

УДК 577.29

Липид-белковые нанодиски: новые возможности для структурно-функциональных исследований водорастворимых мембраноактивных пептидов

З. О. Шенкарев^{1*}, Е. Н. Люкманова¹, А. С. Парамонов¹, П. В. Пантелеев¹, С. В. Баладин¹, М. А. Шулепко^{1,2}, К. С. Минеев¹, Т. В. Овчинникова^{1,3}, М. П. Кирпичников^{1,2}, А. С. Арсеньев^{1,3}

¹Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

³Московский физико-технический институт (государственный университет), 141700, Долгопрудный Московской обл., Институтский пер., 9

*E-mail: zakhar-shenkarev@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.10.2013

После доработки 19.03.2014

РЕФЕРАТ Липид-белковые нанодиски (ЛБН) представляют собой наноразмерные частицы, содержащие фрагмент бислоевой липидной мембраны, стабилизированный в растворе молекулами аполипопротеина или специальным белком MSP. В представленной работе изучена возможность применения мембраномоделирующих сред на основе ЛБН для исследования водорастворимых пептидов, обладающих сродством к липидным мембранам. Показано, что порообразующий антимикробный пептид ареницин-2 из морского пескожила (заряд +6) вызывает разрушение ЛБН, содержащих как цвиттер-ионные молекулы фосфатидилхолина (PC), так и анионные молекулы фосфатидилглицерина (PG). Напротив, токсин паука VSTx1 (заряд +3), блокирующий потенциал-зависимую активацию K⁺-каналов, эффективно взаимодействует с ЛБН, содержащими анионные липиды (POPC/DOPG, 3 : 1), не вызывая их разрушения. VSTx1 имеет меньшее сродство к ЛБН, содержащим цвиттер-ионные липиды (POPC), и слабо взаимодействует с белковой компонентой нанодисков – MSP (заряд -6). Нейротоксин II из яда кобры (NTII, заряд +4), ингибитор никотинового ацетилхолинового рецептора, имеет сравнительно небольшое сродство к ЛБН, содержащим анионные липиды (POPC/DOPG, 3 : 1 и POPC/DOPS, 4 : 1), и не связывается с ЛБН/POPC. Показано, что NTII взаимодействует с поверхностью ЛБН/POPC/DOPS в нескольких ориентациях, и обменные процессы между комплексами с различной топологией идут быстро по шкале ЯМР. Только одна из возможных ориентаций NTII допускает описанное ранее специфическое взаимодействие с полярной головкой фосфатидилсерина из мембранного окружения рецептора. Показано, что ЛБН могут применяться в структурно-функциональных исследованиях водорастворимых мембраноактивных нейротоксинов, а также для изучения механизма взаимодействия пептидных молекул с липидной мембраной.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антимикробные пептиды, липид-белковые нанодиски, липопротеиновые частицы высокой плотности, мембраноактивные пептиды, мембраномоделирующие среды, нейротоксины, ЯМР-спектроскопия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 5-DSA – 5-доксилстеариновая кислота; Ar2 – ареницин-2 из морского пескожила *Arenicola marina*; DLPC – дилауроилфосфатидилхолин; DLPG – дилауроилфосфатидилглицерин; DOPG – диолеоилфосфатидилглицерин; DOPS – диолеоилфосфатидилсерин; MSP – фрагмент 44–243 аполипопротеина A1 человека (membrane scaffold protein); NTII – нейротоксин II из яда кобры *Naja oxiana*; POPC – пальмитоилолеоилфосфатидилхолин; POPE – пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин; POPG – пальмитоилолеоилфосфатидилглицерин; R_n – гидродинамический радиус частицы, радиус Стокса; TROSY – transverse relaxation-optimized spectroscopy; TRX – тиоредоксин из *Escherichia coli*; VSTx1 –

«вольт-сенсорный» токсин из яда паука *Grammostola spatulata*; АМП – антимикробный мембраноактивный пептид; ЛБН – липид-белковый нанодиск; МП – мембраноактивный пептид; η_{xy} – скорость процесса кросс-корреляции между диполь-дипольной релаксацией и релаксацией, возникающей благодаря анизотропии химического сдвига ядра ^{15}N ; τ_r – эффективное время корреляции вращательных движений.

ВВЕДЕНИЕ

Мембраноактивные пептиды (МП) представляют собой класс биомолекул, играющих важную роль в существовании отдельных организмов и их сообществ. Например, антимикробные мембраноактивные пептиды (АМП), селективно действующие на мембраны различных клеток, – одни из основных эффекторов в системе «врожденного иммунитета» – древнейшей защитной системе эукариотических организмов [1]. Некоторые пептидные медиаторы нервной и эндокринной систем организма и ряд токсинов животного происхождения, нацеленных на рецепторы клеточной мембраны, также обладают мембранной активностью и действуют в несколько этапов, изначально связываясь с мембраной, окружающей рецептор, и только потом образуя лиганд-рецепторный комплекс [2, 3]. В этом случае реализуются механизмы так называемого «мембранного катализа», которые значительно увеличивают эффективность взаимодействия лиганд-рецептор [3].

Сложность исследования мембраноактивных пептидов связана с особенностями их пространственной организации. Из-за гидрофобных свойств и большой конформационной подвижности многие МП формируют «активную» пространственную структуру только в присутствии биологической мембраны или подходящей мембраномоделирующей среды (мембранного миметика). Эти факторы значительно затрудняют кристаллизацию МП и обуславливают необходимость использования альтернативных методов исследования. Одним из таких методов является ЯМР-спектроскопия высокого разрешения, которая позволяет изучать пространственную структуру и внутримолекулярную динамику МП в растворе мембраномоделирующих сред [4, 5]. Традиционно используемые мембранные миметики имеют ряд недостатков, которые ограничивают их применение для изучения специфических взаимодействий пептид-мембрана. Так, большая кривизна поверхности и рыхлая упаковка сред на основе детергентов (в форме мицелл или небольших смешанных бицелл с липидами) может приводить к значительным искажениям структуры пептида [6] и к появлению неспецифических взаимодействий пептид-детергент. В то же время среды, содержащие реальные бислойные мембраны в виде липидных везикул или липид/детергентных бицелл, обладают слишком большими размерами и не мо-

гут напрямую использоваться для структурно-динамических исследований МП методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения [4, 7].

Липид-белковые нанодиски (ЛБН), или реконструированные незрелые липопротеиновые частицы высокой плотности, представляют собой наноразмерные дискоидные частицы (обычно 10×4 нм), содержащие фрагмент бислойной липидной мембраны (~150 молекул липида), гидрофобная часть которого экранирована от растворителя двумя молекулами аполипротеина или его синтетического аналога MSP (membrane scaffold protein) [8]. В отличие от традиционно используемых мембранных миметиков, фрагмент липидной мембраны в составе липид-белкового нанодиска обладает повышенной стабильностью и сохраняет многие биофизические свойства, присущие настоящим мембранным системам, например фазовый переход из жидкокристаллического в гелевое состояние [9]. Недавно в ряде работ было показано, что ЛБН могут выступать в качестве альтернативной мембраномоделирующей среды для структурно-функциональных исследований мембранных белков и гидрофобных (слаборастворимых) МП [10–16], в том числе методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения [12–15]. Использование ЛБН, содержащих различные липиды и их смеси, позволяет изучать различные аспекты функционирования мембранных белков и МП [15, 16].

