенциала мембраны на синхронность открывания каналов в кластере;
- 3) установить геометрию СМЕ-канала и определить радиусы его устьев;
- 4) исследовать влияние дипольного потенциала мембраны на каналобразующую активность СМЕ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Многоуровневая проводимость каналов, образованных циклическими липодепсипептидами, обусловлена синхронным и одиночным функционированием элементарных пор. Число элементарных каналов, кооперативно открывающихся в кластере, зависит от величины трансмембранного и дипольного потенциала. Диполь-дипольные и заряд-дипольные взаимодействия ответственны за синхронизацию элементарных каналов в кластере.
2. Элементарный СМЕ-канал представляет собой коническую пору, пептидное устье которой в два раза меньше липидного и имеет радиус ~ 0.3 нм.
3. Дипольный потенциал мембраны влияет на каналобразующую способность СМЕ в липидных бислоях.

Научная новизна. Впервые показано, что кооперативность функционирования элементарных каналов в кластере зависит от величины трансмембранного и дипольного потенциала. Синхронизация элементарных каналов в кластере определяется диполь-дипольными и заряд-дипольными взаимодействиями. Предложена кинетическая схема функционирования циклических липодепсипептидов в мембране, которая включает два непроводящих состояния, предшествующих открыванию как элементарных каналов, так и кластеров. Впервые показано, что водная пора СМЕ-канала имеет форму усеченного конуса. Разработан теоретический подход, позволяющий оценить радиусы устьев конической поры. Данные, полученные в ходе работы, показывают, что токсичность циклических липодепсипептидов для клеток-мишеней может регулироваться дипольным потенциалом их мембран.

Теоретическое и практическое значение. Несомненную важность для понимания механизмов многоуровневой проводимости каналов клеточных мембран представляют полученные данные о роли диполь-дипольных и заряд-дипольных взаимодействий в кооперативности функционирования каналов, образованных циклическими липодепсипептидами в бислойных липидных мембранах. Предложен механизм функционирования циклических липодепсипептидов в мембране. Полученные данные о влиянии дипольного потенциала мембраны на каналобразующую активность СМЕ важны с точки зрения регуляции его токсичности для грибковых клеток. Разработанный теоретический подход для оценки радиусов водной поры СМЕ-канала может быть использован для определения размеров пор других конических каналов.

Апробация работы. Основные положения работы были представлены на 3-м Съезде биофизиков России (Воронеж, 2004), конференциях Биофизического общества США (Лонг Бич, 2005; Солт Лейк Сити, 2006; Балтимор, 2007), Международной научно-практической конференции «МЕТРОМЕД» (Санкт-Петербург, 2007). Материалы докладывались на научных семинарах Института цитологии РАН и Национальных институтов здравоохранения (Бетезда, США).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов, приложения и списка литературы. В первой главе дан обзор литературы, посвященной многоуровневой проводимости ионных каналов и

каналообразующей активности циклических липодепсипептидов. Во второй главе приводится описание использованных в работе материалов и методов исследования. В третьей главе приведены результаты и их обсуждение. Работа изложена на ___ страницах и иллюстрирована ___ рисунками. Список литературы содержит ___ наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. Липодепсипептиды *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, синрингомицин E (СМЕ) и синрингостатин А (ССА), а также экстракты сфинголипидов из мембран штаммов *Saccharomyces cerevisiae* W303C (МАТа *ade2 his3 leu2 trp1 ura3*) и W Δ SYR2 α (МАТа *ade2 his3 leu2 trp1 ura3 syr2::URA3*) были любезно предоставлены д-ром Д. Такемото (Utah State University, USA).

Использовали следующие реактивы: NaCl, MOPS, пентан, этанол, хлороформ, сквален, гексадекан, эргостерол, флоретин, 6-кетохолестанол, полиэтиленгликоли (ПЭГ) (“Sigma”, США), RH 421 (“Molecular Probes”, США), 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДФФХ), 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин (ДОФЭ) и 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДОФС) (“Avanti Polar Lipids”, США).

Формирование липидных бислоев и измерение их электрических характеристик. Формирование бислоевых липидных мембран (БЛМ) проводили по методу Монтала и Мюллера [10] путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстия в тефлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два (*цис*- и *транс*-) отделения. Перед началом формирования мембраны отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали скваленом или раствором гексадекана в пентане (1:10, v/v). Фосфолипидные мембраны формировали из ДФФХ, ДОФХ, ДОФЭ, или смеси ДОФС и ДОФЭ. Для формирования бислоев, близких по липидному составу к плазматической мембране *Saccharomyces cerevisiae*, использовали эквимолярную смесь ДОФС/ДОФЭ/эргостерол и 20 М% сфинголипидов мембран W303C или W Δ SYR2 α . Эксперименты проводили при одинаковом ионном составе разделяемых мембраной водных растворов электролита (0.02 ÷ 1 М NaCl), кислотность растворов (рН 6) поддерживали буферной смесью 5 мМ MOPS/NaOH.

Токсины добавляли к водной фазе одного из отделений камеры (*цис*-отделения) из водного раствора 1 мг/мл (рН 3) до конечной концентрации в околосмембранном растворе 1-5 мкМ.

Дипольный потенциал мембраны изменяли двухсторонней добавкой флоретина (10-100 мкМ) или RH 421 (5-10 мкМ) в омывающие мембрану растворы, либо введением 6-кетохолестанола в мембранообразующий раствор (33-67 М%). Величину дипольного потенциала оценивали согласно [11-18].

Для подачи трансмембранного потенциала (V) и отведения сигнала с БЛМ использовали хлорсеребряные электроды (Ag/AgCl), соединенные с растворами камеры через мостики: 1.5 % агарозы в растворе 2 М KCl. Положительным считали потенциал, вызывающий поток катионов из *цис*- в *транс*-отделение камеры. Измерения тока через модифицированные липодепсипептидами мембраны осуществляли с помощью усилителя, собранного на базе микросхемы К544УД1А, а также Axopatch 200B (Axon Instruments) с использованием 8-полярного фильтра Бесселя (Model 9002, Frequency Devices) (частота фильтрации 1 кГц). Отфильтрованный сигнал записывали на компьютер с частотой дискретизации 5 кГц.

Все эксперименты проводили при комнатной температуре ($21 \pm 2^{\circ}$ C).

Для установления геометрии канала и определения размеров его устьев использовали одностороннее введение ПЭГ различного молекулярного веса в омывающие мембрану растворы [19-22]. ПЭГ различного молекулярного веса поочередно добавляли в раствор с одной стороны мембраны (15 % w/w). Чтобы уравновесить осмотическое давление с разных сторон бислоя, с противоположной стороны вводили непроникающий в канал ПЭГ4600 (15 % w/w). Известно, что ПЭГ увеличивают активность ионов в растворе, поэтому проводимость канала в присутствии ПЭГ данного молекулярного веса нормировали на проводимость в присутствии непроникающего ПЭГ, усредненную для ПЭГ1500, ПЭГ3400 и ПЭГ4600.

