

**МОСКОВСКИЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА,
ОРДЕНА ОКТЯБРЬСКОЙ РЕВОЛЮЦИИ
И ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ им. М.В. ЛОМОНОСОВА**

Биологический факультет

на правах рукописи

ГОСТИМСКАЯ Ирина Сергеевна

**NADH:УБИХИНОН-ОКСИДОРЕДУКТАЗА МИТОХОНДРИЙ:
АЛАМЕТИЦИН КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
ВНУТРИМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ
И ТОПОГРАФИЯ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫХ SH-ГРУПП КОМПЛЕКСА I**

03.00.04 – биологическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2007

Работа выполнена на кафедре биохимии биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор биологических наук
профессор А.Д. Виноградов

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
профессор Р.А. Звягильская
кандидат биологических наук
А.В. Богачев

Ведущая организация: Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино

Защита диссертации состоится 26 марта в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д501.001.71 Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова по адресу 119992, Москва, Воробьевы горы, Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, аудитория ББА.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

М.В. Медведева

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение ферментов внутренней мембраны и матрикса интактных митохондрий сильно осложнено существованием барьеров проницаемости для добавленных извне реагентов (субстратов, ингибиторов, возможных регуляторов). Указанную трудность обычно преодолевают, используя один из следующих методических приемов. Обработка митохондрий ультразвуком приводит к образованию «вывернутых» («inside-out») фрагментов внутренней мембраны митохондрий (так называемые субмитохондриальные частицы – СМЧ), где активные центры Комплексов I, II и F_0F_1 -АТФазы оказываются непосредственно доступными для субстратов. Мембраны можно также разрушить многократным замораживанием и оттаиванием интактных митохондрий. Наконец, использование поверхностно-активных веществ (детергентов) позволяет солиubilизировать мембраны и получить высокоочищенные гомогенно-дисперсные препараты, для которых проблемы проницаемости не существует. Следует, однако, иметь в виду, что каталитические и регуляторные свойства этих ферментов в интактных митохондриях могут отличаться от тех, которые хорошо изучены с использованием препарата «вывернутых» СМЧ или очищенных препаратов (вследствие изменения естественного фосфолипидного окружения, потери белков и/или низкомолекулярных компонентов матрикса, специфического или неспецифического влияния детергентов). В связи с этим представляется актуальным найти способ измерения активности внутримитохондриальных ферментов в интактных митохондриях.

В течение многих лет наша группа занимается изучением каталитических и регуляторных свойств митохондриальной NADH:убихинон-оксидоредуктазы (Комплекс I дыхательной цепи). Один из результатов наших исследований – обнаружение и характеристика существования фермента в двух медленно взаимопревращающихся формах (A – активная, D – деактивированная формы фермента). Молекулярный механизм этого превращения ($A \leftrightarrow D$ -переход) неизвестен. Переход комплекса в D-форму (каталитически неактивную) сопровождается появлением чувствительности фермента к SH-реагентам. Можно предположить, что реакционноспособная SH-группа (A/D-SH) является мишенью для регуляторного воздействия на фермент природных соединений. В связи с этим установление локализации этой SH-группы Комплекса I в интактных митохондриях (матрикс или межмембранное пространство) – актуальная задача исследования фермента.

Сокращения: СМЧ – субмитохондриальные частицы, $A \leftrightarrow D$ -переход – переход фермента между двумя формами (активной и деактивированной), A/D-SH – SH-группа, чувствительная к $A \leftrightarrow D$ -переходу, NEM – N-этилмалеимид, ДТНБ – 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), ДТНП – (2,2'-дитиобис-(5-нитропиридин).

Цель работы: 1) разработать простой способ измерения активности и характеристики свойств Комплекса I в «интактных» митохондриях; 2) установить локализацию и выяснить реакционную способность SH-группы одной из форм Комплекса I.

Научная новизна работы. Изучено влияние каналообразующего антибиотика аламетицина на активности внутримитохондриальных ферментов и показано, что его использование позволяет количественно изучать активности Комплекса I и других ферментов в «интактных» митохондриях.

Использование аламетицина в качестве инструмента позволило установить, что реакционноспособная SH-группа Комплекса I локализована на матриксной стороне внутренней мембраны митохондрий. Получены сведения об относительной реакционной способности этой группы по отношению к различным SH-реагентам.

Практическое значение работы. В результате проделанной работы показано, что препарат сопряженных митохондрий после обработки аламетицином сохраняет структуру двух замкнутых мембран (внешней и внутренней), а также белковый состав матрикса. Таким образом, использование аламетицина позволяет проводить измерения активностей внутримитохондриальных ферментов в нативном окружении при полном или, по крайней мере, частичном сохранении специфических белок-белковых и белок-мембранных взаимодействий. Предложенный нами метод используется в нашей и в ряде зарубежных лабораторий для количественного измерения активности внутримитохондриальных ферментов.

При изучении активности Комплекса I дыхательной цепи в составе нативных митохондрий обработка аламетицином дает возможность освободиться от эндогенных пиридиннуклеотидов и изучать $A \leftrightarrow D$ -переход фермента в отсутствие восстановленных NADH и NADPH. Такой препарат становится удобным объектом для изучения регуляторных свойств Комплекса I в его естественном белковом окружении.

Установление локализации реакционноспособной SH-группы в составе Комплекса I на внутренней стороне внутренней митохондриальной мембраны позволяет предположить существование матриксных регуляторов активности фермента.

Апробация работы. Результаты работы были доложены на заседании кафедры биохимии Биологического факультета МГУ, конференции Mitochondria 2001 Meeting, (San Diego, California, 2001), 13-ой Европейской Конференции по Биоэнергетике (EBEC, Pisa, Italy, 2004) и на международной конференции «Российская биоэнергетика: от молекул к клетке» (Москва, МГУ, 2005 г.).

Публикации. Результаты исследования опубликованы в 2 статьях и 3 тезисах научных докладов.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа содержит 97 страниц машинописного текста, 4 таблицы и 15 рисунков. Список литературы включает 114 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препарат митохондрий сердца крысы получали по модифицированной методике Джекобуса и Сакса [Jacobus and Saks, 1982].

Препарат субмитохондриальных частиц (СМЧ) получали из митохондрий сердца быка по методу, описанному ранее [Kotlyar and Vinogradov, 1990].

Для активации препарата 20 мл суспензии СМЧ (10 мг белка/мл) в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 20 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 0,2 мМ ЭДТА и 0,5 мМ малонат, инкубировали с 1 мМ NADPH и олигомицином (0,5 мкг/мл) в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого суспензию пропускали через колонку с сефадексом *G-50 (грубый)* для удаления NADPH. Суспензию, сошедшую с колонки, центрифугировали 30 мин при 30 000 g (4°C), затем осадок суспендировали в той же среде, что и при нанесении на колонку, в объёме ~0,5 мл [Burbayev et al., 1989, с модификациями]. Препарат хранили в жидком азоте.

NADH-оксидазную активность измеряли на спектрофотометре *Hitachi 557* при длине волны $\lambda=340$ или 380 нм (если концентрация нуклеотида была >150 мкМ) по убыли NADH. Среда измерения содержала 0,25 М сахарозу, 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 0,2 мМ ЭДТА и ~100 мкМ NADH (стандартные условия), в случае не обработанных заранее аламетицином митохондрий среда содержала также 2,5 мМ MgCl₂ и 40 мкг/мл аламетицина.