Вопрос о применимости мембраномоделирующих сред на основе ЛБН в структурных и биофизических исследованиях водорастворимых МП ранее не изучали. Следует отметить, что это не тривиальный вопрос, так как ЛБН, в отличие от везикул, бицелл и мицелл, содержат дополнительную компоненту – MSP, которая является анионным белком (заряд –6). В данной работе взаимодействие водорастворимых МП с ЛБН изучали на примере трех модельных катионных β -структурных пептидов (рис. 1), которые имеют различные физико-химические свойства и представляют три класса мембраноактивных соединений. Антимикробный пептид ареницин-2 (Ar2, 21 а.о., 2772 Да, заряд +6, средний индекс гидрофобности по шкале Kyte и Doolittle [17] -0.06^1) из целомоцитов морского многощетинкового червя *Arenicola marina* селективно

¹ Максимальное и минимальное значения индекса гидрофобности по шкале Kyte и Doolittle [17] равны +4.5 и –4.5 для poly-Ile- и poly-Arg-последовательностей соответственно.

взаимодействует с мембранами, содержащими отрицательно заряженные липидные молекулы, и образует в них олигомерные поры [18]. Токсин VSTx1 (34 а.о., 4010 Да, заряд +3, индекс гидрофобности -0.27) из яда паука *Grammostola spatulata* использует механизм «мембранного катализа» для взаимодействия с потенциал-чувствительными доменами K⁺-каналов, локализованными в клеточной мембране, и при этом не обладает способностью к порообразованию [3]. Нейротоксин II (NTII, 61 а.о., 6885 Да, заряд +4, индекс гидрофобности -1.10) из яда кобры *Naja oxiana* блокирует активацию никотинового ацетилхолинового рецептора, связываясь с его внеклеточным доменом, но, возможно, также использует механизм «мембранного катализа», взаимодействуя с полярными головками фосфатидилсерина (PS) из мембранного окружения рецептора [19]. Выбранные в качестве объектов исследования пептиды растворимы в воде в миллимолярных концентрациях, однако, они значительно отличаются друг от друга по своим гидрофобным/гидрофильным свойствам. Так, несмотря на большой положительный заряд, Ar2 является наиболее гидрофобным из исследуемых пептидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реконструкция и очистка ЛБН

В качестве белка MSP в работе использовали рекомбинантный фрагмент 44–243 аполипопротеина A1 человека, содержащий на N-конце последовательность из шести остатков His. Очищенный белок MSP, полученный как описано в [20], смешивали в молярном соотношении 1 : 75 с липидами в присутствии детергента холата натрия (молярное соотношение холат/липиды 2 : 1) и инкубировали смесь в течение 3 ч при 4 °С. При использовании насыщенных липидов (DLPC, DLPG) температуру реакции поддерживали не ниже 25 °С. Самопроизвольную сборку ЛБН инициировали путем сорбции детергента на смолу Bio-Beads™ (Bio-Rad, США) в течение 1.5 ч. Очистку нанодисков производили на металлоаффинной смоле Ni²⁺ Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, США), уравновешенной буфером А (20 мМ Трис-НСl, 0.5 М NaCl, 1 мМ NaN₃, рН 8.0). После нанесения реакционной смеси смолу промывали пятикратным объемом буфера А. Элюцию ЛБН проводили буфером А, содержащим 100 мМ имидазола. Концентрацию MSP определяли спектрофотометрически по поглощению

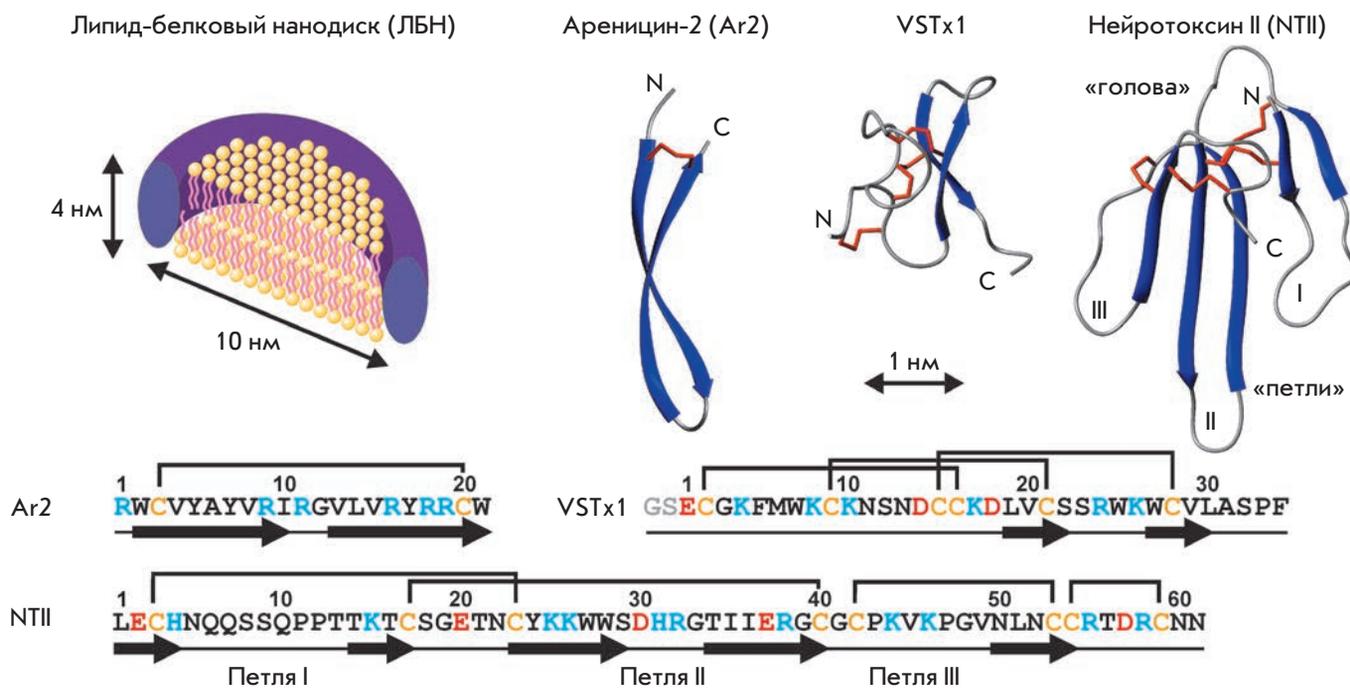


Рис. 1. Схема строения липид-белкового нанодиска и аминокислотные последовательности и пространственные структуры ареницина-2, VSTx1 и NTII (PDB-коды 2JN1, 1S6X и 1NOR соответственно). Две молекулы MSP, экранирующие фрагмент фосфолипидной мембраны нанодиска от растворителя, показаны в виде тора. На последовательностях пептидов цветом показаны заряженные остатки и остатки Cys. В работе использовали рекомбинантный аналог VSTx1, дополнительно содержащий остатки Gly-Ser на N-конце (показаны серым цветом)

нию при $\lambda = 280$ нм. Концентрацию ЛБН определяли, предполагая, что каждый нанодиск содержит две молекулы MSP.

Гель-фильтрация

Гель-фильтрацию с разделением частиц по размеру проводили на смоле Superdex-200, на колонке Tricorn 5/200 (GE Healthcare, Швеция) в буфере (10 мМ Трис-НСl, 0.1 М NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ NaN₃, рН 7.4). В качестве калибровочных белков использовали тироглобулин (669 кДа, радиус Стокса $R_H = 8.5$ нм), ферритин (440 кДа, $R_H = 6.1$ нм), каталазу (232 кДа, $R_H = 5.22$ нм), альдолазу (158 кДа, $R_H = 4.81$ нм), БСА (67 кДа, $R_H = 3.55$ нм), овальбумин (43 кДа, $R_H = 3.05$ нм). Скорость потока через колонку – 0.3 мл/мин, детектирование производили на длине волны 280 нм. Размер частиц определяли по калибровочной кривой зависимости объема элюции от $\lg R_H$. Все приведенные ниже значения размера (диаметра) частиц соответствуют удвоенным значениям R_H .

