

## СТРУКТУРНО–ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

© 2001 г. С. В. ГРИНШТЕЙН, О. А. КОСТ

*Химический факультет Московского государственного  
университета им. М.В.Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Структура и функции биомембран. III. Способы связывания белков с мембраной. IV. Особенности функционирования мембранных ферментов. V. Модельные мембранные системы, используемые для реконструкции мембранных ферментов. VI. Особенности поведения ферментов в тройных системах ПАВ-вода-органический растворитель. VII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время очевидно, что мембранные ферменты функционируют в составе биомембран в виде сложных надмолекулярных ансамблей, что может приводить к проявлению ими особых свойств, не реализующихся в гомогенных водных растворах. Многие ферменты плазматических мембран животных клеток способны переходить из мембраносвязанной формы в растворимую. Изменение способности белков к связыванию с мембраной может сопровождаться существенным изменением особенностей строения и функционирования мембрано-связанных ферментов. В этой области мембранологии в последние годы получено много интересных результатов и, наиболее важные из них мы постарались отразить в этом обзоре. Обобщены сведения о свойствах мембранных белков различных классов,

---

*Принятые сокращения:* АПФ — ангиотензин-превращающий фермент (пептидил-дипептидаза А, КФ 3.4.15.1); р-форма — растворимая форма фермента (без якоря); м-форма — мембранная форма фермента (с якорем); ПАВ — поверхностно-активное вещество; АОТ — натриевая соль ди-(2-этил)гексилового эфира сульфоянтарной кислоты (аэрозоль ОТ);  $w_0$  —  $[H_2O]/[AOT]$ , степень гидратации АОТ (ПАВ); а.о. — аминокислотный остаток; ФХ — фосфатидилхолин; ФЭ — фосфатидилэтаноламин; TNF- $\alpha$  — фактор некроза опухолей; GPI — фосфатидилинозитольный гликолипид.

*Адрес для корреспонденции:* e-mail: kost@enzyme.chem.msu.ru

функционирующих в составе биологических мембран и различных модельных мембранных систем. Представлены собственные и литературные данные, касающиеся свойств соматического ангиотензин-превращающего фермента (АПФ, 200 кДа) — физиологически важного гликопротеина [35], участвующего в регуляции кровяного давления и водно-солевого обмена в организме человека и животных [6, 78].

## II. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ БИОМЕМБРАН

Биомембраны характеризуются чрезвычайным разнообразием и способны не только отделять содержимое клетки от внешней среды и обеспечивать разделение внутреннего объема клетки на компартменты, но и участвовать в регуляции множества процессов [1, 2, 37, 49]. Например, плазматические мембраны обеспечивают диффузионный барьер, активный транспорт, электрическую возбудимость, межклеточную коммуникацию, гормональный и иммунный ответы и др. На мембранах эндоплазматической сети происходит синтез белков, жиров и углеводов. Мембраны нервных клеток способны передавать импульсы в форме изменения электрического потенциала и т.д. Уникальность функций каждой мембраны в значительной степени определяется свойствами мембранных белков, входящих в ее состав.

Белки — разнообразные ферменты, транспортные белки, рецепторы, поры, каналы и др. — вносят существенный вклад в формирование структуры клеточных мембран [1, 2, 37]. Среднее содержание белков в мембранах составляет примерно 60% (по массе сухого вещества), при этом в состав биомембран также входят липиды — 30% и углеводы — 10% [1]. Естественно, соотношение между этими компонентами может значительно меняться в зависимости от природы мембран. Так, содержание белков в мембранах может варьировать от 20% в миелине до 80% в митохондриях [2]. Липиды — фосфолипиды, гликолипиды, холестерин — составляют костяк мембраны и ответственны за целостность мембранной структуры. Углеводы обнаруживаются в составе мембранных белков (гликопротеинов и протеогликанов) или липидов (гликолипидов) [1, 2]. Кроме того, в мембранах содержится относительно большое количество (~30%) связанной невымерзающей воды.

Несмотря на многообразие биомембран основные принципы структурной организации всех мембран животного, растительного и бактериального происхождения одинаковы. Согласно получившей широкое признание «жидкостно-мозаичной» модели, первоначально предложенной в 1972 году Сингером и Николсоном [71], биомембрана представляется как текучий фосфолипидный бислой, в который погружены белки (рис. 1 а). Впоследствии стало, однако, очевидным,

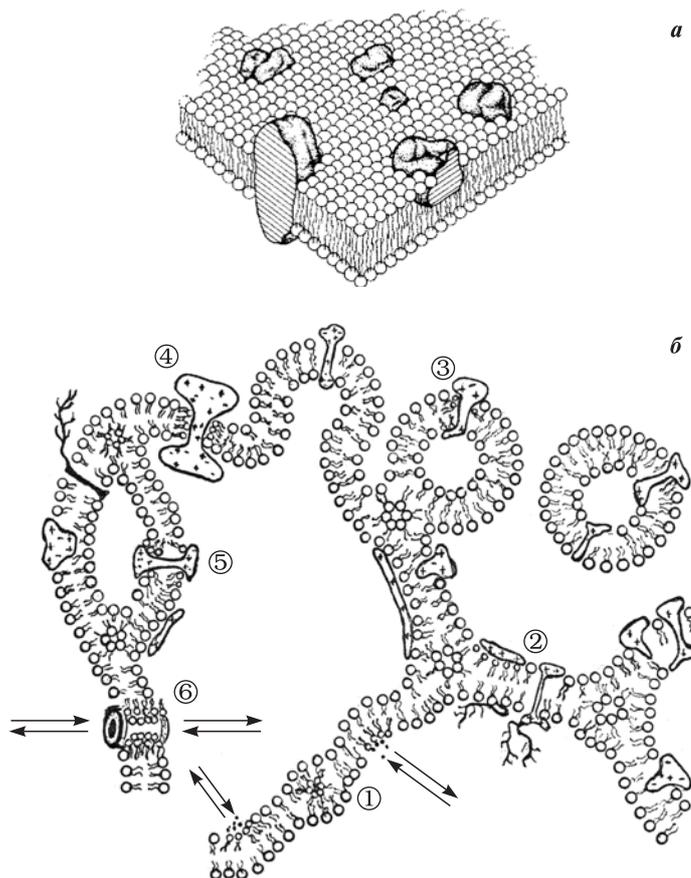


Рис. 1. Модели структурной организации биологических мембран.

(а) — «жидкостно-мозаичная» модель [71], в рамках которой мембрана представляется как текучий фосфолипидный бислой, в который погружены свободно диффундирующие белки.

(б) — «метаморфно-мозаичная» модель [49], включающая в себя следующие процессы:

1. Трансмембранный перенос полярных молекул и ионов ( $\text{Ca}^{2+}$  и т.д.), связанный с возникновением промежуточных образований типа обращенных мицелл;
2. Сочленение мембран друг с другом;
3. Слияние мембран и экзоцитоз;
4. Трансмембранный перенос белка;
5. Компартиментализация в протяженных мембранных системах;
6. Образование пор в мембране.

что молекулярная организация мембран гораздо сложнее, чем это следует из жидкомозаичной модели. В частности, показано, что не все мембранные белки свободно диффундируют в жидком липидном бислое [2, 37]. Некоторые участки мембран отличаются по своей структуре от классического липидного бислоя вследствие липидного полиморфизма. В пределах одной мембраны могут соседствовать участки с разным липидным составом и функциями [34, 49, 60]. В настоящее время считают, что сложная динамическая структура биомембран, для которой характерны искривления, фазовые переходы, вариации толщины, образование небислойных структур, определяется специфическими взаимодействиями мембранных белков с липидами [34, 37, 60]. Такие взаимодействия во многом обеспечивают эффективное выполнение мембранами разнообразных клеточных функций, возникающих в ходе метаболизма. Проиллюстрировать динамические свойства биомембран можно на примере «метаморфно-мозаичной» модели [49], включающей в себя основные мембранные процессы (рис. 1 б).

### III. СПОСОБЫ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКОВ С МЕМБРАНОЙ

Белковая молекула может фиксироваться в бислое с помощью различных типов взаимодействий, включая электростатические (на уровне полярных головок липидов) и гидрофобные (в толще бислоя).

Мембранные белки подразделяют на два типа: периферические и интегральные. Периферические белки отличаются от интегральных меньшей глубиной проникновения в бислою и степенью воздействия на состояние и подвижность углеводородных цепей липидов.

