

КАК МЕМБРАННАЯ ПОВЕРХНОСТЬ ВОЗДЕЙСТВУЕТ НА СТРУКТУРУ БЕЛКОВ

©2014 г.

В. Е. БЫЧКОВА, Л. В. БАСОВА,
В. А. БАЛОБАНОВ

Институт белка РАН, Пущино, Московская область

I. Введение. II. Ненативное состояние белков в клетке. III. Заряженная поверхность мембран как денатурирующий агент в клетке. IV. Моделирование условий около мембранной поверхности. V. Конформационное состояние глобулярных белков в присутствии фосфолипидных мембран. VI. Сопоставление конформационных состояний белков в водно-спиртовых смесях и в присутствии фосфолипидных мембран. VII. Возможные пути взаимодействия мембран и белков. VIII. Воздействие разных видов фосфолипидных мембран на структуру белков. IX. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Немного истории. В 1981 году в лаборатории физики белка Института белка РАН (Пущино) было открыто новое состояние белковой молекулы – промежуточное между нативным и полностью развернутым состоянием. Это состояние с флуктуирующей третичной структурой, компактное, с ярко выраженной вторичной структурой

Принятые сокращения: apoMb – апомиоглобин, holoMb – миоглобин со связанным гемом, apoCyt c – апоформа цитохрома c, holoCyt c – цитохром c со связанным гемом, Cyt b₅ – цитохром b₅, RBP – ретинол-связывающий белок, apoHLA – бескальциевая форма альфа-лактальбумина человека, POPG – 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилглицерин, DPPG – 1,2-дипальмитоил-3-фосфатидилглицерин, MeOH – метанол, tBuOH – третичный бутиловый спирт, DPPC – 1,2-дипальмитоил-3-фосфатидилхолин, iPrOH – изопропиловый спирт, ФЛ – фосфолипиды, Б – белок, N – нативное состояние, I – промежуточное состояние, U – полностью развернутое состояние, MG – состояние расплавленной глобулы, Na-P – смесь фосфатов натрия, GuHCl – гуанидингидрохлорид, КД – круговой дихроизм, УФ – ультрафиолет, ЯМР – ядерный магнитный резонанс, λ_{\max}^{fl} – длина волны в максимуме спектра флуоресценции, I_{\max}^{fl} – интенсивность в максимуме спектра флуоресценции, $C_{p,изб}$ – парциальная избыточная теплоемкость, ΔH – изменение энтальпии, $\epsilon_{эфф}$ – эффективная диэлектрическая проницаемость среды, θ – эллиптичность.

Адрес для корреспонденции: bychkova@vega.protres.ru

Работа поддержана грантом № 14-24-00157 Российского научного фонда.

[1, 2], позднее получило название состояния расплавленной глобулы. Указанное состояние наблюдалось *in vitro* при понижении pH раствора, при умеренных концентрациях сильных денатурантов и некоторых солей, а также часто после тепловой денатурации белков [3–5]. Естественно, возник вопрос, а может ли это состояние глобулярных белков реализовываться в клетке.

Анализ данных литературы тех лет показал, что в ряде процессов в клетке состояние белков является явно не нативным, т.е. белки не имеют жесткой третичной структуры. Было замечено, что при транслокации белков через мембрану митохондрии компетентными для транслокации являются состояния, наблюдаемые сразу после биосинтеза, а также после разбавления раствора белка, развернутого сильным денатурантом [6–8]. Если же эти белки оставались некоторое время без мембран, через которые они должны были быть транслоцированы, то они становились некомпетентными для транслокации. Кроме того, было замечено, что мембрана должна быть отрицательно заряжена. Другим примером является проникновение токсинов в клетку. Колицин А претерпевает конформационное превращение около поверхности мембраны, в результате которого гидрофобная спиральная шпилька внедряется в мембрану и увлекает за собой остальную часть белка. Несколько белков объединяются, и в результате образуются поры в мембране, что и приводит к гибели клетки. Так проявляется токсическое действие колицинов [9, 10].

II. НЕНАТИВНОЕ СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВ В КЛЕТКЕ

УСЛОВИЯ В КЛЕТКЕ

Рассмотрим, какие условия могут наблюдаться в клетке. Как известно, в клетке не наблюдается ни крайне низкого значения pH, ни сильных денатурантов, ни высоких температур. Образующиеся эндоцитозные везикулы содержат в своей мембране протонные АТФазы, за счёт работы которых pH снижается до pH 6 в эндосомах. Этого понижения pH достаточно для освобождения ряда веществ, переносимых рецепторами, структура которых претерпевает конформационный переход при pH 6. Дальнейшее созревание эндосом приводит к образованию лизосом, где pH уже достигает значения 4.5. При этом значении pH лизосомальные протеазы гидролизуют белки, предназначенные для деградации в лизосомах. Более низкого значения pH в клетке практически не наблюдается.

Температура 37 °С далека от температуры тепловой денатурации клеточных белков.

Однако, при взгляде на состав клетки поражает присутствие разнообразных мембран: сильно развитая сеть эндоплазматического ретикулума (ЭР), наличие большого числа органелл, включая митохондрии. Состав клеточных мембран очень сложен. Их бислойная структура содержит нейтрально и отрицательно заряженные фосфолипиды, а внутренняя часть бислоя состоит из гидрофобных липидных частей и имеет низкую диэлектрическую проницаемость ϵ . Мембраны включают в себя мембранные белки, выступающие петли которых (цитоплазматическая поверхность) зачастую заряжены отрицательно, а также рецепторы, фосфоинозитиды и другие компоненты [11]. По оценкам, доля отрицательно заряженных фосфолипидов может составлять до 30% от общего количества фосфолипидов в мембране.

УСЛОВИЯ НА ГРАНИЦЕ РАЗДЕЛА ФАЗ

Принимая во внимание сложный состав мембран и наличие отрицательного заряда на внешней стороне мембраны [12, 13], возникло предположение, что поверхность мембраны может влиять на структуру тех белков, которые функционируют в её окрестностях. Это воздействие может складываться, по крайней мере, из двух составляющих. Как уже было сказано выше, с одной стороны, на поверхности мембраны имеется некий суммарный отрицательный заряд, а с другой стороны, внутренняя часть мембраны обладает низким значением диэлектрической проницаемости. Поэтому наружная сторона мембраны служит границей раздела двух фаз: водной, с ϵ порядка 80, и гидрофобной, с ϵ порядка 2–4. Как было отмечено ещё Ландау и Лифшицем [14], на границе раздела фаз ϵ может равняться полусумме составляющих, т.е. должна быть порядка 40. Очевидно, что эти условия сильно отличаются от водного окружения в цитоплазме.

III. ЗАРЯЖЕННАЯ ПОВЕРХНОСТЬ МЕМБРАН КАК ДЕНАТУРИРУЮЩИЙ АГЕНТ В КЛЕТКЕ

По мере накопления знаний о ненативных состояниях разных белков как в клетке, так и *in vitro*, возник вопрос, что может служить денатурирующим агентом в клетке, где нет экстремальных денатурирующих условий. Поэтому большой интерес представляет анализ ситуаций, когда белок, изначально имевший нативную структуру, трансформируется под действием каких-либо внутренних факторов в клетке в состояние, сходное с денатурированным. Некоторые условия в клетке, такие как умеренно низкие рН (4.5–5.0) в лизосомах или отрицательно заряженные поверхности мембран, а также элементы

цитоскелета, могут обеспечивать умеренно-денатурирующие условия для белков.

В работах группы Шатца [6–8] было показано, что частичное разворачивание белка на поверхности мембраны может иметь физиологическое значение. Они показали, что такое разворачивание перед транслокацией обусловлено отрицательными зарядами на поверхности мембраны. В самом деле, ещё в 1979 году было обнаружено [15] и позднее подтверждено [16], что в соответствии с простой электростатической теорией мембранная поверхность с высоким электростатическим потенциалом может притягивать протоны. Это приводит к локальному понижению рН, по крайней мере, на 2 единицы на расстоянии 5–15 Å от поверхности мембраны. Следует отметить, что именно низкие значения рН делают возможным получение состояния расплавленной глобулы для многих белков в условиях *in vitro* [5, 17, 18]. Как уже отмечалось, для транслокации через мембрану белки должны перейти в состояние расплавленной глобулы, и мембрана сама по себе способствует переходу белка в состояние расплавленной глобулы за счет своей отрицательно заряженной поверхности. Значение рН около мембраны митохондрий может понижаться также за счет выброса протонов, выделяемых дыхательной системой в межмембранное пространство, через поры внешней мембраны [19]. Однако такого понижения рН (порядка 2 единиц) обычно недостаточно для кислотной денатурации белка. В связи с этим нами было выдвинуто предположение [3] о дополнительном денатурирующем воздействии поверхности мембраны – локальном понижении эффективной диэлектрической проницаемости вблизи мембранной поверхности. Это может усиливать электростатические взаимодействия, помогая локально низким рН трансформировать белки в состояние типа расплавленной глобулы. Расчёты показывают [14, 20], что по мере приближения к границе раздела двух сред (например, водной и органической) значение ϵ в водной среде уменьшается, достигая в предельном случае величины почти вдвое меньшей, чем ϵ воды вдали от границы раздела. Действительно, величина ϵ водного окружения белковой молекулы постоянна и равна ~80 при 20 °С, но в случаях, когда возникают высокие электростатические потенциалы или локально высокие концентрации сольватированных ионов, она может меняться. Таким образом, необходимо принимать во внимание зависимость ϵ среды от расстояния до заряженной гидрофобной поверхности. Были проведены теоретические оценки такой зависимости и получены экспериментальные данные при помощи чувствительных к полярности окружения флуоресцентных зондов,

которые свидетельствуют о том, что рН вблизи заряженной гидрофобной поверхности значительно ниже, чем рН воды в среде [21].

IV. МОДЕЛИРОВАНИЕ УСЛОВИЙ ОКОЛО МЕМБРАННОЙ ПОВЕРХНОСТИ

Условия непосредственного окружения поверхности мембраны можно довольно просто смоделировать. Для этого могут быть использованы водно-спиртовые смеси, позволяющие изменять рН и ϵ . Изучение конформационного состояния белков в этих условиях позволяет выявить изменения, которые претерпевает белковая молекула, если она окажется в непосредственной близости от мембранной поверхности. Совершенно очевидно, что помимо этого следует дополнительно проводить также изучение влияния фосфолипидных мембран на структуру белков. Рассмотрим оба этих подхода.

ВОДНО-СПИРТОВЫЕ СМЕСИ КАК МОДЕЛЬ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЛЯ МЕМБРАНЫ НА СТРУКТУРУ БЕЛКОВ

Водно-спиртовые смеси при умеренно низких значениях рН представляют собой простую и одновременно с этим надежную модель, пригодную для проверки нашего предположения, что денатурирующее действие мембран обусловлено не только локальным понижением значения рН, но и влиянием гидрофобной части мембраны (проявляющемся в понижении диэлектрической проницаемости среды) [3, 5] Выбор спиртовых смесей в качестве приемлемой модели опирается на тот факт, что денатурирующее действие простых спиртов определяется, в основном, понижением ϵ раствора, а не специфическими свойствами отдельных спиртов [22, 23]. В литературе не было проведено систематических исследований на эту тему, а проводилось только изучение отдельных белков. Поэтому в следующем разделе основное внимание будет обращено на работы авторов этого обзора. Для более полного понимания экспериментального материала коротко опишем использованные методы исследования.

МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ В СТРУКТУРЕ БЕЛКА

Третичная структура

Изменения в третичной структуре белка тестируются методами сканирующей микрокалориметрии и кругового дихроизма в ближней УФ области, а также методами флуоресцентной и ядерно-магнитной спектроскопии. Зачастую при увеличении концентрации спирта на кривой зависимости теплопоглощения от температуры исчезает пик

теплопоглощения, т.е. происходит нарушение нативной структуры и плотной упаковки боковых групп белка. Этот процесс находит свое отражение также в изменении спектров КД в ближней УФ области. Четко выраженный спектр для нативной формы белка претерпевает изменения и практически исчезает при определенном содержании спирта и рН, что является тестом на денатурацию белка и наблюдается при любом денатурирующем воздействии на белок. Следует отметить, что при этом сохраняется высокая интенсивность спектров КД в дальней УФ области. В спектрах ЯМР при денатурации белков спиртами исчезают характерные особенности в высокопольной области спектра, а также наблюдается смещение полос в области ароматических остатков.

Для белков, содержащих Тгр, наблюдается смещение положения максимума спектра флуоресценции с 320 нм, характерного для нативного белка, к 340 нм, характерного для промежуточного состояния, наблюдаемого для этих белков при других способах денатурации. Однако никогда положение максимума Тгр флуоресценции не достигает положения 350–360 нм, характерного для полностью развернутого состояния белка.

Для белков, содержащих гем, используется также абсорбционная спектроскопия. Этот метод позволяет отслеживать конформационные изменения в области гема, так как поглощение гема очень чувствительно к изменению его окружения. По интенсивности и положению максимума спектра можно судить о влиянии денатуранта на структуру окружения гема.

Вторичная структура

Изменение вторичной структуры тестировалось по спектрам КД в дальней УФ области. При высоком содержании спирта в смеси наблюдается увеличение доли альфа-спиралей. Следует отметить, что в условиях высокого содержания спирта не наблюдается разворачивания белковой молекулы, а денатурированное состояние является высокоспиральным, в отличие от растворов с высокой концентрацией сильных денатурантов, где полипептидная цепь разворачивается. Для большого числа глобулярных белков было показано, что при умеренных концентрациях спиртов происходит формирование промежуточного состояния. Данный факт говорит о наличии, по крайней мере, двух стадий (или трёх состояний) в процессе денатурации белка простыми спиртами. Первая из них была изначально описана как «разворачивание или частичное разворачивание нативной структуры», а вторая – как переход в другую,

денатурированную конформацию, характеризующуюся более высоким содержанием спиральной структуры. Следует отметить, что в ранних работах [22, 23] водно-спиртовые смеси не рассматривались в качестве возможной модели для анализа влияния поля мембраны на структуру белка.

Взаимодействие с мембранами

Чтобы оценить, находится ли белок в свободном или связанном состоянии, были использованы такие методы как высокоэффективная жидкостная гель-хроматография, макроскопическая диффузия и ограниченный протеолиз.

ВЫБОР ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Чтобы осуществить проверку нашего предположения, нужно было выбрать определенные белки. В своем выборе мы руководствовались тем, что отдавали предпочтение белкам, которые располагаются и функционируют вблизи мембран. Наш выбор пал на холо- и апоцитохромы (holoCyt *c* и apoCyt *c*, соответственно), плазменный (RBP) и клеточный (CRBP I) ретинол-связывающие белки, цитохром *b5* (Cyt *b5*), апомиоглобин (apoMb) и убиквитин. Опыты проводились в водно-спиртовых смесях при умеренно низких значениях pH, которые, как предполагалось, могут моделировать окружение мембранной поверхности.

Цитохром c

Cyt *c* функционирует вблизи внутренней мембраны митохондрии, перенося электрон от цитохром-*c*-редуктазы к цитохром-*c*-оксидазе. Изучение конформационного поведения этого белка методами КД и флуоресцентной спектроскопии выявило наличие двух стадий (трех состояний) при его денатурации MeOH. Показано, что в водно-спиртовой смеси (0.5 M NaCl в присутствии 40% метанола, pH 4.0) holoCyt *c* переходит в состояние, сходное по свойствам с состоянием расплавленной глобулы этого белка в водной среде (pH 2.0, 0.5 M NaCl) [24]. Спектр КД этого белка в ближней УФ области теряет свои специфические черты, что свидетельствует об утрате плотной упаковки боковых групп, т.е. жесткой третичной структуры. Однако, согласно спектру КД в дальней УФ области, который похож на аналогичный спектр Cyt *c* в состоянии расплавленной глобулы в водных условиях, белок сохраняет свою вторичную структуру (рис. 1а). Измерения гидродинамических размеров белка в этих условиях методом макроскопической диффузии дают значение радиуса Стокса,

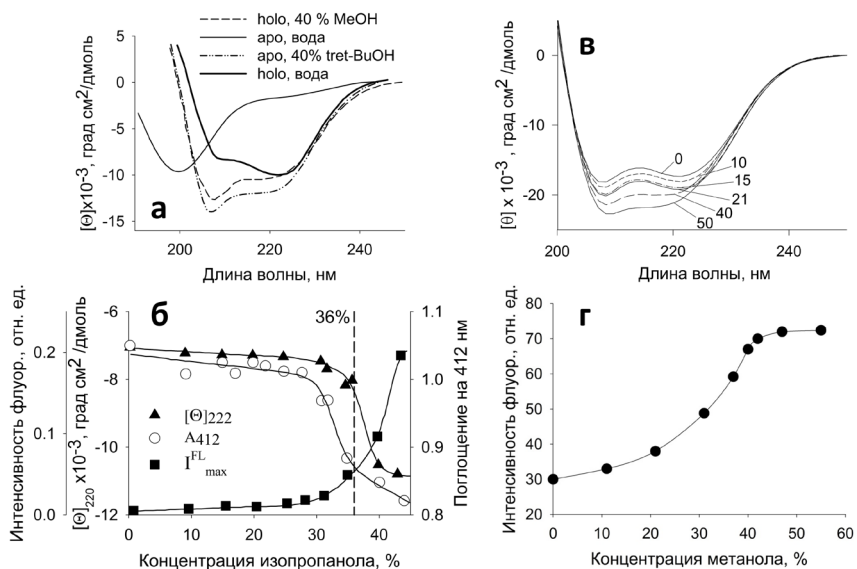


Рис. 1. Изменение параметров белков при их денатурации спиртами.

а) Спектры КД в дальней УФ области апо- и голоCyt c в водном растворе и в присутствии 40% tBuOH и MeOH, соответственно; апоCyt c находится в развернутой форме в воде, а голоCyt c в 0.5 M NaCl – в свернутом нативном состоянии: измерения проведены в 5mM NaP буфере, pH 4.0 [Адаптировано из 34].

б) Изменение интенсивности флуоресценции, спектров КД в дальней УФ области при 220 нм и поглощения при 412 нм (полоса Core) водорастворимого фрагмента Cyt b₅ в зависимости от iPrOH при pH 6.5 [Адаптировано из 30].

в) Изменение спектров КД в дальней УФ области апоMb кашалота в зависимости от концентрации MeOH, указанной цифрами около кривых; c = 1 мг/мл.

г) Изменение интенсивности флуоресценции апоMb кашалота в зависимости от концентрации MeOH при pH 5.7 [Адаптировано из 30].

сходное с таковым для состояния расплавленной глобулы. Денатурированное спиртом состояние Cyt c (в зависимости от содержания MeOH) является высокоспиральным, в отличие от состояния белка, развернутого сильными денатурантами.

Апоцитохром c

АпоCyt c является предшественником функционального холо-белка. Он синтезируется в цитоплазме на свободных рибосомах и затем переносится к поверхности митохондрии, чтобы быть транслоцированным в межмембранное пространство. Белок спирализуется на внешней мембране митохондрии и внедряется в мембрану. В меж-

мембранном пространстве гем-лигаза присоединяет гем к ароСyt *c*. АроСyt *c*, который в водном окружении находится в состоянии неупорядоченного клубка, переходит в водно-спиртовых смесях в высокоспиральное, но умеренно компактное состояние, при этом значение приведенной вязкости оказывается равным 9 [неопубл. данные, 25]. Для этого белка было изучено влияние на его свойства целого набора органических растворителей: это спирты с разной длиной алифатической цепи (MeOH, EtOH, iPrOH, tBuOH), замещённый спирт (2,2,2-трифторэтиловый) и органические растворители (диоксан, тетрагидрофуран, ацетонитрил и ацетон). Спектры КД в дальней УФ области показывают, что добавление спиртов в возрастающей концентрации приводит к изменению как формы, так и интенсивности спектров. Наличие изодихроической точки (около 204 нм) во всех спектрах позволяет заключить, что в этих системах наблюдается переход из неупорядоченной конформации в конформацию с большим количеством спиралей. Другие органические растворители также вызывают возрастание эллиптичности. Однако только для спиртов наблюдается совпадение кривых денатурации, если зависимость доли денатурированных молекул отложить как функцию диэлектрической проницаемости (ϵ) водно-спиртовой смеси [22, 23]. Это свидетельствует о независимости изменений в структуре белка от физических свойств индивидуального спирта. Поскольку ароСyt *c* не имеет третичной структуры в водном растворе, то добавление спирта будет структурировать развёрнутую полипептидную цепь. При этом ϵ среды будет уменьшаться от 80 до 40–50. Важным фактом является то, что по своим структурным свойствам описанное спиральное состояние ароСyt *c* сходно с состоянием этого белка, которое образуется на поверхности мембраны митохондрии и которое компетентно к транслокации через мембрану [8]. Спектры КД в дальней УФ области для Сyt *c* и его апо-формы в водно-спиртовых смесях приведены на рис. 1а.

Водорастворимый фрагмент цитохрома b5

Сyt *b*₅ функционирует как водорастворимый белок [26, 27], восстанавливающий метHb в эритроцитах и метMb в других клетках. Имея амфипатическую структуру, он является периферическим мембранным белком внешнего слоя мембраны ЭР, включающим полярный N-концевой каталитический домен и неполярный C-концевой участок полипептидной цепи, погруженный в липидный бислой мембраны, и являющийся своего рода якорем для этого белка. Водорастворимый домен функционирует в поле мембраны ЭР, взаимодействуя с много-

численными партнерами. Исследование водорастворимого домена в модельных условиях водно-метанольных смесей при концентрациях MeOH от 40 до 60% и pH 7,2 показало, что структура этого фрагмента претерпевает переход, в ходе которого теряется жесткая третичная структура, но сохраняется вторичная структура [29]. Мы провели дополнительное исследование конформационного состояния Cyt b_5 в присутствии различных концентраций iPrOH при pH 6.5, чтобы сузить интервал перехода. Результаты показали, что в присутствии 36% iPrOH окружение гема становится ненативным и не наблюдается характерного пика теплопоглощения, тогда как вторичная структура и компактность сохраняются (см. ниже раздел VI, табл. 2.1). Другими словами, добавление спирта приводит к переходу структуры белка из нативного в промежуточное состояние [неопубл. данные, 30]. Кривые денатурации Cyt b_5 при добавлении iPrOH представлены на рис. 1б.

Апомиоглобин

АроМб является предшественником холо-белка, который функционирует как переносчик и донор кислорода в клетке. АроМб связывает гем около отрицательно заряженной внешней мембраны митохондрии (гем синтезируется на внутренней мембране митохондрии и затем транспортируется к её внешней мембране). Поэтому структура ароМб может испытывать влияние поля мембраны. Свойства ароМб кашалота в модельных условиях водно-метанольных смесей при pH 5.2 были изучены методами КД в дальней и ближней УФ области, флуоресценции, микрокалориметрии и хроматографии. При pH 5.2 в присутствии 30% MeOH не наблюдается пика теплопоглощения, что свидетельствует о нарушении третичной структуры белка. Однако вторичная структура сохраняется, и по данным флуоресценции и гель-фильтрации белок остается компактным [30]. Таким образом, в этих условиях структура белка становится похожей на структуру белка в состоянии расплавленной глобулы в буферном растворе (рис. 1в, 1г и ниже табл. 2.2).

