

ПРОВОДИМОСТЬ ФИТОТОКСИНОВЫХ КАНАЛОВ В ПРИСУТСТВИИ БОЛЬШИХ ОРГАНИЧЕСКИХ ИОНОВ

© О. С. Остроумова,¹ С. С. Ефимова, Л. В. Щагина

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: ostroumova@mail.cytspb.rssi.ru

В работе исследовано влияние размера проникающего аниона на свойства каналов, формируемых циклическим липодепептидом сирингомицином E (СМЕ) в бислойных липидных мембранах. Проведены измерения проводимостей и средних времен жизни СМЕ-каналов в 0.4 М растворах хлорида, аспартата и глюконата натрия. Сравнение результатов кондуктометрических и электрофизиологических измерений показало: 1) отношение подвижностей анионов аспартата в канале и в водном растворе в 5 раз меньше соответствующего отношения для анионов хлора; 2) проводимость каналов в присутствии глюконата натрия обусловлена в основном катионами. Полученные результаты свидетельствуют о связывании проникающих анионов с селективным фильтром СМЕ-поры. Установлены радиус селективного фильтра СМЕ-канала (~0.3 нм) и его локализация в *цис*-устье канала.

Ключевые слова: бислойные липидные мембраны, каналобразующие токсины, одиночные ионные каналы, селективный фильтр поры.

Принятые сокращения: БЛМ — бислойные липидные мембраны,ДФФХ — 1, 2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, СМЕ — сирингомицин E, Asp — аспартат, Glc — глюконат.

Около 30 лет назад были получены первые данные о проводимости и размерах ионных каналов в бислойных липидных мембранах (БЛМ). Экспериментально определяемая проводимость многих каналов отличается от проводимости эквивалентного этим каналам объема водного раствора. Соответствующие литературные данные и результаты наших расчетов приведены в табл. 1. Проводимости пор, образованных α -латротоксином, аламетицином, β -токсином кластридии, колицином Ia, сирингопептином 25A, сирингомицином E (СМЕ) и бетиколином, приблизительно на порядок отличаются от проводимостей цилиндров соответствующего размера; для столбчатого токсина и эндотоксина — на два порядка, а для каналов, формируемых VDAC-порином 31 ВМ, различие составляет более трех порядков. Различие проводимостей вызывает удивление только в том случае, если ионы в канале, как и в растворе, свободно диффундируют. Однако если в канале происходит связывание проникающего иона, то его подвижность в поре может оказаться существенно меньше, чем в растворе. Это и определит различие проводимостей канала и соответствующего цилиндра. Для верификации гипотезы о связывании необходимо измерить проводимость каналов в присутствии проникающих ионов одинакового заряда, но различного размера. Если ионы в канале подчиняются механизму свободной диффузии, то отношение проводимостей канала в присутствии проникающих ионов разного размера должно быть равно отношению их подвижностей в воде. Если же происходит связывание ионов с порой, то указанные отношения для ионов разного размера могут различаться.

Циклический липодепептид СМЕ продуцируется бактериями *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* и обладает противогрибковой и антибактериальной активностью (Sorensen et al., 1996; Lavermicocca et al., 1997; Buber et al., 2002; Takemoto et al., 2003). Показано, что одностороннее введение СМЕ вызывает формирование в БЛМ потенциалзависимых ионных каналов преимущественно анионной селективности, среди которых наблюдаются элементарные каналы и их кластеры (Щагина и др., 1998; Kaulin et al., 1998; Остроумова и др., 2006). Элементарный СМЕ-канал представляет собой асимметричную пептид-липидную пору конической формы, малое устье которой образовано молекулами токсина, а большое — молекулами мембранных липидов (Malev et al., 2002, 2008; Ostroumova et al., 2007).

Целью данного исследования являлось выяснение особенностей диффузии ионов различного размера в каналах, образуемых СМЕ в БЛМ. Полученные в работе результаты свидетельствуют о различном взаимодействии проникающих анионов хлора и аспартата с селективным фильтром СМЕ-поры. Определены размер селективного фильтра ($r \sim 0.3$ нм) и его локализация в *цис*-устье СМЕ-канала.