Получение рекомбинантного аналога Ar2

Рекомбинантный аналог ареницина-2, по аминокислотной последовательности полностью соответствующий природному пептиду, получен согласно протоколам [18, 21].

Продукция и очистка VSTx1

В работе использовали стандартные генно-инженерные методики. Ген *VSTx1* получен с помощью ПЦР с шестью перекрывающимися синтетическими олигонуклеотидами (ЗАО «Евроген», Москва), оптимизированными по редким в *Escherichia coli* кодонам. Ген *VSTx1* был клонирован в вектор рЕТ-32a(+) (Novagen) по сайтам KpnI и BamHI в единой рамке считывания с геном тиоредоксина (TRX). Затем последовательность, кодирующую сайт гидролиза гибридного белка энтерокиназой, предусмотренную в векторе рЕТ-32a(+), заменили на последовательность, кодирующую сайт гидролиза тромбином. Полученную плазмиду назвали рЕТ/TRX-VSTx1.

Клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали рекомбинантным вектором рЕТ/TRX-VSTx1 и рассевали на чашки Петри с LB-агаром (10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl на 1 л среды, рН 7.4) и ампициллином (100 мг/л). Колонии с чашки переносили в питательную среду ТВ (12 г бактотриптона, 24 г дрожжевого экстракта, 4 мл глицерина, 2.3 г KН₂РO₄, 12.5 г K₂НРO₄ на 1 л среды, рН 7.4), содержащую ампициллин (100 мг/л), культивировали при 37°C с умеренным перемешиванием до достижения оптической плотности 0.6 о.е. Индуцировали транскрипцию гена *TRX-VSTx1* добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозиды (ИПТГ)

до конечной концентрации 0.025 мМ и продолжали культивирование клеточной культуры в среде ТВ при 37°C в течение ночи.

Клеточную культуру центрифугировали (20 мин, 8000 об/мин, 4°C). Клеточный осадок с 1 л культуры ресуспендировали в буфере А. Клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора (Branson Digital Sonifier) по 10 с с 12-кратным повтором. Лизат центрифугировали в течение 30 мин при 30000 g, далее отбирали надосадочную жидкость. Лизат очищали на металлоаффинной смоле, уравновешенной буфером А. После нанесения препарата белка колонку промывали последовательно трехкратными объемами: буфера А и буфера А, содержащего 50 мМ имидазола. TRX-VSTx1 элюировали буфером А, содержащим 150 мМ имидазола. После очистки проводили специфический гидролиз гибридного белка тромбином. Препарат VSTx1 выделяли с помощью вычитающей металлоаффинной хроматографии. Для окончательной очистки препарата VSTx1 применяли ВЭЖХ на обращенной фазе (колонка С4, 4.6 × 250 мм, А300, Jupiter, Phenomenex). Выход токсина составил 1 мг/л бактериальной культуры. В отличие от природного токсина, рекомбинантный аналог VSTx1 содержал на N-конце дополнительные остатки Gly-Ser, возникающие в результате гидролиза тромбином. Идентичность молекулярной массы рекомбинантного токсина расчетному значению подтверждена с помощью масс-спектрометрии.

Получение NTII и его ²H,¹⁵N-меченого варианта

Препарат рекомбинантного нейротоксина II был получен согласно [22]. ²H,¹⁵N-меченый препарат NTII получали следующим образом. Клетки BL21(DE3), трансформированные вектором рЕТ-22b(+)/STII/NTII [22], рассевали на чашки Петри с LB-агаром и ампициллином (100 мг/л). Колонии с чашки инокулировали в 10 мл среды LB и культивировали при 37°C в течение 1 ч. Затем к клеткам каждый час добавляли по 10 мл среды LB, приготовленной на дейтерированной воде (²H₂O, 99% дейтерия), до тех пор, пока общий объем среды не достиг 110 мл. В этих условиях культивирование продолжили в течение ночи. После этого в стерильных условиях собирали клеточный осадок и ресуспендировали его в 1 л минимальной среды M9 (6 г Na₂НРO₄, 3 г KН₂РO₄, 0.5 г NaCl, 2 г ¹⁵NH₄Cl, 240 мг безводного MgSO₄, 11 мг CaCl₂, 4 мл глицерина, 2 мг дрожжевого экстракта, 200 мкл 5% тиаминхлорида на 1 л среды, рН 7.4), приготовленной на ²H₂O. Клетки инкубировали при 37°C до достижения культурой оптической плотности, равной 0.6 о.е. Транскрипцию гена *stII-ntII* индуцировали ИПТГ, который добавляли до конечной концентрации 0.05 мМ, и продолжали культивировать клеточную культуру в течение 1 сут.

Выделение и очистку ^2H , ^{15}N -NTII осуществляли согласно [22].

ЯМР-спектроскопия

ЯМР-спектры получали при температуре 40–45°C на спектрометрах AVANCE-700 и AVANCE-III-800 (Bruker, Германия), укомплектованных датчиками с криогенно охлаждаемой ^1H -катушкой, с рабочей частотой по протонам 700 и 800 МГц соответственно.

Для измерения изотерм связывания токсинов с ЛБН и молекулами MSP образцы VSTx1 и NTII (20 мкМ, 10 мМ Трис-Ас, рН 7.0) титровали раствором нанодисков (70 мкМ) различного липидного состава или раствором MSP (0.7 мМ). В каждой точке измеряли 1D ^1H -ЯМР-спектр. Анализ данных проводили, предполагая, что интенсивность наблюдаемых ЯМР-сигналов пептида пропорциональна его равновесной концентрации в растворе ($[\text{P}]_{\text{free}}$). Кривые связывания аппроксимировали либо уравнением равновесного распределения (1), либо с помощью изотермы Ленгмюра (2), учитывая разведение исходных образцов при титровании:

$$\frac{[\text{P}]_{\text{bound}}}{[\text{ЛБН/Липид}]} = K_p \cdot [\text{P}]_{\text{free}}, \quad (1)$$

$$\frac{1}{K_n} = \frac{[\text{P}]_{\text{free}} \cdot (n \cdot [\text{ЛБН}] - [\text{P}]_{\text{bound}})}{[\text{P}]_{\text{bound}}}, \quad (2)$$

где $[\text{ЛБН/Липид}]$ – концентрация ЛБН (в предположении, что один нанодиск содержит две молекулы MSP) или концентрация липидов (в предположении, что один нанодиск содержит 150 молекул липида), $[\text{P}]_{\text{bound}}$ – концентрация пептида, связанного с ЛБН ($[\text{P}]_0 = [\text{P}]_{\text{free}} + [\text{P}]_{\text{bound}}$), K_p – коэффициент распределения, n – число сайтов связывания пептида на поверхности нанодиска, K_n – константа формирования комплекса пептид–сайт связывания.

