

# ПОРОФОРМИРУЮЩИЕ БЕЛКИ И АДАПТАЦИЯ ОРГАНИЗМОВ К УСЛОВИЯМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

©2008 г. Ж. И. АНДРЕЕВА-КОВАЛЕВСКАЯ<sup>1</sup>,  
А. С. СОЛОНИН<sup>1\*</sup>, Е. В. СИНЕВА<sup>1</sup>,  
В. И. ТЕРНОВСКИЙ<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> *Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
им. Г.К.Скрябина РАН, г. Пуццино;*

<sup>2</sup> *Институт биофизики клетки РАН, г. Пуццино*

I. Введение. II. Пороформирующие белки организмов различных систематических групп. III. Пороформирующие белки как один из факторов эволюции. IV. Перспективы использования пороформирующих белков для решения прикладных задач, нанотехнологические конструкции. V. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Первичным барьером при взаимодействии организмов со средой и другими организмами является клеточная мембрана. Неудивительно, что в процессе эволюции большинство организмов приобрели способность вырабатывать соединения, изменяющие проницаемость мембран других организмов, выгодную продуцентам этих веществ [1, 2]. Одним из важнейших и интересных явлений служит продукция различных пороформеров – веществ белковой природы, которые, встраиваясь в чужую мембрану, образуют в ней поры [2].

Первичным актом действия таких пороформирующих белков при всем различии их химического строения является связывание с кле-

---

*Принятые сокращения:* RTX (repeats in toxin) – повторы в токсине; липид II – ундекапренил-пирофосфорил MurNAc-(пентапептид) GlcNAc; GPI – гликозил-фосфатидилинозитол.

\**Адрес для корреспонденции:* solonin@ibpm.pushchino.ru; vternovsky@mail.ru

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 07-04-01706 и № 08-04-01424.

точной мембраной и, как правило, образование в ней гидрофильного проводящего пути, облегчающего, в зависимости от размеров поры, транспорт через гидрофобную область мембраны различных веществ (ионов, сахаров и даже белков). Формирование дополнительных пор запускает различные механизмы клеточной гибели. Например, цитолизины, увеличивающие проницаемость мембраны для ионов, сдвигают осмотическое равновесие клетки, что приводит к ее набуханию и в конечном итоге к лизису. Нарушение ионного гомеостаза клетки может индуцировать массиванный экзоцитоз, эндоцитоз, некроз или гибель клетки по апоптозоподобному типу. Таким образом, организмы, способные продуцировать подобные соединения, получают явные преимущества в процессах, связанных с адаптацией к среде обитания что, в конечном итоге приводит к увеличению их численности и ареала обитания. Пороформирующие белки можно классифицировать по их функции, способу лизиса мембраны, размеру пор или порообразующих субъединиц и т.д. Наиболее информативной является классификация по типу структур, из которых в плоскости мембраны формируется пора – на  $\alpha$ - и  $\beta$ -пороформирующие белки [2]. Эта классификация позволяет проследить общие закономерности порообразования и функций пор у эволюционно удаленных организмов (рис. 1А, Б, табл.).

Предлагаемый вашему вниманию обзор посвящен описанию пороформирующих токсинов и их функциональной роли в процессах адаптации организмов различных систематических групп к условиям окружающей среды.

## II. ПОРОФОРМИРУЮЩИЕ БЕЛКИ ОРГАНИЗМОВ РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАТИЧЕСКИХ ГРУПП

### $\alpha$ -ПОРОФОРМИРУЮЩИЕ БЕЛКИ ЭУКАРИОТ

У беспозвоночных животных в основном обнаруживают два типа пороформирующих цитолизин, обеспечивающих их приспособление к условиям окружающей среды. Один из них включает секропин-подобные пептиды со структурой «спираль–поворот–спираль». Они обладают низкой гемолитической активностью, антимикробным действием, являются частью иммунной системы насекомых, защищающей от патогенных микроорганизмов. Токсины этого типа обнаружены в основном в гемолимфе различных насекомых. Примерами могут служить саркотоксин А у мух, секропины у бабочек и спинигирин у термитов. Положительно заряженные N-концевые

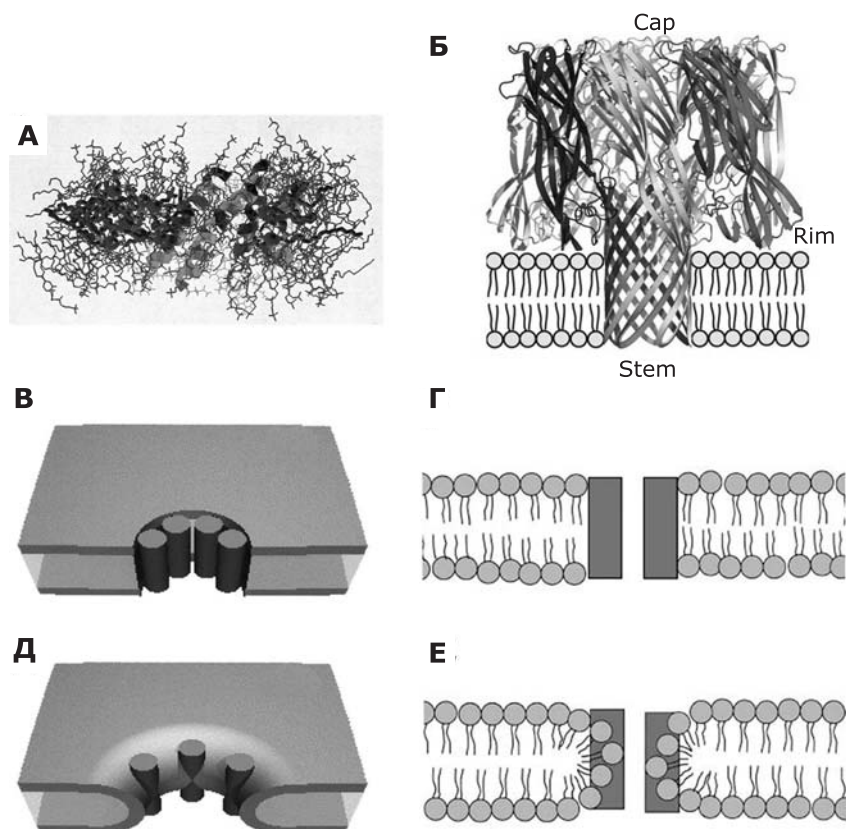


Рис. 1. Пора, образованная  $\alpha$ -пороформирующим белком мелиттином и липидами (вид сбоку), изображена с использованием программы RasMol 2.6 (А) [154]. Структура гептамерной поры, образованной  $\beta$ -пороформирующимся белком  $\alpha$ -гемолизином *S. aureus* (вид сбоку) (Б). Указаны основные домены: stem – стеблевой, rim – краевой и cap – «кэп»-домен [85]. Схематичное изображение «бочкообразной» поры в липидном бислое, вид сверху (В) и сбоку (Г) и тороидальной поры, вид сверху (Д) и сбоку (Е). Мономеры белка изображены в виде темных цилиндров (В, Д) [6] и в виде темных прямоугольников (Г, Е) [9].