Материал и методика

В работе использовали следующие реактивы: NaCl, MOPS, пентан, этанол, хлороформ и гексадекан (Sigma, США); аспартат натрия (NaAsp) и глюконат натрия (NaGlc) (Fluka, США); 1, 2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-

Таблица 1

Сравнение проводимостей ряда ионных каналов с проводимостями цилиндров соответствующего размера

Каналоформер	Проводимость наименьшего подуровня, пСм	Радиус наиболее узкого места в канале, нм	Проводимость цилиндра соответствующего размера, ^a пСм	Отношение проводимости цилиндра к проводимости поры
α -Латротоксин	112 (0.1 М КСl) ^b	0.94	760	7
Аламетицин	700 (1 М NaCl) ^b	1	5370	8
<i>Clostridium perfringens</i> β -токсин	60 (0.1 М NaCl) ^f	1.1	810	14
Колицин Ia	90 (1.77 М КСl) ^d	0.35	1450	16
Сирингопептин 25A	40 (0.1 М NaCl) ^e	0.9	660	17
Сирингомицин E	25 (1 М NaCl) ^ж	0.3	480	19
Бетиколин	16 (0.2 М КСl) ^з	0.8	1000	62
Столбнячный токсин	3 (0.1 М КСl) ^и	0.6	290	97
<i>Bacillus thuringiensis</i> δ -эндотоксин	21 (0.3 М КСl) ^к	1	2300	110
VDAC-порин 31 BM	2.7 (1.15 М КСl) ^л	0.9	6400	2400

^a При расчете проводимости аппроксимирующего канала цилиндра его длина принята равной толщине мембраны (5 нм). Данные взяты из работ: ^b Krasilnikov, Sabirov, 1992; ^в Безруков, Касианович, 2001; ^г Shatursky et al., 2000; ^д Krasilnikov et al., 1998; ^е Dalla Serra et al., 1999; ^ж Ostroumova et al., 2007; ^з Goudet et al., 1999; ^и Finkelstein, 1985; ^к Peyronnet et al., 2002; ^л Carneiro et al., 2003.

фосфохолин (ДФФХ) (Avanti Polar Lipids, США). СМЕ был выделен и очищен, как описано в работе (Bidwai et al., 1987), и любезно предоставлен д-ром Д. Такемото (Utah State University, США).

Формирование бислоиных липидных мембран проводили по методу Монталла и Мюллера (Montall, Mueller, 1972) путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстия в тефлоной пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два (*цис*- и *транс*-) отделения. Объем каждого отделения составлял 1.5 мл, толщина тефлоновой пленки — 10 мкм, диаметр отверстия — около 50 мкм. Перед началом процесса формирования мембраны отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали раствором гексадекана в пентане (объемное соотношение 1 : 10). Монослой формировали на границе вода-воздух из раствора 1 мг/мл липида в пентане.

Эксперименты проводили при одинаковом ионном составе водных растворов электролита (0.4 М NaCl, 0.4 М NaAsp и 0.4 М NaGlc), разделяемых ДФФХ-мембраной, кислотность растворов (рН 6) поддерживали буферной смесью 5 мМ MOPS/NaOH. Поскольку проводимость СМЕ-каналов в мембранах, омываемых растворами NaGlc, мала, выбрали близкую к пределу растворимости NaGlc концентрацию электролитов (0.4 М).

СМЕ добавляли к водной фазе *цис*-отделения камеры из водного раствора 1 мг/мл (рН 3) до конечной концентрации 1—5 мкМ. Электрофизиологические измерения проводили при комнатной температуре.

Измерение тока, протекающего через бислоиную липидную мембрану, осуществляли в режиме фиксации потенциала. Для подачи трансмембранного потенциала и отведения сигнала с мембраны использовали хлор-серебряные электроды, соединенные с растворами камеры через мостики, содержащие 1.5 % агарозы в растворе 2 М КСl. Положительным считали потенциал, вызывающий поток катионов из *цис*- в *транс*-отделение камеры.

Регистрацию трансмембранных токов проводили с помощью операционного усилителя с дискретным диапазоном сопротивлений обратной связи от 10^7 до 10^{10} Ом. Сигнал с выхода усилителя подавали через АЦП на вход компьютера. Наблюдения проводили с помощью специально созданной программы ARMEX.

Обработку записей трансмембранных токов осуществляли с использованием программного пакета Clampfit 9.0 (Axon Instruments, США). Статистический анализ данных проводили при помощи программы Origin 7.0 (OriginLab, США). При построении гистограмм флуктуаций трансмембранного тока использовали значения токов, определявшиеся по изменениям амплитуды тока при открывании (или закрывании) элементарных СМЕ-каналов. По оси ординат откладывали относительную частоту n/N , где n — число флуктуаций тока, отвечающих величине тока в заданном на оси абсцисс диапазоне, N — общее число измеренных флуктуаций тока. Распределение токов на гистограммах аппроксимировали плотностью нормального распределения и получали средние значения токов (I). Величины N , использовавшиеся для определения I , были от 100 до 500. Проводимость каналов (G) определяли как отношение I к трансмембранной разности потенциалов (V). При экстраполяции G в область $V \rightarrow 0$ погрешность оценивали, используя минимальную погрешность измерения проводимости каналов в этой системе.