Взаимодействие NTII с ЛБН изучали с использованием образца, содержащего 45 мкМ ^2H , ^{15}N -NTII и 75 мкМ ЛБН/POPC/DOPS (4 : 1) (10 мМ Трис-Ас, рН 7.0). Для идентификации NH-групп пептида, сближенных с поверхностью нанодиска, в 2D ^{15}N , ^1H -TROSY-спектрах наблюдали изменения интенсивностей кросс-пиков NTII при преднасыщении холиновой группы липида POPC. Сигнал $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ -группы (химический сдвиг – 3.2 м.д.) насыщали на мощности 125 Гц в течение 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 и 3.0 с, используя задержку на релаксацию, равную 3 с. Для идентификации NH-групп пептида, сближенных с гидрофобным регионом мембраны нанодиска, к образцу NTII в комплексе с ЛБН/POPC/DOPS добавляли 5-доксилстеариновую кислоту (5-DSA), растворен-

ную в небольшом количестве метанола, до конечной концентрации 10, 30 и 75 мкМ. Ослабление интенсивности сигналов NTII, возникающее за счет парамагнитного усиления релаксации ядер ^1H и ^{15}N , наблюдали в 2D ^{15}N , ^1H -TROSY-спектрах. Скорости процесса кросс-корреляции между диполь-дипольной релаксацией и релаксацией, возникающей из-за анизотропии химического сдвига ядра, ^{15}N (η_{xy}) измеряли для комплексов NTII с ЛБН/POPC/DOPS при температуре 40°C на спектрометре AVANCE-III-800, используя эксперименты на основе 2D ^{15}N , ^1H -TROSY [23]. Время корреляции вращательных движений (τ_R) для NH-групп пептида было рассчитано из измеренных значений η_{xy} .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие апеницина-2 с нанодисками

Катионный АМП Ar2 содержит в основном положительно заряженные и гидрофобные остатки и в воде имеет структуру β -шпильки, стабилизированной одной дисульфидной связью (рис. 1) [21]. Апеницин-2 селективно взаимодействует с мембранами, содержащими отрицательно заряженные молекулы липидов, и образует в них олигомерные поры, сформированные с участием фосфолипидов (так называемые тороидальные поры) [18]. В больших концентрациях Ar2, вероятно, приводит к мицеллизации бислоя [24]. Как предполагается, в составе поры β -шпильки индивидуальных пептидов имеют трансмембранную ориентацию, так что N- и C-концевые фрагменты и регион β -поворота контактируют с полярными регионами на наружной и внутренней сторонах мембраны [18].

С целью изучения возможности получения стабильных комплексов Ar2 с ЛБН использовали нанодиски, содержащие нейтральные (POPC) и анионные (DOPG) «длинноцепочечные» липиды. Ранее методом КД-спектроскопии было показано, что Ar2 не взаимодействует с везикулами, сформированными из POPC, и с высокой аффинностью связывается с липосомами на основе DOPG [18, 21]. Для моделирования возможного перехода β -шпильки Ar2 (длина ~ 3.5 нм) в трансмембранное состояние использовали смесь «короткоцепочечных» липидов различного заряда (DLPC/DLPG = 4 : 1, жирнокислотные цепи длиной 12 атомов углерода, расстояние между фосфатными группами на противоположных сторонах мембраны ~ 3.4 против ~ 3.7 нм у длинноцепочечных липидов [25]). Ранее ЛБН на основе смеси DLPC/DLPG использовали для наблюдения переходов между поверхностно-связанным и трансмембранным состоянием пептидного канала образующего антибиотика антиамебина I [15].

В ходе исследования водный раствор Ar2 добавляли к образцам нанодисков. Во всех случаях, даже

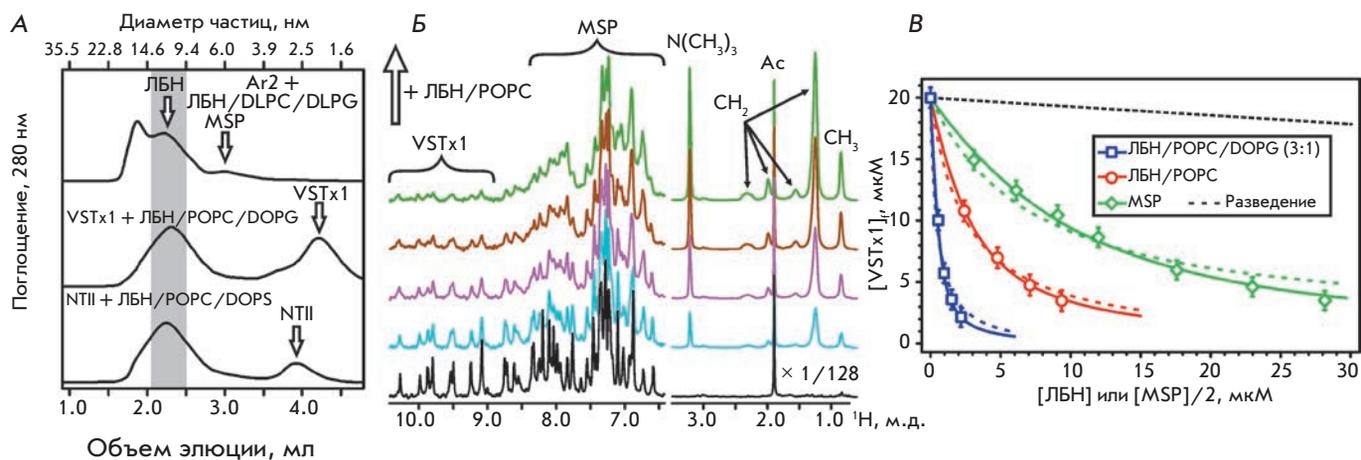


Рис. 2. Гель-фильтрационный анализ препаратов ЛБН после добавления мембраноактивных пептидов и анализ изотерм связывания VSTx1 с ЛБН и MSP. А – на хроматограммах показано положение пиков, соответствующее нанодискам, агрегатам MSP, NTII и VSTx1. Б – взаимодействие VSTx1 с ЛБН/РОРС. Показаны фрагменты 1D ¹H-спектров 20 мкМ VSTx1, измеренных при различных концентрациях ЛБН. В – изотермы связывания VSTx1 с ЛБН и MSP, аппроксимированные уравнением равновесного распределения (уравнение (1), пунктирные линии) и уравнением Ленгмюра (уравнение (2), сплошные линии). Полученные параметры приведены в таблице

при добавлении малых концентраций пептида, растворы ЛБН сильно опалесцировали, а при эквимоллярных концентрациях ($Ar2/LBN = 1 : 1$) и выше растворы мутнели, что указывало на разрушение нанодисков с образованием более крупных частиц. Анализ супернатанта препаратов с помощью гель-фильтрации подтвердил это предположение. В образцах выявлены большие комплексы, имеющие характерные размеры ~ 15 нм, остаточная фракция ЛБН диаметром $\sim 10-11$ нм, а также небольшое количество частиц диаметром ~ 6 нм (рис. 2А). Сравнение с результатами предыдущих исследований [20, 26] позволило предположить, что эти частицы представляют собой агрегаты белка MSP. По-видимому, Ar2 вызывает слияние нанодисков, сопровождаемое высвобождением молекул MSP. Сходный процесс известен как ремоделирование липопротеинов высокой плотности (lipoprotein remodeling), которое может происходить как *in vitro*, так и *in vivo* при взаимодействии липопротеиновых частиц с липофильными белками плазмы крови [27]. Ранее слияние нанодисков наблюдали в бесклеточных системах биосинтеза белка при котрансляционном встраивании мембранных белков в ЛБН, содержащие ненасыщенные липиды [26]. Процессы самопроизвольного слияния ЛБН *in vitro* идут чрезвычайно медленно, но они значительно ускоряются в денатурирующих условиях [28].

Для периферической стабилизации фрагмента мембраны молекулы MSP, обладающие амфифильными свойствами, должны вносить в липидный бислой значительную положительную спонтанную кривизну. Аналогичное влияние на спонтанную кривизну

бислоя оказывают многие амфифильные мембрано-активные пептиды, в частности АМП, чье действие опосредовано формированием «тороидальных» пор – регионов с большой положительной кривизной [29], или мицеллизацией бислоя. Ar2 не взаимодействует с липосомами на основе РОРС [21], поэтому мы можем предположить, что слияние нанодисков, наблюдаемое в случае ЛБН/РОРС, не связано напрямую с порообразующей активностью пептида, а вызвано его присоединением к периферическому участку фрагмента липидной мембраны ЛБН. Присоединенные молекулы Ar2 смещают отдельные участки белка MSP, что приводит к образованию дефектов в структуре ЛБН и слиянию нанодисков с образованием липопротеиновых частиц, содержащих большие фосфолипидные домены, и высвобождению свободных молекул MSP. В случае ЛБН, содержащих анионные липиды, может быть предложен альтернативный механизм формирования дефектов в структуре ЛБН, обусловленный способностью Ar2 взаимодействовать непосредственно с мембраной нанодиска.