спирали молекул этих белков ориентируются параллельно плоскости бислоевой мембраны и электростатически взаимодействуют с отрицательно заряженными группами липидов, при этом гидрофобные С-концевые спирали шести димеров секропинов внедряются в мембрану и формируют пору [3]. Секропин А, выделенный из гемолимфы моли *Hyalophora cecropia*, состоит из 37-аминокислотных остатков

Таблица  
Сравнительные свойства пороформирующих белков

Название пороформирующего белка	Организм – продуцент	Молекулярная масса, кДа	Функция	Размер пор, нм	N*	Тип структуры, формирующей пору	Ссылки
1	2	3	4	5	6	7	8
Секропин А	Гемолимфа моли <i>Hyalophora cecropia</i>	3,7	Антибактериальная	?**	12	$\alpha$ -спираль	[4]
Мелиттин	Яд медоносной пчелы <i>Apis mellifera</i>	2,6	Антибактериальная, защитная	1–3 и 3,5–4,5	6–15 и 4–8	$\alpha$ -спираль	[7, 8]
Ликотоксин I	Яд паука-волка <i>Lycosa carolinensis</i>	2,5	Антибактериальная, обезвреживание и переваривание жертвы, защитная	?	?	$\alpha$ -спираль	[12]
Оксиопинин I	Яд паука <i>Oxyopes kitabensis</i>	4,8	Антимикробная, инсектицидная, защитная	?	?	$\alpha$ -спираль	[5]
$\alpha$ -Латротоксин	Яд паука-каракурта <i>Latrodectus tredescingittatus</i>	130	Обезвреживание и умерщвление добычи	2,5	4	$\alpha$ -спираль	[14]
Пандлинин 2	Яд африканского скорпиона <i>Pandinus imperator</i>	2,4	Обезвреживание жертвы и защита от врагов	?	?	$\alpha$ -спираль	[18]
Эквинатоксин II	Яд морской актинии <i>Actinia equina</i>	20	Защита от нападения рыб и для обезвреживания жертвы	?	3–4	$\alpha$ -спираль	[19]
Стихолизин-II	Яд морской актинии <i>Stichodactyla helianthus</i>	20	Защита от нападения рыб и для обезвреживания жертвы	?	3–4	$\alpha$ -спираль	[20]
Токсин А-III	Морской червь-немертина <i>Cererebratulus lacteus</i>	9,5	Антибактериальная, защитная	?	?	$\alpha$ -спираль	[21]
Пардаксин	Слизистые железы рыб <i>Pardachirus marmoratus</i>	3,3	Антибактериальная, отпугивание хищников	?	?	$\alpha$ -спираль	[22]
Магаинин	Кожа шпорцевой лягушки <i>Xenopus laevis</i>	2,3	Антибактериальная, противогрибковая	3–5	4–7	$\alpha$ -спираль	[23]

См. продолжение табл.

Продолжение табл.

1	2	3	4	5	6	7	8
Кардиотоксин СТХ А3	Яд тайваньской кобры	6,2	Обезвреживание и переваривание жертвы, защитная, антибактериальная	?	?	$\beta$ -слой	[24, 25]
Протегрин	Лейкоциты свиней	1,8	Антимикробная, антигрибковая	2,1	8-10	$\beta$ -слой	[29-31]
Человеческий перфторин	Лимфоциты человека	67	Антивирусная, антимикробная, противопохолевая, компонент иммунной системы	10	20	$\beta$ -слой	[35-37]
Дефенсин	Животные и растения	3-5	Антимикробная, антипаразитарная, компонент иммунной системы	3-200	?	$\beta$ -слой $\alpha$ -спираль	[40, 43, 44]
Колицин E1	Энтеробактерии	60	Антибактериальная, канинибализм	0,8-1,6	1	$\alpha$ -спираль	[47-49]
Дифтерийный токсин	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	58,3	Основной фактор патогенности, получения питательных веществ из клеток хозяина, увеличение ареала обитания	1,8	4	$\alpha$ -спираль	[50, 54]
VacA	<i>Helicobacter pylori</i>	95	"-	?	6	$\alpha$ -спираль	[55]
$\alpha$ -Гемолизин	<i>Escherichia coli</i>	117	"-	1-3	1	$\alpha$ -спираль	[62-64]
Гемолизин Sh1A	<i>Serratia marcescens</i>	162	"-	2,5-3	?	$\alpha$ -спираль	[68]
Листеролизин O	<i>Listeria monocytogenes</i>	58	"-	30-50	?	$\beta$ -слой	[73, 74]
Пневмолизин	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	52	"-	26	44	$\beta$ -слой	[78, 79]
$\alpha$ -Гемолизин	<i>Staphylococcus aureus</i>	33,2	"-	1-1,4	7	$\beta$ -слой	[83, 84]
Гемолизин II	<i>Bacillus cereus</i>	42	"-	1,2-1,6	6-8	$\beta$ -слой	[95, 96]
Аэролизин	<i>Aeromonas hydrophila</i>	52	"-	?	7	$\beta$ -слой	[100, 102]
$\alpha$ -Токсин	<i>Clostridium septicum</i>	46,5	"-	1,3-1,6	6	$\beta$ -слой	[103]

См. продолжение табл.

Окончание табл.

1	2	3	4	5	6	7	8
VCC	<i>Vibrio cholerae</i>	80	-"	1,4-2,5	7	β-слой	[104]
Лейкоидин (LukF и LukS)	<i>Staphylococcus aureus</i>	34,3 и 32,5	Основной фактор патогенности, получения питательных веществ из клеток хозяина, увеличение ареала обитания и подавление иммунитета хозяина	2,1	8	β-слой	[105, 106]
γ-Гемолизин (LukF и γHLLI)	<i>Staphylococcus aureus</i>	34,3 и 32,5	Основной фактор патогенности, получения питательных веществ из клеток хозяина, увеличение ареала обитания	2,5	7	β-слой	[107, 108]
Гемолизин E	<i>Escherichia coli</i>	34	-"	4,2-5,2	8	β-слой	[113]
Летальный LF и отечный EF токены (PA <sub>83</sub> )	<i>Bacillus anthracis</i>	83	Основной фактор патогенности, получения питательных веществ из клеток хозяина, увеличение ареала обитания и снижение иммунитета хозяина	3,5	7	β-слой	[114, 116]
Низин	<i>Lactococcus lactis</i>	3	Антимикробная	1-2 нм	5-8	Циклическая	[122, 123]
Виропорин p7	Вирус гепатита С	6,3	Проникновение в клетки и высвобождение вирусных частиц	?	7	α-спираль	[126, 127]

\*N – количество субъединиц в поре.

\*\*? – размер пор или количество субъединиц формирующих эти поры неизвестны.

Повторение информации, написанной в предыдущей строке, обозначено как «-».

и является антибактериальным пептидом. В свободном состоянии белок находится в виде амфифильного мономера и имеет типичную структуру «спираль–поворот–спираль». При образовании пор обе N- и C-концевые спирали сначала располагаются параллельно мембране, затем C-концевые спирали 12-ти пептидов внедряются в мембрану и образуют пору [4].

К другому типу относят мелиттин-подобные пептиды, также обладающие антимикробным действием, но более высокой, по сравнению с секропин-подобными пептидами, гемолитической активностью. Они используются организмами как оружие для обездвиживания и умерщвления добычи, и вместе с тем для обороны от других животных и человека. Этот тип пептидов найден в яде пчел, ос, пауков, муравьев и скорпионов. Структурно это амфифильные  $\alpha$ -спиральные пептиды. Типичный представитель этой группы токсинов – мелиттин ( $H_2N$ -Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln- $CONH_2$ ) – основной цитотоксический компонент яда медоносной пчелы *Apis mellifera* [5]. Этот полипептид способен убивать клетки прокариотических организмов, а также лизировать все форменные элементы крови и клетки различных тканей эукариот. Цитолитическая активность мелиттина связана с его способностью формировать в мембранах поры с использованием амфифильной  $\alpha$ -спирали, образуемой двумя участками молекулы (остатки 1–10 и 13–26). В зависимости от вида жирнокислотных остатков, включенных в фосфолипиды, образующие бислой, а также от его фазового состояния и соотношения концентраций пептид/липид мелиттин связывается либо преимущественно параллельно плоскости мембраны, не образуя при этом поры, либо в перпендикулярной ориентации с образованием в дальнейшем трансмембранных пор [6]. В последнем случае молекулы мелиттина собираются вместе посредством «спираль–спираль» взаимодействия. При этом гидрофильная сторона спиралей направлена внутрь поры, а гидрофобная экспонирована в гидрофобную часть липидного бислоя. Диаметр пор, формируемых мелиттином, зависит от его концентрации и составляет 1–1,3 и 2,5–3 нм при отношении молярных концентраций токсин/липид 0,01 и 0,04, соответственно. Примерно 6–7 и 10–15 спиралей необходимо для образования пор с такими диаметрами [7, 8]. Такого рода поры, в которых внутренняя полость сформирована только белковыми мономерами, принято называть «бочкообразными». В более поздних исследованиях показано, что мелиттин, скорее всего, способен образовывать так называемые тороидальные поры, при формировании которых происходит инвагинация внеш-

него монослоя бислойной мембраны так, что гидрофильные головки липидного бислоя участвуют в формировании поры и оказываются направлены внутрь нее [9] (рис. 1В–Е). Участие липидов мембраны в формировании тороидальных пор приводит к тому, что поры, образованные 4–8 мономерами мелиттина, имеют внутренний диаметр 3,5–4,5 нм и внешний диаметр 7–8 нм [10]. В отличие от мелиттина, который способен образовывать как обычные «бочкообразные» поры, так и тороидальные поры, известны другие антибактериальные  $\alpha$ -спиральные пептиды, например, аламетицин, продуцируемый грибами *Trichoderma viride* (используемыми в качестве биофунгицида) [11], который формирует только «бочкообразные» поры из 6–10 молекул с внутренним диаметром для наибольшего агрегата 1,8 нм и внешним – 4 нм.