При определении среднего времени пребывания каналов в открытом состоянии (времени жизни каналов) использовали только случаи функционирования одного элементарного СМЕ-канала. Поскольку среднее время жизни СМЕ-каналов не зависит от трансмембранного потенциала (Остроумова и др., 2005), для построения гистограмм объединяли данные, полученные при разных значениях V . Общее число измерений, используемых для построения таких гистограмм, было от 50 до 350. Среднее время жизни канала τ определяли как показатель экспоненциальной

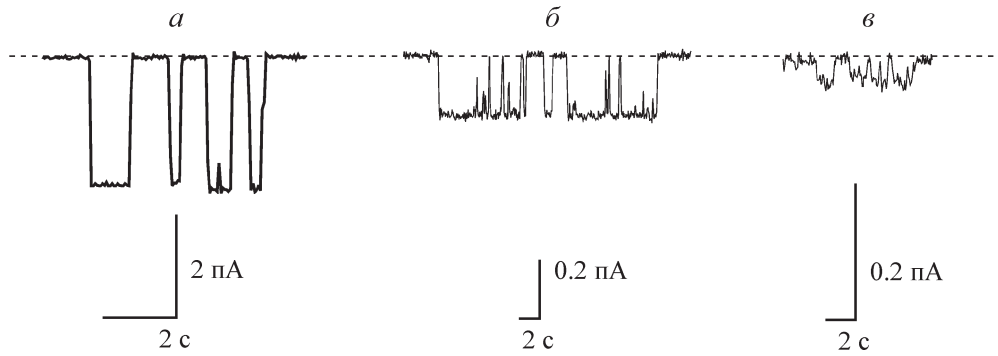
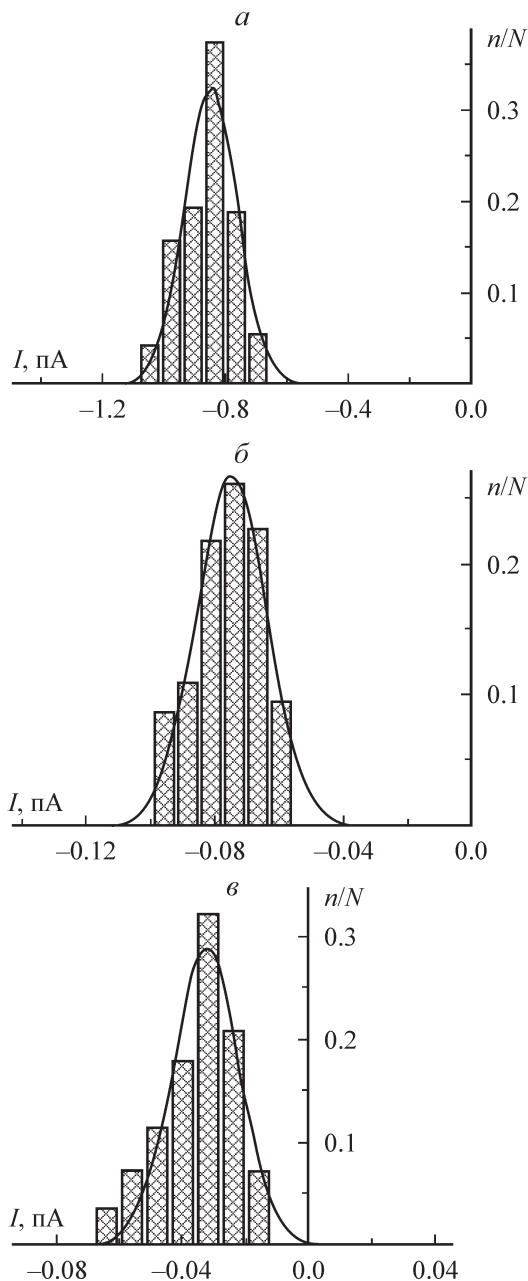


Рис. 1. Треки трансмембранных токов, протекающих через каналы, образованные сирингомизином Е (СМЕ).

Трансмембранный потенциал $V = -150$ мВ. Бислюи сформированы ДФФХ и омываются 0.4 М раствором: *a* — NaCl, *b* — NaAsp, *c* — NaGlc.

функции, аппроксимирующей полученное распределение. Для всех гистограмм при проверке гипотезы о законе распределения использовали критерий χ^2 ($P < 0.05$).