Учитывая, что механизмы, связанные с изменением локальной кривизны липидного бислоя (образование «тороидальных» пор, мицеллизация бислоя), лежат в основе действия подавляющего большинства водорастворимых катионных АМП, мы можем предположить, что многие из этих молекул будут обладать разрушающим действием на ЛБН. Таким образом, нанодиски, вероятно, не подходят в качестве среды для исследования подобных пептидов. Следует отметить, что существуют другие классы поро- и каналобразующих биомолекул, которые могут изу-

чаться в средах на основе ЛБН. Так, описано формирование стабильных комплексов ЛБН с гидрофобным каналообразующим антибиотиком антиамебином I (верхний предел растворимости в воде 30 мкМ) [12, 15, 20], а также успешное встраивание в нанодиски интегральных мембранных белков, образующих ионные каналы и поры, таких, как K^+ -канал KcsA [20], никотиновый ацетилхолиновый рецептор [30], порообразующий компонент токсина сибирской язвы [11], и ряда белков, имеющих структуру β -бочонка [14].

Взаимодействие токсина VSTx1 с нанодисками и белком MSP

Токсин VSTx1 – небольшой β -структурный пептид, стабилизированный тремя дисульфидными связями, образующими «цистеиновый узел» (рис. 1) [31]. VSTx1 слабо взаимодействует с мембранами на основе цвиттер-ионных липидов, имеет значительное сродство к интерфейсу фосфолипидных мембран, содержащих анионные липиды, и при этом не обладает мембранолитической активностью [31]. Согласно современным данным, VSTx1 ингибирует потенциал-зависимую активацию K^+ -каналов и при образовании комплекса с потенциал-чувствительным доменом канала использует механизмы «мембранного катализа» [3]. Активность токсина значительно зависит от липидного состава и механического состояния бислоевой мембраны, окружающей канал [32].

Ранее для исследования взаимодействия VSTx1 с липосомами использовали смесь фосфолипидов на основе цвиттер-ионного фосфатидилэтаноламина и анионного фосфатидилглицерина (POPE/POPG, 3 : 1) [3]. Однако формирование ЛБН, содержащих значительную фракцию фосфатидилэтаноламина, малоэффективно, вероятно, из-за высокой отрицательной спонтанной кривизны образуемого бислоя [20, 33]. Поэтому для оценки энергетики взаимодействия токсина VSTx1 с мембранами ЛБН использовали нанодиски, содержащие цвиттер-ионный фосфатидилхолин и анионный фосфатидилглицерин (POPC и смесь POPC/DOPG, 3 : 1). Для оценки вклада неспецифических взаимодействий, обусловленных присутствием в ЛБН белковой компоненты, использовали препарат MSP, не содержащий липиды. Титрование образца VSTx1 раствором ЛБН либо раствором белка MSP, который в водном окружении образует сравнительно большие агрегаты (диаметр ~ 6 нм), приводило к постепенному уменьшению интенсивности ЯМР-сигналов пептида (рис. 2Б), что указывало на ассоциацию VSTx1 с поверхностью нанодисков или молекулами MSP. В этом случае из-за медленной реориентации нанодисков и агрегатов MSP в растворе связывание пептида вело к значительному увеличению ширины ЯМР-линий и умень-

шению интенсивности сигналов. Расчеты показали, что в условиях эксперимента с хорошей точностью можно использовать предположение о том, что интенсивность наблюдаемого сигнала ЯМР прямо пропорциональна равновесной концентрации свободного пептида в растворе ($[VSTx1]_f$).

Анализ измеренных кривых связывания с помощью уравнения равновесного распределения (уравнение 1, рис. 2В, таблица) показал, что VSTx1 эффективно взаимодействует с ЛБН, содержащими анионные липиды (смесь POPC/DOPG), и менее эффективно взаимодействует с нанодисками на основе цвиттер-ионных липидов (POPC). Рассчитанные коэффициенты распределения ($K_p \sim 17.8 \times 10^3$ и $2.6 \times 10^3 M^{-1}$ соответственно) значительно превышали значения, наблюдаемые ранее для везикул POPE/POPG (3 : 1) и POPC ($K_p \sim 2 \times 10^3$ и $< 0.002 \times 10^3 M^{-1}$ соответственно) [3, 31]. Эти различия в аффинности токсина могут быть обусловлены как отличиями в упаковке молекул фосфолипидов в мембранах ЛБН и везикулах [34], так и использованием в экспериментах различных буферных систем. В работах [3, 31] связывание токсина изучали в буферах, содержащих 150 мМ KCl и NaCl соответственно, в то время как в нашей работе использовали буфер без добавления соли. Увеличение ионной силы раствора, приводящее к частичному экранированию электростатических взаимодействий, вероятно, уменьшает сродство VSTx1 к липидным мембранам. Наблюдаемое слабое взаимодействие VSTx1 с белком MSP (рис. 2В, таблица), по-видимому, обусловленное электростатическим взаимодействием между положительно заряженной молекулой токсина и анионной молекулой MSP, также может выступать в роли дополнительного фактора, усиливающего аффинность токсина к ЛБН.

Анализ кривых связывания с помощью изотермы Ленгмюра (уравнение (2), рис. 2В, таблица) позволил установить, что VSTx1 имеет примерно одинаковую аффинность к сайтам на поверхности нанодиска или на молекуле MSP ($K_n \sim 0.05 \times 10^6 - 0.13 \times 10^6 M^{-1}$, таблица), однако, число сайтов связывания значительно отличается. Так, нанодиск, содержащий POPC (~150 молекул), может связать до ~10 молекул токсина, а добавление отрицательно заряженных липидов увеличивает число сайтов связывания до ~35 (~4 молекулы липидов на молекулу токсина). В свою очередь, каждая молекула MSP (в отсутствие липидов) способна связать до 1.6 молекулы VSTx1, что ведет к практически полной компенсации ее заряда.

Гель-фильтрационный анализ комплексов VSTx1/ЛБН не выявил разрушения нанодисков при связывании токсина. На хроматограммах (рис. 2А) видны отдельные пики для частиц диаметром ~10–11

Энергетические и стехиометрические параметры, описывающие взаимодействие VSTx1 и NTII с ЛБН и MSP, полученные с использованием уравнения равновесного распределения (уравнение (1)) либо уравнения изотермы Ленгмюра (уравнение (2))

Пептид	ЛБН или MSP	Равновесное распределение		Изотерма Ленгмюра	
		K_p (ЛБН, MSP×2)* × 10 ⁶ , М ⁻¹	K_p (Липиды)* × 10 ³ , М ⁻¹	K^{**} × 10 ⁶ , М ⁻¹	n^{***}
VSTx1	ЛБН/POPC	0.39 ± 0.02	2.6 ± 0.2	0.06 ± 0.01	9.6 ± 1.5
	ЛБН/POPC/DOPG (3 : 1)	2.68 ± 0.24	17.8 ± 1.6	0.13 ± 0.02	34.5 ± 3.9
	MSP×2	0.10 ± 0.01		0.05 ± 0.02	3.2 ± 0.9
NTII	ЛБН/POPC/DOPG (3 : 1)	0.32 ± 0.01	2.13 ± 0.07		
	ЛБН/POPC/DOPS (4 : 1)	0.16 ± 0.01	1.07±0.07		

* K_p – коэффициент распределения. В качестве концентрации «неводной» среды использовали концентрацию ЛБН или липидов, предполагая, что один нанодиск содержит две молекулы MSP и 150 молекул липида.