NADH:Q₁-редуктазную активность измеряли на спектрофотометре *Hitachi 557* при $\lambda=340$ нм по убыли NADH. Среда измерения содержала 0,25 М сахарозу, 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 0,2 мМ ЭДТА, 5 мМ NaN₃, 100 мкМ Q₁ и 100 мкМ NADH. В случае СМЧ среда содержала также 0,2 мкг/мл грамицидина D, а в случае митохондрий – 2,5 мМ MgCl₂ и 40 мкг/мл аламетицина. Реакцию начинали добавлением СМЧ или митохондрий соответственно.

Суццинат-оксидазную активность измеряли амперометрически по убыли O₂ в кювете с помощью электрода Кларка. Среда измерения содержала 0,3 М сахарозу, 10

мМ HEPES (pH 7,4), 0,2 мМ ЭДТА, 5 мкМ ротенон. Реакцию начинали внесением 10 мМ сукцината.

АТРазную активность измеряли по количеству высвобождаемых в среду протонов по изменению окраски индикатора фенолового красного при 557-620 нм [Chance and Nishimura, 1967]. Среда измерения содержала 0,25 М сахарозу, 100 мМ KCl, 5 мМ HEPES, 0,1 мМ ЭДТА-К⁺ (pH 7,4), 2 мМ MgCl₂, 2 мМ АТФ и 30 мкМ индикатор.

Изоцитратдегидрогеназную (ИЦДГ) реакцию измеряли на спектрофотометре Hitachi 557 при длине волны $\lambda=340$ нм по появлению NADPH. Среда измерения содержала 0,25 М сахарозу, 50 мМ Трис-НСl (pH 7,5), 0,2 мМ ЭДТА-К⁺, 1 μ М ротенон, 2,5 мМ MgCl₂, 40 мкг/мл аламетицина, 10 мМ D,L-изоцитрат и 5 мМ NADP⁺. Реакцию начинали добавлением митохондрий.

Аконитазную реакцию регистрировали на спектрофотометре Hitachi 557 при длине волны $\lambda=340$ нм по прибыли NADPH. Среда измерения содержала 0,25 М сахарозу, 50 мМ Трис-НСl (pH 7,5), 0,2 мМ ЭДТА-К⁺, 1 μ М ротенон, 2,5 мМ MgCl₂, 40 мкг/мл аламетицина, 10 мМ цитрат и 5 мМ NADP⁺. Реакцию начинали добавлением митохондрий, полагая, что эндогенная ИЦДГ окисляет образующийся в аконитазной реакции изоцитрат.

Малат/глутамат-оксидазную реакцию измеряли с помощью полярографа и кислородного электрода Кларка. Среда измерения активности содержала 0,25 М сахарозу, 10 мМ KCl, 5 мМ К⁺-фосфат (pH 7,0), 0,2 мМ ЭДТА, в полярографическую кювету вносили 200-500 мкг/мл митохондрий, 5 мМ глутамат и 5 мМ малат (состояние 4 по Чансу), а затем 200 мкМ ADP и регистрировали скорость дыхания в состоянии 3 .

Подготовка препарата митохондрий для электронной микроскопии.

Митохондрии, выделенные из сердец 2-х крыс, суспендировали в 400 мкл среды выделения, содержащей 0,3 М сахарозу, 50 мМ HEPES-КОН (pH 8,0), 0,2 мМ ЭДТА и 1 мг/мл БСА. Полученную суспензию разделяли на 2 равные части, а затем разводили той же средой в 5 раз. Первый препарат был контрольным, а ко второму препарату добавляли аламетицин и раствор MgCl₂ до концентраций 40 мкг/мл и 2,5 мМ соответственно. Препараты инкубировали 5 мин при комнатной температуре, после чего фиксировали глутаровым альдегидом, а затем осмиевой кислотой. После этого оба препарата несколько раз промывали 50%-ным раствором этанола, чтобы удалить остатки воды. Дальнейшая процедура состояла в постепенном повышении концентрации спирта в пробах. Инкубацию проводили в 50%- и 60%-ном растворах спирта по 30 мин, а затем в растворе уранилацетата, приготовленном на 70%-ном растворе спирта, в течение ночи (~4°C). На следующий день пробы обрабатывали

80%-ным спиртом (30 мин), после чего их оставляли в 96%-ном спирте на ночь при 4–5°C. На следующий день препараты еще раз промывали спиртом, а затем 2 раза ацетоном, каждый раз инкубируя по 20–30 минут. Осадки митохондрий последовательно помещали в смолу («Epon»), разведенную ацетоном в 3, 2 и 1,5 раза соответственно, каждый раз оставляя препараты для пропитки смолой на ночь при комнатной температуре. Последним этапом было помещение препаратов в неразведенную смолу при 37°C в течение ночи и дальнейшая полимеризация эпона при 60°C до твердого стекловидного состояния. Ультратонкие срезы фиксированных препаратов, а также электронномикроскопические снимки срезов были сделаны в Отделе электронной микроскопии (НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского) Л.Е. Бакеевой.

Концентрацию белка определяли по модифицированному биуретовому методу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Аламетицин как инструмент для изучения внутримитохондриальных ферментов.

Влияние аламетицина на свойства препаратов митохондрий сердца крысы, СМЧ и изолированного Комплекса I

Так как внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для NADH [Lehninger, 1951], а NADH-связывающий центр Комплекса I экспонирован в матриксе, выделяемые нами препараты интактных митохондрий сердца крысы (дыхательный контроль ≥ 10) практически не окисляли добавленные пиридиннуклеотиды (данные не приведены). В связи с этим нас интересовала возможность использования аламетицина, каналобразующего антибиотика, для увеличения проницаемости внутренней митохондриальной мембраны. Ранее на препарате интактных митохондрий печени крысы было показано, что аламетицин в концентрации около 10 мкг/мл вызывает активацию их сукцинатоксидазной активности [Ritov et al., 1992]. Недавно в нашей лаборатории было показано, что и NADH-оксидазную активность можно измерять при помощи этого антибиотика [Grivennikova et al., 2001].

В нашей работе мы сравнили зависимости сукцинатоксидазной (кривая 1) и NADH-оксидазной (кривая 2) активностей митохондрий от концентрации добавленного аламетицина (рис. 1). Из рисунка видно, что максимальная NADH-оксидазная активность фермента выявляется при концентрациях аламетицина, превышающих 20 мкг/мл, а полная активация сукцинатоксидазы происходит уже при добавлении 10 мкг/мл антибиотика, что хорошо согласуется с данными, полученными

ранее Ритовым и соавт. [Ritov et al., 1992]. Так как в митохондриальной мембране существует дикарбоксилатный переносчик, способный переносить сукцинат внутрь, а образованный фумаразой малат наружу, можно считать, что активация окисления сукцината происходит за счет разобщения мембраны (увеличения проницаемости мембраны для протонов). Однако активность сукцинатоксидазы в присутствии аламетицина (0,4 мкмоль/мин/мг белка) в ~3 раза выше, чем активность, измеренная в присутствии разобщителя (0,15 мкмоль/мин/мг белка), что указывает на дикарбоксилатный переносчик в качестве лимитирующего фактора при измерении окисления сукцината в полностью разобщенных митохондриях. Таким образом, увеличение активности сукцинатоксидазы при добавлении аламетицина можно объяснить суперпозицией двух процессов: разобщения мембраны и увеличения проницаемости мембраны для субстрата.