Сходные результаты были получены в работе [31] при исследовании апоМб лошади в водно-метанольных смесях.

Ретинол-связывающий белок

Ретинол-связывающий белок плазмы крови (RBP) переносит ретинол (витамин А) и передает свой лиганд либо на мембрану, либо на соответствующий рецептор. Клеточный ретинол-связывающий белок (CRBPI) переносит витамин А внутри клетки от мембраны к соответствующим ферментам, которые модифицируют ретинол,

превращая его в форму, доступную для клетки. Для RBP в умеренно денатурирующих условиях (рН 8.5, 5 мМ Na-P буфера и 55% MeOH, 37°C) удается смоделировать как передачу ретинола (витамина А), так и изменения структуры белка [32]. При этом одновременно с выходом ретинола сам белок претерпевает конформационный переход в состояние, сходное с состоянием расплавленной глобулы в водной среде при низких рН. Освобождение ретинола и денатурацию RBP при физиологической температуре изучали в зависимости от концентрации MeOH при изменении рН в интервале 2.0–8.5. В результате была построена диаграмма выхода ретинола и денатурации RBP в координатах рН-концентрация MeOH- $\epsilon_{эфф}$ (эффективная диэлектрическая проницаемость среды). Спектры различных форм RBP и диаграмма, а также зависимость доли нативных молекул RBP от концентрации MeOH приведены на рис. 2. Следует отметить, что RBP очень стабильный белок и высвобождает ретинол только между рН 3.5–2.0, так что при рН выше 3.5 мы имеем дело с нативным холо-белком. Наблюдаемое промежуточное состояние в водно-метанольных растворах имеет спектр КД в дальней УФ области, сходный с таковым для состояния расплавленной глобулы при рН 2.0 (см. рис. 2) [33]. Оно не имеет жесткой третичной структуры, но остается компактным почти как нативный белок [34]. Таким образом, впервые удается смоделировать процесс диссоциации ретинола из его комплекса с RBP в простой искусственной системе (водно-спиртовая смесь при умеренно низких значениях рН среды).

RBP является характерным представителем целого класса транспортных белков, вовлеченных в перенос ретинола и его производных. Механизм освобождения гидрофобных лигандов другими белками этого класса изучен недостаточно. Но, учитывая сходство структур этих белков и способ связывания лигандов, можно предположить, что и механизм освобождения этих лигандов будет иметь общие черты с механизмом освобождения ретинола. Примером этому может служить клеточный CRBP I, для которого были получены сходные данные [35].

Убиквитин

Аналогичные исследования были проведены для убиквитина, одной из функций которого в клетке является модификация белков, предназначенных для деградации. Для этого белка показано, что промежуточное состояние, наблюдающееся при рН 2 и 60% метанола, является компактным, почти как нативное (характеристическая вязкость составляет 3.9), обладает высоким содержанием вторичной

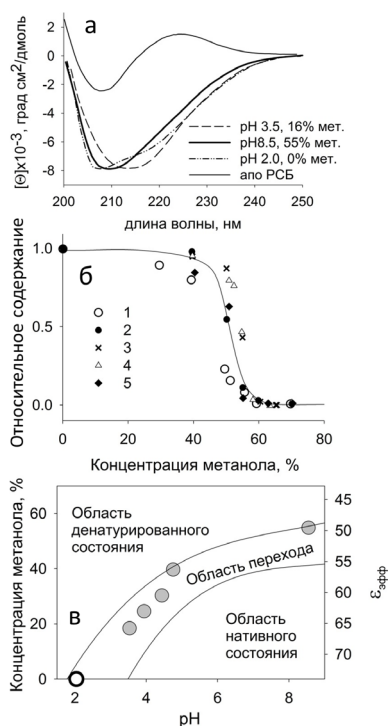


Рис. 2. Конформационное поведение ретинол-связывающего белка (RBP) в зависимости от концентрации MeOH.

а) Сравнение спектров КД в дальней УФ области в состоянии MG (pH 2.0, в отсутствие MeOH) со спектрами RBP при pH 3.5 в 16% MeOH и при pH 8.5 в 55% MeOH (в обоих случаях после выхода ретинола). Спектр КД в дальней УФ области нативного apoRBP показан для сравнения.

б) Относительная доля молекул RBP, связывающих ретинол, и нативных молекул RBP в зависимости от концентрации MeOH: (1) по изменению интенсивности флуоресценции при 460 нм (полоса максимума флуоресценции связанного ретинола); (2) по полосе эллиптичности связанного ретинола при 325 нм; (3, 4) доля нативных молекул по изменению эллиптичности при $[\theta]_{220}$ для аро- и holo-форм RBP, соответственно; и (5) по молярной эллиптичности в ближней УФ области $[\theta]_{280}$ для apoRBP.

в) Диаграмма выхода ретинола и денатурации RBP в зависимости от pH и концентрации MeOH при 37°C. $\epsilon_{эфф}$ – среднее значение диэлектрической проницаемости водно-метанольных смесей. Пунктирные кривые ограничивают область, в которой наблюдается выход ретинола и денатурация RBP, и разграничивают области нативного и денатурированного состояний молекул RBP [Адаптировано из 34].

структуры, но при этом не проявляет кооперативного температурного плавления, т.е. находится в состоянии расплавленной глобулы [неопубл. данные]. Возможно, что сходное состояние наблюдается в этом белке при присоединении его С-концевого глицина к различным белковым субстратам, что может способствовать денатурации его С-концевой части [36].

Другие белки

Кроме белков, описанных выше, имеется ещё несколько белков, для которых были проведены аналогичные исследования в водно-органических смесях.

Для аполипопротеина H (ApoH) человека было обнаружено, что изменение ϵ (добавлением 57% метанола) приводит к появлению альфа-спиральной структуры в этом бета-структурном белке, а спектры КД в дальней УФ области в этих условиях становятся похожими на таковые в присутствии фосфолипидных везикул [37].

Моделирование конформационных изменений в N-концевом связывающем домене рецептора аполипопротеина E (ApoE) человека в водно-пропанольных растворах при pH 7 показало, что при 30% iPrOH происходит изменение третичной структуры белка, хотя и не такое сильное, как при связывании с везикулами. Однако в этих условиях белок почти также компактен, как и нативный. При понижении pH до 4.5 и добавлении 30% iPrOH наблюдаются более значительные изменения как в третичной, так и вторичной структуре белка, сходные с изменениями, вызываемыми мембранами, одновременно с этим происходит увеличение радиуса Стокса [38].

В работе [39] была изучена равновесная денатурация holoMb при pH 4.0. Добавление MeOH (35–40% спирта) при этом pH приводит к потере третичной структуры белка и образованию промежуточного состояния с вторичной структурой, сходной со структурой нативного белка. В этих условиях возможно связывание гема, однако при концентрации метанола более 50% белок перестает связывать гем. При дальнейшем увеличении содержания спирта образуется высокоспиральное состояние apoMb без гема.

Изучение изменений в структуре C-концевого фрагмента рецептора ангиотензина II (AT1A) в присутствии фосфолипидных мембран и в растворах водно-метанольных смесей методом поверхностного плазмонного резонанса показало, что фрагмент связывается с анионными фосфолипидами, а в растворе наблюдается образование структур с высоким содержанием альфа-спиралей. Комбинация гидрофобных и электростатических взаимодействий может быть важной для функции этого рецептора [40].

Таким образом, можно сделать вывод, что в модельных условиях (водно-спиртовые смеси при умеренно низких pH) удается наблюдать изменения структурных свойств белков. При этом белки переходят из нативного в промежуточное состояние, сходное по своим свойствам с состоянием расплавленной глобулы в водном растворе.

Следующим этапом было исследование белка в присутствии фосфолипидных мембран при нейтральном pH раствора, т.е. в условиях, приближенных к условиям в живой клетке.

V. КОНФОРМАЦИОННОЕ СОСТОЯНИЕ ГЛОБУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ В ПРИСУТСТВИИ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

К настоящему времени существуют лишь разрозненные данные о воздействии мембранной поверхности на структуру белков, тем более при физиологическом значении рН. Принимая во внимание недостаток данных по структуре белков в присутствии мембран и гипотезу о денатурирующем действии мембранной поверхности, нами было проведено систематическое изучение влияния отрицательно заряженных фосфолипидных мембран на конформационное состояние глобулярных белков при нейтральных значениях рН, характерных для цитоплазмы.

ВЫБОР ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения конформационных изменений в белках нами были выбраны несколько белков, которые при своем функционировании находятся в поле мембраны, но не связываются с ней. Последнее является важным условием, так как известно, что при прямом взаимодействии с мембраной белок может изменять своё конформационное состояние как при внедрении в мембрану, так и при транслокации через неё [41].

Таковыми белками являются почти нейтральные apo- и holoMb и отрицательно заряженный Cyt b_5 . Для сравнения был выбран отрицательно заряженный лактальбумин человека (HLA), который в процессе биосинтеза связывается с внутренней стороной мембраны ЭР. Положительно заряженные белки были исключены, так как их взаимодействие с отрицательно заряженной мембраной является тривиальным. HoloMb и Cyt b_5 являются стабильными белками. Их денатурация в водных условиях наблюдается или при низких рН порядка 2, или при температурах близких к 70–80°C. Поэтому для получения заметного воздействия мембран были использованы как 100% отрицательно заряженные фосфолипидные мембраны из POPG, так и с меньшим содержанием этих фосфолипидов. Для поддержания постоянного содержания фосфолипидов добавлялись цвиттерионные POPC или DPPC. Исследования проводились при нейтральных рН – рН 6.2 и 7.2. Как уже отмечалось, в присутствии мембран в зависимости от условий возможно локальное понижение рН на 2–4 единицы около их поверхности [16]. Поэтому при рН 7.2 ожидаемое понижение этой величины на 2 единицы может дать рН 5.2. В этих условиях при рН-зависимом разворачивании белок ещё остаётся в нативном состоянии. Другая ситуация наблюдается,

если опыты проводились при рН 6.2. В этом случае в присутствии мембран значение рН около их поверхности может стать равным 4.2 или ниже, а это уже может приводить к переходу в состояние расплавленной глобулы. Поэтому конформационное поведение белка будет другим. Сопоставление экспериментальных данных при этих двух значениях рН чётко показывает, действительно ли около мембранной поверхности (т.е. на границе раздела фаз) при нейтральном рН раствора наблюдается понижение эффективного значения рН. Это понижение, как было подчёркнуто выше, может быть вызвано наличием электростатического потенциала отрицательно заряженных фосфолипидов и низкого значения диэлектрической проницаемости среды внутри мембранного бислоя, т.е. на границе раздела двух фаз.

СЛУЧАЙ МИОГЛОБИНА

Миоглобин осуществляет транспорт кислорода в клетках скелетных мышц и миокарде. Он обладает более высоким сродством к кислороду, чем гемоглобин, и способен связывать молекулу кислорода при его низком парциальном давлении у стенок капилляров, вследствие чего образуется оксимиоглобин (оxуMb). Высокое сродство к кислороду обеспечивает запасание кислорода и его транспортировку от сарколеммы к митохондриям. Липофильная молекула кислорода способна растворяться в липидном бислое и путем свободной диффузии проникать в межмембранное пространство митохондрии. Связывание миоглобином кислорода возможно благодаря присутствию гема. Одна из шести координационных связей иона железа занята атомом азота остатка гистидина 93 (спираль F), а другая служит для связывания молекулы кислорода, и рядом расположен гистидин 64 (спираль E) [42]. Дистальный гистидин, пропионовые цепи и остатки треонина, валина и фенилаланина образуют гидрофобный «лигандный карман», который, вместе с находящимся внутри него гемом и проксимальным гистидином, входит в состав активного центра миоглобина. Молекула кислорода взаимодействует с железом гема, но при этом не происходит изменения степени окисления железа. Это возможно благодаря тому, что в гидрофобном гемовом кармане создается среда с низкой диэлектрической проницаемостью. Однако гем расположен глубоко внутри молекулы миоглобина, и молекула кислорода не может легко его достигнуть. Флуктуации аминокислотных боковых цепей, как предполагается, образуют транспортный коридор, по которому кислород движется к гему. Точно показано, что в этом процессе принимает участие, по крайней мере, гистидин 64. Таким образом, высказывается предположение, что

связывание кислорода обусловлено подвижностью боковых цепей внутри молекулы белка, однако предположение не было доказано экспериментально.

В клетке существуют две формы миоглобина: апо- и холоформы. АроMb, являясь предшественником holoMb (как уже упоминалось выше), связывает гем на поверхности мембраны митохондрии [43]. При связывании гема структурируется часть полипептидной цепи, особенно F-спираль [44], что делает структуру белка более стабильной. К настоящему времени многими авторами хорошо изучены структурные и термодинамические характеристики как ароMb [44–53], так и holoMb [54–57]. АроMb, несмотря на отсутствие гема, сохраняет гидрофобное ядро [58] и третичную структуру, характерную для holoMb [59]. Согласно термодинамическим критериям как holoMb, так и его апоформа способны претерпевать кооперативные переходы при нагревании, которые сопровождаются заметными изменениями энтальпии и теплоемкости.

Холо- и апоформы миоглобина имеют сходную третичную структуру. Таким образом, можно ожидать, что отрицательно заряженные мембраны митохондрий будут сходным образом влиять на структуру обоих белков, однако амплитуда вызываемых эффектов будет зависеть от стабильности белка. Для обоих белков характерно температурное плавление. В присутствии фосфолипидов указанный температурный переход исчезает, однако для ароMb это происходит при соотношении ФЛ : белок, равном 25 : 1, а для holoMb – при соотношении, равном 200 : 1 [60]. Отсутствие пика плавления указывает на нарушение плотной упаковки боковых групп.

Нарушение третичной структуры миоглобина в присутствии фосфолипидных мембран

Детальное исследование holoMb и ароMb проведено в работах [60, 61]. Изменения в форме и интенсивности спектров КД в ближней УФ области дают информацию о нарушении третичной структуры белка в присутствии отрицательно заряженных везикул из POPG, молярное соотношение которых варьировало в интервале ФЛ:Б от 25 : 1 до 200 : 1 при pH 7.2. При молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 при pH 7.2 спектр holoMb по всем параметрам очень близок к спектру нативного белка. Увеличение концентрации фосфолипидов приводит к понижению значения молярной эллиптичности при сохранении формы спектров, что свидетельствует об уменьшении количества молекул белка с жесткой третичной структурой. При молярном соотношении ФЛ : Б = 200 : 1 при pH 7.2 и при молярном соотношении

25 : 1 при pH 6.2 наблюдается исчезновение всех характерных особенностей спектра, что указывает на утрату плотной упаковки боковых групп в присутствии высокого содержания отрицательно заряженных фосфолипидных везикул [60].

Спектр КД аroMb в ближней УФ области в нативном состоянии имеет меньше специфичных особенностей и более низкое значение эллиптичности, чем его холо-форма. Уже при молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 и pH 7.2 форма спектра в области 250–320 нм заметно меняется, и величина эллиптичности становится близкой к нулю [61].

Спектр поглощения holoMb в нативном состоянии (*N*) имеет хорошо выраженный максимум в области 409 нм (полоса Core), а в промежуточном состоянии (*I*) поглощение гема почти отсутствует и сравнимо с его величиной для белка в полностью развернутом состоянии (рис. 3в). Спектры поглощения holoMb в полосе Core в присутствии отрицательно заряженных везикул получены при pH 6.2 при молярных соотношениях ФЛ : Б, варьируемых в интервале от 25 : 1 до 100 : 1 (рис. 3в). При добавлении везикул к нативному белку происходит уменьшение интенсивности полосы поглощения при одновременном ее уширении. Кроме этого, наблюдается появление плеча в области 380 нм, что свидетельствует о накоплении ненативного белка. Следовательно, воздействие везикул приводит к конформационным изменениям в структуре молекулы миоглобина в окружении гема. Понижение pH от 7.2 до 6.2 вызывает более выраженные конформационные изменения в holoMb. Действительно, изменение интенсивности полосы Core при pH 6.2 происходит при молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1, а аналогичное изменение интенсивности полосы Core при pH 7,2 происходит только при соотношении 200 : 1.

АroMb и holoMb содержат по два остатка Trp в А-спирали (в положении 7 и 14), но в нативном состоянии флуоресценция этих остатков сильно затухает как окружающими их аминокислотными остатками, так и гемом в холобелке. Это позволяет следить за конформационными изменениями в белке, используя собственную Trp флуоресценцию. Полное разворачивание holoMb в 6 М GuHCl приводит к увеличению интенсивности флуоресценции и длинноволновому смещению максимума спектра к 355 нм (*U*, рис. 3г). При pH 4.2 [57] максимум флуоресценции Trp миоглобина находится в области 340 нм и является промежуточным между таковым для нативного и полностью развернутого состояний. На рис. 3г для сравнения представлен спектр флуоресценции holoMb при pH 3.6, который соответствует промежуточному состоянию (*I*). Спектры флуоресценции holoMb в присутствии отрицательно заряженных

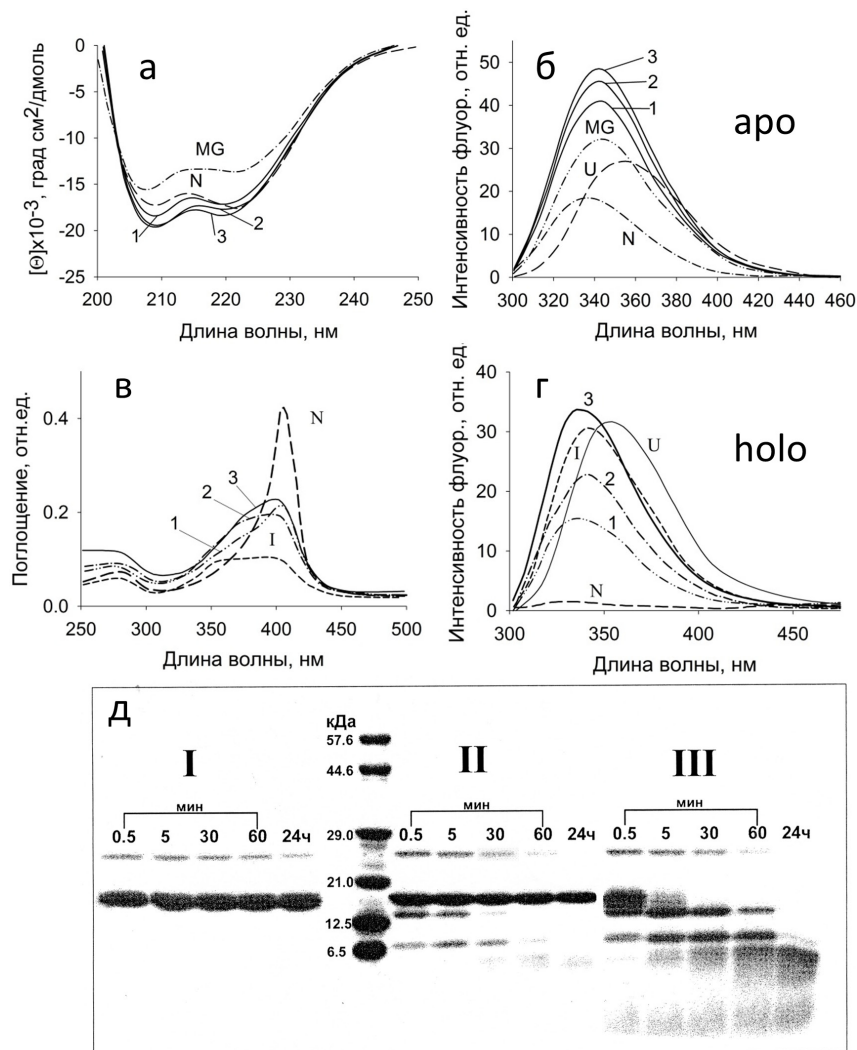


Рис. 3. Подпись к рис. см. на сл. стр.

фосфолипидных мембран регистрировались в широком интервале молярных соотношений ФЛ : Б при рН 7.2 и рН 6.2 (рис. 3г). При минимальном молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 при рН 6.2 наблюдается небольшой рост интенсивности флуоресценции со смещением максимума к 338 нм. Увеличение концентрации ФЛ при постоянной концентрации белка приводит к дальнейшему воз-

Рис. 3. Конформационное поведение миоглобина в различных условиях: рисунки а) и б) представляют данные для ароМб кашалота; в), г) и д) относятся к holoМб кашалота.

а) Спектры КД в дальней УФ области ароМб в присутствии фосфолипидных мембран из POPG: (1) и (2) относятся к спектрам при pH 7.2 и молярному соотношению ФЛ : Б = 25 : 1 и 100 : 1, соответственно; (3) – спектр при pH 6.2 и ФЛ : Б = 50 : 1; пунктиром представлены спектры белка в нативном состоянии (N) при pH 7.2 и в состоянии расплавленной глобулы (MG) при pH 4.2; 10мМ NaAc.

б) Изменение интенсивности спектра Тгр флуоресценции ароМб при pH 7.2 (кривые 1 и 2 при соотношении 25 : 1 и 100 : 1, соответственно) и pH 6.2 (кривая 3, при соотношении 50:1); длина волны возбуждения 293 нм; Спектры для состояния N, MG и в полностью развернутом 6 М GuHCl (U) приведены для сравнения.

в) Спектры поглощения holoМб при pH 6.2 в присутствии POPG везикул при соотношении ФЛ : Б (1) 25 : 1, (2) 50 : 1 и (3) 100 : 1; спектры белка в состояниях N и промежуточном (I) при pH 3.6 без везикул приведены для сравнения [Адаптировано из 30].

г) Изменение интенсивности спектра Тгр флуоресценции holoМб при pH 6.2 (кривые 1, 2 и 3 при соотношении 25:1, 50:1 и 100:1, соответственно); длина волны возбуждения 293 нм; Спектры для состояния N, промежуточного I при pH 3.6 и полностью развернутого 6 М GuHCl (U) приведены для сравнения. [Адаптировано из 30].

д) Трипсинолиз holoМб при pH 7.2 в нативном состоянии (I) и в присутствии везикул при соотношении ФЛ : Б 25 : 1 (II) и 200 : 1 (III). Цифрами около дорожек указано время инкубации с трипсином. Вертикальные полосы между I и II образцами – маркеры молекулярных весов [Адаптировано из 30].