Анализ экспериментальных данных. Обработку записей трансмембранных токов осуществляли с использованием программного пакета Clampfit 9.0 ("Axon Instruments", США). Анализ полученных данных проводили с помощью программы Origin 7.0 ("OriginLab", США).

Общее число событий (N), использовавшихся для построения гистограммы флуктуаций трансмембранного тока при фиксированном значении трансмембранного

потенциала, было от 500 до 20000. По оси ординат откладывали приведенные частоты значений трансмембранного тока $n/(Nh)$, т.е. относительные частоты попадания флуктуаций тока n/N в промежуток h . Все пики аппроксимировали плотностью нормального распределения. Пик с минимальным (по абсолютной величине) центральным значением тока (i) соответствует открыванию/закрыванию элементарных каналов. Проводимость этих каналов (g) определяли как отношение i к поданной на мембрану разности потенциалов (V). Для представления зависимости числа синхронно функционирующих элементарных каналов от V использовали среднее нормированное значение, определяемое для СМЕ-каналов как $m = \sum_{k \geq 3} (k \rho_k) / \sum_{k \geq 3} \rho_k$, где ρ_k – площадь под кривой, аппроксимирующей пик с кратностью k . Величину k определяли как отношение тока, протекающего через канал-кластер, к току элементарного канала.

При определении времени и вероятности нахождения каналов в открытом состоянии использовали только случаи функционирования одного элементарного канала, так называемые «пачки». Для построения временных гистограмм по оси ординат откладывали относительные частоты n/N . Общее число измерений, используемых для построения гистограмм, было от 100 до 20000. Аппроксимацию проводили плотностью показательного распределения с параметром τ_{on} . Для всех гистограмм при проверке гипотезы о законе распределения использовали критерий χ^2 ($P < 0.05$). Вероятность пребывания малого канала в открытом состоянии в пачке находили согласно формуле $P_{on} = \int_{t_1}^{t_2} I(t) dt / (i \cdot \Delta t)$, где $\Delta t = t_2 - t_1$ – длительность пачки, $I(t)$ – значение тока в момент времени t . Интеграл, входящий в формулу, находили с помощью Clampfit 9.0.

Относительное число каналов-кластеров в общем пуле каналов, ответственных за трансмембранный ток, определяли как $S = N_c / (N_c + n_e)$, где N_c – число каналов-кластеров, n_e – число элементарных каналов.

Эффективный воротный заряд определяли как $Q = d(\ln N_{ch}) / d(FV / RT)$ [23], где N_{ch} – эффективное число открытых элементарных каналов, т.е. отношение

стационарного трансмембранного тока к i при заданном V , F – число Фарадея, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Геометрия элементарного СМЕ-канала. Циклические липодепсипептиды, СМЕ и его аналоги, образуют в БЛМ потенциал-зависимые каналы многоуровневой, преимущественно анионной проводимости. Многоуровневая проводимость – результат функционирования одиночных малых (элементарных) каналов и каналов-кластеров – нескольких синхронно открывающихся/закрывающихся элементарных каналов [24,25]. Элементарный СМЕ-канал представляет собой асимметричную пептид-липидную пору, *цис*-устье которой образовано каналоформером, а *транс*-устье – молекулами мембранных липидов [23]. Сказывается ли асимметрия распределения молекул токсина и липида в канале на геометрии водной поры? Измерения проводимости элементарных СМЕ-каналов при одностороннем введении ПЭГ позволили ответить на этот вопрос. На рис. 1 приведены записи флуктуаций трансмембранного тока, соответствующие открыванию/закрыванию СМЕ-каналов в присутствии проникающего ПЭГ200 и непроникающего ПЭГ4600 с разных сторон бислюя. Видно, что уменьшение проводимости канала по сравнению с контролем (непроникающий ПЭГ4600 с обеих сторон мембраны) больше при *транс*-добавке проникающего ПЭГ200, чем при его *цис*-введении. Эти результаты свидетельствуют о том, что СМЕ-пора имеет форму усеченного конуса, размер *транс*-устья которого больше, чем *цис*-устья.

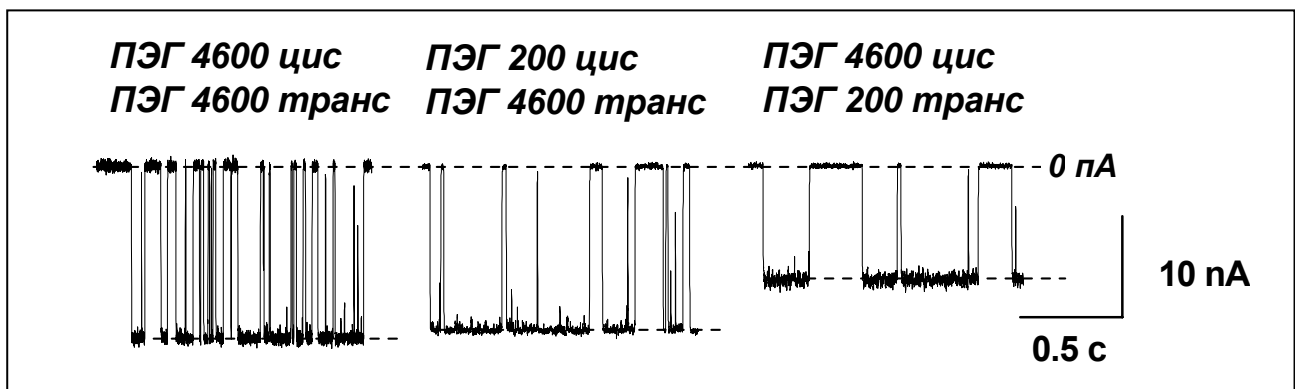


Рис. 1. Влияние асимметричного введения ПЭГ200 и ПЭГ4600 на проводимость элементарного СМЕ-канала. Мембраны сформированы из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ, омываются 1 М NaCl (рН 6). $V = -200$ мВ.

Для определения радиусов устьев канала были проведены измерения проводимости элементарных СМЕ-каналов в присутствии полимеров различного молекулярного

веса (w), введенных с *цис*- или с *транс*- стороны мембраны, в то время как непроникающий ПЭГ4600 добавлен с противоположной стороны бислюя. На рис. 2 полученные результаты представлены в виде зависимости отношения проводимости элементарного СМЕ-канала в присутствии ПЭГ молекулярного веса (w) к средней проводимости канала в присутствии непроникающих ПЭГ ($g(w)/g(w>1500)$) от w при $V = -200$ мВ.