Периферическими называют белки, легко вымываемые из мембран растворами солей или даже дистиллированной водой. Такие белки способны обратимо связываться с бислоем и часто совершают челночные перемещения между мембраной и ее окружением. Некоторые из этих белков связываются непосредственно (или через посредника, в частности,  $\text{Ca}^{2+}$ ) с заряженными группами липидов мембран за счет электростатических взаимодействий (рис. 2 а). В качестве примеров можно привести миелиновый основной белок [29], спектрин [56], протеинкиназу С [63], фосфолипазы [75]. Следует отметить предпочтительное связывание таких белков с мембранами определенного липидного состава, так, например, для фосфолипазы  $\text{A}_2$  критичным является присутствие в мембране фосфатидилхолиновых липидов [75], а для протеинкиназы С — фосфатидилсериновых [63]. В то же время эти белки могут взаимодействовать с ближней гидрофобной областью бислоя [37, 60]. Существует также ряд белков, адсорбирую-

щихся на мембранных гликолипидах и гликопротеинах посредством углевод-белкового и/или белок-белкового взаимодействия (рис. 2 б) [2, 13, 33]. Этот тип взаимодействий реализуется, например, при связывании  $F_1$ -части  $H^+$ -АТФазы с погруженной в мембрану  $F_0$ -частью [68].

Вторая группа мембранных белков — интегральные, которые связаны с мембраной за счет более прочных гидрофобных взаимодействий. Интегральные белки можно извлечь из мембраны только при разрушении липидного бислоя детергентами или органическими растворителями. Такие белки можно подразделить на внутренние трансмембранные (рис. 2 в и г) и наружные, имеющие гидрофобный якорь (рис. 2 д–ж).

Основная функционально значимая часть молекулы внутреннего трансмембранного белка при встраивании практически полностью погружается в мембрану. Трансмембранные белки различаются числом полипептидных участков, пересекающих бислой, и могут содержать один (рис. 2 в), как, например, в случае гликофорина [74], или несколько (рис. 2 г) таких участков, что характерно для АТФаз [68], бактериородопсина [31], родопсина [17] и др. Эти участки, как правило, целиком построены из гидрофобных аминокислот и часто имеют  $\alpha$ -спиральную конфигурацию [1, 2].

Многие интегральные белки животного происхождения связываются с плазматическими мембранами клеток за счет гидрофобного якоря, при этом большая часть молекулы глико-

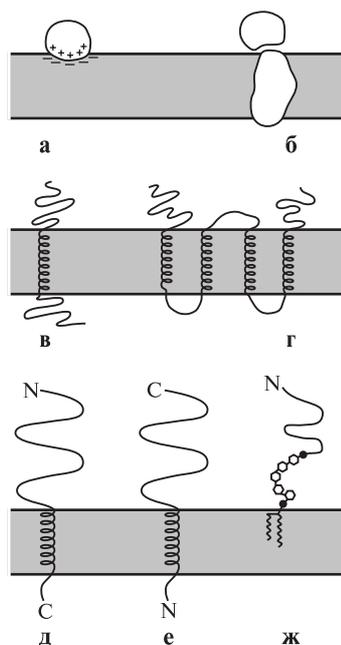


Рис. 2. Классификация мембранных белков по типу связывания с мембраной.

*Периферические белки:* (а) электростатическое связывание с бислоем, (б) связывание с другими «якорными» белками.

*Интегральные трансмембранные белки:* (в) единственное и (г) множественные пересечения мембраны.

*Интегральные мембранные белки, имеющие гидрофобный якорь:* (д) I тип — белок обладает C-концевым пептидным якорем, (е) II тип — белок содержит N-концевой якорь, (ж) в качестве гидрофобного якоря выступает фосфатидилинозитольный гликолипид (GPI).

зилирована и локализуется с наружной стороны мембраны [1, 2, 37]. Некоторые из этих белков крепятся к мембране посредством ковалентно связанного гликозил-фосфатидилинозитольного (GPI) якоря (рис. 2 ж). Подобный способ связывания реализуется в случае щелочной фосфатазы, 5'-нуклеотидазы, ацетилхолинэстеразы и др. [41]. Другие белки взаимодействуют с мембраной за счет трансмембранного пептидного якоря — последовательности гидрофобных аминокислот, расположенной вблизи N- или С-конца молекулы белка. Мембранные белки I типа (рис. 2 д) синтезируются с N-терминальным сигнальным пептидом, отщепляемым в процессе биосинтеза, и С-концевым якорем. В случае белков II типа N-сигнал в процессе биосинтеза не отделяется и выполняет роль трансмембранного якоря (рис. 2 е). Отметим, что для многих белков, встроенных в мембрану с помощью якоря, характерно «слущивание» (shedding) с клеточной поверхности, при котором они выделяются в растворимом виде во внеклеточное окружение, а якорь остается в мембране [42, 58]. Образование растворимых форм происходит в результате ферментативного гидролиза доступного примембранного участка белка-субстрата и описано для разнообразных по структуре и функциям интегральных белков I и II типов (табл. 1) [32, 42].

Таблица 1  
Интегральные мембранные белки с пептидным якорем,  
способные переходить при протеолизе в растворимые формы [42]

Группа	Название	Топология (см. рис. 2)
Ферменты	АПФ	I тип
	Сиалилтрансфераза	II тип
Лиганды рецепторов	Преобразующий фактор роста (TGF- $\alpha$ )	I тип
	Фактор некроза опухолей (TNF- $\alpha$ )	II тип
	Kii-лиганд	I тип
	Фактор роста CSF-1	I тип
Молекулы кле- точной адгезии	L-Селектин	I тип
	Протеогликан NG-2	I тип
Рецепторы	Трансферриновый рецептор	II тип
	Фолат-рецептор	I тип
	Рецептор фактора роста нервов	I тип
	Рецептор преобразующего фактора роста	I тип
Вирусные белки	Гликопротеин вируса везикулярного стоматита	I тип
Другие белки	Предшественник амилоидного белка (APP)	I тип
	Гликопротеин Ib	I тип

Таблица 2  
Свойства секретаз мембранных белков [42]

Субстрат	Класс протеиназы	Место расщепления (...P <sub>1</sub> ↓P <sub>1</sub> '...)	Расстояние от мембраны, число а.о.
Предшественник амилоидного белка			
α-секретаза	металло-	VHНОK↓LVFF	12
β-секретаза	сериновая	SEVKM↓DAEF	28
γ-секретаза	цистеин/сериновая	VGGVV↓IATVI	в пределах мембраны
АПФ человека	металло-	NSAR↓SEGP	24
Фактор некроза опухолей (TNF-α)	металло-	PLAQA↓VRSSS	20
L-Селектин	металло-	QKLDK↓SFSM	11
Fas-лиганд	металло-	н.о.	
Рецептор фактора некроза опухолей	металло-	PQIEN↓VKGTE	10
Белок CD30	металло-	н.о.	
Фолат-рецептор	металло-	EEVA↓R↓F↓YA	11
Рецептор IL-6R	металло-	LPVQ↓DSSS	9
Преобразующий фактор роста (TGF-α)	сериновая	ADLLA↓VVAA	9
Kit-лиганд	сериновая	PPVAA↓A↓SSL	24–25

Ферменты, ответственные за отщепление пептидного якоря этих белков, называют секретазами, конвертазами или шедазами. Большинство из них являются мембранными металлопротеиназами [24, 32, 42] и характеризуются широкой протеолитической специфичностью (табл. 2). Так, например, в случае АПФ, принадлежащего к мембранным белкам I-типа и имеющего якорь с С-конца полипептидной цепи, сращивание происходит под действием специфической металлозависимой секретазы [32].

В то же время существуют и сериновые секретазы (эластаза-подобные), отщепляющие якорь мембранных белков в пределах ограниченной последовательности, состоящей из небольших неполярных аминокислотных остатков [65]. Белки, обладающие GPI-якорем, секретируются с клеточной поверхности при действии фосфолипаз С или D [42].

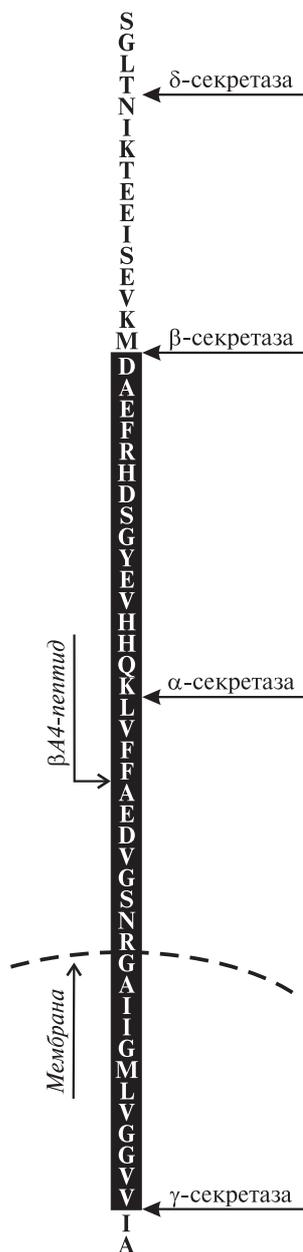


Рис. 3. Расщепление предшественника амилоидного белка Альцгеймера (APP) различными секретазы [42].

