

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ПЕТЕРБУРГСКИЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ
им. Б.П. КОНСТАНТИНОВА

На правах рукописи

ОРЛОВ Юрий Николаевич

НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ИЗУЧЕНИИ СТРУКТУРНОЙ
И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ СИСТЕМ АНИОННОГО
ТРАНСПОРТА В БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ

03.00.02 – биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Санкт-Петербург
2002 г.

Работа выполнена в лаборатории биополимеров Отделения молекулярной и радиационной биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Никифоров А.А.,
доктор физико-математических наук
Бирштейн Т.М.,
доктор физико-математических наук
Тулуб А.А.

Ведущая организация: Институт цитологии РАН

Защита диссертации состоится " 13 " мая 2002 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.229.25 при Санкт-Петербургском государственном техническом университете по адресу: 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Санкт-Петербургского государственного технического университета

Автореферат разослан " _____ " _____ 2002 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

О.Л. Власова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Важным фактором адаптации организмов к условиям существования, особенно в связи с постоянным ростом антропогенных загрязнений окружающей среды, является их способность эффективно удалять из клеток и организма чужеродные органические соединения, как эндогенного, так и экзогенного происхождения. К таким соединениям относятся ксенобиотики, животные и растительные токсины, лекарственные препараты (включая антибиотики), а также продукты их детоксикации.

Очищение внутриклеточной среды от чужеродных соединений обеспечивается благодаря наличию в плазматических мембранах всех клеток специальных белков-переносчиков. Наиболее распространенная и многочисленная группа таких белков входит в суперсемейство, получившее в литературе название ABC-переносчики (Veen, Konings, 1998; Holland, Blight, 1999). Некоторые представители этого суперсемейства очень специфичны по отношению к своим субстратам, другие проявляют мультиспецифичность и могут транспортировать химические вещества разной структуры. К последним относится MRP семейство переносчиков, ставшее известным в связи с явлением множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток (Silverman, 1999).

Другая важная группа переносчиков обеспечивает экскрецию чужеродных веществ на уровне организма путем трансцеллюлярного транспорта. Она включает две системы, которые получили название система транспорта органических анионов и система транспорта органических катионов (Ullrich, 1997; Sweet, Pritchard, 1999). У позвоночных животных эти системы обнаружены главным образом в клетках печени и проксимальных канальцев почки (ПКП), и есть данные, что они также присутствуют в хорриодном сплетении желудочков головного мозга, цилиарном теле глаза и легких (Бреслер, Никифоров, 1981; Remon et al., 2000). При исследовании механизма работы системы транспорта органических анионов в качестве основного модельного объекта используется почечная система транспорта. *p*-Аминогиппуровая кислота (ПАГ) служит при этом основным маркерным субстратом, а пробенецид - специфическим конкурентным ингибитором. Эта система и была выбрана как основной объект в настоящем исследовании.

Экскреция органических анионов в почечных канальцах представляет собой трансцеллюлярный перенос, осуществляемый в два этапа: через базолатеральную мембрану (БЛМ) в цитоплазму и из нее через апикальную мембрану (АМ) в просвет канальца. Предшествующие функциональные

исследования этой системы показали, что как в БЛМ, так и в АМ присутствуют переносчики, осуществляющие транспорт чужеродных органических анионов, что механизмы переноса в них различны и что в обеих мембранах существует более чем один путь транспорта для этих веществ (Ullrich, 1997; Burckhardt et al., 2001).

Считается доказанным, что основным механизмом переноса ПАГ через БЛМ является ПАГ/ α -кетоглутаратный (ПАГ/ α -КГ) антипорт, который функционирует в кооперации с Na^+, K^+ - АТФазой и Na^+/α -КГ симпортом (Pritchard, Miller, 1993; Ullrich, 1997). В АМ предполагается наличие как обменного механизма ПАГ/Х (где Х - неидентифицированный анион), так и электрогенного механизма движения ПАГ по градиенту его концентрации (Burckhardt et al., 2001).

На современном этапе исследований наиболее актуальным является вопрос об идентификации переносчиков, вовлеченных в процесс экскреции чужеродных органических анионов. Важным инструментом в его решении стал метод молекулярно-биологического клонирования, основанный на экспрессии транспортной функции с помощью фракционированной мРНК. Он позволяет определить аминокислотную последовательность переносчика по последовательности кДНК, сконструированной на основе той фракции мРНК, которая дает максимальный транспортный сигнал при экспрессии (Burckhardt, Wolff, 2000). С помощью такого подхода удалось экспрессировать транспорт ПАГ в ооцитах лягушки, а также в клеточных линиях CHO, COS-7, HeLa и LLC-PK1 (Sweet et al., 1997; Kuze et al., 1999; Run et al., 1999; Burckhardt et al., 2001). К настоящему времени имеются данные по клонированию переносчиков ПАГ из почки мыши (mOAT1), крысы (rOAT1), человека (hOAT1), камбалы (fOAT1) и других видов. Эти переносчики объединяются в группу под общим названием OAT и именно им приписывается функция ПАГ/ α -КГ антипорта в БЛМ (Remon et al., 2000; Burckhardt et al., 2001). Клонирован также переносчик, осуществляющий Na^+/α -КГ симпорт, получивший название NaDC-3, который может функционировать в кооперации с OAT1, обеспечивая противогradientный транспорт ПАГ через БЛМ (Pajor, 2000). Этот белок классифицирован (TC 2.A.47.1.4. см. <http://tcd.db.ucsd.edu/tcd.db/tcclass.php>) как принадлежащий семейству DASS переносчиков. Из группы OAT классифицированы только rOAT1 (TC 2.A.1.19.4) и rOAT3 (TC 2.A.1.19.7), которые были клонированы из почки и мозга крысы. Эти белки эволюционно отнесены к семейству переносчиков органических катионов OCT. Остальные переносчики группы OAT еще предстоит классифицировать.

Результаты молекулярно-генетического анализа переносчиков АМ не так значительны. Клонирован полипептид из печени крысы, получив-

ший название Oatp1 (Jacquemin et al., 1994), и его гомологи из почки, названные Oat-k1 и Oat-k2 (Saito et al., 1996; Masuda et al., 1999). В иммуногистохимических экспериментах Oatp1 был зарегистрирован в АМ клеток проксимальных канальцев (Bergwerk et al., 1996). Однако при экспрессии ни Oatp1-, ни Oat-k-полипептиды не транспортировали ПАГ (Sweet, Pritchard, 1999). Таким образом, вопрос о том, какие переносчики АМ вовлечены в систему почечной экскреции чужеродных органических анионов, до сих пор остается открытым.

Другой подход в изучении структурной организации почечной системы транспорта органических анионов основывается на методе аффинных меток. Несмотря на большое количество попыток (Ullrich et al., 1987), в литературе опубликована только одна работа по аффинной идентификации переносчиков ПАГ. Голдингер с соавторами (Goldinger et al., 1984) использовал фотоаффинную метку NAR-таурин (структурный аналог ПАГ) и везикулярные препараты БЛМ и АМ коры почки кролика. Было выявлено четыре белка БЛМ с молекулярной массой 26, 52, 65 и 108 кДа, при этом ни один белок АМ не был помечен.

В целом, успехи молекулярно-биологического подхода в исследовании структурной организации почечной системы транспорта органических анионов несомненны. Тем не менее, уже сейчас ясно, что этот подход не дает ответа на многие вопросы. Во-первых, до сих пор не идентифицирован и не охарактеризован биохимически или иммунологически ни один белок группы ОАТ. По-видимому, здесь имеются принципиальные трудности, связанные с низким уровнем экспрессии. Во-вторых, известно, что функционирование интегральных мембранных белков (и переносчиков в том числе) зависит от их ближайшего липидного окружения (Le Grimmellec et al., 1992). В экспериментах по экспрессии транспортные белки попадают в липидное окружение, которое может существенно отличаться от окружения в эпителии почечных канальцев, и это может влиять на их функционирование. И, наконец, возможности молекулярно-биологического подхода в изучении механизмов функционального взаимодействия переносчиков ОАТ с другими переносчиками ограничены необходимостью одновременной экспрессии всех переносчиков, участвующих в кооперативном транспорте.

Исследование функциональных взаимосвязей мембранных переносчиков идёт довольно давно. В литературе имеется немало примеров, указывающих на кооперативное функционирование переносчиков различных типов (Guggino, Guggino, 1989; Pritchard, Miller, 1993; Run et al., 1999). Известно, что сопряжение котранспортных (симпорт) и обменных (антипорт) потоков может приводить к противогradientному транспорту мета-

болитов. Так осуществляется, например, реабсорбция в почечных канальцах мочевой кислоты (Roch-Ramel et al., 1996), ди- и трикарбоновых кислот (Massad, et. al., 1987), ионов хлора и натрия (Baum, 1988), сульфата (Low et. al., 1984) и бикарбоната (Grassl et. al., 1987). Противогradientный транспорт чужеродных органических анионов осуществляется за счет сопряжения Na^+ / α -КГ симпорта и ПАГ/ α -КГ антипорта в БЛМ клеток проксимальных канальцев (Burckhardt et al., 2001). Видимо, такой же механизм сопряжения, по крайней мере у некоторых видов животных, есть и в АМ (Schmitt, Burckhardt, 1993; Roch-Ramel et al., 1996).

Хотя исследования механизмов кооперативной работы переносчиков идут давно, до сих пор они носят феноменологический характер. Кинетические модели, описывающие сопряжение потоков, которые осуществляются через переносчики с различным механизмом транспорта, в литературе не рассматривались. Учитывая то, что сопряжение симпорта и антипорта является характерной чертой клеток почечной системы транспорта органических анионов, разработка математической модели для описания такого вида сопряжения представлялась нам важной задачей.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является разработка основ нового направления, а именно: физико-химическое исследование структурной организации систем анионного транспорта в биологических мембранах путем использования специфических аффинных меток в условиях активации транспортных потоков и математического моделирования сопряжения транспортных потоков, относящихся к отдельным переносчикам системы. Для достижения поставленной цели необходимо было найти решение следующих задач:

1. Используя везикулярные препараты АМ проксимальных канальцев почки как модель для исследования механизмов транспорта органических анионов, изучить кинетику транспорта ПАГ и выяснить, каково влияние на нее фазового состояния липидного бислоя АМ.
2. Синтезировать аффинные зонды, пригодные для идентификации переносчиков в условиях активации транспортных потоков. Разработать подход по идентификации переносчиков транспорта органических анионов с использованием таких зондов и оценить количественное содержание переносчиков в мембране.
3. Разработать математическую модель для описания сопряжения транспортных потоков, осуществляющихся посредством обменных переносчиков (антипорт) и переносчиков, функционирующих по механизму симпорта (котранспорта). Продемонстрировать работу модели с использованием экспериментальных данных по сопряжению Na^+ / α -КГ симпорта и ПАГ/ α -КГ антипорта.

Научная новизна работы. Определены кинетические характеристики транспорта ПАГ в везикулярных препаратах АМ клеток почечных канальцев крысы и константа ингибирования его пробенецидом. Методом ЭПР-спектроскопии показано наличие термотропного фазового перехода липидного бислоя АМ в температурной области 21-30°C. Продемонстрировано, что фазовое состояние липидного бислоя АМ влияет как на кинетику транспорта ПАГ, так и на способность пробенецида ингибировать этот транспорт.

