УДК 577.19 + 547.96

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА МЕТАЛЛА (МЕДИ) С ГЕСПЕРЕТИНОМ НА АКТИВНОСТЬ АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ В КЛЕТКАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

В.М. Гречко[1], В.Т. Чещевик[1], A. Sykuła[2], A. Dzeikala[2], E. Lodyga-Chruscinska[2]
[1]*Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь*
[2]*Лодзинский технический университет, Лодзь, Республика Польша*

Актуальность. АВС транспортеры – это группа белков, которая осуществляет как импорт, так и экспорт широкого ряда компонентов в эукариотических клетках [1]. С одной стороны, АВС-транспортеры обеспечивают поддержание сбалансированного метаболизма клетки, с другой некоторые из них участвуют в реализации механизма множественной лекарственной устойчивости, что снижает эффективность лекарственной терапии [2].

В АВС белках дрожжей (*S. cerevisiae*) присутствуют трансмембранные домены (TMDs) и нуклеотидсвязывающие домены (NBDs), которые входят в структуру активного центра белка, в кото-

ром и происходит связывание молекулы АТФ и её гидролиз. Домены могут существовать в разных комбинациях, а именно, в «прямом» порядке TMD1-NBD1-TMD2-NBD2, но также могут быть в «обратном порядке» NBD1-TMD1-NBD1-TMD2. При этом ABC белки могут быть представлены в виде полноразмерных (TMD6-NBD)2 или (NBD-TMD6)2, или половинчатых транспортеров (TMD6-NBD), а также у них могут отсутствовать отдельные домены (TMD, NBD или NBD2) [3].

Согласно литературным данным *Saccharomyces cerevisiae* является идеальным модельным организмом для функционального анализа генов, связанных с болезнями, вследствие легкости и дешевизны их культивирования и полностью исследованного генома. Кроме того, дрожжевые клетки *S. cerevisiae* широко используются во многих процессах жизнедеятельности человека, начиная от пивоварения и виноделия, заканчивая производством биоэтанола. Эффективность работы промышленных штаммов зависит от их выживаемости в стрессовых факторах, а именно, при наличии этанольного стресса. Увеличение количества этанола, который накапливается до токсичных концентраций, приводит к отрицательному росту культуры, а также к застойным и вялым ферментациям. Повышенные концентрации этанола приводит к увеличению проницаемости мембраны и, как следствие, к диссипации трансмембранного электрохимического потенциала. [4]. Также было показано, что этанол ингибирует основные гликолитические ферменты и индуцирует образование активных форм кислорода. Одними из защитных механизмов клетки от пагубного влияния этанола являются ABC-транспортеры, которые напрямую могут участвовать в ремоделировании клеточной мембраны.

Одними из предполагаемых регуляторов ABC белков выступают флавоноиды, которые могут проявлять различные биологически-активные свойства (в том числе и выступать в качестве антиоксидантов). А добавление металлов (в данном случае меди (II)) может усиливать данные эффекты, в том числе и в отношении моделирования ABC-транспортеров [5].

Цель работы: исследование клеточных механизмов долговременного действия комплекса металла (меди (II)) с гесперетином на активность ABC белков в клетках *S. cerevisiae*.

Клетки *S. cerevisiae* выращивали при 30 ^{0}C в питательной среде YNB (yeast nitrogen base), которая содержала 2% глюкозу и 50 мкМ каждого из исследуемых флавоноидов. Клетки дрожжей растили до логарифмической фазы роста в течении 18 часов (OD 600nm = 0.5±0.05) и стационарной фазы роста в течении 24 часов (OD 600nm = 1.5±0.05).

Клетки *S. cerevisiae* инкубировали с Calcein AM в течении 60 минут при 30 ^{0}C. Данный зонд был добавлен к суспензии клеток в концентрации 10 мкМ. Для определения жизнеспособности клеток, к суспензии был добавлен PI (propidium iodide) в концентрации 30 мкМ.

Исследование влияния комплекса металла с гесперетином на ABC белки в клетках дрожжей *S. cerevisiae* осуществляли при помощи проточной цитофлуориметрии.

В ходе проделанных экспериментов, было установлено, что как на логарифмической, так и на стационарной фазах роста, нативная молекула гесперетина никак не повлияла на активность ABC-транспортеров. Добавление металла меди (II) к молекуле гесперетина увеличило процент клеток *S. cerevisiae*, обладающих флуоресценцией на логарифмической фазе роста. При достижении клетками стационарной фазы роста, эффект вышеуказанного комплекса изменился. Добавление металла меди (II) привело к значительному снижению клеток, содержащих краситель кальцеин, в 3 раза по сравнению с контрольной группой нативного флавоноида гесперетина (Рисунок).

