

**БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ ВА ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ
УНИВЕРСИТЕТИ ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ
ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ 16.07.2013.К/В/Т.13.01 РАҚАМЛИ
ИЛМИЙ КЕНГАШ
БИООРГАНИК КИМЁ ИНСТИТУТИ, ПЕРНАМБУКО ФЕДЕРАЛ
УНИВЕРСИТЕТИ**

МЕРЗЛЯК ПЕТР ГРИГОРЬЕВИЧ

**НАНОСКОПИК ОҚСИЛ ПОРАЛАРИ СТРУКТУРА ВА
ФУНКЦИЯЛАРИНИНГ ЎЗARO БОҒЛИҚЛИГИНИ ТАВСИФЛАШ**

03.00.02 – Биофизика ва радиобиология

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

Тошкент – 2016

**Докторлик диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар
Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида 30.09.2014/В2014.5.В73 рақам
билан рўйхатга олинган**

Докторлик диссертацияси Биоорганик кимё институти ва Бразилиянинг Пернамбуко Федерал университетида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз) Илмий кенгаш веб-саҳифаси (<http://ss.biochem.uz>) ва “ZiyoNet” таълим ахборот тармоғида (www.ziynet.uz) жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи: Красильников Олег Владимирович биология фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар: Мирходжаев Улуғбек Закирович биология фанлари доктори, профессор

Мадьяров Шухрат Раимджанович
биология фанлари доктори

Турдикулова Шахло Уткуровна
биология фанлари доктори

Етакчи ташкилот: ЎЗР ФА Микробиология институти

Диссертация ҳимояси Биоорганик кимё институти ва Ўзбекистон Миллий университети ҳузуридаги 16.07.2013.К/В/Т.13.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2016 йил «___» _____ соат _____ да ўтадиган мажлисида бўлади (Манзил: 100125, Тошкент шаҳри, Мирзо Улуғбек кўчаси, 83. Тел.: 262 35 40; факс: (99871) 262 70 63). Диссертация билан Биоорганик кимё институти Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин. (Манзил: 100125, Тошкент шаҳри, Мирзо Улуғбек кўчаси, 83. Тел.: (99871) 262 35 40, факс: (99871) 262 70 63, e-mail: asrarov54@mail.ru).

Автореферат 2016 йил «___» _____ да тарқатилди.
(2016 йил _____ даги № _____ рақамли реестр баённомаси).

А.С.Тураев

Фан доктори илмий даражасини берувчи Илмий кенгаш раиси, к.ф.д., профессор

М.И. Асраров

Фан доктори илмий даражасини берувчи Илмий кенгаш илмий котиби, б.ф.д., профессор

Д.А. Кадирова

Фан доктори илмий даражасини берувчи Илмий кенгаш ҳузуридаги илмий семинар раиси, б.ф.д.

КИРИШ (Докторлик диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Жаҳонда оксиллардан ташкил топган ион каналларининг структура ва функцияларини ўзаро боғлиқлигини тадқиқ қилиш замонавий биофизиканинг энг муҳим вазифаларидан бири ҳисобланади. Ион каналлари наноскопик поралар бўлиб,

ионлар учун селективлик хусусиятига эга, у мембранадан турли молекулаларни танлаб ўтказади ёки уларнинг таъсирига жавобан ўзининг хусусиятларини ўзгартиради. Сўнгги тадқиқот натижаларига биноан айнан ион каналлари сенсор вазифасини бажаради, яъни тирик организмларнинг ҳароратини ўлчаш, ҳид, таъм ва ёруғликни ҳис қилади.

Шу билан бирга, баъзи микроорганизмлар (ва шу қаторда юқори патогенлилар) ишлаб чиқарган оксиллар ўз-ўзидан хўжайин хужайра мембранасига жойлашиб, у ерда *de novo* (яъни янгидан) ҳосил бўлган ион каналларидан ионлар билан бирга сувда эрувчан метаболитларни бошқарувга бўйсинмайдиган ўтиши хужайрани ўлимига олиб келади. Бу оксиллар нафақат касалликларнинг клиник кўриниши учун жавобгар, балки хужайра ва бактериялар жойлашган муҳитнинг таркиби ҳам ушбу оксилларга боғлиқ ҳолда ўзгаради. Шу сабабли оксиллардан ҳосил бўлган нанопоралар бутун дунё тадқиқотчиларининг диққат марказида, чунки фундаментал нуқтаий назардан нанопоралар тирик хужайралар функциясининг физиологик ва биофизикавий хусусиятларини тушунтириб берса, амалий томондан уларни нано-қурилмалар сифатида ишлатиш мумкинлиги тўғрисида гоё мавжуд. Жаҳондаги ўтказилаётган тадқиқотларда такидланаётганидек, оксил нанопоралар структураси ва унинг хусусиятларига таъсири ҳақидаги билимлар янги дорилар ва замонавий ускуналар учун нано-қурилма яратишда аҳамиятга эга.

Кўпчилик тадқиқотчилар нано-қурилмаларнинг асоси сифатида энг истиқболли ион каналлари бу *Staphylococcus aureus* бактериялари ҳосил қилган α -гемолизин (α -ГЛ) деб ҳисоблашади, шунинг учун кўп сонли илмий тадқиқотлар шу каналга бағишланган. Таъкидлаш керакки, α -ГЛнинг қўшқаватли липид мембраналарда сувга тўлган трансмембрана пора ҳосил қилиши, бундан 35 йил аввал Ўзбекистонда аниқланган.

Юқоридагилардан диссертация мавзуси ўта муҳимлиги ва зарурлиги кўринади, ушбу ион каналларининг функциясига оксилларнинг қайси структуравий ўзига хослиги таъсир қилиши, уларнинг селективлиги канал тузилишига ва аминокислоталар таркибига қандай боғлиқлиги ҳақидаги натижалар олдиндан мўлжалланган хусусиятларга эга бўлган нанопоралар яратилишига ёрдам беради.

Ушбу диссертация тадқиқоти 2011 йил феврал ойида имзоланган Ўзбекистон ва Япония ўртасидаги Қўшма баёнотда белгиланган вазифаларни амалга оширишга муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республикаси фан ва технологиялари ривожланиши устувор йўналишларига боғлиқлиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг V. «Қишлоқ хўжалиги, биотехнология, экология ва атроф муҳитни ҳимоя қилиш» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий тадқиқотлар шарҳи. Оксил пораларини структура ва функцияларининг ўзаро боғлиқлигини энг

замонавий усулларни қўллаган ҳолда ўрганишга йўналтирилган изланишлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, University of Manitoba (Италия), Columbia University, University of Chicago, University of Maryland (АҚШ), Миллий Физиология институти (Япония), Хужайра биофизика институти (Россия), Ўзбекистон миллий университети ва бошқа илмий марказларда олиб борилмоқда.

Оқсил нанопоралари структураси бўйича жаҳонда олиб борилган илмий тадқиқотлар натижасида қатор, жумладан, қуйидаги илмий натижалар олинган: вольтга боғлиқ анион каналининг (VDAC) тузилишли модели аниқланган (University of Manitoba, Италия) ва унинг функционал ўзига хослиги исботланган (University of Maryland, АҚШ); цитолизин *V. cholerae* El Torнинг кристалли структураси аниқланган (Columbia University, АҚШ); α гемолизиннинг (α -ГЛ) структураси гептамер эканлиги аниқланган ва унинг кристалл структураси (University of Chicago, АҚШ) исботланган.

Жаҳонда ион каналларини ўрганишда бир қатор устувор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда, шу жумладан: механосезгир ва TRP каналларини структура ва функцияларининг ўзаро таъсирини аниқлаш; канал ички тузилишининг потенциалга боғлиқ ўзгаришини исботлаш, турли органик молекулаларнинг нанопора хоссаларига таъсирини аниқлаш; энг янги нано секвенаторлар яратиш; токсик оқсиллардан канал ҳосил қилувчи α -ГЛ ва *Mycobacterium smegmati*порин А структураси ва функцияларини аниқлаш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. *Staphylococcus aureus* бактериялари синтезловчи экзотоксин α -ГЛ бугунги кунда жуда яхши ўрганилган ва истиқболли нанопора ҳосил қилувчи оқсиллардан бири ҳисобланади.

Унинг бирламчи ва кристалли структураси аниқланган бўлиб, потенциалга боғлиқлиги ва селективлик хусусиятлари батафсил ўрганилган. Шунинг учун бу нанопоралар тадқиқотларида идеал даражадаги модел система ҳисобланадики, унинг структурасини молекуляр-биологик методлар билан ўзгартириш мумкин. Мисол учун, сайт-йўналтирилган мутагенез методи ёрдамида нанопоралар ичидаги ёки унинг кириш жойидаги асосий заряд-лар сонини ва уларнинг жойлашишини ўзгартириш имкони мавжуд. Хорижий олимлардан проф. Х.Байли, Дж.Касиановичнинг илмий ишларида липид мембранада жойлашган α -ГЛдан ташкил топган нанопораларнинг ички тузилишини ва ундан турли молекулаларнинг ўтишига таъсирини тўлиқ ўрганилган. Проф. С.Бхакди раҳбарлигида цитолизин *V. cholerae* El Tor. Тадқиқ қилинган.

Хужайра мембранасининг моддалар транспорти жараёнида муҳим рол ўйнайдиган табиий мембраналардаги вольтга боғлиқ анион канал-лари проф.

М.Коломбини ишларида тўлиқ ўрганилган. Ҳозирги кунда макси-анион канали устида проф. Я.Окада бошчилигидаги гуруҳ изланиш олиб боради.

Мамлакатимизда ион каналлари бўйича тадқиқотлар акад. Б.А.Ташмухамедов, профессорлар П.Б.Усманов ва Р.З.Сабилов раҳбарлигида олиб борилмоқда, жумладан α -ГЛ, қорақурт ўргимчак захаридан олинган латротоксин ўрганилмоқда, умуртқалилар ва бўғмоёқлиларнинг қўзғалган

мембранасидаги натрий каналларини блокловчи бир қатор янги токсинлар ажратилган.

Диссертация мавзусининг диссертация бажарилаётган илмий тадқиқот муассасининг илмий ишлари билан боғлиқлиги. Диссертация тадқиқоти Биоорганик кимё институтининг «Бир қанча оксил токсинларидан ҳамда, бир қанча абиоген омиллардан ва табиий мембраналардаги изолирланган оксиллардан ҳосил бўлган ион каналларидаги сув пораларининг геометрик параметрларини ўрганиш» (1997-1999 йй.), Ф-4.1.3 «Сунъий ва табиий мембраналарда ион каналлари ва транспортерларнинг хусусиятларини ва уларнинг ҳужайра ҳажм бошқарилишдаги ролини ўрганиш» (2003-2007 йй.), ФА-ФЗ-Т112 «Ҳайвонлар ва ўсимликлар ҳужайралари ҳажми бошқарилишининг биофизик механизмлари» (2007-2011 йй.), ФА-ФЗ-Т080 «Ҳажмга боғлиқ анион транспортининг молекуляр физиология ва биофизикаси» (2012-2016 йй.) мавзусидаги лойиҳалар ҳамда Пернамбуко Федерал университетнинг Биофизика ва радиобиология департаменти (Бразилия) ИТИ тематик планлари доирасида, Япониянинг Миллий физиология институти ва Биоорганик кимё институти ўртасидаги ҳамкорлик меморандуми доирасида бажарилган.

Тадқиқот мақсади турли оксиллардан ташкил топган ион каналларида структура-функционал ўзаро боғлиқликни аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

ион канали узунлик ўқи бўйича поранинг радиусини ўзгаришини аниқлаш;

VDACдан ташкил топган сув пораларининг радиусини юқори ва қуйи ўтказувчанлик ҳолатларда аниқлаш;

нанопоралар стехиометриясини аниқлашнинг янги услубини ишлаб чиқиш;

цистеин-сканирловчи мутагенез методи ёрдамида нанопоралар ион ўтказувчанлик хусусиятига, α -ГЛ молекуласининг таркибига кирувчи турли аминокислоталар таъсирини аниқлаш;

цистеин-сканирловчи мутагенез методи ёрдамида каналнинг ион ўтказувчанлик хусусиятига таъсир кўрсатувчи аминокислоталарнинг кимёвий модификацияси устида тадқиқотлар ўтказиш;

α -ГЛ нанопораси ион ўтказувчанлик хусусиятига таъсир кўрсатувчи полианионлар ва краун-эфирлар таъсирини ўрганиш;

макси-анион каналининг VDAC оиласига кирувчи оксиллардан эканлигини текшириш.

Тадқиқотнинг объекти оксиллардан ташкил топган ион-ўтказувчан нанопоралар ҳисобланади.

Тадқиқот предмети нанопоралар хусусиятларини оксилларнинг структурасига ва уларнинг аминокислоталар таркибига боғлиқлиги ташкил этади.

Тадқиқот усуллари. Тадқиқотларда фойдаланилган усуллар энг замонавий

электрофизиологик ва биокимёвий бўлиб, Мюллер ва Монталл Мюллер усули ёрдамида қўшқават липид мембраналар ҳосил қилинган,

7

мембрана электрик параметрларини потенциал фиксацияси шароитида тўлиқ компьютерда амалга оширилган ҳамда цистеин-сканирловчи мутагенез усулидан ва оксилларни ажратиш каби усуллар қўлланган.

Компьютер программаларидан Originнинг 5 ва 8.6 ҳамда молекуляр моделларни шакиллантиришда Swiss-PDBViewer, Ver. 3.7 ва CS Chem3D Pro (CambridgeSoft, Cambridge, MA) программалари каби тадқиқот ва таҳлил усуллари қўлланган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат:

илк бор ион каналларининг ўқи бўйлаб поранинг радиусини ўлчаш мумкинлиги исботланган;

VDAC ион канали ўтказувчанлигини бир ҳолатдан иккинчисига ўтганда унинг радиуси ўзгариши аниқланган;

ион каналларининг хусусиятлари нафақат зарядланган гуруҳларнинг зарядига боғлиқ, балки уларнинг канал бўйлаб жойлашган ўрнига ҳам боғлиқ эканлиги аниқланган;

олигомер нанопораларнинг стехиометриясини *in situ* аниқлашнинг янги усули ишлаб чиқилган;

макси-анион канали VDAC оксиллар оиласига мансуб эмаслиги аниқланган;

илк бор полианионларнинг ион каналларини блоклаши уларнинг ўлчамларига боғлиқлиги билан биргаликда икки валентлик катионларнинг концентрациясига боғлиқлиги исботланган;

мембранада фиксация қилинган потенциал α -ГЛ пораларнинг эластик деформацияга учратиши аниқланган.

Тадқиқотнинг амалий натижаси. *In situ* олигомер нанопоралардаги мономерлар сони асосида, физиологик шароитга максимал яқин шароитда ион каналларининг стехиометриясини аниқлашнинг янги усули тавсия қилинди.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги ишда қўлланилган ёндашув ва усуллар, назарий маълумотларнинг олинган тажриба натижалари билан мос келиши, лаборатория тажрибалардаги замонавий биофизикавий жараёнларни аниқлаш адекват методлар билан амалга оширилганлиги, тажриба маълумотларининг корреляцион статистик таҳлил қилинганлиги билан изоҳланади.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти бу илмий иш авваламбор фундаментал бўлиб, оксилли наноскопик поралар хусусиятларининг аминокислотали таркибига ва оксилларнинг тузилишига боғлиқлигига аниқлик киритиш имконини яратади ва нано-датчиклар ясаш учун зарур хусусиятга эга бўлган нанопоралар ҳосил қилишга ёрдам беради.

Олинган натижалар нанотехнологияда амалий қўлланилади, яъни

замонавий қурилмада қўлланиладиган нано-датчиклар, нано-секвенаторлар, нано-фильтр компонентлар, биосенсорлар ва бошқа нано-қурилмаларни яратишда асос бўлиб хизмат қилади. Шу билан бирга натижаларни

8

фармакологияда, биомедицинада ва наноскопик поралар блокаторларини ишлаб чиқиш тадқиқотларида қўллаш мумкин.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Физиологик шароитларда ион каналлари тузилишини аниқлашда қўлланиладиган янги биофизик методлар:

Сокендай университети ва Япония Миллий физиология институтида эътироф этилиб, оксил нанопораларининг тузилишини аниқлашда фойдаланилган (Сокендай университети, Япония, Канагава, 2016 йил 10 мартдаги маълумотномаси). Ушбу янги биофизик методлар Ўзбекистон Республикаси Фанлар академияси томонидан эътироф этилган (Ўзбекистон Республикаси Фанлар академиясининг 2016 йил 10 майдаги маълумотномаси). Бу методлар турли олигомер ион каналларини радиусини ўлчаш ва стехиометриясини исботлаш имконини беради;

Пернамбуко Федерал университети (Бразилия) Биофизика ва радиобиология департаментида оксил нанопоралари ион оқимлари ўзгариши асосида ўта заҳарли оксиллар – микроцистинларни танлаб аниқлайдиган нанодатчик ишлаб чиқилган (Биофизика ва радиобиология департаментнинг 2016 йил 2 майдаги маълумотномаси). Бу нанодатчик гемодиализ тизимидаги циклик пептид токсинларни аниқлаш имконини беради.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Тадқиқот натижалари 21 та илмий-амалий анжуманларда, жумладан, «Экспериментал биология жамияти федерацияси» (FESBE) (Бразилия, 1996-2003, 2005) нинг XI-XVIII, XX кенгашларида, ҳар йили ўтказиладиган Биофизика жамиятининг 43, 44, 48 кенгашларида (АҚШ, 1999, 2000, 2004), Жанубий Конуснинг IV Биофизик конгрессида (Кампинас, Бразилия, 2000), Пора ҳосил қилувчи токсинлар IV Халқаро семинарида (Тренто, Италия 2000), Пора ҳосил қилувчи токсинлар, V Халқаро семинарида (Майнц, Германия, 2004), Япония физиологлар жамиятининг ҳар йили ўтказиладиган 87 съездида (Мориока, Япония, 2010) мавзуларидаги республика ва халқаро илмий-амалий конференцияларда маъруза кўринишида баён этилган ҳамда апробациядан ўтказилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича жами 38 та илмий иши чоп этилган, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 14 та мақола барчаси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркибикириш, олти боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхатидан иборат. Диссертациянинг ҳажми 198 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ишнинг долзарблиги ва мавзунинг янгилиги ва зарурлиги асослаб берилган, мақсад ва вазифалар таърифланган, тадқиқотнинг объект ва предмети аниқланган, тадқиқотларнинг Ўзбекистон Республикаси фан ва технологияларни ривожлантиришнинг устувор йўналишларига мос келиши кўрсатилган, тадқиқотларнинг илмий янглиги ва амалий натижалари ёритилган, олинган натижаларнинг ишончилиги асосланган, қўлга киритилган натижаларнинг назарий ва амалий аҳамияти ёритилган, нашр этилган ишлари тўғрисида ва диссертация структураси ҳақида маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **«Тадқиқ қилинаётган канал ҳосил қилувчи оксилларнинг структура ва хусусиятлари»**да, деб номланган биринчи бобида, нанопораларга бағишланган тадқиқотлар юзасидан ҳамда уларнинг тузилиши ва функцияларига тегишли адабиётлар тўлиқ ёритилган, шу билан бирга ушбу диссертация тадқиқотларидаги барча турдаги оксилли каналларнинг тузилиши ва хусусиятлари тўғрисида энг замонавий маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг **«Канал ҳосил қилувчи оксилларнинг ажратилиши ва уларнинг тадқиқот усуллари»** деб номланган иккинчи бобида, ушбу илмий ишда ишлатилган оксилларнинг олиниш усуллари тўлиқ ёритилган, ҳамда тадқиқотларда ишлатилган электрофизиологик методлар аниқ ва равшан баён қилинган.

Диссертациянинг **«Ион каналларининг полимер зондирлаш»** деб номланган учинчи бобида, илмий ишнинг асосий натижалари, ион каналларини радиусини аниқлаш тадқиқотлари асосида келтирилган. *α-ГЛ каналнинг ўқи бўйича пора радиусининг ўзгаришини аниқлаш. Staphylococcus aureus* бактерияси синтез қилувчи экзотоксин α-гемолизин сувда эрувчан мономер ҳисобланади. Бу полипептид 293 та аминокслота қолдиғидан иборат бўлиб, 33,2 кДа молекуляр массани ташкил қилади ва мембранада гомогептамер поралар ҳосил қилади. (Gouaux et al., 1994).

α-ГЛ каналининг ҳар бир алоҳида кириш жойининг ўлчамини аниқлаш ва унинг геометрияси тўғрисида маълумот олиш учун биз канал ўтказувчанлигини ноэлектrolитларнинг БЛМга нисбатан асимметрик бир томонлама, яъни *цис* ёки *транс* ҳолатида киритилганда ўлчаш ишларини олиб бордик. Бу усул билан яқка ион каналларининг асосий қисми ўтказувчанлигини ўртача катталигини ноэлектrolитларни каналнинг *цис* (g^{cis})

ёки *транс* томони (g^{trans}) ҳолатида аниқладик. Канал радиусини яна ҳам аниқ ўлчаш учун биз полимерларнинг гидродинамик радиусига боғлиқ ҳолда каналнинг тўлишини анализ қилдик. Поралар структурасининг ўзига хослигини адекват таърифлаш учун полимерлар билан тўлиш $F(w)$ коэффициентидан фойдаландик. Мувозанат шароитида (полимерларнинг симметрик аппликациясида) тўлиш коэффициенти 1га тенг бўлади. Бунда катта бўлмаган нозлектролитлар концентрацияси пора ичида ва эритмада бир хил бўлади.

10

1-расм. F^{cis} ва F^{trans} полимерларнинг гидродинамик радиусига боғлиқлиги.

Хатоликлар символдан кичик ёки тенг. Стрелкалар критик нуқталардаги радиуслар ўлчамларини кўрсатади. Эритма таркиби 100 мМ KCl, 5 мМ Трис/цитрат, pH 7,5; 20% ПЭГ. Ҳар бир нуқта полимерларнинг мавжуд ёки йўқлигидаги ($n=150-300$) амплитудалар бўйича каналларнинг тақсимланиш гистограммасидан олинган.

Тўлиш коэффициенти $F(w)$ қуйидаги тенглама ёрдамида ҳисобланди (Krasilnikov et al., 1998):

$$F(w) = \frac{\chi(w)}{g(w)} = \frac{\chi(w)}{g_0} \frac{g_0}{g(w)}$$

Бу ерда g_0 ва χ_0 – каналдан ўтмайдиган полимер мавжудлигидаги канал ўтказувчанлиги ва эритманинг электро ўтказувчанлиги; $g(w)$ ва $\chi(w)$ – каналдан ўтувчи полимер мавжудлигидаги канал ўтказувчанлиги ва эритманинг электро ўтказувчанлиги. Кутилганидек, тўлиш коэффициенти F (1-расм) полимер молекулаларининг гидродинамик радиусига боғлиқ бўлди. F нинг максимал кўрсаткичи, молекуларининг радиуслари 0,6дан кичик бўлган нозлектролитлар мавжуд бўлганда кузатилди. Шубҳасизки, порадан ўтаётган глицерин молекуласи оқимини тўхтатувчи каналнинг торайган қисми йўқ. Катта гидродинамик радиусли полимерлар учун биз F^{cis} и F^{trans} нинг турли ўлчамларини кузатдик ва бу канал геометриясининг

асимметриясидан далолат беради. Бу икки ҳолатда ҳам полиэтилен гликолла (ПЭГ) тўлиш коэффициентининг гидродинамик радиусга боғлиқлигининг икки фазалиги каналнинг ичида торайган қисми борлигидан далолат беради. Каналнинг *цис* томонини тўлдириш учун олиб борилган тадқиқотларда ПЭГнинг катта радиусли молекулалари учун қуйроқ даражадаги F ($F^{\text{cis}} \sim 0$) кузатилди. Радиуси 1,22 нмдан катта молекулалар *цис* тарафдан каналга кираолмайди, полимер молекулалари ўлчамларини кичрайтириш секин – аста тўлишнинг икки фазали ўсишига олиб келади. Бу икки фазали график шуни кўрсатадики, каналнинг сув порасининг ўлчами *цис* киришдан *транс* киришга силлиқ ўзгармайди. Бу боғлиқликни учта чизик билан таърифлаш мумкин. Биринчи чизик молекулаларнинг радиуси 0,9 дан 1,22 нмгача бўлган ораликқа тўғри келади. Иккинчи чизик нисбатан давомли $F = 0,36$ инвариант қисмга тўғри келади. Учинчи чизик глицерин билан PEG300 ($r = 0,31 - 0,6$ нм) орасидаги F параметрининг қиялигини акс эттиради. Тахминимизча, полимер радиуси (r) билан F^{cis} нинг боғлиқлигини аппроксимация қилувчи биринчи чизик ва ($F^{\text{cis}} \approx 0$)нинг инвариант қисмининг энг қуйи қийматининг

11

кесишган нуқтаси каналнинг *цис* кириш қисмининг радиусини (1,26 нм) белгилаб беради. Биринчи ва иккинчи чизикларнинг кесишган жойи каналнинг *цис* кириш томонидаги биринчи торайган жойнинг радиусини (0,9 нм) беради. Шу ва ундан кичкина ўлчамдаги полимерлар биринчи ва иккинчи торайган жойлар қисмига уларнинг радиусига боғлиқ бўлмаган ҳолда жойлашади. Уларнинг ҳажми поранинг иккинчи торайган қисми ўлчамидан ҳам кичиклашиши иккинчи ва учинчи чизикларнинг 0.6 нмда кесишувида амалга ошади. Шу тарзда, канал радиуси 1.25 нм дан 0.9 нм гача кичраяди, сўнгра эса радиус асосий тораший жойигача (0.6 нм) ўзгармайди. $F^{\text{cis}}=0,36$ бўлганда нисбатан узун бўлган оралик инвариант бўлимнинг мавжудлиги шуни кўрсатадики, 0.9 нм дан 0.6 нмгача бўлган гидродинамик радиусли ПЭГ молекулалари поранинг шу қисмини тахминан бирдек самарали тўлдиради. Уларнинг поралари ўқи бўйлаб кириб боришини асосий торайиш чеклайди. Бу торайишнинг тахминий жойлашувини шу “плато”нинг тўлдирилиш қийматини F^{cis} нинг максимал қийматига бўлган нисбати бўйича аниқлаш мумкин: $0.36/0.6=0,6$ (Krasilnikov et al., 1998).

Транс кириш орқали канални тўлдириш тажрибаларида ҳам F^{trans} нинг ноэлектrolитларнинг гидродинамик радиусига боғлиқлигининг икки фазали характери кузатилди (1-расм). *Цис* тўлдириш бўйича экспериментлар каби, 1.22 нмдан катта радиусли молекулалар каналга *транс* кириш орқали умуман кирмади ($F^{\text{trans}}=0$). Полимерларнинг порадан тўлиқ ажратилиши худди *цис* тўлдиришни амалга оширган ПЭГларда кузатилди. Бундан хулоса қилиш мумкинки, *транс* кириш *цис* кириш билан катталик жиҳатидан яқин. Худди олдинги ҳол каби, полимер ҳажмининг кичрайиши тўлдирилиш параметрининг прогрессив катталашишига олиб келди. F^{trans} нинг ноэлектrolитларнинг радиусига боғлиқлиги 4та қисмга бўлиниб, 4та тўғри

чизик билан аппроксимация қилиниши мумкин. Биринчи чизик (ўнгдан чапга) 0.8 нмдан 1.22 нм оралиғидаги молекулаларга тўғри келади. Бу ва пастдаги F^{trans} боғлиқлигининг инвариант бўлимига тегишли чизикнинг кесишуви каналнинг *транс* киришининг радиусини белгилаб беради (1.24 нм).