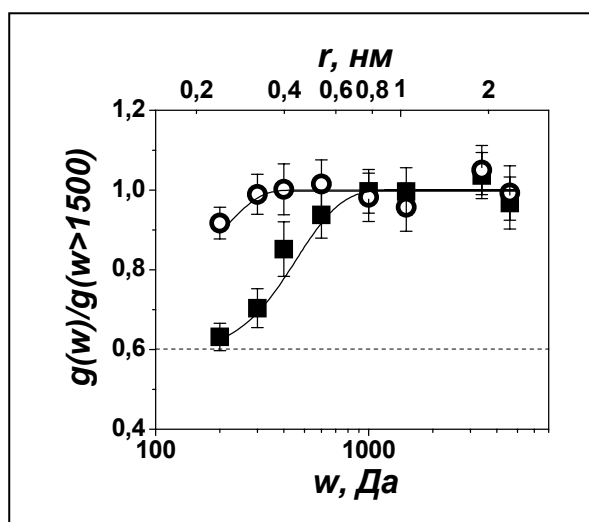


Рис. 2. Зависимость отношения $g(w)/g(w>1500)$ от молекулярного веса ПЭГ (w). Гидродинамический радиус полимерных частиц (r) указан в соответствии с [26]. (○): *цис*- и (■): *транс*- добавка ПЭГ молекулярного веса w . Непроникающий ПЭГ4600 с противоположной стороны. Штриховая линия соответствует среднему отношению удельных электропроводностей растворов в присутствии и в отсутствие ПЭГ. $V = -200$ мВ.

Видно, что *цис*-введение ПЭГ практически не сказывается на проводимости канала при

$w \geq 300$ Да, и только добавка ПЭГ200 приводит к достоверному уменьшению проводимости СМЕ-канала. Из этого следует, что полимеры с $w \geq 300$ Да при введении с *цис*-стороны не попадают в канал. В случае *транс*-добавки полимеров проводимость канала уменьшается при введении ПЭГ с $1000 > w \geq 200$ Да, т.е. ПЭГ с $w \geq 1000$ Да в канал не проникают. Аппроксимация экспериментальных данных на основе разработанного теоретического подхода дает следующие величины для радиусов *цис*- и *транс*-устьев СМЕ-канала: 0.25–0.35 нм и 0.5–0.9 нм, соответственно. Таким образом, можно заключить, что элементарный СМЕ-канал представляет собой коническую пору с меньшим устьем со стороны введения каналоформера. Образованная мембранными липидами *транс*- область канала имеет приблизительно в два раза больший радиус устья по сравнению с устьем пептидной части поры.

Влияние зарядов каналоформера и липида на потенциал-зависимость кооперативности функционирования элементарных каналов. Рис. 3, пример записи флуктуаций трансмембранного тока, протекающего через модифицированную СМЕ отрицательно заряженную мембрану, демонстрирует многоуровневую проводимость СМЕ-каналов.

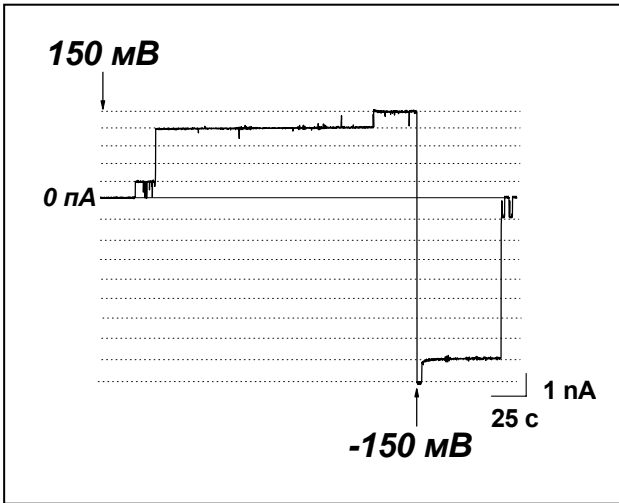


Рис. 3. Записи флуктуаций СМЕ индуцированного трансмембранного тока. Мембрана сформирована из эквимольярной смеси ДОФС и ДОФЭ, омывается раствором 0.1 М NaCl (рН 6). Моменты подачи потенциалов на мембрану указаны стрелками. Интервалы между пунктирными линиями соответствуют току, протекающему через одиночный элементарный канал при фиксированном значении V .

На рисунке видны одиночные элементарные каналы и каналы-кластеры.

Последние имеют проводимость, кратную проводимости элементарных каналов. На рис. 4 представлены гистограммы флуктуаций трансмембранного тока при $V = \pm 50$ мВ, являющиеся результатом обработки большого числа треков, аналогичных рис. 3.

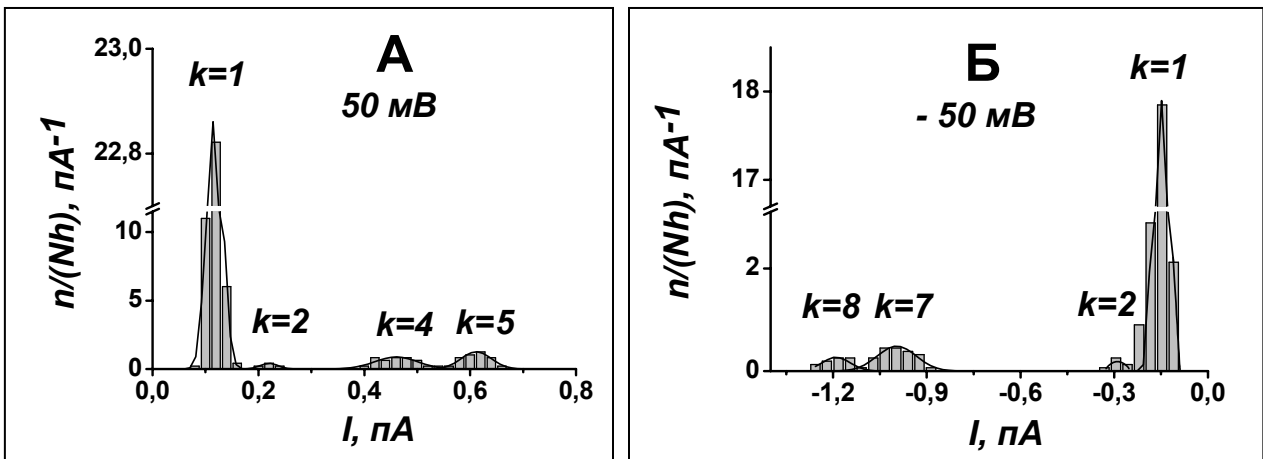


Рис. 4. Гистограммы флуктуаций СМЕ индуцированного трансмембранного тока (I) в мембранах, сформированных из эквимольярной смеси ДОФС и ДОФЭ, омываемых 0.1 М NaCl (рН 6). (А): $V = 50$ мВ; (Б): $V = -50$ мВ. Пики с $k = 1$ соответствуют открыванию–закрыванию элементарных каналов. Пики с $k = 2$ отвечают случайному открыванию–закрыванию двух элементарных каналов. Пики с $k \geq 3$ – результат синхронного функционирования элементарных каналов.