$\alpha$ -Спиральные пептиды, содержащиеся в яде пауков-хищников, которые используют парализующий яд для обездвиживания или умерщвления своей жертвы, играют основную роль не только в захвате, но и в переваривании жертвы. В яде пауков имеются токсины, которые разрушают мембраны клеток и приводят к некрозу тканей. Так в яде паука-волка (*Lycosa carolinensis*) найдены амфифильные  $\alpha$ -спиральные пептиды: ликотоксин I (IWLTALKFLGKHAANKHLAKQQLSKL-NH<sub>2</sub>) и ликотоксин II (KIKWFKTMKSIKFIKKEQMKKHLGGE-OH), которые образуют поры в мембранах и приводят к лизису прокариотических и эукариотических клеток (в частности бактериальные, дрожжевые клетки и эритроциты). Установлено, что они также индуцируют выход ионов Ca<sup>2+</sup> из синапсом мозга крысы и снижают электрохимический потенциал на мышечных мембранах насекомых. Таким образом, эти белки выполняют множественные функции: участвуя в захвате жертвы, ее переваривании, в защите от инфицирования микроорганизмами, присутствующих в теле жертвы, и в борьбе с внешними врагами [12].

Из яда паука *Oxyopes kitabensis* было выделено пять амфифильных  $\alpha$ -спиральных пептидов, названных оксиопининами, которые проявляют антимикробную, гемолитическую и инсектицидную активность, образуя ионные каналы в клеточных мембранах, а также нейротоксин – ингибитор натриевых каналов, названный окситоксином I [5]. Оксиопинин I состоит из 48 аминокислотных остатков и гомологичен с инсектицидным пептидом муравьев – понерицином L2 и антимикробным пептидом лягушки – дермасептином.

Из яда паука-каракурта (*Latrodectus tredecimguttatus*) был выделен  $\alpha$ -латротоксин. Мономер латротоксина имеет молекулярную массу 130 кДа. В отсутствие двухвалентных катионов белок находится



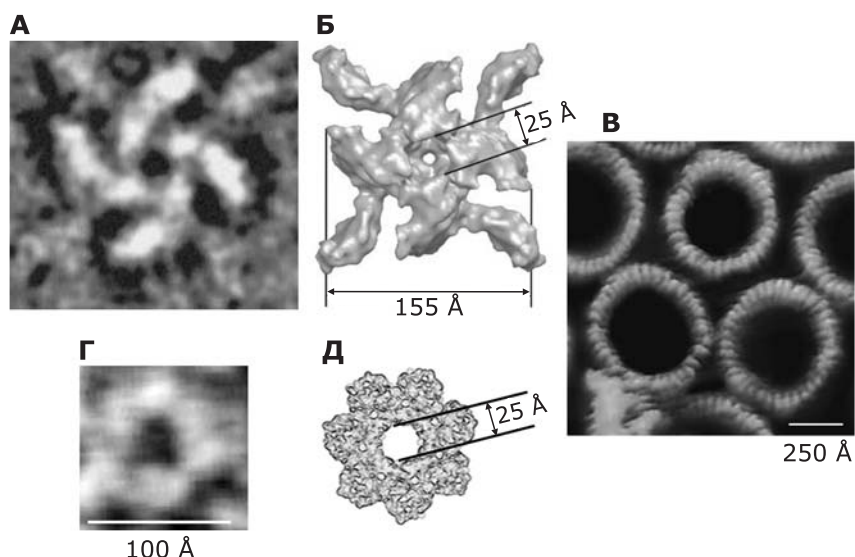


Рис. 2. Криоэлектронная микроскопия тетрамерной поры  $\alpha$ -латротоксина, сформированной в липосомальном бислое в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  (А) и ее 3D реконструкция (Б) [14]. Атомно-силовая микроскопия пор перфринголизина О (PFO) *Clostridium perfringens*, образованных в липидном бислое, содержащем холестерин (В) [155]. Электронная микроскопия поры гемолизина II *B. cereus* в липосомах (Г) и ее модель (вид сверху) (Д) [96].

в растворе преимущественно в форме димера, не способного образовывать пору. Добавление в среду ионов  $Ca^{2+}$  или  $Mg^{2+}$  в миллимолярной концентрации приводит к олигомеризации токсина до тетрамера. Именно в такой форме, в процессе формирования канала, он связывается с мембранами. Для его взаимодействия с клетками необходимо наличие мембранных рецепторов латрофилина или неурексина [13]. По данным криоэлектронной микроскопии структура канала имеет вид четырехлопастного «пропеллера» с внутренним диаметром 2.5 нм [14] (рис. 2А, Б). Процесс взаимодействия латротоксина с клеточными мембранами может осуществляться двумя путями. В первом случае, связываясь с рецептором, но не образуя собственные поры, токсин вызывает деполяризацию мембраны за счет ингибирования потенциалзависимых калиевых каналов и активации  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа. По всей вероятности, данный эффект реализуется посредством взаимодействия токсин-рецепторного комплекса с системой G-белков. Во втором случае токсин формирует катионселективные трансмембранные поры, проницаемые для ионов

кальция. Совокупный эффект действия  $\alpha$ -латротоксина на мембрану проявляется в усилении процесса экзоцитоза в окончаниях нервных клеток и массивному выбросу нейромедиаторов, что приводит к полному блоку нервно-мышечной передачи [15, 16].

Скорпионы, как и пауки, – активные хищники и в их яде обнаруживаются соединения, токсичные как для прокариот, так и для эукариот. Например, из яда скорпионов выделены два токсина – парабутопорин и опистопорин 1. Методом микролокального отведения токов показано, что они образуют в мембранах кардиомиоцитов неселективные поры с эффективным диаметром от 1.38 до 1.78 нм [17]. Пороформирующий антимикробный пептид  $\alpha$ -спиральной структуры – пандинин 2 (FWG ALAKGALKLIPSLFSSFSKKD) – был обнаружен в яде африканского скорпиона *Pandinus imperator*. Он проявляет гемолитическую активность. На первом этапе взаимодействия токсин связывается с мембранами клеток параллельно плоскости мембраны, в дальнейшем молекулы токсина образуют олигомеры, N-концевые районы которых, внедряясь в мембрану, формируют саму пору [18].

Морские актинии класса *Anthozoa* продуцируют яд, в состав которого входят пороформирующие цитотоксины, называемые актинопоринами. Актиния *Actinia equina* вырабатывает эквинатоксин II (Eqт-II), а *Stichodactyla helianthus* – стихолизин-II (St-II). Оба токсина имеют молекулярную массу около 20 кДа и свернуты в  $\beta$ -сэндвич, который окружен с двух сторон  $\alpha$ -спиралями. Токсины связываются с липидным бислоем, посредством кластера ароматических аминокислот, локализованных в петле на верхушке  $\beta$ -сэндвича и в C-концевой  $\alpha$ -спирали. Амфифильная N-концевая  $\alpha$ -спираль из 30 аминокислотных остатков, которая изначально располагается параллельно мембране, затем, не нарушая структуру  $\beta$ -сэндвича, встраивается в мембрану клеток и уже располагается перпендикулярно мембране. В конце этого процесса из спиралей трех или четырех мономеров формируется тороидальная трансмембранная пора. Актинопорины связываются преимущественно с мембранами, содержащими сфингомиелин и образуют катион-селективные поры. Актинопорины высокотоксичны для рыб и ракообразных. Они играют основную роль в защите актиний от нападения и в захвате жертв, которыми они питаются. У позвоночных животных эти токсины вызывают лизис эритроцитов, отек легких, сердечные приступы [19, 20].