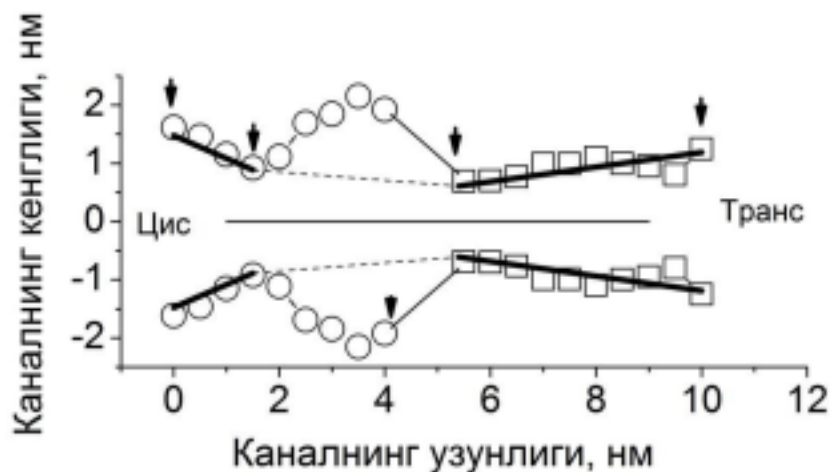
Глицериндан тортиб ПЭГ300 (0.31-0.6нм)гача бўлган молекула хажмлари диапазонида тўлиқлигича тушунилмаган сабабларга кўра F^{trans} F^{cis} дан сифат жихатидан фарқ қилади. Зондловчи молекулаларининг ҳажми кичрайиши натижасида F^{cis} ўсиб бораётган вақтда, F^{trans} ПЭГ300 ҳажмида ўзининг максимал қийматига етгунча тўйинади. Бошланғич хулоса сифатида 0.7 нм радиусли асосий торайиш мавжудлигини ва унинг пора ўқидаги ўрни F^{trans} нинг бу радиусда баланд қиймати (0.4) туфайли *цис* киришга яқин жойлашганлигини қабул қилиш мумкин.

Биз якка каналлар ўтказувчанлигининг полимер нозлектролитли муҳитда соддалаштирилган таҳлилимиз натижасидан шундай хулосага келдикки, каналнинг ҳар икки томонлама киришининг радиуси бир хил бўлиб 1.2-1.3нм га яқин. Шунингдек, яна бир хулоса шуки, каналда ифодаланган 0.6-0.7 радиусли асосий торайиш мавжуд. *Цис* тўлдириш бўйича ўтказилган тажрибалар шуни кўрсатдики, *цис* кириш ва асосий торайиш

12

орлиғида жойлашган 0.9 нм радиусли иккинчи торайиш ҳам мавжудлигини тахмин қилишимиз мумкин (2-расм).

Олинган натижаларни канал тузилиши ҳақидаги кристаллографик маълумотлар (Song et al., 1996) билан солиштириб кўрилди. Бу мақола муаллифлари канал тузилишини 3та бўлимга ажратадилар, шундан 2таси, қалпоқча ва поя (ёки ўзак), канал очилишини ҳосил қилади, ва бизнинг тадқиқотимизда *цис* ва *транс* кириши деб белгиланган. Канал порасининг узунлиги 10 нм ни ташкил қилади, *цис* киришнинг радиуси эса 1,4 нм ни ташкил қилади. *Цис* киришдан 3,5 нм масофада канал ўзининг максимал радиусига эришади. Поранинг тор 0,7 нм радиусли бўлими каналнинг марказий қисмида жойлашган. Шунингдек аниқландики, ўзак бўлимида пора радиуси, аминокислталарнинг 1,3 нм радиусли цилиндр ичига кириб боровчи ён занжирлари ҳажмидан келиб чиқиб, 0,7 нм дан 1,2 нм гача бўлган оралиғда ўзгариб туради. Каналнинг бундай тасвирланиши ва бизнинг тадқиқотимиз натижасида олинган геометрик хусусиятлари ўртасидаги сезиларли ўхшашликни кўриш мумкин. Деярли барча полимернинг зондлаш натижасида олинган структуравий хусусиятлари кристаллографик маълумотларга тўғри келади (2-расм).



2-расм. Кристаллографик ва полимерли зондлаш ёрдамида олинган натижалардан каналнинг узунлиги бўйлаб поранинг эффектив радиуси.

Каналнинг узунлиги, цис кириш қисмидан бошлаб, нанометрларда кўрсатилган.

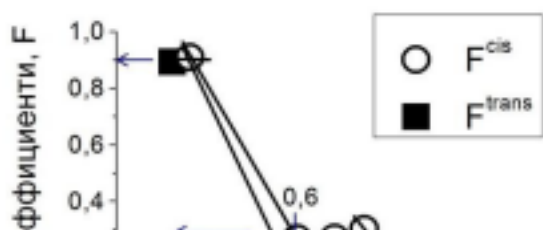
Кристаллографик анализ натижаларидан олинган поранинг тахминий профили (○, •) символларини тўғри чизик ёрдамида бирлаштириб кўрсатилган (Song et al., 1996). Кулранг чизик полимер зондлаш йўли билан олинган натижалар ёрдамида олинган поранинг профили кўрсатилган. Пунктир чизик билан полимер зондлаш имкони бўлмаган майдонлар белгиланган. Стрелкалар пора геометриясининг энг муҳим участкаларини кўрсатади.

Vibrio Cholerae цитолизинидан ҳосил бўлган ион каналининг ички геометриясининг тадқиқотлари. *V. cholerae* EL Tor ва кўпчилик non-O1 штаммлари ишлаб чиқарувчи цитолизинлар вирулентликнинг муҳим факторлари ҳисобланади (Yamamoto et al., 1984; Yamamoto et al., 1986). *V. cholerae* EL Tor (VCC) цитолизини 63 кДа молекуляр массали сувда эрувчан оксил бўлиб, мишен-хужайралар мембранасида нисбатан катта бўлмаган поралар ҳосил қилади (Zitser et al., 1993; Zitser et al., 1995).

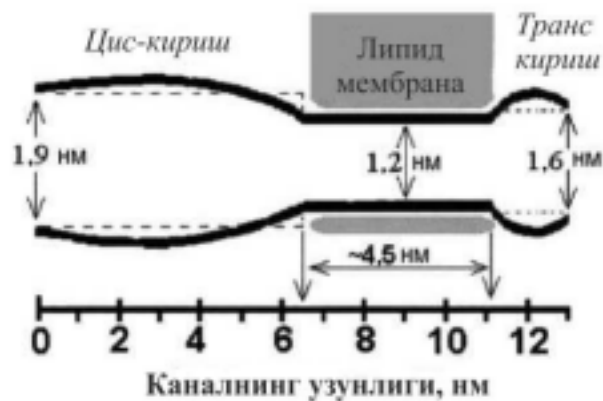
13

Бизнинг тажрибаларимизда порадан ўта олмайдиган (PEG2000) нозлектролит каналнинг тескари томонида бўлган ҳолда бошқа нозлектролитлар каналнинг *цис* ёки *транс* кириш тарафи билан алоқадаги ҳолатда каналнинг ўтказувчанлиги ўлчанди. Каналнинг аниқ кириш радиусини аниқлаш ва уни ички геометриясини ўрганиш учун каналнинг тўлиш $F(w)$ параметри катталигининг нозлектролитларнинг гидродинамик радиусига боғлиқлиқлигини таҳлил қилдик (3-расм). Барча олинган натижаларни таҳлил қилиб, VCC каналнинг моделини таклиф қилдик (4-расм). Бу модел албатта соддалаштирилган, лекин асосан электрон микроскоп ёрдамида олинган натижаларга мос келадики, шунга асосланиб, канал структурасини воронкасимон тузилишли деб тахмин қилинди (Zitser et al., 1997).

3-расм. F^{cis} ва F^{trans} ларнинг нозлектролитлар гидродинамик радиусларига боғлиқлиги. Горизо



нтал стрелкалар VCC каналининг цис ($\sim 0,3$) ва тран свестибюл ларидаги ($\sim 0,1$) тўлиш қиймат ларини кўрсатади. Вертикал стрел калар VCC каналининг критик нуқ таларидаги радиус қийматини кўр сатади. Эритма таркиби қуйида гича: 150 mM NaCl, 5 mM HEPES-NaOH, pH 6,5, 20 % ПЭГ. Хар бир нуқта полимерлар мавжуд ёки уларсиз каналларнинг ($n=80-150$) амплитудасига қараб тузилган гистограммадан олинган.



4-расм. VCC каналининг схематик тузилишининг кўриниши ва мембранадаги тахминий локализацияси. Торайиш узунлиги (диаметри $\leq 1,2$ нм) $\approx 6,5$ дан ≈ 11 нм гача. Каналнинг мембранадаги локализацияси бизнинг тадқиқотларимиз натижаларига ҳамда VCC ва VCC2лардан ҳосил бўлган ион каналларининг ўзаро ўхшаш-лигига асосланган (Krasilnikov et al., 1992; Zitzer et al., 1995).

VDACнинг очик ва ёпиқ ҳолатдаги ички геометриясини аниқлаш. Ион каналларининг энг муҳим хусусиятларидан бири уларнинг потенциалга боғлиқлигидир. Ҳозирги кунга келиб, каналларнинг бу хусусияти уларнинг структуралари ўзгариши билан корреляция қилишини исботловчи кўплаб маълумотлар тўпланган. Бундай жараёни ёритиш учун ишланган геометрик моделларни шартли равишда иккита синфга бўлиш мумкин. Бу "блоклаш" ва "қайта куриш". Потенциалга боғлиқ K^+ каналлари биринчи моделнинг ёрқин вакили ҳисобланади (Gulbis et al., 2000), VDAC (Zimmerberg and Parsegian,

14

1986; Doring and Colombini, 1985) ва коннексонлар (тирқич алоқали каналлар (Unwin and Ennis, 1984)) эса иккинчи моделнинг вакили ҳисобланади. Каналнинг ички ҳажм ўзгаришини ўлчаш ушбу икки синф моделлар орасини чегаралаш учун жуда фойдалидир. Шунинг учун биз юқорида ёритилган методдан фойдаландик. Бунда буқа мушакларидаги поринлардан ҳосил бўлган (Porin-31BM), VDACнинг ички структурасини ўзгаришини ўлчаш учун асимметрик қўшилган яхши ўтувчи нозлектролитлардан фойдаландик.

Каналнинг очик ва қуйи ўтказувчан (ёпиқ) ҳолатидаги ички ҳажм ўзгаришини топиш учуни биз мембранада икки хил потенциални фиксация қилдик. Каналнинг ички бўшлиғининг геометриясини таҳлилида очик ҳолатида мембранада катта бўлмаган потенциал (10 мВ) фиксацияланди ва каналнинг ўтказувчанлик спектри йиғилди. Қуйи ўтказувчан ҳолатидаги

тажрибаларда мембранада аввал 10 мВ потенциал фиксацияланди, канал ҳосил бўлгандан кейин эса потенциал бирданига 50 мВгача кўтарилди. Бу VDASнинг (ёпиқ) қуйи ўтказувчан ҳолатига олиб келди.

Экспериментларда ПЭГлардан фойдаланиб, юқорида таърифланган метод ёрдамида каналнинг ўтказувчанлиги ўлчанди, бунда мембрананинг бир томонида каналдан ўтмайдиган PEG (PEG4600), иккинчи томонида эса – яхши ўтувчи ПЭГлар қўлланилди. Бир хил шароитда алоҳида-алоҳида каналлар учун олинган натижалар гистограммада умумлаштирилган ва юқорида ёзилган каби анализ қилинган.

Каналлар ўтказувчанлиги, каналнинг ноэлектrolитлар билан тўлиш коэффициентини $F(w)$ 1 тенглама ёрдамида ҳисоблаш учун ишлатилди. Олинган натижалар 5-расмда кўрсатилган. Канал *цис* томонидан тўлганда, ҳамма 0,94 нм радиусдан катта бўлган ноэлектrolитлар каналга кирмайди ($F \sim 0$), 0,94 нмдан 0,8 нмгача диапазонда F^{cis} да тез ўсиш кузатилади. Демак каналнинг *цис* кириши $\sim 0,9$ дан 1,0 нмгача радиусли цилиндрсимон формага эга. Кейинчалик r нинг 0,6 нмгача камайиши F^{cis} нинг кўшимча ўсишига олиб келсада, унинг қиймати 1дан камлигича қолади. Каналнинг *транс* кириш томонидан тўлиш тажрибалари, VDAS каналининг *транс* томони бўшлиғининг геометрияси воронка кўринишли эканлигини кўрсатади. Каналнинг нисбатан кичик қисми гидродинамик радиуси 1,92 нмдан кичик бўлган ноэлектrolитлар билан тўла бошлайди. r камайиши F^{trans} нинг аста секин $\sim 0,2$ катталиқкача кўпайишига (PEG450 учун, $r = 1,05$ нм) олиб келади. r нинг кейинги камайиши F нинг кескин катталашиши билан бирга кечади. Юқорида қайд қилинганидек, F нинг r га боғлиқлик муносабати, *транс* кириш конуссимон формага эга бўлиб, унинг киришолди радиуси 2,0 нм тенг ва каналнинг ички маълум жойида $\sim 0,9 - 1,0$ нм (VDASнинг *цис* кириш размери)гача торайиб боради.

15

5-расм. VDAS-каналларнинг тўлиқ очиқ ҳолатида F^{cis} ва F^{trans} нинг ПЭГ гидродинамик радиусига боғлиқлиги. Вертикал стрелклар VDAS каналининг радиусининг критик нуқталардаги катталигини белгилайди. БЛМда +10мВ фиксация қилинди. Эритманинг таркиби қуйидагича: 1,15 М KCl, 5 мМ HEPES, pH 7, 20 % ПЭГ. Ҳар бир нуқта канал

ларнинг полимер бор ёки йўқ ҳолатидаги амплитудалари ($n=70-140$) бўйича

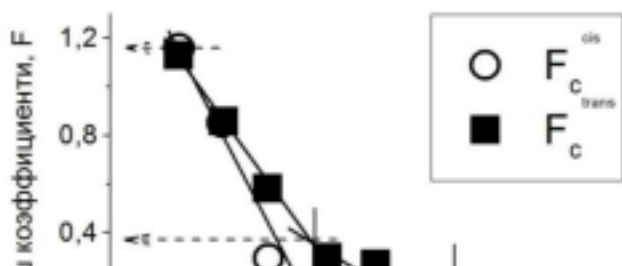
тақсимланиши гистограммасидан олинган.

Каналнинг *цис* (g_c^{cis}) ёки *транс* (g_c^{trans}) томонидан қўшилган турли размерли ПЭГ эритмаларида қуйи ўтказувчанлик ҳолатининг ўтказувчанлик қиймати ўлчанди. Худди, бутунлай очик ҳолатдаги каби, катта бўлмаган ноэлектрولитлар VDAC каналининг ёпиқ ҳолатидаги ўтказувчанлигини сезиларли даражада камайтиради. ПЭГ гидродинамик радиусини катталаштириш VDAC ўтказувчанлигини янги стационар қийматгача g_c^{cis} учун PEG1000дан бошланиб ($r = 0,94$ нм), g_c^{trans} учун эса PEG2000 ($r = 1,22$ нм)дан бошланиб ошишига олиб келди. Бу натижалар VDAC каналининг *транс* кириш қисми, унинг икки хил ҳолатидаги *цис* кириш қисмига қараганда кенг деган тахминга олиб келади. Аммо ёпиқ ҳолатда поранинг иккала кириш қисмининг ўлчамлари орасидаги фарқ анча кам. F_c^{cis} -г боғлиқлик (6-расмдаги оқ квадратлар) асосида аниқланган VDACнинг ёпиқ ҳолатдаги радиуси катталиги *цис* кириш қисмида ($\sim 0,9$ нм) каналнинг очик ҳолатидаги аниқланган катталик ($\sim 1,0$ нм, 5-расм) билан деярли аналогик қийматга эга. Бу маълумотлар асосида шундай хулосага келдикки, Porin 31BMдан ҳосил бўлган каналнинг *цис* кириш қисмидаги ўлчами бир ҳолатнинг ўтказувчанлиги иккинчи ҳолатга ўтишида, кучсиз (агар умуман содир бўлса) ўзгаришга учрайди.

Цис кириш қисмидан фарқли ўлароқ, қуйи ўтказувчанлик ҳолати учун F_c^{trans} -г нинг боғлиқлиги (6- расм, қора квадратлар), каналнинг очик ҳолатидаги аналогик боғлиқлигидан (5-расм) кескин фарқ қилди, айниқса катта гидродинамик радиусли полимер молекулалари учун. Агар VDAC ёпиқ ҳолатда бўлса, молекулаларнинг радиуси 1,22 нмга тенг (PEG2000) ёки катта бўлганда, улар каналга кирмайди. F_c^{trans} -г нинг боғлиқлиги F_c^{cis} -г нинг боғлиқлигидан мураккаброқ. Канални *транс* кириш қисмининг максимал радиуси қуйи ўтказувчанлик ҳолатида $\sim 1,2$ нмга яқин. Бу қиймат каналнинг очик ҳолатидаги радиусидан ($\sim 2,0$ нм) анча кичкина. Шундай қилиб, очик ва ёпиқ ўтказувчанлик ҳолатидаги *транс* кириш размерининг ўзгариши билан кечади. Каналнинг ёпиқ ҳолатидаги структураси, унинг юқори ўтказувчанликдаги ҳолатига қараганда цилиндр шаклига яқин бўлади. VDAC каналининг цилинрик ва конуссимон қисмининг узунлигини ёпиқ ҳолатидаги ўтказувчанлигини аниқлаш учун олинган натижаларнинг таҳлили

16

худди каналнинг очик ҳолатида олинган натижалар каби амалга оширилган. Биз каналнинг цилинрик ва конуссимон қисмининг узунлиги $\sim 2,9$ ва $\sim 1,7$ нмга тенг эканлигани аниқладик. Олинган натижалар шуни кўрсатадики, очик ҳолатидан ёпиқ ҳолатга ўтишдаги кузатиладиган геометрик ўзгариш асосан каналнинг *транс* қисмида содир бўлади.



6-расм. ПЭГнинг гидродинамик радиуси билан F_c^{cis} ва F_c^{trans} (VDAC-каналларининг

**қуйи ўтказувчан ҳолати учун
олинган)нинг боғлиқлиги.**

*Вертикал стрелкалар VDAS
каналнинг критик нуқталардаги
радиуслар катталигини белги
лайди. Ҳар бир нуқта канал
ларнинг полимер бор ёки йўқ
ҳолатидаги амплитудалари*

(n=90-200) бўйича тақсимланиши гистограммасидан олинган.

**7-расм. VDAS-каналнинг ички
тузилиши.**

*L – каналнинг узунлиги, цис
киришдан (0 нм) бошланиб транс
кириши билан (4,6 нм) тугайди .
Стрелка ва сонлар кириш қисмини
ёпиқ ва очиқ ҳолатдаги
диаметрини кўрсатади. Пунктир
чизиқ ва стрелкалар каналнинг
конуссимон қисмининг бошланғич
нуқтасини ёпиқ ва очиқ
ҳолатларда белгилайди.*

Porin-31BM каналнинг геометрияси ҳақидаги бизнинг
натижаларимиздан ва унинг узунлигига 4,6 нм (Guo et al., 1995) асосланиб
каналнинг ички ҳажмини ҳисоблаб чиқиш мумкин. Биз очиқ ва ёпиқ
ҳолатдаги ички ҳажм $\sim 23,3$ ва $\sim 13,3$ нм³ га тенг эканлигини аниқладик.
Шундай қилиб, каналнинг бир ҳолатдан иккинчи ҳолатга ўтаётганда
ҳажмининг ўзгариши 10 нм³ атрофида бўлади.

Олинган натижаларимиз асосида Porin 31BM дан тузилган каналнинг
ёпиқ ва очиқ ҳолатлари учун унинг схематик геометрик тузилишини таклиф
қилиш мумкин (7-расм). Каналнинг очиқ ҳолатида цилиндрсимон қисмининг
радиуси 1,0 нм атрофида бўлиб, узунлиги $\sim 2,5$ нмни ташкил қилади.
Конуссимон қисмининг радиуси цилиндрсимон қисмининг радиусидан кичик
бўлади. Каналнинг *транс* кириш қисмида воронканинг энг катта ($\sim 2,0$ нм)
радиуси кузатилади. Каналнинг бу қисмининг узунлиги тахминан $\sim 2,1$ нмга

17

тенг. Ёпиқ ҳолатга ўтиши радиуснинг унча катта бўлмаган қисқариши билан
кечади ($\sim 1,0$ дан $\sim 0,9$ нмгача) ва каналнинг *транс* конуссимон қисми
ҳисобига цилиндрсимон қисмининг узунлиги ошади ($\sim 2,5$ дан $\sim 2,9$ нмгача).
Макси-анион канал ва VDASнинг биофизик хусусиятлари орасидаги фарқ.
Макси-анион канал плазмолеммал VDAS эканлиги, бу икки каналнинг
умумий биофизик хусусиятларга эга деган тахминга асосланган. Шунга
қарамасдан ўхшашлик юзаки бўлиб, бу хусусиятларни физиологик шароитда

текширилганда фарқлари аниқ кўринди. Бунинг учун VDAC (каламуш жигарининг митохондриясидан ажратилган) билан физиологик шароитга яқин шароитда тажрибалар олиб бордик. Бу канални БЛМга киритиб, нормал Рингер эритмасида якка каналларнинг ўтказувчанлиги тахминан 530 пСмга тенг эканлигини аниқладик. Бу катталиқ шу эритмада якка макси-анион каналларнинг ўтказувчанлигидан 30-70% юқори (300-400 пСм), (Sabirov and Okada, 2009). Маълумки, тузларнинг юқори концентрацияларида макси анион каналнинг ўтказувчанлиги 580-640 пСм гача $K_m \sim 77-120$ мМ билан тўйинади (Hals et al., 1989; Hurnak and Zachar, 1994; Schlichter et al., 1990). Бундан фарқли равишда, якка VDAC каналларнинг амплитудаси 1 М KCl муҳитда 4100 пСм бўлиб, туз концентрацияларини янада ошиши VDAC ўтказувчанлигининг чизиқли ~ 10 нСмгача ошишини кўрсатди (Zambrowicz and Colombini, 1993). Каналнинг параметрларидаги бундай катта фарқ ҳар иккала поранинг ион транспорт механизмининг ҳар хил эканлигидан далолат беради. Ушбу хулоса бу икки каналнинг ион селективлигини солиштирганда ҳам тасдиқланди. Бу икки каналнинг ички тузилишидаги фарқи VDACнинг хлорга нисбатан глутамат учун заиф селективлиги ($P_{\text{glutamate}}/P_{\text{Cl}} = 0,45 \pm 0,03$) худди шу шароитда макси-анион каналининг анча юқори селективлигига ($P_{\text{glutamate}}/P_{\text{Cl}} \sim 0,2$) солиштирганда яққол кўринади.

Макси-анион канал ва VDACнинг яна бир умумий муҳим хусусияти – бу потенциалга боғлиқлиги ҳисобланади. Икки тип канал ҳам мусбат ҳам манфий потенциалларда ёпилади. Бунда вақт константаси +50 мВда 50-100 мсга яқин бўлиб, –50 мВда эса 300-400 мсга тенг бўлди. Шунга қарамасдан, минимал ўтказувчанлик даражаси муҳим фарқ ҳисобланади. Бу шароитда макси-анион канал бутунлай ёпилади, VDAC эса ҳар доим ўтказувчанликни аҳамиятли қисмини сақлайди (40-50%гача). VDACнинг “ёпик” ҳолати катион селективлик хусусиятига эгаллиги адабиётдан маълум (Colombini et al., 1996; Colombini, 2004).

Бу каналларнинг ички тузилиши ҳам турлича. Агар, бизнинг натижаларимизга мос равишда (8-расм), VDAC каналининг радиуси *цис* кириш қисмида 1 нмга тенг, *транс* кириш қисмида 2 нмга тенг бўлса ҳам, лекин макси-анион каналнинг радиусларининг фарқи анча кам: *цис* ва *транс* кириш радиуслари 1,16 нм ва 1,42 нмларга тўғри келади (Sabirov and Okada, 2004).

Юқорида баён қилинганларга асосланиб, қуйидагича хулоса чиқариш мумкин: макси-анион канал ва VDAC митохондриял порини турли оқсиллардан ҳосил бўлади. Аммо бу хулоса албатта VDACнинг плазмалеммада мавжуд бўлиши мумкинлигини асло инкор қилолмайди.

Диссертациянинг «Нанопора структураси ва ион ўтказиш хусусиятини цистеин-сканирлаш мутагенези усули ёрдамида тадқиқ қилиш» деб номланган тўртинчи бобида цистеин-сканирлаш мутагенези усули ёрдамида олинган натижалар муҳокама қилинган.

Ион каналлари нанопораларни ўрганиш учун идеал модел система

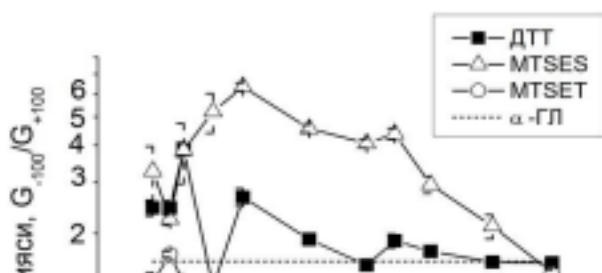
ҳисобланади, чунки улар ўз-ўзидан ҳосил бўлади ва уларнинг структураларини молекуляр-биологик усуллар ёрдамида ўзгартириш мумкин. Масалан, сайт-йўналтирилган мутагенез методи канал ичидаги поранинг кириш яқинидаги асосий зарядларни сони ва жойлашишини ўзгартириш учун ишлатилиши мумкин. Канал структурасидаги бундай ўзгариши натижасида, қоидага кўра, ион селективлиги ва ўтказувчанликнинг потенциалга боғлиқлик ($G-V$) формасида акс этади (Noskov et al., 2004; Jordan, 2005).

Ион каналлари хусусиятларини аминокислота ён занжирининг зарядлари назорат қилиш механизмини аниқлаш учун биз токсиннинг ёввойи типидан ташкил топган ва унинг генетик модифицияланган мутантларининг кимёвий модификациялари ёрдамида α -ГЛ каналнинг ион-ўтказувчанлик хусусиятларини ўргандик.

Бизнинг вазифамиз аминокислота қолдиқларининг тури ва асосий зарядлари жойлашувининг селективликка, ўтказувчанликка (G) ва α -ГЛ каналининг потенциалга боғлиқлигини аниқлашдан иборат эди. α -ГЛнинг ёввойи типининг бирламчи кетма-кетлигида цистеинларнинг йўқлиги учун, биз бир неча нуктали цистеинли мутантларни синтезладик ва мутант каналининг ион-ўтказувчан хусусиятларини аниқладик. Цистеин киртилган мутантларни, β -цилиндрнинг ўзак регионидаги ўрни бўйича, икки гуруҳга бўлдик: жуфт ва тоқ.

Каналнинг электростатик профилини хоҳлаган тарзда назорат қилиш учун биз цистеиннинг сульфгидрил группалари билан ўзаро таъсирлашувчи реагентларни ишлатдикки, уларнинг мусбат ва манфий зарядлари цистеиннинг ён занжирларига боғланади. Бу реагентларнинг цистеин ён занжирлари билан реакцияси $-SH$ группани $-SS-R$ га ўзгартиради, бу ерда $-R$ –зарядланган қисм: $-CH_2CH_2SO_3^-$ (MTSES) ва $-CH_2CH_2N(CH_3)_3^+$ (MTSET).

Манфий заряднинг канал ўзагига қўшилганда тоқ аминокислоталар асимметрияни кучайтирди, мусбат заряднинг қўшилиши эса канал ўтказувчанлик асимметриясини камайишига олиб келди. Бундан ташқари бу янги зарядларнинг таъсири канал ичидаги модифицияланган цистеин қолдиқларининг жойлашишига боғлиқ бўлди (8-расм). G130C дан ташқари жуфт рақамли мутантлар ҳосил бўлган каналлар реагентлар учун сезгир бўлмади.



19

8-расм. α -ГЛ цистеинли мутантлар ўтказувчанлиги асимметриясининг сульфид

рил реагентлар таъсирида ўзгариши. Мутантлар кетма кетлиги чандан ўннга: T129C, G130C, K131C, D127C, G133C, L135C, G137C, N121C, N139C, S141C и G143C. Эритма таркиби: 100 мМ KCl, 30 мМ Трис-HCl, pH 7,5. Масофа каналнинг транс кириш қисмидан.

Қўшилган зарядларнинг каналлар катион-анион селективлигига таъсири 9-расмда кўрсатилган. Бу экспериментларда сульфгидрил реагентлар липид мембранага аввалдан критилган каналларга таъсир этилган.

9-расм. Сульфгидрил реагентларнинг цистеин мутантлардан ҳосил бўлган каналнинг реверсия потенциалига таъсири.