Измерения удельной электропроводности растворов к проводились при 25°C с использованием кондуктометра НН 8820. Диапазон концентраций (C), в котором производили измерения, составлял 10^{-4} —0.4 М. Измеряемые концентрации растворов приготавливали из исходного раствора (0.4 М) весовым способом. Погрешность измерения величин удельных электропроводностей растворов мала (2%), поэтому далее при проведении расчетов ее не учитывали. Предельную эквивалентную электропроводность λ^0 растворов NaAsp и NaGlc определяли при экстраполяции эквивалентной электропроводности ($\lambda = \kappa/C$) в область $C \rightarrow 0$. Экспериментально определенная величина $\lambda_{\text{NaCl}}^0 = 126.5 \text{ См} \cdot \text{см}^2/\text{г-экв}$ совпадает с табличным значением (Робинсон, Стокс, 1963). Радиусы анионов r_i (нм) рассчитывали по формуле Стокса: $r_i = 0.082/(\lambda_i^0 \cdot \eta)$, где i — анион Asp или Glc, η — вязкость растворителя (воды), при 25°C равная 0.0089 пз (Робинсон, Стокс, 1963). При этом λ_i^0 ($\text{См} \cdot \text{см}^2/\text{г-экв}$) находили из разности: $\lambda_i^0 = \lambda_{\text{Na}i}^0 - \lambda_{\text{Na}}^0$, используя табличное значение предельной эквивалентной электропроводности ионов натрия $\lambda_{\text{Na}}^0 = 50.1 \text{ См} \cdot \text{см}^2/\text{г-экв}$ и полученные величины λ_{NaAsp}^0 и λ_{NaGlc}^0 . Анионы аппроксимировали сферами. Величину λ_{Asp}^0 использовали и для определения числа переноса анионов Asp в воде при $C \rightarrow 0$ как $t_{\text{Asp}}^0 = \lambda_{\text{Asp}}^0 / \lambda_{\text{NaAsp}}^0$.

Результаты

Измерения флуктуаций токов, протекающих через одиночные элементарные СМЕ-каналы в мембранах, омываемых водными растворами различных солей, позволяют сравнить проводимости каналов G и средние времена их пребывания в открытом состоянии τ в этих системах. На рис. 1 приведены примеры флуктуаций тока в растворах натриевых солей хлора, аспартата и глюконата. Примеры гистограмм трансмембранных токов, соответствующих открыванию и закрыванию каналов при $V = -50$ мВ, представлены на рис. 2. На рис. 1 и 2 видно, что ток, протекающий через одиночный элементарный СМЕ-канал, зависит от состава околосмембранного раствора. Замена в растворе аниона хлора на анионы аспар-

Рис. 2. Гистограммы трансмембранных токов, протекающих через СМЕ-каналы.

По оси ординат — относительные частоты (n/N). $V = -50$ мВ. ДФФХ-мембраны омываются 0.4 М раствором: *a* — NaCl, $I_{\text{NaCl}} = -0.83 \pm 0.13$ пА; *b* — NaAsp, $I_{\text{NaAsp}} = -0.07 \pm 0.05$ пА; *c* — NaGlc, $I_{\text{NaGlc}} = -0.03 \pm 0.01$ пА.

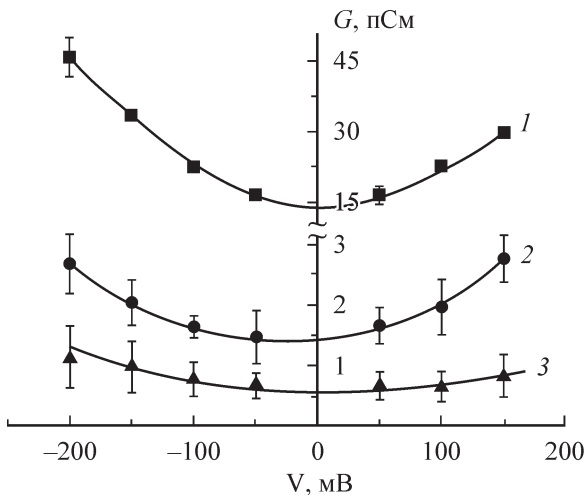


Рис. 3. Зависимость проводимости СМЕ-каналов (G) от V в ДФФХ-мембранах, омываемых 0.4 М раствором: NaCl (1), NaAsp (2), NaGlc (3).

тата, а затем глюконата приводит к последовательному уменьшению I .

Аналогичным образом были определены I для различных V и построены кривые $G = f(V)$ для СМЕ-каналов в указанных выше системах (рис. 3). Для количественного анализа влияния анионов на проводимость СМЕ-каналов использовали проводимости каналов при $V \rightarrow 0$ ($G(V \rightarrow 0) = G^0$). Соответствующая экстраполяция кривых на рис. 3 дает: $G_{\text{NaCl}}^0 = 13.1 \pm 0.5$ пСм, $G_{\text{NaAsp}}^0 = 1.4 \pm 0.1$ пСм, $G_{\text{NaGlc}}^0 = 0.6 \pm 0.2$ пСм.