Различия в концентрациях аламетицина, необходимых для выявления максимальных активностей NADH- и сукцинат-оксидазных реакций, по-видимому, обусловлено строением аламетициновой поры («модель бочонка») [Ермишкин, Зильберштейн, 1982]. Согласно этой модели при увеличении концентрации аламетицина происходит увеличение диаметра образующегося канала, и следовательно, для проникновения через мембрану более крупный субстрат нуждается в большей концентрации добавляемого аламетицина.

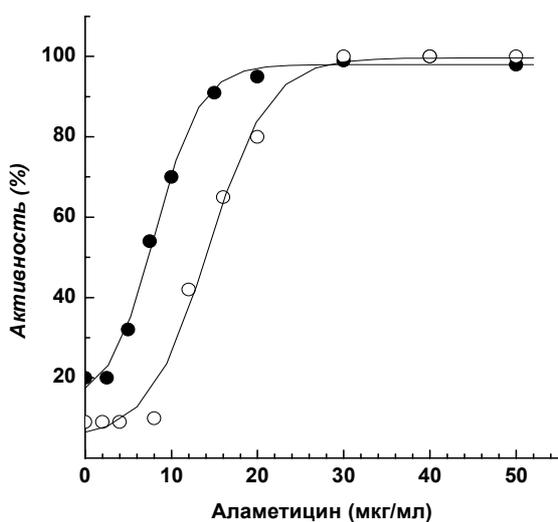


Рис. 1. Зависимость NADH-оксидазной (○) и сукцинатоксидазной (●) активностей интактных митохондрий сердца крысы от концентрации аламетицина.

100% Сукцинатоксидазной активности соответствовало 0,4 мкмоль сукцината/мин на 1 мг белка, 100% NADH-оксидазной активности соответствовало 1,4 мкмоль NADH/мин на 1 мг белка.

Митохондрии сердца крысы (0,3 мг/мл) инкубировали в среде, содержащей 0,3 М сахарозу, 10 мМ HEPES (7,4), 0,2 мМ ЭДТА и 10 мкМ цитохром *c* в присутствии 2,5 мМ MgCl₂ и различных количеств аламетицина в течение 5-ти минут. Реакцию начинали внесением 1мМ NADH (кривая 2) или 10 мМ сукцината (кривая 1) соответственно. При измерении сукцинат-оксидазной активности среда дополнительно содержала 5 мкМ ротенон. NADH-оксидазную активность регистрировали спектрофотометрически при 380 нм, а сукцинатоксидазную активность определяли полярографически по убыли O₂.

В табл. 1 представлены сводные данные по влиянию аламетицина на различные оксидоредуктазные активности, измеренные на препаратах митохондрий, СМЧ и выделенного Комплекса I. Видно, что скорость глутамат/малат-поддерживаемого дыхания в состоянии 3 (в присутствии ADP и P_i) в ~10 раз ниже, чем скорость окисления NADH после добавления аламетицина (0,13 и 1,25 мкмоль/мин/мг белка соответственно). NADH-оксидазная реакция, измеренная в присутствии аламетицина, была на ~90% чувствительна к ротенону и не стимулировалась добавлением разбавителя. Аламетицин не влиял на NADH-оксидазную активность, катализируемую выделенным препаратом Комплекса I и субмитохондриальными частицами. Последнее показывает, что полученный нами препарат СМЧ действительно являлся препаратом «вывернутых» митохондриальных мембран, где активный центр Комплекса I обращен наружу.

Таблица 1. Влияние аламетицина на оксидоредуктазные активности в различных митохондриальных препаратах

Препарат и реакция	Активность ^a (мкмоль/мин на 1 мг белка)	
	– Аламетицин	+ Аламетицин (30 мкг/мл)
Митохондрии сердца крысы:		
Малат/глутамат-оксидаза		
Дыхание в состоянии 4	0,01	
Дыхание в состоянии 3 ^b	0,13	
NADH-оксидаза ^b	0,10	1,25
+ ротенон (5 мкМ)	0,06	0,06
Сукцинатоксидаза	0,08	0,40
+ FCCP (1 мкМ)	0,15	
NADH:Q ₁ -редуктаза ^г	0,05	0,54
+ ротенон (5 мкМ)		0,05
СМЧ сердца быка:		
NADH-оксидаза ^b	0,96	0,95
+ ротенон (5 мкМ)	<0,01	<0,01
NADH:Q ₁ -редуктаза ^г	0,84	0,82
+ ротенон (5 мкМ)	0,11	0,11
Комплекс I сердца быка:		
NADH:Q ₁ -редуктаза ^e	2,65	2,73
+ ротенон (5 мкМ)	0,21	0,24

^aПриведены данные типичных экспериментов. Значения, полученные в серии аналогичных опытов, не превышали 20%.

^b В стандартную среду измерения вносили 200 мкМ ADP (см. «Методы исследования»).

^b В качестве субстрата вносили 200 мкМ NADH.

^гСтандартная среда содержала 100 мкМ NADH, 100 мкМ Q₁ и 1,5 мМ цианид калия.

^eСтандартная среда содержала 100 мкМ NADH, 100 мкМ Q₁ и 5 мМ азид натрия.

Еще один фермент, активность которого является важнейшей характеристикой препарата митохондрий, – F_0F_1 -АТРаза. По меньшей мере, два переносчика могут вносить вклад в скорость гидролиза АТФ разобщенными митохондриями, – карбоксиатрактилат-чувствительная АТФ/АДФ-транслоказа и фосфатный переносчик. Как видно из результатов, представленных в табл. 2, аламетицин делает мембрану проницаемой для АТФ, АДФ и фосфата, так как в его присутствии реакция становится нечувствительной к добавлению карбоксиатрактилата. Скорость олигомицин-чувствительного гидролиза АТФ после добавления аламетицина была в ~2 раза выше, чем скорость, измеренная в присутствии разобщителя (1,4 и 0,8 мкмоль АТФ/мин/мг белка соответственно). Это указывает на то, что в нативных, необработанных аламетицином митохондриях лимитирующим скорость реакции фактором являются переносчики (нуклеотидный и/или фосфатный). Обработанные аламетицином митохондрии полностью сохраняли чувствительность АТРаза к азиду и олигомицину, специфическим ингибиторам F_0F_1 -АТРаз. С другой стороны, как и ожидалось, аламетицин не влиял на карбоксиатрактилат-нечувствительную АТРазную активность СМЧ.