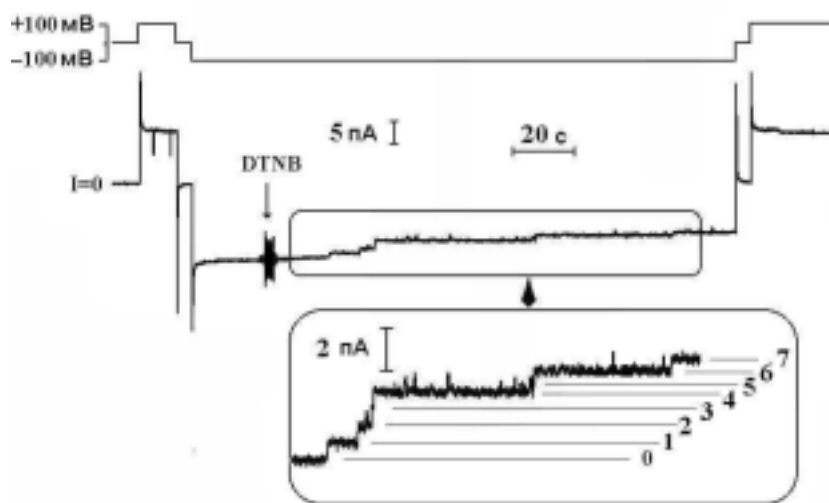
Мембрананинг транс ва цис тарафларида 100 ва 300 мМ KCl ва иккала тарафида қўшимча 30 мМ Трис-HCl, pH 7,5 мавжуд. Мутантлар кетма-кетлиги 8-расмдагидек.

Янги зарядларнинг эффективлиги канал ўкининг узунлиги бўйлаб жойлашишига боғлиқ бўлди. Нисбатан кучсиз эффект каналнинг кириш қисмига яқин бўлган зарядлар учун топилди. Зарядларнинг таъсири масофа бўйлаб кучайиб, транс киришдан 1-1,5 нмда V_{rev} да максимал, $\sim +21$ мВ (MTSET) ва -24 мВ (MTSET) катталиқга эга бўлди. Ўтказувчанликнинг солиштира муносабати $P_K/P_{Cl} \sim 0,001$ ва ~ 170 ни ташкил этди. Шу вақтнинг ўзида α -ГЛ ёввойи типи заиф анион-селектив бўлиб, $V_{rev} \sim +7,6$ мВ ва $P_K/P_{Cl} \sim 0,46$ га тенг. Кимёвий модифицирланган канал учун V_{rev} қиймати Нернст потециалига яқин бўлди ва ушбу шароитда Cl ва K^+ учун $\sim +22$ мВ ва ~ -25 мВни ташкил этди. Зарядлар V_{rev} ва G-V графиклари ассимметриясига турлича таъсир килди. V_{rev} бирламчи ўсишдан кейин максимал даражага эришади ва сўнг деярли бутунлай доимий бўлиб қолади. (9-расм). Ассимметрия катталиги эса максимумга етгач тезда *транс* киришдан узоклашиши билан камаяди (8-расм). Бу натижалар умумий (интегралланган) заряд катион-анион каналларининг танлаши учун жавобгар эканлигини кўрсатади. Зарядларнинг

каларининг шакли учун ҳал қилувчи аҳамиятга эга.

Олигомерли нанопоралар стехиометриясини аниқлашнинг янги усули. Узоқ йиллар давомида α -ГЛ канал 6 та мономердан ташкил топган деб ҳисобланган, чунки электрон микроскопик тадқиқотлар асосан гексамер структурадан далолат берарди (Olofsson et al., 1988; Hebert et al., 1992). Аммо рентгеноструктур тадқиқотлар кимёвий модификация билан биргаликда шуни кўрсатадики, α -ГЛ канал гептамер бўлса керак (Gouaux et al., 1994). Атом кучи микроскопия усули ёрдамида олинган натижалар бир мунча қарама қарши бўлди. Шундай қилиб гептамер модел битта тажриба жараёнида тасдиқланган (Fang et al., 1997) бўлган пайтда, бошқа тажрибалар натижаси (Czajkowsky et al., 1998) липид мембранага гексамер структура ҳосил бўлишига гувоҳлик беради. Бунга боғлиқ ҳолда биз физиологик шароитда максимал яқин бўлган ион каналлар стехиометриясини аниқлаш учун янги усул ишлаб чиқишга уриниб кўрдик. Бу усул асосида бизнинг экспериментал кузатув ётади. Яъни DTNB сульфгидрил-специфик реагентнинг α -ГЛ мутанти билан ўзаро таъсири аввал дифтерал токсинида кузатилгандек (Mindell et al., 1994; Huynh et al., 1997) бор ёки йўқ принципи асосида кетмай, балки зинапоя шаклида олигомер каналнинг алоҳида молекуласида систеин қолдиғининг модификацияси кетма кетлигини кўрсатиб беради (10-расм). Зиналар орасидаги вақт жуда фарқли бўлди ва бу жараённинг стохастик характерини кўрсатади.

Канал ўтказувчанлигининг DTNB таъсирида камайиш зиналарининг максимал сонининг еттига тенг бўлди ва бу ҳолат модифицияланган 38



10-расм. DTNB таъсирида 17С мутант канали ўтказувчанлигининг ўзгариши. DTNB нинг яқка каналга таъсири. Ячейканинг иккала бўлимидаги эритма-лар таркиби 100 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА и 30 мМ трис HCl, pH 7,5.

Кузатилган бошқа ҳолларда зиналар сони тўрт ва олти оралиғида бўлди. Реагент таъсирида содир бўлган ўтказувчанлик камайиши $6,5 \pm 1,6$ пСмни ташкил қилди (ўртача кўрсаткич 226 мартада -100 мВда қайд қилинди). Ҳар бир тажрибада зиналар сони бир хил бўлишини кутиш керак эмас, чунки

пораларнинг олигомер субъединицалар реакциясининг боришини бир неча йўллари мавжуд (Braha et al., 1997). Шунга қарамасдан, маълум ҳолатлар оралиғидаги биринчи ва охири қадамлар ўхшашроқ бўлиши керак. Бу фикрни текшириш учун алоҳида зиналарнинг амплитудаларини таҳлили ҳар бир канал учун кетма-кетликда ўтказилиб, етти зина кузатилди. Ҳақиқатдан, амплитуданинг ўртача қийматидан стандарт фарқининг ўзгариши кетма-кетликдаги тартиб рақамига боғлиқлиги кўнғироқ шаклида бўлди. Кутилгандек, максимал фарқ 3-5 қадам учун кузатилиб, шу вақтнинг ўзида 1 ва 7 қадамларда катта бўлмаган силжиш кузатилди. Шундай қилиб, яқка канал ўтказувчанлигини етти этапли камайиши бизнинг экспериментал системамида α -ГЛ канал гептамер эканлигини исботлайди.

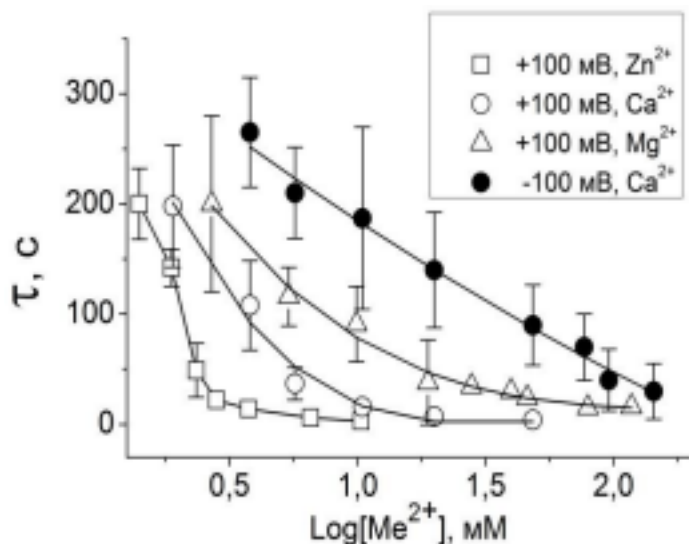
Диссертациянинг « **α -ГЛ каналга полианионларнинг таъсири**» деб номланган бешинчи бобида α -ГЛ каналларнинг полианионлар билан блоканиши тўғрисидаги натижалар келтирилган. Глюкозаминогликанлар полианионларнинг (ПА), структуравий бир хил бўлмаган группасига мансуб бўлиб физиологик жараёнларга кенг-қўлмли таъсир кўрсатади. Буларга таниб олиш, адгезия, мембрана транспорти, анти-бактериал ҳимоя киради. Улар Ca^{2+} ионлари иштирокида (Vannucchi et al., 1985) фосфатидил холин (ФХ) билан ўзаро таъсирлашади ва ион каналлари ва рецепторлар регуляциясида иштирок этади (Van et al., 2006; Suppiramaniam et al., 2006). Бундан ташқари, ПАнинг ион каналлар билан ўзаро таъсири ПА молекуласининг ўлчамига боғлиқ деган фикрлар мавжуд (Chicoine et al., 2004). Бироқ, ПАнинг ион каналлари функциясига таъсирининг батафсил механизми яхши ўрганилмаган. Бу масаланинг ечими учун биз турли ўлчамдаги икки хил ПАнинг α -ГЛ каналлар ўтказувчанлигига таъсирини, ҳамда шу таъсирнинг эритма таркибига боғлиқлигини ўрганиб чиқдик.

Агар α -ГЛ билан модифицирланган мембранада кучланиш қайд қилинса, бунда ток бирданига ўсади, чунки ионлар шу пайтда очик ҳолатдаги каналлар орқали ўтади, кейин токнинг секин-аста камайиши каналларнинг қуйи ўтказувчан ҳолатига ўтиши билан изоҳланади. Мембранани ювиб турувчи эритма таркибида (рН 7,5) гепарин ва Ca^{2+} ионлари йўқ шароитда ҳар қандай белгининг 100 мВ-импульсли потенциал берилиши каналларнинг ёпилишига олиб келмайди. Мембрананинг иккала томонига ПА эритмасини қўшилиши сезиларли эффект бермади. Эритмага CaCl_2 қўйилгандан сўнг токнинг сезиларли релаксацияси кузатилди. Бунда ПА ва Ca^{2+} нинг эффекти модда қўшилган томонга ва қайд қилинган кучланишнинг ишорасига боғлиқ бўлди. Шу билан бирга биз α -ГЛ каналларнинг потенциалга боғлиқлигига бошқа икки валентли катионлар таъсирини ҳам тадқиқ қилдик. ПАли эритмага Mg^{2+} ва Zn^{2+} ионлари қўшилганда, кузатилган эффектлар сифат жиҳатидан Ca^{2+} эффектига аналогик тарзда бўлди. Ягона фарқ турли ионларнинг каналнинг потенциалга боғлиқ ўтишига таъсири эффективлигида кузатилди. Уччала катионларнинг концентрациясини оширилиши ПАнинг қайд қилинган

концентрациясидаги ток релаксация вақтини камайтиради (11-расм). Катионларни эффективлиги бўйича қуйидаги кетма-кетликда жойлаштириш мумкин бўлди: $Zn^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$, бу эса катионларнинг

22

α -ГЛни ҳужайраларга ингибирловчи таъсири қатори билан бир хил (Bashford et al., 1986; Bashford et al., 1988).



11-расм. Ўтказувчанли книнг релаксация доимий лиги вақтининг (τ) икки валентли катионлар кон центрациясига боғлиқлиги.

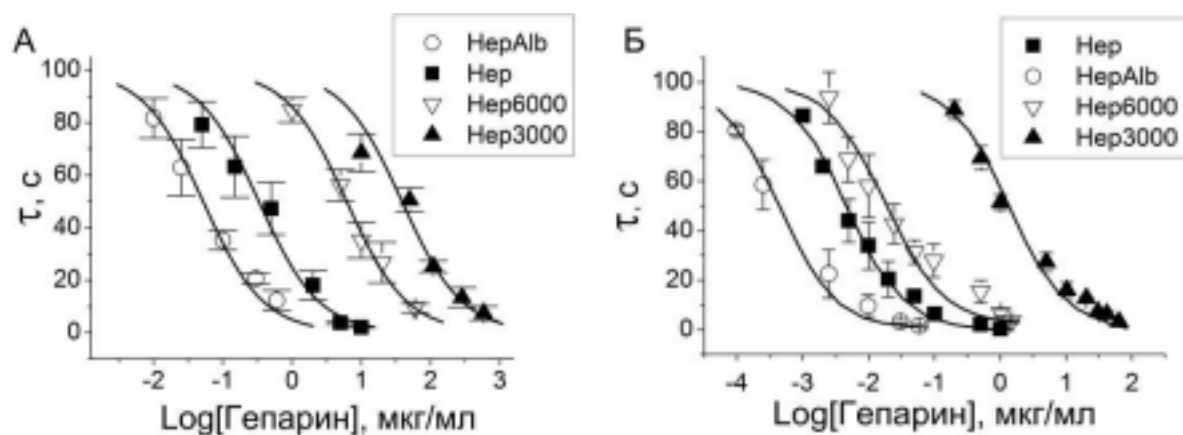
Икки валентли катион хлоридлари (абсцисса ўқида кўрсатилган концентрация да) икки томонига бир вақтда қўшилган. Эритма таркиби 100 мМ KCl, 6 мкг/мл гепарин ва 10 мМ Трис-HCl, pH 7,5, n=3-5.

ПАнинг α -ГЛ каналларга таъсир механизмини аниқлаш учун биз, турли размердаги молекулаларга эга гепарин ва декстран сульфатлар (ДС) билан тажрибалар ўтказдик. Бу экспериментларда биз гепарин-альбумин (НерAlb, 4,8 гепарин молекуласи битта бука зардоби альбумини молекуласи билан боғлиқ); ўртача молекуляр массаси 18000 г/мольга тенг бўлган гепаринлар (Na-тузлари шаклида), (Нер); 6000 г/моль (Нер6000); 3000 г/моль (Нер3000); 563 г/моль молекуляр массали гепарин дисахаридлар (НерDi); ДС ўртача молекуляр массаси 500000 г/моль (DS500); 10000 г/моль (DS10); 5000 г/моль (DS5). Гепаринларнинг канални блок қилиш хусусияти мембрананинг қўшиладиган томонларига боғлиқ бўлдики, уларнинг эффекти размер ва концентрациянинг ошиши билан ошиб борди (12-расм). Энг кичик ҳисобланган гепарин, НерDi, ҳатто 2 мг/мл концентрацияда ҳам α -ГЛ каналга деярли таъсир қилмади. Шу тарика, диффузия коэффицентлари кичик бўлишига қарамасдан, катта ПАлар эффективроқ бўлди ва тезроқ бўлган ток релаксацияларини амалга оширди. Ушбу тадқиқотларда ишлатилган гепаринларни қуйидаги кетма-кетликда жойлаштириш мумкин (эффективлиги камайиш тартибида): НерAlb> Нер> Нер6000> Нер3000>> НерDi.

Декстран сульфатлар α -ГЛ каналнинг потенциалга-боғлиқлигига ҳам таъсир кўрсатди. ДС эффективлигининг ошиши уларнинг размерини ошиши билан бирга кечди: C_{50} қиймати $220,0 \pm 30,0$ мкг/мл (DS5), $7,2 \pm 1,5$ мкг/мл (DS10) ва $1,7 \pm 0,3$ мкг/мл (DS500)ни ташкил этди. ДС гепаринга қараганда юқорироқ мусбат заряд зичлигига эга, лекин уларнинг α -ГЛ каналга таъсир

эффективлиги пастроқ бўлди. Бу эса, декстран сульфат ва гепарин молекулаларининг тузилишларидаги фарқ билан боғлиқ бўлиши мумкин.

23



12-расм. α -ГЛ каналларнинг релаксация вақти доимийлигига ПАнинг таъсири.

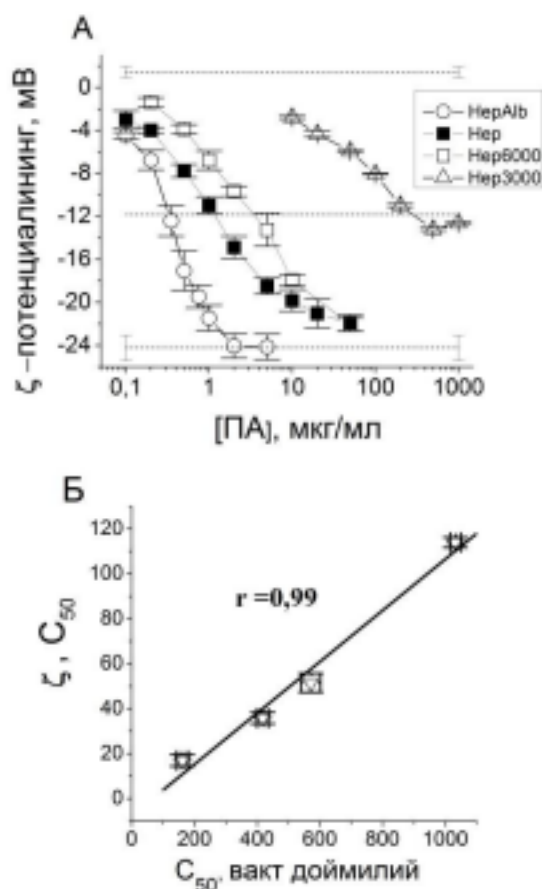
Релаксация вақти доимийлигининг ячeyкани цис (А) ёки транс бўлим (Б)идаги гепариннинг концентрациясига боғлиқлиги. Ўтказилган узлуксиз чизиқлар боғланиш тенгламасига мос равишда ва боғланишнинг ягона сайти мавжудлиги тахмини асосида чизилган, $n=3-5$.

ПА α -ГЛ каналнинг кириш жойида унинг ичига ўтади ва уни блоклайди. Бироқ нима учун ПАнинг молекуляр оғирлиги қанча катта бўлса унинг эффективлиги ошади деган савол очик қолган. Адабиётлардан маълумки, ФХ ва бошқа фосфолипидлар билан ПА фақат икки валентли катионлар мавжудлигидагина ўзаро таъсирлашади (Sagrsta et al., 2000; Huster et al., 1999), чунки бу катионлар мусбат зарядланган фосфолипидларнинг фосфатли группалари ва ПАнинг сульфат группалари орасида кўприк ҳосил қилади (Huster et al., 1999). Бундан ташқари, тадқиқот натижалари гувоҳлик беришича ҳатто 100 мМ Ca^{2+} эритмада ҳам умуман ПАлар, ва хусусан гепарин умумий мусбат зарядланишини сақлаб қолади. Гепаринларни каналга таъсири учун икки валентли катионлар бўлишини талаб қилингани учун, биз ПА нинг мембрана билан боғланиши адабиётларда таклиф қилинган (Huster and Arnold, 1998; Huster et al., 1999) кальцийли кўприк механизми билан содир бўлишини тахмин қилдик.

ПАнинг липосома билан боғланиши уларнинг юзасида манфий ζ -потенциалнинг пайдо бўлишига олиб келади. Бу ҳолат гепарин учун ҳам тўғри келишини текшириш учун, ҳамда ПАнинг мембрана билан боғланишини миқдорий баҳолаш учун, биз ФХ липосомаларни ζ -потенциалини турли ўлчамли гепаринлар кўшилган ва кўшилмаган муҳитда ўлчадик. Аниқланишимизча, гепаринлар ФХ липосомаларнинг ζ -потенциалини енгил мусбат қийматдан (гепаринсиз муҳитда) ~ -24 мВгача

камайтиради (13А-расм). ФХ липосомалардаги ζ -потенциалининг гепарин концентрациясига боғлиқлиги (13А-расм) α -ГЛ каналнинг гепарин индуцирланган блокадасига ўхшаш боғлиқлигини эслатади (12-расм). Бу икки системада гепаринлар эффективлиги орасида (C_{50} да кўрсатилгандек) корреляция мавжуд (13Б-расм).

24



13-расм.

Липосома

ζ -потенциалининг гепаринлар концентрациясига боғлиқлиги (А) ва липосомаларга ва α -ГЛ каналларга гепарин таъсирининг ярим-эффектив концентрациялари орасидаги корреляция (Б). $n=3-5$.

Бу натижалар, ПАнинг мембрана билан боғланиши канал блокадасининг ПА молекуляр оғирлигига кучли боғлиқ эканлигини тушунтириб беради. ПА-иони билан каналнинг ўзаро таъсирининг биринчи этапида ПА мембрана билан Ca^{2+} -кўприklar ёрдамида боғланади, бу эса уларнинг мембрана яқинидаги ва каналнинг кириш қисми атрофида локал концентрациясини ўсишига олиб келади. Каналнинг кириш қисмининг мембрана юзасига яқинлиги ионлар оқими ПА таъсирида блоккланиш эҳтимолини оширади. ПАнинг стационар концентрацияси мембрана юзасидан узоқлашиши билан ночизикли равишда эритма ҳажмидаги кўрсаткичгача камаяди (Peitzsch et al., 1995). Натижада ПАнинг эритма ҳажмидаги бир хил концентрациясида ҳам уларнинг эффектив стационар концентрацияси каналнинг *транс* кириш қисмида (мембрананинг юзасига деярли тегиб турувчи), *цис* кириш

(мембрана юзасидан анча узок бўлган) қисмига қараганда анча юқори бўлиши керак. Бу эса мембран юза қисми ва каналнинг кириш қисми оралиғидаги масофа қандай қилиб ПА эффективлигининг қайси томондан қўшилишига боғлиқлигини тушунтириб беради. Эркин полимер молекулалар тасодифий ҳолда, диффузия натижасида, каналнинг кириш қисмига келиши мумкин, ва сўнг (ПА/канал ўзаро таъсирлашувининг иккинчи босқичида) потенциалга боғлиқ ҳолатда порага киради ва канални блоклайди.

Диссертациянинг « **α -ГЛ каналнинг эластик деформациясини тадқиқ қилиш**» деб номланган олтинчи бобида α -ГЛ каналнинг зарядланган краун/ K^+ комплекси билан блокланиш тадқиқотларининг натижалари келтирилган.

Ион канали порасининг ички геометрик тузилишининг асосий хусусиятлари қоидага кўра каналнинг очик ҳолатида потенциалга боғлиқ бўлмайди деб ҳисобланади. Одатда бу фикр тўғри бўлади, лекин унинг чегараларини аниқлаш зарур. Потенциал-индуцирланган эластик деформация каналнинг транспорт хусусиятини ўзгаришида кўзга кўриниши мумкин, айниқса молекула катталиги канал порасига яқин бўлганда. Табиийки, токнинг қаршиликка боғлиқлиги тўғри чизик бўлмаган каналлар электрострикция

25

эффектини ўзида мужассамлаштирган энг эҳтимоли катта номзод ҳисобланади. Шунга қарамасдан тўғри чизик бўлмаган ҳолатининг ўзи электрострикцияни билдирмайди албатта. Бу муаммони тадқиқ қилиш учун, структураси яхши ўрганилган якка ион канали ва молекуляр инструментлар керак бўлади. Шунинг учун биз, α -ГЛ канални танладик, краун-эфирлар оиласи намоёндаси 1,4,7,10,13,16-гексаоксациклооктан (18-краун-6) эса инструмент сифатида танланди, чунки унинг молекуляр размери (диаметри ~1,15 нм) поранинг энг тор қисмининг катталигига жуда яқин (диаметр ~ 1,2 нм).

14-расмда, 4М KCl эритмасига симметрик қўшилган 18-краун-6, –70 мВда канални максимал блоклаши кўрсатилган. 18-краун-6 ни блокловчи эффекти нихоятда асимметрик. Унинг фақат *транс* бўлимга қўшилиши, амалий жихатдан симметрик қўшилишдан фарқ қилмайди. Шу вақтда фақат *цис* бўлимга 18-краун-6 қўшилиши ўтказувчанликка жуда заиф таъсир қилди. Бу хол блокланиш зарядланган краун/ K^+ комплекс билан боғлиқлигидан ва ушбу комплекс боғлашиш жойини *транс* кириш қисмидан осон топишидан далолат беради. Комплекс берилган потенциал воситасида боғланиш сайтига қадар транспорт қилинади, потенциалнинг катта қисми эса каналнинг ўқ қисмига тушади. 15-расмда 18-краун-6 билан банд бўлмаган боғланиш сайтининг потенциалга боғлиқлик эҳтимоли келтирилган. Бу эҳтимоллик $p I i_n = 1 - \Delta / \Delta i$ бўйича ҳисобланган бўлиб, бу ерда ΔI – краун таъсиридаги ўртача токнинг ўзгариши, Δi – каналдан ўтувчи “лаҳзали” токнинг битта краун/ K^+ комплекси боғланиши билан индуцирланган токнинг камайиши.



14-расм. 4М KCl эритмасига симметрик қўшилган 18-краун-6 ни α -ГЛ каналанинг ўтказувчанлигига таъсири. Якка каналга тегишли типик экспериментларнинг натижалари келтирилган.

Биз блоклаш жараёнининг анализи учун умумлаштирилган кўринишдаги Woodhull (Woodhull, 1973; Hille, 1992) моделидан фойдаландик (Tikhonov and Magazanik, 1998). Бу моделни қўллашда бир нечта шартлар бўлиб, улар қуйидагилардан иборат: ўтказувчанликнинг реагент ёрдамида блоккланиши оксил конформациясининг ўзгаришидаги кооператив аллостерик эффектларнинг натижаси эмас ва блокловчи молекулалар бир бирига боғлиқ бўлмаган ҳолда таъсир қилади, лекин бу ҳолдан боғловчи сайт учун рақобат

26

қилувчи молекулалар истисно ҳисобланади. Bezrukov et al. (2004) ишларида келтирилган кўрсаткичлар ва бизнинг тадқиқотлар 15-расмда келтирилган натижаларимиз юқоридаги талабларга тўлиқ жавоб беришини тасдиқлайди.



15-расм. Каналнинг 18-краун-6 таъсирида «блокланмаслик» эҳтимолининг фиксация потенциалига боғлиқлиги.

Пунктир чизиқ - Woodhull моделида токни якка элементар заряд ёрдамида блоклашнинг энг яхши аппроксимациясидир (2-тенглама). Узлуксиз чизиқ – модифицирланган моделнинг

аппроксимацияси бўлиб, бунда фиксирланган потенциалга боғлиқ ҳолдаги таранг деформацияси тахмин қилинган, $n=3-5$

Тезлик константаларига термодинамик мувозанат берадиган чекланиш
(⁰₂

$k k k k$, бу ерда 0 индекс берилган потенциалнинг нолига тегишли),

$$\begin{matrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \end{matrix}$$

$$1_2 = - -$$

микроскопик қайтарилиш ёки локал мувозанат сифатида маълум. Бу чекланиш натижасида ток блокаторининг якка элементар заряд сифатида симметрик қўлланилишида, каналнинг блокланмаслик эҳтимоли, ўлчамсиз потенциал потенциал, e - электрон заряди,

$$\psi = \phi e / kT (\phi - \text{трансмембран})$$

k - Больцман доимийси, T - абсолют температура) функцияси сифатида қуйидагича ёзилиши мумкин:

$$\begin{matrix} 0 \\ \exp(\delta\psi) \exp(\delta\psi) \end{matrix} \begin{pmatrix} \delta\psi \\ \delta\psi \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \delta\psi \\ \delta\psi \end{pmatrix}$$

$$A$$

$$m m t c$$

$$P_{++-++++-}$$

$$= (2)^{00000}$$

$$(\delta\delta\delta\psi)(\delta\psi)(\delta\delta\delta\psi)$$

$$B A B A$$

$$\exp(\delta\psi) \exp(\delta\psi) \exp(\delta\psi)$$

$$c t m m m t c$$

$$\text{қаерда } \exp(\delta\psi), k_1 = C b_1 - \delta_t \psi \exp(\delta\psi), k_{-1} = b_{-1}$$

$$\delta_m - \delta_t \psi \exp(\delta\psi), k_2 = b_2$$

$$\delta_m - \delta_c \psi$$

$$\exp((\delta\delta)\psi) {}_2 C b_{2cm}$$

$$k_- = - , {}^0_1$$

$$^0/ = -_0$$

$$A k k , {}^0_1$$

$$^0/ = -_0$$

$$B C k k \text{ потенциалга боғлиқ } 2$$

$$1$$

бўлмаган константалар; δ_c , δ_m и δ_t мембранадаги потенциалнинг бир қисмики, *цис* барьер, минимум ва *транс* барьер жойлашган масофага мос келади; C блокатор концентрацияси.