** K_n – константа формирования комплекса пептид–сайт связывания.

*** n – число сайтов связывания пептида на поверхности нанодиска.

и ~2.0 нм, которые, вероятно, соответствовали нанодискам и свободному токсину, диссоциированному с поверхности нанодиска (для хроматографии использовали буфер, содержащий 100 мМ NaCl).

Взаимодействие нейротоксина NTII с нанодисками

Нейротоксин II (NTII) – катионный негидрофобный пептид, стабилизирован четырьмя дисульфидными связями и имеет так называемую «трехпетельную» β-структурную организацию, характерную для токсинов змей (рис. 1) [35]. NTII является высокоспецифичным ингибитором никотинового ацетилхолинового рецептора мышечного типа, своей центральной петлей он блокирует сайты связывания лигандов, располагающиеся на внеклеточном домене рецептора [36]. В отличие от VSTx1, NTII не имеет явно выраженной мембранной активности. В то же время в ходе исследований, проведенных с использованием методов ¹H, ¹⁵N- и ³¹P-ЯМР-спектроскопии на липосомах DOPC/DOPS/холестерин (3 : 1 : 1), моделирующих мембранное окружение ацетилхолинового рецептора, предположили, что механизм действия NTII также включает элементы «мембранного катализа» [19]. По-видимому, сайт, локализованный в области «головы» токсина вблизи остатков Glu2, Asp57 и Arg58 (рис. 3Б), способен в стехиометрии 1 : 1 связывать заряженную головку молекулы фосфатидилсерина (PS) биологической мембраны, окружающей рецептор. Это взаимодействие, возможно, играет роль на начальных этапах действия NTII и служит для придания молекуле токсина ориентации, оптимальной для образования комплекса токсин–рецептор [19].

Формирование ЛБН из смеси фосфолипидов POPC/DOPS/холестерин (3 : 1 : 1) при помощи стандартного протокола сборки нанодисков (см. «Экспериментальную часть») оказалось малоэф-

фективным, поэтому были выбраны ЛБН на основе смеси POPC/DOPS (4 : 1). Кроме того, для сравнения были протестированы нанодиски на основе POPC и POPC/DOPG (3 : 1). Титрование образца NTII растворами нанодисков показало, что токсин не связывается с нанодисками на основе цвиттер-ионных липидов (POPC) и имеет небольшое сродство к ЛБН, содержащим анионные липиды (POPC/DOPG и POPC/DOPS) (рис. 3А, таблица). Большую аффинность NTII к ЛБН на основе POPC/DOPG (3 : 1) можно объяснить большим зарядом мембраны нанодиска (относительное содержание заряженного липида 25% против 20% у мембраны POPC/DOPS (4 : 1)). Кроме того, в мембране, содержащей DOPS, заряды NH₃⁺ и COOH-групп серина образуют диполь, который может экранировать отрицательный заряд фосфатной группы. Таким образом, кажущийся заряд полярной головки у DOPS будет меньше, чем у DOPG. Полученные данные позволяют сделать предположение об отсутствии значительной селективности у молекулы NTII при взаимодействии с анионными липидами, различающимися структурой полярных головок (фосфатидилсерин и фосфатидилглицерин).

Отсутствие детектируемого связывания NTII с ЛБН/POPC косвенно указало на отсутствие неспецифического взаимодействия токсина с белковой компонентой нанодисков – MSP. Так же, как и в случае с VSTx1, гель-фильтрационный анализ комплексов NTII/ЛБН не выявил разрушения нанодисков при связывании токсина (рис. 2А). На хроматограммах видны отдельные пики, соответствующие нанодискам и свободному токсину (диаметр ~2.6 нм).

Топологию взаимодействия молекулы NTII с поверхностью мембраны POPC/DOPS в составе ЛБН изучали с использованием ²H, ¹⁵N-меченого аналога NTII. ЯМР-эксперименты проводили в условиях, ког-

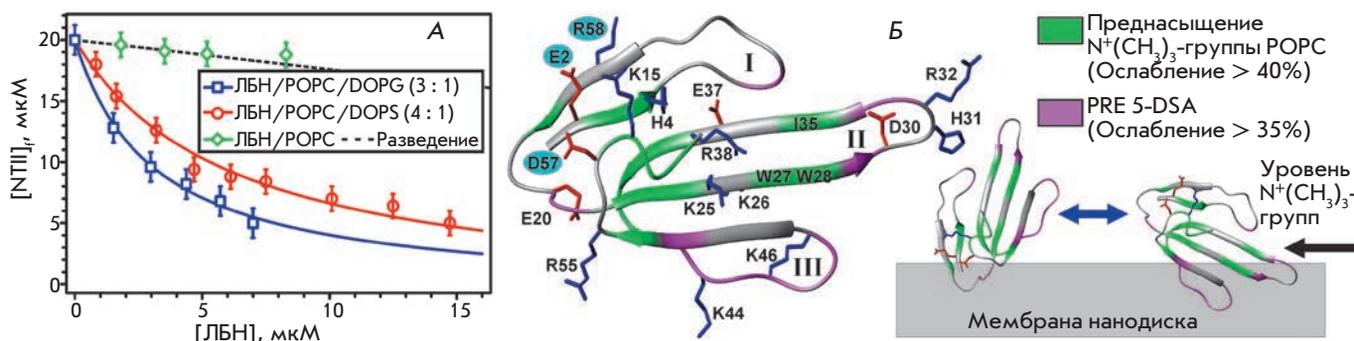


Рис. 3. Анализ изотерм связывания NTII с ЛБН и возможная топология взаимодействия молекулы NTII с поверхностью мембраны РОРС/ДОРС в составе ЛБН. А – изотермы связывания NTII с ЛБН аппроксимированы уравнением равновесного распределения (уравнение (1)). Полученные параметры приведены в таблице. Б – структура NTII окрашена в соответствии с полученными экспериментальными данными (рис. 4Г, Д). Остатки, формирующие предполагаемый сайт связывания с полярной головкой фосфатидилсерина [19], выделены голубыми кружками

да практически весь токсин был связан с поверхностью нанодиска. Несмотря на значительное уширение и ослабление сигналов связанного пептида (рис. 4А), применение дейтерированного аналога NTII и экспериментов TROSY, оптимизированных для уменьшения поперечной релаксации ядер ^1H и ^{15}N , позволило получить ^1H , ^{15}N -корреляционный спектр NTII в комплексе с ЛБН (рис. 4Б). Сравнение ^1H и ^{15}N химических сдвигов молекулы NTII в водном окружении и в комплексе с ЛБН не выявило значительных изменений в пространственной структуре токсина при образовании комплекса. Изменения химических сдвигов, превышающие 0.03 и 0.2 м.д. соответственно, отмечены только для одного остатка Arg32 (данные не показаны).

Скорости кросс-корреляции релаксации ядер ^{15}N (η_{XY}), измеренные для HN-групп NTII в комплексе с ЛБН (рис. 4В), показали большой разброс значений (от 2.5 до 40 Гц, среднее значение 16.3 ± 9.2 Гц, частота 800 МГц, 40°C), что соответствовало временам корреляции вращательных движений (τ_{R}) в диапазоне от 2 до 31 нс, со средним ~ 12.5 нс. Рассчитанное среднее значение τ_{R} соответствовало реориентации глобулярной частицы диаметром ~ 5.4 нм и массой ~ 34 кДа, что значительно превышает размеры молекулы NTII, но существенно меньше размеров нанодиска. Полученные данные указывают на значительную анизотропию взаимодействий в комплексе NTII/ЛБН, которая может объясняться либо наличием дополнительных степеней свободы у молекулы токсина в составе комплекса, либо вовлечением молекулы NTII в быстрый (по шкале ЯМР) обменный процесс между связанным и свободным состояниями.