Приведенные на рис. 3 и 4 данные показывают, что число синхронно функционирующих элементарных каналов в кластере зависит от трансмембранного потенциала: при $V = +150$ мВ кооперативно открываются 3 элементарных канала, при $V = -150$ мВ синхронно закрываются 7 элементарных каналов (рис. 3), при $V = 50$ мВ в кластере могут кооперативно функционировать как 4, так и 5 элементарных каналов, при $V = -50$ мВ – как 7, так и 8 (рис. 4). Можно думать, что наблюдаемая потенциал-зависимость числа синхронно функционирующих элементарных каналов (далее

«синхронизация» или «кооперативность») определяется зарядами и(или) диполями олекул, входящих в состав кластера.

Для анализа вклада зарядов каналоформера и липида в кооперативность функционирования каналов была исследована потенциал-зависимость синхронизации открывания–закрывания элементарных СМЕ-каналов в заряженных и незаряженных мембранах, омываемых растворами различных концентраций NaCl. Поскольку при фиксированном значении трансмембранного потенциала могут наблюдаться большие каналы с разной близкой кратностью (рис. 4), то для представления результатов использовали среднее нормированное значение числа синхронно функционирующих элементарных каналов в кластере (m). Приведенные на рис. 5 результаты показывают: 1) в 1 М растворах NaCl, где заряды каналоформера существенно экранированы, кривая $m(V)$ симметрична относительно оси ординат, имеет колоколообразную форму, и величина m падает с ростом $|V|$; 2) в растворах малой концентрации соли (0.1, 0.02 М), максимальные значения m (m_{\max}) близки к таковому в 1 М растворах, но максимумы зависимостей $m(V)$, также имеющих колоколообразный характер, сдвинуты приблизительно на 100 мВ в область отрицательных V ; 3) кривые $m(V)$ в пределах погрешности измерений совпадают для отрицательно заряженных (ДОФС/ДОФЭ) и незаряженных мембран, сформированных из липидов с различной спонтанной кривизной (ДОФХ и ДОФЭ).

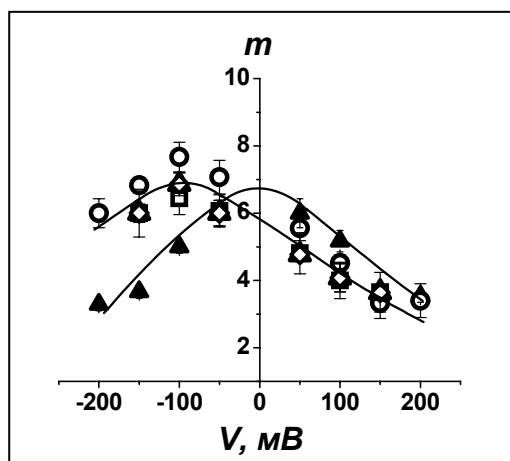


Рис. 5. Потенциал-зависимость m для СМЕ-кластеров. (▲): ДФФХ мембраны омываются 1 М NaCl (pH 6); (Δ): ДОФХ мембраны омываются 0.1 М NaCl (pH 6); (◊): ДОФЭ мембраны омываются 0.1 М NaCl (pH 6); (○): мембраны сформированы из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ, омываются 0.1 М NaCl (pH 6); (□): ДФФХ мембраны омываются 0.02 М NaCl (pH 6).

Анализ этих результатов позволяет заключить, что заряд липидных молекул и их спонтанная

кривизна не влияют на потенциал-зависимость синхронизации элементарных каналов в кластере, а заряд каналоформера ответствен за сдвиг m_{\max} в область отрицательных потенциалов.

Проведенное сравнение кооперативности функционирования СМЕ- и ССА-каналов показывает, что для СМЕ $m_{\max} = 7$, а для ССА $m_{\max} = 4$. Различия m_{\max} могут

быть результатом разной химической структуры молекул этих токсинов. Несмотря на различие m_{\max} , $m(V)$ -зависимости для СМЕ- и ССА-каналов имеют сходный характер. Если учесть, что молекулы СМЕ и ССА не различаются по величине заряда ($-2e$), то одинаковый сдвиг m_{\max} по оси V (-100 мВ), наблюдающийся для этих токсинов в разбавленных растворах, подтверждает вывод о роли заряда каналоформера в кооперативности функционирования элементарных каналов в кластерах.

Влияние мембранного дипольного потенциала на многоуровневую проводимость токсинных каналов. Для проверки предположения о роли диполь-дипольных и заряд-дипольных взаимодействий в синхронизации элементарных каналов в кластере были проведены исследования многоуровневой проводимости СМЕ-каналов в БЛМ, имеющих различный дипольный потенциал (φ_d). В качестве модификаторов, уменьшающих дипольный потенциал мембраны, использовали флоретин, а для увеличения φ_d – 6-кетохолестанол или RH 421. На рис. 6 представлены записи флуктуаций трансмембранного тока, соответствующие открыванию–закрыванию элементарных каналов и кластеров при $V = 160$ мВ в ДОФС/ДОФЭ-мембранах, омываемых 1 М растворами NaCl (pH 6), в присутствии 20 мкМ флоретина (рис. 6А), в отсутствие дипольных модификаторов (рис. 6Б) и в присутствии 5 мкМ RH 421 (рис. 6В).

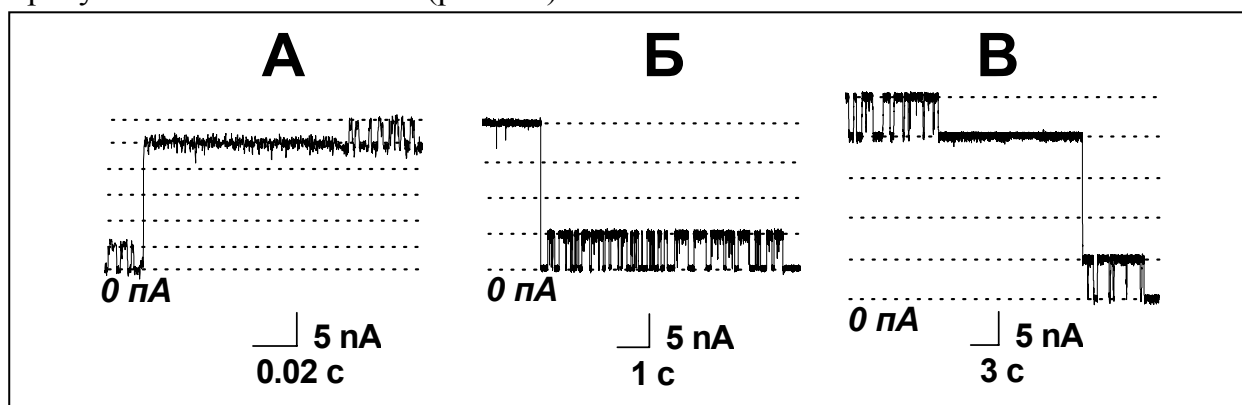


Рис. 6. Записи флуктуаций СМЕ индуцированного трансмембранного тока во времени в мембранах с различным дипольным потенциалом (φ_d). БЛМ сформированы из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ, омываются раствором 1 М NaCl (pH 6). $V = 160$ мВ. (А): $\varphi_d = (120 \pm 20)$ мВ (20 мкМ флоретина); (Б): $\varphi_d = (230 \pm 20)$ мВ (отсутствие дипольных модификаторов); (В): $\varphi_d = (300 \pm 40)$ мВ (5 мкМ RH 421). Интервалы между пунктирными линиями соответствуют току, протекающему через одиночный элементарный канал в заданных условиях.