растанию интенсивности флуоресценции Тгр. При соотношении ФЛ : Б = 200 : 1 амплитуда флуоресценции становится близкой к амплитуде флуоресценции, характерной для белка в промежуточном и полностью развернутом состоянии, однако при этом не происходит сдвига максимума флуоресценции к 355 нм. При понижении pH до 6.2 уже при молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 значение интенсивности составляет половину от этой величины для денатурированного белка в водном растворе, а при ФЛ : Б = 100 : 1 – даже немного превышает таковую для белка в полностью развернутом состоянии (рис. 3г). Положение максимума флуоресценции при всех молярных соотношениях ФЛ : Б и pH одинаково и составляет 338 нм, что близко к положению максимума флуоресценции для белка в промежуточном, но не в полностью развернутом состоянии. Положение максимума спектра Тгр флуоресценции 338 нм обычно приписывается неполному экспонированию Тгр в воду, т.е. свидетельствует о наличии достаточно компактной структуры.

Таким образом, с помощью спектральных методов установлено, что отрицательно заряженные фосфолипидные мембраны при pH 7.2 и 6.2 вызывают конформационные изменения в апо- и холо-формах миоглобина. АроМб полностью утрачивает жесткую третичную структуру уже при молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 при pH 7.2, при этом окружение триптофанов становится отличным от нативного (рис. 3б). HoloMb, благодаря наличию гема, теряет плотную упаковку боковых групп лишь при молярном соотношении ФЛ : Б = 200 : 1 при pH 7.2 и при молярном соотношении 25 : 1 при pH 6.2. При этом и остатки Trp, и гем утрачивают свое нативное окружение. Приведенные выше результаты свидетельствуют о том, что отрицательно заряженные фосфолипидные везикулы вызывают изменения в нативной конформации белковой молекулы, приводя к нарушению ее третичной структуры. Это состояние по своим свойствам похоже на промежуточные состояния этих форм в водном буфере, но не идентично расплавленной глобуле, хотя и проявляет её основные свойства. Подобное же состояние для ароМб и holoMb наблюдается в водно-спиртовых смесях при высоких концентрациях метанола [31, 39].

Спектры флуоресценции ароМб в присутствии отрицательно заряженных везикул при разных молярных соотношениях ФЛ:Б при pH 7.2 приведены на рис. 3б. Спектр ароМб в нативном состоянии заметно отличается от спектра флуоресценции holoMb в отсутствие везикул, что связано с отсутствием тушителя в виде гема. В то же время другие аминокислотные остатки в пространственном окружении триптофанов продолжают тушить его флуоресценцию. При переходе из нативного состояния в состояние расплавленной глобулы интенсивность флуоресценции возрастает, при этом наблюдается сдвиг максимума флуоресценции от 332 нм к 340 нм, а при разворачивании белка мочевиной максимум спектра сдвигается к 355 нм. В присутствии везикул уже при молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 при pH 7.2 происходит резкое возрастание интенсивности флуоресценции до величины, превышающей таковую как для нативного, так и для промежуточного состояний белка. Положение максимума флуоресценции ароМб в присутствии везикул соответствует 340 нм, что характерно для расплавленной глобулы и сильно отличается от этого значения для белка в полностью развернутом состоянии. При более высоких молярных соотношениях ФЛ : Б при pH 7.2, а также при соотношении ФЛ : Б, равном 50 : 1 при pH 6.2, происходит незначительное увеличение интенсивности флуоресценции без изменения положения максимума, что, вероятно,

связано с влиянием гидрофобного слоя мембраны на окружение Тгр. Таким образом, ароМб в присутствии везикул также теряет жесткое нативное окружение остатков Тгр.

*Сохранение вторичной структуры миоглобина
в присутствии фосфолипидных везикул*

Несмотря на существенные изменения в третичной структуре, вызванные добавлением фосфолипидов, вторичная структура миоглобинов не претерпевает особых изменений. Спектр КД для holoMb в нативном состоянии имеет вид, характерный для α -спиральных белков с двумя выраженными минимумами в области 208 и 220 нм. При добавлении больших количеств фосфолипидов спектры КД holoMb претерпевают более существенные изменения, при этом абсолютное значение эллиптичности в области 208 нм становится несколько большим, чем таковое при 220 нм. Таким образом, спектры белка в присутствии везикул становятся похожи на спектр белка в промежуточном состоянии, который, в свою очередь, имеет форму, описанную для состояния расплавленной глобулы других белков [62]. По форме спектры holoMb в присутствии фосфолипидных везикул при pH 6.2 похожи на спектры КД в дальней УФ области при большой концентрации спирта [39]. Большие концентрации ФЛ при pH 6.2 не приводят к заметным изменениям формы спектра, т.е. вторичная структура, если и меняется, то крайне незначительно. Следует особо подчеркнуть, что спектры КД holoMb, полученные в присутствии везикул, сильно отличаются от спектра белка в полностью развернутом состоянии (*U*). Таким образом, спиральная вторичная структура holoMb в присутствии отрицательно заряженной мембраны сохраняется достаточно полно, хотя и отличается от структуры, характерной для нативного белка.

Однако эти изменения не столь существенны, так как спектры также сильно отличаются от спектра белка в полностью денатурированном состоянии в растворе. Как и в случае holoMb, изменения структуры ароМб происходят при pH 6,2 при меньших концентрациях фосфолипидов, чем при pH 7,2.

Таким образом, вторичная структура холо- и апо-форм миоглобина в присутствии отрицательно заряженных ФЛ везикул сохраняет свою спиральную природу, но отличается как от характерной для N, так и U состояний белка. Небольшие изменения формы спектров связаны, по-видимому, с конформационными перестройками пространственной структуры белка в этих условиях.

*Денатурация миоглобина, вызываемая фосфолипидными
везикулами, приводит к взаимодействию белка
с поверхностью везикул*

Как следует из вышесказанного, отрицательно заряженные ФЛ везикулы при рН 7.2 и 6.2 вызывают конформационные изменения в апо- и холо-формах миоглобина, приводя к нарушению третичной структуры. Это новое состояние по своим свойствам сходно с I состоянием этих форм в водном растворе, но не идентично состоянию расплавленной глобулы. Подобное состояние для апо- и holoMb наблюдается в водно-спиртовых смесях при высоких концентрациях метанола [31, 39].

Как известно, в промежуточном состоянии белки склонны к взаимодействию с мембранами, но эффективность этого взаимодействия зависит от ряда факторов, в частности от стабильности белка. Для определения локализации ненативных молекул белка были использованы методы высокоэффективной жидкостной гель-хроматографии, макроскопической диффузии и ^1H -ЯМР высокого разрешения. В силу сильно различающихся размеров объема элюции изолированного белка и белка, связанного с фосфолипидными везикулами, сильно различаются. Это позволяет анализировать связывание белка с фосфолипидами. При молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 при рН 7.2 и методом гель-фильтрации удается выявить пик в области элюции нативного белка, т.е. основная часть (~75%) белка остается свободной, хотя около четверти белка элюируется в пике, соответствующем фосфолипидным везикулам [60]. При более высоких молярных соотношениях ФЛ : Б наблюдается одновременное уменьшение доли свободного белка и увеличение доли белка, связанного с фосфолипидными везикулами. Полное исчезновение пика свободного белка при рН 7.2 происходит при молярном соотношении ФЛ : Б = 200 : 1. При рН 6.2 большая доля (~70%) связанного белка выявляется уже при соотношении ФЛ : Б = 25 : 1, а при соотношении 50 : 1 на профиле элюции выявляется только один пик белка, элюирующийся вместе с везикулами.

Профили элюции apoMb в присутствии везикул для молярных соотношений ФЛ : Б = 25 : 1 и 50 : 1 при рН 7.2 свидетельствуют о том, что уже при наименьшем соотношении ФЛ:Б происходит полное связывание белка с фосфолипидными везикулами [61].

Таким образом, по данным гель-хроматографии обе формы миоглобина связываются с везикулами. ApoMb полностью связывается с везикулами при всех молярных соотношениях ФЛ : Б при обоих значениях рН. Следует отметить, что по оценке площадей поверхности

везикул и белка в выбранных условиях концентрация везикул в системе в три раза превышает количество молекул белка, которое может связаться с поверхностью везикул.

HoloMb взаимодействует с везикулами намного слабее, чем его апоформа (см. табл. 2). Степень связывания белка с везикулами коррелирует с долей денатурированного белка, тестируемого по КД в ближней УФ области [60]. Как известно, белок в N состоянии не взаимодействует с мембранами [3, 5], поэтому только конформационный переход миоглобина в промежуточное состояние с увеличенной гидрофобной поверхностью приводит к связыванию белка с везикулами.

Для тестирования конформационного состояния несвязанного holoMb, который наблюдается при низких концентрациях ФЛ, был использован метод ^1H -ЯМР высокого разрешения. Дисперсия химических сдвигов указывает на то, что holoMb при pH 7.2 имеет жесткую третичную структуру [60]. Характерные высоко- и низкопольные резонансы holoMb лишь незначительно перекрываются с сигналами ФЛ везикул (POPG), что позволяет оценить состояние белка, имеющего специфические резонансы в этих областях.

Наблюдающиеся изменения в спектрах ЯМР этих белков, в основном, были связаны с исчезновением высокопольных сигналов в области 0–(-2) ppm, характерных для плотной упаковки боковых групп, а также с изменениями в области спектра 6–8 ppm, соответствующей состоянию ароматических групп. По оценке интегральной площади в области резонансов CH_2 -групп фосфолипидов оказалось, что увеличение площади под кривой соответствует такому же уменьшению площади в области резонансов белка. Этот факт также свидетельствует о связывании белка с мембраной. При этом наблюдаются некоторые изменения и в спектре везикул. Это может указывать на некоторое нарушение упаковки ФЛ в бислое мембраны [60, 61].

Согласно данным гель-хроматографии, при молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 при pH 7.2 большая часть (~75%) белка в растворе находится в свободном несвязанном состоянии. Размеры молекулы белка и везикулы сильно различаются, что позволяет использовать метод макроскопической диффузии для определения размеров белка и везикул в смешанной системе [63]. Измерение коэффициента диффузии было проведено для несвязанной с везикулами формы holoMb при молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 при pH 7.2, а также везикул в отсутствие белка и белка в нативном состоянии без везикул. Данные приведены в таблице 1. При молярном соотношении ФЛ : Б = 200 : 1 при pH 7.2 вообще не удается выявить свободного (несвязанного)

Таблица 1
**Параметры холомиоглобина в различных условиях,
 полученные методом макроскопической диффузии**

Состояние /условия	Коэффициент диффузии $D \times 10^{-7}$, см ² /сек	Диаметр молекулы, Å
Нативное состояние (<i>N</i> , рН 7.2)	14.5	30
POPG : holoMb = 25 : 1, рН 7.2	6.5	67
POPG : holoMb = 200 : 1, рН 7.2	диффузии белка нет	
POPG (везикулы), рН 7.2 без белка	1.5	300

белка. Этот результат полностью согласуется с данными гель-хроматографии. При оценке площади под диффузионной кривой для несвязанного миоглобина при молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 при рН 7.2 оказалось, что она в среднем на 25% меньше, чем таковая для нативного белка. Таким образом, данные по макроскопической диффузии хорошо согласуются с данными гель-хроматографии.

Наличие или отсутствие молекул нативного holoMb в присутствии везикул было проверено также методом ограниченного протеолиза. Нативный holoMb с жесткой третичной структурой (вне зависимости от времени инкубации) не подвержен действию протеазы (**I**, рис. 3д). При молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 при рН 7.2 с первой минуты инкубации смеси с трипсином наблюдается расщепление приблизительно 25% всех молекул белка (**II**, рис. 3д). При увеличении времени инкубации все фрагменты белка, образовавшиеся на первой минуте, полностью расщепляются, и остается только та часть белковых молекул, которая оказалась недоступна протеазе. Следовательно, эта часть белка (~75%) в данных условиях имеет третичную структуру, сходную с нативной, что хорошо согласуется с данными, полученными спектральными методами. В условиях полного связывания при молярном соотношении ФЛ : Б = 200 : 1 при рН 7.2 с первой минуты наблюдается расщепление всех молекул белка, и полоса в области электрофоретической подвижности нативного белка вообще не обнаруживается (**III**, рис. 3д), что свидетельствует об отсутствии молекул белка с жесткой третичной структурой среди таковых, связанных с везикулами [30].

Резюмируя результаты, полученные при использовании методов гель-хроматографии, макроскопической диффузии и ^1H -ЯМР, можно заключить, что при низком молярном соотношении ФЛ : Б при рН 7.2 примерно третья часть молекул белка не имеет жесткой третичной структуры и связана с везикулами. Оставшаяся часть молекул белка находится в свободном состоянии и проявляет свойства, характерные для нативного состояния. При высоком молярном соотношении ФЛ : Б = 200 : 1 при рН 7.2 и при молярном соотношении ФЛ : Б = 70 : 1 при рН 6.2 миоглобин не имеет жесткой структуры и полностью связывается с везикулами, приводя тем самым к нарушению упаковки фосфолипидов в бислое (см. выше данные по ЯМР).

*Стабильность миоглобина
в присутствии фосфолипидных везикул*

Для характеристики конформационной стабильности несвязанного (свободного) белка в присутствии ФЛ использовали метод сканирующей микрокалориметрии. Температурное плавление holoMb проводилось в присутствии везикул из ненасыщенных ФЛ ($T = 271\text{ K}$) для молярного соотношения ФЛ : Б = 25 : 1, 50 : 1, 200 : 1 при рН 7.2 и 25 : 1 при рН 6.2. По данным спектральных методов, а также гель-фильтрации и диффузии при соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 при рН 7.2 большая часть белка находится в несвязанном состоянии и имеет структуру, подобную нативной. Остальная часть holoMb не имеет жесткой третичной структуры, а, как известно, белки в частично денатурированном состоянии I не имеют пиков температурного плавления. Поэтому в данном случае можно следить только за плавлением свободного белка. Процесс тепловой денатурации holoMb в нативном состоянии происходит по принципу «все-или-ничего» [64], т.к. $\Delta H_{\text{кал}} \approx \Delta H_{\text{эф}}$. При молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 при рН 7.2 наблюдается пик теплопоглощения белка, который, однако, сильно отличается от пика нативного белка. Различие проявляется в смещении пика (на $\sim 20\text{ }^\circ\text{C}$) в сторону более низких температур (по сравнению с нативным белком – 357 K), при этом значение калориметрической энтальпии уменьшается с 500 кДж/моль (для нативного белка) до 280 кДж/моль. Эффективная энтальпия в этих условиях становится равной 370 кДж/моль, следовательно, соотношение калориметрической и эффективной энтальпий равно 0.76. Это означает, что кооперативный участок белка в присутствии везикул меньше, чем у нативного белка. Важно отметить, что наблюдаемые переходы необратимы. Можно предположить, что такое изменение пика теплопоглощения свидетельствует о дестабилизации нативного белка, причиной которого является зависимость стабильности молекул нативного белка от

pH, ионной силы и т.д. и стабилизации денатурированных молекул белка за счет связывания с везикулами. При молярном соотношении ФЛ : Б = 50 : 1 и выше (до 200 : 1) при pH 7.2, а также при всех молярных соотношениях при pH 6.2, кривые теплопоглощения holoMb отсутствуют, что характерно для белка, не имеющего жесткой третичной структуры. Однако по данным КД в ближней УФ области при соотношении ФЛ : Б = 50 : 1 и pH 7.2 часть белка сохраняет плотную упаковку боковых групп, но это не противоречит калориметрическим данным, т.к. температура сама по себе является дополнительным денатурирующим фактором.

Таким образом, часть молекул свободного holoMb в присутствии везикул при pH 7.2 имеет нативное состояние, которое, однако, стало менее стабильным относительно денатурированного состояния. Изменение параметров перехода гель-жидкий кристалл насыщенных фосфолипидов свидетельствует о взаимодействии holoMb с везикулами, приводящем к нарушению исходной регулярной упаковки фосфолипидов в бислое. Это согласуется с данными, полученными методом ^1H -ЯМР.

В случае ароMb пик теплопоглощения нативного белка в присутствии везикул из ненасыщенных ФЛ отсутствует уже при молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 при pH 7.2. Это указывает на нарушение третичной структуры белка и согласуется с данными, полученными другими методами. Тот факт, что в области температурного плавления ароMb отсутствует пик теплопоглощения, может свидетельствовать об отсутствии в пробе нативных молекул белка, а изменение формы кривых плавления везикул в присутствии белка – о взаимодействии ароMb с ФЛ везикулами, нарушающем структуру бислоя. Это взаимодействие, вероятнее всего, выражается в частичном встраивании белка в бислой, вследствие чего меняется упаковка ФЛ. При pH 6.2 и для всех вышеприведенных соотношений ФЛ:Б полученные результаты были сходны с таковыми при pH 7.2.

Стабильность белка и взаимодействие с мембранами

В лаборатории физики белка, Института белка РАН, подробно было изучено сворачивание ароMb. Была исследована кинетика сворачивания мутантных белков с заменами как в консервативных, так и в неконсервативных позициях, важных для завершения процесса сворачивания [52, 53]. Для изучения влияния стабильности белка на его взаимодействие с мембранами был выбран ряд мутантных ароMb. Выяснилось, что отрицательно заряженная поверхность мембран может играть двоякую роль: развернутая мочевиной полипептидная

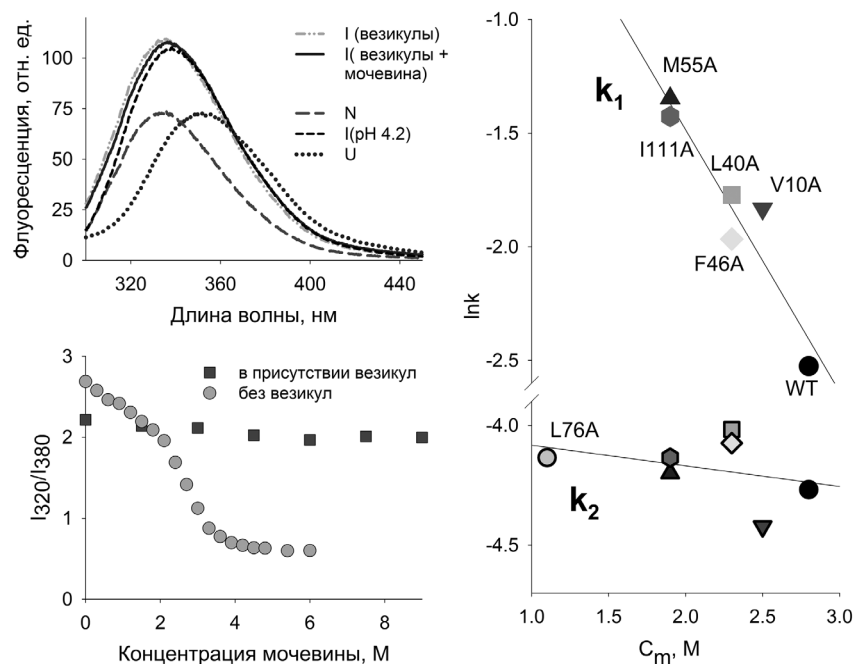


Рис. 4. Влияние стабильности белка на его взаимодействие с фосфолипидными мембранами. [Адаптировано из 65].

а) Изменение спектров Trp флуоресценции при добавлении апоMb, как в N состоянии, так и в развернутом мочевиной U состоянии, к раствору смешанных везикул (POPG:POPC) при содержании 20% отрицательно заряженных POPG.

б) Кривые денатурации белка мочевиной в отсутствие и в присутствии везикул, тестируемой по отношению интенсивностей Trp флуоресценции при 320 и 380 нм. Кинетика взаимодействия мутантных форм апоMb тестировалась по изменению интенсивности Trp флуоресценции при 335 нм.

в) Зависимость логарифмов констант k_1 и k_2 I-ой и II-ой стадий взаимодействия белков с везикулами в зависимости от середин переходов между N и I для каждого мутанта при денатурации белков мочевиной.

Обозначения: \blacktriangle – M55A, \square – L40A, \blacktriangledown – V10A, \triangleleft – L111A, \diamond – F46A, \bullet – WT, \circ – L76A.

цепь апоMb сворачивается на поверхности мембран и приобретает черты структуры, характерной для состояния расплавленной глобулы. С другой стороны, нативный апоMb в присутствии тех же мембран теряет свою нативную структуру и переходит в аналогичное состояние, сходное с состоянием расплавленной глобулы (см. рис. 4) [65]. Изучение кинетики взаимодействия нативного апоMb с поверхностью

везикул показало, что при изменении содержания отрицательно заряженных ФЛ от 100 до 20% скорость взаимодействия практически остается одинаковой. Однако, если везикулы образованы только из цвиттерионных РОРС фосфолипидов, то взаимодействия белка с везикулами не наблюдается. Добавление же одного моля мочевины, увеличивающей флуктуации структуры апоMb, вновь приводит к взаимодействию белка с везикулами. Исследование конформационного поведения мутантных белков в присутствии отрицательно заряженных мембран показало, что их связывание с мембранами сильно зависит от стабильности этих белков. На рис. 4 представлена зависимость логарифма скорости первой стадии взаимодействия мутантных форм апоMb с ФЛ везикулами от величины c_m для каждого мутанта. Как видно, четко прослеживается зависимость – чем стабильнее структура белка, тем ниже скорость взаимодействия.

*Фосфолипидные мембраны облегчают
освобождение кислорода из оксимиоглобина*

Известно, что миоглобин связывает кислород и транспортирует его от сарколеммы к митохондриям. Механизм освобождения кислорода до сих пор не ясен. Также остается неизвестным, что является стимулом для освобождения кислорода. Недавно было показано, что при физиологическом давлении кислорода освобождение кислорода из охуMb возможно лишь при его непосредственном контакте с поверхностью митохондрии, при этом скорость реакции не зависит от концентрации белка [66]. Наши эксперименты по исследованию влияния модельных мембран на структуру миоглобина показали, что в присутствии отрицательно заряженной мембраны третичная структура белка может нарушаться. Это позволяет предположить, что в присутствии митохондрий происходит дестабилизация структуры молекулы миоглобина, вследствие чего сродство к кислороду резко уменьшается. Поэтому была изучена кинетика автоокисления охуMb в присутствии модельных мембран (везикул) методом абсорбционной спектроскопии. На рис. 5в и 5г представлены спектры поглощения охуMb в отсутствие и в присутствии везикул. Спектр поглощения оксиформы миоглобина характеризуется наличием ярко выраженных пиков при 543 и 581 нм, которые исчезают в метформе, где лигандом гема является вода. Метформа тестируется по появлению максимумов в области 505 и 634 нм. Процесс перехода оксиформы миоглобина в метформу в отсутствие везикул при комнатной температуре происходит медленно и по времени занимает несколько суток, а при повышении температуры до физиологической (37 °С) этот процесс

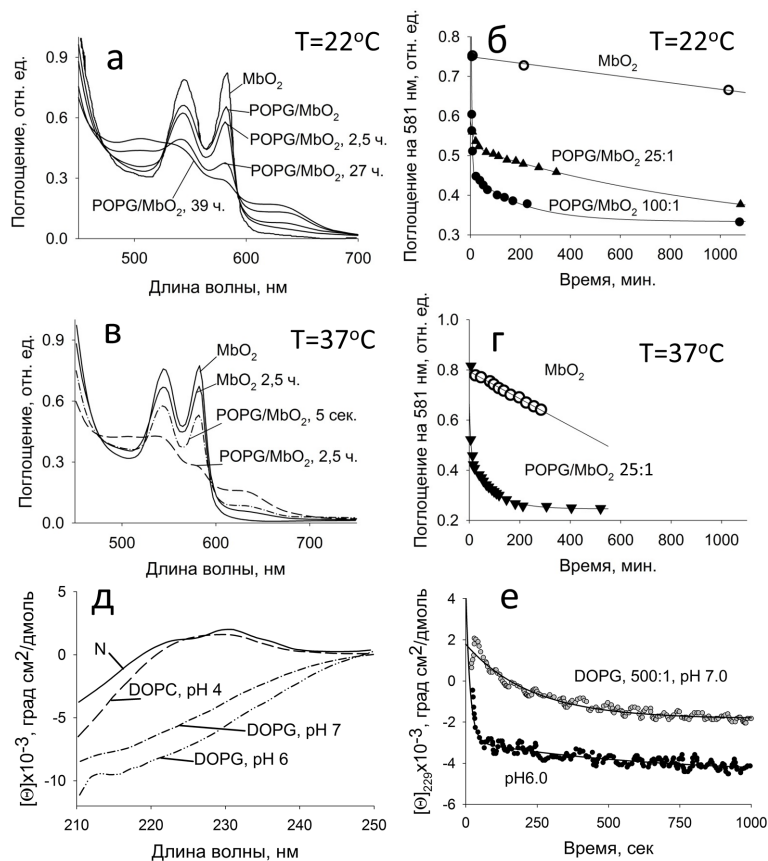


Рис. 5. Кинетика освобождения связанного лиганда в присутствии фосфолипидных мембран. ОхуМб при разных температурах: (а) и (б) при 22 °С; (в) и (г) при 37 °С, (д) и (е) – RBP при 22 °С.