Каналнинг ички геометриясини эътиборга олиб, бошқа авторларнинг нашр қилинган натижалари (Howorka and Bayley, 2002) ва бизнинг

баҳоларимизни инобатга олган ҳолда, *цис* барьер (δ_c) жойлашишини 0,8 деб қабул қилдик. Агар *транс* барьер (δ_t) жойлашиши фиксация қилинмаса, у

одатда нореал манъфий кўрсаткичларни қабул қилади. Шундан келиб чиқиб, биз каналнинг *транс* кириш қисмига барьер қўйиб, δ_t қийматни нолга тенг

27

деб қабул қилдик. Натижада бу функция фақат учта эркин параметрни ўз ичига олади: δ_m – трансмембрана потенциалнинг блокловчи комплексига таъсир қилувчи қисми, ҳамда A ва B параметрлар. (2)-тенгламани энг яхши аппроксимациялари 15-расмда пунктир чизиклар билан кўрсатилган. Бу назарий эгри чизиклар экспериментал нуқталарни аниқ таърифлаб беролмайди ва бу тафовут кичик мусбат кучланишлардаги ўлчашга нисбатан катта хатоликларга боғлиқ эмас. Модел билан мос келиш учун қуйида келтирилган таклифлардан биттаси (ёки иккаласи) қабул қилиниши керак: (I) краун/ K^+ комплексининг заряди бирдан катта; (II) берилган потенциал пора структурасини деформациясига олиб келади ва натижада 18-краун-бнинг пора билан ўзаро таъсирларини (2)-формулада ҳисобга олинмаган ҳолда ўзгариб кетади.

Бу иккита тахминлардан бирини танлаш учун аввало шунга эътибор бериш керакки, 18-краун-6 ва калий ионлари орасидаги комплекс 1:1 пропорцияда ҳосил бўлиши қатъиян аниқланган (Rounaghi et al., 1997), шунинг учун «битта заряд – битта блокловчи комплекс учун» тахмини ўзини оқлайди. 15-расмда келтирилган натижалар 18-краун-бнинг нисбатан кичик концентрацияларида олинган. Шундай қилиб, бизнинг биринчи таклифимиз рад қилиниши мумкин. Иккинчиси эса манъфий потенциал каналнинг *цис* томонидан кириш барьерини 18-краун-6 учун торайтиради, бу эса "геометрик тор қисмининг" ўлчамини ортиши ҳисобига амалга ошади. Ҳақиқаттан, агар торайиш радиуси 18-краун-бнинг радиусига тенг ёки кичик бўлса, барьер чексиз катта ва краун/ K^+ комплексининг молекуласи каналдан ўта олмайди. Агар торайиш радиуси манъфий потенциалда ошса, барьернинг баландлиги тезда камаяди, бу эса 18-краун-бнинг каналнинг *цис* томонидан чиқишини осонлаштиради. Моделнинг бу модификациясида B параметри доимий бўлади, A нинг қиймати эса энди потенциалнинг функцияси бўлиб, манъфий кучланиш фиксация қилинганда ўсиши кузатилади. Энергетик ўйикнинг чуқурлиги ёки берилган потенциал таъсирида барьернинг ўзгаришини таърифлашнинг бир имконияти сифатида биз краун/ K^+ комплекси ва пора деворлари ўзаро таъсирининг Ван-дер-Ваальс энергиясини танладик. Бунда биз радиусга боғлиқ ўзаро таъсирларни водород-водород жуфтлиги (Allen and Tildesley, 1989) учун Леннард-Джонс потенциал константалари орқали ифодалашимиз мумкин бўлади. Канал ўтказувчанлигига ўхшаш бўлган чўзилиш радиусининг потенциалга реалистик боғлиқлигини инобатга олган ҳолда, биз эксперимент натижалари ва модел башорати ўртасида етарли даражада мосликка келамиз. Биз бу ёндашувдан шуни аниқладикки, барьернинг ўзгариши ҳақидаги дастлабки тахминнинг ўзигина боғловчи

сайтни поранинг тор қисми ($\delta_m \sim 0,7$) билан боғлаш имконини беради ва канал шу қисмидаги радиусининг жуда кичик ($\sim 0,08$ нм) эластик ўзгариши боғланиш энергиясини тахминан kT нинг икки бирлигига ўзгартиришга қодир ва моделнинг башорати ва экспериментлар орасидаги фарқларни бартараф қилади. 18-краун-6 ва поранинг ўзаро таъсирининг ўзгаришини инобатга олиб ўтказилган эгри чизик 15-расмда узлуксиз чизик шаклида кўрсатилган. Ҳақиқатдан, потенциал таъсирида чақирилган радиус

28

катталигининг амалдаги ўсиши Ван-дер-Ваальс кучи учун ишлатиладиган тахминий яқинлашувга боғлиқ бўлади. Масалан, "цилиндр цилиндрда" ёки "сфера сферада" геометриялари учун кўрсатилганидек (Parsegian, 2005), ўзаро таъсир масофанинг иккинчи даражали тескари боғлиқлик бўлиши мумкин. Бу боғлиқликни ҳисоблаб, радиуснинг катта ўзгаришини кузатиш мумкин. Шундай қилиб бизнинг α -ГЛ каналнинг транспорт хусусиятларида электрострикциянинг роли ҳақидаги гипотезамиз кузатилаётган потенциалга боғлиқлик ўтказувчанликнинг қолдиқ асимметрияси ва 18-краун-6нинг блокланишини тушунтириб бериш имконини беради (15-расм). Иккала ҳолатда ҳам қўйилган кучга пропорционал, ион канали структурасидаги узлуксиз эластик ўзгариш мавжудлиги тахмин қилинади. Бу эса маълум "канал дарвозаси"даги майдон таъсирида индуцирланган конформацион дискрет ўзгариш ва одатдаги "барчаси ёки ҳеч нима" типидagi жараёнлардан принципно фарқ қилади. Бизнинг тадқиқотларимиз натижаларидан берилган потенциал таъсиридаги поранинг радиуси ўзгаришлари локал электрострикция туфайли содир бўлади дейишимиз мумкин. Биз α -ГЛ каналнинг торайган зонасининг эластик деформациясини тавсия қилишимиз мумкин бўлган механистик моделда, потенциал фиксация қилинганда каналнинг энг тор қисмида жойлашган Lys147 ҳаракатланади. Бу ҳаракат *цис* томонга манфий потенциал берилганда канал диаметрининг кенгайишига ва натижада 18-краун-6нинг каналдан чиқиб кетишига олиб келади. *Цис* томонга мусбат потенциал берилганда эса канал диаметрининг торайишига ва ион транспортини қийинлашувига олиб келади. Албатта, бу механистик модель ҳисобланади. Шунга қарамасдан келтирилган таҳлил бизнинг тадқиқотимизда илгари сурилган электрострикция гипотезаси ҳақиқатга яқиндлигидан далолат беради.

ХУЛОСАЛАР

1. Илк бор модификацияланган полимер зондлаш усули ёрдамида қуйидагилар аниқланди:

а) α -ГЛ каналнинг иккала кириш қисмининг диаметри бир бирига яқин ва 2,6/2,4 нм га тенг (*цис*/*транс*). α -ГЛ каналда 2 та тор жой мавжуд: асосий торайган жойнинг диаметри 1,3 нм бўлиб, тахминан, каналнинг марказида жойлашган. Иккинчи жойнинг диаметри эса 1,8 нм га тенг бўлиб, каналнинг *цис* кириш қисми яқинида жойлашган;

б) цитолизин ҳосил қилган каналнинг *цис* кириш диаметри 1,9 нм га

тенг, транс кириш диаметри эса 1,6 нм га тенг. Канал ичида битта торайган қисм бўлиб, унинг диаметри 1,2 нмга тенг;

в) VDAC ион каналининг юқори ўтказувчанлик ҳолатида цис ва транс кириш диаметрлари, мос равишда, 2,0 ва 4,0 нмга тенг. Қуйи ўтказувчанлик ҳолатига ўтганда иккала кириш қисми диаметри кичраяди ва цис кириш 1,8 ва транс кириш 2,4 нм га тенг бўлади. Канал ҳажмининг умумий камайиши ~10 нм³га тенг, бу пора умумий ҳажмининг 40% ни ташкил этади.

29

2. Макси-анион ва VDAC каналларининг биофизик хусусиятларини мукамал таққослаш, физиологик шароитларда, бу икки ион каналлари турли оксиллардан ташкил топганлигини кўрсатди.

3. Илк марта α -ГЛ каналнинг цистеин-сканирловчи мутагенез усули структурасига қўшимча манъфий зарядлар қўшилиши унинг кучсиз анион селективлигини кучли катион селективлигига ўзгартириши исботланди, мусбат зарядлар қўшилиши эса унинг анион селективлигини сезиларли даражада оширишини кўрсатди. Бу ўзгаришларнинг даражаси янги зарядларнинг қўшилиш нуқтасига (бу ион танлаб ўтказувчанлигига кўпроқ таъсир қилади) ҳамда ушбу зарядлар каналнинг бўйлама ўқи бўйича жойлашишига боғлиқ (бу асосан вольт-ампер тавсифини ўзгартиради). Бу натижалар шуни кўрсатадики, пора деворининг йиғинди заряди α -ГЛ каналининг катион-анион селективлиги учун жавобгар бўлади, заряднинг пора кириш қисмида жойлашиши эса вольт-ампер эгри чизиқларининг шаклини белгилаб берувчи асосий омилдир.

4. Олигомер ион каналлари стехиометриясини аниқлашнинг, фақат электрофизиологик ўлчашларга асосланган янги усули ишлаб чиқилди. Унинг ёрдамида, қўшқават липид мембранада ҳосил бўлган α -ГЛ канал гептамер эканлиги аниқланган.

5. Полианион молекуласи порага электростатик куч ҳисобига кириши ва ионлар ўтишини физикавий блоклаши аниқланди. α -ГЛ каналнинг полианионлар билан блокланиш эҳтимоли қуйидаги омилларга боғлиқ:

а) икки валентли катионларнинг иштироки ва концентрациясига, қайси ки таъсир эффективлиги қуйидаги қатор билан белгиланади: $\text{Zn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$;

б) полианионларнинг концентрацияси, молекуляр массаси ва структурасига; полианионларнинг каналга таъсир эффективлиги, уларнинг мембрана ζ -потенциалига бўлган таъсири билан корреляция қилинади;

в) полианионлар қўшиладиган томонга полианионларни каналнинг транс кириш томонидан қўшилиши кўпроқ самара беради, бу эса α -ГЛ каналнинг асимметрик тузилишига боғлиқ.

6. Илк бор мембранада фиксация қилинган потенциал α -ГЛ каналининг эластик деформациясини чақириши исботланган, бу KCl тузининг юқори концентрацияларида вольт-ампер тавсифини қолдиқ асимметриясини ва 18-

краун-6 ҳамда калий катиони комплекси билан блоклянишини потенциалга боғлиқлигини тушунтиради.

30

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ 16.07.2013.К/В/Т.13.01 ПРИ ИНСТИТУТЕ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ И НАЦИОНАЛЬНОМ
УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНОЙ
СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ, ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ПЕРНАМБУКО**

МЕРЗЛЯК ПЕТР ГРИГОРЬЕВИЧ

**ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАИМОСВЯЗИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ В
НАНОСКОПИЧЕСКИХ БЕЛКОВЫХ ПОРАХ**

03.00.02 –Биофизика и радиобиология

АВТОРЕФЕРАТ ДОКТОРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ

Ташкент - 2016

31

Тема докторской диссертации зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан, за номером 30.09.2014/B2014.5.B73

Докторская диссертация выполнена в Институте биоорганической химии и Федеральном Университете Пернамбуко, Бразилия.

Автореферат диссертации на трех языках (узбекский, русский, английский) размещен на веб-странице Научного совета по адресу <http://ss.biochem.uz> и Информационно образовательном портале “ZiyoNet” по адресу www.ziyo.net

Научный консультант: Красильников Олег Владимирович доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: Мирходжаев Улугбек Закирович доктор биологических наук, профессор

Мадьяров Шухрат Раимджанович
доктор биологических наук

Турдикулова Шахло Уткуровна
доктор биологических наук

Ведущая организация: Институт микробиологии АН РУз

Защита состоится « ____ » _____ 2016 г. в ____ часов на заседании Научного совета 16.07.2013.К/В/Т.13.01 при Институте биоорганической химии и Национальном Университете Узбекистана по адресу: 100125, г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83. Тел.: (99871) 262 35 40, факс: (99871) 262 70 63, e-mail: asrarov54@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Института биоорганической химии по адресу г. Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83.

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2016 года
(протокол рассылки ____ от _____ 2016 года)

А.С. Тураев

Председатель Научного совета по присуждению
ученой степени доктора наук, д.х.н., профессор

М.И. Асраров

Ученый секретарь Научного совета по присуждению
ученой степени доктора наук, д.б.н., профессор

Д.А.Кадырова

Председатель Научного семинара при Научном совете
по присуждению ученой степени доктора наук, д.б.н.

32

ВВЕДЕНИЕ (аннотация докторской диссертации)

Актуальность и востребованность темы диссертации. Одной из важнейших задач современной биофизики является изучение взаимосвязи структуры и функций ионных каналов, образованных белками. Ионные каналы являются наноскопическими порами, обладающими селективностью к ионам, способностью избирательно пропускать различные молекулы через мембрану или реагировать на них, изменяя свои свойства. Согласно последним исследованиям, именно ионные каналы являются сенсорами, которые помогают живым организмам измерять температуру, чувствовать запахи, вкус и свет.

В тоже время, некоторые микроорганизмы (и в их числе высоко патогенные) продуцируют белки, способные самопроизвольно встраиваться в мембраны клеток-хозяев и формировать в них ионные каналы, через которые неконтролируемо выходят как ионы, так и водорастворимые вещества-метаболиты, что приводит к клеточной смерти. От этих белков-токсинов зависят не только клинические проявления болезней, но и состав среды, в которой существуют клетки и бактерии. В связи с этим нанопоры, образованные белками, привлекают пристальное внимание исследователей во всем мире как с точки зрения фундаментальных физиологических и биофизических принципов функционирования живых клеток, так и с практической стороны, так как существуют идеи по использованию их в качестве нано-секвенаторов, компонентов нано-фильтров, биосенсоров и других наноустройств.

Во многих исследованиях, проводимых в мире, отмечается, что знание о структуре белковых нанопор и влиянии ее на свойства последних может помочь как в создании современных лекарств, так и в разработке наноустройств, используемых в новейших приборах. Наиболее перспективным ионным каналом в качестве основы нано приборов большинство исследова

телей считает α -гемолизин (α -ГЛ), продуцируемый бактериями *Staphylococcus aureus*, поэтому большое число работ посвящено исследованию свойств именно этого канала. Следует отметить, что способность α -ГЛ формировать водонаполненные трансмембранные поры в бислойных липидных мембранах была впервые обнаружена более 35 лет назад в Узбекистане.

В свете выше сказанного тема диссертации является весьма актуальной и востребованной, так как данные о том, какие структурные особенности влияют на функционирование ионных каналов, как зависит их селективность от строения и аминокислотного состава, могут помочь в конструировании нанопор с заранее заданными свойствами.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных Совместным заявлением между Республикой Узбекистан и Японией, подписанным в феврале месяце 2011г.

Соответствие исследования с приоритетными направлениями развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии приоритетного направления развития науки и технологий рес-

33

публики V. «Сельское хозяйство, биотехнология, экология и охрана окружающей среды».

Обзор международных научных исследований по теме диссертации.

Научные исследования, направленные на изучение взаимосвязи структуры и функций белковых пор с применением современных методов, осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе, University of Manitoba (Италия), Columbia University, University of Chicago, University of Maryland (США), Национальном институте физиологии (Япония), Институте биофизики клетки (Россия), Национальном Университете Узбекистана и других.

В результате исследований, проведенных в мире по структуре белковых нанопор, получен ряд научных результатов, в том числе: предложены структурные модели вольт-зависимого анионного канала (VDAC) (University of Manitoba (Италия) и изучены его функциональные особенности, (University of Maryland, США); предложена кристаллическая структура цитолизина *V. cholerae* El Tor (Columbia University, США); установлено, что α -гемолизин (α ГЛ) является гептамером и предложена его кристаллическая структура (University of Chicago, США).

В мире при изучении ионных каналов по ряду приоритетных направлений проводятся исследования, в том числе: по изучению взаимосвязи структуры и функций механочувствительных, механосенситивных и TRP каналов; изучается потенциал-зависимое изменение внутреннего строения каналов, которое можно обнаружить по влиянию различных органических молекул на свойства нанопоры; при изучении каналов образованных токсическими белками особое внимание уделяется изучению α -ГЛ и порину *A Mycobacterium smegmatis*, которые являются наиболее перспективными в плане создания но

вейших нано секвенаторов.

Степень изученности проблемы. Синтезируемый бактерией *Staphylococcus aureus* α -ГЛ в настоящее время является одним из самых изученных и перспективных белков, формирующих нанопору. Поэтому данный белок является идеальной модельной системой при исследовании нанопор, структура которых может быть изменена молекулярно-биологическими методами, например, методом сайт-направленного мутагенеза, с помощью которого можно варьировать число и расположение основных зарядов внутри нанопоры и/или у входа в нее. В научных работах зарубежных учёных, проф. Х. Байли, д-р. Дж. Касиановича, подробно изучается внутреннее строение нанопоры образованной α -ГЛ и ее влияние на прохождение различных молекул, непосредственно в липидной мембране. Цитолизин *V. cholerae* El Tor детально исследован под руководством проф. С. Бхакди. Вольт-зависимый анионный канал природных мембран, играющий важную роль в процессах транспорта молекул через клеточные мембраны, а также в апоптозе подробно изучается в работах проф. М. Коломбини. Макси-анионный канал изучается группой под руководством проф. Я. Окады.

В исследования ионных каналов в нашей стране проводятся под руководством акад. Б.А. Ташмухамедова, профессоров П.Б. Усманова и Р.З. Са-

34

бирова, в частности изучаются α -ГЛ, латротоксин из яда паука каракурта, выделен ряд новых токсинов, действующих на липидный остов мембран и блокирующих натриевые каналы возбудимых мембран позвоночных и членистоногих.

Связь темы диссертации с планом научно-исследовательских работ научно-исследовательских учреждений, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно-исследовательских работ и прикладных проектов Института биоорганической химии: номер госрегистрации 01.97.0005431 «Изучение геометрических параметров водной поры ионных каналов, формируемых некоторыми белковыми токсинами, а также белками, изолированными из природных мембран и некоторыми абиогенными факторами» (1997-1999 гг.); Ф-4.1.3 «Изучение свойств ионных каналов и транспортеров в искусственных и природных мембранах и их роли в регуляции клеточного объема» (2003-2007 гг.); ФА Ф3-Т112 «Биофизические механизмы регуляции объема животных и растительных клеток» (2007-2011 гг.); ФА-Ф5-Т080 «Молекулярная физиология и биофизика объем-активируемого анионного транспорта» (2012-2016). Тематики НИР лаборатории биофизики мембран департамента биофизики и радиобиологии Федерального университета Пернамбуко (Бразилия), а также в рамках Меморандума о сотрудничестве между Институтом биоорганической химии и Национальным институтом физиологии (Япония).

Целью исследования является определение структурно функциональной взаимосвязи в ионных каналах, сформированных различными белками.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи

исследования:

определение изменения радиуса поры вдоль оси ионного канала;
определение радиусов водной поры, образованной VDAC, в высокопроводящем и низкопроводящем состояниях;

разработка нового метода определения стехиометрии нанопор;
исследование влияния на ион-проводящие свойства нанопоры различных аминокислот, входящих в состав молекулы α -ГЛ, методом цистеин сканирующего мутагенеза;

исследование влияния химической модификации аминокислот на ион проводящие свойства канала методом цистеин-сканирующего мутагенеза;
исследование влияния полианионов и краун-эфиров на ион-проводящие свойства нанопоры α -ГЛ;

проверить предположение, что макси-анионный канал принадлежит к семейству VDAC белков.

Объектом исследования являлись ион-проводящие нанопоры, сформированные белками.

Предмет исследования зависимость свойств нанопоры от структуры и аминокислотного состава белков.

Методы исследования. В работе использованы современные электрофизиологические и биохимические методы исследования, такие как

35

формирование бислойных липидных мембран (БЛМ) по методу Мюллера и Монталла-Мюллера, измерение электрических параметров мембран в режиме фиксации потенциала с полным компьютерным контролем, методы выделения белков, а также метод цистеин-сканирующего мутагенеза.

Использованы компьютерные программы Origin версии 5 и 8.6, молекулярные модели строились с помощью программ Swiss-PDBViewer, Ver. 3.7 и CS Chem3D Pro (CambridgeSoft, Cambridge, MA).

Научная новизна диссертационного исследования заключается в следующем:

впервые установлено, что методом асимметричной аппликации неэлектролитов можно измерить изменение радиуса поры вдоль оси ионных каналов;

установлено, что радиус ионного канала VDAC изменяется при переходе из одного состояния проводимости в другое;

установлено, что свойства ионных каналов зависят не только от знака заряда заряженных групп, распределенных внутри канала, но и от их местоположения вдоль оси канала;

разработан новый метод определения стехиометрии олигомерных нанопор;

установлено, что макси-анионный канал не относится к семейству VDAC белков;

впервые доказано, что блокирование полианионами ионного канала зависит как от их размера, так и от концентрации двухвалентных катионов;

установлено, что фиксированный на мембране потенциал вызывает эластическую деформацию α -ГЛ поры.

Практические результаты исследования. Предложен новый метод определения стехиометрии олигомерных нанопор *in situ*, позволяющий определять стехиометрию ионных каналов в условиях максимально близких к физиологическим.

Достоверность полученных результатов обосновывается тем, что экспериментальные данные получены с применением современных высокоточных методов исследования. Выводы в работе сделаны на основе результатов, обработанных с использованием современных методов математической статистики.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования. Данные, представленные в этой работе, имеют, прежде всего, фундаментальный интерес, поскольку позволяют выявить зависимость свойств наноскопических белковых пор от их строения и аминокислотного состава. Полученные результаты будут применены не только в теоретических исследованиях, но и могут найти практическое применение в нанотехнологии в качестве основы для создания нано-датчиков, нано-секвенаторов, компонентов нано-фильтров, биосенсоров и других нано-устройств, используемых в современных приборах; также они представляют интерес для фармакологии, биомедицины и исследований с целью разработки блокаторов наноскопических пор.

36

Внедрение результатов исследования. Новые биофизические методы определения структуры ионных каналов в физиологических условиях: признаны в Университете Сокендай и в Национальном институте физиологии Японии и использованы при исследовании структуры белковых нанопор (Справка Университета Сокендай от 10 марта 2016 года, Япония, Канагава). Новые биофизические методы признаны также Академией наук Республики Узбекистан (справка АН РУз от 10 мая 2016 года). Эти методы дают возможность определения радиуса олигомерных ионных каналов и определять их стехиометрию.

На основе изменения ионного тока через белковые нанопоры, в Департаменте Биофизики и радиобиологии Федерального университета Пернамбуко, Бразилия, разработан нано-датчик, позволяющий распознавать высокотоксичные белки - микроцистины (справка от 2 мая 2016 года Департамента биофизики и радиобиологии). Этот нанодатчик дает возможность определения циклических пептидных токсинов в системе гемодиализа.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на XI XVIII, XX ежегодных заседаниях «Федерации обществ экспериментальной биологии» (FESBE) (Бразилия, 1996-2003, 2005); на 43, 44, 48-ом ежегодных совещаниях Биофизического общества (США, 1999, 2000, 2004); IV Биофизическом конгрессе стран Южного конуса (Кампинас, Бразилия, 2000);

4-ом Международном семинаре по порообразующим токсинам (Тренто, Италия 2000); 5-ом Международном семинаре по порообразующим токсинам (Майнц, Германия, 2004); 87-ом Ежегодном съезде общества физиологов Японии (Мориока, Япония, 2010).

Опубликованность результатов. По теме диссертации опубликовано 38 научных работ. Из них 14 научных статей в зарубежных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

Структура и объем диссертации. Структура диссертации состоит из введения, шести глав, заключения, списка использованной литературы. Объем диссертации составляет 198 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во **введении** обоснована актуальность проблемы и востребованность проведенных научных исследований, определено соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий Республики Узбекистан, сформулированы цели и задачи, дан обзор международных научных исследований по теме диссертации, определена степень изученности проблемы, ее научная новизна, обоснована достоверность полученных результатов, предложено их внедрение, а также изложены основные положения, выносимые на защиту, приведены сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Строение и свойства исследованных белков каналоформеров**» приведен подробный обзор литературы, посвященной исследованным белкам, формирующим нанопоры в мембранах и изложены сведения об их строении, функциях и свойствах.

Во второй главе «**Получение белков каналоформеров и методы их исследования**» подробно описаны методы получения всех использованных в работе белков, изложены электрофизиологические методы исследования, а также методы математической обработки и статистического анализа данных.

В третьей главе «**Полимерное зондирование ионных каналов**» приве

дены результаты исследований по определению радиусов ионных каналов. *Определение изменений радиуса поры вдоль оси α -ГЛ канала.* Синтезируемый бактерией *Staphylococcus aureus* экзотоксин α -гемолизин является водорастворимым мономером. Этот полипептид, состоящий из 293 аминокислотных остатков, имеет молекулярную массу 33,2 кДа и формирует в мембранах гомогептамерные поры (Gouaux et al., 1994).

Чтобы определить размер каждого отдельного входа в α -ГЛ канал и получить дополнительную информацию о геометрии последнего, нами была измерена проводимость канала при асимметричном (одностороннем) добавлении проникающих неэлектролитов с *цис* или *транс* стороны БЛМ. Таким образом, были установлены средние величины проводимости основных путей одиночных ионных каналов в присутствии тестовых неэлектролитов на *цис* (g^{cis}) или *транс* стороне (g^{trans}) канала. Для того, чтобы получить более точные измерения радиуса канала, мы проанализировали зависимость заполнения канала полимерами от их гидродинамического радиуса. Для адекватной характеристики структурных особенностей поры использовался коэффициент заполнения полимером, $F(w)$. В условиях равновесия (симметричная аппликация полимеров) коэффициент заполнения, равный 1, соответствует полному заполнению, то есть состоянию, в котором концентрация небольших неэлектролитов внутри поры равна их концентрации в растворе.

Коэффициент заполнения $F(w)$ был рассчитан с помощью следующего уравнения (Krasilnikov et al., 1998):

$$F(w) = \frac{g(w) \chi_0}{g_0 \chi(w)}$$

38

где g_0 и χ_0 - проводимость канала и электропроводность раствора в присутствии непроникающего полимера; $g(w)$ и $\chi(w)$ - проводимость канала и электропроводность раствора в присутствии проникающего полимера. Как и ожидалось, коэффициент заполнения F (рис. 1.) зависит от гидродинамического радиуса полимерных молекул. Максимальное значение F наблюдалось в присутствии небольших молекул неэлектролитов с радиусом, меньшим, чем 0,6. Очевидно, что внутри канала нет сужения, которое бы остановило поток этих молекул через пору. Для полимеров с большим гидродинамическим радиусом мы получили различные значения для F^{cis} и F^{trans} , что указывает на асимметрию в геометрии канала. В обоих случаях зависимость коэффициента заполнения от гидродинамического радиуса полиэтиленгликолей

(ПЭГ) имеет двухфазный характер и свидетельствует о наличии сужения (или сужений) внутри канала. При исследовании заполнения с *цис* стороны канала низкий уровень F ($F^{\text{cis}} \sim 0$) наблюдался для ПЭГ с большим радиусом молекул. Молекулы с радиусом больше 1,22 нм не входят в канал со стороны *цис* входа, уменьшение размера молекул полимеров приводит к постепенному, но двухфазному, увеличению коэффициента заполнения. Эта двухфазность показывает, что размер водной поры канала от *цис* к *транс* входу изменяется не плавно. Данную зависимость можно описать тремя прямыми. Первой соответствует выраженный наклон, наблюдаемый для молекул, радиусы которых варьировали от 0,9 до 1,22 нм. Второй прямой соответствует относительно длительная промежуточная инвариантная часть с $F = 0,36$. Третьей - наклон зависимости параметра F для молекул с размерами между глицирином и PEG300 ($r = 0,31 - 0,6$ нм).

Рис. 1. Зависимость F^{cis} и F^{trans} от гидродинамического радиуса полимеров.