Синтезирован новый необратимый ингибитор транспорта органических анионов в проксимальных канальцах почки – бромацетилованный-п-аминогиппурат (BrAcПАГ). Показано, что BrAcПАГ способен полностью подавлять транспорт органических анионов через АМ почечных канальцев.

Разработан новый метод идентификации переносчиков системы транспорта органических анионов, основанный на использовании аффинных меток с низкой реакционной способностью в условиях активации транспортных потоков. Благодаря использованию таких аффинных меток (BrAc[³H]ПАГ и диазо[³H]гиппурата (диазо[³H]ПАГ)) впервые в апикальной и базолатеральной мембранах проксимальных канальцев почки крысы выявлены полипептиды молекулярного веса 98 кДа и 28 кДа, которые идентифицируются как структурные элементы системы транспорта органических анионов.

Разработана математическая модель и программа для компьютерного моделирования сопряжения котранспортных и обменных потоков в биологических мембранах. На основе использованной модели проведена оценка частоты спонтанной (без субстрата) переориентации переносчика ПАГ с одной стороны мембраны на другую.

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе дано обоснование нового подхода для изучения структурной и функциональной организации систем транспорта органических анионов в биологических мембранах.

Продемонстрирована перспективность применения аффинных меток с низкой реакционной способностью для идентификации переносчиков органических анионов, находящихся в условиях активации транспортных потоков. Разработанная экспериментальная модель может быть использована для идентификации переносчиков в других мембранах и других видах клеток.

Предложенная математическая модель сопряжения транспортных потоков, осуществляющихся посредством механизма симпорта и антипорта, позволяет оценить частоту переориентации незагруженного субстратом

обменного переносчика с одной стороны мембраны на другую – параметр, который трудно определить прямыми методами. Модель может быть использована для прогнозирования характера кооперативной работы других переносчиков, функционирующих по механизму симпорта и антипорта.

На защиту выносятся основные положения и результаты:

1. Транспорт органических анионов через апикальную мембрану проксимальных канальцев почки зависит от фазового состояния ее липидного бислоя: изменение фазового состояния АМ существенным образом влияет на значение кинетических параметров транспорта ПАГ.
2. Обоснование подхода, использованного для идентификации переносчиков системы транспорта органических анионов АМ, включающего: (а) применение аффинных меток низкой реакционной способности в условиях активации транспортных потоков, (б) выбор аффинного реагента; (в) демонстрацию его способности ингибировать транспорт органических анионов необратимо; (г) аффинную идентификацию переносчиков системы с помощью радиоактивно меченных аффинных реагентов в присутствии и в отсутствие ингибиторов транспорта органических анионов; (д) анализ результатов ковалентного связывания аффинных меток с мембранными белками методом SDS электрофореза.
3. Математическая модель сопряжения транспортных потоков, осуществляющихся посредством механизма симпорта и антипорта. Применение модели для описания собственных и литературных экспериментальных данных на примере сопряжения Na^+ / α -кетоглутаратного симпорта и ПАГ/ α -кетоглутаратного антипорта базолатеральной мембраны проксимальных канальцев почки.

Апробация работы. Материалы работы докладывались на 8 Всесоюзной конференции по физиологии почек и водно-солевого обмена (Ленинград, 1989 г.), Всероссийском симпозиуме "Мембранный транспорт и функции клетки" (Санкт-Петербург, 25-27 октября, 1994 г.), I(XI) Международном совещании по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 1996 г.), XXXIII International Congress of Physiological Sciences (St.Petersburg, June 30-July 5, 1997), II Съезд биофизиков России, (Москва, 23-27 августа, 1999 г), на школе ПИЯФ, РАН (1996, 1998 гг.). По теме диссертации опубликована 31 работа, из них основное содержание работы изложено в 23 работах.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 11 разделов, выводов и списка литературы, включающего 419 работ. Работа изложена на 197 страницах, включая список литературы (31 страница), 8 таблиц и 53 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Разработка метода по идентификации переносчиков почечной системы транспорта чужеродных органических анионов была выполнена на везикулярных препаратах апикальной мембраны. Идентификация переносчиков проводилась с использованием препаратов как АМ, так и БЛМ а исследование механизма сопряжения $\text{Na}^+/\alpha\text{-КГ}$ симпорта и ПАГ/ $\alpha\text{-КГ}$ антипорта было выполнено на везикулярных препаратах только БЛМ. Такой выбор был сделан из следующих соображений: (1) на АМ не проведена аффинная идентификация переносчиков чужеродных органических анионов почечных канальцев; (2) сопряжение $\text{Na}^+/\alpha\text{-КГ}$ симпорта и ПАГ/ $\alpha\text{-КГ}$ антипорта в базолатеральной мембране является основным механизмом, за счет которого обеспечивается противогradientная экскреция чужеродных органических анионов в почечных канальцах; (3) везикулярные препараты как АМ, так и БЛМ свободны от метаболических реакций и позволяют легко менять состав среды инкубации по обе стороны мембраны.

Выделение везикулярных препаратов АМ и БЛМ. Препараты обеих мембран выделялись из коры почки белых беспородных крыс (преимущественно самцов), весом 180-250 г. АМ и БЛМ разделялись методом катионной (Mg^{2+}) преципитации с последующей очисткой БЛМ в градиенте плотности сахарозы (Booth, Kenny, 1974). Чистота мембранных фракций контролировалась методом электронной микроскопии, а также с помощью следующих маркерных ферментов: для БЛМ – Na^+, K^+ -АТФазы (ЕС 3.6.1.3), для АМ – щелочной фосфатазы (ЕС 3.1.3.1), для мембран эндоплазматического ретикулаума и митохондрий – глюкозо-6-фосфатазы (ЕС 3.1.3.9) и сукцинатдегидрогеназы (ЕС 1.3.99.1), соответственно. На конечной стадии выделения выход очищенных фракций АМ и БЛМ составлял около 10-15%, относительно гомогената, а обогащение по соответствующему маркерному ферменту было около 10. После выделения мембранные фракции помещались в среду, содержащую 100-300 мМ маннитол (в зависимости от целей эксперимента), 20 мМ Трис-НЕРЕС, 2 мМ MgCl_2 , pH=7,5.

*Определение уровня накопления [^3H]-*n*-аминогиппуровой кислоты (^3H]ПАГ) в везикулярных мембранных препаратах.* Изучение транспорта [^3H]ПАГ (Amersham) в везикулах АМ и БЛМ проводили методом фильтрации на нитроцеллюлозных фильтрах ("Сынпор") с диаметром пор 0,4 мкм. Продолжительность и температура инкубации указаны в подписях к рисун-

кам. На дно пробирки наносили 10 мкл суспензии везикул (100 мкг белка) и реакцию начинали добавлением 60 мкл среды инкубации следующего состава: 100-300 мМ маннитол, 20 мМ Трис, 2 мМ MgCl₂, 100 мкМ [³H]ПАГ, рН 7,5. Среда инкубации могла меняться в зависимости от целей эксперимента, и тогда ее состав указан в подписях к рисункам. Транспорт останавливали добавлением 2 мл холодного (10 °С) раствора такого же состава, как и среда инкубации, но без [³H]ПАГ. Содержимое пробирки выливали на фильтр, и внешняя среда отделялась от везикул фильтрацией при небольшом (0,1 - 0,2 атм) разрежении. Затем фильтр промывали 5 мл того же раствора. Контрольная проба (фон фильтра) определялась так же, только к суспензии везикул вначале добавляли 2 мл холодного раствора, а затем 60 мкл среды инкубации, содержащей субстрат. Радиоактивность высушенных фильтров определяли в сцинтиляторе ЖС-107 на счетчике SL-30 (Франция). Во всех экспериментах было выполнено условие равенства осмомолярности внешней среды и среды внутреннего пространства везикул.

Метод введения ЭПР-зонда в липидный бислой. Для определения области термотропного фазового перехода липидного бислоя АМ был использован метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Спектры ЭПР были получены на безмодуляционном спектрометре трехсантиметрового диапазона (Исаев-Иванов и др., 1976). В качестве зонда использовалась 5-доксилстеариновая кислота (Chemical Aldrich Company), которая встраивалась в липидный бислой при помощи следующей процедуры (Hise et al., 1984). 10 мкг (50 мкл) 5-доксилстеариновой кислоты в растворе изобутанола помещали на дно стеклянной ампулы и высушивали в струе аргона так, чтобы 5-доксилстеариновая кислота могла образовать тонкую пленку на поверхности ампулы. Затем ампулу запаивали под аргоном и хранили при температуре минус 20 °С до использования.

После выделения АМ стандартным методом конечный осадок переводили в буфер, содержащий 100 мМ NaCl, 20 мМ Трис, рН 7,4. Мембранную суспензию (4 – 6 мг белка) вливали в ампулу с ЭПР-зондом и пробу интенсивно перемешивали при 36 °С в течение 30 мин. По окончании инкубации мембранную суспензию разбавляли десятикратно холодным (4 °С) буфером, содержащим 100 мМ маннитол, 20 мМ Трис, 0,5 мМ ЭДТА, рН 7,4, и центрифугировали 30 минут при 25000 g. Осадок переводили в 150-200 мкл того же буфера. Конечная концентрация белка составляла 20-25 мг на 1 мл. Такая процедура встраивания ЭПР-зонда в липидный бислой давала молярное соотношение 5-доксилстеарата/липид не выше 1%.

Электронная микроскопия фракции АМ. Для контроля чистоты и морфологии фракции АМ проводилось электронно-микроскопическое исследование. Для фиксации осадок АМ заливали буфером выделения с добавкой 2%

глутарового альдегида, выдерживали в течение 3-4 часов, затем промывали 4-5 раз буфером выделения, после чего образец обезвоживали в спиртовых растворах возрастающей концентрации и заливали в аральдит. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Просмотр и фотографирование производили на электронном микроскопе TESLA-613. *Синтез бромацетилированной n-аминогиппуровой кислоты (BrAcПАГ).* Синтез BrAcПАГ проводили следующим образом: в 50 мл сухого диоксана растворяли 5,5 г бромацетата, раствор охлаждали до 12-15°C и добавляли 4,1 г сухого дициклогексилкарбодиимида. Через 20 мин. колбу с реакционной смесью помещали в водяную баню с температурой 25°C на 10 мин. Дициклогексилмочевину удаляли фильтрацией. Получившийся фильтрат порциями по 1 мл добавляли к 20 мл водного раствора ПАГ (50 мг/мл) в 0,1 N NaHCO₃ (pH= 8-9). Значение pH реакции поддерживали равным 8-9 при помощи 0,5 N NaOH. Реакцию вели на ледяной бане. По окончании реакции смесь упаривали досуха, осадок растворяли в 100 мл воды и закисляли до pH=2,5 -3, 1 M HCl. Осадок отделяли фильтрацией и отбрасывали, а фильтрат упаривали до 20 мл, при этом выпадал осадок (BrAcПАГ), который собирали, промывали ледяной водой и перекристаллизовывали из воды. Выход реакции составлял 55-65 %.

Синтез BrAc[³H]ПАГ был осуществлен на основе [³H]ПАГ (1 mCi) аналогичным способом, но в масштабе 1:500. Очистка BrAc[³H]ПАГ была выполнена сразу после стадии конденсации методом бумажной хроматографии в смеси н-бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:5). Удельная активность BrAc[³H]ПАГ составляла 11-15 ГБк/мМоль.