Как видно на рис. 6, увеличение дипольного потенциала от 120 до 300 мВ приводит к уменьшению числа синхронно функционирующих элементарных каналов в кластере, а также к увеличению проводимости и времени жизни элементарных СМЕ-каналов.

На рис. 7А представлена потенциал-зависимость среднего нормированного числа синхронно функционирующих СМЕ-каналов в кластере в мембранах, омываемых 1 М растворами NaCl и различающихся дипольным потенциалом. Видно, что увеличение φ_d на ~ 200 мВ приводит к уменьшению m во всем изученном диапазоне V , при этом m_{max} падает с 9 до 6. Приведенные результаты подтверждают предположение о том, что синхронизация каналов в мембранах регулируется диполь-дипольными взаимодействиями.

В случае разбавленных растворов, т.е. в отсутствие экранирования заряда каналоформера высокой концентрацией NaCl, кроме диполь-дипольных взаимодействий за кооперативность функционирования каналов в кластере также ответственны заряд-дипольные взаимодействия, приводящие к сдвигу m_{max} в область отрицательных V (рис. 7Б).

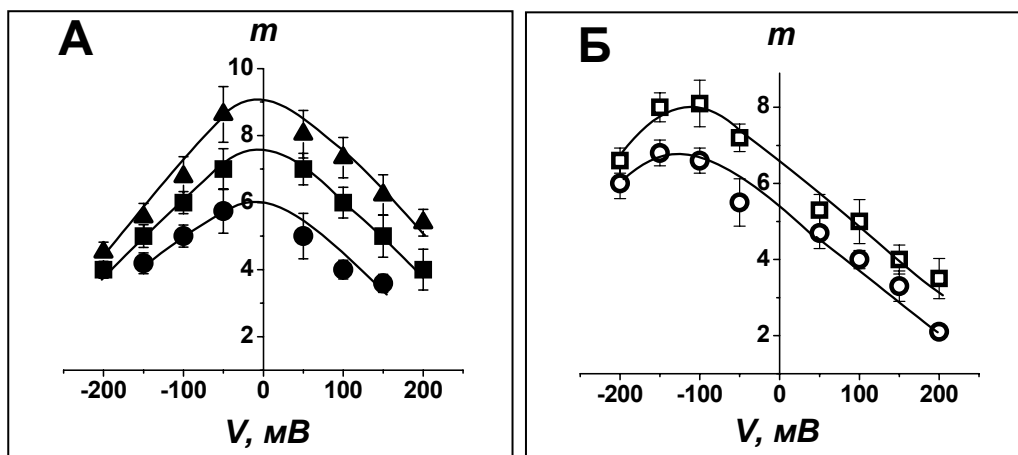
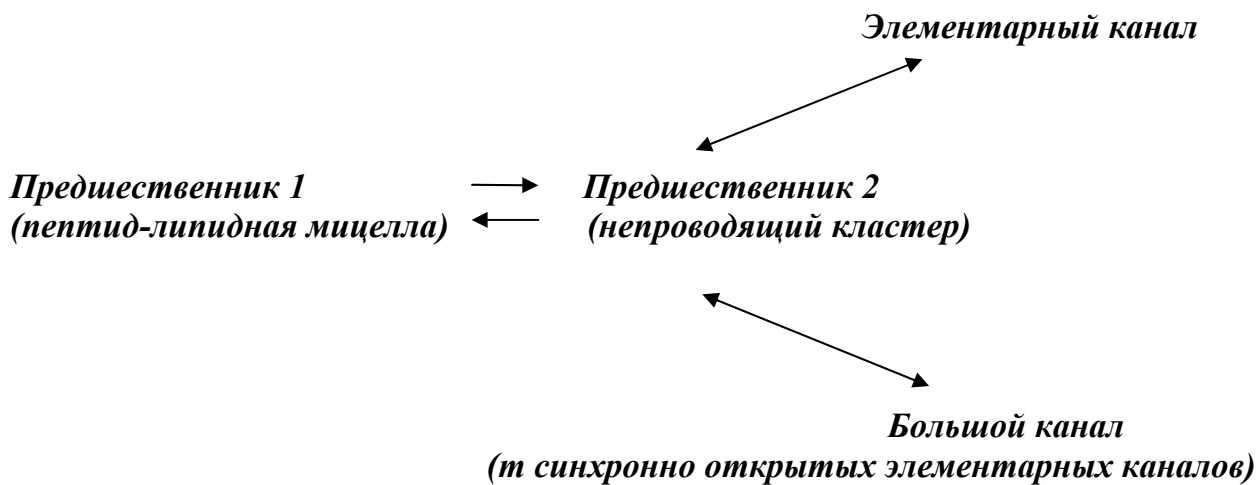


Рис. 7. Потенциал-зависимость m для СМЕ-кластеров в мембранах с различным дипольным потенциалом (φ_d). (А): Мембраны сформированы из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ, омываются 1 М NaCl (рН 6). (▲): $\varphi_d = (120 \pm 20)$ мВ (20 мкМ флоретина); (■): $\varphi_d = (230 \pm 20)$ мВ (отсутствие дипольных модификаторов); (●): $\varphi_d = (300 \pm 40)$ мВ (5 мкМ RH 421). (Б): Мембраны сформированы из ДОФС (33 М%) и ДОФЭ или 6-кетохолестанола соответственно, омываются 0.1 М NaCl (рН 6). (□): $\varphi_d = (230 \pm 20)$ мВ (67 М% ДОФЭ, отсутствие дипольных модификаторов); (○): $\varphi_d = (430 \pm 20)$ мВ (67 М% 6-кетохолестанола).

Механизм функционирования циклических липодепептидов в БЛМ.

Результаты нашей работы позволили уточнить ранее предложенную [27]

кинетическую схему функционирования СМЕ-каналов, а также качественно и количественно охарактеризовать включенные в нее состояния:



Наличие двух непроводящих состояний, предшествующих открыванию как элементарных каналов, так и каналов-кластеров, Предшественника 1 и Предшественника 2, было установлено в результате изучения потенциал-зависимости кинетических параметров одиночных каналов и относительного числа каналов-кластеров в общем пуле каналов. На рис. 8А и 8Б приведены зависимости времени жизни (τ_{on}) и вероятности нахождения элементарного СМЕ-канала в открытом состоянии в пачке (P_{on}) от V , соответственно. Как следует из рис. 8А и 8Б, τ_{on} и P_{on} не зависят от V . Отсутствие зависимости вероятностей и времен нахождения этих каналов в открытом и закрытом состояниях в пачке от трансмембранной разности потенциалов говорит о том, что величина энергетического барьера между проводящим и непроводящим состояниями элементарного канала не зависит от V . В то же время потенциал-зависимость открывания–закрывания СМЕ-каналов предполагает изменение энергетического барьера между открытым и закрытым состояниями канала в ответ на изменение V . Эти факты говорят о наличии, как минимум, двух непроводящих состояний элементарного канала с потенциал-зависимым переходом от Предшественника 1 к Предшественнику 2, в то время как переход из Предшественника 2 в проводящее состояние от V не зависит. Можно думать, что Предшественник 1 образуется в результате пептид-липидных взаимодействий: это «мицелла» с включенными в нее молекулами токсина и липида, формируется на *цис*-поверхности мембраны при некоторой «критической» концентрации СМЕ. Под действием трансмембранного потенциала происходят

конформационные перестройки в «мицелле», что приводит к образованию Предшественника 2.