На рис. 4 представлены гистограммы распределения времен жизни каналов в тех же системах. В табл. 2 приведены значения τ в мембранах, омываемых 0.4 М растворами натриевых солей хлора, аспартата и глюконата. Как видно из данных табл. 2, τ в присутствии анионов глюконата и хлора в пределах погрешности совпадает, а в присутствии анионов аспартата — в 2 раза больше.

Используя экспериментально найденные величины $\lambda_{\text{NaAsp}}^0 = 83.5$ См·см²/г-экв и $\lambda_{\text{NaGlc}}^0 = 79.0$ См·см²/г-экв, рассчитали радиусы анионов аспартата и глюконата и число переноса Asp⁻: $r_{\text{Asp}^-} = 0.28 \pm 0.01$ нм, $r_{\text{Glc}^-} = 0.32 \pm 0.01$ нм, $t_{\text{Asp}^-}^0 = 0.40 \pm 0.04$. Полученные значения радиусов анионов аспартата и глюконата оказались на 10 % меньше приведенных в работе Смита и соавторов (Smith et al., 1999), что может быть результатом различных способов аппроксимации пространственной формы ионов при расчете их размеров.

Обсуждение

Известно, что СМЕ-канал в ДФФХ-мембране гораздо более проницаем для анионов хлора, чем для катионов натрия. Число переноса в канале (t_{ch}) для анионов хлора составляет $t_{ch \text{ Cl}^-} = 0.97 \pm 0.02$ (Malev et al., 2002). Зная число переноса иона в канале, можно определить проводимость канала, обусловленную этим ионом, $G_i^0 = G_{\text{NaCl}}^0 \cdot t_{ch i^-}$. Соответствующие значения для Cl⁻ и Na⁺: $G_{\text{Cl}^-}^0 = 12.7 \pm 0.8$ пСм, $G_{\text{Na}^+}^0 = 0.4 \pm 0.3$ пСм. Последняя величина в пределах погрешности совпадает с экспериментально определенной проводимостью СМЕ-канала в ДФФХ-мембране, омываемой 0.4 М раствором NaGlc, при $V \rightarrow 0$ ($G_{\text{NaGlc}}^0 = 0.6 \pm 0.2$ пСм). На этом основании можно предположить, что

вследствие больших размеров анион глюконата не может пройти через канал и проводимость поры обусловлена проводимостью катионов натрия. В пользу этого предположения говорят результаты измерения селективности каналов, сформированных аналогом СМЕ, синрингопептином 25А (СП25А), в растворах, содержащих NaCl и NaGlc. Авторы показали, что проницаемость СП25А-канала для анионов глюконата в 50 раз меньше, чем хлора (Carpanetto et al., 2002). Радиус СП25А-канала (~0.9 нм; по: Dalla Serra et al., 1999) больше, чем СМЕ-канала (среднее значение для большего устья составляет ~0.7 нм; по: Ostroumova et al., 2007). Поэтому проницаемость СМЕ-ка-