Синтез диазогиппуровой кислоты. Диазогиппуровая кислота была синтезирована методом диазотирования ПАГ и использовалась в дальнейшей работе без предварительной очистки. К 10 мл охлажденного до 0°C раствора ПАГ в 0,1 N HCl постепенно добавляли 10 мл 1 M раствора NaNO₂ при той же температуре. За ходом реакции следили методом тонкослойной хроматографии в среде н-бутанол:уксусная кислота:вода (12:3:5). Радиоактивно меченный диазо[³H]гиппурат был синтезирован по такой же методике, но в масштабе 1:500. Конечная удельная активность метки составляла 10-12 ГБк/ммоль.

Обработка фракции AM BrAcПАГ. К 0,1 мл суспензии везикул в буфере выделения (концентрация по белку 10-12 мг/мл) при 37°C добавляли аликвоту BrAcПАГ. Концентрация аффинной метки и время обработки зависели от цели конкретного эксперимента и указаны в подписях к рисункам. По окончании реакции пробу разбавляли в 20 раз тем же буфером и осаждали при 30000g 30 мин. Последнюю процедуру повторяли дважды. Конечный

осадок ресуспендировали в буфере выделения (модифицированная мембранная фракция).

Обработка мембранной фракции диазогиппуратом. 150 мкл мембранной суспензии (0,5 мг белка) осаждали на фильтре с диаметром пор 0,22 мкм ("Millipore") при небольшом разрежении (0,05 атм.). Затем через тонкий слой осажденного на фильтре мембранного образца фильтровали 150 мкл раствора, содержащего диазо[³H]гиппурат, концентрацией 200 мкМ. Время фильтрации составляло 2-3 мин. По окончании фильтрации фильтр промывали 100 мкл того же раствора, но без диазогиппурата и помещали в пробирку, содержащую 0,3 мл 100 мМ NaCl. Пробирку с фильтром переносили в аппарат для встряхивания на 30 мин., при этом с фильтра смывалась примерно половина нанесенного на него белка. Полученный образец использовался для анализа ковалентного связывания метки с белками мембраны.

Разделение белковой и липидной фракций перед электрофорезом и электрофорез. В пробирки, содержащие мембранные фракции, добавляли по 0,9 мл смеси хлороформ-метанол в соотношении 2:1 по объему и помещали в аппарат для встряхивания на 30 мин. Затем образцы центрифугировали при 12000 g 5 мин, в результате чего белковые фракции образцов концентрировались в интерфазе между водно-солевой (верхней) и хлороформ-метанольной (нижней) фазами. Солевой раствор и органическую смесь отсасывали так, чтобы в пробирке оставался только осадок белка, который затем высушивали в вакуумной центрифуге с подогревом. Сухой осадок белка растворяли в 20 мкл буфера для электрофореза. Электрофорез белков проводили по методу Леммли (Laemmli, 1970). На одну пробу брали 50-100 мкг мембранного белка. После электрофореза полоску геля разрезали на секции по 1,5-2,0 мм, размельчали в 0,2 мл 1 % тритона X-100 и выдерживали ночь при 37°C, после чего радиоактивность пробы (по 0,1 мл) определяли жидкосцинтилляционным методом.

Результаты и обсуждение

1. Влияние фазового состояния липидного бислоя на транспорт ПАГ через АМ

На рис. 1 представлена зависимость параметра порядка от обратной абсолютной температуры для спин-меченых препаратов АМ коры почки крысы. Хорошо видно, что в области температур 21-30 °С имеет место отклонение приведенной на графике зависимости от линейной. Согласно литературным данным, в подавляющем большинстве случаев резкие изменения функциональных свойств и физических характеристик мембран происходят в области температур от 19 до 30 °С (Ивков, Берестовский, 1982;

Антонов, 1982; Bresler et al., 1989; Le Grimellec, 1992). Обратимость этих изменений, а также корреляция их критических температур, выявленных различными физическими методами (ЭПР-, ЯМР-спектроскопия, рентгеновская дифракция, поляризация люминесценции флуоресцентных зондов), позволяют сказать, что в этой области происходит термотропный фазовый переход липидного бислоя.

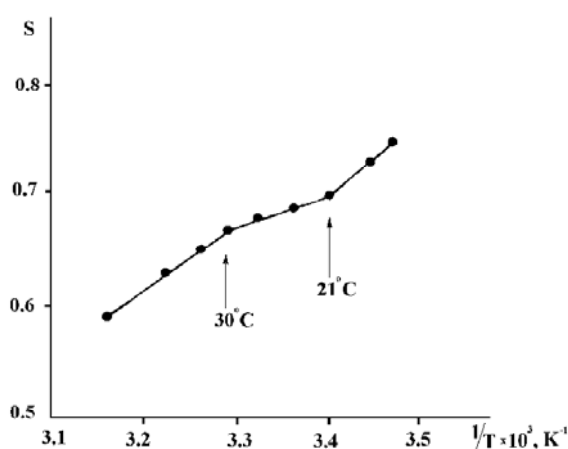


Рис. 1. Зависимость параметра порядка S от обратной абсолютной температуры для спин-меченых препаратов АМ коры почки крысы. В качестве спинового зонда использовалась 5-доксилстеариновая кислота. Стрелками указаны температуры, при которых происходит отклонение данной зависимости от линейности. Ошибка определения параметра порядка 1%.

На рис. 2 в координатах уравнения Аррениуса приведена зависимость начальной скорости транспорта ПАГ в везикулах АМ от температуры среды инкубации. Можно видеть, что при температуре 28-30 °C наблюдается отклонение графика от линейности. При тех же значениях температур (28-30 °C) наблюдается излом на графике Аррениуса для активности маркерного фермента АМ щелочной фосфатазы (рис. 3). Для интегральных мембранных ферментов (и переносчиков в том числе) наличие изломов на графиках Аррениуса, описывающих зависимость их активности от температуры среды, в настоящее время хорошо известный факт (Bresler et al., 1985; Le Grimellec, 1992). Изменение энергии активации при некоторой критической температуре в реакциях, которые катализируются мембранными белками, авторы объясняют изменением свойств белок-липидного

взаимодействия и самого липидного бислоя при термотропном фазовом переходе последнего.

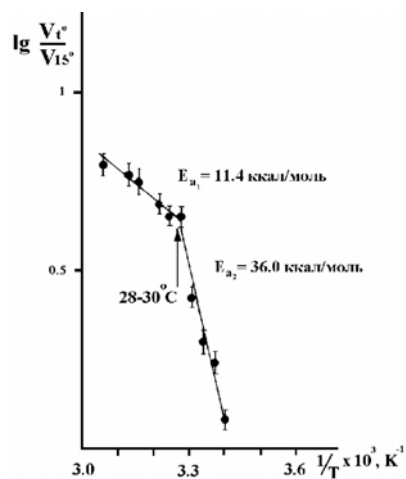


Рис. 2. Зависимость начальной скорости транспорта ПАГ в везикулы АМ коры почки крысы от температуры среды инкубации, представленная в линейных анаморфозах уравнения Аррениуса. Стрелкой указана точка излома (28–30°C).

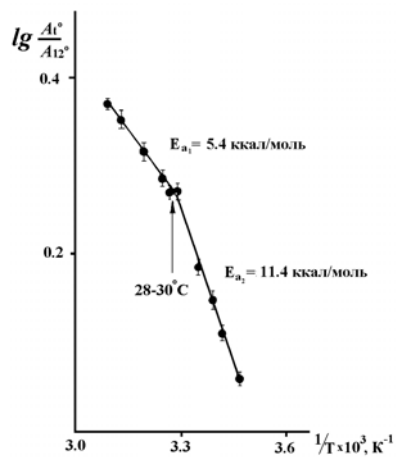


Рис. 3. Зависимость активности щелочной фосфатазы АМ коры почки крысы от температуры среды инкубации, представленная в линейных анаморфозах уравнения Аррениуса. Стрелкой указана точка излома (28–30°C).

Совпадение температур, при которых наблюдаются изломы на графиках Аррениуса для транспорта ПАГ и активности щелочной фосфатазы, с верхней границей области фазового перехода липидного бислоя АМ, регистрируемой по величине параметра порядка S , позволяет нам сказать, что при этих температурах происходит скачкообразное изменение фазового состояния липидного бислоя АМ, которое, в свою очередь, может привести к изменению функциональных свойств ее интегральных белков. Действительно, это подтверждается результатами дальнейших опытов по изучению кинетики транспорта ПАГ на везикулярных препаратах АМ при разных температурах среды инкубации (то есть когда фазовое состояние липидного бислоя АМ моделировалось с помощью температуры).

На рис. 4 представлена зависимость начальной скорости транспорта ПАГ от его концентрации в координатах уравнения Лайнуивера-Берка. Температура среды инкубации – 36°C. Отметим, что при наличии в среде инкубации пробенецида имеет место конкурентный тип ингибирования. Кажущаяся константа Михаэлиса для транспорта ПАГ $K_M = 7 \pm 1$ мМ, максимальная скорость $V_{max} = 15 \pm 2$ нмоль/мин на 1 мг белка, константа ингибирования транспорта ПАГ пробенецидом $K_i = 0.5 \pm 0.1$ мМ.

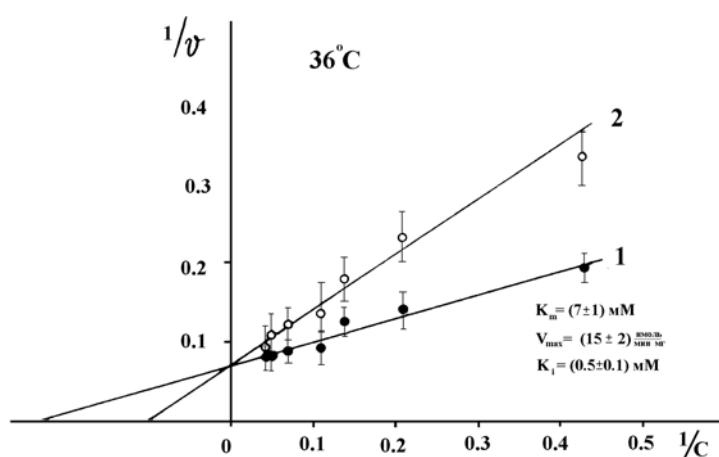


Рис. 4. Зависимость начальной скорости транспорта $[^{14}\text{C}]$ ПАГ в везикулы АМ коры почки крысы от его концентрации в среде инкубации при температуре 36°C. График представлен в линейных координатах уравнения Лайнуивера-Берка:

1 – в отсутствие пробенецида;

2 – в присутствии 0,75 мМ пробенецида.

По оси ординат – величина, обратная начальной скорости накопления $[^{14}\text{C}]$ ПАГ в везикула, $(\text{нмоль}/\text{мин} \cdot \text{мг})^{-1}$. По оси абсцисс – величина, обратная концентрации $[^{14}\text{C}]$ ПАГ, мМ^{-1} .

При понижении температуры среды инкубации до 25 °С (середина области фазового перехода липидного бислоя АМ) зависимость начальной скорости транспорта ПАГ от его концентрации становится линейной, при этом пробенецид ингибирует транспорт (рис. 5). Дальнейшее снижение температуры до 22 °С, что соответствует нижней границе области фазового перехода, приводит к исчезновению достоверного ингибирующего действия пробенецида (рис. 5). Таким образом, из представленных кинетических данных можно заключить, что функционирование переносчика (или пере-

носчиков) системы транспорта органических анионов существенно зависит от фазового состояния липидного бислоя АМ.