Таким образом, многие белки могут присутствовать в организме животных как в мембраносвязанной, так и в растворимой циркулирующей формах. Полагают, что свойственный для этих белков баланс форм необходим для их нормального функционирования [18, 42, 76]. Повышение секретазной активности приводит к нарушению этого баланса и наблюдается при патологических состояниях: отеке легких, кахексии, артрите, сепсисе, аутоиммунных заболеваниях, нейродегенерации, онкогенезе и др. [18, 42, 58, 62]. Очевидно, секретазы белков, вовлеченных в различные физиологические и патологические процессы, имеют важное значение и могут рассматриваться как потенциальные мишени при поиске новых лекарственных средств. Важность функций различных секретаз наглядно иллюстрирует пример образования  $\beta$ A4-пептида, являющегося основной причиной болезни Альцгеймера. Этот пептид образуется в процессе расщепления мембраносвязанного предшественника амилоидного белка двумя  $\beta$ - и  $\gamma$ -секретазами (рис. 3), при этом действие других секретаз (в особенности  $\alpha$ -секретазы) предотвращает развитие этого заболевания [42, 67].

Биологическая значимость процесса слушивания мембранных белков в значительной степени может быть обусловлена различными свойствами их растворимых и мембраносвязанных форм *in vivo*. Прежде всего эти отличия могут быть вызваны особенностями функциониро-

вания мембраносвязанных белков, которые мы рассмотрим ниже. Особое внимание при этом будет уделено свойствам ферментов — биокатализаторов превращений разнообразных биологически активных веществ.

#### IV. ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

##### БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕМБРАННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Изучение роли мембранной организации белков непосредственно в живом организме затруднено из-за сложной организации живой материи и одновременного протекания множества взаимосвязанных процессов. Однако, возможность проведения мутации генов, обеспечивающей избирательные изменения в структуре экспрессируемых белков, например, экспрессию только растворимых форм белков, позволяет в некоторых случаях показать важность функционирования именно мембраносвязанных белков [35, 38, 39, 43, 58]. Рассмотрим это на примере *Kit*-лиганда — одного из мембраносвязанных факторов роста млекопитающих. Для мутантной формы этого интегрального гликопротеина I типа, не содержащей трансмембранного и цитоплазматического доменов, была продемонстрирована нормальная экспрессия *in vivo* и биологическая активность при исследовании слияния клеток, аналогичная активности секреторируемой формы нативного белка. Однако у мыши, имеющей ген такого белка, проявлялись все симптомы животного, вообще лишённого гена *Kit*-лиганда — макроцитарная анемия, бесплодие, белый окрас [43]. В качестве другого примера можно привести мембранный фактор *Boss*, который является необычным интегральным белком I типа. Якорь этого белка семикратно пересекает мембрану. Мутации, обеспечивающие полное или даже частичное (с сохранением трех трансмембранных участков) удаление якоря, приводили к полной потере биологической активности этого белка в организме [39].

Недавние исследования также убедительно подтверждают физиологическую значимость мембранной формы АПФ. Мышь, у которой ген нативного АПФ был заменен на ген, кодирующий фермент без якоря таким образом, что весь секреторируемый фермент был активен, однако не встраивался в мембрану, имела все симптомы «нокаутного» животного, полностью лишённого гена АПФ: низкое давление, неконтролируемое мочеиспускание, бесплодие, различные сосудистые дисфункции, нарушения структуры и функции почек [35].

Отметим, что важность связывания с биомембраной выявлена не только для интегральных белков, но и продемонстрирована в ряде случаев для периферических белков, например, пируватоксидазы — периферического фермента, катализирующего окисление пирувата до уксусной кислоты и восстановление убихинона. Указанный фермент циркулирует в организме и связывается с плазматической мембраной лишь в присутствии субстрата и кофактора; при этом в молекуле белка формируется С-концевой липидсвязывающий домен. Показано, что мутантная форма пируватоксидазы, лишенная последних 24 аминокислотных остатков, полностью неактивна *in vivo* из-за неспособности связываться с мембраной [38].

Таким образом, биологическая роль различных мембранных ферментов может в значительной степени определяться их способностью к связыванию с мембраной. Во-первых, связывание с биомембраной обеспечивает *локализацию (концентрирование) ферментов в определенной части клетки и/или в той области мембраны, где концентрируется субстрат*. Например, ацетилхолинэстераза фиксируется в постсинаптической мембране, где велика концентрация ацетилхолина [64]. Во-вторых, адсорбция ферментов на мембране создает возможность для *сопряжения процессов катализа и трансмембранного переноса*. Так, при функционировании мембраносвязанных ферментов, участвующих в гидролизе крахмала и белков, вблизи клеточной мембраны создается локально высокая концентрация растворимых молекул продукта, что способствует их эффективному поглощению клеткой [22]. В-третьих, для многих ферментов при связывании с мембраной обеспечивается *доступность водонерастворимых субстратов*. Это могут быть интегральные ферменты, участвующие в процессинге мембранных белков (например, секретазы мембранных белков, см. выше), а также периферические ферменты: фосфолипазы [28], протеинкиназа С [63], пируватоксидаза [38] и др. Наконец, при связывании формируется *оптимальное микроокружение*, обеспечивающее нативную конформацию и каталитическую активность мембранных ферментов.

#### ВЛИЯНИЕ МЕМБРАННОГО ОКРУЖЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Каталитически активная конформация трансмембранных ферментов может в значительной степени формироваться мембраной. При выделении из мембраны и делипидизации они часто полностью теряют свою каталитическую активность. К таким ферментам относятся ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ )-АТФазы [68], цитохром С оксидаза [36] и др.

Каталитические свойства интегральных ферментов, обладающих пептидным или фосфатидилинозитольным якорем, также могут изменяться при переводе их в растворимую форму. На такую возможность прямо указывают данные по изучению каталитических свойств мембраносвязанного АПФ (двудоменный фермент с двумя активными центрами [6]) в культуре клеток яичников китайского хомячка [45]. Было показано, что соотношение каталитических констант гидролиза природного субстрата ангиотензина I на N- ( $k_{\text{cat}} = 48 \text{ с}^{-1}$ ) и C-доменах ( $k_{\text{cat}} = 14 \text{ с}^{-1}$ ) мембраносвязанного фермента отличается от такового для солюбилизированного АПФ в водных условиях:  $11 \text{ с}^{-1}$  и  $34 \text{ с}^{-1}$ , соответственно [45]. Кроме того, изменение каталитических характеристик ферментов при их солюбилизации было показано в серии экспериментов по сравнительному изучению кинетических свойств р- и м-форм ферментов, обладающих GPI-якорем [26, 52, 64, 70]. При этом в одних случаях ферментативная активность падала при высвобождении фермента, а в других, напротив, связанная форма ферментов характеризовалась пониженной активностью. Например, в случае ацетилхолинэстеразы слущивание фермента с мембраны под действием фосфолипазы C приводило к потере его наблюдаемой активности [64]. Обратный эффект наблюдался в случае дипептидазы из почек свиньи, для которой характерна активация при высвобождении этого фермента с поверхности мембраны [26]. При этом показано, что активация дипептидазы в реакции гидролиза субстрата Gly-D-Phe происходила за счет десятикратного уменьшения  $K_m$  (от 0,77 до 0,07 мМ) при сохранении постоянного значения  $V_{\text{max}}$ . В аналогичных исследованиях свойств 5'-нуклеотидазы из желудка курицы было показано, что активация фермента при его солюбилизации происходила за счет как уменьшения значения  $K_m$ , так и повышения  $V_{\text{max}}$  [52]. В случае 5'-нуклеотидазы из лимфоцитов свиньи подобный эффект был связан с увеличением  $V_{\text{max}}$  на 20% при сохранении постоянного значения  $K_m$  [52].

Таким образом, мембранное окружение существенно влияет на проявляемые ферментами каталитические свойства. Ниже мы рассмотрим основные факторы, регулирующие активность мембраносвязанных ферментов.