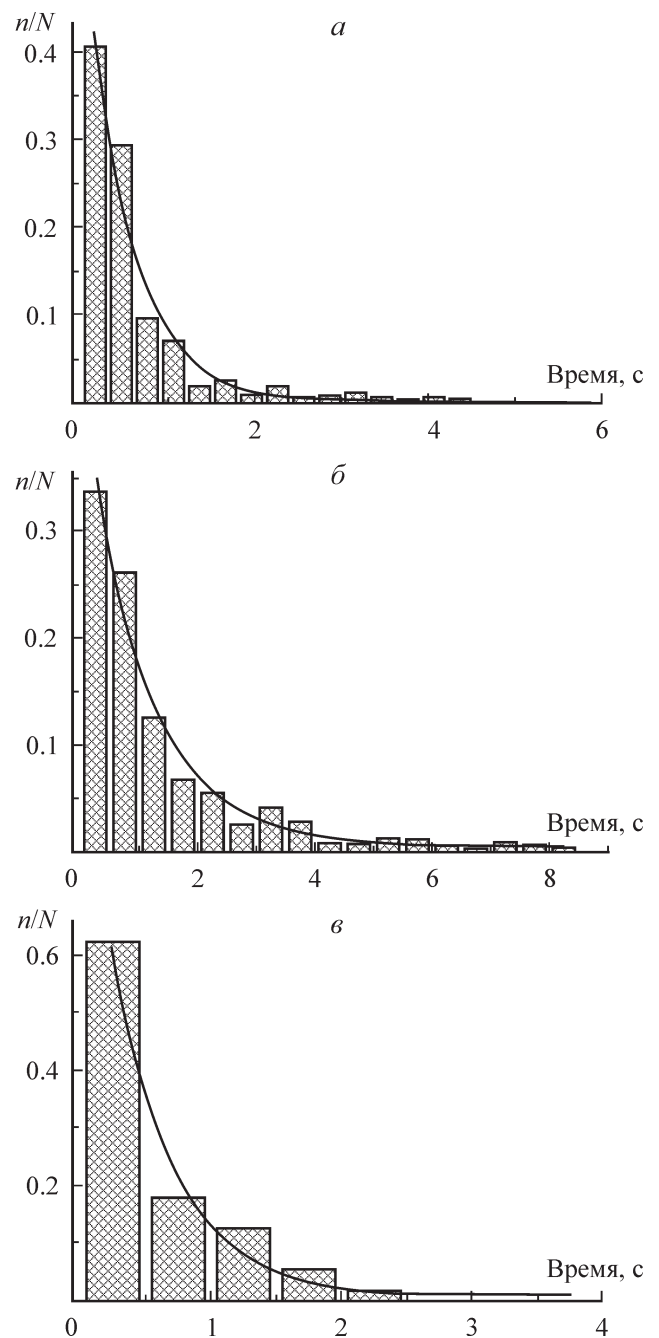


Рис. 4. Распределение времени жизни элементарных СМЕ-каналов в ДФФХ-мембранах, омываемых 0.4 М раствором: а — NaCl, б — NaAsp, в — NaGlc.

Т а б л и ц а 2

Средние времена жизни одиночных СМЕ-каналов (τ) в ДФФХ-мембранах в присутствии анионов различного размера

Состав раствора ^а	τ , с
NaCl	0.51 ± 0.04
NaAsp	1.05 ± 0.09
NaGlc	0.46 ± 0.06

^а Концентрации и pH всех околосмембранных растворов соответственно 0.4 М и 6.

налов для аниона глюконата должна быть меньше, чем для СП25А-каналов, т. е. близка к нулю.

Предположив, что в растворе NaAsp проводимость канала, обусловленная натрием, такая же, как в растворах NaCl или NaGlc, и равна 0.4—0.6 пСм, можно найти проводимость канала, обусловленную анионами Asp: $G_{Asp}^0 = 0.9 \pm 0.2$ пСм. Тогда отношение проводимости канала в растворе NaCl, обеспечиваемой анионами хлора, к проводимости канала в растворе NaAsp, обусловленной анионами аспартата, равно $G_{Cl}^0/G_{Asp}^0 = 14.1 \pm 4.0$.

Пренебрегая слабовыраженной зависимостью чисел переноса аниона Cl в водных растворах от концентрации соли (Никольский, 1964), можно найти удельную электропроводность аниона хлора в 0.4 М растворе NaCl как $\kappa_{Cl} = \kappa_{NaCl} \cdot t_{Cl}^0 = 23.4$ мСм/см, где $\kappa_{NaCl} = 37.8$ мСм/см. Удельная электропроводность анионов аспартата в растворе 0.4 М NaAsp равна $\kappa_{Asp} = \kappa_{NaAsp} \cdot t_{Asp}^0 = 7.8$ мСм/см, где $\kappa_{NaAsp} = 19.5$ мСм/см. Тогда соотношение $\kappa_{Cl}/\kappa_{Asp} = 3.0$.

При равенстве концентраций удельная электропроводность ионов в растворе или их проводимость в канале пропорциональна подвижности ионов в водном растворе (u_i) или в канале ($u_{ch i}$). На этом основании можно записать соотношение:

$$\left(\frac{G_{Cl}^0}{G_{Asp}^0} \right) / \left(\frac{\kappa_{Cl}}{\kappa_{Asp}} \right) = \left(\frac{u_{ch Cl}}{u_{Cl}} \right) / \left(\frac{u_{ch Asp}}{u_{Asp}} \right) = 4.7 \pm 1.3.$$

Сравнение соотношений подвижностей анионов хлора и аспартата в СМЕ-канале и в водном растворе показывает, что подвижность Asp⁻ в канале по сравнению с водным раствором приблизительно в 5 раз меньше, чем соответствующее соотношение для Cl⁻. Такое возможно, если анионы в канале идут не по механизму свободной диффузии, а существует электростатическое связывание ионов с каналом, энергия которого для Asp⁻ больше, чем для Cl⁻. О связывании ионов в СМЕ-поре говорят результаты наших измерений зависимости проводимости каналов при $V \rightarrow 0$ (G_T^0) от температуры (T) в 0.4 М растворе NaCl (Остроумова и др., 2009). Мы получили, что значение энергии активации транспорта ионов через СМЕ-канал (7 ккал/моль) в 2 раза превышает величину энергии активации свободной диффузии ионов в водном растворе (~3.3 ккал/моль).