(а) Спектры поглощения охуМб в разное время (указано около кривых) после добавления везикул, молярное соотношение ФЛ : Б = 25 : 1, pH 7.2.

(б) Кинетика автоокисления охуМб в отсутствие (○) и в присутствии везикул при соотношениях 25 : 1 (▲) и 100 : 1 (●).

(в) Спектры поглощения охуМб в разное время после добавления везикул, указанного около спектров, pH 7.2;

(г) Кинетика освобождения кислорода в отсутствие (○) и в присутствии везикул при молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 (▼) [адаптировано из 30].

(д) Спектры КД в дальней УФ области RBP в нативном состоянии и в присутствии смешанных везикул (DOPC:DOPG/1:1) при молярном соотношении ФЛ : Б = 500 : 1 при разных pH, 22 °С. Изменение спектра в N состоянии отражает денатурацию белка.

(е) Кинетика денатурации RBP в присутствии везикул в условиях, аналогичных рис. 5д. Одновременно с денатурацией белка происходит выход ретинола, кинетика выхода которого очень быстрая [неопубл. данные].

ускоряется, но не настолько, чтобы привести к быстрому освобождению кислорода. Добавление везикул приводит к ещё более быстрому освобождению кислорода, и при молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 при pH 7.2 при 37 °С это происходит за 2 часа 30 мин, при 22 °С – намного медленнее, до полутора суток. Увеличение концентрации ФЛ в четыре раза (ФЛ : Б = 100 : 1) ускоряет процесс освобождения кислорода в два раза, а при молярном соотношении ФЛ : Б = 200 : 1 молекулы охуМб сразу после смешивания с везикулами переходят в метформу (не показано). Эти данные указывают на то, что присутствие мембран облегчает процесс освобождения кислорода. Сходные данные в присутствии везикул другого состава получены в работе [67]. Описанный эффект может быть связан с нарушением третичной структуры молекулы охуМб, наблюдаемым другими методами для holoМб. Первоначальное освобождение кислорода происходит только у тех молекул миоглобина, которые денатурируют и связываются с мембраной. Можно предположить, что медленная фаза соответствует отдаче кислорода молекулами белка, которые находятся в свободном состоянии. Следует отметить, что процесс отщепления кислорода у несвязанных с везикулами молекул охуМб происходит намного быстрее в присутствии везикул, чем у этого белка в отсутствие везикул, что косвенно указывает на дестабилизацию структуры несвязанных с везикулами молекул миоглобина. При молярном соотношении ФЛ : Б = 200 : 1 при pH 7.2 белок полностью связывается с везикулами (данные других методов), поэтому после смешивания раствора белка с везикулами происходит быстрое отщепление кислорода и замена его на воду, т.е. образование метформы.

Аналогичный эффект наблюдается при передаче витамина А (ретинола) мембране. Кинетика денатурации RBP и освобождения ретинола при pH 7.0 в присутствии мембран резко ускоряется, а понижение pH до 6.0 приводит к ещё большему эффекту (см. рис. 5д и 5е). Следует подчеркнуть, что ретинол может быть освобожден из RBP только при нарушении его структуры. Поэтому освобождение ретинола идет одновременно с денатурацией белка, но с большей скоростью.

Примеры охуМб и RBP без сомнения свидетельствуют, что присутствие отрицательно заряженной поверхности мембран приводит к увеличению флуктуаций в структуре белка, которые в добавление к флуктуациям, вызываемым повышением температуры до 37 °С, способствуют выполнению функций этими белками.

ВОДОРАСТВОРИМЫЙ ФРАГМЕНТ ЦИТОХРОМА b_5

Особенности нарушения нативных взаимодействий в третичной структуре цитохрома b_5 в присутствии фосфолипидных везикул

Cyt b_5 – это периферический мембранный белок [28, 68, 69], который посттрансляционно спонтанно встраивается во внешний слой мембраны ЭР.

Водорастворимый домен Cyt b_5 функционирует в поле мембраны ЭР и взаимодействует с многочисленными партнерами, включающими NADH-Cyt b_5 редуктазу [70, 71] и NADPH цитохром P450 редуктазу [72, 73]. От них он получает один электрон и переносит его на другие белки, являющиеся компонентами системы переноса электронов (такими, как цитохром P450). Эти белки катализируют десатурацию жирных кислот [74, 75], гидроксирование стероидов, ксенобиотическую трансформацию лекарств и различных природных продуктов [70, 72, 76]. В эритроцитах существует природная водорастворимая форма Cyt b_5 (без гидрофобного домена), участвующая в восстановлении metMb [70, 77] и metHb [78, 26]. Существует мнение, что Cyt b_5 , лишенный гидрофобного домена, не способен образовывать комплекс с цитохромом P-450, и гидрофобные взаимодействия при комплексообразовании играют более важную роль, чем электростатические [79].

Структура каталитического фрагмента Cyt b_5 была изучена как методами рентгеноструктурного анализа [80], так и методами гомо-[81, 82] и гетеро-ЯМР [83, 84]. Рентгеноструктурное исследование установило, что каталитический домен в своей последовательности имеет очень много отрицательно заряженных аминокислотных остатков в области локализации гема, которые определяют заряд фрагмента [80]. Часть из них вовлечена во взаимодействие с цитохромами [74, 85] и глобинами [26, 77, 86], другая – с редуктазами [71, 77, 87, 88]. Большинство отрицательно заряженных остатков находится на поверхности белка и локализовано вокруг гема, и именно эта область фрагмента и принимает участие в процессах взаимодействия Cyt b_5 с белками-партнерами в окислительно-восстановительных реакциях. Часть белка, обращенная к мембране, напротив, сильно обеднена отрицательно заряженными аминокислотными остатками. Изучение конформационного состояния водорастворимого фрагмента Cyt b_5 вблизи мембранной поверхности очень важно для понимания механизма его функционирования. Структурные исследования Cyt b_5 были предприняты как в присутствии везикул из отрицательно заряженных ненасыщенных фосфолипидов, так и в присутствии везикул из смеси

насыщенных незаряженных (DPPC) и ненасыщенных (POPG) фосфолипидов при pH 7.2 и pH 5.5. Следует заметить, что при pH 5.5 Сут b_3 находится ещё в нативном состоянии, незначительно дестабилизированном из-за pH-зависимости стабильности нативного состояния [89].

Особенности поведения третичной структуры цитохрома b_3 в присутствии фосфолипидных везикул

Температурная денатурация позволяет судить об изменении третичной структуры белка в различных условиях. Полученные кривые теплопоглощения Сут b_3 при изменяющихся молярных соотношениях ФЛ : Б от 50 : 1 до 200 : 1 при pH 7.2 и pH 5.5 свидетельствуют о том, что не наблюдается существенного сдвига температуры плавления белка даже при pH 5.5. Однако при понижении pH происходит примерно 2-х кратное уменьшение калориметрической энтальпии, что, вероятно, связано с дестабилизацией структуры белка [89]. Изменяется и отношение калориметрической к эффективной энтальпии, которое составляет уже 0.5, что предполагает ассоциацию, вероятно, димеризацию белка в присутствии везикул.

Исходя из данных работы [89], можно предположить, что при соотношении ФЛ : Б = 50 : 1 небольшая часть молекул белка находится в денатурированном состоянии и не вносит вклада в общую калориметрическую энтальпию, а плавится только оставшаяся часть молекул белка, которая еще сохранила третичную структуру. При молярных соотношениях ФЛ : Б = 100 : 1 и выше при pH 7.2 пиков теплопоглощения белка не наблюдается, следовательно, жесткая третичная структура белка уже нарушена. Следует отметить, что повышение температуры само по себе вызывает дестабилизацию белка, а совместно с везикулами общее их денатурирующее воздействие на структуру белка оказывается еще более сильным. При pH 5.5 при всех молярных соотношениях ФЛ : Б не удается наблюдать температурного плавления белка, что свидетельствует о том, что при понижении pH добавление везикул приводит к нарушению плотной упаковки боковых групп белка.

Фазовый переход гель-жидкий кристалл насыщенных фосфолипидов (DPPG) наблюдается при 312K (39 °C), что дает возможность следить за этим переходом. Калориметрическое измерение с использованием везикул из насыщенных фосфолипидов было проведено для молярных соотношений ФЛ : Б = 100 : 1 при pH 7.2 и 5.5. Для молярного соотношения ФЛ : Б = 100 : 1 при pH 7.2 изменений параметров температурного перехода везикул практически не

происходит, что может свидетельствовать лишь об электростатическом взаимодействии белка с поверхностью везикул без нарушения упаковки фосфолипидов в бислое. При pH 5.5 при этом же соотношении пик плавления везикул меняется не только по величине теплоемкости и энтальпии, но и сдвигается в сторону меньших температур, следовательно, белок сильнее взаимодействует с везикулами.

Сут b_5 в нативном состоянии при pH 7.2 имеет жесткое асимметричное окружение остатков ароматических аминокислот, что приводит к появлению ярко выраженного спектра КД в ближней УФ области с набором характерных полос, которые полностью отсутствуют в спектре, полученном для белка в промежуточном состоянии расплавленной глобулы [89]. Спектры КД в ближней УФ области для Сут b_5 в условиях, когда присутствует пик теплопоглощения при калориметрических измерениях, по форме очень похож на спектр нативного белка. Такой спектр свидетельствует о сохранении третичных взаимодействий у большей части белковых молекул. При увеличении концентрации ФЛ при pH 7.2 происходит исчезновение особенностей спектров КД в ближней УФ области, характерных для нативного белка, что указывает на нарушение плотной упаковки его боковых групп. При pH 5.5 для всех исследованных молярных соотношений ФЛ : Б спектры КД в ближней УФ области утрачивают все характерные особенности спектра нативного белка. Это означает, что Сут b_5 в этих условиях взаимодействует с фосфолипидными везикулами и в этом состоянии не имеет плотной упаковки боковых групп. Эти данные согласуются с результатами, полученными с помощью микрокалориметрии.

Спектры поглощения Сут b_5 в характеристической полосе гема чувствительны к изменению его окружения. При соотношении ФЛ : Б = 50 : 1 при pH 7.2 спектр поглощения не проявляет явных изменений и близок к нативному. Увеличение концентрации ФЛ в четыре раза и выше приводит к уширению полосы Soret, уменьшению абсолютной величины пика и смещению максимума в коротковолновую область с появлением дополнительного плеча в области 380 нм, характерного для денатурированного белка. При pH 5.5 уже при молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 происходят более заметные изменения в полосе Soret. Наблюдаемые изменения спектров указывают на то, что окружение гема Сут b_5 в присутствии везикул отличается от характерного для нативного состояния в растворе, что свидетельствует о денатурации белка в целом. При этом спектры поглощения в присутствии везикул сильно отличаются от спектра

белка при pH 3.0, при котором гем освобождается из гидрофобного кармана.

Амплитуда собственной Тгр флуоресценции $Syt b_5$ в нативном состоянии достаточно мала, и при этом для спектра флуоресценции характерен слабо выраженный максимум в области 335 нм, что, вероятно, вызвано, как и у holoMb, тушением единственного Тгр остатка гемом и окружающими аминокислотными остатками. При молярном соотношении ФЛ : Б = 50 : 1 при pH 7.2 интенсивность флуоресценции увеличивается незначительно, т.е. Тгр ещё испытывает сильное влияние гема и находится в достаточно жестком окружении. При увеличении концентрации ФЛ до соотношения ФЛ : Б = 500 : 1 при pH 7.2 происходит заметный рост интенсивности Тгр флуоресценции, однако она лишь незначительно превышает таковую для этого белка в состоянии расплавленной глобулы. При pH 5.5 уже при молярном соотношении ФЛ : Б = 50 : 1 интенсивность флуоресценции несколько выше, чем при соотношении ФЛ : Б, равном 500 : 1 при pH 7.2. Спектры флуоресценции при других соотношениях при pH 5.5 одинаковы по интенсивности флуоресценции и лишь немного превышают интенсивность флуоресценции для соотношения ФЛ : Б = 50 : 1. В то же время в указанных условиях интенсивность флуоресценции составляет лишь 75% от этой величины, характерной для полностью развернутого состояния. Таким образом, данные флуоресцентной спектроскопии свидетельствуют о том, что в присутствии фосфолипидов меняется расстояние и взаимная ориентация гема и Тгр. Длина волны в максимуме флуоресценции при всех молярных соотношениях ФЛ : Б составляет 340 нм, что близко к таковому значению для нативного состояния $Syt b_5$. Это указывает на достаточно гидрофобное окружение Тгр в денатурированном белке.

Суммируя данные, полученные при изучении третичной структуры $Syt b_5$ в присутствии отрицательно заряженных ФЛ везикул, можно сделать вывод, что в присутствии фосфолипидов происходит нарушение плотной упаковки боковых групп белка. $Syt b_5$ оказался более устойчивым к денатурирующему действию отрицательно заряженных везикул, чем holoMb, который полностью утрачивает свою третичную структуру при меньшем соотношении ФЛ : Б. Такое отличие во взаимодействии этих белков с везикулами может быть связано как с различием их суммарного заряда, так и их структурной организации.

*Вторичная структура цитохрома b_5 сохраняется
в присутствии фосфолипидных мембран*

Спектры КД в дальней УФ области были изучены для Сyt b_5 в тех же условиях, что и при измерениях поглощения и флуоресценции. В нативном состоянии Сyt b_5 спектр КД имеет один ярко выраженный минимум в области 220 нм и плечо при 208 нм. В состоянии расплавленной глобулы [89] при рН 3.0 форма спектра меняется, и плечо на 208 нм превращается в четко выраженный минимум. При молярном соотношении ФЛ : Б = 50 : 1 при рН 7.2 изменения спектра КД незначительны, и по всем параметрам он похож на спектр белка в нативном состоянии. Спектры Сyt b_5 в присутствии больших концентраций ФЛ при рН 7.2 по форме становятся похожи на спектр белка в состоянии расплавленной глобулы, при этом они сильно отличаются от спектра белка в состоянии U. Следовательно, при рН 7.2 вторичная структура Сyt b_5 в присутствии везикул меняется незначительно, а изменение формы спектров связано с конформационными перестройками молекулы белка. Понижение рН до 5.5 приводит к увеличению абсолютного значения эллиптичности при 220 нм уже при молярном соотношении ФЛ : Б = 50 : 1 по сравнению со спектром белка в состоянии MG, хотя по форме спектры похожи между собой. Увеличение концентрации везикул приводит к еще большему росту амплитуды спектра КД. Аналогичное изменение спектров КД в дальней УФ области наблюдается для этого белка при больших концентрациях MeOH [29]. Такой эффект можно объяснить увеличением стабильности водородных связей внутри полипептидной цепи при попадании белка в более гидрофобное окружение, т.е. в среду с более низкой ϵ . Можно предположить, что увеличение содержания вторичной структуры происходит вследствие частичного погружения молекулы белка в бислои, где уже сказывается влияние гидрофобной части мембраны. Это согласуется с данными сканирующей микрокалориметрии. Таким образом, Сyt b_5 в присутствии отрицательно заряженных ФЛ везикул, так же как и в состоянии MG, имеет хорошо выраженную вторичную структуру, которая, однако, отличается от нативной.

Взаимодействие цитохрома b_5 с фосфолипидными мембранами

Известно, что нативный водорастворимый фрагмент этого белка не взаимодействует с мембраной, поэтому связывание с мембраной также косвенно свидетельствует о денатурации белка. На профилях элюции, полученных при гель-фильтрации смесей белка и фосфолипидов,

удается выявить два пика: один – в месте элюции изолированного белка, а другой – на месте элюции везикул, в данном случае, в свободном объеме колонки. Появление второго пика характерно для белка, связанного с везикулами. При молярном соотношении ФЛ : Б = 50 : 1 при рН 7.2 площадь пика, соответствующего изолированному белку, уменьшается незначительно (~10%). Увеличение молярной концентрации ФЛ приводит к уменьшению высоты пика в области элюции нативного Cyt b_5 , и одновременно с этим наблюдается увеличение площади пика в области элюции везикул.

Связывание всех молекул белка при рН 7.2 происходит лишь при молярном соотношении ФЛ : Б = 500 : 1, хотя площадь поверхности везикул во много раз больше (~в 20 раз), чем площадь поверхности всех молекул белка. Для рН 5.5 тенденция изменений величины пиков элюции сходна с таковой при рН 7.2, однако полное связывание белка с везикулами происходит при значительно меньшей концентрации ФЛ – при соотношении ФЛ : Б = 200 : 1. Таким образом, для Cyt b_5 также наблюдается взаимодействие с везикулами, однако для этого требуется более высокая молярная концентрация ФЛ, чем для holoMb. Дестабилизация белка, вызванная понижением рН до 5.5, приводит к переходу белка из N в I состояние и последующему связыванию с мембраной при меньшем молярном соотношении ФЛ : Б, чем таковое требуется при рН 7.2.

Взаимодействие Cyt b_5 со смешанными везикулами

Липидный состав биологических мембран представлен как отрицательно заряженными ФЛ, так и нейтральными ФЛ, и это справедливо для мембраны ЭР. В связи с этим было изучено влияние везикул из смеси (50 : 50) насыщенных незаряженных (DPPC) и ненасыщенных отрицательно заряженных (POPG) ФЛ на конформационное состояние Cyt b_5 . Для оценки состояния третичной структуры белка был использован метод сканирующей микрокалориметрии. Для белка в нативном состоянии максимум теплопоглощения наблюдается при температуре 340 К (67 °С), а везикул – в области 300 К (27 °С). Пики плавления белка и везикул не перекрываются, что позволяет достоверно следить за изменениями каждого процесса отдельно. При молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1 при рН 7.2 температура плавления белка в максимуме практически не изменяется, но при этом калориметрическая энтальпия уменьшается в два раза по сравнению с нативным белком. Подобное изменение кривой температурного перехода наблюдалось для Cyt b_5 в присутствии везикул из отрицательно заряженных ФЛ, но при молярном соотношении ФЛ : Б = 50 : 1.

В случае же смешанных ФЛ при том же молярном соотношении наблюдается лишь небольшой пик плавления белка с максимумом при температуре 343К, что свидетельствует о том, что большая часть молекул белка уже потеряла свою третичную структуру. Оставшаяся часть молекул белка сохраняет плотную упаковку боковых групп. Таким образом, нарушение третичной структуры Сyt b₅ в присутствии везикул из смеси незаряженных и заряженных ФЛ оказалось более эффективным, чем при использовании только отрицательно заряженных ненасыщенных ФЛ. Возможно, смесь насыщенных и ненасыщенных ФЛ образуют бислой, воздействие которого, несмотря на уменьшение вдвое отрицательного заряда мембранной поверхности, является более эффективным для этого белка.

Таким образом, и нейтрально заряженный миоглобин, и отрицательно заряженный Сyt b₅, претерпевают воздействие заряженной поверхности ФЛ мембран на их третичную структуру, приводящее к изменению их конформационного состояния.

АЛЬФА-ЛАКТАЛЬБУМИН

Лактальбумин (HLA) – хорошо изученный глобулярный белок, содержащийся в молоке человека и млекопитающих. HLA является модификатором фермента галактозил-трансферазы и вызывает образование лактозосинтазного ферментного комплекса, который катализирует конечный шаг в биосинтезе лактозы в период лактации. Пространственная структура альфа-HLA человека определена с разрешением 1.7 Å [90]. В структуре HLA присутствуют четыре альфа-спирали и тройной антипараллельный бета-слой. Белок стабилизирован четырьмя дисульфидными мостиками. HLA является кислым белком с pI = 4.4 и при нейтральных pH имеет заряд –8.

Конформационные переходы в структуре этого белка под действием разных денатурантов в водных растворах хорошо изучены [1, 2, 91]. Одна из наиболее важных особенностей этого белка – это его высокое сродство к ионам кальция, который стабилизирует белок, [92].

HLA является водорастворимым белком, но после биосинтеза в апо-форме связывается с внутренним слоем мембраны ЭР. Однако неизвестно, в какой конформации находится белок в мембраносвязанном состоянии. Только связывание Ca²⁺ приводит к изменению конформации белка, приобретению им нативной функциональной конформации, преодолению системы контроля качества ЭР и последующему экзоцитозу.

*Конформационные изменения α -лактальбумина
в присутствии фосфолипидных везикул*

НЛА является секреторным белком. Для изучения была выбрана бескальциевая форма НЛА, т.к. именно она взаимодействует с мембраной после биосинтеза. Структурные изменения этого белка в присутствии везикул исследовали методами сканирующей микрокалориметрии, КД в дальней УФ области и ЯМР высокого разрешения.

Кривые теплопоглощения были получены для ароНЛА (в присутствии 10мМ EDTA) в отсутствие везикул при pH 6.2, для белка в присутствии везикул из смеси ФЛ, а также для свободных везикул из смеси тех же ФЛ (рис. 6а). Свободные везикулы имеют собственный пик плавления с максимумом в области 300К. Максимум пика плавления белка находится в области 311К, поэтому наблюдается перекрывание белкового пика с пиком плавления везикул. Значение калориметрической энтальпии плавления белка соответствует 168 кДж/моль, а для везикул оно составляет только около 23 кДж/моль. В присутствии везикул не наблюдается пика теплопоглощения белка, но происходит сдвиг пика плавления везикул в сторону более высоких температур. Наблюдаемое смещение кривой теплопоглощения везикул указывает на изменение их свойств за счет взаимодействия с белком.