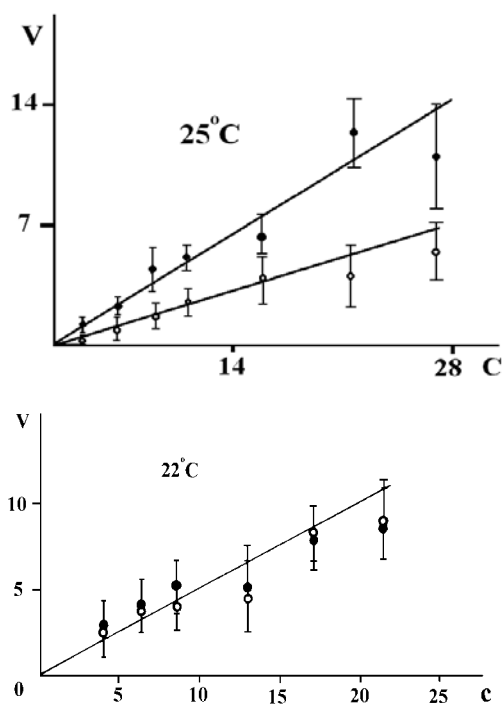


Рис. 5. Зависимость начальной скорости транспорта $[^{14}\text{C}]\text{ПАГ}$ в везикулы АМ от его концентрации в среде инкубации при температуре 25°C и 22°C .

● – в отсутствие пробенецида; ○ – в присутствии 0.75 мМ пробенецида.

По оси абсцисс – концентрация ПАГ, мМ.

По оси ординат – начальная скорость транспорта ПАГ, нмоль/мин на 1 мг белка.

Надо сказать, что возможность влияния липидного бислоя на кинетику транспорта обычно не учитывается в экспериментах по экспрессии переносчиков. Так, например, вопрос о принадлежности (локализации) ОАТ транспортеров к АМ или БЛМ решается, в основном, исходя из кинетических данных по транспорту ПАГ, которые были получены ранее на везикулярных препаратах этих мембран. По этим критериям переносчики ОАТ1 отнесены к БЛМ, поскольку при их экспрессии наблюдается ПАГ/ α -

КГ антипорт, характерный для этой мембраны, а значение K_m для транспорта ПАГ (5-160 мкМ) ближе к значению K_m для переноса органических анионов через БЛМ, чем через АМ (Burckhardt et al., 2001). Наряду с этим, некоторые переносчики, относящиеся к группе ОАТ, оказались неспособны транспортировать ПАГ или ингибироваться пробенецидом, что затрудняет их локализацию (Sweet, Pritchard, 1999; Burckhardt, Wolff, 2000). Это может быть связано с тем, что при экспрессии переносчиков в ооцитах и клеточных линиях их липидное окружение меняется. В свою очередь, известно, что влияние липидного окружения на характер работы мембранных белков моделируется изменением фазового состояния липидного бислоя (Bresler et al., 1989; Le Grimellec, 1992). Из наших данных следует, что фазовое состояние липидного бислоя АМ существенно влияет как на кинетику транспорта ПАГ, так и на способность пробенецида ингибировать этот транспорт. В литературе имеются также данные, подтверждающие влияние фазового состояния липидного бислоя на транспорт органических анионов через БЛМ (Hori et al., 1982; Ребане и др., 1985). Другими словами, решение вопросов принадлежности ОАТ переносчиков к той или иной мембране на основе данных только молекулярно-биологического подхода, сегодня представляется трудной задачей. Это ограничение естественным образом снимается, если идентификацию переносчиков ПАГ проводить на везикулярных препаратах БЛМ и АМ по отдельности.

2. Аффинная идентификация переносчиков ПАГ апикальной мембраны

Для решения задачи идентификации переносчиков органических анионов проксимальных канальцев почки нами был разработан специальный подход, основанный на применении аффинных меток с низкой реакционной способностью и повышении специфичности аффинного мечения за счет использования кинетических свойств переносчиков. Суть этого подхода заключается в следующем. Скорость реакции ковалентного связывания между меткой и активным центром переносчика зависит от частоты эффективных соударений между ними. Эта частота определяется как их взаимным сродством, так и доступностью активного центра для метки. Доступность же, в свою очередь, зависит от частоты появления активного центра на поверхности мембраны, то есть, в конечном счете, определяется числом оборотов переносчика. Таким образом, можно увеличить эффективность реакции между аффинным реагентом и активным центром переносчика за счет увеличения числа оборотов или сродства (или обоих факторов) комплекса переносчик-субстрат.

Такой взгляд накладывает определенные ограничения на выбор аффинного реагента. При химической идентификации часто используются высокореактивные фотоаффинные метки, время жизни которых в водных растворах составляет 10^{-7} – 10^{-5} с (Knowles, 1972). Это время существенно меньше времени (0,1–0,2 с), которое необходимо для транслокации комплекса переносчик-субстрат через мембрану (Orlov et al., 1994). Из этих данных следует, что в случае фотоаффинных реагентов необратимая реакция происходит, скорее, на этапе образования комплекса переносчик-метка, а не в шаге его транслокации. Другими словами, фотоаффинные метки не позволяют увеличить эффективность специфической (с активным центром) реакции за счет увеличения числа оборотов переносчика. Кроме того, фотоаффинные метки вследствие своей высокой реакционной способности могут эффективно связываться с другими белками мембраны.

В этой связи кажется более перспективным использование низко-реактивных аффинных меток, время жизни которых зависит от природы химически активной группы и может достигать нескольких минут и более (Jakoby, Wilchek, 1977). В этом случае вероятность необратимой реакции между меткой и переносчиком максимальна в шаге транслокации, и тогда различить специфическое и неспецифическое ковалентное связывание можно посредством увеличения числа оборотов переносчика. Известно, например, что транспорт ПАГ как через базолатеральную, так и апикальную мембрану может активироваться в условиях противотока, что обусловлено резким (на порядок) увеличением числа оборотов переносчика (Shimada, et al., 1987; Schmitt, Burckhardt, 1993; Roch-Ramel et al., 1996). Подобные условия активации могут быть использованы для идентификации переносчиков органических анионов проксимальных канальцев почки.

В нашей работе были использованы две аффинные метки: бром-ацетилированный п-аминогиппурат ($\text{BrAc}[^3\text{H}]\text{ПАГ}$) и диазогиппуровая кислота (диазо $[^3\text{H}]\text{ПАГ}$). Выбор именно этих реагентов обусловлен тем, что, во-первых, они являются близкими структурными аналогами п-аминогиппурата и, во-вторых, они обладают низкой (по сравнению с фотоаффинными метками) реакционной способностью. Кроме того, оба реагента транспортируются системой транспорта органических анионов (Орлов и др., 1994; Ребане и др., 1998), что позволяет проводить аффинную идентификацию переносчиков в условиях равновесного обмена по транспорту, т.е. когда число оборотов переносчика максимально.

Подбор оптимальных условий обработки везикул апикальной мембраны аффинным реагентом с целью максимального подавления функции транспорта органических анионов был сделан следующим образом. Мембранные фракции обрабатывали в течение различного времени разными

концентрациями ВгАсПАГ и после отделения аффинного реагента изучали способность модифицированных везикул транспортировать $[^3\text{H}]\text{ПАГ}$.

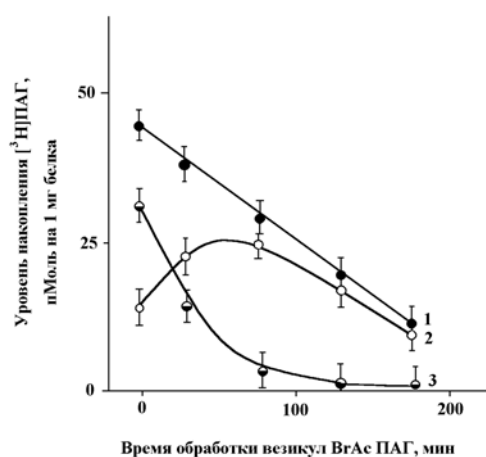


Рис.6. Зависимость общего уровня накопления $[^3\text{H}]\text{ПАГ}$ везикулами апикулярной мембраны от времени обработки везикул ВгАсПАГ.

1 – кривая накопления ПАГ при 10 с инкубации;
2 – кривая накопления ПАГ при 3 с инкубации;
3 – разностная кривая между 1 и 2.
Концентрация ВгАсПАГ - 1 мМ.

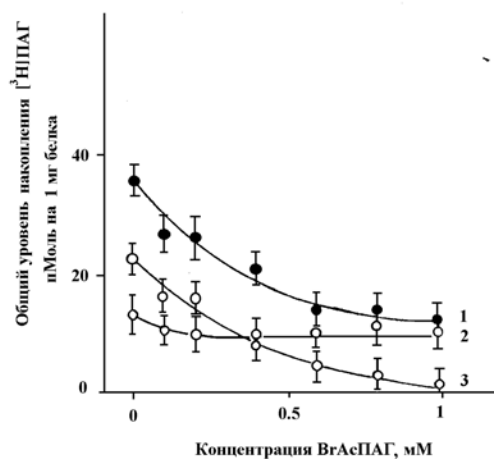


Рис. 7. Зависимость общего уровня накопления $[^3\text{H}]\text{ПАГ}$ везикулами АМ от концентрации ВгАсПАГ в среде обработки.

1 – кривая накопления ПАГ при 10 с инкубации;
2 – кривая накопления ПАГ при 3 с инкубации;
3 – разностная кривая между 1 и 2.

Время обработки везикул ВгАсПАГ – 90 минут.

Зависимость накопления $[^3\text{H}]\text{ПАГ}$ модифицированными везикулами АМ от времени их обработки аффинным реагентом представлена на

рис. 6. Можно видеть, что общий уровень накопления [^3H]ПАГ (10 с инкубации) равномерно падает с увеличением длительности обработки мембранной фракции ВгАсПАГ (рис. 6, кривая 1), в то время как накопление субстрата при 3 с (неспецифическая составляющая общего уровня накопления) сначала немного возрастает, а затем равномерно уменьшается (рис. 6, кривая 2). При временах обработки мембранной фракции более 80 мин уровень накопления [^3H]ПАГ при 3 с и 10 с инкубации совпадает. Кривая 3 (рис. 6), представляющая разность кривых 1 и 2 (собственно ПАГ транспорт), демонстрирует уровень ингибирования транспорта органических анионов в зависимости от времени обработки везикул аффинным реагентом. При концентрации реагента 1 мМ и времени обработки более 80 минут транспортная функция подавлена практически полностью.

Зависимость накопления [^3H]ПАГ модифицированными везикулами АМ от концентрации ВгАсПАГ (при постоянном времени обработки) представлена на рис. 7. Уровень накопления [^3H]ПАГ при 3 с инкубации (неспецифическая составляющая общего уровня накопления) остается практически постоянным во всем диапазоне концентраций аффинного реагента (рис. 7, кривая 2), в то время как при 10 с накопление [^3H]ПАГ падает с ростом концентрации ВгАсПАГ (рис. 7, кривая 1). Кривая 3, рис. 7 (собственно ПАГ транспорт), которая, как и в предыдущем случае, есть результат вычитания кривой 2 из кривой 1 демонстрирует подавление транспорта ПАГ в везикулах после их предварительной обработки различными концентрациями аффинного реагента. Можно сказать, что после обработки мембранных препаратов 0,8 мМ ВгАсПАГ в течение 1,5 часа, транспорт ПАГ ингибируется практически полностью. Результаты, представленные на рис. 6 и 7, показывают, что, во-первых, ВгАсПАГ необратимо ингибирует транспорт п-аминогиппурата и, во-вторых, что он способен полностью подавлять функцию транспорта органических анионов в апикальной мембране.