В связи с наличием специфического взаимодействия проникающих ионов с порой представляет интерес обнаруженное различие τ в исследованных системах (табл. 2). Среднее время пребывания токсинных каналов в открытом состоянии в 2 раза меньше в мембранах, омываемых растворами NaCl и NaGlc, по сравнению с NaAsp. Время жизни СМЕ-каналов коррелирует с размером иона, осу-

ществляющего проводимость. В системах, содержащих NaCl и NaGlc, проводимость каналов обусловлена ионами Cl⁻ и Na⁺, размер которых значительно меньше, чем Asp⁻, в основном определяющих проводимость поры в растворе NaAsp.

Электростатическое взаимодействие проникающих анионов указывает на наличие селективного фильтра в водной поре СМЕ-канала. Таким фильтром должен служить наиболее узкий участок канала, имеющий положительный заряд. В *цис*-устье канала находятся молекулы СМЕ, несущие положительные заряды, и оно имеет в 2 раза меньший радиус, чем *транс*-устье (Ostroumova et al., 2007). Совпадение определенного ранее радиуса *цис*-устья канала (0.30 ± 0.05 нм) (Ostroumova et al., 2007) и радиуса не проникающего через канал аниона глюконата (0.32 ± 0.01 нм) дает основание считать, что селективный фильтр канала находится в *цис*-устье и его радиус составляет 0.31 ± 0.01 нм.

Таким образом, полученные в работе результаты свидетельствуют о различном электростатическом взаимодействии анионов Cl⁻ и Asp⁻ с селективным фильтром СМЕ-канала, который находится в области *цис*-устья канала.

Авторы выражают благодарность В. В. Малеву за плодотворное обсуждение результатов, Ф. А. Гурьеву за участие в измерениях и Д. Такемото за предоставление синрингомицина Е.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00883-а), программы «Ведущие научные школы» (проект 1135.2008.4) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Безруков С. М., Касианович Д. Д. 2001. Нейтральные полимеры в нанопорах аламетина и гемолитина. Биол. мембр. 18 (6) : 451—455.
- Никольский Б. П. 1964. Справочник химика. Л.: Химия. Т. 3. 1008 с.
- Остроумова О. С., Гурьев Ф. А., Малев В. В. 2009. Температурные зависимости параметров, характеризующих функционирование СМЕ-каналов в липидных бислоях. Биол. мембр. 26 (4) : 324.
- Остроумова О. С., Гурьев Ф. А., Такемото Д., Щагина Л. В., Малев В. В. 2005. Кинетические характеристики одиночных ионных каналов и стационарная проводимость модифицированных фитотоксинами липидных бислоев. Цитология. 47 (4) : 338—343.
- Остроумова О. С., Малев В. В., Щагина Л. В. 2006. Кооперативность функционирования ионных каналов, образуемых фитотоксинами, синрингомицином Е и синрингостатином А. Биол. мембр. 23 (5) : 412—419.
- Робинсон Р., Стокс Р. 1963. Растворы электролитов. М.: Изд-во иностр. лит-ры. 646 с.
- Щагина Л. В., Каулин Ю. А., Фейгин А. М., Такемото Д., Бранд Д., Малев В. В. 1998. Зависимость свойств ионных каналов, образованных антибиотиком синрингомицином Е в липидных бислоях, от концентрации электролита в водной фазе. Биол. мембр. 15 (4) : 433—446.
- Bidwai A. P., Zhang L., Bachmann R. C., Takemoto J. Y. 1987. Mechanism of action of *Pseudomonas syringae* phytotoxin, syringomycin: stimulation of red beet plasma membrane ATPase activity. Plant Physiol. 83: 39—43.
- Buber E., Stindl A., Acan N. L., Kocagöz T., Zocher R. 2002. Antimycobacterial activity of lipopeptides produced by *Pseu-*

domonas syringae pv. *syringae* B359. Nat. Prod. Lett. 16 : 419—423.

Carneiro C. M., Merzlyak P. G., Yuldasheva L. N., Silva L. G., Thinnes F. P., Krasilnikov O. V. 2003. Probing the volume changes during voltage gating of Porin 31BM channel with nonelectrolyte polymers. Biochim. biophys. acta. 1612 : 144—153.

Carpaneto A., Dalla Serra M., Menestrina G., Fogliano V., Gambale F. 2002. The phytotoxic lipodepsipeptide syringopeptin 25A from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* forms ion channels in sugar beet vacuoles. J. Membr. Biol. 188 : 237—248.

Dalla Serra M., Fagioli G., Nordera P., Bernhart I., Della Volpe C., Di Giorgio D., Ballio A., Menestrina G. 1999. The interaction of lipodepsipeptide toxins from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* with biological and model membranes: a comparison of syringotoxin, syringomycin, and two syringopeptins. Mol. Plant Microbe Interact. 12 : 391—400.