Погрешности равны или меньше, чем символы. Стрелки указывают на значения радиусов в критических точках. Раствор содержал 100 мМ KCl, 5 мМ Трис/цитрат, pH 7,5, 20% ПЭГ. Каждая точка получена путем построения гистограмм распределения каналов ($n=150-300$) по амплитудам в отсутствие и в присутствии полимеров.

Мы предполагаем, что пересечение между первой прямой, которая аппроксимирует зависимость F^{cis} от радиуса полимера (r) и прямой самого низкого значения инвариантной части ($F^{\text{cis}} \approx 0$) дает радиус *цис* входа канала, равный 1,26 нм. Пересечение между первой и второй прямыми (0,9 нм) дает радиус первого сужения со стороны *цис* входа. Полимеры этого и меньшего размеров заполняют часть поры между первым и вторым сужением с распре-

39

делением, независимым от их радиуса. Их размер становится меньше, чем отверстие второго сужения, на пересечении второй и третьей прямых при 0,6 нм. Таким образом, сначала мы имеем уменьшение радиуса канала от 1,25 нм до 0,9 нм, затем радиус не меняется до основного сужения ($r=0,6$ нм). Наличие относительно длинной промежуточной инвариантной части при $F^{\text{cis}}=0,36$ означает, что молекулы ПЭГ с гидродинамическим радиусом от 0,9 до 0,6 нм одинаково эффективны при заполнении этой части поры. Их проникновение вдоль оси канала сдерживается основным сужением. Относительное положение этого сужения можно приближенно оценить из

отношения величины заполнения для этого плато и максимального значения F^{cis} : $0,36/0,6=0,6$ (Krasilnikov et al., 1998).

В экспериментах по заполнению канала с *транс* входа также наблюдается двухфазный характер зависимости F^{trans} от гидродинамического радиуса неэлектролитов (рис. 1), хотя и гораздо менее выраженный. Как и в случае экспериментов с *цис* заполнением, молекулы с радиусом больше 1,22 нм не входят в канал со стороны *транс* входа ($F^{trans}=0$). Полное исключение полимеров из поры наблюдается для тех же ПЭГ, что и при *цис* заполнении. Из этого следует, что *транс* вход по размеру близок к *цис* входу. Также, как и в предыдущем случае, уменьшение размера радиуса полимера приводит к прогрессивному увеличению параметра заполнения. Эта зависимость F^{trans} от радиуса неэлектролитов может быть разделена на четыре области и аппроксимирована четырьмя прямыми. Первая (справа налево) соответствует наклону зависимости для молекул, радиусы которых варьируют от 0,8 до 1,22 нм. Пересечение между этой и нижней, соответствующей инвариантной части зависимости F^{trans} , прямыми дает радиус *транс* входа в канал, равный 1,24 нм.

В диапазоне размеров молекул от глицерина до PEG300 (0,31 - 0,6 нм) по не вполне понятным причинам F^{trans} и F^{cis} качественно отличаются. Когда F^{cis} еще растет с уменьшением размера молекул зондирования, F^{trans} насыщается до своего максимального значения при размере PEG300. В качестве предварительного вывода можно принять существование основного сужения радиусом 0,7 нм и (из-за высокого значения F^{trans} (0,4) при этом радиусе), что его позиция на оси поры, скорее всего, находится ближе к *цис* входу.

Наш упрощенный анализ проводимости одиночных каналов в присутствии полимерных неэлектролитов позволяет сделать вывод, что радиусы двух входов канала практически одинаковы и близки к 1,2-1,3 нм. Также можно заключить, что в канале имеется выраженное основное сужение с радиусом 0,6 - 0,7 нм. Из экспериментов по *цис* заполнению мы также предсказываем наличие второго сужения с $r=0,9$ нм, расположенного между *цис* входом и основным сужением канала (рис. 2). Интересно сравнить полученные результаты с кристаллографическими данными о структуре канала (Song et al., 1996). Авторы этой статьи разделяют структуру канала на три области, две из которых, шляпка и ствол, формируют отверстия канала и трактуются в нашем исследовании как *цис* и *транс* входы. Длина поры составляет 10 нм, а радиус *цис* входа - 1,4 нм. На расстоянии 3,5 нм от *цис* входа канал достигает своего максимального радиуса 2,3 нм. Узкая часть поры с радиусом 0,7 нм

40

находится вблизи центра канала. Было также обнаружено, что в стволовой области радиус поры колеблется от 0,7 до 1,2 нм, в зависимости от объема боковых цепей аминокислот, которые выступают внутрь цилиндра радиусом 1,3 нм. Данное описание канала демонстрирует значительное сходство с геометрическими особенностями, установленными в нашем исследовании. Практически все структурные характеристики, полученные полимерным

зондированием, хорошо согласуются с кристаллографическими данными (рис. 2).

	Рис. 2. Эффективный радиус канала вдоль оси поры, полученный из данных кристаллографического и полимерного зондирования. Длина канала представлена в нанометрах, начиная от цис входа. Символы (○, •), соединенные сплошными линиями, демонстрируют прибли-
<i>тельный профиль поры, полученный из анализа кристаллографических данных (Song et al., 1996). Серыми линиями представлен профиль поры по данным полимерного зондирования. Пунктирная линия обозначает участок, не доступный для измерения полимерным зондированием. Стрелки указывают на ключевые участки геометрии поры.</i>	

*Исследование внутренней геометрии ионного канала, сформированного цитолизинном *Vibrio Cholerae*.*

Цитолизины, продуцируемые некоторыми штаммами *V. cholerae* EL Tor, а также большинством non-O1 штаммов, являются важными факторами вирулентности (Yamamoto et al., 1984; Yamamoto et al., 1986). Цитолизин *V. cholerae* El Tor (VCC) является растворимым в воде белком с молекулярной массой 63 кДа, он формирует небольшие поры в мембране клеток-мишеней (Zitser et al., 1993; Zitser et al., 1995).

Проведя детальный анализ всех полученных результатов, мы предложили модель VCC канала (рис. 4). Эта модель, конечно же, является упрощенной, но в основном она согласуется с данными электронной микроскопии, которые также указывают на воронкообразную структуру канала (Zitser et al., 1997).

F^{trans} от гидродинамических радиусов неэлектролитов.

Горизонтальные стрелки указывают на значения заполнения для цис ($\sim 0,3$) и транс вестибюлей ($\sim 0,1$) VCC канала. Вертикальные стрелки указывают на значения радиусов в критических точках VCC канала. Раствор содержал 150 мМ NaCl, 5 мМ HEPES-NaOH, pH 6,5, 20 % ПЭГ. Каждая точка получена

путем построения гистограмм распределения каналов ($n=80-150$) по амплитудам в отсутствие и в присутствии полимеров.

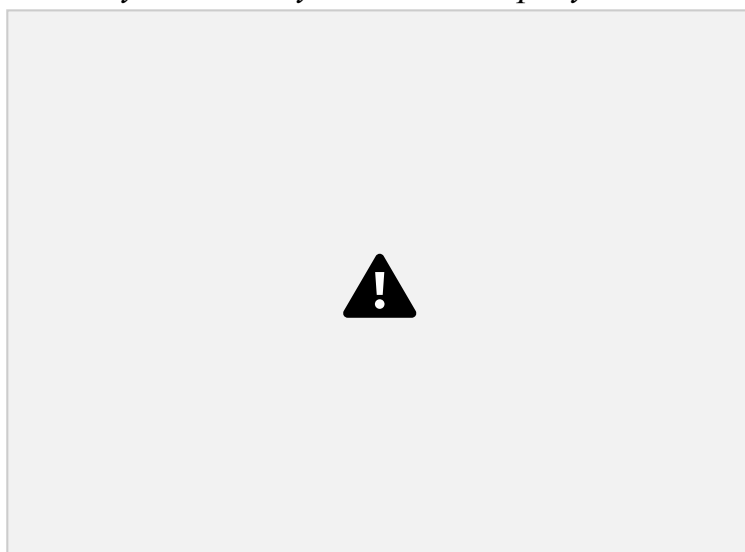


Рис. 4. Схематичное изображение строения VCC канала и его возможная локализация в мембране.

Протяженное сужение (диаметром $\leq 1,2$ нм) начинается от $\approx 6,5$ и продолжается до ≈ 11 нм. Локализация канала в мембране предполагается на основе данных нашего исследования и сходства между ионными каналами, образованными VCC и VCC2 (Krasilnikov et al., 1992; Zitzer et al., 1995).

Определение внутренней геометрии VDAC в открытом и закрытом состояниях.

Одним из известных свойств ионных каналов является их потенциал-зависимость. К настоящему времени накопилось множество свидетельств в пользу того, что это свойство каналов коррелирует с их структурными изменениями. Все геометрические модели, разработанные для описания такого поведения, можно условно разделить на два класса: "блокировка" и "перестройка". Потенциал-зависимые K^+ каналы являются ярким примером первой модели (Gulbis et al., 2000), а VDAC (Zimmerberg and Parsegian, 1986; Doring and Colombini, 1985) и коннексоны (каналы щелевых контактов (Unwin and Ennis, 1984)) - представителями второй.

Измерение изменения внутреннего объема канала очень полезно для разграничения между этими двумя классами моделей. Поэтому мы использовали описанный выше метод асимметричного добавления проникающих неэлектролитов для измерения изменений во внутренней структуре VDAC, сформированного порином, выделенным из мышц быка (Porin-31BM).

Чтобы обнаружить изменения при переходе из открытого в низкопроводящее (закрытое) состояние, мы фиксировали два разных потенциала. Для анализа геометрии просвета канала в высокопроводящем (открытом) состоянии на мембране фиксировался небольшой потенциал (± 10 мВ) и собирался спектр проводимости каналов. В случае низкопроводящего состояния на мембране фиксировалось также 10 мВ и, когда канал появлялся, потенциал ступенчато повышался до 50 мВ. Это вызывало переход VDAC в закрытое состояние проводимости.

Эксперименты проводились с различными ПЭГ по методу, аналогичному описанному ранее, т.е. измерялась проводимость канала, когда с одной стороны мембраны находился непроникающий PEG (PEG4600), а с другой проникающий. Результаты, полученные для различных каналов в одних и тех же условиях, были обобщены в кумулятивные гистограммы и проанализированы таким же образом, как было описано выше.



Рис. 5. Зависимость F^{cis} и F^{trans} , полученных для VDAC в полностью открытом состоянии, от гидродинамического радиуса ПЭГ. Вертикальные стрелки обозначают величины радиусов в критических точках VDAC. На БЛМ фиксировалось +10 мВ. Раствор содержал: 1,15 М KCl, 5 мМ HEPES, pH 7, 20 %

ПЭГ. Каждая точка получена путем построения гистограмм распределения проводимости каналов ($n=70-140$) по амплитудам в отсутствие и в присутствии полимеров.

Полученные величины проводимости каналов были использованы для расчета коэффициента заполнения канала $F(w)$ неэлектролитами по уравнению 1, результаты представлены на рис. 5. Когда канал заполняется с *э* стороны, неэлектролиты с радиусом больше 0,94 нм не входят в канал ($F \sim 0$), а в диапазоне от 0,94 до 0,8 нм мы имеем резкое увеличение F^{cis} . Следова

тельно, со стороны *цис* входа канал имеет цилиндрическую форму с радиусом $\sim$ от 0,9 до 1,0 нм. Дальнейшее уменьшение r до 0,6 нм приводит к до полнительному небольшому увеличению F^{cis} , которое все же остается

43

меньше, чем 1. Эксперименты по заполнению канала с *транс* входа показывают, что на этой стороне VDAC просвет поры имеет воронкообразную геометрию. Небольшая часть канала начинает заполняться неэлектролитами с гидродинамическим радиусом меньше 1,92 нм. Уменьшение r приводит к плавному увеличению F^{trans} до величины $\sim 0,2$ (для PEG450, $r = 1,05$ нм). Дальнейшее уменьшение r сопровождается резким увеличением F^{trans} . Как отмечалось ранее, такое поведение зависимости F от r указывает на то, что *транс* вход имеет коническую форму с радиусом около 2,0 нм у входа и сужением до $\sim 0,9$ -1,0 нм (размер *цис* входа VDAC) на определенном участке внутри канала. Значения проводимости в низкопроводящем состоянии были также измерены в присутствии в растворах на *цис* (g_c^{cis}) или *транс* (g_c^{trans}) стороне канала ПЭГ разного размера. Так же как и в случае полностью от крытого состояния небольшие неэлектролиты значительно уменьшали про водимость закрытого состояния VDAC. Увеличение гидродинамического ра диуса ПЭГ, начиная с PEG1000 ($r = 0,94$ нм) для g_c^{cis} и с PEG2000 ($r = 1,22$ нм) для g_c^{trans} , вызывало рост проводимости VDAC до нового стационарного значения. Исходя из этих результатов, можно предположить, что *транс* вход VDAC шире, чем *цис* вход в обоих состояниях канала. Однако в низкопроводящем состоянии разница между размерами двух входов в пору намного меньше. Величина радиуса *цис* входа VDAC в закрытом состоянии ($\sim 0,9$ нм), полученная из F_c^{cis} - r зависимости (светлые квадраты на рис. 6), почти аналогична этой величине, установленной для канала в открытом состоянии ($\sim 1,0$ нм, рис. 5). На основании этих данных мы пришли к заключению, что размер *цис* входа канала, образованного Porin 31BM, подвергается слабым (если таковые вообще имеют место) изменениям при переходе из одного состояния проводимости в другое.

В отличие от *цис* входа, зависимость F_c^{trans} - r для низкопроводящего со стояния (черные квадраты на рис. 6), существенно отличалась от аналогич ной зависимости при открытом состоянии канала (см. рис. 5), особенно в случае полимерных молекул с большим гидродинамическим радиусом. Когда VDAC находится в закрытом состоянии, молекулы с радиусом, равным или больше 1,22 нм (PEG2000), не входят в канал. Зависимость F_c^{trans} - r более сложная, чем F_c^{cis} - r , и ее ниспадающая часть легко разбивается на два сег мента прямыми линиями. Максимальный радиус *транс* входа канала в низ копроводящем состоянии близок к $\sim 1,2$ нм. Это значение существенно меньше, чем радиус канала в открытом состоянии ($\sim 2,0$ нм). Таким образом, переход между открытым и закрытым состояниями проводимости, в основ ном, сопровождается изменением в размере радиуса именно *транс* входа. В

закрытом состоянии структура канала ближе к форме цилиндра, по сравнению с состоянием высокой проводимости. Для установления длины цилиндрической и конусообразной частей VDAC в низкопроводящем состоянии результаты были проанализированы также как данные, полученные при открытом состоянии. Мы установили, что длина цилиндрической и конусообразной частей равна $\sim 2,9$ и $\sim 1,7$ нм, соответственно. Полученные результаты показывают, что основные геометрические изменения при переходе из от-

44

крытого в закрытое состояние проводимости происходят в *транс* части канала.

На основе полученных нами данных можно предложить схематичное геометрическое изображение канала, образованного Pore 31BM, в открытом и закрытом состояниях (рис. 7). В открытом состоянии радиус цилиндрической части составляет около 1,0 нм и имеет длину $\sim 2,5$ нм. Меньший радиус конической части равен радиусу цилиндрической. Наибольший радиус воронки ($\sim 2,0$ нм) наблюдается у *транс* входа. Длина этой части канала примерно равна $\sim 2,1$ нм. Переход в закрытое состояние проводимости сопровождается небольшим уменьшением радиуса (от $\sim 1,0$ до $\sim 0,9$ нм) и увеличением длины (от $\sim 2,5$ до $\sim 2,9$ нм) цилиндрической части за счет конусообразной *транс* части канала.

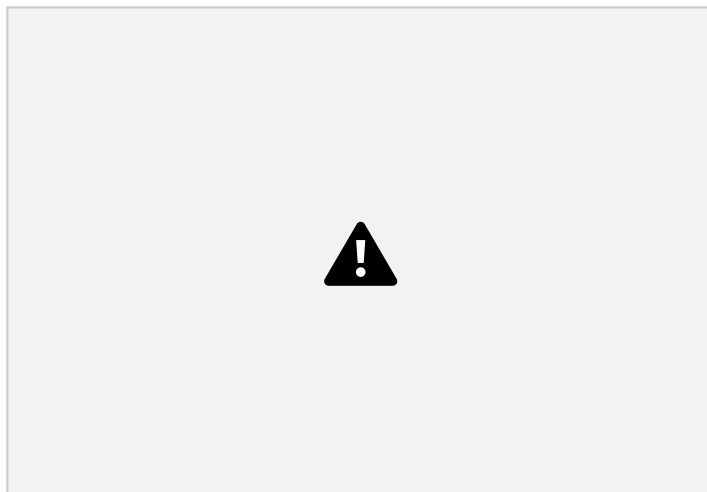


Рис. 6. Зависимость F_{c}^{cis} и F_{c}^{trans} (полученных для VDAC в низкопроводящем состоянии) от гидродинамического радиуса ПЭГ.

Вертикальные стрелки обозначают величины радиусов в критических точках VDAC. Каждая точка получена путем построения гистограмм распределения каналов ($n=90-200$) по амплитудам в отсутствие и в присутствии полимеров.

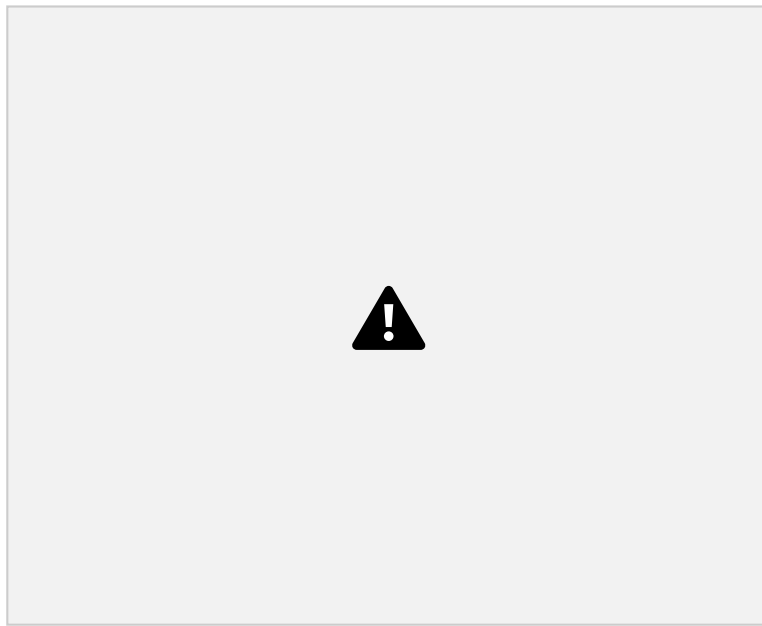


Рис. 7. Внутреннее строение просвета VDAC.

L - длина канала, начиная от *цис* входа (0 нм) и заканчивая *транс* входом (4,6 нм). Стрелки и цифры обозначают диаметры входов канала в открытом и закрытом состояниях. Пунктирные линии со

*стрелками указывают на
начальную точку конусной части
канала в открытом и закрытом
состояниях.*

Используя наши данные о геометрии Pore-31BM канала и длину самого канала, равную 4,6 нм (Guo et al., 1995), можно вычислить объем просвета последнего. Мы определили, что этот объем равен ~23,3 и ~13,3 нм³ для открытого и закрытого состояния, соответственно. Таким образом, изменение

45

объема при переходе канала из одного состояния в другое составляет около 10 нм³.

Различия в биофизических свойствах между макси-анионным каналом и VDAC. Основной причиной для предположения, что макси-анионный канал - это плазмалеммальный VDAC, является тот факт, что эти два канала имеют общие биофизические свойства. Тем не менее, сходство весьма поверхностное и более детальная проверка этих свойств при физиологических условиях показала существенные различия. Для этого мы провели эксперименты с VDAC (выделенным из митохондрий печени крысы) при условиях, близких к физиологическим. Мы встроили его в БЛМ и установили, что проводимость одиночных каналов в нормальном растворе Рингера приблизительно равна 530 пСм. Эта величина на 30-70% выше проводимости одиночных макси-анионных каналов (300-400 пСм) в такой же среде (Sabirov and Okada, 2009). В симметричных растворах KCl проводимость макси-анионного канала из клеток C127 насыщается уже при 2220 mM KCl с $K_m = 590 \pm 66$ mM. Данная зависимость проводимости от концентрации очень отличается от аналогичной зависимости VDAC, унитарная проводимость которого растет линейно с увеличением концентрации KCl вплоть до 3,5 M и достигает уровня ~10 нСм без каких-либо признаков насыщения (Colombini, 1986). Такая огромная разница в поведении каналов предполагает принципиально различный механизм ионного транспорта. Этот вывод подтверждается также и при сравнении ионной селективности. Слабая селективность VDAC для глутамата относительно ионов хлора ($P_{\text{glutamate}}/P_{\text{Cl}} = 0,45 \pm 0,03$) по сравнению с намного более высокой селективностью в этих же экспериментальных условиях макси-анионного канала $P_{\text{glutamate}}/P_{\text{Cl}} \sim 0,2$ подтверждает наше заключение о существенных отличиях во внутреннем строении этих двух пор.

Потенциал-зависимость - еще одно важное свойство, которое является общим для макси-анионного канала и VDAC. Оба типа каналов закрываются при фиксации положительного или отрицательного потенциала ± 50 мВ с временными константами около 50-100 мс при +50 мВ и 300-400 мс при -50 мВ. Тем не менее, важным отличием является уровень минимальной проводимости. В то время как макси-анионный канал закрывается

полностью, VDAC всегда сохраняет значительную часть (до 40-50%) проводимости. Так называемые «закрытые» состояния VDAC обладают к тому же катионной селективностью (Colombini et al., 1996; Colombini, 2004).

Внутреннее строение этих каналов также весьма различно. Так, согласно нашим данным (рис. 7), VDAC имеет радиус *цис* входа 1 нм, а *транс* входа 2 нм, а у макси-анионного канала разница гораздо меньше: 1,16 нм и 1,42 нм для радиусов *цис* и *транс* входа, соответственно (Sabirov and Okada, 2004).

На основании вышеизложенного можно заключить, что макси-анионный канал и митохондриальный порин VDAC формируются разными белками. Однако этот вывод отнюдь не отвергает возможности самого существования VDAC в плазмалемме.

46

В четвертой главе «Исследование ион-проводящих свойств и структуры нанопор методом цистеин-сканирующего мутагенеза» приведены данные по действию сульфгидрильных реагентов на мутанты α -ГЛ канала.

Ионные каналы являются идеальной модельной системой для изучения нанопор, так как они самоорганизуются и их структуры можно изменять с помощью молекулярно-биологических методов. Например, метод сайт направленного мутагенеза может быть использован для изменения числа и расположения основных зарядов внутри канала и/или вблизи входов в пору. Последствия таких изменений в структуре канала, как правило, проявляются в ионной селективности и форме зависимости проводимости от потенциала (G-V) (Noskov et al., 2004; Jordan, 2005). Чтобы установить механизм того, как заряды боковых цепей аминокислот контролируют свойства ионных каналов, мы изучили ион-проводящие свойства α -ГЛ канала, образованного диким типом токсина и его генетически модифицированными мутантами с следующей химической модификацией.

Наша задача заключалась в определении влияния типа и расположения основных зарядов аминокислотных остатков на селективность, проводимость (G) и зависимость проводимости от потенциала α -ГЛ канала. Поскольку первичная последовательность дикого типа α -ГЛ не имеет цистеинов, мы синтезировали несколько точечных цистеиновых мутантов и определили ион-проводящие свойства мутантного канала. Мутанты, содержащие цистеин, разделили на две группы по позиции в β -цилиндре стволового региона на четные и нечетные.

Для того, чтобы контролируемым образом модифицировать электростатический профиль канала, мы использовали реагенты, которые взаимодействуют с сульфгидрильными группами цистеина и приносят положительный или отрицательный заряд в его боковую цепь. Реакция этих реагентов с боковой цепью цистеина преобразует -SH группу в -SS-R, где -R – это заряженная часть: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ (MTSES), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ (MTSET).



Рис. 8. Изменение асимметрии проводимости цистеиновых мутантов α -ГЛ под действием сульфгидрильных реагентов. Последовательность мутантов слева направо: T129C, G130C, K131C, D127C, G133C, L135C, G137C, N121C, N139C, S141C и G143C. Раствор содержал: 100 мМКl, 30 мМТрис-HCl, pH 7,5. По оси абсцисс-расстояние от трансхода канала.

Добавление отрицательных зарядов в стволовой регион канала в случае нечетных аминокислот увеличивало асимметрию проводимости канала, а до-

47

бавление положительных зарядов уменьшало ее. Кроме того, влияние этих новых зарядов зависело от положения модифицируемого цистеинового остатка внутри канала (рис. 8). Мутанты с четными номерами, за исключением G130C, были недоступны для реагентов в предварительно сформированных каналах.

Влияние добавленных зарядов на катион-анионную селективность каналов показано на рис. 9. В этих экспериментах действию сульфгидрильных реагентов подвергались каналы, предварительно встроенные в липидную мембрану.

Эффективность новых зарядов зависела от их расположения вдоль оси канала. Относительно слабые эффекты были обнаружены для зарядов, расположенных близко ко входу в канал. Влияние зарядов усиливалось с расстоянием и на 1-1,5 нм от *транс* входа V_{rev} достигал максимальной величины $\sim +21$ мВ (MTSET) и -24 мВ (MTSES) с относительными отношениями проницаемости $P_K/P_{Cl} \sim 0,001$ и ~ 170 , соответственно, в то время как дикий тип α -ГЛ канала был слабо анион-селективен с $V_{rev} \sim +7,6$ мВ и $P_K/P_{Cl} \sim 0,46$. Максимальные значения V_{rev} для химически модифицированных каналов были близки к потенциалу Нернста при этих условиях ($\sim +22$ мВ и ~ -25 мВ для Cl и K^+ , соответственно). Положение зарядов влияет на V_{rev} и асимметрию G-V кривых по-разному. После первоначального роста V_{rev} достигает максимума и остается почти постоянным (рис. 9), тогда как величина асимметрии, достигнув максимума, быстро уменьшается по мере удаления от *транс* входа (рис. 8). Эти результаты показывают, что общий (интегрированный) заряд несет ответственность за катион-анионную избирательность канала, а баланс зарядов между входами имеет решающее значение для опре

деления формы вольт-амперных кривых.

Рис. 9. Влияние сульфгидрильных реагентов на потенциал реверсии каналов, образованных цистеиновыми мутантами.

Мембрана омывалась 100 и 300 мМ водным раствором KCl на транс и цис стороне, соответственно, все растворы содержали 30 мМ Трис-HCl, pH 7,5. Последовательность мутантов такая же, как на рис. 8.

Новый метод определения стехиометрии олигомерных нанопоп. На протяжении многих лет α -ГЛ канал считали состоящим из 6 мономеров, так как электронно-микроскопические исследования свидетельствовали в пользу именно гексамерной структуры (Olofsson et al., 1988; Hebert et al., 1992). Однако рентгеноструктурные исследования в сочетании с химической

48

модификацией показали, что, скорее всего, α -ГЛ канал является гептамером (Gouaux et al., 1994). Данные, полученные с помощью атомно-силовой микроскопии, были несколько противоречивы. Так, гептамерная модель была подтверждена в ходе одного исследования (Fang et al., 1997), тогда как результаты другого (Czajkowsky et al., 1998) свидетельствовали в пользу образования в липидной мембране гексамерных структур. В связи с этим мы предприняли попытку разработать новый метод определения стехиометрии ионных каналов в условиях, максимально приближенных к физиологическим. В основе этого метода лежит экспериментальное наблюдение того, что взаимодействие сульфгидрил-специфического реагента DTNB с цистеиновыми мутантами α -ГЛ протекает не по принципу «все или ничего», как это наблюдалось для дифтерийного токсина (Mindell et al., 1994; Huynh et al., 1997), а ступенчато (рис. 10), что отражает последовательную модификацию остатков цистеина в отдельных молекулах олигомерного канала. Временные интервалы между ступенями варьировали от канала к каналу, что отражает стохастический характер процесса. Максимальное количество ступеней по этапного уменьшения проводимости канала, наблюдаемое под действием DTNB, было равно семи, и это зафиксировано у 25% от общего числа модифицированных 38 каналов. Число ступеней, наблюдаемых в других случаях, колебалось от четырех до шести. Средняя величина изменения проводимости, вызванного реагентом, составляла $6,5 \pm 1,6$ пСм (среднее значение из 226 событий при фиксации -100 мВ). Нельзя ожидать, что ступени будут идентичны в каждом эксперименте, поскольку есть несколько способов, которыми

может проходить реакция субъединиц олигомерной поры (Braha et al., 1997). Тем не менее, первый и последний шаги между определенными состояниями



Рис. 10. Изменения проводимости мутантных каналов I7C, индуцированные DTNB.