#### *Влияние состава и динамических свойств мембраны*

Функциональная активность мембранных белков в первую очередь зависит от динамических свойств липидного матрикса мембраны, обеспечивающих конформационную подвижность фермента — способность белковой молекулы совершать обратимый конформационный переход из напряженного состояния в расслабленное

[1, 2, 37]. Такая возможность зависит от плотности упаковки липидов, которая в свою очередь зависит от состава мембран. Обычно при температурах ниже критической ( $T_{кр}$  — температура фазового перехода «гель — жидкий кристалл», индивидуальна для каждой мембраны, например в бислойных мембранах чистого фосфатидилхолина  $T_{кр}$  составляет  $23^\circ$ ) мембраны слишком упорядочены, чтобы обеспечивать конформационную лабильность белков [1]. Однако, ферменты в клетках спящих губернатов (животных, впадающих в зимнюю спячку) могут функционировать даже при понижении температуры ниже, чем  $T_{кр}$ . Дело в том, что при подготовке к зимнему периоду происходит изменение фосфолипидного состава мембран животных — увеличение содержания полиненасыщенных жирных кислот в их составе. Такие липиды концентрируются вблизи гидрофобных участков белков и формируют слой так называемых пограничных (аннулярных) липидов, отличающихся от липидов общей фазы мембраны [5]. В этом случае белки окружены более рыхлой упаковкой липидов таким образом, что активность ферментов оказывается на достаточно высоком уровне для поддержания жизнедеятельности клеток этих животных. В настоящее время считают, что контролирование активности большинства ферментов в биомембране осуществляется на уровне молекулярных взаимодействий белка с этим слоем, т.е. за счет локальной липидной регуляции [37, 60].

Липидный состав мембран, от которого зависит и состояние аннулярного слоя белков, влияет на каталитические свойства ферментов. Например, карбоангидраза из мышц кролика [77] проявляет различные кинетические свойства, находясь в связанном состоянии с мембранами различного состава (содержание холестерина различалось в 22 раза). Кинетические параметры каталитического гидрирования  $CO_2$  под действием карбоангидразы в различных мембранных фракциях варьируют:  $K_m$  от 1,6 до 3,6 мМ;  $k_{cat}$  от 230 до 510  $s^{-1}$ . При этом также показана различная способность фермента в разных фракциях к связыванию специфических ингибиторов — изменение значений  $K_i$  на два порядка. Можно также привести любопытные данные о влиянии состава мембран голодающих и сытых крыс на способность мембраносвязанной ацилтрансферазы к связыванию специфического ингибитора малонил-СоА [27]. Показано, что в микросомальных мембранах сытых животных сродство этого фермента к ингибитору выше в 2,2 раза.

От динамических свойств общей липидной фазы мембран существенно зависит активность ферментов, использующих водонерастворимые субстраты. Известно, например, что холестерин понижает текучесть мембран. Показано, что введение холестерина в культуру

клеток *HEK 293* подавляет активность мембраносвязанной  $\alpha$ -секретазы предшественника амилоидного белка (см. рис. 3), что, в свою очередь, приводит к значительному понижению уровня секретируемой формы этого белка в культуральной среде [25]. Очевидно, это связано с ограничением латеральной подвижности фермента в мембране [25]. В случае периферических белков некоторые модификации бислоя, напротив, приводят к их активации. Например, при добавлении к мембранным фракциям ионов  $\text{Ca}^{2+}$  или продуктов перекисного окисления липидов наблюдается активация митохондриальных фосфолипаз [20, 21]. Полагают, что вызываемые этими добавками дефекты упаковки и структурные флуктуации липидов облегчают связывание периферических белков с мембраной.

#### *Влияние поверхностного потенциала мембран*

От поверхностного заряда биомембран зависит электрический потенциал, который определяет локальную концентрацию заряженных субстратов и протонов вблизи мембраны [2]. Влияние поверхностного потенциала может проявляться в сдвиге рН-оптимума активности ферментов, активный центр которых локализован у поверхности мембраны, и в изменении измеряемой величины константы Михаэлиса ( $K_m$ ) для заряженных субстратов [2]. Для ряда ферментов показана регуляция ферментативной активности изменением поверхностной плотности заряда мембран (митохондриальные мембраны и микросомы клеток печени или мозга белых крыс) [85, 88]. Например, глицерин-3-фосфатдегидрогеназа и арилсульфатаза активируются при уменьшении, а ацетилхолинэстераза, диметилаланинооксидаза и моноаминоксидаза, напротив, при увеличении плотности отрицательного заряда в мембране. Этот параметр варьировали добавлением к нативным мембранам анионных или катионных детергентов, встраивающихся в липидный бислой мембраны. Анализ кинетических данных во всех случаях подтвердил, что наблюдаемый эффект связан с изменением значений  $K_m$  при сохранении значений  $V_{max}$ , что указывает на концентрирование заряженного субстрата или продукта реакции вблизи мембранной поверхности [79].

#### *Формирование ферментных комплексов*

Модуляция активности мембраносвязанных ферментов может происходить вследствие того, что белки в мембранах нередко формируют гомо- и гетерокомплексы [1, 2, 5, 23, 37]. Как правило, они представляют собой нековалентные белковые комплексы, структура которых нарушается при разрушении мембраны и при выделении комплекса в раствор (слабые взаимодействия в таких комплексах

могут зависеть даже от ионной силы раствора) [2]. Получены также и стабильные детергент-нерастворимые белковые комплексы, в состав которых входят эктоферменты, обладающие GPI-якорем (например, щелочная фосфатаза, аминопептидаза Р, 5'-нуклеотидаза) и гликолипиды [66]. Состояние белковой агрегированности в мембране может определяться несколькими факторами [4, 40]: 1) наличием прямых белок-белковых взаимодействий, способствующих появлению агрегатов; 2) энтропией смешивания белков в липидной фазе, т.к. при агрегации белков энтропия системы уменьшается, то диспергированное состояние белков в мембране является предпочтительным; 3) термодинамической выгодностью сокращения количества пограничных липидов (за счет уменьшения поверхности контакта белка с липидом), что нередко способствует появлению белковых агрегатов [2].

В нативной мембране степень агрегированности белков также зависит от факторов, влияющих на состояние общей липидной фазы. Так, введение холестерина в мембраны эритроцитов и митохондрий приводило к агрегации белков и сопровождалось увеличением упорядоченности липидов общей фазы [5].

Рассмотрим примеры модулирования каталитических свойств мембранных ферментов в результате образования ферментных комплексов. Так,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -зависимая АТФаза, находясь в солюбилизированной (мономерной) форме, связывает меньшее количество ионов  $\text{K}^+$ , чем в мембраносвязанном (димерном) состоянии [1]. Показано, что УДФ-глюкуронилтрансфераза — интегральный гликопротеин I типа — в составе мембран функционирует только в виде гомокомплексов. При образовании олигомеров этого фермента в мембране возникают гидрофобные карманы, способствующие концентрированию гидрофобных субстратов и ориентирующие их определенным образом относительно реактивных групп активного центра фермента [59]. Интересным, на наш взгляд, примером влияния комплексообразования на каталитические свойства мембранных ферментов является различное поведение мономерной растворимой и олигомерной мембранной полифосфатазы [55]. Методом гельфильтрации показано, что мембранный фермент, обладающий GPI-якорем, в экстракте 0,1% тритоном X-100 из мембранной фракции митохондрий *Saccharomyces cerevisiae* присутствует в составе двух белковых комплексов — 120 и 76 кДа, в то время как р-форма полифосфатазы найдена только в виде мономера (36 кДа). Активность фермента, находящегося в составе белкового комплекса, повышалась при увеличении степени полимеризации субстрата (от 9 до 188 фосфатных остатков), а активность мономерного фермента от этого параметра не зависела. Двухзарядные катионы активировали мономерную и, напротив, ингибировали

олигомерные формы фермента. В то же время однозарядные анионы, активируя олигомеры фермента, не влияли на активность мономерной полифосфатазы. Различия заключались и в том, что сродство мономерной формы к полифосфату-15 и -188 характеризовалось меньшими значениями  $K_m$  (в 6 и 17 раз, соответственно), чем аналогичные значения, полученные для олигомерных форм мембранного фермента [55].

В последнее время появляются также данные о существовании *специфических механизмов*, регулирующих активность мембранных ферментов. Например, активация протеинкиназы С — периферического фермента, участвующего в фосфорилировании мембраносвязанных белков — происходит только при специфическом связывании с мембраной. При этом одновременно участвуют три подцентра связывания (с форболовыми эфирами или диацилглицеринами, с  $Ca^{2+}$  и с фосфатидилсеринем), и только при специфическом взаимодействии белка с фосфатидилсеринем происходит высвобождение псевдосубстрата из активного центра и активация этого фермента [63].