Изменения спектров Тгр флуоресценции сходны с таковыми для ароMb. При увеличении интенсивности флуоресценции положение максимума спектра сдвигается к 340 нм, что соответствует таковому для белка в состоянии расплавленной глобулы. Подобные изменения свидетельствуют о денатурации НЛА в присутствии везикул, однако о компактности белка судить сложно, т.к. нельзя исключить влияние гидрофобного слоя мембраны на Тгр флуоресценцию.

Спектры КД в дальней УФ области НЛА представлены на рис. 6б. Как следует из рисунка, спектр белка в присутствии везикул меняется по форме, происходит увеличение эллиптичности при 208 нм, и, тем самым, спектр становится более похожим на спектр белка в состоянии MG. В целом, такая картина изменений свидетельствует о некоторой перестройке элементов вторичной структуры, вызванной взаимодействием белка с везикулами. Однако полного разрушения вторичной структуры не наблюдается, т.к. спектр белка в присутствии везикул не похож на таковой для развернутой формы.

Спектр ЯМР нативного белка имеет ряд характерных, хорошо разрешенных вторичных химических сдвигов, которые почти полностью исчезают при добавлении ФЛ везикул. Остаются лишь

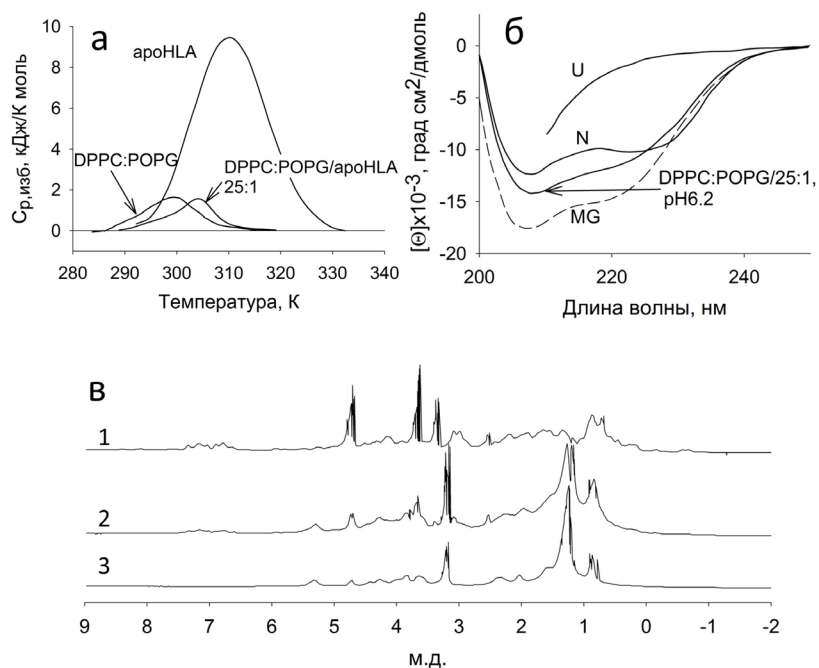


Рис. 6. Поведение бескальциевой формы человеческого лактальбумина (apoHLA) в присутствии фосфолипидных мембран.

а) Зависимость избыточной парциальной теплоёмкости $c_{p,изб}$ от температуры в присутствии смешанных везикул из цвиттерионных DPPC и заряженных POPG (1 : 1) для соотношения ФЛ : Б = 25 : 1, pH 6.2. Кривая теплопоглощения для нативного состояния белка при pH 6.2 в отсутствие везикул приведена для сравнения.

б) Спектры КД в дальней УФ области apoHLA в присутствии везикул (условия такие же, как в рис. 6а). Спектры белка в состояниях N, MG (pH 2.0) и U (6M GuHCl) представлены для сравнения.

в) Спектры ¹H-NMR высокого разрешения apoHLA в нативном состоянии (1) и в присутствии везикул (2) в условиях, аналогичных рис. 6а; (3) – спектр везикул без белка [Адаптировано из 30].

особенности, характерные для свободных везикул (рис. 6в). Следует отметить, что спектр ЯМР белка в присутствии везикул в области резонансов везикул (2–0.5 ppm), существенно отличается от спектра свободных везикул, в частности, происходит увеличение интегральной площади под кривой. Резонансы, характерные для нативного белка в этих условиях, не проявляются. Данное обстоятельство позволяет

предположить, что белок связывается с поверхностью везикул, и это приводит к некоторому нарушению регулярной упаковки фосфолипидов в бислое.

Конформационные состояния и термодинамика связывания НЛА с мембраной были изучены в группе Шеналья [93]. Было показано, что конформация этого белка, связанного с мембранной поверхностью, очень чувствительна к внешним факторам, таким как рН, концентрация Ca^{2+} , заряд и кривизна мембраны. Заякоревание белка в мембране ограничивается амфифильными альфа-спиралями.

Таким образом, бескальциевая форма НЛА человека в присутствии ФЛ везикул претерпевает нарушение третичной структуры при сохранении вторичной структуры. Это позволяет заключить, что в процессе биосинтеза бескальциевая форма НЛА связывается с мембраной в промежуточном, но не в нативном состоянии.

СОПОСТАВЛЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ РАЗНЫХ БЕЛКОВ В ПРИСУТСТВИИ ФОСФОЛИПИДНЫХ ВЕЗИКУЛ

Приведенные данные позволяют провести сравнение влияния отрицательно заряженных фосфолипидных везикул на конформационное состояние слабо положительно заряженных холо- и апомиоглобинов и отрицательно заряженного водорастворимого фрагмента $\text{Cyt } b_5$ при нейтральных значениях рН, характерных для цитоплазмы. Все исследованные белки функционируют вблизи мембраны и не связываются с ней, но могут испытывать её влияние. Обнаружено, что ФЛ везикулы оказывают денатурирующее действие на все эти белки, при этом для них прослеживается общая тенденция структурных изменений, несмотря на различия в пространственных структурах белков. Основным результатом – третичная структура этих белков в присутствии везикул нарушается, в то время как регулярная вторичная структура сохраняется. Такое состояние белков является промежуточным между N и U состояниями белков в водном растворе и по своим свойствам близко к состоянию расплавленной глобулы. Однако наблюдаемое промежуточное состояние белка в присутствии фосфолипидных мембран нельзя называть типичным состоянием MG, наблюдаемым в водных условиях, т.к. все эти белки связываются с везикулами, образуя комплекс. Этот факт не позволил нам определить размеры белка доступными методами. Связывание белков с везикулами происходит благодаря электростатическим взаимодействиям, а после погружения части белка в наружный слой мембраны подключаются и гидрофобные взаимодействия. Если рассматривать поведение каждого белка в присутствии везикул отдельно, то обнаруживается ряд

особенностей, связанных со структурными характеристиками белка и различием суммарного заряда. ApoMb и бескальциевая форма HLA не содержат лигандов, которые бы стабилизировали белковую молекулу, поэтому их денатурация и связывание с везикулами происходят уже при минимально используемой концентрации ФЛ (ФЛ : Б = 25 : 1). Вторичная структура этих белков в присутствии везикул меняется незначительно. HoloMb и Cyt b_5 содержат нековалентно связанный гем, что приводит к увеличению стабильности белков, т.е. определённой жёсткости третичной структуры при нейтральном значении pH. Однако, несмотря на большую стабильность третичной структуры, добавление отрицательно заряженных везикул при pH 7.2 приводит к увеличению подвижности боковых групп и, в конечном итоге, к нарушению их плотной упаковки. В данном случае, процессы денатурации и связывания, в отличие от апо-белков, происходят ступенчато, т.е., при низких концентрациях ФЛ лишь часть молекул белка утрачивает плотную упаковку боковых групп и связывается с везикулами. Постепенно, с увеличением концентрации ФЛ, все большее количество молекул белка денатурирует, пока все белковые молекулы не перейдут в промежуточное состояние, в котором белок свяжется с везикулами. Для миоглобина при pH 7.2 все молекулы полностью связываются с везикулами при молярном соотношении ФЛ : Б = 200 : 1, а для Cyt b_5 – только при ФЛ : Б = 500 : 1, хотя по оценкам в данных системах доступная для связывания площадь поверхности везикул превышает площадь поверхности всех белковых молекул. Возможно, это объясняется разницей в суммарном заряде белка. Это подчеркивает важность электростатических взаимодействий при связывании белков с фосфолипидными мембранами. Несвязанные с везикулами молекулы миоглобина, которые присутствуют при более низких концентрациях ФЛ, находятся в нативном состоянии, которое, однако, становится менее стабильным относительно денатурированных молекул белка, связанных с везикулами. Это связано с тем, что фосфолипидные мембраны имеют свое «поле» на расстоянии 5–20 Å, обусловленное наличием отрицательно заряженных фосфолипидных головок и изменением диэлектрической проницаемости среды от величины примерно 40 на поверхности раздела фаз и до 80 в водной фазе. В случае же Cyt b_5 свободные молекулы белка в присутствии везикул дольше сохраняют нативность третичной структуры, пока столкновения с мембраной не приведут к переходу в промежуточное состояние, компетентное к связыванию. Понижение pH до 6.2 для миоглобина и до 5.5 для Cyt b_5 облегчает денатурацию и связывание с фосфолипидной мембраной, так как в этом случае holoMb попадает

в начало своего рН-индуцируемого перехода и поэтому не должен претерпевать изменений в третичной структуре, а Cyt b_5 при таком понижении рН окажется уже в середине своего рН-зависимого перехода. Исходя из наших данных, эффективное понижение рН около поверхности заряженных везикул для ароMb составляет порядка 3 единиц рН в используемых нами условиях. Зависимость свойств holoMb и Cyt b_5 от содержания ФЛ напоминает в общих чертах зависимость стабильности этих белков от рН.

VI. СОПОСТАВЛЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННЫХ СОСТОЯНИЙ БЕЛКОВ В ВОДНО-СПИРТОВЫХ СМЕСЯХ И В ПРИСУТСТВИИ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Сравнительный анализ экспериментальных данных о вовлечении ненативных состояний белка в ряд клеточных процессов привел к предположению о возможной функциональной роли промежуточных состояний белка [94]. В последующие годы эта гипотеза получила целый ряд подтверждений. Так, например, экспериментально было показано, что, кроме транслокации белков через мембрану и обмена лигандами вблизи мембраны, после биосинтеза белок приобретает состояние MG, которое узнается шаперонами. Белки, предназначенные для деградации, подвергаются модификациям, что ведет к дестабилизации их структуры. Кроме того, другие, не менее важные, клеточные процессы также требуют ненативного состояния белка. Однако возникновение ненативного состояния белка в клетке может привести к образованию бляшек на поверхности мембран и фибрилл, следствием чего может быть возникновение заболеваний человека.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КОНФОРМАЦИОННОГО СОСТОЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ БЕЛКОВ В ВОДНО-СПИРТОВЫХ СМЕСЯХ И В ПРИСУТСТВИИ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Бислойная мембрана имеет сложный состав [12, 13, 95]. Результаты, полученные для ретинол-связывающего белка [32] и Cyt c [24] показали, что изменение ряда существенных черт в структуре белка, наблюдаемое в присутствии ФЛ мембран, может быть смоделировано в условиях умеренного понижения ϵ и рН среды. В частности, для RBP было показано, что при умеренно низких концентрациях MeOH (16%) при рН 3.5 происходит освобождение ретинола и переход белка в промежуточное состояние типа MG. Исследования по изучению влияния водно-спиртовых смесей на структуру ароMb лошади проведены в работе [31], holoMb лошади – [39] и отрицательно заряженного Cyt b_5 – [29]. В ходе исследования кон-

формационного состояния apoMb в водно-метанольных смесях при умеренно низких значениях pH (~ 30% MeOH при pH 5.2) было обнаружено промежуточное состояние, которое характеризуется отсутствием жесткой третичной структуры при сохранении компактности и почти нативной вторичной структуры (см. табл. 2.2). При концентрациях спирта выше 50% наблюдается более структурированное денатурированное спиральное состояние. Аналогичная картина наблюдается и в случае holoMb, который в 40% MeOH при pH 4.0 переходит в промежуточное состояние типа MG (см. табл. 2.3). Изучение водорастворимого фрагмента Cyt b_5 было проведено при pH 7.2 [29], и только при концентрациях от 40 до 60% MeOH наблюдается переход в промежуточное состояние.

Нами было проведено исследование конформационного состояния Cyt b_5 в присутствии различных концентраций iPrOH при pH 6.5 методами абсорбционной спектроскопии, Trp флуоресценции и кругового дихроизма в дальней УФ области (рис. 1б), а также сканирующей микрокалориметрии. Результаты экспериментов показали, что при концентрации спирта 36% окружение гема становится ненативным, пика теплопоглощения не наблюдается, в то время как вторичная структура и компактность (по данным флуоресценции) сохраняются (см. табл. 2.1), т.е. наблюдается переход структуры белка из нативного в промежуточное состояние.

Сопоставляя структурные данные, полученные для различных белков в присутствии отрицательно заряженных везикул и в водно-спиртовых смесях, можно заключить, что тенденция конформационных превращений сходна в обоих случаях. Под влиянием обоих денатурантов в определенных условиях белки утрачивают жесткую третичную структуру, однако сохраняют вторичную. О степени компактности белковой молекулы в присутствии везикул судить сложно, т.к. белок связывается с мембраной. Основные структурные характеристики изученных белков в различных условиях представлены в таблице 2.

Полученные нами данные по денатурации белков в присутствии везикул согласуются с результатами, полученными для белков в водно-спиртовых смесях при умеренно низких pH. Это подтверждает гипотезу [3, 94], что мембраны воздействуют на структуру белка благодаря усилению электростатических взаимодействий вблизи её поверхности, а именно, благодаря совместному действию локального понижения pH и ϵ среды. Полученные результаты не оставляют сомнения в том, что поверхность мембраны может служить умеренно денатурирующим агентом в клетке.

Таблица 2.
Структурные особенности белков в нативном состоянии, в присутствии фосфолипидных везикул при нейтральных значениях рН и в водно-спиртовых смесях при умеренно низких значениях рН

Таблица 2.1. Водорастворимый фрагмент цитохрома b_5

Условия/состояние	T_m , К	$[\Theta]_{220}^{\circ}$, град см ² дмоль ⁻¹	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}}$, нм	Гель-хромато- графия (объём)
Нативное состояние, рН 7.2	340.3	-8 100	335	Элюция в объеме компактной формы
В присутствии фосфолипидных везикул при рН 7.2, POPG :Cyt b_5 = 50 : 1	341.5	-7 500	340	80% белка выходит в объеме элюции нативного белка
В присутствии фосфолипидных везикул при рН 7.2, POPG : Cyt b_5 = 500 : 1	пик плавления отсутствует	-5 500		100% молекул белка наблюдается в объеме элюции везикул
В водно-спиртовых смесях при умеренно низких значениях рН (36% изопропанола, рН 6.5)	пик плавления отсутствует	-8 300	345	Элюция в объеме компактной формы

Таблица 2.2. Апомиоглобин

Условия/состояние	T_m , К	$[\Theta]_{220}^{\circ}$, град см ² дмоль ⁻¹	$\lambda_{\text{макс}}^{\text{фл}}$, нм	Гель-хромато- графия (объём)
Нативное состояние, рН 7.2	335.5	-17 000	334	Элюция в объеме компактной формы
Промежуточное, в присутствии фосфолипидных везикул: POPG : apoMb = 25 : 1, рН 7.2	пик плавления отсутствует	-17 000	340	Белок выходит в объеме элюции везикул
Промежуточное, в водно-спиртовых смесях при умеренно низких значениях рН (30% метанола, рН 5.2)	пик плавления отсутствует	-18 000	340	Элюция в объеме компактной формы

Окончание табл. 2 см. на сл. стр.

Окончание табл. 2.

Таблица 2.3. Холомиоглобин

Условия/состояние	T_m , К	$[\Theta]_{220}^{\lambda}$, град см ² дмоль ⁻¹	$\lambda_{макс}^{фл}$ нм	Гель-хромато- графия (объем)
Нативное состояние, рН 7.2	357	-22 000	330	Элюция в объеме компактной формы
В присутствии фосфо- липидных везикул при рН 7.2: POPG : holoMb = 25 : 1	338	-20 800	340	75% белка выходит в объеме элюции нативного белка
В присутствии фосфо- липидных везикул при рН 7.2: POPG : holoMb = 200 : 1	пик плавления отсутствует	-17 500		100% белка наблю- дается в объеме элюции везикул
В водно-спиртовых смесях при умеренно низких значениях рН (40% метанола, рН 4.0)	пик плавления отсутствует	-21 500	340	Элюция в объеме компактной формы

VII. ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕМБРАН И БЕЛКОВ

ТРАНСЛОКАЦИЯ БЕЛКОВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНУ

Первое указание на то, что в процесс транслокации вовлечено ненативное состояние белка, появилось в работах группы Шатца, посвященных изучению транслокации белков, ренатурированных из растворов сильного денатуранта [96–99]. Было показано, что эти ренатурированные белки транслоцируются быстрее и намного эффективнее нативных предшественников и процесс транслокации не ингибируется ни низкой температурой, ни специфическими лигандами.

В работах этой же группы [6, 8] было сделано наблюдение, что нативный предшественник, будучи связанным на внешней поверхности мембраны митохондрии, трансформируется в состояние, компетентное к транспорту, которое может быть сходным с промежуточным состоянием в сворачивании белка. Авторы отметили, что «подобное частичное разворачивание не может не иметь физиологического значения».

Дальнейшие исследования группы Шатца ясно показали, что для транслокации белка через мембрану требуется его денатурация.

Во-первых, имеются данные о том, что стабилизация белка путем связывания лигандов ингибирует транслокацию: метотрексат, связанный с дигидрофолатредуктазой, стабилизирует её структуру против протеолиза и не позволяет ей пройти через мембрану [7, 96]; или введение дисульфидной связи в предшественник дигидрофолатредуктазы, стабилизирующей структуру белка, блокирует его импорт [100]. Кроме того, дестабилизация белка мочевиной, точечными мутациями или связыванием с мембраной, резко ускоряет его импорт в митохондрию [6, 7, 98, 101]. В добавление к этим данным, в работе [102] показано, что стабилизация структуры рибонуклеазы барназы её ингибитором барстаром полностью ингибирует импорт барназы в митохондрию.

Было обнаружено, что холо-белки или их предшественники, например, цитохромы типа *c* и *b*, импортируются после биосинтеза в их апоформах, тогда как связывание гема ингибирует транслокацию [103]; дикий тип апо-формы мальтоза-связывающего белка, который чувствителен к протеолизу, экспортируется быстро и эффективно [104].

Во-вторых, установлено, что ненативные белки транслоцируются существенно легче. Дигидрофолатредуктаза без С-концевых остатков транслоцируется даже в отсутствие АТФ [105]. Предшественник β -лактамазы связывается с GroEL непосредственно после биосинтеза, ещё до приобретения им жесткой структуры, и может быть транслоцирован, но теряет эту способность по достижении нативного состояния [106].

В-третьих, показано, что белки, связанные с мембраной, имеют ненативную структуру. Транслокация дигидрофолатредуктазы распадается на две стадии: связывание с мембраной, которое ингибируется солями, происходит в частично развернутой форме, доступной протеолизу, и собственно транслокацию, которая ингибируется метотрексатом [96, 97]. Встраивание мембранных белков, синтезируемых в цитоплазме, в мембрану происходит ступенчато, проходя через промежуточные состояния [107, 108].

К настоящему времени появились новые данные о процессах транслокации белков через мембрану, в частности, более подробно изучен транспорт белка через мембрану митохондрий. Многие белки транспортируются из цитоплазмы в митохондрию через ТОМ комплекс или каналы, диаметр которых ограничен [109]. Чтобы пройти через такую пору даже самым маленьким белкам требуется денатурация [110, 111]. Нарушение структуры изначально свернутого белка вызывает сама мембрана митохондрии благодаря наличию специфических белков (например, Hsp70) и потенциала на мембране митохондрии [112, 113].

ТРАНСЛОКАЦИЯ

Изучение токсинов свидетельствует о том, что их проникновение через мембрану осуществляется в ненативном состоянии. Для порообразующего домена колицина А было показано, что его связывание с мембраной и проникновение в нее резко возрастают при низких значениях pH [9, 10]. С другой стороны было установлено, что этот домен трансформируется в состояние расплавленной глобулы при низких pH, и значение этого pH совпадает с локальным значением pH на поверхности мембраны. Полученные данные привели авторов к выводу, что локальное низкое значение pH на поверхности мембраны денатурирует порообразующий домен токсина до состояния расплавленной глобулы. Это делает структуру домена более флуктуирующей или гибкой и позволяет гидрофобной шпильке, в нативном состоянии погруженной в гидрофобное ядро белка, отделиться от остальной части белка и проникнуть в мембрану [9, 114]. Позже было показано, что связывание колицина А с отрицательно заряженными везикулами приводит к конформационным изменениям структуры белка, связанным с нарушением третичной структуры [115–118].

Сходно ведут себя и другие токсины, имеющие порообразующие домены, такие как колицин Е1 [119] и дельта-токсин [120].

Для дифтерийного токсина (DT), для которого переход из нативного состояния в состояние расплавленной глобулы наблюдается при кислых pH [122], было показано, что денатурация облегчает его связывание с мембраной [121]. Хорошо известно, что дифтерийный токсин попадает в клетку через органеллы с внутренним кислым значением pH. В условиях *in vivo* в лизосомах дифтерийный токсин подвергается воздействию кислых значений pH, при котором он трансформируется в состояние расплавленной глобулы. При переносе в цитоплазму происходит ренатурация соответствующих доменов этого токсина из состояния расплавленной глобулы до нативного активного состояния [121–124]. Сходные данные были получены для экзотоксина, гомологичного дифтерийному токсину и обладающего сходной энзиматической активностью [125], а также для гемагглютинина вируса гриппа [126]. Позднее, в 2009 году, в группе Шеняля [127] процесс проникновения токсичного домена DT через мембрану был подробно изучен методами нейтронной рефлектометрии и solid-state NMR спектроскопии.

А-домен димерного токсина – рицина – связывается с отрицательно заряженными фосфолипидными везикулами, но не взаимодействует с нейтральными РС-везикулами. Процесс связывания рицина сопровождается конформационными изменениями белка и дестабилизацией

липидного бислоя [128, 129]. При взаимодействии белка с везикулами происходит переход белка в частично развернутое состояние, что подтверждается его расщеплением трипсином и утратой способности связывать аденин, т.е. выполнять свою функцию.