Действие DTNB на одиночный канал. Растворы в обоих отсеках ячейки содержали 100 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА и 30 мМ трис-HCl, pH 7,5.

Чтобы проверить это предположение, амплитуды отдельных ступеней были проанализированы последовательно для всех каналов, в которых наблюдалось семь ступеней. Действительно, зависимость изменения стандартных от-

49

клонений средней величины амплитуды ступени от номера в последовательности оказалась колоколообразной. В соответствии с предсказанием, максимальное отклонение наблюдалось для шагов 3-5, в то время как шаги 1 и 7 имели небольшие отклонения. Таким образом, семиступенчатое снижение проводимости одиночного канала в нашей экспериментальной системе однозначно идентифицирует α -ГЛ канал как гептамер.

В пятой главе «**Влияние полианионов на α -ГЛ канал**» приведены данные по блокированию α -ГЛ канала полианионами.

Глюкозаминогликаны являются группой структурно-неоднородных полианионов (ПА), способных влиять на широкий спектр физиологических процессов, в том числе таких, как распознавание, адгезия, мембранный транспорт, анти-бактериальная защита. Они взаимодействуют с фосфатидилхолином (ФХ) в присутствии ионов Ca^{2+} (Vannucchi et al., 1985) и участвуют в регуляции функций ионных каналов и рецепторов (Van et al., 2006; Suppiramaniam et al., 2006). Кроме того, есть сообщения о том, что взаимодействие ПА с ионными каналами зависит от размера молекул ПА (Chicoine et al., 2004). Однако, детальный механизм влияния ПА на функции ионных каналов еще плохо изучен. Для решения этого вопроса мы изучили эффекты двух типов ПА разного размера на проводимость α -ГЛ каналов, а также зависимость их воздействия от состава среды.

Если на мембране, модифицированной α -ГЛ, зафиксировать напряжение, то

ток мгновенно увеличивается, так как ионы проходят через каналы, находящиеся в этот момент в открытом состоянии, затем ток начинает постепенно уменьшаться из-за перехода каналов в низкопроводящее состояние. В отсутствие в омывающем мембрану растворе (рН 7,5) гепарина и ионов Ca^{2+} фиксация 100 мВ-импульсов напряжения любого знака не вызывает значительного закрытия каналов, а добавление ПА в раствор по обе стороны от мембраны мало эффективно. Значительные токовые релаксации наблюдались только тогда, когда в раствор добавлялся CaCl_2 , причем эффект ПА и Ca^{2+} зависел как от стороны добавки, так и от знака фиксированного напряжения.

Мы также исследовали влияние других двухвалентных катионов на потенциал-зависимость α -ГЛ каналов. Когда в раствор добавляли ионы Mg^{2+} и Zn^{2+} в присутствии ПА, наблюдались эффекты, качественно аналогичные эффектам Ca^{2+} . Единственным различием являлась степень эффективности, с которой различные ионы способствовали потенциал-зависимым переходам канала. Увеличение концентрации всех трех катионов уменьшало постоянную времени релаксации тока в присутствии фиксированной концентрации ПА (рис. 11). По эффективности катионы можно было расположить в следующей последовательности $\text{Zn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$, идентичной той, что наблюдалась при ингибировании катионами действия α -ГЛ на клетки (Bashford et al., 1986; Bashford et al., 1988). Для выяснения механизма влияния ПА на α -ГЛ каналы мы провели эксперименты с гепаринами и декстран сульфатами (ДС), имеющими разный размер молекул. В этих опытах мы использовали гепарин альбумин (HepAlb, 4,8 молекулы гепарина связаны с одной молекулой бычьего сывороточного альбумина); гепарины со средней молекулярной

50

массой 18000 г/моль (в виде Na-солей), (Hep); 6000 г/моль (Hep6000); 3000 г/моль (Hep3000); гепарин дисахариды с молекулярной массой 563 г/моль (HepDi); ДС со средней молекулярной массой 500000 г/моль (DS500); 10000 г/моль (DS10); 5000 г/моль (DS5).



Рис. 11. Зависимость постоянной времени релаксации проводимости (τ) от концентрации двухвалентных катионов.

Хлориды двухвалентных катионов были добавлены (в концентрациях, указанных на оси абсцисс) в оба отсека одновременно. Раствор содержал 100 мМ KCl, 6 мкг/мл гепарина и 10 мМ Трис-HCl, рН 7,5, $n=3-5$.

Способность гепаринов блокировать канал зависела от стороны мембраны, с которой они добавлялись и эффект усиливался с ростом их размеров

и концентрации (рис. 12). Наименьший гепарин, НерDi, практически не влиял на α -ГЛ канал даже при концентрации 2 мг/мл. Таким образом, не смотря на меньшие коэффициенты диффузии, большие ПА более эффективны и вызывают более быструю релаксацию тока. Гепарины, использованные в настоящем исследовании, можно расположить следующим образом (в порядке убывания эффективности): НерAlb> Нер> Нер6000> Нер3000>> НерDi.

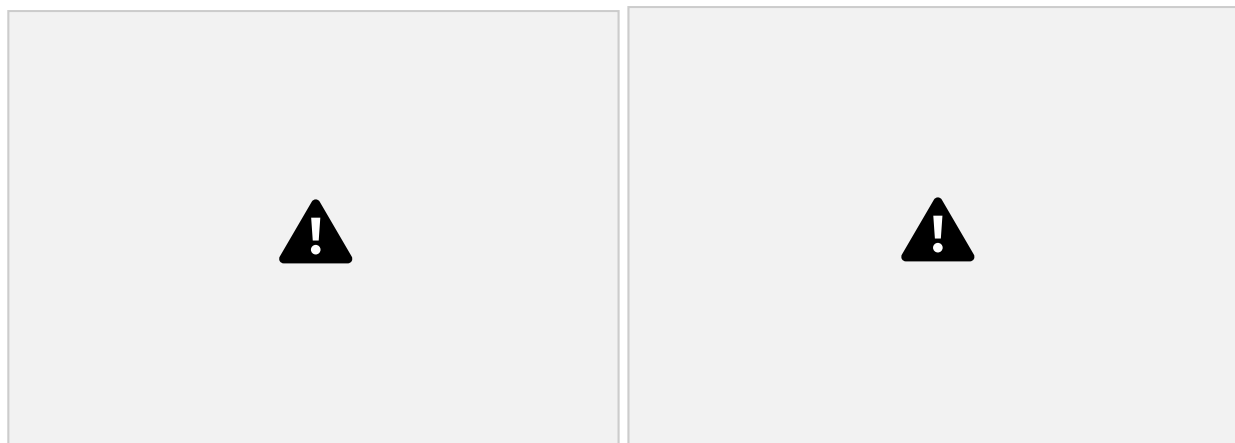


Рис. 12. Влияние ПА на постоянную времени релаксации α -ГЛ каналов. Зависимость постоянных времени релаксации от концентрации гепаринов в цис (А) или транс отсеке (Б) ячейки. Сплошные линии проведены согласно уравнению связывания, исходя из предположения о существовании всего одного сайта связывания, $n=3-5$.

Декстран сульфаты также оказывают влияние на потенциал-зависимость α -ГЛ канала. Эффективность ДС увеличивается с увеличением их размеров:

51

величины C_{50} были равны $220,0 \pm 30,0$ мкг/мл (DS5), $7,2 \pm 1,5$ мкг/мл (DS10) и $1,7 \pm 0,3$ мкг/мл (DS500). ДС имеют большую отрицательную плотность заряда, чем гепарины, но они значительно менее эффективны по воздействию на α -ГЛ канал. Это, скорее всего, связано с различиями в строении молекул декстран сульфатов и гепаринов.

ПА, оказавшись у входа в α -ГЛ канал, входит внутрь и блокирует его. Однако вопрос, почему, чем больше молекулярный вес ПА, тем более они эффективны (рис. 12), остается открытым. Из литературы известно, что фосфолипиды, включая ФХ, взаимодействуют с ПА (Sagrister et al., 2000; Huster et al., 1999) только в присутствии двухвалентных катионов, так как эти катионы образуют мостики между отрицательно заряженными фосфатными группами фосфолипидов и сульфатными группами ПА (Huster et al., 1999). Кроме того, экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ПА вообще и гепарин, в частности, продолжают иметь отрицательный общий заряд даже в 100 мМ Ca^{2+} растворе. Так как для действия гепаринов на канал требуется присутствие двухвалентных катионов, мы предположили возможность того, что

ПА связываются с мембраной в соответствии с механизмом кальциевых мостиков, предложенным в литературе (Huster and Arnold, 1998; Huster et al., 1999).

Связывание ПА с липосомами вызывает появление отрицательного ζ -потенциала на их поверхности. Чтобы проверить, является ли то же самое верным и для гепаринов, а также для проведения количественной оценки связывания исследуемых ПА с мембраной, мы измерили ζ -потенциал ФХ липосом в отсутствие и в присутствии гепаринов разного размера. Было обнаружено, что гепарины уменьшают ζ -потенциал ФХ липосом от слегка положительного значения (в отсутствие гепарина) до ~ -24 мВ (рис. 13А). Чем больше были молекулы гепаринов, тем больше оказывалось их влияние на ζ -потенциал. Зависимость ζ -потенциала липосом (рис. 13А) от концентрации гепарина напоминает сходную зависимость гепарин-индуцированной блокады α -ГЛ канала (рис. 12). Существует корреляция между эффективностью гепаринов (представленной как C_{50}) в этих двух системах (рис. 13Б).

Эти результаты позволяют предположить, что сильная зависимость блокады канала от молекулярного веса ПА объясняется связыванием ПА с мембраной.

Похоже, что на первом этапе взаимодействия канала с ПА-ионом, последний связывается с мембраной с помощью Ca^{2+} -мостиков, что приводит к повышению локальной концентрации ПА вблизи мембраны и, таким образом, вокруг области входа в канал. Близость входа в канал к поверхности мембраны увеличивает вероятность того, что поток ионов будет заблокирован ПА. Стационарная концентрация ПА уменьшается нелинейно (Peitzsch et al., 1995) по мере удаления от поверхности мембраны вплоть до ее объемного значения. В результате, при одной и той же концентрации ПА в объеме раствора их эффективная стационарная концентрация должна быть намного выше у *транс* входа (который практически соприкасается с поверхностью мембраны), чем у *цис* входа (удаленного от поверхности мембраны) канала.

52

Последнее объясняет, как разница в расстоянии между поверхностью мембраны и входами в канал может определять зависимость эффективности ПА от стороны добавки. Свободные полимерные молекулы случайным образом, в результате диффузии, могут подходить ко входу в канал, а затем (второй этап взаимодействия ПА/канал), входя потенциал-зависимым образом, блокировать последний.

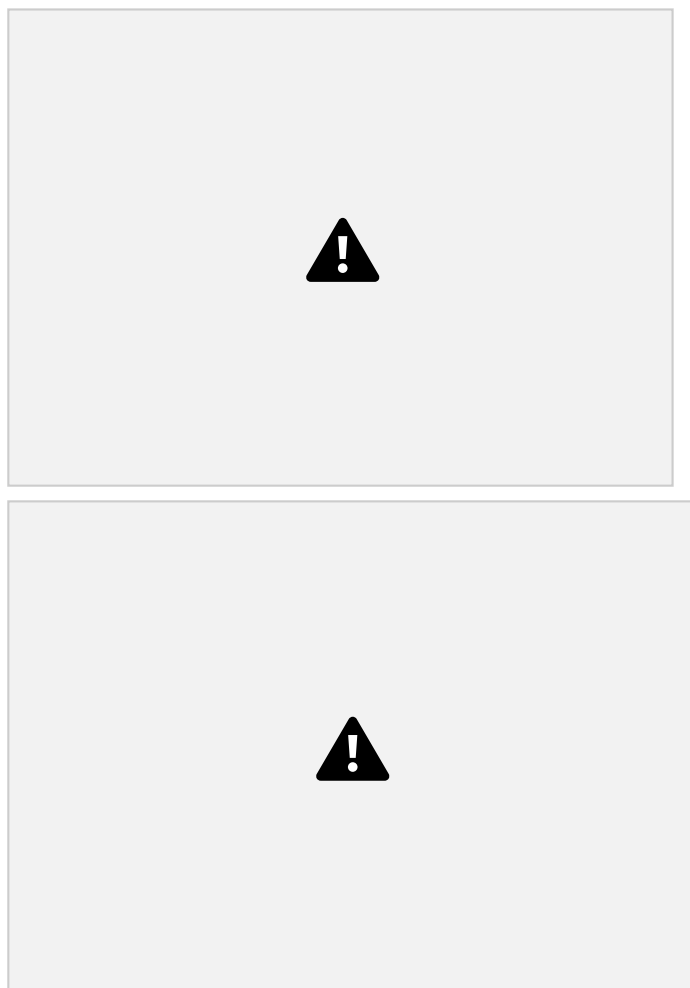


Рис. 13. Зависимость ζ -потенциала липосом от концентрации гепаринов (А) и корреляция между концентрацией полу эффекта гепаринов при действии на липосомы и на α -ГЛ каналы (Б). $n=3-5$

В шестой главе «Исследование эластической деформации α -ГЛ канала» приведены данные, полученные при исследовании блокирования α -ГЛ канала заряженным краун/ K^+ комплексом.

Геометрические особенности внутреннего строения поры ионных каналов в полностью открытом состоянии считаются, как правило, не зависящими от потенциала. Хотя это предположение обычно верно, желательно было бы определить его ограничения. Потенциал-индуцированная эластическая деформация может проявляться в изменении транспортных свойств канала, что особенно важно в случае молекул с размерами, сравнимыми с диаметром поры. Очевидно, что каналы с ярко выраженной нелинейностью зависимости тока от напряжения являются наиболее вероятными кандидатами на обладание эффектами электрострикции, хотя, конечно, нелинейность сама по себе не обязательно означает электрострикцию. Чтобы исследовать эту проблему, нужен одиночный ионный канал с хорошо известной структурой и соответствующий молекулярный инструмент. Поэтому мы выбрали α -ГЛ канал, а представитель большой семьи краун-эфиров, 1,4,7,10,13,16-гексаокса циклооктан (18-краун-6) с молекулярным размером ($\sim 1,15$ нм в диаметре),

очень близким к размеру самой узкой части поры (диаметр $\sim 1,2$ нм), был выбран в качестве инструмента для оценки возможных изменений в канале.

На рис. 14 показано, что при симметричном добавлении 18-краун-6 в 4М раствор KCl максимум блокировки канала наблюдается при фиксации -70 мВ.

Блокирующий эффект 18-краун-6 сильно асимметричен. Когда он добавляется только в *транс* отсек, эффект практически неотличим от сим-

53

метричного добавления. В то же время, добавление 18-краун-6 только в *цис* отсек влияет на проводимость очень слабо. Такое поведение указывает на то, что блокирование связано с заряженным краун/ K^+ комплексом, который легко достигает места связывания со стороны *транс* входа в канал. Комплекс транспортируется до сайта связывания посредством приложенного потенциала, большая часть которого падает в стволовой области канала. На рис. 15 приведена зависимость вероятности того, что сайт связывания не занят 18-краун-6, от потенциала. Вероятность была рассчитана, как $p(I_i) = 1 - \Delta I / \Delta$, где ΔI - краун-индуцированные изменения в среднем токе, протекающем через канал и Δi - уменьшение "мгновенного" тока, индуцированное K^+ .



Рис. 14. Влияние симметричной добавки 18-краун-6 в 4М раствор KCl на проводимость α -ГЛ канала.

Представлен результат типичного эксперимента на одиночном канале.

Рис. 15. Зависимость вероятности «не блокирования» канала 18-краун-6 от фиксированного потенциала. Пунктирная линия - наилучшая аппроксимация по модели

Woodhull для блокирования тока одиночным элементарным зарядом (уравнение 2). Сплошная линия - аппроксимация с помощью модифицированной модели, в которой предполагается упругая деформация в зависимости от

фиксированного потенциала.
 $n=3-5$

Для анализа процесса блокирования мы использовали модель Woodhull (Woodhull, 1973; Hille, 1992) в обобщенном виде (Tikhonov and Magazanik, 1998). Некоторые из основных требований к применимости этого подхода состоят в том, что блокада проводимости реагентом не является результатом кооперативных аллостерических эффектов при изменении конформации

54

белка и что блокирующие молекулы действуют независимо друг от друга, за исключением их конкуренции за сайт связывания. Данные, приведенные в работе (Bezrukov et al., 2004) и наши собственные результаты позволяют предположить, что зависимость, представленная на рис. 15, находится в полном согласии с этими требованиями. Ограничение, налагаемое равновесной термодинамикой на константы скорости (k_0 , k_1

k_0
 k_1

k_0 , индекс 0 относится к

$k_1 = -$

нулю приложенного потенциала), известно как микроскопическая обратимость или локальное равновесие. Из-за этого ограничения, в случае симметричного добавления блокатора тока в виде одиночного элементарного заряда, вероятность того, что канал не заблокирован, может быть описана как функция безразмерного потенциала $\psi = \phi e / kT$ (ϕ - трансмембранный потенциал, e - заряд электрона, k - постоянная Больцмана, T - абсолютная температура):

k_0

$() ()$

$\exp ()$

$\delta \psi \delta \delta \delta \psi$

$+ + -$

A

$m m t c$

$P_{+ + - + + + -}$

$= (2)^{0000}$

$(\delta \delta \delta \psi) (\delta \psi) (\delta \delta \delta \psi)$

$B A B A$

$\exp () \exp \exp ()$
 $c t m m m t c$

где $\exp ()$, $k_1 = C b_1 - \delta_t \psi \exp ()$, $k_{-1} = b_{-1}$

$\delta_m - \delta_t \psi \exp ()$, $k_2 = b_2$

$$\delta_m - \delta_c \psi$$

$$k_- = - , 0_1$$

$$0/ = -$$

$$\exp((\delta \delta) \psi) \cdot C b_{2cm} \quad 0$$

$$A k k , 0_1 0/ = -$$

$B C k k$ - независимые от 2

1

потенциала константы; δ_c , δ_m и δ_t являются долями потенциала, фиксированного на мембране, которые соответствуют положению *цис* барьера, минимуму и *транс* барьера; C - концентрация блокатора.

Принимая во внимание внутреннюю геометрию канала, данные, опубликованные другими авторами (Howorka and Bayley, 2002) и наши собственные оценки, расположение *цис* барьера (δ_c) было принято равным 0,8. Если месторасположение *транс* барьера (δ_t) не фиксировать, то он, чаще всего, принимает нереальное отрицательное значение. Так что мы приняли, что δ_t равно нулю, поставив барьер именно у *транс* входа в канал. В результате, эта функция содержит только три свободных параметра: δ_m - доля трансмембранного потенциала, который действует на блокирующий комплекс, а также параметры A и B . Наилучшие аппроксимации уравнения (2) для данных на рис. 15 показаны пунктирными линиями. Эти теоретические кривые не точно описывают экспериментальные точки, но это не связано с относительно большими ошибками измерений при малых и положительных напряжениях. Чтобы получить лучшее согласие с моделью, надо принять одно (или оба) из следующих двух предположений: (I) заряд краун/ K^+ комплекса больше, чем единица; (II) приложенный потенциал приводит к структурным деформациям поры и, как следствие, к изменениям взаимодействия 18-краун-6 с порой, что не учитывается формулой (2).

Чтобы выбрать между этими двумя предположениями, заметим сначала: твердо установлено, что комплекс между 18-краун-6 и ионами калия образуется в пропорции 1:1 (Rounaghi et al., 1997), так что предположение «один за ряд на один блокирующий комплекс» вполне оправдано. Данные, представ-

55

ленные на рис. 15, получены при сравнительно небольшой концентрации 18-краун-6. Таким образом, первое из наших предположений может быть проигнорировано. Второе заключается в том, что отрицательный потенциал уменьшает выходной барьер для 18-краун-6 с *цис* стороны канала за счет увеличения размера "геометрически узкого места". Действительно, если радиус сужения в точности равен или меньше, чем радиус 18-краун-6, барьер

бесконечно велик и молекула комплекса краун/ K^+ не может пройти канал. Если радиус сужения увеличивается при отрицательных потенциалах, то высота барьера быстро уменьшается, что облегчает выход 18-краун-6 из канала с *цис* стороны. В этой модификации модели параметр B является постоянным, а параметр A теперь является функцией потенциала и увеличивается при фиксации отрицательного напряжения. В качестве одной из возможных описаний глубины ямы и/или изменения барьера приложенным потенциалом мы выбрали энергию взаимодействия Ван-дер-Ваальса между краун/ K^+ комплексом и стенками поры. Тогда радиус-зависимые взаимодействия можно выразить через известные константы потенциала Леннарда-Джонса для пары водород-водород (Allen and Tildesley, 1989). Предполагая реалистичную зависимость радиуса перетяжки от потенциала, которая качественно совместима с изменениями проводимости канала, мы приходим к разумному согласию между предсказанием модели и результатами экспериментов. При таком подходе нами установлено, что только предположение об изменении барьера позволяет соотнести сайт связывания с узкой частью поры ($\delta_m \sim 0,7$) и очень маленькое ($\sim 0,08$ нм) эластичное изменение радиуса этой части канала способно изменить энергию связи примерно на две единицы kT и устранить расхождение между предсказаниями модели и экспериментами. Кривая, проведенная с учетом таких изменений во взаимодействии 18-краун 6 и поры, показана на рис. 15 сплошной линией. Действительно, фактическая величина увеличения радиуса, вызванного потенциалом, зависит от приближения, которое используется для сил Ван-дер-Ваальса. Например, было показано (Parsegian, 2005) для геометрий "цилиндр в цилиндре" или "сфера в сфере", что взаимодействие может быть выражено как обратная зависимость второй степени. Рассчитывая эту зависимость, можно получить большие изменения радиуса. Таким образом, наша гипотеза о роли электрострикции в транспортных свойствах α -ГЛ канала позволяет объяснить наблюдаемую потенциал-зависимость как остаточной асимметрии проводимости, так и блокирования 18-краун-6 (рис. 15). В обоих случаях предполагаются постепенные непрерывные эластичные изменения в структуре ионного канала, пропорциональные приложенной силе. Это принципиально отличается от известных "ворот каналов", когда индуцированные полем конформационные изменения являются дискретными и часто упоминаются как процессы типа "все или ничего". В нашем исследовании мы предположили, что видимые изменения в радиусе поры под действием приложенного электрического поля являются локальной электрострикцией. Мы можем предложить возможную механистическую модель эластичной деформации в зоне сужения α -ГЛ канала, где Lys147 перемещается при фиксации потенциала, увеличивая диа-

метр канала в этой позиции и облегчая, тем самым, выход 18-краун-6, когда отрицательный знак потенциала фиксируется на *цис* стороне, или уменьшая диаметр канала и затрудняя транспорт 18-краун-6 при фиксации положительного потенциала. Тем не менее, приведенные оценки показывают, что

гипотеза электрострикции, выдвинутая в нашем исследовании, является достаточно правдоподобной.

ВЫВОДЫ

1. Впервые модифицированным методом полимерного зондирования установлено, что:

а) диаметры двух входов α -ГЛ канала близки друг к другу и равны 2,6/2,4 нм (*цис/транс*). α -ГЛ канал имеет 2 узких участка: основное сужение диаметром 1,3 нм, расположенное примерно в центре канала и второе, диаметром 1,8 нм, расположенное ближе к *цис* входу в канал;

б) диаметр *цис* входа VCC канала равен 1,9 нм, а *транс* входа 1,6 нм, внутри канала имеется одно сужение диаметром 1,2 нм;

в) диаметры *цис* и *транс* входов ионного канала VDAC в высокопроводящем состоянии равны 2,0 и 4,0 нм, соответственно. При переходе в низкопроводящее состояние диаметры обоих входов уменьшаются и становятся равными 1,8 и 2,4 нм, соответственно. Суммарное уменьшение объема канала равно $\sim 10 \text{ нм}^3$, что составляет около 40% от общего объема поры.

2. Детальное сравнение, при физиологических условиях, биофизических свойств макси-анионного канала и VDAC показало, что они формируются разными белками.

3. Впервые, методом цистеин-сканирующего мутагенеза, доказано, что добавление в структуру α -ГЛ канала дополнительных отрицательных зарядов изменяет его слабо анионную селективность на сильно катионную, а добавление положительных зарядов заметно увеличивает анионную селективность. Степень этих изменений зависит как от радиуса канала в точке добавления нового заряда (что преимущественно влияет на ионную избирательность), так и от расположения зарядов вдоль продольной оси канала (в основном изменяет вольт-амперную характеристику). Эти результаты демонстрируют, что суммарный заряд стенки поры несет ответственность за катион-анионную селективность α -ГЛ канала, а положение заряда у входа в пору является основным фактором, определяющим форму вольт-амперных кривых.

4. Разработан новый метод определения стехиометрии олигомерных ионных каналов, основанный только на электрофизиологических измерениях. С помощью него установлено, что α -ГЛ канал, сформированный в бислойной липидной мембране, является гептамером.

5. Установлено, что молекула полианиона входит в пору за счет электростатических сил и физически блокирует прохождение ионов.

Вероятность блокирования α -ГЛ канала полианионами зависит:

а) от присутствия и концентрации двухвалентных катионов, которые по эффективности располагаются в следующей последовательности: $Zn^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$;

б) от концентрации, молекулярной массы и структуры полианионов; эффективность влияния полианионов на канал коррелирует с их влиянием на ζ -потенциал мембран;

в) от стороны добавки полианионов, их добавка со стороны *транс* входа канала более эффективна, что связано с асимметричным строением α -ГЛ канала.

6. Впервые доказано, что фиксированный на мембране потенциал вызывает эластическую деформацию α -ГЛ канала, что объясняет остаточную асимметрию его вольт-амперной характеристики при высоких концентрациях соли и зависимость его блокировки комплексом 18-краун-6 с катионом калия от потенциала.

**DOCTOR OF SCIENCES 16.07.2013.K/B/T.13.01 AT INSTITUTE OF
BIOORGANIC CHEMISTRY AND THE NATIONAL UNIVERSITY
OF UZBEKISTAN
INSTITUTE OF BIOORGANIC CHEMISTRY, FEDERAL UNIVERSITY
OF PERNAMBUCO**

MERZLYAK PETR GRIGORIEVICH

**CHARACTERISTICS OF RELATIONSHIP OF STRUCTURE AND
FUNCTIONS IN PROTEIN NANOSCOPIC PORES**

03.00.02 –Biophysics and radiobiology

ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

Tashkent – 2016

The subject of doctoral dissertation is registered at Supreme Attestation Commission at the Cabinet of Ministers of Republic of Uzbekistan under number 30.09.2014/B2014.5.B73

Doctoral dissertation is carried out at Institute of Bioorganic Chemistry, the Federal University of Pernambuco.

The full text of doctoral dissertation is placed on web page of Scientific council 16.07.2013.K/B/T.13.01 of the Institute of Bioorganic Chemistry and the National University of Uzbekistan to the address <http://ss.biochem.uz>

Abstract of dissertation in three languages (Uzbek, Russian, English) is placed on web page to address <http://ss.biochem.uz> and on Information-educational portal "ZiyoNet" to address www.ziyo.net.