Таблица 2. Влияние аламетицина на АТРазную активность СМЧ сердца быка и митохондрий сердца крысы

Условия измерения	АТРазная активность ^a (мкг-ионы H^+ /мин/мг белка)	
	Митохондрии	СМЧ
1. Без добавок	0,1	6,0
2. + FCCP (0,7 мкМ)	0,8	8,0
3. + FCCP (0,7 мкМ) + олигомицин (0,5 нмоль/мг белка)	0,1	0,1
4. + FCCP (0,7 мкМ) + карбоксиатрактилат (2 мкМ)	0,1	7,9
5. + Аламетицин (30 мкг/мл)	1,4	8,0
6. + Аламетицин (30 мкг/мл) + карбоксиатрактилат (2 мкМ)	1,2	7,0
7. + Аламетицин (30 мкг/мл)+ азид (0,4 мМ)	0,1	<0,1

^aАТРазную активность измеряли, как описано в разделе «Методы исследования». В пробе 1 и 3-6 после 5 мин преинкубации препарата с указанными реагентами реакцию начинали добавлением АТФ, после чего измеряли уровень начальной скорости. В пробе 2 FCCP добавляли через 1 мин после внесения АТФ. В пробе 7 реакцию начинали внесением митохондрий или СМЧ в стандартную среду измерения, содержащую азид, после чего через 4 мин измеряли скорость реакции. Во всех случаях реакцию останавливали внесением олигомицина (5 нмоль/мг, остаточная активность при этом составляла <0,05 мкг-ионов H^+). Ответ фенолового красного на закисление среды калибровали добавлением 20-50 мкМ HCl. В таблице приведены данные типичных экспериментов. Значения, полученные в серии аналогичных опытов, не превышали 20%.

Ультраструктура митохондрий сердца крысы, обработанных аламетицином

На рис. 2 (два разных увеличения) представлены электронные микрофотографии контрольного препарата митохондрий сердца крысы и того же препарата после обработки аламетицином. Митохондрии в изотоническом растворе сахарозы имеют очень плотный и темный матрикс, что соответствует литературным данным, согласно которым в отсутствие высокомолекулярных веществ в среде суспендирования митохондрий, при условии целостности внешней мембраны, вода поступает в межмембранное пространство, и создаваемое гидростатическое давление вызывает сильное сжатие матрикса митохондрий. После добавления аламетицина барьеры проницаемости для низкомолекулярных веществ исчезают, а митохондрии, обработанные аламетицином, набухают (рис. 2, Б). Объем их матрикса увеличивается, матрикс становится более светлым по сравнению с контрольными митохондриями. Митохондрии приобретают сферическую форму. Однако обработка митохондрий аламетицином не приводит к разрушению митохондрий. Видно также, что после обработки аламетицином наружная мембрана сохраняется.

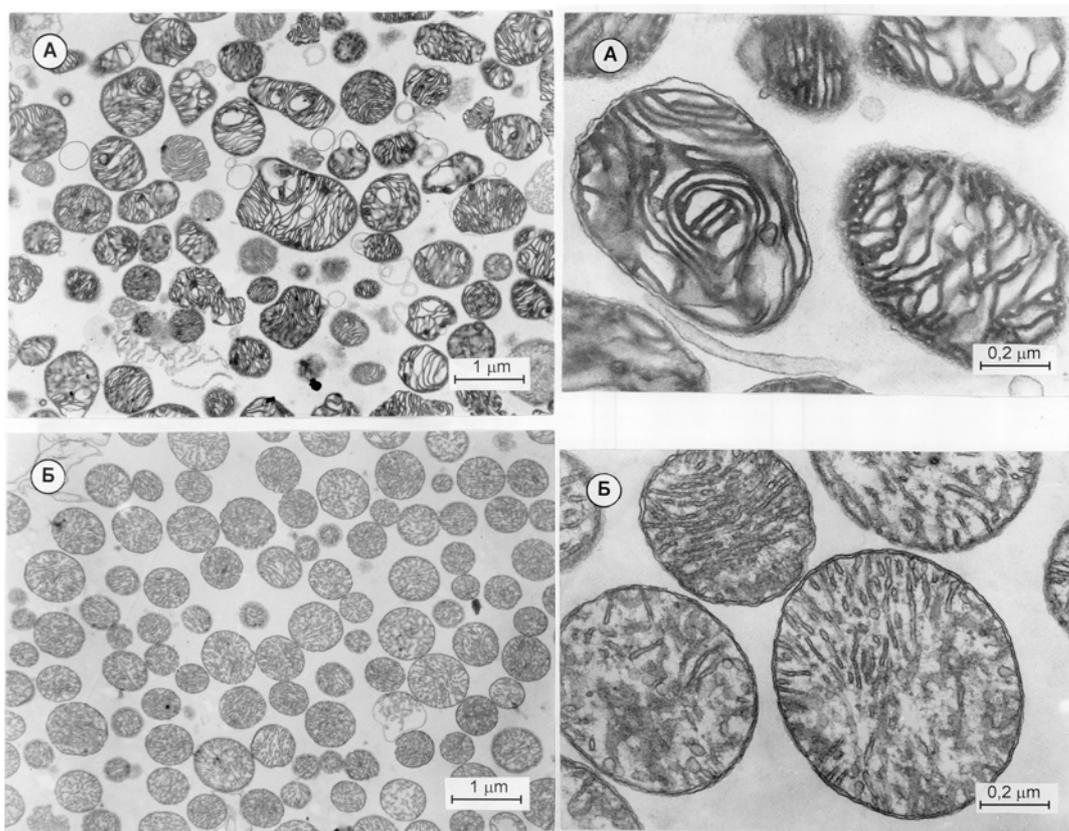
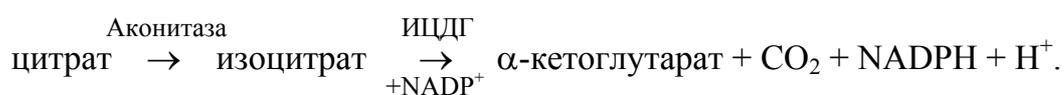


Рис. 2. Ультраструктура митохондрий сердца крысы до (А) и после (Б) обработки аламетицином при двух различных увеличениях.

Аконитазная и изоцитратдегидрогеназная активности митохондрий до и после обработки аламетицином

Данные электронной микроскопии показали морфологическую целостность внутренней и внешней мембран митохондрий. Можно было ожидать, что обработка в указанных условиях митохондрий аламетицином приведет к проницаемости мембран только для низкомолекулярных компонентов, тогда как белки сохранятся в матриксе. Для подтверждения этого мы измеряли активность двух ферментов матрикса: аконитазы и изоцитратдегидрогеназы (рис. 3).

Так же, как и в случае Комплекса I, активность изоцитратдегидрогеназы в интактных митохондриях измерить невозможно, так как субстратом фермента является NADP^+ . Однако добавление аламетицина к митохондриям в среде, содержащей субстраты изоцитратдегидрогеназной реакции, приводило к многократному увеличению каталитической активности изоцитратдегидрогеназы. Также многократно увеличивалась активность аконитазной реакции, измеренной в системе, сопряженной с изоцитратдегидрогеназной реакцией:



Из рис. 3 видно, что добавление аламетицина вызывает резкое увеличение аконитазной активности препарата митохондрий. Таким образом, аламетицин оказался удобным инструментом для измерения активности не только Комплекса I, Комплекса II, F_0F_1 -АТФазы, но и аконитазы и изоцитратдегидрогеназы.