Возможную ориентацию NTII на поверхности мембраны нанодиска определяли, измеряя перенос намагниченности между протонами липидов и HN-

группами нейротоксина за счет ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Наибольший отклик в ЯМР-спектрах пептида детектировался при насыщении сигналов холиновой группы РОРС. Существенное падение интенсивности ^1H , ^{15}N -кросс-пиков наблюдалось для остатков, локализованных на двух участках молекулы NTII: 1) в области «головы» токсина, вблизи от предполагаемого сайта связывания фосфатидилсерина, и 2) в центральной (второй) петле на уровне остатков Trp27, Trp28 и Ile35 (рис. 3Б, 4Г). Наблюдаемое уменьшение интенсивности указывало на пространственную сближенность соответствующих HN-групп токсина с поверхностью бислоя ЛБН.

Дополнительно с целью определения топологии NTII на поверхности нанодиска использовали липофильный спиновый зонд 5-DSA, который встраивается в бислой таким образом, что его спиновая метка располагается в гидрофобном регионе мембраны вблизи от области, занимаемой полярными головками. Наибольшее ослабление интенсивностей HN-сигналов, вызванное эффектом парамагнитного усиления релаксации, наблюдалось у остатка Thr21 из «головы» токсина и остатков из третьей и второй петель (рис. 3Б, 4Д), что указывало на наличие контакта соответствующих HN-групп с гидрофобным регионом бислоя ЛБН.

Полученные данные не согласуются с одной преимущественной ориентацией молекулы NTII на поверхности мембраны нанодиска (рис. 3Б). Вероятно, токсин взаимодействует с поверхностью нанодиска в нескольких (минимум двух) ориентациях и участвует в быстрых (по шкале химических сдвигов ЯМР) обменных процессах между комплексами с различной топологией. При этом только одна из возможных топологий (рис. 3Б) «совместима» со специфическим взаимодействием NTII с полярной головкой фосфа-

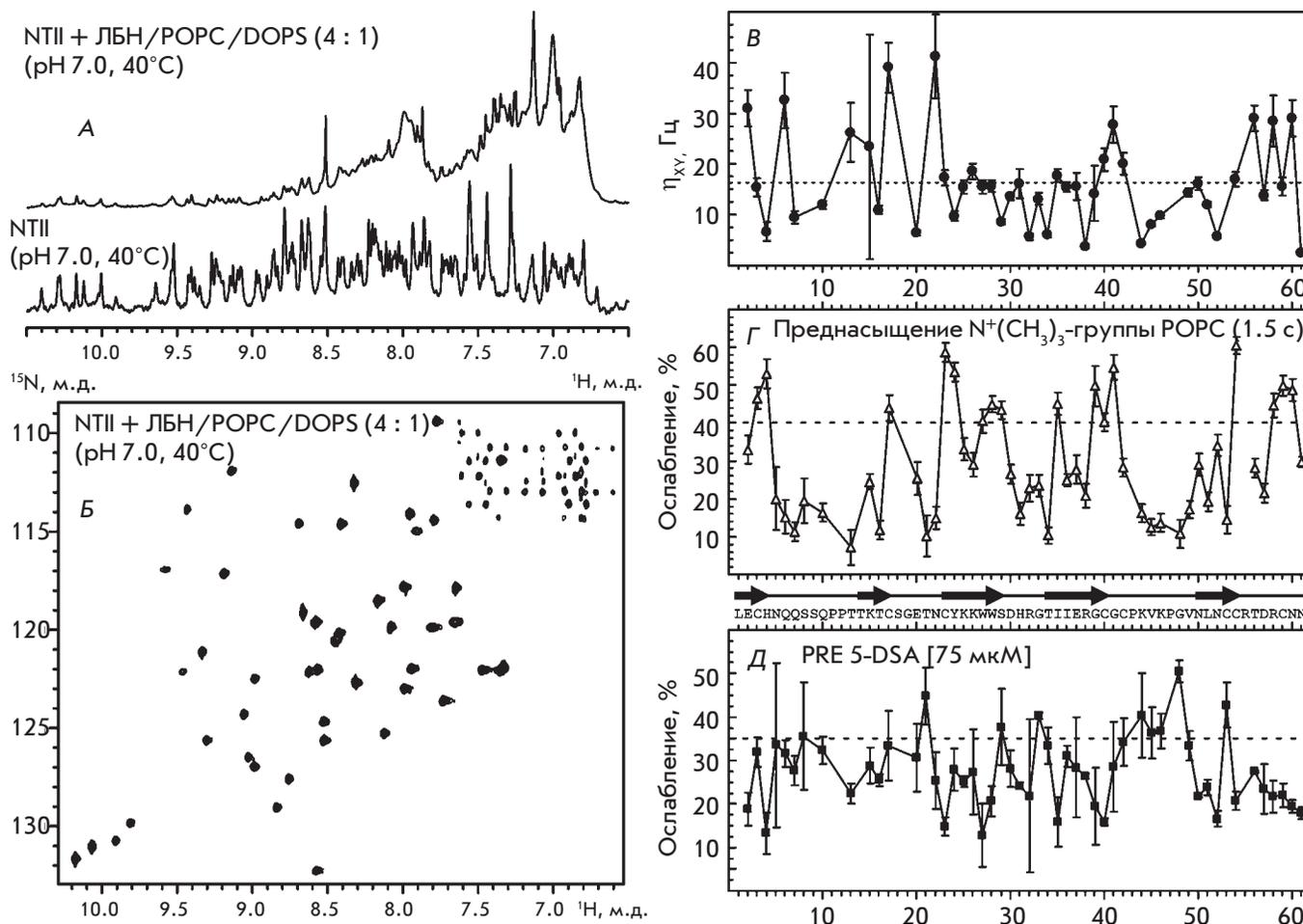


Рис. 4. Анализ взаимодействия NTII с ЛБН методом ЯМР-спектроскопии. А – сравнение 1D ^1H -спектров 45 мкМ ^2H , ^{15}N -меченого аналога NTII в водном растворе (внизу) и в комплексе с 75 мкМ ЛБН/ПОРС/ДОПС (4 : 1) (вверху). Б – 2D ^1H , ^{15}N -TROSY-спектр 45 мкМ ^2H , ^{15}N -меченого NTII в комплексе с 75 мкМ ЛБН/ПОРС/ДОПС (4 : 1). В – скорость кросс-корреляции релаксации ядер ^{15}N (η_{xy}) молекулы NTII в комплексе с ЛБН/ПОРС/ДОПС (4 : 1). Среднее значение показано пунктиром. Г, Д – относительное ослабление интенсивностей ^1H , ^{15}N -TROSY-кросс-пиков NTII в комплексе с ЛБН/ПОРС/ДОПС, вызванное (Г) преднасыщением сигнала холиновой группы ПОРС в течение 1.5 с или (Д) парамагнитным усилением релаксации (PRE) от 75 мкМ 5-DSA

тидилсерина в предполагаемом сайте связывания [19]. Таким образом, в комплексе NTII с ЛБН/ПОРС/ДОПС неспецифические электростатические и гидрофобные взаимодействия имеют сравнимую энергию со специфическими взаимодействиями.

Следует отметить, что динамическое равновесие между комплексами с различной топологией может играть определенную роль в функционировании периферических мембранных белков и мембраноактивных пептидов. Так, в ходе недавнего ЯМР-исследования комплекса GTP-азы Rheb (семейство Ras) с ЛБН было установлено, что белок имеет две возможные ориентации относительно поверхности мембраны нанодиска. При этом заселенность этих состояний меняется в ходе гидролиза GTP [37].