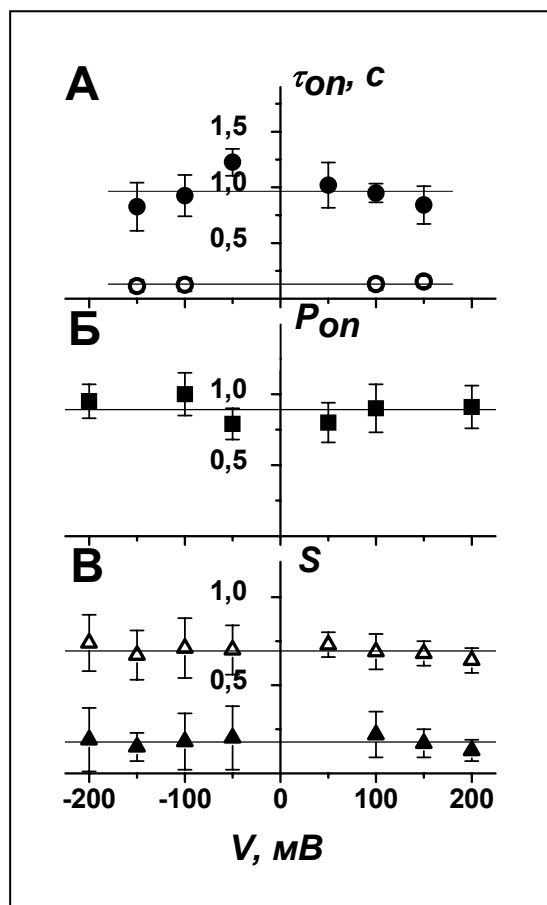


Рис. 8. Потенциал-зависимость среднего времени жизни элементарных СМЕ- (●) и ССА- (○) каналов (τ_{on}) (А), вероятности пребывания элементарных СМЕ-каналов в открытом состоянии в пачке (P_{on}) (Б) и относительного числа СМЕ- (▲) и ССА- (△) кластеров (S) (В). Мембраны сформированы из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ, омываются 0.1 М NaCl (рН 6). Проведена линейная аппроксимация экспериментальных данных.

Результаты исследования потенциал-зависимости относительного числа кластеров (S) привели к выводу, что из Предшественника 2 открываются как элементарные каналы, так и каналы-кластеры. На рис. 8В видно, что относительное число СМЕ-кластеров в общем пуле каналов не зависит от V ($S = 0.18 \pm 0.03$), следовательно, количество наблюдаемых каналов-кластеров при изменении V

увеличивается–уменьшается пропорционально числу регистрируемых элементарных каналов. Этот факт и говорит о наличии общего предшественника для кластеров и элементарных каналов. Поскольку абсолютное число каналов в мембране (как элементарных, так и каналов-кластеров) зависит от V , а относительное число каналов-кластеров не является функцией трансмембранного потенциала, то следует думать, что при изменении V изменяется концентрация Предшественника 2. В приведенной схеме переход от Предшественника 1 к Предшественнику 2 изображен иным образом, чем другие переходы. Это сделано для того, чтобы отметить лимитирующий характер этого перехода: время жизни Предшественника 2, определенное на основании изучения динамики трансмембранного тока через модифицированные СМЕ липидные бислои [28], составляет $\tau_{Pr2} \approx 3 \text{ мин} = 200 \text{ с}$, что существенно больше, чем время пребывания одиночных каналов в открытом состоянии. Для элементарных каналов $\tau_{on} = (0.9 \pm 0.1) \text{ с}$, а время жизни каналов-кластеров $T_{on} = (9.2 \pm 1.1) \text{ с}$. На основании $m(V)$ -зависимостей (рис. 5) можно представить, что Предшественник 2 –

непроводящий кластер, состоящий из нескольких элементарных каналов. Поскольку изменение синхронизации в кластере происходит за время, меньшее или равное времени разрешения экспериментальной установки (1 мс) (рис. 3), т.е. за время много меньше τ_{Pr2} , то можно считать, что при изменении V меняется число кооперативно функционирующих, а не число образующих кластер элементарных каналов. Экстраполяция зависимости $m_{max}(\varphi_d)$ в область $\varphi_d \rightarrow 0$ позволила оценить максимальное число элементарных каналов, входящих в состав Предшественника 2. В случае СМЕ оно равно 13. Поскольку при приложении трансмембранной разности потенциалов Предшественник 2 может функционировать как элементарный канал и(или) как канал-кластер, то можно полагать, что каждый из элементарных каналов имеет свой воротный механизм, а в кластере они объединены общим воротным механизмом. Нами установлен сходный характер изменений времен жизни элементарных каналов и кластеров при увеличении как концентрации соли в омывающих мембрану растворах, так и дипольного потенциала мембраны. Эти факты указывают на одинаковую природу воротных механизмов, ответственных за открывание–закрывание элементарных каналов и кластеров.

Результаты, полученные для ССА-каналов, отвечают приведенному механизму. Наблюдаются лишь количественные различия с приведенными выше величинами для СМЕ-каналов. В случае элементарных ССА-каналов в БЛМ, сформированных из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ, при концентрации околосмембранных растворов 0.1 М NaCl (pH 6) $\tau_{on} = (0.09 \pm 0.02)$ с, $S = 0.70 \pm 0.03$ (рис. 8А и 8В). Таким образом, можно считать, что предложенный механизм функционирования является общим для циклических липодепсипептидов.

Каналообразующая активность СМЕ. Результаты наших исследований показали, что дипольный потенциал мембраны (φ_d) влияет не только на характеристики одиночных СМЕ-каналов, но и на каналообразующую активность токсина в БЛМ. На рис. 9А представлена кинетика трансмембранного тока до и после введения флоретина (20 мкМ) в омывающие заряженные мембраны растворы 0.1 М NaCl (pH 6). Видно, что уменьшение φ_d от 230 до 120 мВ (за счет добавки флоретина) вызывает существенный рост трансмембранного тока при 50 мВ. Увеличение φ_d от 230 до 360 мВ (при введении 10 мкМ RH 421) приводит к

значительному уменьшению абсолютного значения стационарного трансмембранного тока при ± 50 мВ с одновременным изменением знака трансмембранного потенциала, открывающего СМЕ-каналы (рис. 9Б).