В таблице 1 приведены результаты экспериментов по распределению аффинного реагента между белковой и липидной частью апикальной мембраны, которая модифицировалась 1 мМ ВгАс[^3H]ПАГ в течение 1,5 часа. Из данных таблицы видно, что 85% ковалентно связанной аффинной метки приходится на белки апикальной мембраны и только 15% – на липиды, причем, существенного преимущества в ковалентном связывании аффинного реагента с каким-либо липидом не наблюдается.

Эксперименты по аффинной идентификации переносчиков апикальной мембраны были выполнены в транспортных условиях равновесного обмена (когда число оборотов переносчиков максимально) по трем вариантам. В первом варианте мембранная фракция обрабатывалась радиоак-

Таблица 1. Распределение ковалентно-связанного ВгАс^[3Н]ПАГ между белковой и липидной компонентой апикальной мембраны

Компоненты мембраны	Связанный ВгАс ^[3Н] ПАГ пмоль на 1 мг белка
Белки	46±4
Липопротеины	8±2
Липиды	10±2
Сфингомиелин	1,6±0,4
Фосфатидилсерин	2,8±0,6
Фосфатидилхолин	2,0±0,4
Фосфатидилэтаноламин	1,6±0,3
Холестерин и минорные липиды	1,8±0,4

тивно меченным ВгАсПАГ. Во втором – обработка делалась так же, но в присутствии 2 мМ SITS (ингибитора анионного обмена) в среде инкубации. В третьем варианте мембранная фракция сначала обрабатывалась не радиоактивным ВгАсПАГ в присутствии 5 мМ пробенецида, и, после удаления аффинного реагента и пробенецида из среды инкубации, обработка повторялась радиоактивно меченным ВгАс^[3Н]ПАГ. Анализ ковалентного связывания аффинного реагента с отдельными белками мембраны проводился методом SDS-электрофореза.

На рис. 8 показаны результаты типичного эксперимента. Можно видеть, что после обработки везикул ВгАс^[3Н]ПАГ по первому варианту аффинный реагент связывается ковалентно с четырьмя полипептидами АМ молекулярного веса 150 кДа, 98 кДа, 63 кДа и 28 кДа (рис. 8 А, сплошная линия). Наличие SITS в среде инкубации в процессе аффинного мечения ведет к исчезновению пиков радиоактивности, ассоциированных с полипептидами 98 кДа, 63 кДа и 28 кДа (рис. 8 А, пунктирная линия), однако пик, соответствующий полипептиду молекулярного веса 150 кДа, остается. SITS не является структурным аналогом ПАГ, хотя хорошо известно, что он ингибирует его транспорт. Другими словами, SITS не должен заметно влиять на ковалентное связывание ВгАсПАГ с аминокислотными остатками тех белков, которые не принимают участия в транспорте ПАГ, и уменьшать или полностью подавлять связывание аффинного реагента с активными центрами переносчиков ПАГ. Исходя из этого, можно сказать, что полипептиды с молекулярным весом 28 кДа, 63 кДа и 98 кДа могут быть структурными элементами системы транспорта органических анионов, а белок с молекулярным весом 150 кДа – нет.

В случае предварительной защиты апикальной мембраны нерадиоактивным аффинным реагентом в присутствии пробенецида, после элек-

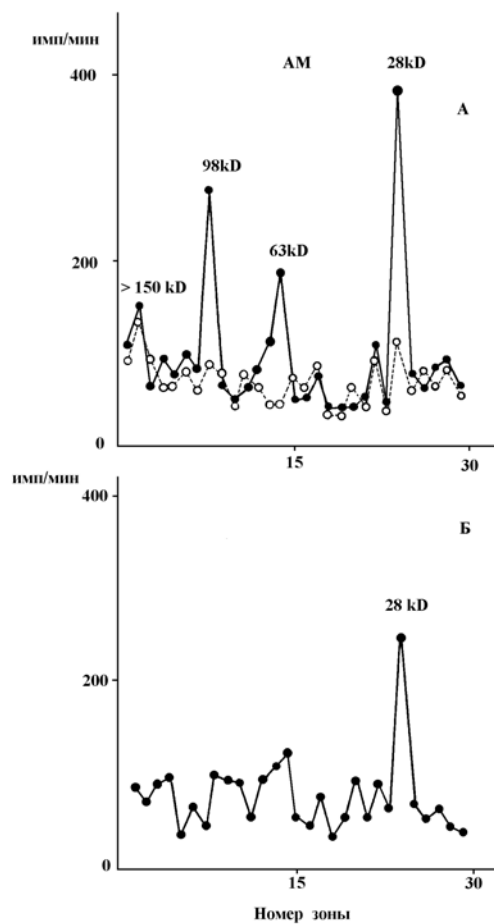


Рис. 8. Диаграмма ковалентного связывания BrAc[³H]ПАГ с белками апикальной мембраны.

А – в присутствии (○) и в отсутствие (●) 2 мМ SITS в среде обработки;
 Б – после предварительной обработки АМ нерадиоактивным BrAcПАГ в присутствии 5 мМ пробенецида.

трофореза остается только один основной пик радиоактивности, ассоциированный с полипептидом 28 кДа. Пики, связанные с белками 63 кДа и 98 кДа, уменьшаются практически до фонового уровня (рис 8 Б).

Эксперименты по аффинной идентификации полипептидов системы транспорта органических анионов базолатеральной мембраны были выполнены по той же схеме, что и для апикальной. После обработки фракции базолатеральной мембраны $\text{BrAc}[^3\text{H}]\text{ПАГ}$ на SDS полиакриламидном геле наблюдаются два основных пика радиоактивности, соответствующие полипептидам 28 кДа и 98 кДа (рис. 9 А, сплошная линия). SITS полностью ингибирует ковалентное связывание $\text{BrAc}[^3\text{H}]\text{ПАГ}$ с этими белками (рис. 9 А, пунктирная линия); использование пробенецида в качестве протектора переносчиков дает результат, совпадающий с тем, который был получен на апикальной мембране (рис. 9 Б).

Способность (или неспособность) пробенецида защищать белки системы транспорта органических анионов от ковалентного связывания с $\text{BrAc}\text{ПАГ}$ зависит от разницы в сродстве $\text{BrAc}\text{ПАГ}$ и пробенецида к активному центру данного переносчика. Поэтому результаты этих экспериментов как в случае базолатеральной, так и апикальной мембраны могут быть объяснены тем, что белок молекулярного веса 28 кДа (в отличие от белков 63 кДа и 98 кДа) имеет более высокое сродство к пробенециду, чем к $\text{BrAc}\text{ПАГ}$. Здесь следует обратить внимание на то, что полипептиды 28 кДа и 98 кДа метились во всех проведенных экспериментах (см. табл. 2), в то время как белок с молекулярным весом 63 кДа – только два раза.

Таблица 2. Воспроизводимость ковалентного связывания $\text{BrAc}[^3\text{H}]\text{ПАГ}$ с полипептидами апикальной и базолатеральной мембраны

Мембранная фракция	Число экспериментов	Молекулярный вес белков			
		28 кДа	63 кДа	98 кДа	>150 кДа
Апикальная	8	8	2	8	4
Базолатеральная	4	4	-	3	-

Известно, что транспорт ПАГ в проксимальных канальцах почки активируется ионами хлора (Inui et al., 1986; Schmitt, Burckhardt, 1993). Детальный кинетический анализ, проделанный Шмидтом и Буркхардтом (Schmitt, Burckhardt, 1993), показывает, что хлор скорее приводит к увеличению числа оборотов переносчика, чем сам транспортируется этой системой. Используя это наблюдение, мы сравнили эффективность аффинной

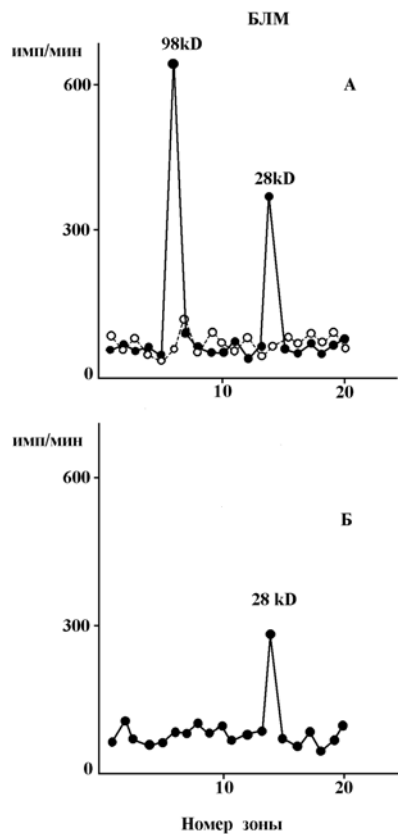


Рис. 9. Диаграмма ковалентного связывания BrAc[³H]ПАГ с белками базолатеральной мембраны. А – в присутствии (o) и в отсутствие (•) 2 мМ SITS в среде обработки; Б – после предварительной обработки БЛМ нерадиоактивным BrAcПАГ в присутствии 5 мМ пробенецида.

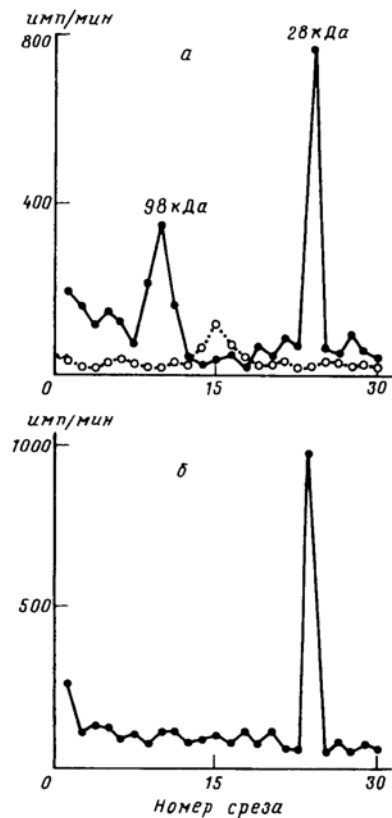


Рис. 10. Ковалентное связывание диазо[³H]ПАГ с белками апикальной мембраны. а – среда инкубации содержала 100 мМ маннитол, 100 мМ NaCl, 10 мМ трис-HEPES, pH 7.5 (сплошная линия) и 300 мМ маннит и 10 мМ трис-HEPES, pH 7.5 (пунктирная линия); б – после предварительной защиты апикальной мембраны диазоПАГ в среде 100 мМ маннитол, 100 мМ NaCl, 10 мМ трис-HEPES, 5 мМ пробенецид, pH 7.5.

реакции в присутствии и в отсутствие ионов хлора в среде инкубации. В этих опытах в качестве аффинной метки использовался диазо[^3H]ПАГ.