Далее мы определили, сохраняются ли аконитаза и изоцитратдегидрогеназа в матриксе митохондрий после обработки аламетицином. Препарат митохондрий обрабатывали аламетицином, после чего осаждали центрифугированием (30 000 g). Полученный осадок митохондрий ресуспендировали и анализировали на содержание в нем аконитазной и изоцитратдегидрогеназной активностей. Результаты приведены на рис. 3. Видно, что до и после обработки аламетицином активности этих ферментов различаются незначительно.

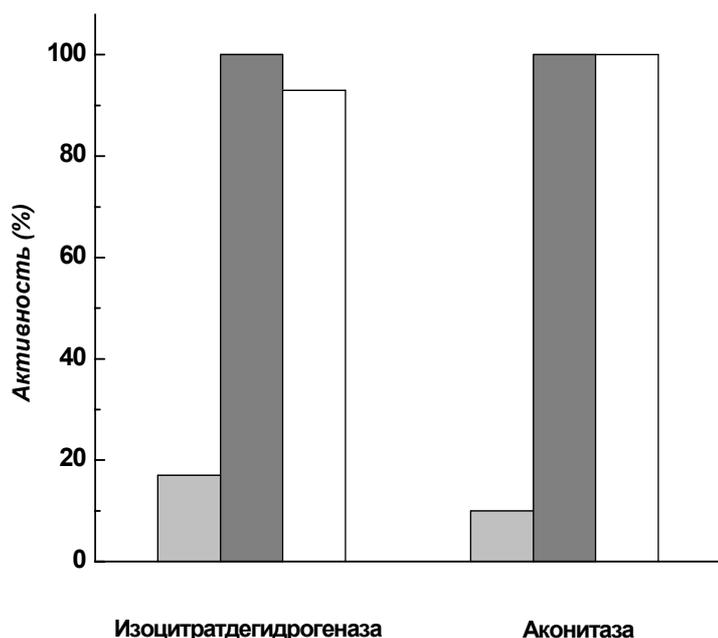


Рис. 3. Сравнение изоцитратдегидрогеназной и аконитазной активностей митохондрий до и после обработки аламетицином.

Митохондрии предварительно обрабатывали аламетицином и проводили измерение активностей, как описано в тексте и разделе «Методы исследования». Концентрация белка в среде измерения составляла 22 мкг/мл. Реакцию начинали добавлением изоцитрата (для ИЦДГ) или цитрата (для аконитазы). 100% Активности изоцитратдегидрогеназы соответствовало 0,25 мкмоль изоцитрата/мин/мг белка, аконитазы – 0,05 мкмоль цитрата/мин/мг белка. Светлые столбики – контрольные митохондрии, темные – контрольные митохондрии после добавления аламетицина, белые – митохондрии после обработки аламетицином и пересадки

Результаты, полученные в этом разделе работы, показали, что аламетицин является ценным инструментом для изучения как Комплекса I, так и других внутримитохондриальных ферментов.

II. Топография SH-группы, чувствительной к $A \leftrightarrow D$ -переходу

Все ранее опубликованные нашей лабораторией данные об $A \leftrightarrow D$ -переходе Комплекса I и связанному с ним появлению чувствительности фермента к SH-реагентам были получены с использованием NEM – относительно гидрофобного соединения, проникающего через мембраны. Описанные в предыдущем разделе данные о пермеабиллизации внутренней мембраны митохондрий аламетицином позволили перейти к установлению топографии SH-группы Комплекса I, чувствительной к $A \leftrightarrow D$ -переходу. Можно было ожидать, что если эта группа локализована в матриксе, аламетицин вызовет появление ее реактивности по отношению к гидрофильным непроникающим реагентам.

Локализация SH-группы, меняющей реакционную способность во время $A \leftrightarrow D$ -переходов Комплекса I (A/D-SH)

Для изучения локализации SH-группы Комплекса I, чувствительной к $A \leftrightarrow D$ -переходу, мы выбрали два модификатора: проникающий через мембрану нейтрально

заряженный NEM и непроникающий дианион 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) (ДТНБ). Чтобы достичь деактивации белка и предотвратить его реактивацию эндогенными субстратами, митохондрии были преинкубированы при 37°C в анаэробных условиях. На рис. 4 представлены результаты измерения NADH-оксидазной активности таких препаратов, обработанных NEM и ДТНБ в присутствии и в отсутствие аламетицина. Видно, что непроникающая ДТНБ, в отличие от NEM, не приводит к ингибированию активности фермента. После добавления аламетицина в среду преинкубации оба реагента ингибируют активность с одинаковой эффективностью.

Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что интересующая нас SH-группа расположена на внутренней стороне внутренней митохондриальной мембраны, а на ее внешней стороне нет других значимых для активности Комплекса I SH-групп.

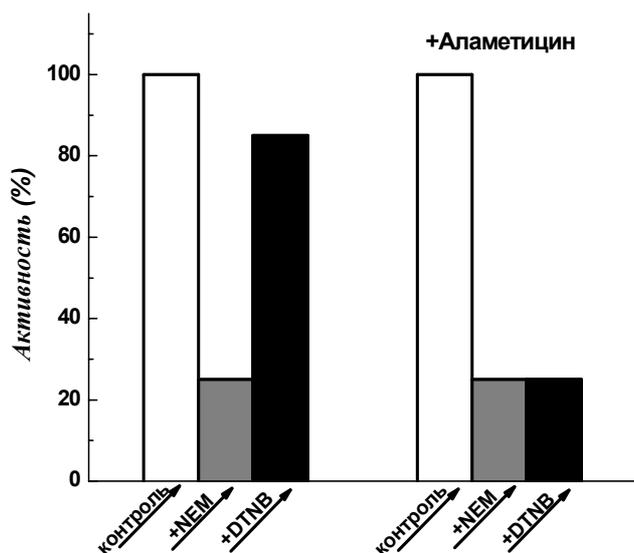


Рис. 4. Эффект каналобразующего антибиотика аламетицина на ингибирование деактивированного Комплекса I SH-модификаторами.

Митохондрии сердца крысы (1 мг/мл) инкубировали в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 0,2 мМ ЭДТА, 1,5 мМ сукцинат K^+ , 50 мМ Tris/Cl⁻ (pH 8,0) при 37°C в течение 1 ч в закрытых флаконах (общий объем 2 мл). Реакционную среду наливали до плотно закрытой резиновой крышки, чтобы избежать контакта суспензии с воздухом, а растворенный в среде кислород восстанавливался во время сукцинат-оксидазной реакции. После анаэробной инкубации образцы охлаждали до 15°C, добавляли ингибиторы (0,5 мМ NEM или ДТНБ) шприцом под крышку, после чего инкубировали в течение 30 мин. Аламетицин (20 мкг/мл) и MgCl₂ (0,6 мМ) добавляли к образцам, где указано (Б), перед добавлением ингибиторов. Затем образцы разводили в 5 раз

и пересаждали (1 ч 16 000 об/мин, ротор Beckman

JA-20). Осадки ресуспендировали в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ Tris/Cl⁻ (pH 8,0), после чего измеряли NADH-оксидазную активность при 30°C в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 0,2 мМ ЭДТА, 0,6 мМ MgCl₂, 20 мкг/мл аламетицина, 100 мкМ NADH, 50 мМ Tris/Cl⁻ (pH 8,0) и 20–30 мкг белка на 1 мл. Незначительное ингибирование (~15%, данные не приведены) NADH-оксидазной активности SH-реагентами наблюдалось в контрольных препаратах, преинкубированных в аэробных условиях (открытые и хорошо перемешиваемые флаконы), в дальнейшем обработанных аналогично анаэробным препаратам. 100% NADH-оксидазной активности соответствовало 0,6 мкмоль/мин на 1 мг белка (значение, полученное для необработанных ингибиторами митохондрий после анаэробноза).