В целом, функционирование мембранных ферментов зависит от локального окружения и может определяться их взаимодействием с липидными и белковыми компонентами мембран. В настоящее время тонкие взаимодействия такого рода на мембранах исследовать в экспериментах *in vivo* затруднительно, поэтому для изучения характеристических свойств мембранных ферментов прибегают к методам их очистки и реконструкции с использованием адекватных моделей биомембран. Ниже мы рассмотрим возможности различных модельных систем для проведения таких исследований.

#### **V. МОДЕЛЬНЫЕ МЕМБРАННЫЕ СИСТЕМЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ МЕМБРАННЫХ ФЕРМЕНТОВ**

Несмотря на то, что свойства ферментов в системах, моделирующих их мембранное окружение, могут изменяться по сравнению с реальной средой, изучение очищенных и реконструированных ферментов дает большие преимущества. Этот подход позволяет не только охарактеризовать фермент в изолированной системе, но и определить минимальное число компонентов, необходимых для проявления тех или иных биохимических активностей [1, 2, 37, 40].

В мембранологии в настоящее время используется целый ряд систем, предложенных для моделирования биомембран. В их числе:

- поверхности раздела фаз;
- монослои липидов на границе воздух—вода;
- монослои липидов на твердой подложке;

- плоский липидный бислои;
- плоский бислои на твердой подложке;
- фосфолипидные везикулы — липосомы;
- дисперсии фосфолипидов в воде;
- гидратированные агрегаты синтетических ПАВ или природных липидов в органических растворителях.

Большинство из перечисленных систем не находят широкого применения в энзимологии из-за ряда ограничений. Например, в монослойные мембраны можно включать только ферменты, которые функционируют на границе раздела липид-вода. К таковым относятся липазы [2], которые, действуя на мембранные липиды, влияют на площадь поверхности и поверхностное давление монослоя. Встраивание в плоский бислои применяется обычно для характеристики белков, способных увеличивать ионную проводимость мембраны [72].

Чаще всего белки встраивают в везикулы, образованные одинарным фосфолипидным бислоем [2, 69], которые могут служить моделью компартиментализации в биологических системах. С помощью этих систем было подтверждено влияние физического состояния мембраны — поверхностного заряда, плотности упаковки липидов (текучести), толщины бислоя, кривизны бислоя, структурных флуктуаций — на активность мембранных ферментов. Так, использование для реконструкции ферментов однослойных везикул, образованных липидами с разной длиной углеводородных цепей или степенью ненасыщенности углеводородных цепей, позволяет изучить соответственно влияние *толщины бислоя* и *текучести мембран* на каталитические свойства ферментов. Например, таким образом было показано, что активность цитохрома Р-450 строго зависит от толщины бислоя [80].

В то же время при добавлении в везикулярную систему липидов, не образующих бислои структуры (таких как фосфатидилэтанол-амин или диацилглицерин), может быть продемонстрирована роль изменения *кривизны бислоя*. Показано, что при функционировании как интегральных (родопсин,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаза, цитохром Р-450, митохондриальная убихинон-цитохром С редуктаза, дигликозилдиацилглицерин-синтетаза, маннозилтрансфераза), так и периферических ферментов (фосфолипаза  $A_2$ , протеинкиназа С) между функцией белка и присутствием в бислоиной системе таких липидов существует прямая связь [34]. Например, структурные флуктуации липидов оказываются необходимым условием для активации транспортной  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулума [61]. Увеличение содержания в системе липидов, вызывающих образование небислоиных структур, приводило к резкому увеличению скорости переноса  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь липосом. Скорость гидролиза липидов под действием

фосфолипаз А<sub>2</sub> и С [30], низкая для ламеллярной упаковки фосфатидилхолина (ФХ) в монослойных везикулах, возрастала при введении в систему диацилглицеринов.

Использование суспензии смесей липидов в воде, в которых в зависимости от соотношения компонентов образуются различные агрегаты липидов, в том числе обращенные мицеллы и гексагональные структуры, позволяет выявить оптимальную конструкцию матрицы для функционирования различных ферментов. В частности, для митохондриальной АТФазы, солюбилизированной в водной суспензии смеси ФХ и фосфатидилэтаноламина (ФЭ), наблюдалась существенная зависимость активности от изменения структуры липидного окружения, определяемого соотношением [ФХ]/[ФЭ] в смеси. В системах с ламеллярной (более 30% содержания ФХ) и обращенной гексагональной структурой (менее 10% ФХ) активность фермента была относительно низкой. При этом в области перехода между этими двумя структурами каталитическая активность АТФазы существенно возрастала, достигая своего оптимума в случае, когда в системе основной структурной единицей являлись обращенные мицеллы (при 15% ФХ) [44]. В то же время каталитическая активность маннозилтрансферазы индуцировалась исключительно гексагональной упаковкой липидного окружения в водной дисперсии смеси ФХ и фосфатидилинозитола [46].

Кроме вышеперечисленных методов реконструкции мембранных белков, в энзимологии успешно применяются псевдогомогенные коллоидные системы на основе синтетических ПАВ — структурных аналогов природных липидов (рис. 4) [9]. В таких системах в зависимости от концентрации компонентов могут возникать все структуры, характерные для водных дисперсий мембранных липидов:

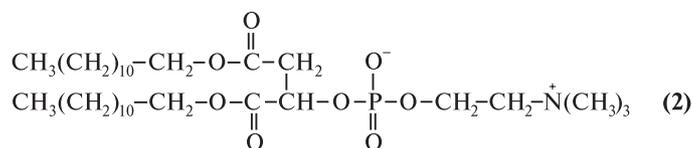
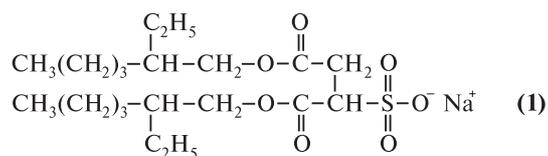


Рис. 4. Строение широко используемого анионного ПАВ — аэрозоля ОТ (1) и фосфатидилхолина (2).

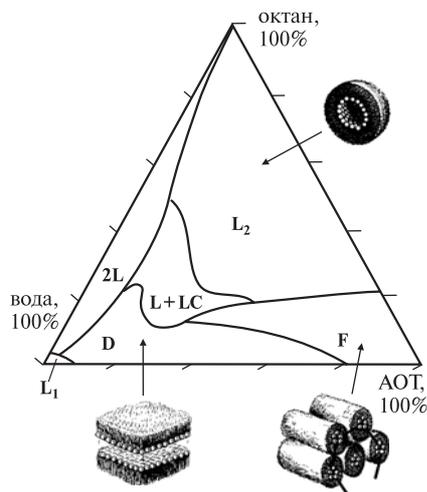


Рис. 5. Фазовая диаграмма тройной системы АОТ–вода–изооктан [73]. Концентрации компонентов даны в процентах по массе.

- $L_1$  — прямые мицеллы;
- $2L$  — эмульсия органический растворитель — вода;
- $L_2$  — обращенные мицеллы;
- $D$  — ламеллярная фаза;
- $L+LC$  — область нескольких сосуществующих фаз;
- $F$  — обращенная гексагональная структура.

обращенные и прямые мицеллы, жидкокристаллические структуры, в том числе ламеллярная, прямая и обращенная гексагональная и кубическая упаковки. Пример такой фазовой диаграммы для системы Аэрозоль ОТ–октан–вода приведен на рис. 5 [73]. Принципиально важным достоинством таких систем является возможность целенаправленного варьирования основных физико-химических параметров системы путем простого изменения соотношения компонентов. Гидратированные агрегаты синтетических ПАВ в органических растворителях просты в приготовлении, устойчивы в течение многих часов в присутствии добавленного белка (от 10 до  $10^5$  нг/мл) и равновесное состояние в них достигается быстро — минуты [9].

При солюбилизации в такой системе белки включаются во внутреннюю полярную полость агрегатов ПАВ, приобретая оболочку из монослоя гидратированных молекул ПАВ, предохраняющих их от денатурирующего действия органического растворителя. Ферменты при этом не теряют способности к катализу, а динамический характер системы, обеспечивающий быстрый обмен компонентами, позволяет изучать взаимодействия ферментов с различными эффекторами (субстратами, ингибиторами, кофакторами и т.д.) [14, 16, 53]. Эти свойства выгодно отличают этот способ реконструкции от других систем.