Денатурирующее действие мембран проявляется и при проникновении в клетку стафилококкового альфа-токсина [130]. Для *Bordetella pertussis* СуаА токсина патогенной бактерии было изучено внедрение и транслокация через мембрану каталитического домена [129–131]. Был обнаружен длинный участок (1–489 а.к.о.), который обладал способностью связываться с мембраной и дестабилизировать структуру бислоя, в то время как более короткий фрагмент этого белка (1–386 а.к.о.) не обладал такими свойствами. Дестабилизация структуры этого белка около мембраны вызывала экспонирование гидрофобного участка и связывание его с мембраной. Это позволяло перенести гидрофобный каталитический домен через гидрофильную межклеточную среду в гидрофобное окружение цитоплазматической мембраны.

Эти данные ещё раз подтверждают, что перед взаимодействием с мембраной жесткая структура белка должна быть нарушена. Этот факт находит подтверждение в литературе. Токсины холеры и коклюша являются нестабильными по отношению к температуре, что позволяет им быть в ненативной конформации и использовать систему деградации ЭР для проникновения в цитоплазму. Тепловая дестабилизация третичной структуры каталитической субъединицы токсина холеры обычно предшествует нарушению его вторичной структуры. Поэтому любая стабилизация структуры токсина холеры [132, 133] или коклюша [134, 135] ингибирует их движение в клетке из ЭР в цитоплазму и интоксикацию клетки. Так, стабилизация третичной структуры каталитической субъединицы токсина холеры глицерином препятствует выходу этой субъединицы из ЭР [132]. Эта работа показывает, что тепловая нестабильность токсина холеры играет ключевую роль в процессе интоксикации. Это также относится и к S1 субъединице токсина коклюша (*Pertussis toxin*) [134]. В работе [136] показано, что мембранное окружение нейротоксина облегчает связывание лиганда с его рецептором. Взаимодействие нейротоксина с заряженными головками фосфатидилсерина (PS), окружающими ацетилхолиновый рецептор, приводит к возникновению специфической топологии токсина на мембране, которая благоприятствует блокированию рецептора. Взаимодействие кардиотоксина Р-типа из яда кобры с разными фосфолипидными мембранами было исследовано с помощью ^1H -ЯМР. Оказалось, что токсин

связывается с отрицательно заряженными везикулами (но не с нейтральными) и проникает в бислои, что приводит к дальнейшему разрушению мембраны [137].

СВЯЗЫВАНИЕ НЕНАТИВНОГО СОСТОЯНИЯ БЕЛКА С МЕМБРАНОЙ

В ненативном состоянии наблюдается экспонирование гидрофобных групп на поверхность белка. Это приводит к связыванию гидрофобных красителей, агрегации белков и взаимодействию с мембранами. Это справедливо для HLA, который при кислых значениях pH совершает переход из нативного состояния в состояние расплавленной глобулы и лишь после этого связывается с мембраной, частично погружаясь в бислой [138]. В более поздних работах при помощи метода ЯМР было показано, что связывание HLA с мембраной происходит благодаря взаимодействию гидрофобных остатков спиралей A и C с липидами бислоя [139]. Для apoMb также было показано, что он связывается с большими везикулами при кислых значениях pH, и была определена последовательность фрагмента, который взаимодействует с мембраной [140].

Было обнаружено, что анионные фосфолипиды способны модулировать функцию ряда ферментов: например, для активации гидролитической активности водорастворимой АТФ-азы SecA необходимо её связывание с внутренней мембраной *Escherichia coli*, при этом белок находится в частично развернутой конформации [141]. Модулирующее действие отрицательно заряженной мембраны было показано и для пептидов, выделенных из C-концевого домена аполипопротеина E (apoE). Эти пептиды способны независимо образовывать липопротеиновые комплексы, и авторы считают, что поверхностный заряд apoE может регулировать его метаболизм [142]. Для регуляции активности и стабильности тирозин-гидроксилазы требуется лишь слабое связывание с мембраной [143], подобные условия также необходимы и для активации протромбина [144]. Водорастворимый димер ацетилхолинэстеразы из *Torpedo californica*, будучи в нативном состоянии, не взаимодействует с везикулами из фосфатидилхолина, в то время как трансформация белка в состояние расплавленной глобулы приводит к его связыванию с мембраной посредством наиболее гидрофобного пептида массой 5 кДа [145]. Этот амфифильный пептид располагается горизонтально на поверхности мембраны и погружается в нее лишь своей гидрофобной поверхностью. Ацетилхолинэстераза из *Bungarus fasciatus* легче претерпевает тепловую денатурацию в присутствии мембран, но не связывается с ними, а остается в денатурированном состоянии в

растворе [146], т.е. мембранная поверхность, в этом случае, служит катализатором денатурации.

Вышеприведенные примеры были получены в ненативных условиях, когда промежуточные состояния белков были образованы до их взаимодействия с мембранами. Исключение составляет ацетилхолинэстераза, для которой обнаружено, что присутствие мембран катализирует её тепловую денатурацию при нейтральном рН [147].

Для сапозина С показано, что он, связываясь с отрицательно заряженными PS-везикулами, вызывает их слияние [148]. В процессе слияния везикул принимают участие как белок-мембранные, так и белок-белковые взаимодействия. Слияние везикул происходит благодаря погружению N-концевой и C-концевой спиралей белка в бислой разных везикул, что сопровождается изменением конформации белковой молекулы, которая, в свою очередь, способна взаимодействовать с такой же молекулой белка, расположенной рядом.

Авторы работы [149] отмечают, что в присутствии фосфолипида PG в мембране наблюдается повышение скорости сворачивания и эффективности выхода свернутого тримерного альфа-спирального мембранного белка диацилглицеринкиназы. Замена PG на лизо-PG приводит к снижению скорости и эффективности сворачивания этого фермента.

Для малой GTPase H-Ras, заякоренной на мембране, показано, что она образует активные димеры за счет белок-белковых взаимодействий (без вовлечения липидной части) только на поверхности мембраны. В растворе же этот белок находится исключительно в мономерной форме [150].

Процесс образования оболочки транспортных везикул также оказался связанным с мембранами. Так, самоорганизация клатринов и сходных белков (coat proteins) происходит исключительно на мембране [151].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИТОХРОМА С С МЕМБРАНАМИ

Изучение Cyt *c* и его апо формы было начато давно. В литературе имеется пример функционального структурирования apoCyt *c* при взаимодействии его исходно развёрнутой цепи с отрицательно заряженной поверхностью мицелл. Белок при этом спирализуется, внедряется в мембрану и оказывается способным связывать гем [152]. Изучение конформационного состояния апо- и холоцитохромов *c* в присутствии различных мембран, а также механизма взаимодействия этих белков с мембранами проводилось в группе Pinheiro на протяжении нескольких лет [153–158]. В первых работах этой серии

авторы изучали структуру и динамику ФЛ бислоя, который содержит связанный Cyt *c*, методом одномерного ³¹P-ЯМР [153]. Было показано, что связывание Cyt *c* с мембраной есть результат дестабилизации белковой молекулы и разрушения его третичной структуры. В его связывании с мембраной большую роль играют электростатические взаимодействия, так как положительно заряженный Cyt *c* взаимодействует с отрицательно заряженными липидными головками, особенно с кардиолипином, который является основным ФЛ внутренней мембраны митохондрии. Следовательно, специфика взаимодействия белка с мембраной зависит от типа ФЛ, из которых состоит бислой. Взаимодействие Cyt *c* с мембранами исследовалось также методами флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии с использованием установки остановленного потока и ЯМР [154, 158]. По итогам этой работы авторы предложили кинетический механизм разворачивания Cyt *c* вблизи мембранной поверхности. Было установлено, что первоначальное связывание белка с мембраной происходит путем электростатических взаимодействий положительно заряженных групп белка с отрицательно заряженными ФЛ головками, вследствие чего появляется интермедиат со структурой, подобной структуре нативного белка. На следующем этапе происходит разрушение третичной структуры и осуществляется переход в денатурированное состояние со спиральной вторичной структурой, опять же похожей на структуру нативного белка. Кинетические исследования продолжились в работах по изучению сворачивания apoCyt *c* в присутствии липидных мицелл [155, 156]. ApoCyt *c* (как уже подчеркивалось) является предшественником Cyt *c*, который функционирует в межмембранном пространстве митохондрии. ApoCyt *c* синтезируется в цитоплазме и затем транслоцируется через внешнюю мембрану митохондрии, после чего присоединяет гем. Используя методы флуоресцентной спектроскопии и КД в дальней УФ области, авторы описали возможный механизм транслокации apoCyt *c* через внешнюю мембрану митохондрии. Было показано, что формирование спиральной структуры предшествует взаимодействию и внедрению белка в мембрану [155].

СВЯЗЬ БЕЛОК-МЕМБРАННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С ВОЗНИКНОВЕНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Ключевым событием в возникновении прионных заболеваний является преобразование нормальной клеточной формы прионного белка в токсичную форму, которая склонна к образованию фибрилл и бляшек. Причиной неправильно сворачивания белка может быть

присутствие мембраны. Экспериментально показано, что бета-структурная форма рекомбинантного прионного белка связывается с анионными везикулами при рН 7, но намного лучше – при рН 5 [159]. При этом сохраняется большая часть бета-структуры и неупорядоченных участков. Бета-PrP при связывании с мембраной при рН 5 формирует диффузные агрегаты с появлением протофибриллярных структур. А в присутствии плоских мембран из смеси DPPC, холестерина и сфингомиелина происходит денатурация бета-формы PrP с последующим образованием фибрилл. Альфа-спиральная форма прионного белка взаимодействует с тремя типами мембран: с отрицательно заряженной мембраной, с мембраной из нейтральных фосфолипидов и плоской мембраной, состоящей из фосфатидилхолина, сфингомиелина и холестерина [160]. Более сильное связывание происходит с отрицательно заряженной мембраной при рН 5.0, по сравнению с рН 7.0, что связано с протонированием гистидинов и увеличением заряда белка с +4 до +9, т.е. в данной системе ключевую роль в связывании играют электростатические взаимодействия.

Белок альфа-синуклеин может быть предшественником в образовании бляшек в болезни Альцгеймера и Паркинсона. альфа-Синуклеин – небольшой водорастворимый белок, который имеет неупорядоченную вторичную структуру в водном растворе. Было показано, что альфа-синуклеин способен связываться с отрицательно заряженными фосфолипидными везикулами [161]. При взаимодействии этого белка с мембраной происходит стабилизация неупорядоченной вторичной структуры и появлением участков со спиральной структурой. Кроме того, было выяснено, что удаление стерина из мембран (что делает их более подвижными) уменьшает связывание alpha-Syn с цитоплазматической мембраной, увеличивает везикулярную ассоциацию и, тем самым, приводит к большей токсичности белка. Таким образом, более высокая концентрация стерина в цитоплазматической мембране может способствовать предотвращению развития синуклеинопатии. Этот эффект требует дополнительного исследования в связи с широким использованием статинов и их возможным влиянием на мембраносвязывающие белки [162].

Роль PS-содержащих мембран и фактора V(a) в активации протромбина обсуждается в работе [144]. Было обнаружено, что оба фактора примерно одинаково ускоряют процесс, однако PS-содержащие мембраны существенно увеличивают преимущество пути активации через образование одного из интермедиатов, мейзотромбина, при определенной концентрации мембран.

Тау-белок способен образовывать нейрофибриллы и бляшки [163]. Авторы выдвигают предположение, что центрами образования фибрилл и бляшек в клетке, которые способствует такого рода преобразованиям белка, могут быть отрицательно заряженные мембраны.

Способность мембран влиять на функцию белка была изучена для антимикробного полипептида секропина А. Были проверены все стадии процесса взаимодействия – приближение полипептида к мембране, взаимодействие с поверхностью и проникновение в мембрану. Было установлено, что полипептид приобретает хорошо выраженную вторичную структуру на поверхности мембраны, ориентированную параллельно её поверхности. Хотя при погружении в бислой мембраны полипептид несколько увеличивается в размерах, его структура и ориентация остаются неизменными [164].

Взаимодействие гормона амилина с мембраной способствует образованию пре-амилоидных агрегатов, что ведет к формированию амилоидных фибрилл при втором типе диабета [165].

Основной регулятор клеточного роста и метаболизма, а также реорганизации цитоскелета TOR (Ser/Thr kinase target of rapamycin) претерпевает значительные конформационные изменения в присутствии фосфолипидных мембран как в присутствии фосфатидиной кислоты (РА), так и без неё. Нарушение регуляции при передаче TOR-сигналов сказывается на изменении метаболизма и вызывает нейрологические заболевания. Было обнаружено, что при недостатке глюкозы происходит понижение внутриклеточного рН с ~7.5 до ~6, которое может способствовать изменению структуры белков [166].

Во внутриклеточных белках, таких как киназы, обнаружены фосфолипид-связывающие модули, которые играют решающую роль в регуляции многих протеинкиназ, от локализации которых зависит регуляция. Для многих из них мембранная локализация зависит от наличия PS. Используя рентгеноструктурный анализ, для многих модулей были идентифицированы структурно консервативные места связывания с анионными фосфолипидами. При этом киназы связывают другие регуляторы типа септинов, только будучи связанными с мембранной поверхностью. Эти факты важны для понимания дефектов в действии киназ, поскольку это связано с различными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера, рак и аутизм [167].

Важную роль играют липидные домены в поддержании структуры миелина при передаче нервных импульсов. Эти домены контролируют адсорбцию МВР (миелинового основного белка) на мембране и взаимодействие с липидными бислоями миелина, которые находятся в тесном контакте. Это создает условия низкой диэлектрической пос-

тоянной через компактные бислои, что существенно для эффективного прохождения нервного импульса. Любое нарушение структуры миелиновой оболочки и взаимодействий внутри этой системы ведёт к неврологическим заболеваниям, из которых наиболее частым является рассеянный склероз [166–168].

Коротко перечисленные выше примеры показывают, что белок-мембранные взаимодействия очень существенны в возникновении различных заболеваний. Прогресс в этом направлении поможет найти новые пути предотвращения их развития.

НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ

В последние годы возник новый интерес к исследованию лактальбумина в связи с его способностью образовывать комплекс с олеиновой кислотой. Этот молекулярный комплекс способен дважды преодолевать мембранный барьер и разрушать ДНК раковых клеток [107, 169–172]. Лактальбумин формирует комплекс только в бескальциевой форме в частично развернутой конформации типа MG, и его модифицированная форма способна связываться с мембраной, как клеточной, так и митохондриальной.

В последние годы всё большее внимание обращается на то, каково возможное влияние клеточных мембран на белки, находящиеся или функционирующие вблизи от их поверхности. Этот вопрос важен при изучении сворачивания и внедрения в мембрану интегральных мембранных белков [107, 173]. Такие белки внешней мембраны, как OmpA [107] и OmpG [174], синтезируются в виде глобулярных предшественников, которые около мембранной поверхности претерпевают конформационный переход в состояние MG. Затем это изменённое состояние взаимодействует с мембраной, приводя к внедрению в неё уже промежуточной структуры. Однако факторы, влияющие на процесс взаимодействия белков с мембраной, остаются мало изученными.

Взаимодействие белков с мембранами проявляется также при выборе путей доставки белковых веществ в клетку [175]. Мембранные белки продолжают быть мишенями для доставки в клетку лекарств, потому что они обеспечивают взаимодействие между соседними клетками и участвуют в транспорте ионов и веществ через клеточную мембрану.

В литературе имеется тому подтверждение. Мембраны могут оказывать регуляторное действие. Доставка транмиттеров требует слияния синаптической везикулы с плазматической мембраной. Это достигается структурированием под влиянием мембраны неупо-

рядоченного цитоплазматического домена синаптобrevина при Ca^{2+} -зависимом образовании SNARE-комплекса, вызывающего образование четырёхспирального комплекса, объединяющего три компонента SNARE-комплекса (синтаксина 1A, SNAP-25 и синаптобrevина-2) [176–178], где синтаксин и синаптобrevин связаны с мембраной С-концевыми фрагментами. Однако было не вполне понятно, как синтаксин кластеризуется на поверхности мембраны. В работе [179] было установлено, что этому способствуют электростатические взаимодействия с анионным липидом фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатом (PIP₂), который образует обширный кластер, необходимый для сорбции синтаксина. Эта работа фокусирует внимание на том факте, что электростатические взаимодействия между белком и фосфолипидами могут приводить к образованию микродоменов в мембране независимо от других факторов.

Было отмечено, что частично денатурированное состояние кислого фактора роста фибробластов взаимодействует с фосфолипидными мембранами, чего не наблюдается для нативного белка [180].

Имеется ещё один аспект, который необходимо учитывать при анализе изменений в структуре белка при взаимодействии с мембраной, – это целевая доставка белковых веществ (таких как альфа-интерферон, инсулин или гормон роста) в организм при их пероральном приёме. Для успешного решения этой проблемы необходимо учитывать биохимические и физиологические процессы, которые определяют мембранную проницаемость, перенос через желудочно-кишечный тракт, взаимодействие со слизистыми оболочками. Для этого разрабатываются специальные носители, устойчивые к определённому типу воздействий (например, к pH 1.0 в желудке), но обычно это соединения, способные вызвать изменения в структуре белков. Часто внутри этих носителей транспортируемые белки находятся в состоянии, сходном с состоянием их MG в растворе [175]. Чаще всего местом доставки является тонкий кишечник, где условия для белков далеки от нативных. Наличие разветвлённой поверхности мембран [181] и присутствие ароматических желчных кислот создают условия для дестабилизации структуры белков и перехода их в промежуточное состояние. Это создаёт проблему для доставки и сохранения физиологически важных свойств белковых соединений [182–184].

VIII. ВОЗДЕЙСТВИЕ РАЗНЫХ ВИДОВ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАН НА СТРУКТУРУ БЕЛКОВ

В клетке существует большое разнообразие мембран. Они имеют высокодинамичную природу с точки зрения их состава, формы и упаковки [12, 13, 95]. Кроме того, для процессов апоптоза, дифференцировки и развития необходимо иметь возможность уменьшать размеры органелл и создавать их вновь, т.е. клетка в процессе жизнедеятельности использует разные виды мембран в зависимости от ситуационных нужд. С другой стороны, и воздействие разного вида мембран на белки должно быть разным. На рис. 7 схематически представлены наиболее часто встречающиеся виды фосфолипидных мембран, используемых *in vitro*. Это большие бислойные везикулы (LUV), диаметр которых составляет 1000–2000 Å, и как их разновидность гигантские везикулы ещё большего размера. Часто используют малые бислойные везикулы (SUV), размеры которых находятся в пределах 300–500 Å. Образование мицелл возможно в условиях небольших концентраций ФЛ. Эти везикулы позволяют моделировать как плоские мембраны, так и близкие по форме к сфере или закругленной части эллипсоида, наблюдаемые *in vivo*.

Выбор того или иного вида везикул и составляющих их ФЛ *in vitro* определяется той задачей, которую ставят перед собой авторы. Поэтому чаще всего белки исследуются с использованием только одного вида везикул. Однако для двух белков – аромб и Сут с – исследования были проведены в присутствии разного вида ФЛ мембран, и поэтому есть возможность сравнить результаты.

Случай аромб. В работе [61], было показано, что в присутствии SUV (при молярном соотношении ФЛ : Б = 25 : 1) структура аромб претерпевает конформационное изменение при нейтральных значениях pH 7.2 и 6.2. С другой стороны, в работе [138] было обнаружено, что в присутствии LUV (при молярном соотношении ФЛ : Б = 300 : 1) взаимодействие аромб с мембраной происходит только при pH 5.5. Более того, ещё в 1984 году [43] было показано, что стабилизация SUV холестерином замедляет выход гемина в 2 раза. На взаимодействие белок-мембрана также влияет концентрация отрицательно заряженного PG. Эффективность связывания понижается при уменьшении концентрации PG в смешанных везикулах. При этом замедляется скорость взаимодействия мембрана-белок, и заметный эффект вносит также стабильность структуры белка [65]. Дополнительно POPG SUV способны разворачивать нативный аромб и сворачивать развёрнутый мочевиной белок.

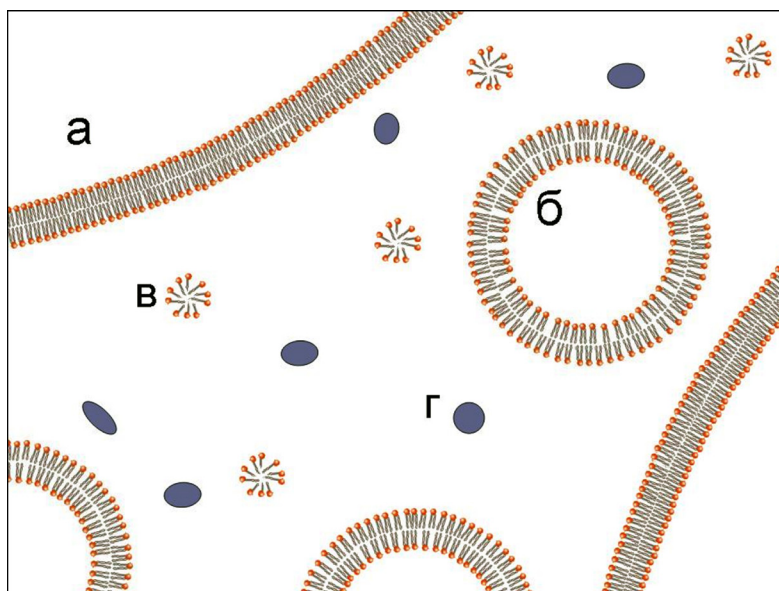


Рис. 7. Разнообразие фосфолипидных мембран.

Представлены (а) фрагменты больших бислоевых мембран (LUV), (б) малых бислоевых мембран (SUV), (в) мицеллы из лизофосфолипидов (Micelles) и (г) разные белки в сопоставимом масштабе.

Разные виды мембран отличаются кривизной, расстоянием между фосфатными головками и доступностью липидной составляющей водной среде.

Случай Cyt *c*. Для этого белка было показано, что малые везикулы (γ -SUV), составленные из POPG и DOPS, способны приводить к денатурации Cyt *c* [152]. Сворачивание apoCyt *c* в присутствии DPPG γ -SUV исследовали методами FTIR и H/D обмена [185, 186]. В присутствии цвиттерионных POPC SUV никакого воздействия мембран на белок выявить не удалось [185]. Однако, если вместо ФЛ были взяты лизоФЛ, то наблюдалось слабое воздействие мембран на белок, приводившее к связыванию и структурированию примерно 60% молекул [185, 186].

Особый случай представляют мицеллы (γ -MIC) из lysoPG. Использование γ -MIC lysoPG приводит к сворачиванию неструктурированного apoCyt *c* в спиральное состояние, достигающего почти 100% спиральности нативного holoCyt *c* в растворе [150, 185, 186]. При этом спирали располагаются перпендикулярно поверхности мембраны. Но что более удивительно, так это тот факт, что методами КД, поглощения в полосе Core и флуоресценции наблюдалась денатурация

стабильного *holoCyt c* в присутствии даже цвиттерионных MIS lysoPC [155], чего не наблюдается для PC-везикул.