Scientific Consultant: Krasilnikov Oleg Vladimirovich doctor of sciences in biology,
professor

Official opponents: Mirkhodjaev Ulugbek Zakirovich doctor of sciences in biology,
professor

Madyarov Shukhrat Raimdjanovich
doctor of sciences in biology

Turdikulova Shahlo Utkurovna
doctor of sciences in biology

Leading institution: Institute of microbiology AN RUz

Defense will take place on «_____» _____ 2016 at ____ at the meeting of the Scientific council 16.07.2013.K/B/T.13.01 of the Institute of Bioorganic Chemistry and the National University of Uzbekistan at the following address: 100125, Tashkent, 83 M. Ulugbek street. Phone: 262 35 40, Fax: (99871) 262 70 63

Doctoral dissertation is registered in library at the Institute of Bioorganic Chemistry, it is possible to review it in library (100125, Tashkent, 83 M. Ulugbek street. Phone: 262 35 40, Fax: (99871) 262 70 63), e-mail: asrarov54@mail.ru

Abstract of dissertation sent out on«_____» _____ 2016 year
(mailing report _____ on «_____» _____ 2016 year)

A.S. Turaev
Chairman of Scientific council
on award of scientific degree of doctor of sciences
doctor of sciences in chemistry, professor

M.I. Asrarov
Scientific secretary of Scientific council
doctor of sciences in biology, professor

D.A. Kadyrova
Chairman of Scientific seminar at Scientific council
on award of scientific degree of doctor of sciences
doctor of sciences in biology, professor

ANNOTATION OF DOCTORAL DISSERTATION

Topicality and relevance of the dissertation topics. One of the major problems in modern biophysics is to study the relationship of structure and function of ion channels formed by proteins. On one hand, the ion channels are nanoscopic pores which exhibit selectivity to ions, ability to selectively transport through the membranes different molecules or respond to them by changing their own properties. On the other hand, some organisms (including highly pathogenic ones) produce proteins that are capable to spontaneously integrate in the host cell membrane and form there ion channels *de novo*. Not only clinical symptoms of various infectious diseases, but also compositions of medium in which the cells and bacteria exist depend on these proteins. Therefore, nanopores formed by proteins attracted attention of researchers of all over the world, both in terms of basic principles of biophysical and physiological functioning of living cells, and from the practical aspect, as there are ideas for their use as nano sequencers, components of nano-filter, biosensors and other nanodevices. The data on what structural characteristics affect nanopore functioning and how selectivity depends on their structure and amino acid composition may help in designing nanopores with predetermined properties.

In international publications, scientists noted that knowledge about the structure of protein nanopores and its impact on their properties, can help both in the development of modern medicine and the development of nanodevices used in modern devices. Most researchers believe that α -hemolysin (α -HL) is the most promising ion channel as a basis of these instruments, and therefore, a large number of papers devoted to the studies of the properties of this channel have been published. The ability of α -HL to form water-filled transmembrane pores in bilayer lipid membranes was first discovered over 35 years ago in Uzbekistan.

This dissertation research to a certain extent is the implementation of the tasks stipulated by the Joint Statement between Uzbekistan and Japan signed in February. **Compliance of the investigation with Priority Directions in Science and Technology of the Republic of Uzbekistan.** This study was performed according to the priority directions of development of science and technology of the Republic, V: «Agriculture, biotechnology, ecology and environmental protection». **Review of international scientific research on the topics of dissertation.** Research addressing the relationship of structure and function in protein pores using modern methods are being carried out in the world leading research centers and higher educational institutions including the University of Manitoba (Italy), Columbia University, University of Chicago, University of Maryland (USA), National Institute for Physiological Sciences (Japan), Institute of Biophysics of Cells (Russia).

As a result of research carried out in the world on the structure of the protein

nanopore, a number of scientific results have been obtained including: the proposed structural model of the voltage-dependent anion channel (VDAC) and its functional features (University of Manitoba, University of Maryland), a crystal structure of the cytolysin of *V. cholerae* El Tor (Columbia University), the finding that the α -HL is a heptamer and its crystal structure (University of Chicago).

61

In the world, the studies on ion channels are being performed in a number of priority areas including the relationship of structure and function in mechanosensitive and TRP channels, studies on the potential-dependent changes in the internal structure of the channels, which can be found upon the influence of various organic molecules which affect the properties of the nanopore, the studies of the channels formed by toxic proteins focused on the study of α -HL and porins of *Mycobacterium smegmatis*, which are the most promising in terms of creating new nano sequencers.

Degree of study of the problem. Synthesized by the bacterium *Staphylococcus aureus*, α -HL is currently one of the most studied and promising proteins that form a nanopore. Therefore, the protein is an ideal model system in the studies of nanopores whose structure can be altered by molecular biological techniques, for example, by site-directed mutagenesis, through which one can alter the number and location of the main charges inside the nanopores and/or at the pore entrance. The scientific works of foreign scholars, prof. H. Bayley and Dr. J. Kasianowicz, studied in detail the internal structure of the nanopore formed by α -HL and its influence on the passage of various molecules directly into the lipid membrane. Cytolysin *V. cholerae* El Tor has been studied in detail under the guidance of prof. S. Bhakdi. The voltage-dependent anion channel of natural membranes, which plays an important role in the transport of molecules across cell membranes, as well as in apoptosis has been studied in detail by Prof. M. Colombini. The maxi anion channel has been studied by a team led by prof. Y. Okada.

The study of ion channels in our country have been performed under the leadership of akad. B.A. Tashmukhamedov, professors P.B. Usmanov and R.Z. Sabirov. Particularly, α -HL and the latrotoxin of the Black Widow Spider venom have been investigated and a number of new toxins acting on the membrane lipid backbone and blocking the sodium channels of excitable membranes of vertebrates and arthropods have been identified.

Relation of the Dissertation to the thematic scientific research plans of the Institution. This work has been carried out in accordance with the research themes of the Laboratory of Molecular Physiology, Institute of Bioorganic Chemistry of the Academy of Sciences of Uzbekistan within the fundamental research projects: "The study of geometrical parameters of the water pore of ion channels formed by several protein toxins and proteins isolated from natural membranes and some abiotic factors" (1997-1999); F-4.1.3 "Studying the properties of ion channels and transporters in artificial and natural membranes and their role in regulation of cell volume" (2003-2007); FA-F3-T112 "Biophysical mechanisms of regulation of the volume of animal and plant cells" (2007-2011); FA-F5-T080 "Molecular Physiolo

ogy and Biophysics volume-activated ion transport" (2012-2016). Also, within the research topics of the Laboratory of Membrane Biophysics of the Department of Biophysics and Radiobiology of the Federal University of Pernambuco (Brazil) and within the framework of the Memorandum of collaboration between the Institute of Bioorganic Chemistry of the Academy of Sciences of Uzbekistan and the National Institute of Physiology of Japan.

62

The aim of research work is to conduct structural and functional analysis of nanopores formed by different proteins.

Tasks of research work in connection to the purpose of investigation: determination of the radius of the pores along the axis of an ion channel; determination of radii of water pores formed by VDAC in its high- and low conducting states;

development of a new method of determination of the stoichiometry of nanopores; studying by cysteine-scanning mutagenesis the effects of different amino acids that constitute the molecule of α -HL on the ion-conductive properties of nanopores;

probing, by cysteine-scanning mutagenesis, the effects of chemical modification of amino acids on the channel ion-conductive properties;

studying the effects of polyanions and crown ethers on ion-conducting properties of the α -HL nanopore;

testing the hypothesis that maxi-anion channel belongs to a family of VDAC proteins.

The object of study is the ion-conductive nanopores formed by proteins.

Subject of research - the dependence of the properties of the nanopore on the protein structure and amino acid composition.

Methods of research. We used modern electrophysiological and biochemical methods of research, such as the formation of bilayer lipid membranes by the method of Mueller and Montal-Mueller¹, measuring the electrical parameters of the membranes in a voltage-clamp mode with full computer control, methods for isolating proteins, as well as the method of cysteine-scanning mutagenesis. Computer program Origin, versions 5 and 8.6 were used for data analysis; for building the molecular models, we used the programs Swiss-PDBViewer, Ver. 3.7 and CS Chem3D Pro (CambridgeSoft, Cambridge, MA).

Scientific novelty of the dissertation work includes the followings: for the first time, using the method of asymmetric application of non-electrolytes, it has been shown that the changes in the pore radius along the axis of the ion channels can be detected;

it was found that the radius of the VDAC ion channel changes upon transition from one to other conduction state;

it was found that the properties of ion channels depend not only on the sign of the charge of the charged groups distributed within a channel, but also by their location along the longitudinal axis of the channel;

a novel method for determining the stoichiometry of channels formed *in situ* has been proposed;

it is established that the maxi-anion channel does not belong to the family of VDAC proteins;

for the first time, it was demonstrated that blocking of ion channel by poly anions depends on their size and concentration of divalent cations; it was found that the potential clamped on the membrane causes an elastic deformation of the α -HL pore.

63

Practical results of the study. A new method of determining the stoichiometry of oligomeric nanopores *in situ*, which allows to determine the stoichiometry of the ion channels in conditions as close as possible to the physiological has been proposed.

Reliability of the results is based on the fact that the experimental results were obtained by using modern methods of investigation. The conclusions were made based the results processed using the modern methods of mathematical statistics.

The scientific and practical value the study results. The data presented in this work are primarily of fundamental interest because they allow identification of protein-dependent properties of nanoscopic pores and their relation to the structure and amino acid composition, and thus help to create nanopores with properties required for the creation of various nanosensors. The results obtained will find practical application in nanotechnology as a basis for development of nanosensors, nano sequencer components, nano-filters, biosensors and other devices used in modern devices; they are of interest for the pharmaceutical, biomedical research to develop nanoscopic pore blockers.

Implementation of results into practice. The new biophysical methods of determination of structure of ion channels under physiological conditions: have been acknowledged by the SOKENDAI University and the National Institute for Physiological Sciences and employed for the studies of structure of protein nanopores (Reference of the SOKENDAI University of March 10, 2016, Japan, Kanagawa). The new biophysical methods have also been acknowledged by the Academy of Sciences of Uzbekistan (Reference of the Ac. Sci. RUz of March 10, 2016). These methods allow determination of the radius of oligomeric ion channels and establishing their stoichiometry.

Base on the changes of ionic current through protein nanopores, at the Department of Biophysics and Radiobiology of the Federal University Pernambuco, Brazil, a nano-sensor has been developed, which allows detection of highly toxic proteins – microcystins (Reference of May 2, 2016 of the Department of Biophysics and Radiobiology). This nano-sensor gives a possibility of determination of cyclic peptide toxins in hemodialysis systems.

Approbation of the work. The results of the studies were presented at the XI XVIII and XX Annual Meetings of the "Federation of Societies for Experimental

Biology» (FESBE) (Brazil, 1996-2003, 2005); 43rd, 44th and 48th Annual Meetings of the American Biophysical Society (USA, 1999, 2000, 2004); IV Biophysical Congress of the Southern Cone (Campinas, Brazil, 2000); 4th International Workshop on pore-forming toxins (Trento, Italy 2000); 5th International Seminar on the pore-forming toxins (Mainz, Germany, 2004); 87th Annual Meeting of Japan Society of Physiologists (Morioka, Japan, 2010).

Publication of the research results. On the dissertation theme, 38 publications including 14 primary research papers, all in international journals recommended by the Supreme Attestation Commission of the Republic of Uzbekistan for publication of basic scientific results of doctoral dissertations.

The structure and volume of the thesis. The dissertation consists of an Introduction; six Chapters, Conclusion, and the List of the used references. The volume of the thesis is 198 pages.

MAIN CONTENT OF DISSERTATION

In **Introduction**, the urgency and demand of the theme of dissertation is emphasized, the purpose and problems, and also an objects of research are formulated, conformity of research to Priority Directions of Development of Science and Technologies in the Republic of Uzbekistan is stated, scientific novelty and practical results of research are formulated, reliability of obtained results is proved, the theoretical and practical importance of the obtained results is described, practical applications of the research results are noted, and information on previously published works and dissertation structure is presented.

In the first chapter, "**Structure and properties of the investigated channel forming proteins**", a detailed review of the literature dealing with all the nanopores studied in this thesis is presented, the information about their structure and functions is provided, and the modern data on the structure and properties of protein channels studied in this thesis is given.

The second chapter, "**Preparation of channel-forming proteins and methods of their investigation**", describes in details methods for obtaining of all used proteins and clearly outlines the employed electrophysiological methods.

In the third chapter, "**The polymer probing of ion channels**", the results of research to determine the ion channel radius are presented.

Synthesized by the bacterium *Staphylococcus aureus*, the exotoxin α -hemolysin is a water-soluble monomer. The polypeptide constitutes a 293-residue single chain protein with a molecular mass of 33.2 kDa. Seven molecules of α -toxin form one transmembrane channel (Gouaux et al., 1994).

To gauge the size of each entrance of the α -toxin channel and to probe the geometry of the channel lumen, we measured the channel conductance with polymeric nonelectrolytes added to the *cis* or *trans* side of the BLM. With this purpose, we calculated the averaged conductivities of major pools of single ion channels in the presence of test non-electrolytes at *cis* (g^{cis}) or *trans* side (g^{trans}) of the channel. For more precise estimation of the pore size, we analyzed the dependence of pore

filling on the polymer hydrodynamic radius. To deduce pore structural features, we introduced the polymer filling factor, $F(w)$, which describes the ratio of the pore length that is accessible to a polymer of a given molecular weight, w , to the total pore length L . Under equilibrium conditions (symmetrical application of polymers), a filling factor of 1.0 would correspond to equipartitioning, that is, to a large pore in the presence of small polymers that occupy all of the volume of the pore with a concentration equal to that in the bulk. Filling factor $F(w)$ was calculated by the following equation (Krasilnikov et al., 1998):

$$F(w) = \frac{\chi(w)}{\chi_0} \frac{g_0}{g(w)}$$

where g_0 and χ_0 is the channel conductance and solution conductivity in the presence of impermeant polymers, $g(w)$ and $\chi(w)$ is the channel conductance and solution conductivity in the presence of polymers of different molecular weight, w . As expected, the filling, F (fig 1.), is dependent on the hydrodynamic radius of polymer molecules. In both cases, the maximum values of F observed in the pres-

65

ence of the smallest nonelectrolyte are close to 0.6. In this case, there is no constriction inside the channel lumen that is narrow enough to stop the flux of glycerol molecules through the pore. When polymers with larger hydrodynamic radii were used, we observed significantly different values for F^{cis} and F^{trans} , indicating an asymmetry in the α -toxin channel geometry. In both cases, the dependence of filling on the hydrodynamic radius of polyethylene glycols (PEG) shows a biphasic behavior, which, in the case of a cylindrical geometry, suggests the presence of a constriction(s) in the channel lumen.

Fig. 1. Dependence of F^{cis} and F^{trans} on polymer hydrodynamic radii.

The error bars are equal to or smaller than the symbols used. Arrows indicate the radii values at critical points. The solution contained 100 mM KCl, 5 mM Tris / citrate, pH 7.5, 20% PEG. Each point is obtained by plotting histograms of the distribution of the channel amplitudes ($n = 150-300$) in the absence and presence-polymers.

In the *cis* filling experiments, the lowest level of filling ($F^{\text{cis}} \sim 0$) is observed for the largest PEG used. Molecules with radii larger than 1.22 nm do not enter the channel from the *cis* entrance at all. It can be seen (Fig. 1) that a decrease in polymer size leads to a progressive, but biphasic, increase in filling. This behavior suggests that the size of the channel pore does not change smoothly from *cis* to *trans* opening. Three straight lines can fit this part of the dependence (from right to left). The first line fits a pronounced slope observed for molecules, the radii of which varied from 0.9 nm to 1.22 nm. The second line fits a relatively long plateau of the dependence with $F^{\text{cis}} = 0.36$. The third line fits the slope of the dependence that is measured for molecules with sizes between those of glycerol and PEG300 ($r = 0.31 - 0.6$ nm) when filling increases from 0.36 to its maximum value of 0.6. We argue that the interception between the first line that fits the slope of the falling part of F^{cis} dependence and its lowest invariant part ($F^{\text{cis}} = 0$) gives the radius (1.26 nm) of the channel *cis* opening. The interception between the first and second lines (0.9 nm) gives the radius of the first constriction as seen from the *cis* side opening. Polymers of this and smaller sizes fill the part of the pore between this and the second (with a smaller aperture) constriction, with partitioning independent of their size. Their size gets smaller than the aperture of the second constriction at the intersection of the second and third lines at 0.6 nm. Thus, we first deduce the decrease in the channel radius from 1.25 nm to 0.9 nm; then after this point, the radius stops decreasing until the main constriction ($r = 0.6$ nm) is reached. The presence of a relatively long intermediate invariant part of the dependence with $F^{\text{cis}} = 0.36$ means that molecules of PEG with hydrodynamic radii varying from 0.9 nm to 0.6 nm are equally effective in filling the channel pore. Their penetration

66

along the pore axis is restrained by the major constriction. The relative position of this constriction, as seen from the *cis* side opening, can be approximately estimated by the ratio of filling value for this plateau and its maximum value (Krasilnikov et al., 1998) as $0.36/0.6 = 0.6$.

In the *trans* filling experiments, polymer partitioning also shows biphasic behavior (Fig. 1), although it is much less expressed. As in the case of *cis* filling experiments (see above), molecules with radii larger than 1.22 nm do not enter the channel from the *trans* opening at all ($F^{\text{trans}} = 0$). Complete polymer exclusion from the pore is observed for almost the same PEGs as for the *cis* filling. This demonstrates that the size of the *trans* opening is close to the size of the *cis* opening. Again, a decrease in polymer size leads to a progressive increase in filling. The decreasing part of the dependence F^{trans} can be divided into four regions approximated by four straight lines. The first (from right to left) line fits an extended slope observed for molecules, the radii of which varied from 0.8 nm to 1.22 nm. The interception between this line and the lowest invariant part of the dependence F^{trans} indicates the radius (1.24 nm) of the *trans* opening of the channel.

In the range of sizes between glycerol and PEG300 ($r = 0.31 - 0.6$ nm), for the

reasons that we do not know, F^{trans} and F^{cis} differ qualitatively. While *cis* filling still grows as probing molecule size decreases, *trans* filling saturates to its maximum value at the size of PEG300. The biphasic features of the *trans* filling are poorly expressed. Among the tentative conclusions would be the existence of the main constriction of 0.7 nm radius. Its position along the pore axis would be predicted as close to the *cis* opening of the pore because of the high filling value (0.4) at this radius.

Our simplified analysis of the single-channel conductance in the presence of polymeric nonelectrolytes allows us to conclude that the radii of two openings of the channel are practically equal and are close to 1.2–1.3 nm. We also infer that the channel has a main constriction with a radius of 0.6 – 0.7 nm. From the *cis* filling experiments, we predict the presence of the second constriction (with $r=0.9$ nm), which is situated between the *cis* opening and the main constriction.

Let us compare our findings with crystallographic data on the channel structure (Song et al., 1996). The authors divide the channel structure into three domains, two of which, Cap and Stem, form the channel openings defined, respectively, as *cis* and *trans* in our study. The channel pore length is 10 nm and the radius of the *cis* opening is 1.4 nm. At 3.5 nm from the *cis* opening, the channel pore reaches its maximum radius of 2.3 nm. The narrowest part of the pore, with a radius of 0.7 nm, was established to be near the channel center. It was also found that in the stem region, the pore radius varies from 0.7 to 1.2 nm, depending on the volume of the side chains that protrude into the 1.3-nm-radius cylinder. Just from this description of the channel one can see a significant likeness with the geometrical features established in our study (Fig. 2).



Fig. 2. The apparent radius of the α -HL channel pore along the pore axis from crystallographic and polymer probing studies. Channel length is shown in nanometers, starting from the *cis* opening. Symbols ($\bigcirc$, $\bullet$), joined by solid lines mark the approximate profile of

the pore deduced from analysis of crystallographic data of Song et al. (1996) for Cap and Stem regions. Striped lines visualize the pore profile from polymer probing. Arrows indicate key points of the pore geometry.

*Study of the internal geometry of the ion channel formed by cytotoxin *Vibrio Cholerae*. Cytotoxins produced by some strains of *V. cholerae* EL Tor, and a majority of non-O1 strains are potential virulence factors (Yamamoto et al., 1984; Yamamoto et al., 1986). Cytotoxin *V. cholerae* EL Tor (VCC) is a water soluble protein with a molecular mass of 63 kDa, and forms small pores in the membrane of target cells (Zitser et al., 1993; Zitser et al., 1995).*

Fig. 3. The dependence of F^{cis} and F^{trans} on the hydrodynamic radii of nonelectrolytes. *Horizontal arrows indicate filling values for the cis (~ 0.3) and the trans (~ 0.1) vestibules of the VCC channel. Horizontal arrows indicate the values for filling of the cis (~ 0.3) and trans entrance (~ 0.1) VCC channel. Vertical arrows indicate the values of the radii at the critical points VCC channel.*

The solution contained 150 mM NaCl, 5 mM HEPES-NaOH, pH 6.5, 20% PEG. Each point is obtained by plotting the histograms of the distribution of channels amplitudes ($n = 80-150$) in the absence and presence of polymers.

In our experiments, we measured conductance of the channel in the solutions of non-electrolytes in contact with the *cis* or *trans* entrance of the channel, while the non-penetrating non-electrolyte (PEG2000) is on the opposite side of the channel.

For exact values of the radii of the channel entrances and examining its internal geometry, we analyzed the dependence of the parameter of channel filling $F(w)$ on the hydrodynamic radius of non-electrolytes (Fig. 3). After the detailed analysis of these results, we proposed a model VCC channel (Fig. 4). This model,

68

of course, is simplified, but basically it is consistent with the data of electron microscopy, which also assumed a funnel-like channel structure (Zitser et al., 1997).

Fig. 4. An inside view on the VCC1 channel lumen and possible channel localization in membrane. *The stretched constriction (diameter ≤ 1.2 nm) is appeared from ≈ 6.5 nm to ≈ 11*



nm of the channel length. Channel localization in membrane was deduced based on the similarity between ion channels formed by VCC1 and VCC2 (Krasilnikov et al., 1992; Zitzer et al., 1995).

Determination of the intrinsic geometry of VDAC in the open and closed state. Protein pores (ion channels) possess several properties such as conductance, selectivity and gating. There are growing indications that the electrical properties of single ion channels, called „gating“, are correlated with its structural modifications. All geometric models developed to describe this behavior can be roughly divided into two classes: „blocking“ and „rearrangement“. It appears that voltage dependent K^+ channels are a striking example of the first model of gating (Gulbis et al., 2000), while VDAC (Zimmerberg and Parsegian, 1986; Doring and Colombini, 1985) and gap junction (Unwin and Ennis, 1984) are representatives of the second model of gating.

Measurement of changes in the internal volume of the channel is very useful in distinguishing between these two classes of models. Therefore, we used the approach described above, which is based on the distribution of non-electrolytes, for measuring the changes in the internal structure of the VDAC channel formed by a porin from bovine muscles (Porin-31BM). To find the changes in the interior of the open channel and its low-conducting (closed) state, we applied two different potentials. To analyze the geometry of the lumen of the channel in a highly conducting (open) state, we applied relatively small potential of 10 mV and spectrum of channel conductance was collected. In order to analyze the channel lumen geometry in a low-conductance state, the bilayer was initially clamped at 10 mV. When a channel appeared, its conductance was measured and the potential was changed to 50 mV. This caused VDAC to switch to its low-conductance state.

Experiments were conducted with different PEGs according to the method similar to that described above, i.e. channel conductivity was measured when one side of the membrane was exposed to an impermeant PEG (PEG4600), and the other one – to a test PEG. The results obtained for the various channels in the same conditions were summarized in cumulative histograms and analyzed in the same manner as described above. The obtained channel conductances were used to calculate the Filling factor of the channels $F(w)$ for non-electrolytes using Equation 1. The results are shown in Fig. 5.

69

Fig. 5. The dependence of F^{cis} and F^{trans} , (obtained for VDAC-channels in fully open state) on the hydrodynamic radii of PEGs. Vertical arrows indicate the radii values at critical points of VDAC-channel. On BLM

was fixed +10mV. The solution contained: 1.15 M KCl, 5 mM HEPES, pH 7, 20% PEG. Each point is obtained by plotting histograms of the distribution channel amplitudes ($n = 70-140$) in the absence and presence of polymers.

When the channel is filled from its *cis* side, adding smaller PEGs (at PEG hydrodynamic radii of 0.94 to 0.8 nm) leads to a sharp increase in F . Hence, from the *cis* opening, the channel lumen appears to be a cylinder with a radius of ~ 0.9 to 1.0 nm. However, if this cylinder is the narrowest part of the VDAC channel, the method used here cannot reveal the structural features of the channel behind this constriction. A further decrease in r , up to 0.6 nm, leads to an additional small increase in F^{cis} that continues to be much smaller than 1.

The *trans* filling experiments suggest that the *trans* side of VDAC lumen has a funnel-like geometry. A small part of the channel is filled when the hydrodynamic radius of PEG is less than 1.92 nm. The decrease in r leads to a smooth increase in F^{trans} which reaches ~ 0.2 for PEG1450 ($r = 1.05$ nm). A further decrease in r leads to a sharp increase in F . As noted above, such behavior of the $F - r$ dependence suggests that the *trans* opening of the channel lumen has a conic geometry with radius of about 2.0 nm at the opening tapering to $\sim 0.9 - 1.0$ nm (the size of the *cis* side of VDAC lumen) somewhere inside the channel.

We then examined the apparent radius of each opening of the channel in low conductance state in the presence of differently sized PEGs in the *cis* (g_c^{cis}) or in the *trans* (g_c^{trans}) side of the channel. As for the fully open state, small PEGs considerably decreased the conductance of the „closed“ states of VDAC. Increasing the hydrodynamic radius of PEG caused the VDAC conductance to increase until a new steady-state value was reached at PEG1000 ($r = 0.94$ nm) for g_c^{cis} and at PEG2000 ($r = 1.22$ nm) for g_c^{trans} . These results suggest that the *trans* opening of the VDAC channel is wider than the *cis* opening at both the low and high conductance states. However, in the low conductance state, the difference between the two pore opening sizes is much smaller. The apparent value for the radius of VDAC *cis* opening in low conductance state, (~ 0.9 nm), obtained from $F_c^{cis} - r$ dependence (open squares in Fig. 6), is almost similar to that determined for this opening in the high conductance state (~ 1.0 nm, fig. 5). We conclude that the size of the *cis* opening of the Porin 31BM channel undergoes a weak (if any) alteration during the transition between the two conductance states.

Fig. 6. The dependence of F^{cis} and F^{trans} , (obtained for

VDAC-channels in low conductance state on the hydrodynamic radii of PEGs.

Vertical arrows indicate the radii values at critical points of VDAC-channel. Each point is obtained by plotting histograms of the distribution channel amplitudes ($n = 90-200$) in the absence and presence-polymers.

The *trans* F_c^{trans} - r relation for the closed state (filled squares in Fig. 6), however, is significantly different from that determined for the channel in the high conductance state (see Fig. 5), especially for polymer molecules with large hydrodynamic radii. When VDAC is in its low conductance state, molecules with r equal to and larger than 1.22 nm (PEG2000) are not able to fill the channel. The relation F_c^{trans} - r is more complex than the F_c^{cis} - r , and its decreasing part was fitted with two straight lines. The maximum radius of the *trans* opening of Porin 31BM channel in low conductance state was estimated to be ~ 1.2 nm. This value is considerably smaller than that for the channel in the high conductance state (~ 2.0 nm). Hence, the transition between the high and low conductance states is mainly accompanied by a change in the *trans* opening. In this state, the channel structure looks more cylindrical than it appears to be in its high conductance state. To establish the lengths of the cylindrical and funnel-like parts of VDAC channel in the low conductance state, the results were analyzed as the results obtained for the high conductance state. In this way, we found that the tentative lengths of the cylindrical and funnel-like parts are ~ 2.9 and ~ 1.7 nm, respectively. Cumulative results demonstrate that the main geometrical change takes place at the *trans* part of the channel during transition from high to low conductance state. Using our data on the geometry of the Porin-31BM channel and taking the length of the channel as 4.6 nm (Guo et al., 1995), the volume of the channel lumen can be calculated. We found it to be ~ 23.3 and ~ 13.3 nm³ for the high and the low conductance states, respectively. Hence, the volume change during channel transition between these two states is around 10 nm³.

From these data, the model depicted in Fig. 7 emerges as a geometrical representation of high and low conductance states of the Porin 31BM channel. In high conductance state, the radius of the cylindrical part is about 1.0 nm and the length is ~ 2.5 nm. The smaller radius of the conic portion is equal to the radius of the cylindrical part. The larger radius of the funnel (~ 2.0 nm) is observed at the *trans* opening of the channel. The length of this portion of the channel is estimated to be 2.1 nm. It appears that the channel transition to low conductance state is accompanied by a small decrease in the radius (from ~ 1.0 to ~ 0.9 nm) and an increase in

the length (from ~ 2.5 to ~ 2.9 nm) of the cylindrical part of the channel at the expense of the *trans* funnel-like part.