Из рис. 10 а (сплошная линия) следует, что при наличии ионов хлора в среде инкубации диазо[^3H]гиппурат ковалентно связывается с полипептидами апикальной мембраны молекулярного веса 28 кДа и 98 кДа, в то время как в отсутствие хлора аффинная реакция вообще не эффективна (рис. 10 а, пунктирная линия). Данные пяти независимых экспериментов показали полную воспроизводимость результата аффинной реакции. После предварительной обработки фракции апикальной мембраны нерадиоактивным диазогиппуратом в присутствии пробенецида и последующей ее обработки диазо-[^3H]гиппуратом, аффинная метка ковалентно связывалась только с полипептидом 28 кДа (рис. 10 б). Другими словами, результаты аффинной идентификации переносчиков почечной системы транспорта органических анионов апикальной мембраны, полученные с использованием разных аффинных реагентов и в разных условиях активации транспорта органических анионов, находятся в хорошем соответствии.

Совокупность имеющихся данных позволяет сказать, что полипептиды молекулярного веса 28 кДа и 98 кДа как базолатеральной, так и апикальной мембраны являются структурными элементами почечной системы транспорта органических анионов. В то же самое время нельзя отвергать возможность того, что полипептид 63 кДа также входит в эту систему. Возможно, что транспорт органических анионов посредством белка 63 кДа преимущественно реализуется в других условиях.

Из полученных данных можно оценить количество переносчиков ПАГ, приходящееся на 1 мг мембранного белка. Зная количество белка в пробе, которая наносится на электрофорез (0,1 мг), удельную радиоактивность аффинной метки (300 мСi/ммоль), эффективность счета по тритию (33%) и процент необратимого ингибирования переносчика при аффинной идентификации (50%, см. рис. 6 и 7), можно рассчитать, что, например, для белка 98 кДа эта величина равна 50 пмоль на 1 мг мембранного белка.

3. Математическая модель сопряжения $\text{Na}^+/\alpha\text{-КГ}$ симпорта и ПАГ/ $\alpha\text{-КГ}$ антипорта базолатеральной мембраны

Экскреция чужеродных органических анионов в почечных каналах происходит против градиента концентрации и осуществляется за счет кооперативного функционирования трех транспортеров базолатеральной мембраны (см. рис. 11). За счет гидролиза АТФ Na^+ , K^+ -АТФазой создается градиент Na^+ , направленный в клетку (шаг 1). Этот градиент является движущей силой для переноса $\alpha\text{-КГ}$ путём $\text{Na}^+/\alpha\text{-КГ}$ симпорта (шаг 2). Внутриклеточный $\alpha\text{-КГ}$, в свою очередь, инициирует поток ПАГ в клетку по-

средством ПАГ/ α -КГ антипорта (шаг 3). Такое сопряжение транспортных потоков известно в литературе как механизм рециклирования, поскольку перенос одного субстрата (ПАГ) обеспечивается за счет рециклирования через мембрану другого (сопрягающего) субстрата, в данном случае – α -КГ (Pritchard, Miller, 1993). Показано, что этот механизм обеспечивает около 60% полного экскреторного потока органических анионов в проксимальных канальцах (Welborn et al., 1998).

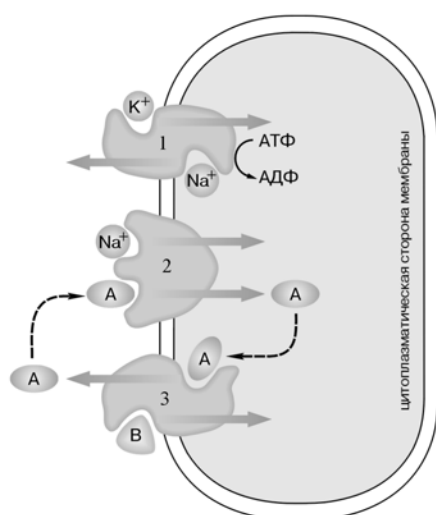


Рис.11. Схема сопряжения потоков, осуществляющихся за счет Na^+ , K^+ -АТФазы (1), $\text{Na}^+/\alpha\text{-КГ}$ симпорта (2) и ПАГ/ $\alpha\text{-КГ}$ антипорта (3). А = $\alpha\text{-КГ}$; В = ПАГ.

В рассмотренной схеме сопряжения $\text{Na}^+/\alpha\text{-КГ}$ симпорта и ПАГ/ $\alpha\text{-КГ}$ антипорта остается невыясненным важный вопрос: почему из всех субстратов Na^+ /дикарбоксилатного переносчика (а их известно, по крайней мере, восемь) только глутарат и α -кетоглутарат вызывают противогradientное накопление ПАГ? Ответ на поставленный вопрос, по-нашему мнению, может стать ключевым как к пониманию энергетики экскреции чужеродных органических анионов, так и к пониманию функциональных связей этой системы транспорта в целом.

В литературе это явление объясняется тем, что на цитоплазматической стороне мембраны сродство $\alpha\text{-КГ}$ (или глутарата) к анион-обменному переносчику существенно выше, чем для других субстратов Na^+ /дикарбоксилатного симпорта (Bueckhard et al., 2001). Однако это объяснение противоречит тому факту, что переносчики органических анионов

обладают широкой субстратной специфичностью (Pritchard, Miller, 1993), и, следовательно, нет оснований полагать, что только глутарат и α -кетоглутарат, в отличие от других субстратов Na^+ /дикарбоксилатного симпорта, могут связываться с анион-обменным переносчиком. Так или иначе, но энергетические механизмы противогradientной экскреции в почечных канальцах пока остаются невыясненными.

Эффективным подходом в изучении механизмов сопряжения транспортных потоков является математическое моделирование. В нашей работе мы разработали общую модель для описания сопряжения симпорта (котранспорта) и антипорта (обмена или противотока) и применили ее для описания экспериментальных результатов по сопряжению Na^+ / α -КГ симпорта и ПАГ/ α -КГ антипорта базолатеральной мембраны.

3.1. Предпосылки и формулировка модели

В случае симпорта (см. рис. 12) предполагается, что истинным субстратом для этого переносчика является пара субстратов – X, Y и что мембрану может пересекать либо комплекс, загруженный обоими субстратами, либо пустой переносчик, но не его промежуточные формы (Stein, Lieb, 1986). Для простоты стехиометрия переноса X и Y предполагается равной 1:1. Исходно во внешнем объеме создается gradient X, который является движущей силой для противогradientного накопления Y во внутреннем объеме.

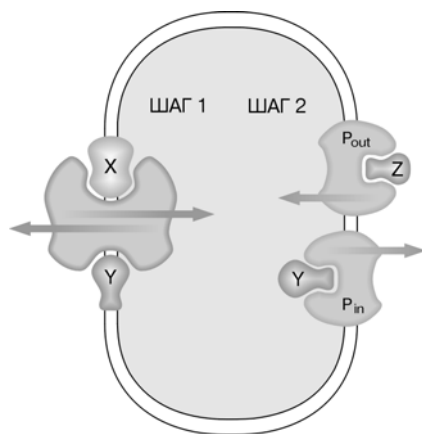


Рис. 12. Схематическое представление кооперации симпорта (шаг 1) и антипорта (шаг 2). Субстраты X, Y переносятся в клетку путем симпорта. Субстраты Y, Z переносятся путем антипорта по механизму пинг-понг.

Механизм антипорта (обмена) рассматривается как механизм пинг-понг, когда переносчик имеет один связывающий центр, поочередно ори-

ентирующийся то на одну, то на другую сторону мембраны (Murer et al., 1989). На этом этапе разработки модель не учитывает пассивную диффузию субстратов через мембрану, осмотическое изменение внутреннего объема и возможное влияние мембранного электростатического потенциала на транспорт. Кроме того, модель является симметричной, то есть предполагает, что константы ассоциации–диссоциации и скорости транслокации различных комплексов переносчиков через мембрану не зависят от того, на какой стороне мембраны (внутренней или внешней) находится связывающий центр данного переносчика.

Исходя из этих предположений, можно записать следующую систему уравнений для плотности потоков J_X , J_Y и J_Z субстратов X , Y и Z через мембрану:

$$\begin{aligned} J_X &= k_1(X_{out}Y_{out} - X_{in}Y_{in}) \\ J_Y &= k_2(Y_{out}P_{out} - Y_{in}P_{in}) + k_1(X_{out}Y_{out} - X_{in}Y_{in}) \\ J_Z &= k_3(Z_{out}P_{out} - Z_{in}P_{in}), \end{aligned} \quad (1)$$

где

$X_{in(out)}$, $Y_{in(out)}$, $Z_{in(out)}$ – концентрации, соответственно, субстратов X , Y , Z во внутреннем (внешнем) объеме;

$P_{in(out)}$ – поверхностная концентрация обменного переносчика на внутренней (внешней) стороне мембраны;

J_X , J_Y , J_Z – плотности потоков, соответственно, субстратов X , Y , Z через мембрану;

k_1 , k_2 , k_3 – обобщенные константы скорости, соответственно, для транспорта X (или Y) посредством симпорта, Y посредством антипорта и Z посредством антипорта.

На основе этой системы и исходя из предположения, что изменение поверхностной концентрации обменного переносчика ($P_{in(out)}$) происходит существенно быстрее, чем изменение концентрации субстратов Z и Y по обе стороны мембраны (т. е. квази-равновесие между P и Y , Z), можно получить следующие кинетические уравнения для зависящих от времени концентраций $X_{in(out)}$, $Y_{in(out)}$, $Z_{in(out)}$ и $P_{in(out)}$:

$$\begin{aligned} dX_{in}/dt &= (Sk_1/V_{in})(X_{out}Y_{out} - X_{in}Y_{in}) \\ dY_{in}/dt &= (S/V_{in})[k_2(Y_{out}P_{out} - Y_{in}P_{in}) + k_1(X_{out}Y_{out} - X_{in}Y_{in})] \\ dZ_{in}/dt &= (Sk_3/V_{in})(Z_{out}P_{out} - Z_{in}P_{in}) \\ k_2(Y_{out}P_{out} - Y_{in}P_{in}) + k_3(Z_{out}P_{out} - Z_{in}P_{in}) + \gamma(P_{out} - P_{in}) &= 0 \quad (2) \\ dX_{out}/dt &= -(V_{in}/V_{out}) dX_{in}/dt \\ dY_{out}/dt &= -(V_{in}/V_{out}) dY_{in}/dt \\ dZ_{out}/dt &= -(V_{in}/V_{out}) dZ_{in}/dt, \end{aligned}$$

где первые три уравнения описывают изменение во времени концентрации субстратов X , Y и Z во внутреннем объеме и непосредственно получаются из системы уравнений (1); четвертое уравнение получено из предположения о квази-равновесии между P и Y , Z , а уравнения 5-7 – условия сохранения соответственно для субстратов X , Y и Z по обе стороны мембраны; V_{in} и V_{out} – соответственно суммарный внутренний и внешний объемы, разделенные мембраной; S – общая площадь мембраны, ограничивающая внутренний объем V_{in} ; γ – частота спонтанной (без субстрата) переориентации обменного переносчика с одной стороны мембраны на другую в единицу времени.

Полная система уравнений (2) позволяет количественно описать в рамках минимальной модели процесс сопряженного транспорта субстратов X , Y и Z через мембрану. Вся информация о механизмах транспорта в данной системе уравнений содержится в четырех параметрах: k_1 , k_2 , k_3 , γ , и она может быть решена стандартными численными методами.