Кроме того, была проверена жизнеспособность клеток дрожжей в зависимости от добавленного флавоноида в суспензию клеток. Было установлено, что комплекс металла гесперетина как на стационарной, так и на логарифмической фазе отрицательно повлияли на рост культуры. Жизнеспособность клеток снизилась в 3 раза на логарифмической и в 4 раза на стационарной фазе по сравнению с контрольной группой нативной молекулы гесперетина.

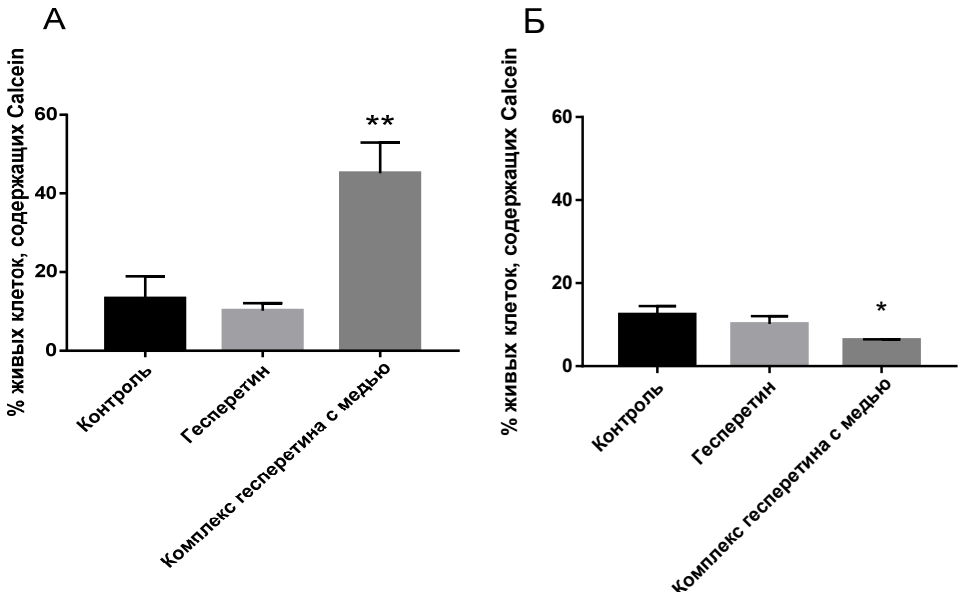

Рисунок – Процент живых клеток, содержащих краситель под действием гесперетина и его комплекса с металлом (А-логарифмическая фаза роста, Б-стационарная фаза роста)

В результате проделанных экспериментов был сделан вывод о том, что комплекс металла с гесперетином обладает более сильным модулирующим эффектом по сравнению с нативной молекулой гесперетина. Более того, эффект на каждой фазе роста проявляется по-разному, что говорит о экспрессии разных видов белков под действием вышеуказанного комплекса. Данные эффект может позволить применять комплексы флавоноидов с металлом в низких концентрациях для моделирования активности разных ABC-транспортеров на разных фазах роста дрожжей *S. Cerevisiae*.

Список использованных источников

1. Balzi E. Yeast multidrug resistance: the PDR network/ E. Balzi, A. Goffeau//J. Bioenerg. Biomembr, 1995. – Vol. 27. – P. 71–76.

2. Kothandan, G. Docking and 3D-QSAR (quantitative structure activity relationship) studies of flavones, the potent inhibitors of P-glycoprotein targeting the nucleotide binding domain/ G. Kothandan, C. G. Gadhe, T. Madhavan, C. H. Choi, S. J. Cho//Eur. J. Med. Chem, 2011. – Vol. 46. – P. 4078–4087.

3. Davidson A.L. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems/ A.L. Davidson, E. Dassa, C. Orelle// Mol. Biol. – Rev. 2008. – Vol. 72. – P. 317 – 364.

4. Sakowicz-Burkiewicz M. Suppression of TWIST1 enhances the sensitivity of colon cancer cells to 5-fluorouracil/ M. Sakowicz-Burkiewicz, T. Przybyla, M. Wesserling, H. Bielarczyk, I. Maciejewska, T. Pawelczyk//J Biochem Cell Biol., 2016. – Vol. 78. – P. 268 – 278.

5. Lodyga-Chruscinska E. Chelating ability and biological activity of hesperetin Schiff base/ E. Lodyga-Chruscinska [et al.]//J. of Inorganic Biochemistry, 2014. – Vol. 143. P. 387 – 398 p.