Общее содержание SH-групп в препаратах митохондрий и СМЧ

Для измерения общего количества реакционноспособных SH-групп был выбран реактив Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота, ДТНБ) как наиболее специфичный модификатор. Полученные результаты приведены в таблице 3. Как и ожидалось, аламетицин вызывал значительное увеличение количества SH-групп, реагирующих с ДТНБ, в препарате нативных митохондрий, однако в случае субмитохондриальных частиц это количество практически не менялось. Солюбилизация мембран детергентом Triton X-100 приводила к дальнейшему увеличению количества выявляемых сульфгидрильных групп в обоих препаратах. В дальнейших опытах количество реакционноспособных SH-групп учитывалось при подборе концентрации ингибитора.

Таблица 3. Содержание реакционноспособных SH-групп в различных препаратах.

Препараты	Количество групп, взаимодействующих с ДТНБ (нмоль на 1 мг белка)	
	– аламетицин	+ аламетицин*
Митохондрии сердца крысы	16 ± 2	40 ± 2
+ Triton X-100	48 ± 2	–
СМЧ сердца быка	16 ± 2	16 ± 2
+ Triton X-100	35 ± 2	35 ± 2

Митохондрии сердца крысы или СМЧ сердца быка (0,2 мг/мл) суспендировали в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ Tris/Cl⁻, pH 8,0. Аламетицин и Triton X-100 вносили до конечных концентраций 30 мкг/мл и 1% соответственно. ДТНБ ($2 \cdot 10^{-4}$ М, т.е. 1 мкмоль/мг белка) добавляли в суспензию, и измеряли поглощение при λ 412/510 нм. Значение оптической плотности переставало увеличиваться через ~30 мин. Конечный уровень поглощения использовали для подсчета содержания SH-групп в белке.

*Одновременно с аламетицином добавляли MgCl₂ (2,5 мМ), так как ранее была показана необходимость присутствия ионов Mg²⁺ для формирования аламетициновых каналов [Grivennikova et al., 2001].

Реакционноспособность A/D-SH-группы

Для изучения реакционноспособности A/D-SH-группы мы выбрали три SH-модификатора: NEM, ДТНБ и ДТНП (2,2'-дитиобис-(5-нитропиридин)). ДТНБ и

ДТНП обладают схожей структурой, однако ДТНБ обладает большей гидрофильностью, чем ДТНП, и отрицательно заряжен в отличие от нейтрального ДТНП. Оба этих модификатора взаимодействуют с SH-группами по механизму тиол-дисульфидного обмена в отличие от алкилирующего реагента NEM. На рис. 5 представлены характерные кинетические кривые, полученные с помощью модификатора ДТНБ, на препарате СМЧ. Видно, что активная форма фермента практически не ингибируется SH-реагентом, а деактивированный препарат полностью восстанавливает свою активность после добавления избытка дитиотреитола (ДТТ). Ингибирование D-формы фермента подчиняется временной и концентрационной кинетике первого порядка (при использовании избытка ДТНБ по отношению к общему количеству SH-групп). Незначительное ингибирование активной формы фермента (~15%) связано с существованием равновесия между активной и деактивированной формами белка. Качественно аналогичные результаты были получены и для двух других реагентов (NEM и ДТНП).

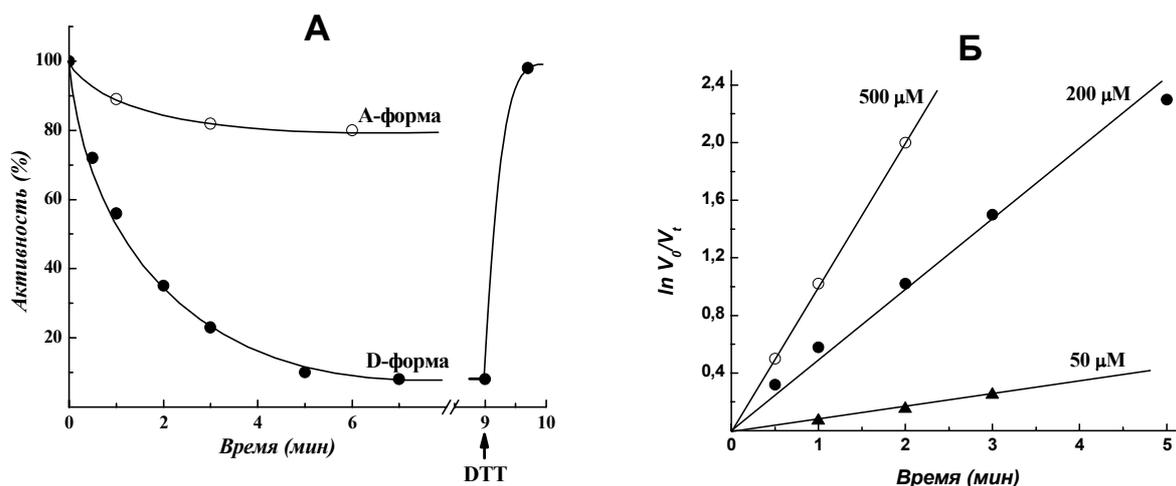


Рис. 5. Кинетика ингибирования Комплекса I ДТНБ в составе вывернутых субмитохондриальных частиц.

А – Активированные (А-форма) или деактивированные (D-форма) СМЧ (1 мг/мл) инкубировали в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ Tris/Cl⁻ (pH 8,0) и 200 мкМ ДТНБ при 15°C. Остаточную NADH-оксидазную активность измеряли при 30°C в той же среде без ДТНБ, содержащей помимо перечисленного 100 мкМ NADH и разобшитель (грамицидин D, 0,05 мкг/мл). Где указано, вносили 5 мМ ДТТ. В случае деактивированного препарата во время регистрации активности наблюдалась выраженная лаг-фаза, в таком случае активность определяли после выхода на постоянный уровень (~ 30 с после начала реакции добавлением СМЧ). Б – Графики, полученные аналогично (А), для деактивированного препарата при различных концентрациях ДТНБ в полу-логарифмических координатах.

Предварительная обработка Комплекса I ДТНБ приводила к защите белка от последующего необратимого ингибирования NEM (рис. 6). Это указывает на то, что

оба реагента взаимодействуют с одной и той же сульфгидрильной группой (группами).