Fig. 7. An inside view on the VDAC channel lumen at high and low conductance states. *L* is the channel length starting from the cis entrance (0 nm) and ending at the trans entrance (4.6 nm). Dashed line represents the central axis of the lumen. Arrows and numbers indicate apparent diameters of the channel openings in high and low conductance states. Dotted lines with arrows indicate the starting point of the funnel part of the channel in high and low conductance states.

Differences in the biophysical properties between maxi-ion channel and VDAC.

The main reason for considering the maxi-anion channel as plasmalemmally expressed VDAC was that the two channels shared common biophysical properties. However, the similarity is very superficial and more detailed inspection of these properties under physiological conditions showed significant differences. For this purpose, we carried out experiments with VDAC (isolated from rat liver mitochondria) under conditions close to physiological. We reconstituted it into the BLM and found that the conductivity of single channels in normal Ringer's solution is approximately 530 pS. This value is about 30-70% higher than the conductivity of single-maxi anion channels (300-400 pS) in the same medium (Sabirov and Okada, 2009). At higher salt concentrations, the maxi-anion channel conductance is known to saturate at 580–640 pS with K_m of 77–120 mM (Hals et al., 1989; Hurnak and Zachar, 1994; Schlichter et al., 1990). Meanwhile, we recorded the single VDAC amplitude of 4100 pS in 1 M KCl, and it is well known that further increase in salt concentration leads to a linear increase in VDAC conductance up to the level of ~ 10 nS without any saturation (Colombini, 1986). Such an immense difference in channel behavior suggests a principally different mechanism of ionic transport in these two pores. This inference is supported by comparison of the ionic selectivity of these two channels. In many cell types, the maxi-anion channel exhibits superb discrimination for anions over cations. Poor selectivity of VDAC for glutamate over chloride ($P_{\text{glutamate}}/P_{\text{Cl}} = 0.45 \pm 0.03$) compared to much better discrimination with $P_{\text{glutamate}}/P_{\text{Cl}} \sim 0.2$ observed under the same experimental conditions for the maxi-anion channel confirms our conclusion on crucial differences in the interior of the two channels.

Voltage-dependent gating is yet another important property which is common

for the maxi-anion channel and VDAC. Both channels inactivated at positive and

72

negative voltages above app. ± 20 mV with time-constants of about 50-100 ms at +50 mV and 300-400 ms at -50 mV. However, an important difference is the degree of inactivation. While the maxi-anion channel closes completely, VDAC always retains a large portion (up to 40-50%) of its amplitude. The so-called "closed" state has preferential selectivity for cations (Colombini et al., 1996; Colombini, 2004).

The internal structure of these channels is also quite different. Thus, according to our data (Fig. 7), VDAC channel has a radius of *cis* entrance 1 nm and *trans* entrance 2 nm, while maxi-anion channel difference is much smaller: 1.16 nm and 1.42 nm radii *cis* and *trans* input respectively (Sabirov and Okada, 2004).

Based on the above considerations, we conclude that maxi-anion channel and VDAC are unrelated proteins. However, this conclusion by no means rejects the possibility of the plasmalemmal VDAC expression itself.

In the fourth chapter, **"The study ion-conductive properties and structure of the nanopore by cysteine-scanning mutagenesis"**, presents data obtained by cysteine-scanning mutagenesis.

Ion channels are an ideal model system for the study of nanopores because they self-assemble and their structures can be altered using molecular biological techniques. For example, site-directed mutagenesis can be used to change the number and location of fixed charges inside the channel and/or near the pore entrances. The effects of such changes to the channel structure are generally reflected in the ion selectivity and the shape of the *G-V* relationship (Noskov et al., 2004; Jordan, 2005). To learn more about how charged amino acid side chains control the properties of ion channels, we studied the conducting properties of the channel formed by α -HL and genetically engineered mutants.

Our objective here was to determine the significance of the type and location of fixed charges for the selectivity, conductance (*G*) and *G-V* dependence of the α -HL channel. Because the primary sequence of wild-type α -HL has no cysteines, we produced a number of point cysteine mutants and determined their effects on the conducting properties of the α -HL channel. We subsequently chemically modified these novel cysteine side chains with water-soluble sulfhydryl-specific reagents. Mutants containing cysteine were divided into two groups according to their position in the β -cylinder stem region into even and odd.

In order to modify, in a controlled manner, the electrostatic channel profile, we used reagents which react with sulfhydryl groups of cysteine and introduce a positive or negative charge in its side chain. The reaction of these reagents with a reduced cysteine side chain converts the -SH group to -SS-R, where R is the charged moiety: -CH₂CH₂SO₃⁻(MTSES), -CH₂CH₂N(CH₃)₃⁺(MTSET).

Addition of negative charges inside the channel region of the stem in the case of odd amino acids increased the asymmetry, and the addition of positive charge reduced the asymmetry. Furthermore, the impact of these new charges depended on the position of a cysteine residue to be modified within the channel (Fig. 8). Mu

tants with even numbers, except for G130C, were inaccessible to reagents in the preformed channels. Effect of added charges on the cation-anion selectivity of

73

channels shown in Fig. 9. In these experiments, the preliminarily reconstituted in a lipid membrane channels were subjected to the action of sulfhydryl reagents. The effectiveness of the novel charges was dependent on their location along the channel axis. Relatively weak effects were found for charges located close to the channel opening. The effect of charges increased with distance, and, at a distance of 1 nm to 1.5 nm from the *trans* opening, V_{rev} was maximal at $\sim +21$ mV (MTSET) or at -24 mV (MTSES), with relative permeability relationship $P_K/P_{Cl} \sim 0.001$ and ~ 170 , respectively. These values are close to the Nernst potentials ($\sim +22$ mV and ~ -25 mV for Cl and K^+ , respectively). Note that the wild-type α -HL channel was weakly anion-selective with $V_{rev} \sim +7.6$ mV and $P_K/P_{Cl} \sim 0.46$. Thus, the derivatized α -HL channels are highly selective for anions or cations depending on the sign of the introduced charge. Charges located further in the pore interior

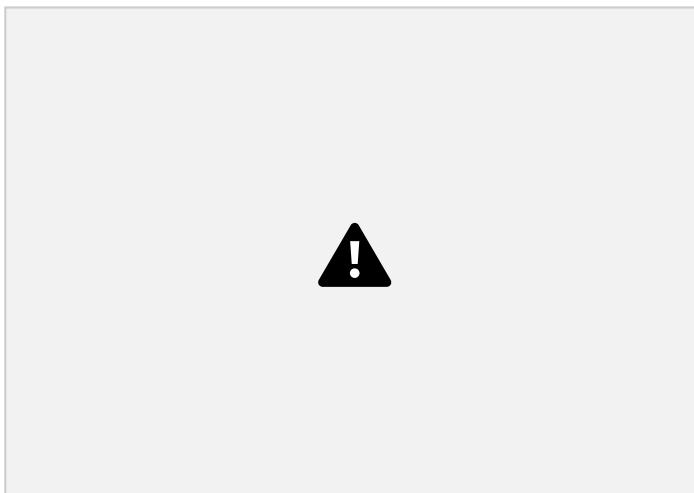
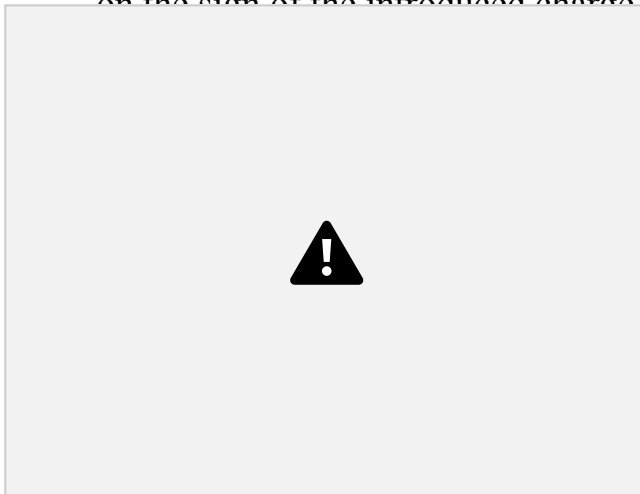


Fig. 8. The effect of sulfhydryl reagents on the α -HL cysteine mutant channel rectification. *The sequence of mutants from left to right is T129C, G130C, K131C, D127C, G133C, L135C, G137C, N121C, N139C, S141C, and G143C. The distance from the trans pore entrance.*

Fig. 9. Effects of sulfhydryl reagents on the reversal potential of channels formed by single cysteine α -HL mutants. *The membrane is bathed by 100 mM and 300 mM KCl aqueous solution on the trans and cis sides, respectively, and all solutions contained 30 mM Tris HCl, pH 7.5. Mutant sequence is the same as in Fig. 8.*

The position of the novel charge affects V_{rev} and the asymmetry of G - V curves

differently. After an initial increase, V_{rev} remains large and nearly constant (Fig. 9). In contrast, the change in the asymmetry vanishes quickly with distance from the *trans* pore entrance (Fig. 8). The results suggest that the net (integrated) charge is responsible for cation-anion selectivity of the α -HL channel whereas the balance of charges between the openings is crucial for determining the G - V curves.

74

The new method of determining the stoichiometry of oligomeric nanopores.

For many years, α -HL channel has been considered to consist of six monomers, as electron-microscopic studies mainly testified in favor of the hexamer structures (Olofsson et al., 1988; Hebert et al., 1992). However, X-ray crystallography studies in combination with chemical modification have shown that, most likely, α HL channel is a heptamer (Gouaux et al., 1994). Data obtained with atomic force microscopy have been somewhat contradictory, however. Thus, whereas the heptamer model was confirmed in one study (Fang et al., 1997), results from another investigation (Czajkowsky et al., 1998) favored dominance of toxin hexamers in lipid bilayers. Therefore, we attempted to develop a new method to determine the stoichiometry of the ion channels under conditions as close to physiological as possible. The grounds of this method are based on the experimental observation that the interaction of sulfhydryl-specific reagent, DTNB, with cysteine mutant α HL does not occur on the principle of "all or nothing", as observed for diphtheria toxin (Mindell et al., 1994; Huynh et al., 1997), but rather happens in steps (Fig. 10) which reflect the sequential modification of the cysteine residues in a single oligomeric channel molecules. Time intervals between the steps varied from channel to channel, reflecting the stochastic nature of the process. The maximum number of steps in the gradually decreasing channel conductivity observed under the action of DTNB was equal to seven, and this was observed in 25% of the total number of 38 modified channels.



Fig. 10. Change in the conductivity of the mutant channels I7C, induced by DTNB. *Action of DTNB on a single channel. The solutions in both compartments of the cell contained 100 mM KCl, 1 mM EDTA and 30 mM Tris-HCl, pH 7.5.*

The number of steps observed in other cases ranged from four to six. The

mean magnitude of the changes in conductance produced by the reagent was 6.5 ± 1.6 pS (mean of 149 events at -100 mV fixed). The steps are not expected to be identical in each experiment because there are several ways in which subunits can be permuted about the multiple-fold axis in heteromeric pores (Braha et al., 1997). However, the first and the last steps are between defined states and should be more homogeneous. To test this prediction, the amplitudes of the individual steps were analyzed consecutively for all channels in which seven downward steps

75

were observed. Indeed, there was a bell-shaped dependence of standard deviation on the step sequence. In accordance with prediction, the maximal standard deviation was observed for the steps # 3-5, whereas steps 1 and 7 showed the smallest deviations. Thus, the seven-step reduction of the conductivity of single channel in our experimental system unequivocally identifies the α -HL channel as the heparin channel.

In the fifth chapter, **"The Effects of polyanions on the alpha-HL channel"**, described the effect of polyanions on the conductivity of α -HL channel. Glycosaminoglycans, structurally heterogeneous polyanions (PAs), are known to contribute to a wide range of physiological processes including recognition, adhesion, membrane transport, anti-bacterial defense. They interact with phosphatidylcholine in the presence of Ca^{2+} (Vannucchi et al., 1985) and are implicated in ion channel and receptor regulation (Van et al., 2006; Suppiramaniam et al., 2006). Moreover, there are reports indicating a size-dependent interaction of PAs with ion channels and membranes (Chicoine et al., 2004). However, the detailed mechanism of PA influence on ion channel function is poorly understood. To address this issue, we studied the effects of two types of differently sized PAs on the ionic conductance of a mesoscopic ion channel formed by α -HL in planar lipid bilayer membranes, and the dependence of their activities on the composition of the medium.

When α -HL-modified membrane clamped at certain voltage, the current instantaneously increases as the increased voltage drives ions through the channels, and then the current diminishes as the channels transitioned to lower conductance states. If buffer (pH 7.5) does not contain neither heparin nor Ca^{2+} , application of 100 mV-voltage pulses of either sign to the *cis* compartment failed to induce significant channel closure. Heparin alone added to solutions on both sides of the bilayer had no detectable effect. Only when CaCl_2 was also added, there were noteworthy current relaxations observed in response to voltage pulses. Other divalent cations were employed to examine the ionic specificity of heparin effect on voltage-dependent gating of ST channels. When Mg^{2+} and Zn^{2+} were used (Fig. 11), heparin exhibited effects that were qualitatively same as those seen in the presence of Ca^{2+} . The only difference observed was the efficiency with which different ions facilitated the transition. The efficiency follows the sequence $\text{Zn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$, identical to that observed for inhibition of the effects of ST on cells (Bashford et al., 1986; Bashford et al., 1988).

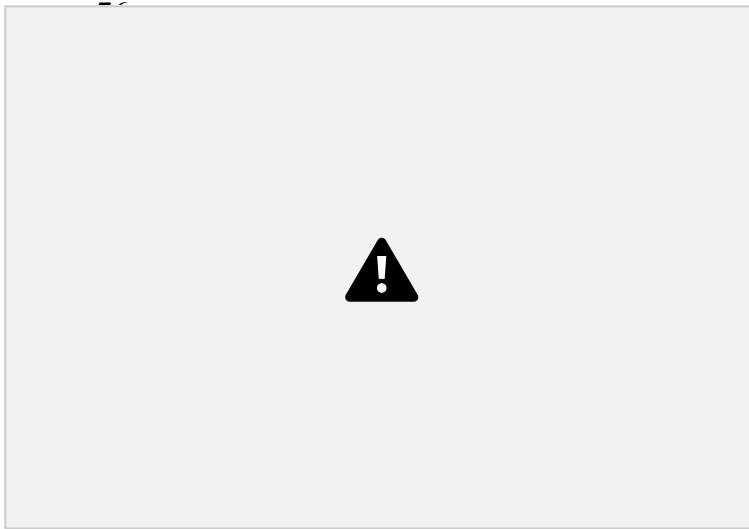


Fig. 11. Dependence of the relaxation time of the conduction (τ) on the concentration of divalent cations. *Chlorides of divalent cations were added (at the concentrations indicated on the horizontal axis) to both compartments simultaneously. The solution contained 100 mM KCl, 6 mg/ml heparin and 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, $n=3-5$.*

To clarify the mechanism of PA effects on α -HL channels, experiments with differently sized heparins and dextran sulfates (DS) were performed. All PAs used demonstrated potent inhibitory activities against α -HL channel. In these experiments, we used a heparin-albumin (HepAlb, 4.8 heparin molecules linked to one molecule of bovine serum albumin); heparins with average molecular weight 18000 g/mol (as Na-salts), (Hep); 6000 g/mol (Hep6000); 3000 g/mol (Hep3000); heparin disaccharides of molecular weight of 563 g/mol (HepDi); DS with an average molecular weight of 500,000 g/mol (DS500); 10000 g/mol (DS10); 5000 g/mol (DS5). The ability of heparins to block the channel depended on the side of the membrane to which they were added, and the effect increased with increasing their concentration and size (Fig. 12).



Fig. 12. Influence of PA on α -HL

channel current relaxation time constant. *Relaxation time constants for the α -HL channel blockage are plotted as a function of heparin's concentration in the (A) cis or (B) trans compartment of the chamber. Solid line, best-fit of a one-site-binding equation, $n=3-5$.*

The smallest heparin, HepDi, virtually had no effect on α -HL channel even at a concentration of 2 mg/ml. Thus, despite the smaller diffusion coefficients, large PA cause more effective and faster relaxation of currents. Heparins used in the present study could be ranked as follows (in order of effectiveness): HepAlb> Hep> Hep6000> Hep3000 >> HepDi.

77

DS also caused the α -HL channel current decrease. The effectiveness of DS species increases with their size: the IC_{50} values were 220.0 ± 30.0 mg/mL (DS5), 7.2 ± 1.5 mg/mL (DS10), and 1.7 ± 0.3 mg/mL (DS500). DS have a larger negative charge density than the heparins, but they were significantly less effective against the α -HL channel. The difference between PAs topologies most likely accounts for this result.

PA appears to enter and occlude the α -HL channel. However, the question of why the larger molecular weight PA is more effective at reducing the channel conductance (Fig. 12) remains unclear. It is known that phospholipids, including PC, interact with PA (Sagrista et al., 2000; Huster et al., 1999). Binding PA with phospholipids does not occur in the absence of divalent cations. These cations form

bridges between negatively charged phosphate groups of the phospholipids and the sulfate groups on PA (Huster et al., 1999). Moreover, the data suggest that PA, and heparins in particular, continue to possess a negative net charge even in 100 mM Ca^{2+} solution. Because heparins also require the presence of divalent cations in the bulk to affect the channel, we considered the possibility that heparins bind to the membrane, in agreement with the calcium-bridge mechanism suggested in (Huster and Arnold, 1998; Huster et al., 1999).

Polyanion-binding to liposomes confers them a negative ζ -potential. To verify whether the same is true for heparins and to quantify the binding of these PAs to the membrane, we measured the ζ -potential of PC liposomes in the absence and presence of differently sized heparins. We found that heparins decreased the PC liposome ζ -potential from slightly positive value (in the absence of PA) up to ~ -24 mV (Fig. 13A). The larger heparins were more effective. The dependence of liposome ζ -potential (Fig. 13A) on heparin concentration resembles that for heparin-induced α -HL channel current blockade (Fig. 12). There is a strong correlation between the effectiveness of heparins (presented as the IC_{50}) in these two systems (Fig. 13B).



Fig. 13. ζ -Potential of liposomes in the presence of growing concentrations of heparins (A) and the correlation between equi-effective concentration of heparins against liposomes and α -HL channels (B). $n=3-5$.

These results suggest that the binding of PA with the membrane might account for the strong dependence of the channel blockade on PA molecular weight. It appears that at the first step of PA-ion channel interaction, PA binds to membrane via Ca^{2+} -bridges, resulting in higher local concentrations on and near the membrane and thus around the α -HL pore entrance area. This proximity to the pore entrance increases the probability that, at the right polarity, the pore ion flux would be inhibited by the polyanion. The steady-state polyanion concentration decreases nonlinearly (Peitzsch et al., 1995) with distance from the surface, down to their bulk value. As a result, at the same bulk concentration, the effective steady-state polyanion concentration should be much higher at the *trans* (which is closer to the membrane surface) than *cis* (which is far from the membrane surface) entrance of the channel. The latter clarifies how the difference in the distance between the membrane surface and the entrances of the channel may determine the sidedness in PA effectiveness. Unbound polymer can occasionally approach the channel entrance by diffusion and then (at the second step of PA/ion channel interaction) enter the pore in a voltage-dependent manner and block it.

In the sixth chapter "**Investigation of elastic deformation α -HL channel**" presents data obtained with blocking α -HL channel charged crown / K^+ complex. Geometrical features of the channel lumen in the fully open state are usually assumed to be voltage-independent. Although this assumption generally works, it is desirable to realize its limitations. Voltage-induced elastic deformations may manifest themselves in the changes of the channel transport properties that are particularly important in the case of molecules with a close fit to the channel pore dimensions. It is clear that channels with a profound non-linearity of their current voltage characteristics are likely candidates for the electrostriction effects, though the non-linearity *per se* does not necessarily mean electrostriction. To approach this problem, one needs a single ion channel with a well-known structure and appropriate molecular tools. For this purpose, we chose the channel formed by α -HL and a representative of a large family of crown ethers, 1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctane (18-crown-6), as a tool to evaluate a possible change in the α -HL pore because its molecular size (~ 1.15 nm in diameter) is very close to the size of the narrowest part of the α -HL pore (diameter of ~ 1.2 nm). Fig. 14 shows that at 4 M KCl, for symmetric crown application, the major blockage is observed when the applied voltage was close to -70 mV. Blocking effect was very asymmetric. When the crown is present in the *trans* compartment only, the effect is practically indistinguishable from symmetrical addition. In contrast, the presence of the crown on the *cis* side was felt only slightly and only at high positive potentials (data not shown). This behavior indicates that the blockage was due to the charged crown/ K^+ complexes, which easily reach the binding site from the *trans* side. The complex is driven onto the binding site by the applied potential most of which drops in the area of the channel stem.

Fig. 15 gives the voltage dependence of the probability that the binding site is

not occupied by the crown for 4 M KCl solutions. The probability was calculated as $p_{i_n} = 1 - \Delta / \Delta_i$, where Δ_i is the crown-induced change in the average current

79

through the channel and Δ_i is the reduction of the “instantaneous” current induced



Fig. 14. Effect of symmetrical (to both sides of the membrane) addition of the crown to 4 M KCl membrane-bathing solutions on α -HL channel conductance.
Result of typical experiment with the same single channel is presented.

We applied the Woodhull model (Woodhull, 1973; Hille, 1992) in its generalized form (Tikhonov and Magazanik, 1998) to analyze the voltage dependence of the crown block. Some of the main requirements for the validity of this approach are that the blockage of the conductance by a reagent is not a result of cooperative allosteric effects of changing protein conformation and that the blocking molecules are independent from each other, except for their competition for the same binding site. The data presented in (Bezrukov et al., 2004) and our own results suggest that the data in Fig. 15 are in perfect agreement with these requirements.



Fig. 15. Probability that the channel is “not blocked” by the crown as a function of applied voltage at three crown concentrations.
Dashed lines are best fits by the Woodhull model (in its generalized form) for a blocker carrying a single elementary charge, Eq. (2). Solid lines are best fits of a modified model that included the elastic deformation. $n=3-5$.

The restriction imposed by equilibrium thermodynamics on the rate constants

(⁰₂

ϕ_1

k_0 , where subscript 0 refers to zero applied voltage) is known as micro

$\phi_2 = -$

scopic reversibility and local equilibrium. Because of this restriction, in the case of symmetrical application of a blocker carrying a single elementary charge, the probability that channel is not blocked can be described as a function of dimensionless voltage ψ and potential, e – the elementary

charge, k – the Boltzmann constant, T – the absolute temperature):

80

ϕ_0

(ϕ_0)

$\exp(\phi_0)$

$\delta \psi \delta \delta \delta \psi$

$++-$

A

$m m t c$

$P_{++-+++-}$

$= (2)^{0000}$

$(\delta \delta \delta \psi)(\delta \psi)(\delta \delta \delta \psi)$

$B A B A$

$\exp(\phi_0) \exp(\phi_0)$

$c t m m m t c$

$\exp((\delta \delta \delta \psi) \psi) C b_{2 c m}$

$k_- = - \phi_1$

$k_+ = - \phi_1$

where $(\delta \psi) C b_t$

$k_- = - \phi_1, \exp((\delta \delta \delta \psi) \psi) b_{2 m c}$

$k_+ = \phi_1 \exp(- \phi_1), \exp((\delta \delta \delta \psi) \psi) b_{1 m t}$

$\phi_0 = - A k k, \phi_1$

$\phi_0 = - B C k k, b_i$ is voltage independent con

ϕ_2

ϕ_1

stant; δ_c , δ_m and δ_t are fractions of the membrane field which correspond to the location of the *Cis* barrier, energy minimum and the *Trans* barrier; C is the blocker concentration, same on both sides of the channel.

Taking into consideration the inner channel geometry, data published by others (Howorka and Bayley, 2002) and our own estimation, the location of the *cis* barrier, δ_c , was taken to be equal to 0.8. If the *Trans* barrier location (δ_t) was allowed to be free, it take unrealistic negative values. Therefore, we need to assume δ_t to be equal to zero by placing the barrier exactly at the *Trans* opening. As a result, this function contains only three free parameters: δ_m , a fraction of transmembrane potential that is assumed to be felt by the blocker molecule, A , and B .

The best fit of Eq. (2) to the data in Fig. 15 is shown by dashed lines. It is seen that the theoretical curves do not accurately describe the experimental points. Relatively large error bars at small and positive voltages do not jeopardize this conclusion. To obtain better agreement with the model, one has to accept one (or both) of the two assumptions: (i) the charge of the crown/ K^+ complex is larger than one; (ii) the applied field introduces structural deformations of the pore interior thus changing the crown-pore interactions in a way that is not accounted for by Eq. (2). To choose between these two assumptions, we first note that it is firmly established that a 1:1 complex is formed between the crown and potassium ion (Rounaghi et al, 1977), so that assuming one elementary charge per blocker molecule is well justified. Moreover, the data in Fig. 15 represent rather small crown concentrations. Therefore, the first explanation can be safely ruled out. The second possibility is to assume that the negative voltage reduces the barrier for the crown exit to the *cis* side of the channel by increasing the size of the “geometric bottle neck”. Indeed, if the radius of the constriction is exactly equal to or smaller than the radius of the crown, the barrier is infinite and crown molecules can not cross the channel. As the constriction radius is increased by negative voltages, the height of the barrier quickly decreases thus allowing crowns to exit the channel from the *cis* side. In this modification of the model, parameter B is constant, but parameter A is now a function of voltage, increasing towards negative voltages. As one of the possibilities to describe the depth and/or the barrier variation with the applied voltage, we choose the energy of van der Waals interactions between the crown/ K^+ complex and the pore wall. Then, we express the radius-dependent interaction through the known constants of Lennard-Jones potential for hydrogen-hydrogen pairs (Allen and Tildesley, 1989). Assuming realistic dependences of the constriction radius on voltage that are qualitatively compatible with the channel conductance change, we arrive at a reasonable agreement between the model predic-

81

tion and experiment. Using this approach, we found that the only assumption about the barrier variation allows to correlate the binding site with the narrowest part of the channel pore ($\delta_m \sim 0.7$) and that a very small (~ 0.08 nm) field-induced elastic change in the radius of this part of the channel is able to change the energy of binding by a couple of kT 's and to remove the discrepancies between the model predictions and the experiment. The curves accounting for such changes in the crown-pore interactions are shown in Fig. 15 as solid lines. In fact, the actual value for the voltage-induced increase in the radius depends on the approximation that one uses for van der Waals forces. For example, it was shown (Parsegian and Weiss, 1974; Parsegian, 2005) that for “cylinder in a cylinder” or “sphere in a sphere” geometry the attractive term of the interaction can be expressed as the inverse second power of the separation. Assuming this dependence, we can obtain larger radius changes. So, our hypothesis on the role of electrostriction in the α -HL transport properties allows us to explain the observations on voltage-dependence of both the asymmetry of the residual conduction and blocking by the crown (Fig. 15) in a unified manner. In both cases, the supposed elastic changes in the ion channel

structure are gradual, continuous, and proportional to the applied force. This is principally different from the well-known “gating” where the field-induced conformational changes are discrete and frequently mentioned as “all or none” processes. In our study, we assumed that the apparent change in the pore radius under the applied electric field is the result of local electrostriction. We can suggest a possible mechanistic model of the elastic deformation at the constriction zone of α -HL channel where Lys147 could be displaced under voltage thus increasing the channel diameter at this position and facilitating the crown exit when a negative voltage is applied on the *cis* side or decreasing the channel diameter and make the crown transport difficult when a positive sign of voltage is applied. Certainly, this is only a mechanistic model. Nevertheless, these estimates show that the electrostriction hypothesis put forward is plausible.

CONCLUSIONS

1. Using the modified method of polymer probing, it was shown for the first time that:

a) the diameters of the two entrances of the α -HL channel are close to each other and equal to 2.6-2.4 nm (*cis/trans*); the channel has two narrow portion: the main constriction has a diameter of 1.3 nm and is located approximately in the center of the channel, whereas the second one has a diameter of 1.8 nm and is located closer to the *cis* entrance of the pore;

b) the diameter of the *cis* entrance of VCC channel is 1.9 nm, and that of the *trans* entrance is 1.6 nm; there is a constriction inside the channel with a diameter of 1.2 nm;

c) the diameters of the *cis* and *trans* entrance of VDAC ion channel in its high-conductance state are 2.0 nm and 4.0 nm, respectively. Upon transition to the low-conductance state, the diameters of both entrances decrease and become equal