## VI. ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ В ТРОЙНЫХ СИСТЕМАХ ПАВ–ВОДА–ОРГАНИЧЕСКИЙ РАСТВОРИТЕЛЬ

Обращенные мицеллы ПАВ, в которых солюбилизированы мембранные белки, можно рассматривать как модель белок-содержащих фрагментов биомембран и применять их в качестве среды для ферментативных процессов при изучении механизмов регуляции активности мембранных ферментов.

Широкое применение систем обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях для изучения мембранных свойств ферментов сформировалось в отдельное направление — мицеллярную энзимологию [57]. Мицеллы, построенные из анионных ПАВ (например, АОТ), как правило, характеризуются узким распределением по размеру и форме, не зависящем от концентрации ПАВ [82]. Это дает возможность варьирования их размера путем простого изменения соотношения компонентов системы. Так, повышение содержания воды при постоянном соотношении АОТ/октан приводит к увеличению размера мицелл, который определяется степенью гидратации АОТ ( $w_0$ , молярным отношением  $[H_2O]/[АОТ]$ ).

Каталитическая активность ферментов в системах обращенных мицелл зависит от степени гидратации. Наблюдаемые зависимости, как правило, имеют колоколообразный вид, причем максимум активности обнаруживается при том значении  $w_0$ , когда радиус внутренней полости мицелл соответствует радиусу сферической (или большей полуоси несферической) белковой глобулы, т.е. когда осуществляется принцип геометрического соответствия [15]. Существование оптимума объясняется способностью мицелл оптимального размера поддерживать и закреплять активную конформацию фермента. Несколько оптимумов каталитической активности проявляют ферменты, обладающие четвертичной структурой, причем каждый оптимум, как правило, отвечает функционированию индивидуальной каталитически активной структурной единицы фермента [15, 48]. Исходя из размера мицелл в оптимуме ферментативной активности можно оценить размеры белка и его олигомерных структур. Таким образом, исследование зависимости каталитической активности фермента от степени гидратации в системе обращенных мицелл — простой и удобный способ обнаружения и изучения четвертичной структуры ферментов. Например, только в системе обращенных мицелл АОТ удалось стабилизировать и охарактеризовать четыре индивидуальные олигомерные формы уридинфосфоорилазы [50], а также гетерокомплексы глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы [54].

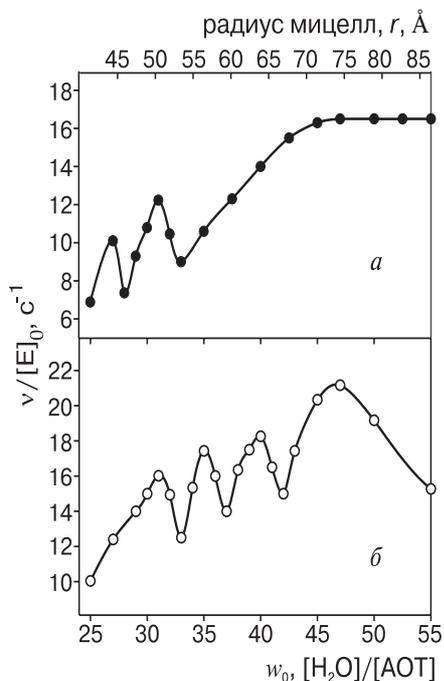


Рис. 6. Зависимость каталитической активности р- (а) и м- (б) форм АПФ в системе обращенных мицелл от степени гидратации АОТ.

На верхней оси абсцисс рисунка приведена шкала средних радиусов внутренних полостей обращенных мицелл [3].

Кроме того, направленно изменяя структуру агрегатов ПАВ в тройных системах ПАВ–вода–органический растворитель, можно моделировать тем самым структуру мембранного окружения белка. При этом для ряда ферментов было показано существенное изменение активности. Так, в случае лакказы [53] и кислой фосфатазы [9] наблюдалось повышение активности ферментов при переходе из фазы ламелл к системе обращенных мицелл, для алкогольдегидрогеназы [12] и лактатдегидрогеназы [11] — при переходе из фазы обращенных мицелл к обращенной гексагональной структуре ПАВ, для пероксидазы — при переходе из фазы обращенных мицелл к системе с кубической упаковкой молекул ПАВ [9, 10]. Во всех выше указанных случаях при фазовых переходах именно для мембранных форм

Этот подход помогает выявить различия в четвертичной структуре растворимых и мембранных ферментов. Так, при анализе зависимостей каталитической активности растворимой (без якоря) и мембранной (с якорем) форм АПФ от степени гидратации АОТ в системе обращенных мицелл (рис. 6) и при проведении седиментации АПФ-содержащих обращенных мицелл при различных значениях  $w_0$  было установлено, что растворимый АПФ способен функционировать в виде мономера ( $w_0 = 27$ ), компактного димера ( $w_0 = 31$ ) и тетрамера, а м-форма — в виде трех типов димеров различного размера ( $w_0 = 31, 35$  и  $40$ ) и тетрамера ( $w_0 = 47$ ), при этом мономер м-формы этого фермента не обнаруживался [3]. Таким образом показано, что мембранная организация может существенно влиять на четвертичную структуру этого фермента.

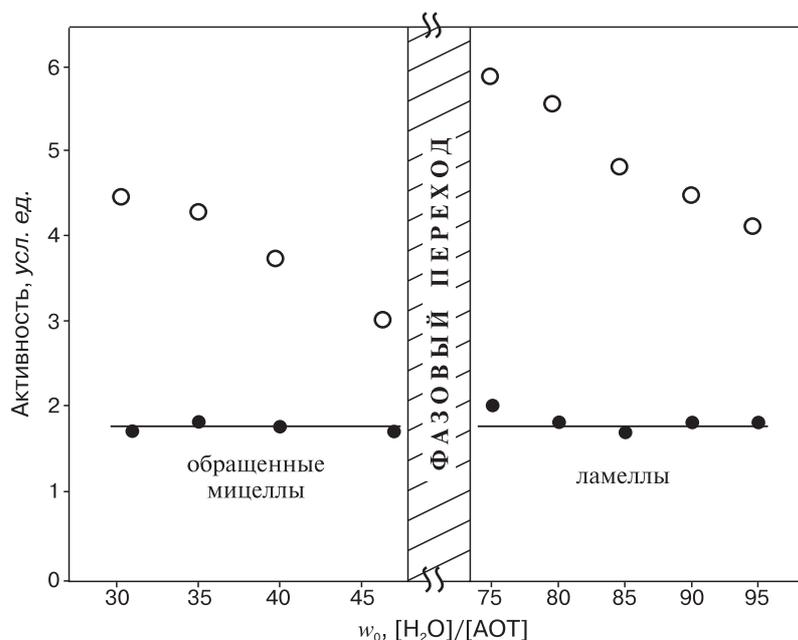


Рис. 7. Зависимость каталитической активности р- (●) и м-форм (○) АПФ от степени гидратации АОТ при фазовом переходе «обращенные мицеллы-ламеллы».

ферментов наблюдалось резкое изменение каталитической активности. Это явление получило название — «фазозависимость» ферментов. «Фазозависимость» демонстрируют не только природные мембранные белки, но и ферменты с искусственно введенным якорем. Так, искусственно гидрофобизованный остатками стеариновой кислоты  $\alpha$ -химотрипсин, в отличие от нативного  $\alpha$ -химотрипсина, также резко повышал каталитическую активность при фазовых переходах: «обращенные мицеллы — ламеллы» и «обращенная гексагональная фаза — ламеллы» [7]. На рис. 7 представлены зависимости наблюдаемой каталитической активности мембранного и растворимого АПФ от степени гидратации при фазовом переходе из среды обращенных мицелл в ламеллярную фазу. Видно, что при этом каталитическая активность р-формы АПФ сохраняется постоянной, однако, для мембранного фермента характерно резкое увеличение активности. Следовательно, наличие «фазозависимости» может служить тестом на мембраноактивность фермента, проявляющего максимальную активность при оптимальной структуре мембранного окружения.

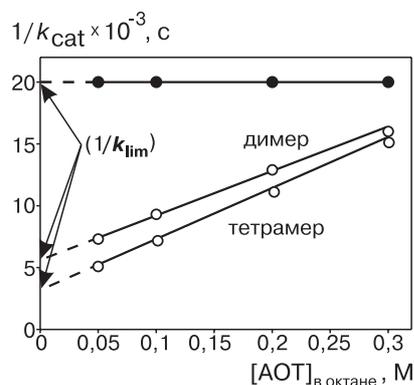


Рис. 8. Зависимость каталитической константы ( $k_{cat}$ ) гидролиза FA-Phe-Gly-Gly под действием р- (1) и м- (2) форм АПФ в системе обращенных мицелл от концентрации АОТ [4].