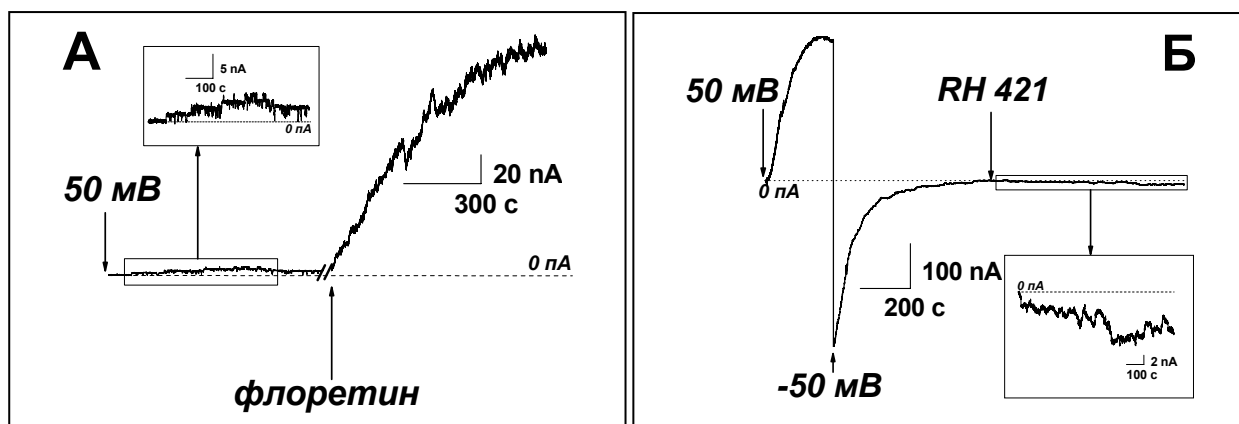


Рис. 9. Влияние дипольных модификаторов на кинетику трансмембранного тока. Мембраны сформированы из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ, омываются 0.1 М NaCl (рН 6) ($\varphi_d = (230 \pm 20)$ мВ). (А): стрелкой указан момент добавки 20 мкМ флоретина ($\varphi_d = (120 \pm 20)$ мВ); (Б): стрелкой указан момент введения 10 мкМ RH 421 ($\varphi_d = (360 \pm 40)$ мВ).

Влияние φ_d на такие параметры СМЕ-каналов, как g , t и S , может приводить к изменению стационарного трансмембранного тока при введении дипольных модификаторов. Увеличение φ_d сопровождается ростом g (рис. 6) и уменьшением t (рис. 7). Величина S от φ_d не зависит. Расчет показывает, что модификация указанных характеристик СМЕ-каналов не может быть причиной наблюдаемого различия трансмембранных токов до и после введения дипольных модификаторов. С другой стороны, абсолютное значение эффективного воротного заряда СМЕ-каналов ($|Q|$), коэффициент распределения каналоформера между водной и липидной фазами (K), который определяет число предшественников каналов в мембране (N_{Pr}), и химическая составляющая работы образования канала (U_{ch}) влияют на эффективное число открытых элементарных каналов:
$$N_{ch} = N_{Pr} (K) \exp(-U_{ch}) \exp(QVF / RT) \quad [17].$$
 Известно, что $|Q|$ зависит от φ_d [17], поэтому число открытых каналов при фиксированном V будет зависеть от дипольного потенциала мембраны. Анализ результатов изучения зависимости N_{ch} от V до и после введения дипольных модификаторов позволил заключить, что каналообразующая активность СМЕ в мембранах с различным дипольным потенциалом обусловлена не только изменением $|Q|$, но и K и(или) U_{ch} .

Эксперименты с дрожжевыми клетками, *Saccharomyces cerevisiae*, показали, что токсическая активность СМЕ связана с наличием определенных сфинголипидов в плазматической мембране клеток-мишеней [29,30]. Поскольку токсичность обусловлена способностью липодепептида образовывать ионные каналы в мембранах клеток-мишеней, были проведены исследования каналообразующей активности СМЕ в БЛМ, в состав которых вводились сфинголипиды мембран дикого (W303C) и мутантного (W Δ SYR2 α) штаммов дрожжевых клеток. Оказалось, что кластерная организация СМЕ-каналов зависит от вида сфинголипида, входящего в состав бислоя: m приблизительно в 1.2, а S в 2 раза больше в БЛМ, включающих сфинголипиды W303C, чем в бислоях с добавкой сфинголипидов W Δ SYR2 α . Эти изменения m и S могут обеспечить приблизительно двукратное различие трансмембранных токов. Тем не менее, из рис. 10 следует, что, независимо от V , эффективное число элементарных каналов в бислоях, содержащих сфинголипиды дикого типа, в 40 раз выше, чем в мембранах с участием сфинголипидов мутантных клеток. Значения эффективного воротного заряда для СМЕ-каналов в мембранах, включающих разные сфинголипиды, не различаются и составляют 1.0 ± 0.1 . Следовательно, каналообразующая активность СМЕ в содержащих эти сфинголипиды БЛМ определяется, главным образом, K и(или) U_{ch} .

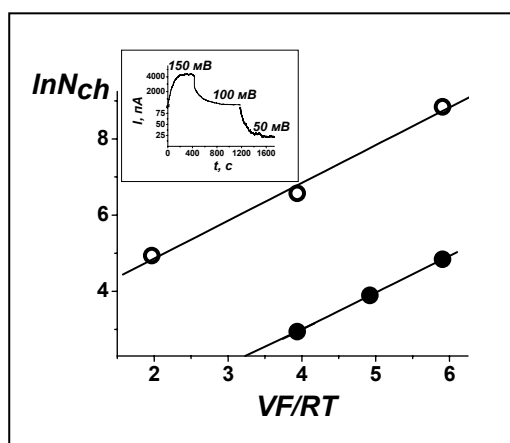


Рис. 10. Потенциал-зависимость эффективного числа элементарных каналов (N_{ch}) в мембранах, содержащих различные сфинголипиды. Мембраны сформированы из эквимольной смеси ДОФС, ДОФЭ, эргостерола и содержат 20 М% сфинголипидов мембран клеток дикого типа W303C (○) или мутантных клеток W Δ SYR2 α (●). Концентрация СМЕ равна 0.93 мкг/мл. Околосмембранный раствор – 0.1 М NaCl, (рН 6). На вставке показан пример экспериментального определения N_{ch} при различных значениях V в мембране, содержащей сфинголипиды W303C.

Известно, что дипольный потенциал мембраны зависит от ее сфинголипидного состава [31]. Сфинголипиды W Δ SYR2 α отличаются от W303C отсутствием одной полярной группы (ОН). Это позволяет полагать, что обнаруженные различия определяются дипольным потенциалом бислоев, содержащих указанные сфинголипиды.

Полученные результаты заставляют учитывать различие дипольных потенциалов клеточных мембран при сравнении токсичности СМЕ и его аналогов для клеток-мишеней.