На рис. 13 показан результат компьютерного моделирования зависимостей $X_{in}(t)$, $Y_{in}(t)$ и $Z_{in}(t)$ при разной скорости симпорта (k_1 – варьируется) и постоянной скорости антипорта (k_2 , k_3 – постоянные величины). Можно видеть, что противогradientное накопление субстрата Z во внутреннем объеме начинается тогда, когда $k_1 \gg k_2$ и k_3 , т. е. когда скорость симпорта существенно превышает скорость антипорта. Поясним этот результат (см. рис. 12). Для того чтобы субстрат Z мог накапливаться во внутреннем объеме против градиента концентрации, необходим источник энергии. Этим источником может быть градиент концентрации субстрата Y ($Y_{in} > Y_{out}$), который может быть сформирован только в том случае, если поток Y во внутренний объем путем симпорта превышает его поток во внешний объем, осуществляющийся через обменный переносчик. В противном случае градиент концентрации Y сформироваться не может и, следовательно, нет условий для противогradientного накопления субстрата Z . Этим и можно объяснить то, что из всех субстратов Na^+ /дикарбоксилатного переносчика только глутарат и α -кетоглутарат вызывают противогradientное накопление ПАГ в везикулах БЛМ. Видимо, другие дикарбоновые кислоты транспортируются через Na^+ /дикарбоксилатный переносчик существенно медленнее, чем глутарат и α -кетоглутарат.

На основе этих данных можно сформулировать условие возникновения энергетического сопряжения симпорта и антипорта, а именно: энергетическое сопряжение возможно, если лимитирующим шагом сопряженной системы является шаг противопотока.

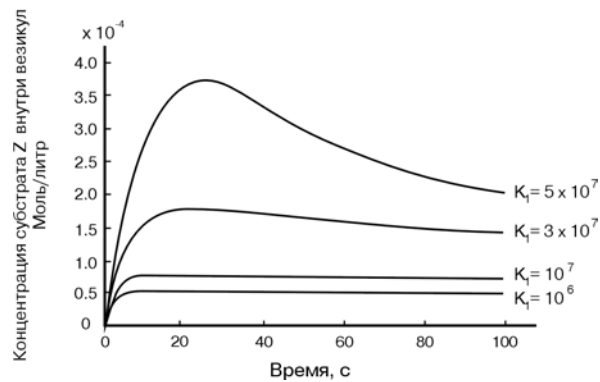
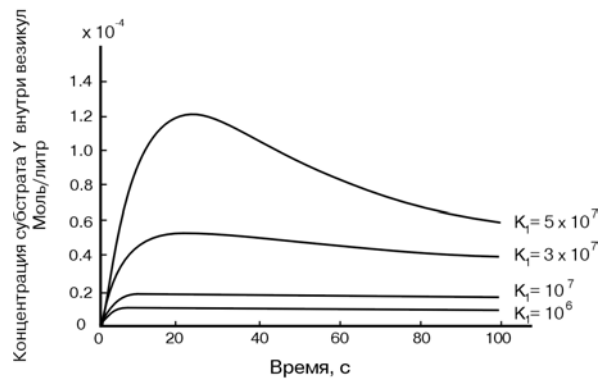
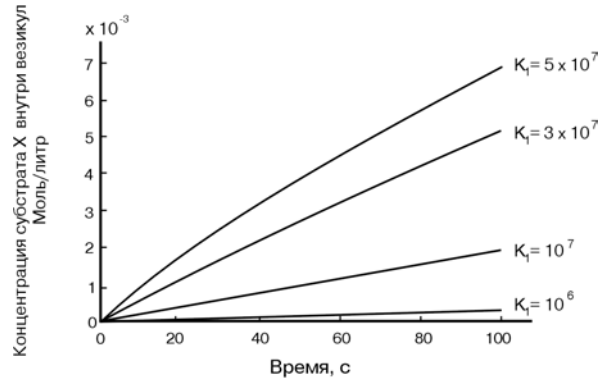


Рис. 13. Зависимость накопления во внутреннем объеме субстратов X, Y и Z от времени при изменении скорости симпорта.
 $X_{out} = 10^{-1} \text{ M}$,
 $Y_{out} = 10^{-5} \text{ M}$,
 $Z_{out} = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$,
 $\gamma = 50 \text{ c}^{-1}$.
 $K_1 (\text{M}^{-2} \text{c}^{-1})$ – варьируется,
 $K_2 = 7 \times 10^6 (\text{M}^{-1} \text{c}^{-1})$, $K_3 = 5 \times 10^6 (\text{M}^{-1} \text{c}^{-1})$.

3.2. Описание экспериментальных результатов по сопряжению $\text{Na}^+/\alpha\text{-КГ}$ симпорта и ПАГ/ $\alpha\text{-КГ}$ антипорта с помощью математической модели

Для демонстрации работы модели были использованы экспериментальные результаты, полученные нами, и аналогичные данные, изложенные в работе Шимады с соавторами (Shimada et al., 1987). При математическом моделировании экспериментальных кривых концентрации реагентов $X(\text{Na}^+)$, $Y(\alpha\text{-КГ})$ и $Z(\text{ПАГ})$ были такими же, как в эксперименте (см. подписи к рисункам). В таблице 3 приведены значения постоянных величин, которые использовались в модели.

Таблица 3. Значение постоянных параметров математической модели

Параметр	Значение параметра
Диаметр одной везикулы d	1 мкм
Объем везикул на один мг белка	1 мкл/мг
Концентрация анион-обменного переносчика на 1 мг белка	50 пмоль/мг
Количество переносчика, приходящееся на одну везикулу	5×10^3 шт
Поверхностная концентрация переносчика	$1,6 \times 10^{11}$ шт/см ²

Значения первых трех параметров были взяты из собственных экспериментальных измерений, значения двух последних являются расчетными. Концентрация обменного переносчика, приходящаяся на 1 мг белка, была оценена из данных по аффинной идентификации полипептида 98 кДа.

На рисунке 14 показана временная зависимость накопления ПАГ везикулами базолатеральной мембраны коры почки крысы, полученная нами (Rebane et al., 1998). Значения точек взяты из эксперимента, сплошная линия – результат математического моделирования. Условия эксперимента приведены в подписи к рисунку. Как можно видеть, удовлетворительное описание экспериментальных точек достигается при следующих значениях переменных модели: $k_2=4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_3=2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и частоты спонтанной переориентации обменного переносчика $\gamma=10 \text{ s}^{-1}$.

Аналогичный результат описания с помощью нашей математической модели экспериментальных данных, полученных Шимадой с соавторами (Shimada et al., 1987), представлен на рис. 15. Как и в предыдущем случае, при математическом моделировании этой экспериментальной кривой концентрации реагентов $X(\text{Na}^+)$, $Y(\alpha\text{-КГ})$ и $Z(\text{ПАГ})$ были такими же, как в эксперименте, а значения постоянных величин были взяты из таблицы 3. Как видно, экспериментальные данные удовлетворительно описыва-

ются математической моделью (сплошная линия рис. 15) при значениях переменных модели, равных $k_2=2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$, $k_3=6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ и $\gamma=10 \text{ c}^{-1}$. Сравнивая значения переменных параметров модели, которые получаются при моделировании экспериментальных кривых сопряжения $\text{Na}^+/\alpha\text{-КГ}$ симпорта и ПАГ/ $\alpha\text{-КГ}$ антипорта, полученных в разных условиях и в разных лабораториях, можно сказать, что они неплохо соответствуют друг другу (отличия не более, чем в 3 раза). Наиболее интересным результатом моделирования мы считаем совпадение в двух рассмотренных случаях частоты спонтанной переориентации анион-обменного переносчика γ . Изменение этой величины на порядок в меньшую или большую сторону ведет к невозможности описания экспериментальных результатов ни при каких значениях параметров модели k_2 и k_3 . Кроме того, этот параметр, по крайней мере на современном этапе, трудно определить прямыми методами, и его расчетное значение может оказаться полезной величиной для индивидуальной характеристики переносчика.

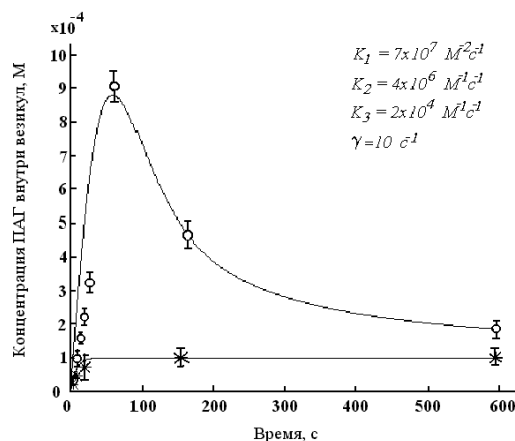


Рис. 14. Зависимость накопления $[^3\text{H}]$ ПАГ в везикулах базолатеральной мембраны от продолжительности инкубации. Состав среды инкубации:

○ – 150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HEPES, pH 7,5, 10 мкМ $\alpha\text{-КГ}$, 100 мкМ $[^3\text{H}]$ ПАГ;

* – 300 мМ маннитол, 10 мМ трис-HEPES, pH 7,5, 100 мкМ $[^3\text{H}]$ ПАГ.

Сплошная линия – результат математического моделирования зависимости противогradientного транспорта ПАГ в везикулы базолатеральной мембраны в условиях сопряжения $\text{Na}^+/\alpha\text{-КГ}$ симпорта и ПАГ/ $\alpha\text{-КГ}$ антипорта.

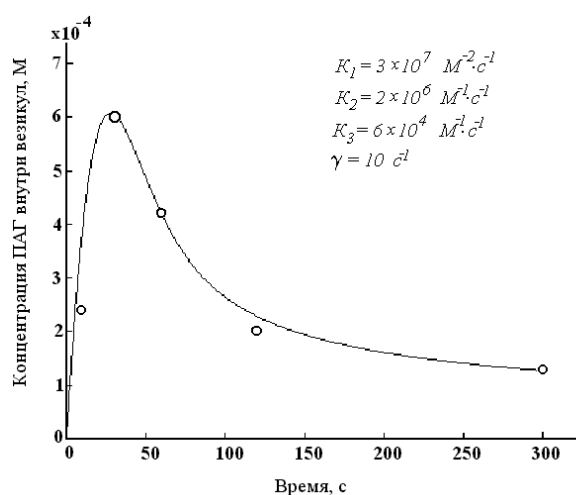


Рис. 15. Зависимость накопления [³H]ПАГ в везикулах базолатеральной мембраны от продолжительности инкубации. Экспериментальные данные, представленные точками (показаны средние значения пяти независимых измерений), взяты из работы Шимады с соавторами (Shimada et al., 1987). Состав среды инкубации: 150 мМ NaCl, 20 мМ трис-HEPES, pH 7,4, 10 мкМ α-КГ, 50 мкМ [³H]ПАГ. Сплошная линия – результат математического моделирования зависимости противогradientного транспорта ПАГ в везикулы базолатеральной мембраны в условиях сопряжения Na⁺/α-КГ симпорта и ПАГ/α-КГ антипорта.

В литературе существует ограниченное количество данных по транспорту органических анионов, которые можно прямо использовать для кинетического анализа рассматриваемой модели. Показано, однако, что в отсутствие обмена начальная скорость накопления сукцината и цитрата через Na⁺/дикарбоксилатный котранспорт равны, соответственно, 1200 и 130 пмоль/мин на 1 мг белка (Write, Wunz, 1987). Начальная скорость транспорта ПАГ в условиях сопряжения с Na⁺/α-КГ симпортом, по нашим данным, составляет 720 ± 180 пмоль/мин на 1 мг белка (см. рис. 14). Другими словами, скорость накопления сукцината и цитрата в везикулах БЛМ сравнима или существенно меньше, чем скорость транспорта ПАГ в условиях противопотока. Сопоставляя эти данные с данными предлагаемой модели, можно сказать, что ни сукцинат, ни цитрат не должны приводить к противогradientному накоплению ПАГ в везикулах БЛМ. Это и было продемонстрировано в работе Шмитта и Буркхарда (Schmitt, Burckhardt, 1993).