Морской червь-немертина *Cerebratulus lacteus* секретирует токсин белковой природы А-III, состоящий из 95 аминокислот. Он представляет собой полипептидную цепочку, имеющую  $\alpha$ -спиральную структуру, стабилизированную тремя дисульфидными

связями. Предполагается, что треть С-концевой последовательности полипептида имеет структуру спиральной шпильки и участвует в формировании поры, увеличивая проницаемость мембран клеток различных видов, а также липосом различного липидного состава. По-видимому, токсин формирует поры большого диаметра, так как они хорошо проницаемы для высокомолекулярных белков. В сублитических концентрациях токсин ингибирует протеинкиназу С и угнетает потенциал-зависимые натриевые и кальциевые каналы нервной и сердечно-сосудистой систем [21].

Пардаксин – пептид, лизирующий мембраны, выделен из слизистых желез рыб *Pardachirus marmoratus*, которые секретируют его для отпугивания хищных рыб, таких как акулы. Мишенью пардаксина являются жабры рыб. При низких концентрациях он вызывает раздражение, а при высоких – гибель. Пардаксин также убивает бактерии и способен лизировать эритроциты, действуя на липидный бислой клеточной мембраны. Этот токсин состоит из 33 аминокислотных остатков (G-F-F-A-L-I-P-K-I-I-S-S-P-LF-K-T-L-L-S-A-V-G-S-A-L-S-S-G-G-Q-E) и представляет собой амфифильный  $\alpha$ -спиральный пептид со структурой «спираль–поворот–спираль». В центре петли, разделяющей две спирали, находится пролин Pro<sub>13</sub>, по которому происходит изгиб молекулы. Для проявления избирательности действия этого пептида важен состав липидного компонента мембран. В зависимости от состава липидов, амфифильные С-концевые спирали нескольких мономеров токсина располагаются либо параллельно плоскости мембраны, образуя так называемый «ковер», либо внедряются в бислой и формируют «бочкообразную» пору. В первом случае мембрана подвергается деструкции за счет образования в ней локальных дефектов. Во втором – сформированные поры вызывают лизис клетки. Холестерин и анионные липиды подавляют способность этого токсина разрушать липидные бислои [22].

В коже шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) обнаружен  $\alpha$ -спиральный полипептид магаинин, состоящий из 23 аминокислотных остатков (NH<sub>2</sub>-Gly-Ile-Gly-Lys-Phe-Leu-His-Ser-Ala-Lys-Lys-Phe-Gly-Lys-Ala-Phe-Val-Gly-Glu-Ile-Met-Asn-Ser-CONH<sub>2</sub>), который проявляет антибактериальную, противогрибковую и противоопухолевую активность. Этот токсин образует только тороидальные (белково-липидные) поры с внутренним диаметром 3–5 нм и внешним 7–8 нм, состоящих всего из 4–7 мономеров магаинина [6, 23].

### β-ПОРОФОРМИРУЮЩИЕ БЕЛКИ ЭУКАРИОТ

Многие эукариотные организмы продуцируют β-пороформирующие белки. Так в яде змей содержатся β-пороформирующие токсины. Введение яда в жертву приводит к её обездвиживанию и гибели, а также способствует её перевариванию. Змеи питаются разнообразной пищей: насекомыми, ящерицами, лягушками, птицами, грызунами, а морские змеи – рыбой. Яд кобры вызывает некроз тканей, и процесс заживления ран у выживших протекает очень медленно. Кардиотоксин СТХА3 из яда тайваньской кобры взаимодействует с мембранами клеток и образует поры. Он способен лизировать эритроциты и индуцировать некроз кардиомиоцитов [24, 25]. Это β-слоистый основной полипептид, состоящий из 62 аминокислотных остатков. В яде змей содержатся также токсины, обладающие антибактериальным действием. В яде бразильской змеи *Bothrops jararacussu* найден миотоксин II, который при взаимодействии с бактериальными мембранами индуцирует образование пептидгликановых пор [26]. Наличие в яде змей антимикробных токсинов можно объяснить тем, что ядовитые железы эволюционно связаны со слюнными железами. При этом антибактериальные свойства впрыснутого яда позволяют предотвратить рост бактерий, содержащихся в проглоченной жертве [27].

Пороформирующие антимикробные пептиды являются частью иммунной системы млекопитающих. Так из лейкоцитов свиней выделен β-слоистый антимикробный пептид протегрин, состоящий из 18 аминокислот (NH<sub>2</sub>-Arg-Gly-Gly-Arg-Leu-Cys-Тур-Cys-Arg-Arg-Arg-Phe-Cys-Val-Cys-Val-Gly-Arg-CONH<sub>2</sub>). Он убивает различные виды бактерий и грибов. Кроме прокариотических клеток, протегрин способен лизировать мембраны человеческих эритроцитов. Однако, он не активен против эритроцитов овцы и козы. Избирательность токсина объясняется различием липидного состава клеточных мембран. Содержание положительно заряженного фосфатидилэтаноламина варьирует от ~33% для эритроцитов человека до ~68% для овцы и козы. Наличие отрицательно заряженных фосфолипидов и липополисахаридов в мембранах прокариот обуславливают их повышенную чувствительность к токсину [28]. Протегрин имеет структуру β-шпильки с одним поворотом, а четыре цистеина формируют две дисульфидные связи, которые стабилизируют структуру β-слоя. Он образует тороидальные слабо анион-селективные каналы с внутренним диаметром 2,1 нм и внешним 4,2 нм из 4–5 NCCN параллельных димеров [29–31].

Интереснейшими представителями порообразующих белков, функционирующих в составе иммунной системы млекопитающих,

являются перфорины. Перфорины позвоночных животных (в том числе и человека) – растворимые, порообразующие белки, секретируемые цитолитическими лимфоцитами (CTL и NK) и способные убивать как патогенные микроорганизмы, так и клетки своего организма – раковые клетки и клетки, пораженные вирусами [32]. Впервые перфорины были описаны в 1985 г. [33, 34]. Последние исследования показали, что человеческий перфорин синтезируется в форме предшественника с молекулярной массой ~67 кДа (555 аминокислотных остатков), который имеет N-концевой сигнальный пептид из 21 аминокислоты. Белок становится активным только после удаления сигнального пептида и дополнительного отщепления гликозилированного C-концевого пептида цистеиновой протеазой. Перфорины имеют сложную доменную структуру, консервативную для перфоринов позвоночных животных. Молекула мономера зрелого белка имеет L-образную форму и демонстрирует высокую степень структурного сходства с холестерин-зависимыми цитотоксическими бактериями [35, 36]. Удивительному сходству между этими пороформирующими токсинами микроорганизмов и белками защиты высших эукариот пока не найдены объяснения. Непонятно, были ли они обреты в результате горизонтального переноса генов или это результат конвергенции и сходства функций. C-конец зрелого белка содержит C<sub>2</sub>-домен, который участвует в Ca<sup>2+</sup>-зависимом связывании с фосфолипидными мембранами и в олигомеризации мономеров перфорины. Средняя часть молекулы имеет α-спиральную структуру, которая трансформируется в две антипараллельные β-шпильки, формирующие β-бочкообразную пору [37]. Перфорин образует поры с эффективным диаметром 5–20 нм. По данным электронной микроскопии, у поры из 20 субъединиц: внутренний диаметр ~10 нм, внешний 20 нм, а высота около 16 нм. По современным представлениям перфорины совместно с гранзимами (серпиновыми протеазами) посредством экзоцитоза высвобождаются из цитотоксических гранул (модифицированных секреторных лизосом) лимфоцитов в иммунологический синапс – зону тесного контакта, образуемую лимфоцитом между своей мембраной и мембраной клетки-мишени. Далее перфорин обеспечивает доставку молекул гранзимов в цитоплазму клетки-мишени, где гранзимы инициируют процессы апоптоза. Существует несколько предположений о механизме доставки гранзимов. Согласно одному из них перфорины, олигомеризуясь на мембране клетки-мишени, образуют поры, проницаемые для гранзимов. Процесс пороформирования зависит от наличия в среде ионов кальция, и сформированные поры проницаемы для Ca<sup>2+</sup>. В

соответствии с более поздними представлениями, на первом этапе молекулы перфорины и гранзимов связываются с мембраной, затем перфорин формирует поры, что увеличивает концентрацию ионов  $Ca^{2+}$  в цитозоле клетки-мишени и активирует процесс эндоцитоза. Далее перфориновые олигомеры и молекулы гранзимов проникают внутрь клетки в составе эндосом. Однако при этом остается неясным, каким образом перфорин высвобождает гранзимы с их выходом в цитоплазму [38].