Анализируя вышеприведенные данные, можно сказать, что отличие использованных мембран заключается только в упаковке фосфолипидов. В больших везикулах могут быть достаточно плоские участки, где упаковка ФЛ будет плотной, и только фосфатные головки будут экспонированы воде. Поэтому эффект будет зависеть в основном от заряда этих головок, а низкая диэлектрическая проницаемость липидной части будет оказывать незначительный эффект. Другое дело малые везикулы, а ещё значительнее мицеллы. В этих мембранах упаковка ФЛ уже не такая плотная из-за значительной кривизны поверхности. Поэтому влияние гидрофобной части будет более существенным, а это будет усиливать электростатический эффект фосфатных головок. Поэтому денатурирующий эффект будет более значительным, что и наблюдается в приведённых выше примерах.

IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изложенные выше экспериментальные данные достоверно подтверждают гипотезу [3, 94], что мембраны воздействуют на структуру белка благодаря усилению электростатических взаимодействий вблизи её поверхности, а именно, благодаря совместному действию локального понижения рН и диэлектрической проницаемости среды. Это свидетельствует о том, что поверхность мембраны, без сомнения, может служить умеренно денатурирующим агентом в клетке.

Обзор имеющихся в литературе данных и экспериментальных работ авторов указывает на необходимость принимать во внимание возможное влияние или прямое взаимодействие белков и мембран в определенных условиях, когда изучают поведение белков около мембраны или сворачивание мембранных белков или доставку белковых препаратов. Это может быть важным также при выборе путей доставки лекарственных веществ в организме. При анализе этих проблем необходимо обращать внимание на подробные исследования белок-липидных взаимодействий, детально освещенные в недавно опубликованных обзорах [187–189]. Преобразование мембран зависит от их взаимодействия с белками и включает изменение формы клеточных органелл [190], а также деформацию везикул при их транспорте [191–193]. Принимая во внимание роль высокой концентрации белков в клетке, способствующей изменению кривизны мембран, [194, 195], всё вышеизложенное подчеркивает важность вопросов, рассмотренных в настоящем обзоре.

Авторы благодарны Т.Б. Кувшинкиной за помощь в подготовке статьи к печати.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dolgikh, D.A., Gilmanshin, R.I., Brazhnikov, E.V., Bychkova, V.E., Semisotnov, G.V., Venyaminov, S.Yu., and Ptitsyn O.B. (1981) Alpha-lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Lett.*, **136**, 311–315.
2. Dolgikh, D.A., Abaturov, L.V., Bolotina, I.A., Brazhnikov, E.V., Bushuev, V.N., Bychkova, V.E., Gilmanshin, R.I., Lebedev, Yu.O., Semisotnov, G.V., Tiktopulo, E.I., and Ptitsyn O.B. (1985) Compact state of a protein molecule with pronounced small-scale mobility: bovine alpha-lactalbumin, *Eur. Biophys. J.*, **13**, 109–121.
3. Bychkova, V.E., and Ptitsyn, O.B. (1993) The Molten Globule *in vitro* and *in vivo*, *Chemtracts – Biochem. Mol. Biol.*, **4**, 133–163.
4. Бычкова, В.Е., Птицын, О.Б. (1993) Состояние расплавленной глобулы становится скорее правилом, чем исключением, *Биофизика*, **38**, 58–66.
5. Ptitsyn, O.B. (1995) Molten globule and protein folding, *Adv. Protein Chem.*, **47**, 83–229.
6. Endo, T., and Schatz, G. (1988) Latent membrane perturbation activity of a mitochondrial precursor protein is exposed by unfolding, *EMBO J.*, **7**, 1153–1158.
7. Eilers, M., Endo, T., and Schatz, G. (1989) Adriamycin, a drug interacting with acidic phospholipids, blocks import of precursor proteins by isolated yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **264**, 2945–2950.
8. Endo, T., Eilers, M., and Schatz, G. (1989) Binding of a tightly folded artificial mitochondrial precursor protein to the mitochondrial outer-membrane involves a lipid-mediated conformational change, *J. Biol. Chem.*, **264**, 2951–2956.
9. Van der Goot, F.G., Gonzales-Manas, J.M., Lakey, J.H., and Pattus, F. (1991) A molten-globule membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A, *Nature*, **354**, 408–410.
10. Van der Goot, F.G., Lakey, J.H., and Pattus, F. (1992) The molten globule intermediate for protein insertion or translocation through membranes, *Trends Cell Biol.*, **2**, 343–348.
11. Schmitt, S., Prokisch, H., Schlunck, T., Camp II, D.G., Ahting, U., Wai-zenegger, T., Scharfe, C., Meitinger, T., Imhof, A., Neupert, W., Oefner, P.J., and Rapaport, D. (2006) Proteome analysis of mitochondrial outer membrane from *Neurospora crassa*, *Proteomics*, **6**, 72–80.
12. Engelman, D.M. (2005) Membranes are more mosaic, than fluid, *Nature*, **438**, 578–580.
13. Von Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nature Rev./Mol. Cell Biol.*, **9**, 112–124.
14. Ландау, Л.Д., Лившиц, Е.М. (1982) *Теоретическая физика*, **8**, М.: Наука, 60.
15. Eisenberg, M., Gresalfi, T., Riccio, T., and McLaughlin, S. (1979) Absorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids, *Biochemistry*, **18**, 5213–5223.
16. Prats, M., Teissie, J., Toccane, J.F. (1986) Lateral proton conduction at lipid-water interfaces and its implications for the chemiosmotic-coupling hypothesis, *Nature*, **322**, 756–758.
17. Ptitsyn, O.B. (1987) Protein Folding: hypotheses and experiments, *J. Prot. Chem.*, **6**, 273–293.
18. Ptitsyn, O.B. (1992) The molten globule state. In: *Protein Folding*, Ed. T.E. Creighton, New York, 243–299.

19. Скулачев, В.П. (1989) Энергетика биологических мембран, М.: Наука. 564 с.
20. Finkelstein, A.V., and Ptitsyn, O.B. (2002) In *Protein Physics*, Academic Press, An Imprint of Elsevier Science, Amsterdam-Boston-London-New York-Oxford-Paris-San Diego-San Francisco-Singapore-Sydney-Tokyo, pp 1–380.
21. Winitski, A.P., McLaughlin, A.C., McDaniel, R.V., Eisenberg, M., and McLaughlin, S. (1986) An experimental test of the discreteness-of-charge effect in positive and negative lipid bilayers, *Biochemistry*, **25**, 8206–8214.
22. Wilkinson, K.D., and Mayer, A.N. (1986) Alcohol-induced conformational changes of ubiquitin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **250**, 390–399.
23. Dufour, E., Bertrand-Harb, C., and Haertle, T. (1993) Reversible effects of medium dielectric constant on structural transformation of β -lactoglobulin and its retinol binding, *Biopolymers*, **33**, 589–598.
24. Bychkova, V.E., Dujsekina, A.E., Klenin, S.I., Tiktopulo, E.I., Uversky, V.N., and Ptitsyn, O.B. (1996) Molten globule-like state of cytochrome *c* under conditions simulating those near the membrane surface, *Biochemistry*, **35**, 6058–6063.
25. Дюйсекина, А.Е. (1998) Конформации белков в средах с умеренно низкими значениями диэлектрической постоянной и pH, *Диссертация* (Пушино).
26. Poulos T.L., and Mauk A.G. (1983) Models for complexes formed between cytochrome b_5 and subunits of methemoglobin, *J. Biol. Chem.*, **258**, 7369–7373.
27. Livingston, D.J., McLachlan, S.J., La Mar, G.N., and Brown, W.D. (1985) Myoglobin:cytochrome b_5 interactions and the kinetic mechanism of metmyoglobin reductase, *J. Biol. Chem.*, **260**, 15699–15707.
28. Spatz, L., and Strittmatter P. (1971) A form of cytochrome b_5 that contains an additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 1042–1046.
29. Wang, Z.-Q., Wang, Y.-H., Quan, W., Wang, H.-H., Chunyu, L.-J., Xie, Yi, and Huang, Z.-X. (1999) Methanol-induced unfolding and refolding of cytochrome b_5 and its P40V mutant monitored by UV-visible, CD, and fluorescence spectra, *J. Prot. Chem.*, **18**, 547–555.
30. Басова, Л.В. (2004) Исследование влияния мембранной поверхности на конформационное состояние глобулярных белков, *Диссертация* (Пушино).
31. Kamatari, Yu.O., Ohji, S., Konno, T., Seki, Ya., Soda, K., Kataoka, M., and Akasaka, K. (1999) The compact and expanded denatured conformations of apomyoglobin in the methanol-water solvent, *Protein Sci.*, **8**, 873–882.
32. Bychkova, V.E., Dujsekina, A.E., Ptitsyn, O.B., Fantuzzi, A., and Rossi, G.L. (1998) Release of retinol and denaturation of its plasma carrier, retinol-binding protein, *Fold. Des.*, **3**, 285–291.
33. Bychkova, V.E., Berni, R., Rossi, G.L., Kutysenko, V.P., and Ptitsyn, O.B. (1992) Retinol-binding protein is in the molten globule state at low pH, *Biochemistry*, **31**, 7566–7571.
34. Дюйсекина, А.Е., Бычкова, В.Е., Фантуци, А., Росс, Дж.-Л., Птицын, О.Б. (1998) Освобождение гидрофобного лиганда из ретинол-связывающего белка в условиях, моделирующих поле мембраны, *Молекуляр. биология*, **32**, 133–140.
35. Torta, F., Dyuysekina, A.E., Cavazini, D., Fantuzzi, A., Bychkova, V.E., and Rossi, G.L. (2004) Sol-

- vent-induced ligand dissociation and conformational states of Cellular Retinol-Binding Protein Type I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1703**, 21–29.
36. Stockman, B.J., Euvrard, A., and Scahill, T.A. (1993) Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of a partially denatured protein: the A-state of human ubiquitin, *J. Biomol. NMR*, **3**, 285–296.
37. Wang, S.X., Sun, Y.T., and Sui, S.F. (2000) Membrane-induced conformational changes in human apolipoprotein H, *Biochem. J.*, **348 Pt 1**, 103–106.
38. Clement-Collin, V., Leroy, A., Monteilhet, C., and Aggerbeck, L.P. (1999) Mimicking lipid-binding-induced conformational changes in the human apolipoprotein E N-terminal receptor binding domain effects of low pH and propanol, *Eur. J. Biochem.*, **264**, 358–368.
39. Babu, K.R., and Douglas, D.J. (2000) Metanol-Induced conformation of myoglobin at pH 4.0, *Biochemistry*, **39**, 14702–14710.
40. Mozsolits, H., Unabia, S., Ahmad, A., Morton, C.J., Thomas, W.G., and Aguilar, M.I. (2002) Electrostatic and hydrophobic forces tether the proximal region of the angiotensin II receptor (AT1A) carboxyl terminus to anionic lipids, *Biochemistry*, **41**, 7830–7840.
41. Бычкова В.Е. (1997) О функциональной роли ненативных белков, *Успехи биологической химии*, **37**, 49–99.
42. Perutz, M.F. (1989) Myoglobin and haemoglobin: role of distal residues in reactions with haem ligands, *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 42–44.
43. Cannon, J.B., Kuo, F.S., Pasternack, R.F., Wong, N.M., and Muller-Eberhard, U. (1984) Kinetics of the interaction of heme liposomes with heme binding proteins, *Biochemistry*, **23**, 3715–3721.
44. Hughson, F.M., Wright, P.E., Baldwin, R.L. (1990) Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate, *Science*, **249**, 1544–1548.
45. Griko, Yu.V., Privalov, P.L., Venyaminov, S.Yu., and Kutysenko, V.P. (1988) Thermodynamic study of the apomyoglobin structure, *J. Mol. Biol.*, **202**, 127–138.
46. Postnikova, G.B., Komarov, Y.E., and Yumakova E.M. (1991) Fluorescence study of the conformational properties of myoglobin structure. I. pH-Dependent changes of tryptophanyl fluorescence in intact and chemically modified sperm whale apomyoglobins, *Eur. J. Biochem.*, **198**, 223–232.
47. Jennings, P., and Wright, P.E. (1993) Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin, *Science*, **262**, 892–896.
48. Gast, K., Damaschun, H., Misselwitz, R., Mueller-Frohne, M., Zirwer, D., and Damaschun, G. (1994) Compactness of protein molten globules: temperature-induced structural changes of the apomyoglobin folding intermediates, *Eur. Biophys. J.*, **23**, 297–305.
49. Nishii, I., Kataoka, M., and Goto, Y. (1995) Thermodynamic stability of the molten globule states of apomyoglobin, *J. Mol. Biol.*, **250**, 223–238.
50. Постникова Г.Б. (1999) Изучение конформационных переходов в миоглобиновой структуре методом флуоресценции, *Биохимия*, **64**, 326–346.
51. Nishimura, C., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2006) Identification of native and non-native structure in kinetic folding intermediates of apomyoglobin, *J. Mol. Biol.*, **355**, 139–156.

52. Samatova, E.N., Katina, N.S., Balobanov, V.A., Melnik, B.S., Dolgikh, D.A., Bychkova, V.E., and Finkelstein, A.V. (2009) How strong are side chain interactions in the folding intermediate? *Protein Sci.*, **18**, 2152–2159.
53. Samatova, E.N., Melnik, B.S., Balobanov, V.A., Katina, N.S., Dolgikh, D.A., Semisotnov, G.V., Finkelstein, A.V., and Bychkova, V.E. (2010) Folding Intermediate and Folding Nucleus for I/N and U/I/N Transitions in Apomyoglobin: Contributions by Conserved and Nonconserved Residues, *Biophys. J.*, **98**, 1694–1702.
54. Antonini, E., and Brunori, M. (1971) Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands, *Frontiers of Biology*, Eds. Neuberger A., Tatum E.L., Amsterdam–London: North-Holland Publishing Company, **21**, 436 pp.
55. Bismuto, E., Colonna, G., Savy, F., and Irace, G. (1985) Myoglobin structure and regulation of solvent accessibility of heme pocket, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **26**, 195–207.
56. Privalov, P.L., Griko, Yu.V., Venyaminov, S.Yu., and Kutysenko, V.P. (1986) Cold denaturation of myoglobin, *J. Mol. Biol.*, **190**, 487–498.
57. Postnikova, G.B., Komarov, Y.E., and Yumakova, E.M. (1991) Fluorescence study of the conformational properties of myoglobin structure. 2. pH- and ligand-induced conformational changes in ferric- and ferrous myoglobins, *Eur. J. Biochem.*, **198**, 233–239.
58. Griko, Y.V., and Privalov, P.L. (1994) Thermodynamic puzzle of apomyoglobin unfolding, *J. Mol. Biol.*, **235**, 1318–1325.
59. Cocco, M.J., Kao, Y.H., and Lecomte, J.T. (1996) The native state of apomyoglobin described by proton NMR spectroscopy: the A-B-G-H interface of wild-type sperm whale apomyoglobin, *Proteins*, **25**, 267–285.
60. Basova, L.V., Tiktopulo, E.I., Kutysenko, V.P., Klenin, S.I., Balobanov, V.A., Bychkova, V.E. (2014) Membrane-induced changes in the holomyoglobin tertiary structure: interplay with function, *Eur. Biophys. J.*, **43**, 317–329.
61. Басова, Л.В., Тиктопуло, Е.И., Кашпаров, И.А., Бычкова, В.Е. (2004) Конформационное состояние апомиоглобина в присутствии фосфолипидных везикул при нейтральных pH, *Молекулярная биология*, **38**, 323–332.
62. Vassilenko, K.S., and Uversky, V.N. (2002) Native-like secondary structure of molten globules, *Biochim. Biophys. Acta*, **1564**, 168–177.
63. Цветков, В.Н., Кленин, С.И. (1953) Диффузия фракций полистирола в дихлорэтане, *Докл. Акад. Наук СССР*, **88**, 49–52.
64. Privalov, P.L. (1979) Stability of proteins: Small globular proteins, *Adv. Protein Chem.*, **33**, 167–241.
65. Балобанов В.А., Ильина Н.Б., Катина Н.С., Кашпаров И.А., Долгих Д.А., Бычкова В.Е. (2010) Кинетика взаимодействия апомиоглобина с фосфолипидной мембраной, *Молекуляр. биология*, **44**, 708–717.
66. Постникова, Г.Б., Целикова, С.В. (2005) Миоглобин и митохондрии: изучение кинетики отщепления кислорода от оксимиоглобина в растворе митохондрий, *Биофизика*, **50**, 297–306.
67. Постникова, Г.Б., Шеховцова, Е.А. (2013) Влияние искусственных и природных фосфолипидных мембран на скорость автоокисления оксимиоглобина кашалота, *Биохимия*, **78**, 357–363.
68. Funk, W.D., Lo, T.P., Mauk, M.R., Brayer, C.D., MacGillivray, R.T., and Mauk A.G. (1990) Mutagenic, Electrochemical, and Crystallographic

- Investigation of the Cytochrome b_5 Oxidation-Reduction Equilibrium: Involvement of Asparagine-57, Serine-64, and Heme Propionate-7, *Biochemistry*, **29**, 5500–5508.
69. Mitoma, J., and Ito, A. (1992) The Carboxy-terminal 10 amino acid residues of cytochrome b_5 are necessary for its targeting to the endoplasmic reticulum, *EMBO J.*, **11**, 4197–4203.
70. Hultquist, D.E., and Passon, P.G. (1971) Catalysis of methemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome b_5 and cytochrome b_5 reductase, *Nature New Biol.*, **229**, 252–254.
71. Kawano, M., Shirabe, K., Nagai, T., and Takeshita, M. (1998) Role of carboxyl residues surrounding heme of human cytochrome b_5 in the electrostatic interaction with NADH-cytochrome b_5 reductase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**, 666–669.
72. Hildebrandt, A.G., and Estabrook, R.W. (1972) Evidence for the participation of cytochrome b_5 in hepatic microsomal mixed function oxidation reactions, *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**, 66–79.
73. Yamazaki, H., Johnson, W.W., Ueng, Y.-F., Shimada, T., and Guengerich, F.P. (1996) Lack of electron transfer from cytochrome b_5 in stimulation of catalytic activities of cytochrome P450 3A4. Characterization of a reconstituted cytochrome P450 3A4/NADPH-cytochrome P450 reductase system and studies with apocytochrome b_5 , *J. Biol. Chem.*, **271**, 27438–27444.
74. Strittmatter, P., Spatz, L., Corcoran, D., Rogers, M.J., Setlow, B., and Redline, R. (1974) Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4565–4569.
75. Keyes, S.R., and Cinti, D.L. (1980) Biochemical properties of cytochrome b_5 -dependent microsomal fatty acid elongation and identification of products, *J. Biol. Chem.*, **255**, 11357–11364.
76. Kozutsumi, Y., Kawano, T., Yamakawa, T., and Suruki, A. (1998) Participation of cytochrome b_5 in CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylation in mouse liver cytosol, *J. Biochem.*, **108**, 704–706.
77. Livingston, D.J., McLachlan, S.J., La Mar, G.N., and Brown, W.D. (1985) Myoglobin: cytochrome b_5 interactions and the kinetic mechanism of metmyoglobin reductase, *J. Biol. Chem.*, **260**, 15699–15707.
78. Gacon, G., Lostanlen, D., Labie, D., and Kaplan, J.-C. (1980) Interaction between cytochrome b_5 and hemoglobin: Involvement of $\beta 66$ (E10) and $\beta 95$ (FG2) lysyl residues of hemoglobin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1917–1921.
79. Усанов, С.А., Бендзко, П., Пфайль, В., Ениг, Г.-Р., Рукпауль, К. (1983) Роль гидрофобного фрагмента цитохрома b_5 при взаимодействии с цитохромом P-450, *Биорганическая химия*, **9**, 450–461.
80. Mathews, F.S., Levine, M., and Argos, P. (1972) Three-dimensional Fourier synthesis of calf liver Cytochrome b_5 at 2.8 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **64**, 449–464.
81. Veitch, N.C., Concar, D.W., Williams, R.J.P., and Whitford, D. (1988) Investigation of the solution structures and mobility of oxidized and reduced cytochrome b_5 by 2D NMR spectroscopy, *FEBS Lett.*, **238**, 49–55.
82. Whitford, D. (1992) The identification of cation binding domains on the surface of microsomal cytochrome b_5 using ^1H NMR paramagnetic difference spectroscopy, *Eur. J. Biochem.*, **203**, 211–223.
83. Guiles, R.D., Basus, V.J., Kuntz, I., and Waskell, L. (1992) Sequence

- specific ^1H and ^{15}N resonance assignments for both equilibrium forms of the soluble heme binding domain of rat ferrocytochrome b_5 , *Biochemistry*, **31**, 11365–11375.
84. Muskett, F.W., Kelly G.P., and Whitford, D. (1996) The solution structure of bovine ferricytochrome b_5 determined using heteronuclear NMR methods, *J. Mol. Biol.*, **258**, 172–189.
 85. Mauk, A.G., Mauk, M.R., Moore, G.R., and Northrup, S.H. (1995) Experimental and theoretical analysis of the interaction between cytochrome c and cytochrome b_5 , *J. Bioenerg. Biomembr.*, **27**, 311–330.
 86. Stayton, P.S., Fisher, M.T., and Sliagar S.G. (1988) Determination of cytochrome b_5 association reactions. Characterization of metmyoglobin and cytochrome P-450 binding to genetically engineered cytochrome b_5 , *J. Biol. Chem.*, **263**, 13544–13548.
 87. Stayton, P.S., Poulos, T.L., and Sliagar, S.G. (1989) Putidaredoxin competitively inhibits cytochrome b_5 – cytochrome P-450^{cam} association: a proposed molecular model for a cytochrome P-450^{cam} electron-transfer complex, *Biochemistry*, **28**, 8201–8205.
 88. Lederer, F. (1994) The cytochrome b_5 -fold: an adaptable module, *Biochimie*, **76**, 674–692.
 89. Басова, Л.В., Ильина, Н.Б., Василенко, К.С., Тиктопуло, Е.И., Бычкова, В.Е. (2002) Конформационные состояния водорастворимого фрагмента цитохрома b_5 : рН-зависимая денатурация, *Молекулярная биология*, **36**, 891–900.
 90. Acharya, K.R., Ren, J.S., Stuart, D.I., Phillips, D.C., and Fenna, R.E. (1991) Crystal structure of human alpha-lactalbumin at 1.7 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **221**, 571–581.
 91. Kuwajima, K., Nitta, K., Yoneyama, M., and Sugai, S. (1976) Three-state denaturation of alpha-lactalbumin by guanidine chloride, *J. Mol. Biol.*, **106**, 359–373.
 92. Permyakov, E.A., Yarmolenko, V.V., Kalinichenko, L.P., Morozova, L.A., and Burstein, E.A. (1981) Calcium binding to alpha-lactalbumin: structural arrangement and association constant evaluation by means of intrinsic fluorescence changes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 191–197.
 93. Chenal, A., Vernier, G., Savarin, P., Bushmarina, N.A., Geze, A., Guillain, F., Gillet, D., and Forge, V. (2005) Conformational states and thermodynamics of alpha-lactalbumin bound to membranes: a case study of the effects of pH, calcium, lipid membrane curvature and charge, *J. Mol. Biol.*, **349**, 890–905.
 94. Bychkova, V.E., Pain, R.H., and Ptitsyn, O.B. (1988) The «molten globule» state is involved in the translocation of proteins across membranes? *FEBS Lett.*, **238**, 231–234.
 95. Bigay, J., and Bruno, A. (2012) Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: Defining cellular territories in determining specificity, *Dev. Cell*, **23**, 886–895.
 96. Eilers, M., and Schatz, G. (1986) Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria, *Nature*, **322**, 228–232.
 97. Eilers, M., and Schatz, G. (1988) Protein unfolding and energetics of protein translocation across biological membranes, *Cell*, **52**, 481–483.
 98. Vestweber, D., and Schatz, G. (1988-1) Point mutations destabilizing a precursor protein enhance its post-translational import into mitochondria, *EMBO J.*, **7**, 1147–1151.
 99. Glick, B., and Schatz, G. (1991) Import of proteins into mitochondria, *Annu. Rev. Genet.*, **25**, 21–44.