Кроме того, показано, что в везикулах апикальной мембраны почки кролика начальная скорость $\text{Na}^+/\alpha\text{-КГ}$ симпорта составляет 2800 ± 100 пмоль/мин на 1 мг белка (Kirpen et al., 1979 a), что существенно превышает скорость транспорта ПАГ через базолатеральную мембрану в условиях противотока. Из этих данных можно сказать, что реабсорбция α -кетоглутарата через АМ может приводить к противогradientной экскреции ПАГ путем ПАГ/ α -КГ обмена на базолатеральной мембране. Такое предположение, по крайней мере, не противоречит ни имеющимся в литературе экспериментальным данным, ни сложившимся представлениям.

Выводы

1. Транспорт ПАГ в везикулярных препаратах АМ клеток проксимальных канальцев почки крысы подчиняется кинетике Михаелиса-Ментен с параметрами: $K_m = 7 \pm 1$ мМ, $V_{\max} = 15 \pm 2$ нмоль/мин на 1 мг белка, (37°C) и ингибируется пробенецидом с константой $K_i = 0,5 \pm 0,1$ мМ.
2. Зависимость начальной скорости транспорта ПАГ от температуры, представленная в линейных анаморфозах уравнения Аррениуса, имеет излом в температурной области $28\text{--}30^\circ\text{C}$. Методом ЭПР-спектроскопии показано наличие термотропного фазового перехода липидного бислоя АМ в области температур $21\text{--}30^\circ\text{C}$. При температурах, соответствующих началу фазового перехода липидного бислоя, зависимость начальной скорости транспорта ПАГ от его концентрации является линейной, при этом пробенецид не влияет на скорость транспорта ПАГ. В середине фазового перехода эта зависимость остается линейной, но ингибирующее действие пробенецида появляется. При температуре выше верхней границы области фазового перехода зависимость начальной скорости транспорта ПАГ от его концентрации характеризуется насыщением, при этом пробенецид достоверно ингибирует скорость транспорта ПАГ. Отсюда следует, что фазовое состояние липидного бислоя апикальной мембраны (АМ) существенно влияет на кинетику транспорта органических анионов.
3. Бромацетилованный-п-аминогиппурат (BrAcПАГ) является необратимым ингибитором системы переноса чужеродных органических анионов в проксимальных канальцах почки крысы, способным полностью подавлять транспорт ПАГ через АМ. При этом эффективность ингибирования транспорта ПАГ зависит как от продолжительности обработки препаратов АМ необратимым ингибитором, так и от его концентрации.

4. Разработан подход для идентификации переносчиков системы транспорта органических анионов проксимальных канальцев почки, основанный на использовании аффинных меток с низкой реакционной способностью в условиях активации транспортных потоков. Применение радиоактивно меченных аффинных реагентов $\text{BrAc}[^3\text{H}]\text{ПАГ}$ и диазо $[^3\text{H}]$ гиппурата позволило идентифицировать в апикальной и базолатеральной мембранах полипептиды молекулярного веса 28 кДа и 98 кДа, как структурные элементы системы транспорта чужеродных органических анионов проксимальных канальцев почки.

5. Разработана минимальная математическая модель для описания сопряжения транспортных потоков двух различных субстратов, один из которых (Y) транспортируется как котранспортным, так и обменным переносчиком, а другой (Z) – только последним. Из анализа модели следует, что для пары субстратов Y и Z сопряжение между симпортом и антипортом становится возможным при выполнении следующих условий: (а) поток субстрата Y путем симпорта во внутренний объем должен превышать его поток во внешний объем, осуществляющийся путем антипорта; (б) частота переориентации с одной стороны мембраны на другую связывающего центра обменного переносчика, загруженного субстратом, должна быть больше частоты его спонтанной (т.е. без субстрата) переориентации. Собственные и литературные экспериментальные данные по сопряжению $\text{Na}^+/\alpha\text{-КГ}$ симпорта и $\text{ПАГ}/\alpha\text{-КГ}$ антипорта в везикулах БЛМ проксимальных канальцев удовлетворительно описываются предложенной моделью. Из модельного расчета следует, что свободный от субстрата переносчик ПАГ базолатеральной мембраны имеет частоту переориентации с одной стороны мембраны на другую, равную 10 циклам в секунду.

Основные публикации по теме диссертации

1. Орлов Ю.Н., Бреслер В.М., Казбеков Э.Н., Суходолова А.Т. (1985). Специфическое связывание органических кислот фракцией базолатеральной мембраны коры почки крысы, полученной методом осмотического шока. Цитология, Т. 27 №7, с.756-762.
2. Орлов Ю.Н., Бреслер В.М., Казбеков Э.Н., Суходолова А.Т. (1987). Влияние градиента NaCl на транспорт пара-аминогиппуровой кислоты в везикулы базолатеральной мембраны коры почки. Цитология, Т. 29, № 3, с. 365-368.
3. Бреслер В.М., Вальтер С.Н., Исаев-Иванов В.В., Казбеков Э.Н., Клейнер А.Р., Орлов Ю.Н., Суходолова А.Т., Фомичев В.Н. (1987). Физико-

химические механизмы транспорта органических кислот в везикулах апикальной мембраны клеток проксимальных канальцев почки крысы. 1. Кинетические параметры транспорта и влияние фазового состояния липидов на транспорт. Цитология, Т. 29, № 10, с. 1177- 1184.

4. Бреслер В.М., Исаев-Иванов В.В., Казбеков Э.Н., Клейнер А.Р., Орлов Ю.Н., Остапенко И.А., Суходолова А.Т., Фомичев В.Н. (1988). Физико-химические механизмы транспорта органических кислот в везикулах апикальной мембраны клеток проксимальных канальцев почки крысы. 2. Кинетические параметры транспорта и фазовое состояние липидного бислоя у мутантных крыс линии Кемпбелл. Цитология, Т. 30, № 3, с. 283- 289.

5. Bresler V.M., Valter S.N., Zherebtsova M.A., Isayev-Ivanov V.V., Kazbekov E.N., Kleiner A.R., Orlov Yu.N., Ostapenko I.A., Suchodolova A.T. and Fomichev V.N. (1989). The influence of the lipid bilayer phase state on the p-aminohippurate (PAH) transport and the activity of the alkaline phosphatase in brush-border membrane vesicles from normal and mutant rats. Biochim. Biophys. Acta, V. 982, pp.288-294.

6. Бреслер В.М., Орлов Ю.Н., Казбеков Э.Н. (1989). Изучение физических механизмов транспорта органических кислот в пузырьках апикальной и базолатеральной мембраны клеток проксимальных канальцев почки. // 8 Всесоюзная конференция по физиологии почек и водно-солевого обмена. Тезисы доклада, С-Петербург, с. 37.

7. Беляева Е.А., Бреслер В.М., Казбеков Э.Н., Орлов Ю.Н. (1990). Роль Na^+, K^+ -АТФазы в экскреции анионных ксенобиотиков через клеточный слой. Цитология, Т. 32, №9, с. 917-918.

8. Казбеков Э.Н., Жеребцова М.А., Орлов Ю.Н., Бреслер В.М. (1992). Системы экскреции ксенобиотиков как способ тестирования в экологическом мониторинге. В книге: Биотестирование в решении экологических проблем. Л.: Наука, с. 31-45.

9. Орлов Ю.Н., Жеребцова М.А., Вальтер С.Н., Казбеков Э.Н. (1994). Количественное изучение неспецифической составляющей транспорта п-аминогиппурата в везикулах апикальной мембраны. Цитология, Т. 36, № 9/10, с. 966-971.

10. Orlov Yu.N., Zherebtsova M.A., Kazbekov E.N. (1994). Affinity identification of organic anion transporters in brush-border membrane vesicles from rat kidney. Biochim. Biophys. Acta V. 1192, pp. 117-124.

11. Орлов Ю.Н., Жеребцова М.А., Казбеков Э.Н. (1994). Необратимое ингибирование транспорта п-аминогиппуровой кислоты в везикулах апикальной мембраны проксимальных канальцев почки крысы. Определение кинетических параметров. Биологические мембраны, Т. 11, № 6, с. 631-638.

12. Орлов Ю.Н., Жеребцова М.А., Казбеков Э.Н. (1994). Аффинная идентификация системы транспорта органических анионов в проксимальных канальцах почки. Всероссийский симпозиум "Мембранный транспорт и функции клетки". С-Петербург, 25-27 октября, с. 391.
13. Orlov Yu.N., Zherebtsova M.A., Kazbekov E.N. (1995). Irreversible inhibition of p-aminohippurate transport in brush-border membrane vesicles isolated from the rat kidney cortex: determination of transport kinetic parameters. *Membr. and Cell Biol.*, V. 8, pp.663-670.
14. Orlov Yu.N., Kazbekov E.N. (1996). Structural investigation of the organic anion transport system of the rat kidney brush border membrane by the affinity probe method. *Membr. and Cell Biol.*, V. 10, pp.421-428.
15. Орлов Ю.Н., Казбеков Э.Н. (1996). Изучение структурной организации системы транспорта органических анионов апикальной мембраны клеток канальцев почки крысы методом аффинных меток. *Биол. мембраны*, Т. 13, № 4, стр.389-395.
16. Орлов Ю.Н. (1997). Механизмы секреции токсичных органических анионов в почке млекопитающих. *Биологические мембраны*, Т. 14, №4, с. 341-350.
17. Orlov Yu.N., Rebane E.N., Kazbekov E.N. (1997). Why do not all of Na^+ /dicarboxylate cotransporter substrates trigger the uphill organic anion transport through the basolateral membrane? XXXIII International congress of physiological sciences, St.Petersburg. D028.
18. Orlov Yu.N. (1997). Mechanisms of secretion of toxic organic anions in mammalian kidney. *Membr. Cell Biol.* V. 11 № 4, p. 417-429.
19. Ребане Е.Н., Орлов Ю.Н., Казбеков Э.Н., Любимов Я., Булат М.Н. (1997). Механизм сопряжения транспорта органических анионов с Na^+ /дикарбоксилатным симпортом в везикулах базолатеральной мембраны. *Биологические мембраны*, Т. 15, №1, с. 43-47.
20. Орлов Ю.Н., Ребане Ю.Т., Ребане Е.Н. (1999). Математическая модель энергетического сопряжения котранспортного и анион-обменного механизмов переноса в биологических мембранах. II Съезд биофизиков России, 23-27 августа, Москва, с. 546.
21. Rebane E.N., Orlov Y.N., Kazbekov E.N., Lyubimov Ya., Bulat M.N. (1998). The mechanism of coupling of the organic anion exchange to Na^+ -dicarboxylate symport in basolateral membrane vesicles. *Membr. Cell. Biol.*, V. 12, № 1, p. 51-56.
22. Орлов Ю.Н., Ребане Ю.Т., Ребане Е.Н. (2000). Минимальная математическая модель энергетического сопряжения котранспортного и анион-обменного механизмов переноса в биологических мембранах. *Биофизика*, Т. 45, вып. 5, с. 857-863.