Интересен механизм, посредством которого лимфоцитарные клетки защищают от действия перфорины собственные мембранные структуры. Предполагается, что, синтезированный в эндоплазматическом ретикулуме перфорин связывается со своим ингибитором калретикулином. Затем с помощью аппарата Гольджи он транспортируется в цитотоксические гранулы, где совместно с гранзимами образует комплекс с протеогликаном – серглицином. Таким образом, молекулы перфорины постоянно находятся в связанном состоянии, при этом кислая среда внутри гранулы (рН 5.1–5.4) способствует его дополнительной инактивации. Имеет значение и то, что в объеме гранулы ионы кальция, необходимые перфорины для взаимодействия с липидами и олигомеризации, также находятся в связанном состоянии. Протеолитическое отщепление С-концевого пептида, необходимое для активации перфорины, происходит, однако, скорее всего, внутри гранулы, так как эта реакция требует пониженного рН (5.1–5.2). После того, как перфорин попадает в иммунологический синапс, под действием нейтрального рН (7.4–7.5) он отделяется от серглицина и становится полностью активным. Чтобы объяснить, каким образом защищена наружная лимфоцитарная мембрана, предложена гипотеза, согласно которой молекулы перфорины на ее поверхности расщепляются протеазами, связанными с мембранами [39].

В последнее время тщательно и разносторонне изучению подвергаются дефенсины – пептиды эукариот, являющиеся важным фактором врожденного иммунного ответа. У высших многоклеточных эти низкомолекулярные пептиды (~5 кДа) обеспечивают первоначальный антимикробный барьер слизистых оболочек глаза, дыхательных путей и кожи. В тоже время, эти пептиды обнаружены у самых разнообразных групп эукариот, от одноклеточных грибов до растений, насекомых и млекопитающих [40]. Предполагается, что все дефенсины имеют общее эволюционное происхождение и служат древнейшим способом защиты клеток. Дефенсины демонстрируют широкий спектр антипатогенных свойств. Они активны против грам-положительных, грам-отрицательных бактерий, грибов, а также против

некоторых вирусов, являясь естественными антибиотиками широкого спектра действия. Механизмы действия дефенсинов многообразны и еще не до конца изучены. Однако известно, что некоторые из этих положительнозаряженных пептидов могут убивать бактерии, разрушая их мембраны путем формирования пор. Взаимодействие дефенсинов с мембранами не требует наличия рецептора, однако, благодаря положительному заряду, пептиды связываются с анионными липидами клеточной поверхности, такими как фосфатидилглицерол и кардиолипин, которые широко распространены в микроорганизмах. Клеточная мембрана млекопитающих, напротив, состоит главным образом из незаряженных фосфолипидов, таких как фосфатидилхолин и сфингомиелин, что обуславливает крайне слабое влияние дефенсинов на клетки млекопитающих [41, 42].

У позвоночных существуют три типа дефенсинов:  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\theta$ -дефенсины. В организме человека они синтезируются в ацидофильных клетках кишечника, нейтрофилах и клетках слизистых оболочек. У всех трех типов преобладает  $\beta$ -складчатая структура, имеются шесть цистеинов, которые образуют дисульфидные связи и стабилизируют структуру. При этом в  $\alpha$ -дефенсинах дисульфидные мостики образованы между первым и шестым цистеинами ( $\text{Cys}^1\text{--Cys}^6$ ), вторым и четвертым ( $\text{Cys}^2\text{--Cys}^4$ ), третьим и пятым ( $\text{Cys}^3\text{--Cys}^5$ ); тогда как в  $\beta$ -дефенсинах связи образованы между  $\text{Cys}^1\text{--Cys}^5, \text{Cys}^2\text{--Cys}^4, \text{Cys}^3\text{--Cys}^6$ .  $\theta$ -дефенсины имеют циркулярную структуру и соединены в следующих позициях  $\text{Cys}^1\text{--Cys}^6, \text{Cys}^2\text{--Cys}^5, \text{Cys}^3\text{--Cys}^4$ . Показано, что человеческий дефенсин  $\alpha$ -1 формирует высокопроводящие поры в мембранах паразита *Trypanosoma cruzi*. Диаметры пор варьируют от 3 до 200 нм с выраженным пиком 10–20 нм. Одиночные поры, образованные мономерами пептида, имеют тенденцию к взаимному сливанию, что объясняет разнообразие их размеров. Помимо порообразующей активности человеческий дефенсин  $\alpha$ -1 индуцирует фрагментацию ДНК трипаносомальной клетки и, таким образом, обладает бинарным действием [43]. Лучше всего изучена кристаллическая структура  $\beta$ -дефенсина hBD2 (рис. 3А) [44]. Элементарная кристаллическая ячейка содержит два октамерных ансамбля, каждый из которых сформирован четырьмя димерами дефенсина. Октамер имеет геометрические параметры около  $25\text{\AA} \times 25\text{\AA} \times 50\text{\AA}$ . В концентрированных растворах hBD-2 присутствует главным образом в виде димеров, хотя выявляются в небольшом количестве и агрегаты более высокого порядка. Для формирования потенциальных пор необходима мембрана. Поры, образованные hBD-2, хорошо проницаемы для низкомолекулярных (400 Да) веществ,

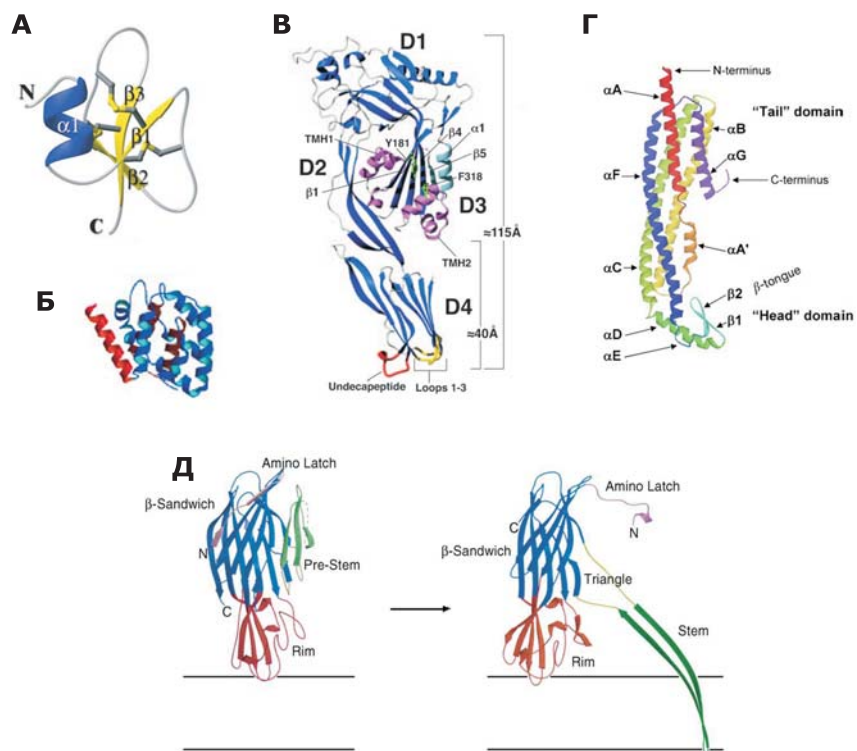


Рис. 3. Трехмерная структура человеческого дефенсина hBD2 (А). Молекула состоит из трехцепочечного антипараллельного  $\beta$ -слоя и одной  $\alpha$ -спирали, фланкирующей  $\beta$ -слой. Структуру стабилизируют три дисульфидных связи [44]. Структура пороформирующего домена (С-домен) колицина E1 (Б). Пороформирующий домен изображен синим цветом, гидрофобная шпилька – коричневым и  $\alpha$ -спираль, которая соединяет представленный домен с остальными доменами – красным цветом [47]. Кристаллическая структура перфринголизина O (PFO) *Clostridium perfringens* (В). Показана локализация амфифильных трансмембранных  $\beta$ -шпилек – ТМН1 и ТМН2 (розовым цветом), три петли домена 4 (желтым), ундекапептид (красным), аминокислотные остатки Y181 и F318 (зелёным),  $\beta 5$ - $\alpha 1$  (светло-голубым). Обозначены  $\beta$ -цепи  $\beta 1$  и  $\beta 4$  третьего домена кора  $\beta$ -слоя и домены с первого по четвертый – D1–D4 [70]. Структура водорастворимого мономера HlyE *Escherichia coli* (Г). Обозначены хвостовой (tail) и головной (head) домены, N- и C- концы [113]. Структуры водорастворимого мономера  $\alpha$ -гемолизина и протомера из гептамерного комплекса  $\alpha$ -гемолизина *S. aureus* (Д). Схематически представлено конформационное изменение  $\alpha$ -гемолизина во время пороформирования. Основные домены выделены различными цветами: престеблевой (pre-stem) и стеблевой (stem) домены изображены зелеными, краевой (rim) – темно-красным и  $\beta$ -сэндвич ( $\beta$ -sandwich) домен – синим цветом. Амино-застежка (amino latch) изображена розовым цветом, треугольный район (triangle) – желто-серым [84]. На всех рисунках  $\alpha$ -углеродный остов выполнен при использовании Ribbon графики.