Finkelstein A. 1985. The ubiquitous presence of channels with wide lumens and their gating by voltage. Ann. N. Y. Acad. Sci. 456 : 26—32.

Goudet C., Benitah J. P., Milat M. L., Sentenac H., Thibaud J. B. 1999. Cluster organization and pore structure of ion channels formed by beticolin 3, a nonpeptidic fungal toxin. Biophys. J. 77 : 3052—3059.

Kaulin Y. A., Schagina L. V., Bezrukov S. M., Malev V. V., Feigin A. M., Takemoto J. Y., Teeter J. H., Brand J. G. 1998. Cluster organization of ion channels formed by the antibiotic syringomycin E in bilayer lipid membranes. Biophys. J. 74 : 2918—2925.

Krasilnikov O. V., Da Cruz J. B., Yuldasheva L. N., Varanda W. A., Nogueira R. A. 1998. A novel approach to study the geometry of the water lumen of ion channels: colicin Ia channels in planar lipid bilayers. J. Membr. Biol. 161 : 83—92.

Krasilnikov O. V., Sabirov R. Z. 1992. Comparative analysis of latrotoxin channels of different conductance in planar lipid bilayers. Evidence for cluster organization. Biochim. biophys. acta. 1112 : 124—128.

Lavermicocca P., Iacobellis N. S., Simmako M., Graniti A. 1997. Biological properties and spectrum of activity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* toxins. Physiol. Mol. Plant Pathol. 50 : 129—140.

Malev V. V., Ostroumova O. S., Takemoto J. Y., Schagina L. V. 2008. Voltage-dependent ion channels induced by cyclic lipodepsipeptides in planar lipid bilayers: structure, properties, and resemblance to native channels. In: Advances in planar lipid bilayers and liposomes. Amsterdam. Elsevier Inc. 8 : 59—106.

Malev V. V., Schagina L. V., Gurnev Ph. A., Takemoto J. Y., Nestorovich E. M., Bezrukov S. M. 2002. Syringomycin E channel: a lipidic pore stabilized by lipopeptide? Biophys. J. 82 : 1985—1994.

Montall M., Muller P. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and study of their electrical properties. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 65 : 3561—3566.

Ostroumova O. S., Gurnev P. A., Schagina L. V., Bezrukov S. M. 2007. Asymmetry of syringomycin E channel studied by polymer partitioning. FEBS Lett. 581 : 804—808.

Peyronnet O., Nieman B., Genereux F., Vachon V., Laprade R., Schwartz J. L. 2002. Estimation of the radius of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* Cry1C delta-endotoxin in planar lipid bilayers. Biochim. biophys. acta. 1567 : 113—122.

Shatarsky O., Bayles R., Rogers M., Jost B. H., Songer J. G., Tweten R. K. 2000. Clostridium perfringens beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers. Infect. Immun. 68 : 5546—5551.

Smith S. S., Steinle E. D., Meyerhoff M. E., Dawson D. C. 1999. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: physical basis for lyotropic anion selectivity patterns. J. Gen. Physiol. 114 : 799—818.

Sorensen K. N., Kim K. H., Takemoto J. Y. 1996. In vitro antifungal and fungicidal activities and erythrocyte toxicities of cyclic lipodepsinonapeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Antimicrob. Agents Chemother. 40 : 2710—2713.

Takemoto J. Y., Brand J. G., Kaulin Y. A., Malev V. V., Schagina L. V., Blasko K. 2003. The syringomycins: lipodepsipeptide pore formers from plant bacterium *Pseudomonas syringae*. Pore forming peptides and protein toxins. London: Taylor&Francis. 5 : 260—271.

Поступила 9 IV 2009

CONDUCTANCE OF PHYTOTOXIN CHANNELS IN THE PRESENCE OF LARGE ORGANIC IONS

O. S. Ostroumova,¹ S. S. Efimova, L. V. Schagina

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: ostroumova@mail.cytspb.rssi.ru

In this study we evaluated the effect of penetrating anion size on the properties of the channels formed by cyclic lipodepsipeptide syringomycin E (SRE) in bilayer lipid membranes. Conductance and the mean lifetime of the SRE channels have been measured in 0.4 M solutions of sodium chloride, aspartate, and gluconate. Comparison of the results of conductometrical and electrophysiological measurements has shown: 1) ratio of mobilities of aspartate anions in the channel and in the water solution is 5 times lower than that for chlorine anions; 2) conductivity of the channels in the presence of sodium gluconate is due mainly to cations. The results obtained indicate binding of the penetrating anions to the selective filter of the SRE pore. The radius of the SRE channel selective filter has been established ($r \sim 0.3$ nm) and its localization in the *cis*-mouth of the pore has been found.

Key words: bilayer lipid membranes, channel-forming toxins, single ion channels, selective filter of the pore.