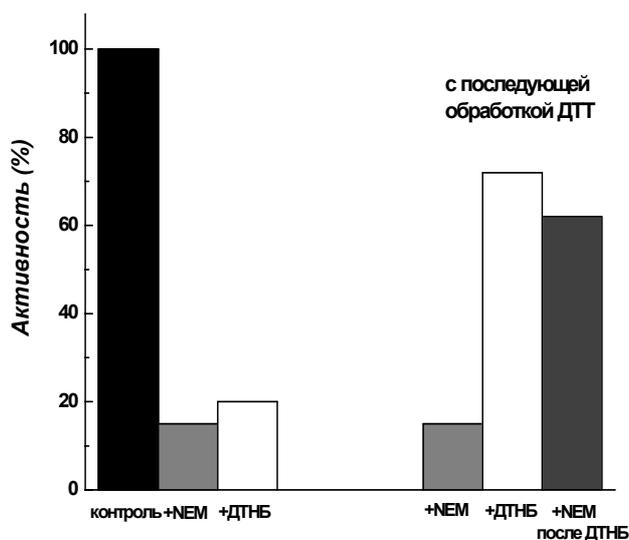


Рис. 6. Предотвращение необратимой модификации Комплекса I N-этилмалеимидом с помощью ДТНБ.

Деактивированный препарат СМЧ (1 мг/мл) инкубировали в среде, содержащей 0,25 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ Tris/Cl⁻ (pH 8,0) в присутствии и в отсутствие 0,5 мМ ДТНБ в течение 10 мин при 25°С. СМЧ осаждали центрифугированием и ресуспендировали в той же среде (без ДТНБ). Затем образцы обрабатывали NEM (0,5 мМ, 5 мин при 25°С), осаждали и вновь суспендировали в среде, содержащей 5 мМ дитиотреитол (где указано «+ДТТ») для удаления ДТНБ. NADH-оксидазу измеряли при 30°С.

Мы сравнили реакционную способность по отношению к A/D-SH-группе двух сходных по химическому строению и механизму реакции (тиол-дисульфидный обмен) модификаторов – ДТНБ и ДТНП (табл. 4). Удобным параметром для оценки реакционной способности соединения является константа скорости его взаимодействия с A/D-SH-группой. Для определения этой константы мы использовали большой избыток ингибитора по отношению к количеству фермента в преинкубации. Через определенные промежутки времени из преинкубации отбирали пробы фермента для определения активности. Далее строили зависимость $\ln V_0/V_t$ от времени, которая представляла собой прямую, тангенс угла наклона которой численно равен наблюдаемой константе скорости. Чтобы перейти к истинной константе скорости второго порядка необходимо разделить значение наблюдаемой константы скорости на использованную концентрацию ингибитора.

Так как выбранные нами ингибиторы обладают различной реакционной способностью по отношению к нейтральному низкомолекулярному тиолу (ДТТ), то нам представлялось целесообразным нормировать ингибирующую способность модификаторов к их относительной реакционной способности по отношению к «стандартному» тиолу. Из таблицы видно, что нормированная константа скорости реакции ДТНП с A/D-SH-группой в ~14 раз больше таковой для ДТНБ (0,72 и 0,05 соответственно). Такой результат можно ожидать, если A/D-SH-группа находится в окружении относительно гидрофобных и/или отрицательно заряженных групп. Ранее в нашей лаборатории было показано, что A↔D-переход влияет на NADH:убихинон-редуктазную реакцию, но не на восстановление искусственных акцепторов электронов (феррицианид, гексааминорутений),

взаимодействующих с гидрофильной частью фермента [Sled and Vinogradov, 1993]. Эти факты позволяют предположить, что A/D-SH-группа расположена в непосредственной близости к убихинон-связывающему участку (участкам), вероятно, на границе раздела фаз мембрана/матрикс митохондрии. Если это предположение верно, то увеличение отрицательного заряда на мембране должно приводить к уменьшению реакционной способности A/D-SH-группы (сдвиг кажущейся pK_a) из-за электростатических взаимодействий, мешающих депротонированию тиола (стадия, необходимая для протекания реакции). Действительно, модификация мембраны отрицательно заряженным SDS приводила к уменьшению реакционной способности SH-группы белка, но не низкомолекулярного ДТТ. Наоборот, увеличение ионной силы приводило к увеличению реакционной способности благодаря вторичному солевому эффекту.

Таблица 4. Реакционная способность различных SH-реагентов по отношению к A/D-SH-группе Комплекса I (25°C)

SH-реагент	Константа скорости второго порядка ($M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot 10^4$)		Относительная реакционная способность ($k_i/k_{\text{ДТТ}}$)
	Ингибирование Комплекса I (k_i)	Реакция с ДТТ ^a ($k_{\text{ДТТ}}$)	
ДТНБ (стандартная среда) ^б	0,30	6,0	0,05
+ KCl (100 мМ) ^в	0,70	7,0	0,10
+ SDS (200 мкМ)	0,17	6,0	0,03
ДТНП (стандартная среда) ^б	50	69	0,72
+ KCl (100 мМ) ^в	100	80	1,25
+ SDS (200 мкМ)	25	69	0,36
Окисленный глутатион (10 мМ, 75 мин, pH 8,0) ^б	не ингибирует	не определяли	

^a Измерения проводили с использованием 1 мкМ ДТТ и 10 мкМ ДТНБ или ДТНП в стандартной среде измерения (см. рис. 5) при pH 7,0. При этом значении pH реакция протекает со скоростью, достаточно медленной для достоверного измерения константы скорости.

^б Константы скорости определяли, как описано в рис. 5. Концентрации ДТНБ и ДТНП были 200 мкМ и 1 мкМ, а содержание белка в пробах – 1 мг/мл и 10 мкг/мл соответственно.

^в Другие соли (NaCl, RuCl, ацетат Na^+) оказывали практически такой же эффект на скорости реакций.

Мы измерили рН-зависимость реакционной способности А/D-SH-группы по отношению к ДТНБ. Действительно, оказалось, что эта SH-группа обладает аномально высоким значением pK_a (>10) определить которое невозможно, так как не удается достичь выхода кривой на плато вплоть до значения рН 11. Эти данные подтверждают наше предположение о расположении А/D-SH-группы в непосредственной близости от гидрофобных и/или отрицательно заряженных групп.

Мы показали, что А/D-SH-группа локализована в обращенной к митохондриальному матриксу части Комплекса I. Реакционная способность А/D-SH-группы по отношению к различным SH-реагентам, а также ее зависимость от рН, ионной силы и модификации мембраны с помощью SDS позволяют предположить, что она находится в примембранном слое (граница раздела фаз мембрана/матрикс). Структурные перестройки в белке, происходящие при А \leftrightarrow D-переходе, можно себе представить следующим образом. Активная форма фермента содержит протонированную форму А/D-SH-группы, погруженную в гидрофобную мембрану. Деактивация фермента приводит к появлению А/D-SH-группы в гидрофильном матриксе, где она депротонируется. Эта модель находится в соответствии с данными о том, что при щелочных значениях рН D \rightarrow A-переход значительно замедляется. Следует, однако, иметь в виду, что наши результаты не исключают возможности, при которой А/D-SH-группа находится не в примембранном слое, а в окружении гидрофобных и/или отрицательно заряженных аминокислот гидрофильного домена Комплекса I. Избирательное мечение D-формы Комплекса I флуоресцирующим производным NEM [Gavrikova and Vinogradov, 1999] позволило установить, что А/D-чувствительный цистеиновый остаток принадлежит одной из малых субъединиц комплекса (15 кДа). Окончательное выяснение расположения А/D-SH-группы будет возможно только после установления ее принадлежности к определенной субъединице Комплекса I и полного структурного анализа.