но транспорт через них высокомолекулярных веществ ( $> 3000$  Да) затруднен, хотя и возможен. Очень интересно сходство структуры hBD-2 со структурами пептида из яда утконоса [45] и двух токсинов актиний, хотя функция этих белков в соответствующих организмах существенно отличается от защитной функции дефенсина. (База данных по дефенсинам – <http://defensins.bii.a-star.edu.sg/>)

Таким образом, разнообразные функции пороформирующих токсинов, как отмечалось в начале обзора, определяют преимущества различных организмов в процессах, связанных с его адаптацией к среде обитания. Часть этих процессов направлено на защиту от внешних врагов, в том числе и от патогенных микроорганизмов, часть – на добывание пищи, ее переваривание, что приводит к увеличению ареала обитания и численности популяции. Кроме того, существенным является участие пороформирующих токсинов в обеспечении иммунитета эукариот, которое заключается в способности убивать клетки своего организма, пораженные вирусами или являющиеся раковыми клетками [32].

#### $\alpha$ -ПОРОФОРМИРУЮЩИЕ БЕЛКИ ПРОКАРИОТ

К настоящему времени известны многие порообразующие цитолизины, которые продуцируются как грам-положительными, так и грам-отрицательными микроорганизмами.

Типичным представителем  $\alpha$ -пороформирующих токсинов являются колицины. Колицины – это семейство антимикробных белков (мол. масса 60–80 кДа), которые секретируются энтеробактериями в условиях стресса, вызванного нехваткой питательных веществ или перенаселенностью, и убивают клетки чувствительных к ним бактериальных штаммов.

По механизму своего летального действия эти токсины подразделяют на две группы. В одну входят колицины, формирующие ионные каналы в цитоплазматической мембране, например, E1, а в другую – токсины, ингибирующие белковый и пептидогликановый синтез и вызывающие деградацию нуклеиновых кислот клетки (например, E2 и E3). Колицины связываются с рецепторами – белковыми компонентами наружных мембран (которые в норме осуществляют транспорт различных питательных веществ) и таким образом транслоцируются через внешнюю мембрану в периплазматическое пространство чужеродного микроорганизма. Например, E1, который первоначально связывается с витаминным рецептором VtuB [46]. Для транслокации через внешнюю мембрану колицины группы, в которую входит E1, используют Tol-систему, а колицины второй группы используют Top-систему атакуемых клеток. После транслокации в периплазм-

матическое пространство через TolC-канал, сформированный из трех молекул белка, колицин связывается с внутренней мембраной и формирует потенциал-зависимый ионный канал.

Колицин E1 состоит из трех функциональных доменов. Средняя часть молекулы ответственна за связывание с рецептором, N-концевой домен за транслокацию белка к внутренней мембране и C-концевой (более гидрофобный домен) формирует канал (рис. 3Б) [47]. При транслокации в составе молекулы токсина C-концевой домен находится в развернутом виде. Канал образуется одной молекулой колицина. C-концевой домен включает в себя 137 аминокислотных остатков и в нем можно выделить 5–6 амфифильных  $\alpha$ -спиральных сегментов, которые внедряются в липидный бислой и формируют канал [48]. На модельных мембранах было показано, что колицин E1 формирует поры с двумя уровнями проводимости долгоживущим  $\sim 60$  пСм и короткоживущим  $\sim 600$  пСм в 1 М КСl. Вероятность включения того или иного подсостояния канала зависит от толщины гидрофобного слоя мембраны. Так в «тонких» мембранах формируются преимущественно низкоуровневые каналы с диаметром 0,8 нм, а в более «толстых» мембранах – более крупные, диаметром 1,6 нм. Так как селективность каналов определяется преимущественно видом липидов, из которых формировалась мембрана, то по мнению авторов [48], колицин формирует тороидальные поры, в которых кроме белка в формировании стенок канала участвуют и липиды. В формировании низкопроводящих пор может участвовать меньшее количество  $\alpha$ -спиралей, чем при формировании более крупных пор [49]. Колицин E1 убивает клетки путем формирования ионных каналов во внутренней мембране. Бактериальные клетки, продуцирующие колицин, защищены от «самоубийства» одновременным синтезом белка, который связывается с колициновым C-концевым доменом, нейтрализуя тем самым его активность.

*Corynebacterium diphtheriae*, вызывающая дифтерию, тоже синтезирует пороформирующий токсин, который используется бактерией для атаки макроорганизма и ответственен за разрушение тканей. Дифтерийный токсин (58,3 кДа) синтезируется в виде полипептида и состоит из двух фрагментов – А и В, соединенных дисульфидной связью. Фрагмент А является N-концевым каталитическим доменом (С). Фрагмент В включает в себя домен, связывающий рецептор (R) и трансмембранный домен (Т) [50]. Токсин проникает в клетку эндоцитозом, опосредованным рецептором. При кислых значениях рН $\sim 5.5$  внутри образованных эндосом индуцируются конформационные изменения токсина, способствующие его внедрению в мембрану и

образованию в ней поры. Последующая транслокация каталитического домена в цитозоль клетки ведет к ее гибели в результате инактивации белкового синтеза. Домен Т состоит из 10 спиралей, три из которых – 5, 8 и 9-ая участвуют в образовании поры [51]. В зависимости от концентрации токсина канал может быть сформирован либо мономером [52], либо при увеличении концентрации – несколькими молекулами токсина [53]. По три  $\alpha$ -спирали домена Т от каждой из четырех собранных вместе молекул токсина внедряются в мембрану и формируют канал. Канал, сформированный тетрамером дифтерийного токсина обеспечивает транспорт домена С в клетку, а затем происходит дисульфидредуктазное разделение двух цепей и выход каталитического домена в цитозоль [54].

Одним из основных вирулентных факторов, секретируемых *Helicobacter pylori*, который может поселяться в слизистой оболочке желудка и вызывать у человека хронические гастриты, язвы желудка, рак, опухоль лимфатической ткани, является цитотоксин VacA. Этот белок с молекулярной массой 95 кДа образует при нейтральных рН водорастворимый комплекс в форме цветка, состоящий из двух гексамеров. При рН 5 и ниже VacA взаимодействует с отрицательно заряженными липидными бислоями. Первоначально, при низких рН водорастворимый комплекс диссоциирует до мономеров, и белок VacA вновь олигомеризуется, но уже в гексамерные комплексы, связывающиеся с мембраной и образующие пору.

Формирование пор на мембранах олигомерами VacA напрямую связано с его токсическим действием на клетки хозяина [55]. В мономере VacA выделяют два домена, соединенных петлей, чувствительной к протеазам. N-концевой домен молекулярной массой 37 кДа с 150 аминокислотами из C-концевого домена являются цитотоксическими, а C-концевой домен (58 кДа) связывается на клеточной мембране с рецепторподобным белком тирозинфосфатаза  $\beta$  [56]. Аминоконцевой  $\alpha$ -спиральный гидрофобный район, существенный для пороформирования, имеет шесть остатков глицина и три tandemных GxxxG мотива, которые необходимы для сборки гомогексамерного канала. Токсин формирует анионселективные каналы и может приводить к образованию эндосом [57]. Формирование каналов в клеточных мембранах вызывает осмотическое разбухание, диссипацию митохондриального потенциала и апоптоз. Формирование каналов в плазматической мембране клеток желудка позволяет бактериям получить доступ к потенциальным метаболическим субстратам, находящимся в цитозоле клеток хозяина, таким, например, как пируват и  $\text{HCO}_3^-$  [58].