ВЫВОДЫ

1. Многоуровневая проводимость ионных каналов, образованных синрингомицином Е и синрингостатином А в липидных бислоях, обусловлена кооперативным функционированием элементарных каналов. Диполь-дипольные и заряд-дипольные взаимодействия определяют синхронизацию элементарных каналов в кластере.
2. Элементарный СМЕ-канал представляет собой коническую пору с меньшим устьем со стороны введения каналоформера. Радиусы устьев канала составляют 0.25 – 0.35 нм и 0.5 – 0.9 нм.
3. Полученные данные позволяют предложить принципиальную схему образования каналов, которая включает два непроводящих состояния, предшествующих открыванию как элементарных каналов, так и каналов-кластеров.
4. Дипольный потенциал мембраны влияет на каналобразующую активность СМЕ за счет изменения эффективного воротного заряда каналов, а также коэффициента распределения токсина между липидной и водной фазами и(или) химической составляющей работы образования канала.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Ostroumova O.S.**, Malev V.V., Kaulin Yu.A., Gurnev Ph.A., Takemoto J.Y., Schagina L.V. 2005. Voltage-dependent synchronization of gating of syringomycin E ion channels. FEBS Letters. 579 (25), 5675-5679.
2. Kaulin Yu.A., Takemoto J.Y., Schagina L.V., **Ostroumova O.S.**, R. Wangspa, Teeter J.H., Brand J.G. 2005. Sphingolipids influence the sensitivity of lipid bilayers to fungicide, syringomycin E. J. Bioenerg. Biomembr. 37 (5), 339-348.
3. **Остроумова О.С.**, Гурьев Ф.А., Такемото Д., Шагина Л.В., Малев В.В. 2005. Кинетические характеристики одиночных ионных каналов и стационарная проводимость модифицированных фитотоксинами липидных бислоев. Цитология. 47(4): 338-343.

4. **Остроумова О.С.**, Малев В.В., Щагина Л.В., 2006. Кооперативность функционирования ионных каналов, образованных фитотоксинами, синргомицином Е и синргостатином А. Биологические мембраны. 23 (5), 412-419.
5. **Ostroumova O.S.**, Gurnev P.A., Schagina L.V., Bezrukov S.M. 2007. Asymmetry of syringomycin E channel studied by polymer partitioning. FEBS Letters. 581 (5), 804-808.
6. **Остроумова О.С.**, Гурьев Ф.А., Щагина Л.В. 2004. Зависимость кластерной организации ионных каналов, образуемых фитотоксинами в модельных липидных мембранах, от трансмембранного потенциала. Тезисы докладов III Съезда биофизиков России, Воронеж, Июнь 24-29. 1: 271-272.
7. **Ostroumova O. S.**, Gurnev Ph. A., Takemoto J.Y., Malev V.V., Schagina L.V. 2005. Kinetic parameters of phytotoxin ion channels in planar lipid bilayers. Abstracts of 49th Annual Meeting of Biophysical Society, Long Beach, California, February 12-16. Biophys. J. 88: 248a.
8. Schagina L. V., **Ostroumova O. S.**, Gurnev Ph. A., Takemoto J.Y., Malev V.V. 2005. Voltage-dependent synchronization of gating of phytotoxin ion channels in planar lipid bilayers. Abstracts of 49th Annual Meeting of Biophysical Society, Long Beach, California, February 12-16. Biophys.J. 88: 247a.
9. **Ostroumova O.S.**, Malev V.V., Gurnev Ph.A., Kaulin Yu.A., Takemoto J.Y., Schagina L.V. 2006. Membrane dipole potential modulates synchronization of gating of syringomycin E channels. Abstracts of 50th Biophysical Society Annual Meeting, Salt Lake City, Utah, February 18-22. Biophys.J. 90: 518a.
10. **Ostroumova O.S.**, Schagina L.V., Gurnev Ph.A., Takemoto J.Y., Bezrukov S.M. 2007. Probing pore geometry of the syringomycin E channel with polyethylene glycols. Abstracts of 51th Annual Meeting of Biophysical Society, Baltimore, Maryland, March 3-7. Biophys.J. 92: 613a.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Janisiewicz W.J. et al. 1999. J. Food Prot. 62: 1372-1375. 2. Bull C. et al. 1998. Biol. Control. 12: 89-95. 3. Sorensen K.N. et al. 1996. Antimicrob. Agents Chemother. 40: 2710-2713. 4. De Lucca A.J. et al. 1999. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 371-373. 5. Maget-Dana R., Ptak M. 1990. Biochim. et Biophys. Acta. 1023: 34-40. 6. Brodley C.L. et al. 1991. Mol. Plant-Microbe Interact. 4: 407-411. 7. Sheppard J.D. et al. 1991. Biochim. et

Biophys. Acta. 1064: 13-23. **8.** Hutchinson M.L. et al. 1995. Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 610-620. **9.** Carpaneto A. et al. 2002. J. Membr. Biol. 188: 237-248. **10.** Montal M., Mueller P. 1972. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 65: 3561-3566. **11.** Pickar A.D., Benz R. 1978. J. Membr. Biol. 44: 353-376. **12.** Flewelling R.F. et al. Biophys. J. 49: 541-552. **13.** Franklin J.C., Cafiso D.S. 1993. Biophys. J. 65: 289-299. **14.** Cseh R., Benz R. 1998. Biophys. J. 74: 1399-1408. **15.** Cseh R. et al. 2000. Eur. Biophys. J. 29: 172-183. **16.** Peterson U. et al. 2002. Chem. Phys. Lipids. 117: 19-27. **17.** Schagina L.V. et al. 2003. Bioelectrochemistry. 60: 21-27. **18.** Starke-Peterkovic et al. 2005. AJP-Regul. Integr. Comp. Physiol. 288: R663-R670. **19.** Krasilnikov O.V. et al. 1998. J. Membr. Biol. 161: 83-92. **20.** Merzlyak P.G. et al. 1999. Biophys. J. 77: 3023-3033. **21.** Yuldasheva L.N. et al. 2001. Biochim. Biophys. Acta. 1512: 53-63. **22.** Carneiro C.M. et al. 2003. Biochim. Biophys. Acta. 1612: 144-153. **23.** Malev V.V. et al. 2002. Biophys. J. 82: 1985-1994. **24.** Щагина Л.В. и др. 1998. Биол. мембраны. 15: 433-446. **25.** Kaulin Y.A. et al. 1998. Biophys. J. 74: 2918-2925. **25.** Malev V.V. et al. 2002. Biophys. J. 82: 1985-1994. **26.** Kuga S.J. 1981. J. Chromatogr. 206: 449-461. **27.** Малев В.В. и др. 2000. Биол. мембраны. 17: 653-665. **28.** Бессонов А.Н. и др. 2006. Биол. мембраны. 23: 248-257. **29.** Grilley M.M. et al. 1998. J. Biol. Chem. 273: 11062-11068. **30.** Stock S.D. et al. 2000. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 1174-1180. **31.** Brockman H.L. et al. 2004. Biophys. J. 87: 1722-1731.