Отсутствие ингибирования Комплекса I глутатионом в наших опытах противоречит данным, полученными Тэйлором и соав. [Taylor et al., 2003], где сообщалось об обратимом глутатионилировании 51 и 75 кДа-субъединиц Комплекса I, приводящем к ингибированию ротенон-чувствительной активности фермента и повышению продукции им супероксида. Отсутствие ингибирования Комплекса I окисленным глутатионом, однако, не исключает возможности влияния соотношения GSSG/GSH на активность фермента. Например, GSH может защищать А/D-SH-группу Комплекса I от модификации другими SH-соединениями по конкурентному механизму.

Изменение свойств А/D-SH-группы является, по-видимому, не единственным признаком, отличающим две формы фермента. Высокая энергия активации указывает

на существование значительных структурных изменений, сопровождающих A↔D-переход.

Недавно Ушаковой и соавт. было показано, что мутации 29,9 кДа-субъединицы фермента из *Neurospora crassa* [Ushakova et al., 2005], гомологичной В13-субъединице Комплекса I млекопитающих, влияет на кинетику A↔D-перехода. Мы полагаем, что существование двух форм Комплекса I может оказаться существенным для ряда регуляторных воздействий (фосфорилирование под действием протеинкиназ [Papa et al., 2002], нитрозилирование и другие известные и неизвестные ковалентные модификации фермента).

ВЫВОДЫ

1. Каналообразующий антибиотик аламетицин вызывает набухание митохондрий сердца крысы, не приводящее к разрушению внутренней и внешней митохондриальных мембран.

2. Внутренняя мембрана митохондрий после обработки аламетицином становится свободно проницаемой для низкомолекулярных соединений (NADH, АТФ, фосфат, сукцинат), но не ферментов матрикса митохондрии. Обработанные аламетицином митохондрии полностью сохраняют аконитазную и изоцитратдегидрогеназную активности.

3. Аламетицин не влияет на активности Комплекса I и АТФазы в составе препарата субмитохондриальных частиц. Его использование позволяет измерять активности внутримитохондриальных ферментов: ротенон-чувствительную NADH-оксидазу, NADH:убихинон-редуктазу, олигомицин-чувствительную АТФазу, аконитазу и изоцитратдегидрогеназу.

4. SH-группа (группы), меняющая свою реакционную способность в зависимости от состояния Комплекса I (A- или D-форма фермента), локализована на обращенной в сторону митохондриального матрикса части белка.

5. Реакционную способность этой группы (групп) по отношению к различным SH-реагентам соответствует модели, согласно которой цистеиновый остаток расположен в примембранном слое внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрий.

**Список работ Гостимской (Крысовой) И.С., опубликованных по теме
диссертации**

1. Grivennikova, V.G., Krysova, I.S., Bakeeva, L.E., and Vinogradov, A.D. (2001) The catalytic activity of the respiratory chain-linked NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) in intact mitochondria. Mitochondria 2001 Meeting, (San Diego, California). *Mitochondrion*, **1**, 87–112.
2. Gostimskaya, I.S., Grivennikova, V.G., Zharova, T.V., Bakeeva, L.E., and Vinogradov, A.D. (2003) In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria. *Anal. Biochem.*, **313**, 46–52.
3. Vinogradov, A.D., Gostimskaya, I.S., Loskovich, M.V., and Grivennikova, V.G. (2004) Possible mechanisms of regulation of the mitochondrial complex I as related to its slow active/inactive transition. *Abstract of 13 EBEC (2004)* Pisa, Italy, 20.
4. Gostimskaya, I.S., and Vinogradov, A.D. Location and chemical reactivity of the slow active-inactive transition-sensitive SH-group in the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). Тезисы международной конференции «Российская биоэнергетика: от молекул к клетке» (2005) Москва, МГУ, 38.
5. Gostimskaya, I.S., Cecchini, G., and Vinogradov, A.D. (2006) Topography and chemical reactivity of the active-inactive transition-sensitive SH-group in the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1155–1161.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ермишкин Л. Н., Зильберштейн А. Я. (1982) Ионные каналы, образуемые антибиотиками. Структура и свойства. Итоги науки и техники. *Биофизика мембран*, **2**, 83–160.
2. Burbaev, D.Sh., Moroz, I.A., Kotlyar, A.B., Sled, V.D., and Vinogradov, A.D. (1989) Ubisemiquinone in the NADH-ubiquinone reductase region of the mitochondrial respiratory chain. *FEBS Letters*, **254**, 47–51.
3. Chance, B., and Nishimura, M. (1967) Sensitive measurements of changes of hydrogen ion concentration. *Methods Enzymol.*, **10**, 641–650.
4. Gavrikova, E.V., and Vinogradov, A.D. (1999) Active/de-active state transition of the mitochondrial complex I as revealed by specific sulfhydryl group labeling. *FEBS Lett.*, **455**, 36–40.

5. Grivennikova, V.G., Kapustin, A.N., and Vinogradov, A.D. (2001) Catalytic activity of NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) in intact mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **276**, 9038–9044.
6. Jacobus, A., and Saks, V. (1982) Creatine kinase of heart mitochondria: changes in its kinetic properties induced by coupling to oxidative phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **219**, 167–178.
7. Kotlyar, A.B., and Vinogradov, A.D. (1990) Slow active/inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1019**, 151–158.
8. Lehninger, A.L. (1951) Phosphorylation coupled to oxidation of dihydrodiphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, **190**, 345–359.
9. Papa, S., Scacco, S., Sardanelli, A.M., Petruzzella, V., Vergari, R., Signorelli, A., and Technikova-Dobrova, Z. (2002) Complex I and the cAMP cascade in human physiopathology, *Biosci. Rep.*, **22**, 3–16.
10. Ritov, V. B., Tverdislova, I.L., Avakyan, T.Yu., Menshikova, E.V., Leikin, Yu.N., Bratkovskaja, L.B., and Shimon, R.G. (1992): Alamethicin-induced pore formation in biological membranes. *Gen. Physiol. Biophys.*, **11**, 49–58.
11. Sled, V.D., and Vinogradov, A.D. (1993) Kinetics of the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase interaction with hexaamminoruthenium (III). *Biochim. Biophys. Acta*, **1141**, 262–268.
13. Taylor, E.R., Hurrell, F., Shannon, R., Lin, T.-K., Hirst, J., and Murphy, M.P. (2003) Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *J. Biol. Chem.*, **278**, 19603–19610.
14. Ushakova, A.V., Duarte, M., Vinogradov, A.D., Videira, A. (2005) The 29.9 kDa subunit of mitochondrial complex I is involved in the enzyme active/de-active transitions. *J. Mol. Biol.*, **351**, 327–333.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 99-04-48082, 02-04-48679, 03-04-48202, 05-04-48809, 06-04-48931), Программы поддержки ведущих научных школ (гранты № 00-15-97798 и НШ-596.2003.4), Шведской Королевской Академии Наук (грант № 12557) и NIH Fogarty International Research Collaboration Award (FIRCA) grant 1RO3TW006041.

Автор благодарен Бакеевой Лоре Евгеньевне за помощь в получении электронных микрофотографий.