Грам-отрицательные бактерии *Escherichia coli* часто являются причиной внекишечных заболеваний, таких как инфекции мочевого тракта, пневмония, менингит, которые иногда приводят к сепсису. Непосредственной причиной этих заболеваний является  $\alpha$ -гемолизин – это 117 кДа токсин, секретируемый вирулентными штаммами этих бактерий.  $\alpha$ -Гемолизин – член семейства RTX (repeats in toxin), которое сгруппировано исходя из механизма формирования поры, с учетом гомологии белков. Это семейство токсинов, в которое входят лейкотоксин *Pasteurella haemolytica*, гемолизин и лейкотоксин *Actinobacillus*, гемолизины *Bordetella pertussis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii* и *Moraxella bovis* [59] и др. Члены семейства обладают общей структурной особенностью – их С-концевой домен содержит ряд нанопептидных тандемно расположенных повторов с консенсусной последовательностью X-Leu-X-Gly-Gly-X-X-Gly-Asp-Asp-Asp, которая богата аминокислотными остатками глицина и аспартата. Аминокислоты, которые формируют данные повторы, участвуют в связывании кальция. У  $\alpha$ -гемолизина в таком домене находится His859, который играет основную роль в связывании кальция. В растворе белок находится в виде мономера, который склонен к агрегации. Мономер  $\alpha$ -гемолизина может обратимо связываться с мембраной в отсутствие ионов кальция, но только в комплексе с ионом  $Ca^{2+}$  белок способен конформационно изменяться и пронизывать мембрану [60].  $\alpha$ -Гемолизин действует на эритроциты в значительно меньших концентрациях, чем на липосомы, так как эритроцитарные мембраны содержат мембранный белок гликофорин, который является рецептором для  $\alpha$ -гемолизина. Гемолизин связывается с рецептором при помощи участка около С-концевой области белка (914–936 аминокислоты), который консервативен для всех представителей семейства RTX [61]. Связь с мембранами осуществляется и без рецептора, но только при более высоких концентрациях белка. Найдено, что рецептор улучшает связывание в сотни раз. Еще одной общей структурной особенностью RTX-токсинов является присутствие в их N-концевой части девяти амфифильных  $\alpha$ -спиралей включающей 21 аминокислотный остаток, которые пронизывают мембрану клеток и формируют трансмембранную пору. Установлено, что пора формируется одной либо несколькими молекулами токсина [62]. Диаметр катионселективной поры в зависимости от разных условий и разного фосфолипидного состава мембран составляет 1–3 нм [63, 64]. Гемолизины семейства RTX не содержат в своей структуре сигнального пептида и секретируются с участием специфических белков [65].

Порообразующие токсины, характерные для микроорганизмов семейства *Serratia* [66] в отличие от RTX-токсинов имеют типичный

сигнальный пептид и не требуют ионов кальция или других кофакторов для проявления своей активности. Токсины этого семейства обнаружены в патогенных грам-отрицательных бактериях, способных вызывать тяжелые заболевания человека. Например, *Serratia marcescens* и *Proteus mirabilis* причастны к заболеваниям уринарного тракта, *Haemophilus ducreyi* – к образованию язв на гениталиях, *Yersinia pestis* известен как возбудитель бубонной чумы и пневмонии, *Yersinia enterocolitica* поражает желудочно-кишечный тракт. Кроме того, микроорганизмы семейства способны поражать насекомых (*Photobacterium luminescens*) и растения (*Xylella fastidiosa*). Наиболее изученным представителем пороформирующих токсинов можно считать гемолизин Sh1A с молекулярной массой 162 кДа, который продуцируется *Serratia marcescens*. Транспорт вновь синтезированного токсина из периплазмы во внешнюю среду осуществляется с помощью 60 кДа белка Sh1B, расположенного во внешней мембране. При взаимодействии Sh1B с Sh1A, молекула токсина конформационно изменяется и переходит в активную форму [67]. Наибольшей гемолитической активностью обладают мономеры и частично димеры. Агрегаты с большим числом молекул, например тетрамеры, утрачивают активность полностью. По всей вероятности, мономеры токсина вначале связываются с мембраной, затем олигомеризуются в плоскости липидного бислоя и образуют пору из  $\alpha$ -спиралей с функциональным диаметром 2,5–3 нм [68]. В модельных планарных бислоях мембран токсин формирует неселективные, потенциалнезависимые поры со средней проводимостью 1200–1400 пСм в 1М КСl. Для взаимодействия с мембранами и образования пор токсин не нуждается в присутствии какого-либо белкового рецептора, однако, наличие фосфатидилсерина в составе моноламеллярных везикул усиливает его активность. Считается, что отсутствие фосфатидилсерина в составе мембран прокариотических клеток может объяснить почему Sh1A их не лизирует [69].

#### β-ПОРОФОРМИРУЮЩИЕ БЕЛКИ ПРОКАРИОТ

β-Складчатые каналобразующие цитолизины встраиваются в мембрану с образованием пор за счет доменов, имеющих укладку β-листа. Амфипатичные β-шпильки цитолизинов, собранных вместе, образуют β-бочку с гидрофильной внутренней и гидрофобной внешней поверхностью, которая взаимодействует с мембраной.

К этим цитолизинам относятся холестерин-зависимые токсины, такие как, листериолизин О – основной вирулентный фактор *Listeria monocytogenes* микроорганизма, вызывающего листериозисы, вклю-

чая менингиты, энцефалиты, внутриматочные инфекции, стрептолизин О (Slo) *Streptococcus pyogenes* – стрептококковые инфекции кожи, пневмолизин О (Ply) *Streptococcus pneumoniae*, являющийся возбудителем менингита, среднего отита, синусита, пневмонии, перфринголизин О *Clostridium perfringens*, который вызывает некроз тканей, газовую гангрену [70], антролизин О *Bacillus anthracis* – возбудитель сибирской язвы [71] и другие. Последний из них способен убивать лейкоциты, лимфоциты, фагоциты, нейтрофилы, моноциты, макрофаги, тем самым, ослабляя иммунитет хозяина [72].

Для всех холестерин-зависимых цитолизинов характерно: абсолютная зависимость связывания с мембраной от присутствия в ней холестерина и формирование необычно больших пор с внутренним диаметром от 30 до 50 нм. Это наиболее крупные поры, которые проницаемы не только для отдельных ионов, но и для белков, потеря которых приводит к стремительному коллоидно-осмотическому лизису клетки. Токсины секретируются во внеклеточную среду в виде растворимого мономера. Сталкиваясь с эукариотической клеткой, мономеры связываются с холестерином клеточной мембраны, латерально диффундируют в ней и образуют олигомеры. Далее формируется мембраносвязанный препоровый комплекс большого размера в виде кольца, в котором « $\beta$ -бочка» еще не внедрена в мембрану, в конечном итоге, образуется поровый комплекс встроенный в мембрану (рис. 2В, рис. 4А) [73].

В составе молекул токсинов этого типа содержатся один или несколько цистеиновых аминокислотных остатков, чьи SH-группы играют важную роль в их взаимодействии с мембраной. На активную роль сульфгидрильных групп указывает тот факт, что специфические SH-блокирующие реагенты ингибируют цитолитическое действие токсина, а при последующей обработке тиолами или другими восстанавливающими агентами токсин приобретает исходную активность. Эти токсины инактивируются внеклеточным холестерином. Ингибиторный эффект холестерина обусловлен тем, что он занимает рецептор-связывающий сайт в молекуле токсина, припятствуя его связыванию с мембранным холестерином. Снижение концентрации холестерина в мембранах приводит к блокированию перехода препорового комплекса в поровый, т.е. предотвращает внедрение трансмембранной « $\beta$ -бочки» в мембрану [70].