для ряда мембранных ферментов (например, пероксидаза [8], лакказы [19], кислая фосфатаза [9], различные олигомерные формы мембранного АПФ), в том числе и для искусственно гидрофобизованных белков, например, стеарилированного  $\alpha$ -химотрипсина [7], была обнаружена зависимость каталитической активности от концентрации ПАВ в системе обращенных мицелл (рис. 8), что объясняют способностью ферментов этой группы взаимодействовать с мицеллярной матрицей (молекулами ПАВ) [47]. Разбавление системы органическим растворителем приводит к уменьшению концентрации одинаковых по размеру мицелл. В пределе, при концентрации ПАВ стремящейся к нулю, можно оценить предельные значения каталитических констант ( $k_{lim}$ ) — истинную активность структурной единицы фермента (рис. 8), проявляемую им в одной изолированной мицелле.

Этот подход помогает наиболее полно продемонстрировать отличия как в каталитической активности растворимой и мембранной форм ферментов при их включении в модельную биомембранную систему, так и в каталитической активности различных структурных единиц для ферментов, обладающих четвертичной структурой. В качестве примера можно привести полученные нами для различных олигомерных структур АПФ значения  $k_{lim}$  в системе обращенных мицелл АОТ в октане (табл. 3). Видно, что каталитические свойства р- и м-форм

Отличия в способности мембранных и растворимых форм ферментов к взаимодействию с мембранной матрицей проявляются и в их различной чувствительности к варьированию концентрации ПАВ в системе обращенных мицелл при постоянной степени гидратации [7, 57]. Так, каталитическая активность водорастворимых ферментов (химотрипсин [7], трипсин [16], р-форма щелочной фосфатазы [48], различные олигомерные формы растворимого АПФ и др.), неспособных взаимодействовать с мицеллярной матрицей, не зависит от концентрации ПАВ (рис. 8). В то же время,

АПФ, практически не различающиеся в водных растворах [51], в системе обращенных мицелл значительно различаются. р-Форма фермента проявляет в этой системе наименьшую активность, причем при образовании гомокомплексов активность этого фермента не меняется. В то же время фермент, обладающий якорем, проявляет более высокую каталитическую активность, которая в значительной степени зависит от олигомерного состояния фермента (табл. 3). Таким образом, для проявления максимальной активности АПФ в этой системе необходимо присутствие в молекуле фермента якоря и важно олигомерное состояние белка.

Использование модельных мембранных систем может иногда выявить новые, необычные свойства мембранных белков, которые вряд ли могли бы быть получены при их исследовании только в водных растворах. Так, при исследовании мембранного АПФ при широком варьировании свойств водной фазы в системе обращенных мицелл мы обнаружили существенное изменение его каталитических свойств. Оказалось, что только в случае мембранного АПФ (но не растворимого!) при варьировании молярности вносимого в систему буфера происходит изменение каталитической активности и рН-оптимума активности фермента. Эти данные позволили предположить [4] существование двух конформеров мембранного АПФ при разном составе среды в системе обращенных мицелл, различающихся по рН-оптимуму активности (конформер I — рН-оптимум 7,5, как в водном растворе, и конформер II — рН-оптимум 5,5) и по величинам предельных каталитических констант (табл. 3). Следует подчеркнуть, что в зависимости от условий среды активность мембранного соматического АПФ по-разному зависит от способа укладки молекул в белковом комплексе: предполагаемый конформер II наиболее активен в виде компактного димера, а конформер I — в виде тетрамера (табл. 3).

Таблица 3  
Предельные значения каталитических констант ( $k_{lim}$ ) гидролиза FA-Phe-Gly-Gly под действием различных структурных форм АПФ быка в системе обращенных мицелл АОТ в октане [4]

Олигомерное состояние фермента	$K_{lim}, c^{-1}$
<b>р-Форма АПФ</b>	
<i>мономер</i>	50±4
<i>компактный димер</i>	55±6
<i>тетрамер</i>	62±8
<b>м-Форма АПФ</b>	
<u>конформер I:</u>	
<i>компактный димер</i>	190±20
<i>тетрамер</i>	370±50
<u>конформер II:</u>	
<i>мономер</i>	570±60
<i>компактный димер</i>	1230±130
<i>тетрамер</i>	715±75

Полученные данные указывают на более высокую чувствительность фермента с якорем, по сравнению с ферментом без якоря, к изменениям микроокружения и на широкие возможности регуляции активности мембраносвязанного АПФ. Обнаруженное значительное различие активности р- и м-форм АПФ в системе, моделирующей мембранное микроокружение ферментов, указывает на возможность осуществления аналогичного явления *in vivo* при взаимодействии этого фермента с биомембраной.

## VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя представленный выше материал, можно утверждать, что мембранное окружение играет важную роль в модуляции активности разнообразных мембранных ферментов. Причем липид-белковые и белок-белковые взаимодействия могут приводить к проявлению особых свойств ферментов и осуществлению процессов, которые не могут реализоваться в гомогенной водной среде. Изменение способности ферментов к связыванию с мембраной (например, при слущивании мембранных белков с плазматической мембраны или нарушении целостности мембран) может приводить к потере их функциональной активности. Изучение особенностей функционирования ферментов в составе реальных мембран затруднено одновременным протеканием в них множества взаимосвязанных процессов, поэтому для изучения свойств мембранных ферментов, как правило, используют различные модельные мембранные системы. Одними из наиболее перспективных систем являются тройные системы ПАВ–вода–органический растворитель, в которых можно варьировать структуру и размеры мембранной матрицы простым изменением соотношения компонентов. Благодаря использованию таких систем в качестве среды для ферментативных реакций стало возможным выявлять функциональные особенности надмолекулярной структуры ферментов, обнаруживать отличия в каталитических свойствах мембранных и немембранных форм белка. Изучение свойств ферментов в таких системах может позволить выявить закономерности функционирования ферментов в составе биомембран, указывающие на возможные пути регуляции их активности в организме.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской государственной научно-технической программы «Новейшие методы биоинженерии» (раздел «Инженерная энзимология», грант № 1–34).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А.А., Котелевцев С.В., Ланио М., Альварес К., Перес П. Введение в биомембранологию. М: Изд-во МГУ. 1990. 208 с.
2. Геннис Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции. М: Мир. 1997. 624 с.
3. Гринштейн С.В., Никольская И.И., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Кост О.А. // Биохимия. 1999. Т. 64. С. 686—696.
4. Гринштейн С.В., Левашов А.В., Кост О.А. // Биохимия. 2000. Т. 65. (в печати)
5. Дергунов А.Д., Капрельяни А.С., Островский Д.Н. // Усп. биол. хим. 1984. Т. 25. С. 89—110.
6. Елисеева Ю.Е. // Биоорг. химия. 1998. Т. 24. С. 262—270.
7. Кабанов А.В., Левашов А.В., Мартинек К. // Вестн. Моск. ун-та. 1986. Т. 27. С. 591—594.
8. Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К. // Мол. биол. 1984. Т. 18. С. 1019—1031.
9. Клячко Н.Л., Левашов А.В., Пшежецкий А.В., Богданова Н.Г., Кабанов А.В., Березин И.В., Хмельницкий Ю.Л., Жаринова И.Н., Мартинек К. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 289. С. 1266—1270.
10. Клячко Н.Л., Левашов А.В., Пшежецкий А.В., Богданова Н.Г., Мартинек К. // Биол. мембраны. 1986. Т. 3. С. 1020—1029.
11. Клячко Н.И., Меркер Ш., Вакула С.В., Иванов М.В., Березин И.В., Мартинек К., Левашов А.В. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 298. С. 1479—1481.
12. Клячко Н.Л., Пшежецкий А.В., Кабанов А.В., Вакула С.В., Мартинек К., Левашов А.В. // Биол. мембраны. 1990. Т. 7. С. 467—472.
13. Курганов Б.И. // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. С. 363—371.
14. Курганов Б.И., Цетлин Л.Г., Малахова Э.А., Чеботарева Н.А., Ланкин В.З., Левашов А.В., Глебова Г.Д., Березовский В.М., Мартинек К., Березин И.В. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 282. С. 1263—1267.
15. Левашов А.В. // Итоги науки и техники. Биотехнология. М: ВНИИТИ. 1987. Т. 4. С. 112—158.
16. Левашов А.В., Пантин В.И., Мартинек К., Березин И.В. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 252. С. 133—136.
17. Липкин В.М., Обухов А.Н. // Биол. мембраны. 1999. Т. 16. С. 135—158.
18. Локшина Л.А. // Биоорг. химия. 1998. Т. 24. С. 323—331.
19. Пшежецкий А.В., Меркер Ш., Клячко Н.Л., Пепанян Г.С., Мартинек К., Левашов А.В. // Биохимия. 1988. Т. 53. С. 1013—1016.
20. Таджикибаева Э., Вагина О.Н., Замаева М.В., Гагельганс А.И., Тукфатулина И.И., Салахутдинов Б.А., Арипов Т.Ф. // Биол. мембраны. 1999. Т. 16. С. 57—63.
21. Тимушева Ю.Т., Маренинова О.А., Вагина О.Н., Замаева М.В., Салахутдинов Б.А., Арипов Т.Ф., Ташмухамедов Б.А. // Биол. мембраны. 1998. Т. 15. С. 36—42.
22. Уголев А.М. Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция, Ленинград: Наука. 1972. 260 с.
23. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. М: Мир. 1986. 202 с.