ВЫВОДЫ

В представленной работе на примере трех модельных β -структурных пептидов: ареницина-2, VSTx1 и NTII, исследована возможность применения ЛБН для изучения специфических взаимодействий пептид/мембрана и механизмов «мембранного катализа» в функционировании водорастворимых мембраноактивных антимикробных пептидов и нейропептидов. Установлено, что нанодиски, содержащие молекулы фосфатидилхолина и фосфатидилглицерина, могут разрушаться при взаимодействии с катионными порообразующими пептидами и, возможно, не подходят в качестве мембрано моделирующей среды для изучения подобных молекул. В то же время среды на основе ЛБН могут приме-

няться для исследования энергетики, стехиометрии и топологии взаимодействия мембраноактивных нейротоксинов с липидной мембраной. В ходе подобных исследований необходимо учитывать возможность неспецифических взаимодействий пептидных молекул с белковой компонентой MSP и с липидной мембраной нанодиска. ●

Работа поддержана программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», РФФИ (гранты № 12-04-31485, 12-04-01639 и 14-04-01270), Министерством образования и науки РФ (соглашение № 8789), стипендией Президента РФ (СП-5823.2013.4) и грантом Президента РФ (НШ-1766.2014.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zasloff M. // Nature. 2002. V. 415. № 6870. P. 389–395.
2. Thomas L., Scheidt H.A., Bettio A., Beck-Sickinger A.G., Huster D., Zschörnig O. // Eur. Biophys. J. 2009. V. 38. № 5. P. 663–677.
3. Lee S.Y., MacKinnon R. // Nature. 2004. V. 430. № 6996. P. 232–235.
4. Mäler L. // Mol. Membr. Biol. 2012. V. 29. № 5. P. 155–176.
5. Oxenoid K., Chou J.J. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2013. V. 23. № 4. P. 547–554.
6. Chou J.J., Kaufman J.D., Stahl S.J., Wingfield P.T., Bax A. // J. Am. Chem. Soc. 2002. V. 124. № 11. P. 2450–2451.
7. Warschawski D.E., Arnold A.A., Beaugrand M., Gravel A., Chartrand É., Marcotte I. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1808. № 8. P. 1957–1974.
8. Bayburt T.H., Sligar S.G. // FEBS Lett. 2010. V. 584. № 9. P. 1721–1727.
9. Denisov I.G., McLean M.A., Shaw A.W., Grinkova Y.V., Sligar S.G. // J. Phys. Chem. B. 2005. V. 109. № 32. P. 15580–15588.
10. Frauenfeld J., Gumbart J., van der Sluis E.O., Funes S., Gartmann M., Beatrix B., Mielke T., Berninghausen O., Becker T., Schulten K., et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2011. V. 18. № 5. P. 614–621.
11. Katayama H., Wang J., Tama F., Chollet L., Gogol E.P., Collier R.J., Fisher M.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 8. P. 3453–3457.
12. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Sobol A.G., Ovchinnikova T.V., Chupin V.V., Kirpichnikov M.P., Blommers M.J., Arseniev A.S. // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. № 7. P. 2140–2141.
13. Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N., Paramonov A.S., Shingarova L.N., Chupin V.V., Kirpichnikov M.P., Blommers M.J., Arseniev A.S. // J. Am. Chem. Soc. 2010. V. 132. № 16. P. 5628–5629.
14. Hagn F., Etzkorn M., Raschle T., Wagner G. // J. Am. Chem. Soc. 2013. V. 135. № 5. P. 1919–1925.
15. Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Lyukmanova E.N., Gizatullina A.K., Zhuravleva A.V., Tagaev A.A., Yakimenko Z.A., Telezhinskaya I.N., Kirpichnikov M.P., Ovchinnikova T.V., et al. // Chem. Biodivers. 2013. V. 10. № 5. P. 838–863.
16. Schuler M.A., Denisov I.G., Sligar S.G. // Meth. Mol. Biol. 2013. V. 974. P. 415–433.
17. Kyte J., Doolittle R.F. // J. Mol. Biol. 1982. V. 157. № 1. P. 105–132.
18. Shenkarev Z.O., Balandin S.V., Trunov K.I., Paramonov A.S., Sukhanov S.V., Barsukov L.I., Arseniev A.S., Ovchinnikova T.V. // Biochemistry. 2011. V. 50. № 28. P. 6255–6265.
19. Lesovoy D.M., Bocharov E.V., Lyukmanova E.N., Kosinsky Y.A., Shulepko M.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Efremov R.G., Arseniev A.S. // Biophys. J. 2009. V. 97. № 7. P. 2089–2097.
20. Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N., Solozhenkin O.I., Gagnidze I.E., Nekrasova O.V., Chupin V.V., Tagaev A.A., Yakimenko Z.A., Ovchinnikova T.V., Kirpichnikov M.P., et al. // Biochemistry (Mosc.). 2009. V. 74. № 7. P. 756–765.
21. Ovchinnikova T.V., Shenkarev Z.O., Nadezhdin K.D., Balandin S.V., Zhmak M.N., Kudelina I.A., Finkina E.I., Kokryakov V.N., Arseniev A.S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 360. № 1. P. 156–162.
22. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Schulga A.A., Ermolyuk Y.S., Mordvintsev D.Y., Utkin Y.N., Shoulepko M.A., Hogg R.C., Bertrand D., Dolgikh D.A., et al. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 34. P. 24784–24791.
23. Chill J.H., Louis J.M., Baber J.L., Bax A. // J. Biomol. NMR. 2006. V. 36. № 2. P. 123–136.
24. André J., Jakovkin I., Grötzinger J., Hecht O., Krasnosdembская A.D., Goldmann T., Gutschmann T., Leippe M. // Biochem. J. 2008. V. 410. № 1. P. 113–122.
25. Nagle J.F., Tristram-Nagle S. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1469. № 3. P. 159–195.
26. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Khabibullina N.F., Kopeina G.S., Shulepko M.A., Paramonov A.S., Mineev K.S., Tikhonov R.V., Shingarova L.N., Petrovskaya L.E., et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1818. № 3. P. 349–358.
27. Clay M.A., Pyle D.H., Rye K.-A., Barter P.J. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 12. P. 9019–9025.
28. Jayaraman S., Gantz D.L., Gursky O. // Biophys. J. 2005. V. 88. № 4. P. 2907–2918.
29. Huang H.W. // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1758. № 9. P. 1292–1302.
30. Sheng J.R., Grimme S., Bhattacharya P., Stowell M.H.B., Artinger M., Prabahakar B.S., Meriggioli M.N. // Exp. Neurol. 2010. V. 225. № 2. P. 320–327.
31. Jung H.J., Lee J.Y., Kim S.H., Eu Y.J., Shin S.Y., Milescu M., Swartz K.J., Kim J.I. // Biochemistry. 2005. V. 44. № 16. P. 6015–6023.
32. Schmidt D., MacKinnon R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 49. P. 19276–19281.
33. Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N., Butenko I.O., Petrovskaya L.E., Paramonov A.S., Shulepko M.A., Nekrasova O.V., Kirpichnikov M.P., Arseniev A.S. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1828. № 2. P. 776–784.
34. Nakano M., Fukuda M., Kudo T., Miyazaki M., Wada Y., Matsuzaki N., Endo H., Handa T. // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. № 23. P. 8308–8312.
35. Golovanov A.P., Lomize A.L., Arseniev A.S., Utkin Y.N., Tsetlin V.I. // Eur. J. Biochem. 1993. V. 213. № 3. P. 1213–1223.
36. Teixeira-Clerc F., Ménez A., Kessler P. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 28. P. 25741–25747.
37. Mazhab-Jafari M.T., Marshall C.B., Stathopoulos P.B., Kobashigawa Y., Stambolic V., Kay L.E., Inagaki F., Ikura M. // J. Am. Chem. Soc. 2013. V. 135. № 9. P. 3367–3370.