100. Vestweber, D., and Schatz, G. (1988-2) A chimeric mitochondrial precursor protein with internal disulfide bridges blocks import of authentic precursors into mitochondria and allows quantitation of import sites, *J. Cell Biol.*, **107**, 2037–2043.
101. Eilers, M., Hwang, S., and Schatz, G. (1988) Unfolding and refolding of a purified precursor protein during import into isolated mitochondria, *EMBO J.*, **7**, 1139–1145.
102. Huang, S., Murphy, S., and Matouschek, A. (2000) Effect of the protein import machinery at the mitochondrial surface on precursor stability, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12991–12996.
103. Hay, R., Böhni, P., and Gasser, S. (1984) How mitochondria import proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **779**, 65–87.
104. Randall, L.L., and Hardy, S.J.S. (1986) Correlation of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species. A study in vivo of maltose-binding protein from *Escherichia coli*, *Cell*, **46**, 921–928.
105. Verner, K., and Schatz, G. (1988) Protein translocation across membranes, *Science*, **241**, 1307–1313.
106. Bochkareva, E.S., Lissin, N.M., and Girshovich, A.S. (1988) Transient association of newly synthesized unfolded proteins with the heat-shock GroEL protein, *Nature*, **336**, 254–257.
107. Kleinschmidt, J.H., and Tamm, L.K. (1996) Folding intermediates of a beta-barrel membrane protein. Kinetic evidence for a multi-step membrane insertion mechanism, *Biochemistry*, **35**, 12993–13000.
108. Booth, P.J., and Curnow, P. (2009) Folding scene investigation: membrane proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 8–13.
109. Schwartz, M.P., and Matouschek, A. (1999) The dimensions of the protein import channels in the outer and inner mitochondrial membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13086–13090.
110. Diekert, K., de Kroon, A.I.P.M., Ahting, U., Niggemeyer, B., Neupert, W., de Kruijff, B., and Lill, R. (2001) Apocytochrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane, *EMBO J.*, **20**, 5626–5635.
111. Prakash, S., and Matouschek, A. (2004) Protein unfolding in the cell, *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 593–600.
112. Bolliger, L., Junne, T., Schatz, G., and Lithgow, T. (1995) Acidic receptor domains on both sides of the outer membrane mediate translocation of precursor proteins into yeast mitochondria, *EMBO J.*, **14**, 6318–6326.
113. Huang, S., Ratliff, K.S., and Matouschek, A. (2002) Protein unfolding by the mitochondrial membrane potential, *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 301–307.
114. Cavard, D., Sauve, P., Heitz, F., Pattus, F., Martinez, C., Dijkman, R., and Lazdunski, C. (1988) Hydrodynamic properties of colicin A. Existence of a high-affinity lipid-binding site and oligomerization at acid pH, *Eur. J. Biochem.*, **172**, 507–512.
115. Muga, A., Gonzalez-Manas, J.M., Lakey, J.H., Pattus, F., and Surewicz, W.K. (1993) pH-dependent stability and membrane interaction of the pore-forming domain of colicin A, *J. Biol. Chem.*, **268**, 1553–1557.
116. Lakey, J.H., Gonzalez-Manas, J.M., van der Goot, F.G., and Pattus, F. (1992) The membrane insertion of colicins, *FEBS Lett.*, **307**, 26–29.
117. Parker, M.W., Tucker, A.D., Tsernoglou, D., and Pattus, F. (1990) Insights into membrane insertion based on studies of colicins, *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 126–129.

118. Anderluh, G., and Lakey, J.H. (2008) Disparate proteins use similar architectures to damage membranes, *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 482–490.
119. Merrill, A.R., Cohen, F.S., and Cramer, W.A. (1990) On the nature of the structural change of the colicin-E1 channel peptide necessary for its translocation competent state, *Biochemistry*, **29**, 5829–5836.
120. Li, J.D., Carroll, J., and Ellar, D.J. (1991) Crystal-structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus Thuringiensis* at 2.5-Å resolution, *Nature*, **353**, 815–821.
121. Zhao, J.-M., and London, E. (1988) Conformation and model membrane interactions of Diphtheria toxin fragment A, *J. Biol. Chem.*, **263**, 15369–15377.
122. London, E. (1992) Diphtheria-toxin: membrane interaction and membrane translocation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1113**, 25–51.
123. Jiang, J.X., Abrams, F.S., and London, E.I. (1991) Folding changes in membrane-inserted Diphtheria toxin that may play important roles in its translocation, *Biochemistry*, **30**, 3857–3864.
124. Cabiaux, V., Brasseur, R., Wattiez, R., Falmagne, P., Ruysschart, J.-M., and Goormaghtigh, E. (1989) Secondary structure of Diphtheria-toxin and its fragments interacting with acidic liposomes studied by polarized infrared-spectroscopy, *J. Biol. Chem.*, **264**, 4928–4938.
125. Allured, V.S., Collier, R.J., Carroll, S.F., and McKay, D.B. (1986) Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1320–1324.
126. Tsurudome, M., Gluck, R., Graf, R., Falchetto, R., Schaller, U., and Brunner, J. (1992) Lipid interactions of the hemagglutinin HA2 NH2-terminal segment during influenza virus-induced membrane-fusion, *J. Biol. Chem.*, **267**, 20225–20232.
127. Chenal, A., Prongidi-Fix, L., Perrier, A., Aisenbrey, C., Vernier, G., Lambotte, S., Haertlein, M., Dauvergne, M.T., Fragneto, G., Bechinger, B., Gillet, D., Forge, V., and Ferrand, M. (2009) Deciphering membrane insertion of the diphtheria toxin T domain by specular neutron reflectometry and solid-state NMR spectroscopy, *J. Mol. Biol.*, **391**, 872–883.
128. Day, P.J., Pinheiro, T.J.T, Roberts, L.M., and Lord, J.M. (2002) Binding of ricin A-chain to negatively charged phospholipids vesicles leads to protein structural changes and destabilizes the lipid bilayer, *Biochemistry*, **41**, 2836–2843.
129. Mayerhofer, P.U., Cook, J.P., Wahlman, J., Pinheiro, T.J.T., Moore, K.A.H., Lord, J.M., Johnson, A.E., and Roberts, L.M. (2009) Ricin A chain insertion into Endoplasmic reticulum membranes is triggered by a temperature increase to 37°C, *J. Biol. Chem.*, **284**, 10232–10242.
130. Vecsey-Semjen, B., Moellby, R., and van der Goot, F.G. (1996) Partial C-terminal unfolding is required for channel formation by Staphylococcal α -toxin, *J. Biol. Chem.*, **271**, 8655–8660.
131. Karst, J.C., Baker, R., Devi, U., Swann, M.J., Davi, M., Roser, S.J., Ladant, D., and Chenal, A. (2012) Identification of a region that assists membrane insertion and translocation of the catalytic domain of *Bordetella pertussis* CyaA toxin, *J. Biol. Chem.*, **287**, 9200–9212.
132. Massey, S., Banerjee, T., Pande, A.H., Taylor, M., Tatulian, S.A., and Teter, K. (2009) Stabilization of the tertiary structure of the Cholera toxin A1 subunit inhibits toxin dislocation and cellular intoxication, *J. Mol. Biol.*, **393**, 1083–1096.

133. Taylor, M., Banerjee, T., Navarro-Garcia, F., Huerta, J., Massey, S., Burlingame, M., Pande, A.H., Tatulian, S.A., and Teter, K. (2011) A therapeutic chemical chaperone inhibits cholera intoxication and unfolding/translocation of the cholera toxin A1 subunit, *PLoS One*, **6**, e18825, doi: 10.1371/journal.pone.0018825.
134. Pande, A.H., Moe, D., Jamnadas, M., Tatulian, S.A., and Teter, K. (2006) The Pertussis toxin S1 is a thermally unstable protein susceptible to degradation by the 20S proteasome, *Biochemistry*, **45**, 13734–13740.
135. Pande, A.H., Scaglione, P., Taylor, M., Nemeč, K.N., Tulhill, S., Moe, D., Holmes, R.K., Tatulian, S.A., and Teter, K. (2007) Conformational instability of the cholera toxin A1 polypeptide, *J. Mol. Biol.*, **374**, 1114–1128.
136. Lesovoy, D.M., Bocharov, E.V., Lyukmanova, E.N., Kosinsky, Y.A., Shulepko, M.A., Dolgikh, D.A., Kirpichnikov, M.P., Efremov, R.G., and Arseniev, A.S. (2009) Specific membrane binding of neurotoxin II can facilitate its delivery to acetylcholine receptor, *Biophys. J.*, **97**, 2089–2097.
137. Dubovskii, P.V., Lesovoy, D.M., Dubinnyi, M.A., Utkin, Y.N., and Arseniev, A.S. (2003) Interaction of the P-type cardiotoxin with phospholipid membranes, *Eur. J. Biochem.*, **270**, 2038–2046.
138. Kim, J.G., and Kim, H.M. (1989) Interaction of alpha-lactalbumin with phospholipid vesicles as studied by photoactivated hydrophobic labeling, *Biochim. Biophys. Acta*, **983**, 1–8.
139. Halskau, O., Froystein, N.G., Muga, A., and Martinez, A. (2002) The membrane-bound conformational of α -lactalbumin studied by NMR-monitored ^1H -exchange, *J. Mol. Biol.*, **321**, 99–110.
140. Vernier, G., Chenal, A., Vitrac, H., Barumandzadhe, R., Montagner, C., and Forge, V. (2007) Interactions of apomyoglobin with membranes: Mechanism and effects on heme uptake, *Protein Sci.*, **16**, 391–400.
141. Ahn, T., Kim, J.-S., Lee, B.-C., and Yun, C.-H. (2001) Effects of lipids on the interaction of SecA with model membranes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **359**, 14–20.
142. Pande, A.H., Tripathy, R.K., and Narkar, S.A. (2009) Membrane surface charge modulates lipoprotein complex forming capability of peptides derived from the C-terminal domain of apolipoprotein E, *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 1366–1376.
143. Thorolfsson, M., Doskeland, A.P., Muga, A., and Martinez, A. (2002) The binding of tyrosine hydroxylase to anionic lipid bilayers involves the N-terminal region of the enzyme, *FEBS Lett.*, **519**, 221–226.
144. Weinreb, G.E., Mukhopadhyay, K., Majumder, R., and Lentz, B.R. (2003) Cooperative roles of factor V(a) and phosphatidylserine-containing membranes as cofactors in prothrombin activation, *J. Biol. Chem.*, **278**, 5679–5684.
145. Shin, I., Kreimer, D., Silman, I., and Weiner, L. (1997) Membrane-promoted unfolding of acetylcholinesterase: a possible mechanism for insertion into the lipid bilayer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2848–2852.
146. Shin, I., Silman, I., Bon, C., and Weiner, L. (1998) Liposome-catalyzed unfolding of acetylcholinesterase from *Bungarus fasciatus*, *Biochemistry*, **37**, 4310–4316.
147. Shin, I., Wachtel, E., Roth, E., Bon, C., Silman, I., and Weiner, L. (2002) Thermal denaturation of *Bungarus fasciatus* acetylcholinesterase: Is aggregation a driving force in protein unfolding? *Protein Sci.*, **11**, 2022–2032.

148. Wang, Y., Grabowski, G.A., and Qi, X. (2003) Phospholipid vesicle fusion induced by saposin C, *Arch. Biochem. Biophys.*, **415**, 43–53.
149. Seddon, A.M., Lorch, M., Ces, O., Templer, R.H., Macrae, F., and Booth, P.J. (2008) Phosphatidylglycerol lipids enhance folding of an alpha helical membrane protein, *J. Mol. Biol.*, **380**, 548–556.
150. Lin, W.-C., Iversen, L., Tu, H.-L., Rhodes, C., Christensen, S.M., Iwing, J.S., Hansen, S.D., Huang, W.Y.C., and Groves, J.T. (2014) H-Ras forms dimers on membrane surfaces via a protein-protein interface, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 2996–3001.
151. Faini, M., Beck, R., Wieland, F.T., and Briggs, J.A.G. (2013) Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly, *Trends Cell Biol.*, **23**, 279–288.
152. De Jongh, H.H.J., Killian, J.A., and de Kruijff B. (1992) A water-lipid interface induces a highly dynamic folded state in apo-cytochrome c and cytochrome c, which may represent a common folding intermediate, *Biochemistry*, **31**, 1636–1643.
153. Pinheiro, T.J.T., and Watts, A. (1994) Resolution of individual lipids in mixed phospholipids membranes and specific lipid-cytochrome c interactions by magic-angle spinning solid-state phosphorus-31 NMR, *Biochemistry*, **33**, 2459–2467.
154. Pinheiro, T.J.T., Elove, G.A., Watts, A., and Roder, H. (1997) Structural and kinetic description of cytochrome c unfolding induced by the interaction with lipid vesicles, *Biochemistry*, **36**, 13122–13132.
155. Bryson, E.A., Rankin, S.E., Carey, M., Watts, A., and Pinheiro, T.J.T. (1999) Folding of apocytochrome c in lipid micelles: formation of alpha-helix precedes membrane insertion, *Biochemistry*, **38**, 9758–9767.
156. Rankin, S.E., Watts, A., Roder, H., and Pinheiro, T.J.T. (1999) Folding of apocytochrome c induced by the interaction with negatively charged lipid micelles proceeds via a collapsed intermediate state, *Protein Sci.*, **8**, 381–393.
157. Sanghera, N., and Pinheiro, T.J.T. (2000) Unfolding and refolding of cytochrome c driven by the interaction with lipid micelles, *Protein Sci.*, **9**, 1194–1202.
158. Pinheiro, T.J.T., Cheng, H., Seeholzer, S.H., and Roder, H. (2000) Direct evidence for the cooperative unfolding of cytochrome c in lipid membranes from H-2H exchange kinetics, *J. Mol. Biol.*, **303**, 617–626.
159. Sanghera, N., and Pinheiro, T.J.T. (2002) Binding of prion protein to lipid membranes and implications for prion conversion, *J. Mol. Biol.*, **315**, 1241–1256.
160. Critchley, P., Kazlauskaitė, J., Eason, R., and Pinheiro, T.J.T. (2004) Binding of prion proteins to lipid membranes, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **313**, 559–567.
161. Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F., and George, J.M. (1998) Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes, *J. Biol. Chem.*, **273**, 9443–9449.
162. Valastyan, J.S., Termine, D.J., and Lindquist, S. (2014) Splice isoform and pharmacological studies reveal that sterol depletion relocolizes alpha-synuclein and enhances its toxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 3014–3019.
163. Chirita, C.N., Necula, M., and Kuret, J. (2003) Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization in vitro, *J. Biol. Chem.*, **278**, 25644–25650.
164. Silvestro, L., and Axelsen, P.H. (2000) Membrane-induced folding of cecropin A, *Biophys. J.*, **79**, 1465–1477.

165. Hebda, J.A., Magzoub, M., and Miranker, A.D. (2014) Small molecule screening in context: Lipid-catalyzed amyloid formation, *Protein Sci.*, **23**, 1341–1348, doi: 10.1002/pro.2518.
166. Rodriguez Camargo, D.C., Link, M.N., and Dames, S.A. (2012) The FKBP-Rapamycin binding domain of human TOR undergoes strong conformational changes in the presence of membrane mimetics with and without the regulator phosphatidic acid, *Biochemistry*, **51**, 4909–4921.
167. Moravcevic, K., Mendrola, J.M., Schmitz, K.R., Wang, Y.-H., Slochower, D., Janmey, P.A., and Lemmon, M.A. (2010) Kinase associated-1 domains drive MARK/PAR1 kinases to membrane targets by binding acidic phospholipids, *Cell*, **143**, 966–977.
168. Lee, D.W., Banquy, X., Kristiansen, K., Kaufman, Y., Boggs, J.M., and Israelachvili, J.N. (2014) Lipid domains control myelin basic protein adsorption and membrane interactions between model myelin lipid bilayers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E768–E775.
169. Kohler, C., Gogvadze, V., Hakanson, A., Svanborg, C., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2001) A folding variant of human alpha-lactalbumin induces mitochondrial permeability transition in isolated mitochondria, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 186–191.
170. Svensson, M., Fast, J., Mossberg, A.K., Dueringer, C., Gustafsson, L., Hallgren, O., Brooks, C.L., Berliner, L., Linse, S., and Svanborg, C. (2003) Alpha-lactalbumin unfolding is not sufficient to cause apoptosis, but is required for the conversion to HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells), *Protein Sci.*, **12**, 2794–2804.
171. Hallgren, O., Aits, S., Brest, P., Gustafsson, L., Mossberg, A.K., Wullt, B., and Svanborg, C. (2008) Apoptosis and tumor cell death in response to HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells), *Adv. Exp. Med. Biol.*, **606**, 217–240.
172. Pettersson-Kastberg, J., Mossberg, A.K., Trulsson, M., Yong, Y.J., Min, S., Lim, Y., O'Brien, J.E., Svanborg, C., and Mok, K.H. (2009) alpha-lactalbumin, engineered to be nonnative and inactive, kills tumor cells when in complex with oleic acid: a new biological function resulting from partial unfolding, *J. Mol. Biol.*, **394**, 994–1010.
173. Booth, P.J., and Curnow, P. (2009) Folding scene investigation: membrane proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **19**, 8–13.
174. Liang, B., and Tamm, L.K. (2007) Structure of outer membrane protein G by solution NMR spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 16140–16145.
175. Milstein, S.J., Leipold, H., Sarubbi, D., Leone-Bay, A., Mlynek, G.M., Robinson, J.R., Kasimova, M., and Freire, E. (1998) Partially unfolded proteins efficiently penetrate cell membranes – implications for oral drug delivery, *J. Control. Release*, **53**, 259–267.
176. Kweon, D.-H., Kim, C.S., and Shin, Y.-K. (2003) Regulation of neuronal SNARE assembly by membrane, *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 440–447.
177. Bowen, M., and Brunger, A.T. (2006) Conformation of the synaptobrevin transmembrane domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 8378–8383.
178. Ellena, J.F., Liang, B., Wiktor, M., Stein, A., Cafiso, D.S., Jahn, R., and Tamm L.K. (2009) Dynamic structure of lipid-bound synaptobrevin suggests a nucleation-propagation mechanism for trans-SNARE complex formation,

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 20306–20311.
179. van den Bogaart, G., Meyenberg, K., Risselada, H.J., Amin, H., Willig, K.I., Hubrich, B.E., Dier, M., Hell, S.W., Grubmueller, H., Diederichsen, U., and Jahn, R. (2011) Membrane protein sequestering by ionic protein-lipid interactions, *Nature*, **479**, 552–555.
 180. Mach, H., and Middaugh, C.R. (1995) Interaction of partially structured states of acidic fibroblast growth factor with phosphor-lipid membranes, *Biochemistry*, **34**, 9913–9920.
 181. Уголев, А.М. (1967) Физиология и патология пристеночного (контактного) пищеварения, Л. Наука, 231 с.
 182. Stroll, B.R., Leipold, H.R., Milstein, S., and Edwards, D.A. (2000) A mechanistic analysis of carrier-mediated oral delivery of protein therapeutics, *J. Control. Release*, **64**, 217–228.
 183. Lennernas, H. (2007) Modelling gastrointestinal drug absorption requires more *in vivo* biopharmaceutical data: experience from *in vivo* dissolution and permeability studies in humans, *Curr. Drug Metab.*, **8**, 645–657.
 184. Wawrezynieck, A., Pean, J.M., Wuethrich, P., and Benoit, J.P. (2008) Oral bioavailability and drug/carrier particulate systems, *Med. Sci. (Paris)*, **24**, 659–664.
 185. Rankin, S.E., Watts, A., and Pinheiro, T.J. (1998) Electrostatic and hydrophobic contributions to the folding mechanism of apocytochrome c driven by the interactions with lipid, *Biochemistry*, **37**, 12588–12595.
 186. Bryson, E.A., Rankin, S.E., Goormaghtigh, E., Ruysschaert, J.M., Watts, A., and Pinheiro, T.J. (2000) Structure and dynamics of lipid-associated states of apocytochrome c, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1390–1396.
 187. McLaughlin, S., and Murray, D. (2005) Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics, *Nature*, **438**, 605–611.
 188. Li, L., Shi, X., Guo, X., Li, H., and Xu, C. (2014) Ionic protein-lipid interactions at plasma membrane: what can the charge do? *Trends Biochem. Sci.*, **39**, 130–140.
 189. Derganc, J., Antonny, B., and Copic, A. (2013) Membrane bending: the power of protein imbalance. *Trends Biochem. Sci.*, **38**, 576–584.
 190. Shibata, Y., Hu, J., Kozlov, M.M., and Rapoport, T.A. (2009) Mechanism shaping the membranes of cellular organelles, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **25**, 329–354.
 191. Zimmerberg, J., and Kozlov, M.M. (2006) How proteins produce cellular membrane curvature, *Nature Rev./Mol. Cell Biol.*, **7**, 9–19.
 192. Sens, P., Johannes, L., and Bassereau, P. (2008) Biophysical approaches to protein-induced membrane deformations in trafficking, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **20**, 476–482.
 193. Copic, A., Latham, C.F., Horlbeck, M.A., D'Arcangelo, J.G., and Miller, E.A. (2012) ER cargo properties specify a requirement for COPII coat rigidity mediated by Sec 13p, *Science*, **335**, 1359–1362.
 194. Leventis, R., and Silvius, J.R. (2010) Quantitative experimental assessment of macromolecular crowding effects at membrane surfaces, *Biophys. J.*, **99**, 2125–2133.
 195. Stachowiak, J.C., Hayden, C.C., and Sasaki, D.Y. (2010) Steric confinement of proteins on lipid membranes can drive curvature and tubulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7781–7786.