24. Black R.A., Rauch C.T., Kozlosky C.J., Peschon J.J., Slack J.L., Wolfson M.F., Castner B.J., Stocking K.L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K.A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J.N., Johnson R.S., Paxton R.J., March C.J., Cerretti D.P. // *Nature*. 1997. Vol. 385. P. 729—733.
25. Bodovitz S., Klein W.L. // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 4436—4440.
26. Brewis I.A., Turner A.J., Hooper N.M. // *Biochem. J.* 1994. Vol. 303. P. 633—638.
27. Broadway N.M., Saggerson E.D. // *Biochem. J.* 1997. Vol. 322. P. 435—440.
28. Burack W.R., Biltonen R.L. // *Chem. Phys. Lipids.* 1994. Vol. 73. P. 209—222.
29. Cheifetz S., Boggs J.M., Moscarello M.A. // *Biochemistry.* 1985. Vol. 24. P. 5170—5175.
30. Dawson R.M.C. // *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 1982. Vol. 52. P. 401—406.
31. Dunn R.J., Hackett H.R., McCoy, J.M., Chao B.H., Kimura, K., Khorana, H.G. // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 9246—9254.
32. Ehlers M.R.W., Schwager S.L., Chubb A.J., Scholle R.R., Brandt W.F., Riordan J.F. // *Immunopharmacology.* 1997. Vol. 36. P. 271—278.
33. Elgavish S., Shaanan B. // *TIBS.* 1997. Vol. 22. P. 462—467.
34. Epand R.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1376. P. 353—368.
35. Esther C. R., Marino E. M., Howard T. E., Michaud A., Corvol P. // *J. Clin. Invest.* 1997. Vol. 99. P. 2375—2385.
36. Gelles J., Blair D.F., Chan S.I. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1987. Vol. 853. P. 205—236.
37. Gil T., Ipsen J.H., Mouritsen O.G., Sabra M.C., Sperotto M.M., Zuckermann M.J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1376. P. 245—266.
38. Grabau C., Cronan J.E. // *Biochemistry.* 1986. Vol. 25. P. 3748—3751.
39. Hart A.C., Kramer H., Van Vactor D.L.Jr., Paidhungat M., Zipursky S.L. // *Genes. Dev.* 1990. Vol. 4. P. 1835—1847.
40. Heyse S., Stora T., Schmid E., Lakey J.H., Vogel H. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1376. P. 319—338.
41. Hooper N.M. // *Clin. Chim. Acta.* 1997. Vol. 266. P. 3—12.
42. Hooper N.M., Karran E.H., Turner A.J. // *Biochem. J.* 1997. Vol. 321. P. 265—279.
43. Huang E.J., Nocka K.H., Buck J., Besmer P. // *Mol. Biol. Cell.* 1992. Vol. 3. P. 349—362.
44. Hui S.W., Stewart T.P., Yeagle P.L., Albert A.D. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1981. Vol. 207. P. 227—240.
45. Jaspard E., Alhenc-Gelas F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. Vol. 211. P. 528—534.
46. Jensen J.W., Schutzbach V. // *Biochemistry.* 1984. Vol. 23. P. 1115—1119.
47. Kabanov A.V., Levashov A.V., Klyachko N.L., Nametkin S.N., Pshezhetsky A.V., Martinek K. // *J. Theor. Biol.* 1988. Vol. 33. P. 327—343.
48. Kabanov A.V., Nametkin S.N., Klyachko N.L., Levashov A.V. // *FEBS Lett.* 1991. Vol. 278. P. 143—146.
49. de Kruiff B. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1997. Vol. 1. P. 564—569.
50. Kurganov B.I., Burlakova A.A., Chebotareva N.A., Debabov V.G. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997. Vol. 41. P. 547—554.

51. *Lanzillo J.J., Stevens J., Dasarathy Y., Yotsumoto H., Fanburg B.L.* // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 14938—14944.
52. *Lehto M.T., Sharom F.J.* // *Biochem. J.* 1998. Vol. 332. P. 101—109.
53. *Levashov A.V.* // *Ind. J. Chem.* 1993. Vol. 32. P. 167—169.
54. *Levashov A.V., Ugolnikova A.V., Ivanov M.V., Klyachko N.L.* // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997. Vol. 42. P. 527—534.
55. *Lichko L., Kulakovskaya T., Kulaev I.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1372. P. 153—162.
56. *Maksymiwi R., Sui S., Gaub H., Sackmann E.* // *Biochemistry.* 1987. Vol. 26. P. 2983—2990.
57. *Martinek K., Levashov A.V., Klyachko N.L., Khmel'nitsky Y.L., Beresin I.V.* // *Eur. J. Biochem.* 1986. Vol. 155. P. 453—468.
58. *Massague J., Atanasio P.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1993. Vol. 62. P. 515—541.
59. *Meech R., Mackenzie P.I.* // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1997. Vol. 24. P. 907—915.
60. *Mouritsen O.G., Jorgensen K.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997. Vol. 7. P. 518—527.
61. *Navarro J., Toivito-Kinnucan M., Racke, E.* // *Biochemistry.* 1984. Vol. 23. P. 130—135.
62. *Naim N.Y.* // *Biochem. J.* 1996. Vol. 316. P. 259—264.
63. *Newton A.C., Johnson J.E.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1376. P. 155—172.
64. *Ott P.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. Vol. 822. P. 375—392.
65. *Pandiella A., Bosenberg M.W., Huang E.J., Besmer P., Massague J.* // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. P. 24028—24033.
66. *Parkin E.T., Turner A.J., Hooper N.M.* // *Biochem. J.* 1996. Vol. 319. P. 887—896.
67. *Parvathy S., Hussain I., Karran E.H., Turner A.J., Hooper N.M.* // *Biochemistry.* 1998. Vol. 37. P. 1680—1685.
68. *Pedersen P.L., Carafoli E.* // *TIBS.* 1987. Vol. 12. P. 146—150.
69. *van der Rest M.E., Kamminga A.H., Nakano A., Anraku Y., Poolman B., Konings W.N.* // *Microbiol. Rev.* 1995. Vol. 59. P. 304—322.
70. *Roberg, B., Torgner, I.A., Kvamme, E.* // *Contrib. Nephrol.* 1997. Vol. 121. P. 11—19.
71. *Singer S.L., Nicolson G.L.* // *Science.* 1972. Vol. 175. P. 720—731.
72. *Suarez-Isla B.A., Wan K., Lindstrom J., Montal M.* // *Biochemistry.* 1983. Vol. 22. P. 2319—2323.
73. *Tamamushi B., Watanabe N.* // *Colloid. Polymer. Sci.* 1980. Vol. 258. P. 174—178.
74. *Tomita M., Marchesi V.T.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975. Vol. 72. P. 2964—2968.
75. *Van den Bosh H.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1980. Vol. 604. P. 191—246.
76. *Van Hoof V.O., Deng J.T., De Broe M.E.* // *Clin. Chim. Acta.* 1997. Vol. 266. P. 23—31.
77. *Wetzel P., Gros G.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1998. Vol. 356. P. 151—158.
78. *Williams T.A., Soubrier F., Corvol P.* // *in Zinc Metalloproteases in Health and Disease.* / Ed. Hooper N.M. London. Taylor and Francis. 1996. P. 83—104.
79. *Wojtzak L., Nalecz M.J.* // *Eur. J. Biochem.* 1979. Vol. 94. P. 99—107.

80. *Yun C.H., Ahn T., Guengerich F.P.* // Arch. Biochem. Biophys. 1998. Vol. 356. P. 229—238.
81. *Zakim D., Edmontson D.E.* // J. Biol. Chem. 1982. Vol. 257. P. 1145—1148.
82. *Zulauf M., Eicke H.-F.* // J. Phys. Chem. 1979. Vol. 83. P. 480—486.