Листерииолизин О, белок с молекулярной массой 58 кДа, является единственным представителем этого семейства, у которого пороформирующая активность зависит от pH среды. Листерииолизин О проявляет низкую цитолитическую активность при нейтральных

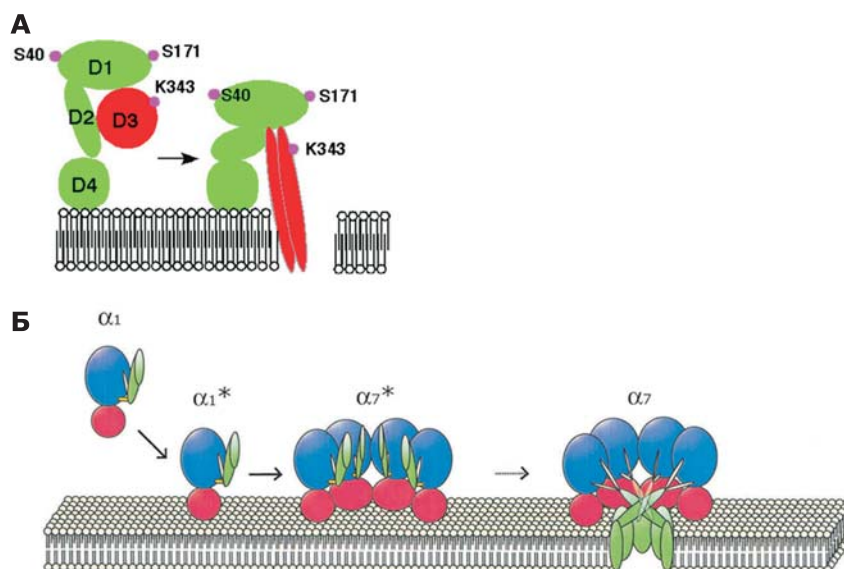


Рис. 4. Схема конформационного изменения мономера перфринголизина O *Clostridium perfringens* при переходе из стадии препоры в стадию проводящей поры (А). Подписаны основные домены: D1, D2, D3, D4, указана локализация некоторых аминокислотных остатков [73]. Стадии ( $\alpha 1$ – $\alpha 7$ ) формирования поры  $\alpha$ -гемолизином *S. aureus* (Б). Водорастворимый мономер ( $\alpha 1$ ) связывается с мембраной с помощью краевого домена ( $\alpha 1^*$ ), затем следует образование препоры ( $\alpha 7^*$ ) и наконец формируется гептамерная пора ( $\alpha 7$ ). Основные домены обозначены различными цветами: престолевого и стеблевой домены изображены зелеными, краевой – темно-красным,  $\beta$ -сэндвич домен – синим цветом, треугольный район – серым. Для удобства рассмотрения на стадиях гептамерной препоры ( $\alpha 7^*$ ) и гептамерной поры ( $\alpha 7$ ) изображено только четыре протомера [88].

pH, и значительную активность при pH 5,5. В отличие от других токсинов, зависимых от pH, его пороформирующая активность контролируется быстрой и необратимой денатурацией структуры при нейтральных pH и повышении температуры выше 30°C. Начало быстрой денатурации при нейтральных pH проявляется в разворачивание домена 3 трансмембранной  $\beta$ -шпильки, структура которой в норме формирует « $\beta$ -бочку». Триада аминокислотных остатков внутри домена 3 функционирует как pH сенсор и инициирует денатурацию листериолизина, дестабилизируя структуру домена 3.

Листериолизин O – пороформирующий токсин, и подобно другим членам семейства цитолизин, зависимых от холестерина, его мономеры олигомеризуются в большой пороформирующий комп-

лекс. Мономеры связываются с мембраной и олигомеризуются в препору с последующим внедрением в мембрану и формированием «β-бочки» поры [74]. Листеролизин О необходим бактерии для ее проникновения в цитоплазму эукариотической клетки. Бактериальная клетка внутри фагосомы проникает внутрь эукариотической клетки, затем синтезирует токсин, который активен при низких pH. Токсин образует поры и, в конечном итоге, происходит высвобождение бактерии в цитоплазму. В цитоплазме активность токсина понижается, поэтому клетка не погибает вследствие повреждения мембраны, а дает бактерии возможность проникнуть внутрь клетки и там размножиться, питаясь ее содержимым. Внутри клетки хозяина при субоптимальных pH токсин все же способен образовывать в мембранах, насыщенных холестерином, поры, проницаемые для катионов кальция. Кальций-зависимым клеточным ответом является индукция апоптоза. Размножившиеся бактерии выходят из клетки и процесс повторяется снова с другими клетками [75].

Другой представитель холестерин-зависимых цитолизинов – пневмолизин *Streptococcus pneumoniae*, который трансформируется из растворимого 52 кДа мономера в 30–50 субъединичную олигомерную пору. Токсин, как и все представители этого семейства, имеет структуру представленную на (рис. 3В). Мономер состоит из четырех β-структурных доменов с гидрофильной поверхностью. Первым взаимодействует с поверхностью мембраны четвертый домен, содержащий высококонсервативную последовательность (ECTGLAWEWWR). Именно этот участок молекулы взаимодействует с холестерином. Кроме того, в четвертом домене присутствуют L1–L3 петли, которые также необходимы для связывания с холестерином мембран [76]. Связывание петель с мембраной инициирует конформационные изменения в молекуле токсина и запускает процесс его олигомеризации [77], ведущий к образованию препоры, а дальнейшие конформационные изменения приводят к образованию поры. В структуре препоры четвертый домен располагается перпендикулярно к поверхности мембраны и связан со вторым доменом. В стадии препоры с мембраной взаимодействует только четвертый домен. Второй и третий домены связаны с первым и взаимодействуют между собой. Первый домен представляет собой стабильную структуру, к которой прикреплены все остальные мобильные домены. При формировании поры второй и третий домены расходятся, затем третий домен разворачивается и внедряется в мембрану. Этот домен мономера имеет два ряда из трех α-спиралей, которые при внедрение в липидный бислой трансформируются в β-цепи и образуют две β-шпильки. Четыре цепи



от каждого мономера собираются в большую трансмембранную «β-бочку». Переход из препоры в пору сопровождается большими конформационными изменениями. Каждый мономер имеет две амфифильные трансмембранные β-шпильки, которые вносят вклад в формирование поры. В случае пневмолизина пора содержит 44 субъединицы, имеет трансмембранную полость 26 нм в диаметре и состоит из 176 β-цепей, которые одновременно внедряются в мембрану и формируют стенку канала [78, 79].

К β-складчатым каналобразующим цитолизинам также относится группа токсинов аэролизинового типа, таких как α-гемолизин *Staphylococcus aureus*, аэролизин *Aeromonas hydrophila*, α-токсин *Clostridium septicum*, Vcc *Vibrio cholerae*, гемолизин II *Bacillus cereus*. Эти бактерии способны вызывать различные заболевания такие как дермо-некрозы, эндокардиты, пневмонию (*S. aureus*), мионекрозы, экземы, гастроэнтериты (*A. hydrophila*), газовую гангрену (*C. septicum*), холеру (*V. cholerae*), диаррейный и эметический синдромы, заболевания глаз, маститы (*B. cereus*).

Бактериальный экзотоксин α-гемолизин, секретируемый *S. aureus*, является водорастворимым мономером. Этот полипептид, состоящий из 293 а.о., имеющий молекулярную массу 33.2 кДа, формирует гомо-гептамерные поры в мембранах. Способность альфа-гемолизина формировать ионные каналы в бислойных липидных мембранах была обнаружена более 25 лет назад Красильниковым и коллегами [80, 81]. В модельных планарных липидных мембранах токсин индуцирует слабоанионные, потенциалнезависимые при нейтральных рН каналы, со средней проводимостью 110 пСм в 0.1 М КСl [82]. Гептамерный комплекс имеет грибовидную форму: шляпку, выступающую над плоскостью мембраны, и стебель, пронизывающий гидрофобную область. Высота сформированной поры – 10 нм, общий диаметр – 10 нм, внутренний диаметр ионпроводящего пути 1–1.4 нм [83, 84]. Стебель состоит из 14 цепей, имеющих β-структуру. N- и C-концевые части полипептидов формируют шляпку гриба, которая также, в основном, представлена β-структурой.

В современной модели сборки поры различают три стадии. Первая стадия – связывание находящейся в растворе мономерной формы α-гемолизина с мембраной за счет начального электростатического взаимодействия. Мономер чувствителен к протеолизу, и имеет два основных сайта расщепления. Первый сайт расположен в глицин-богатом центральном домене, впоследствии входящем в состав стебля, второй около N-конца. N-конец предотвращает преждевременную олигомеризацию мономеров в растворе и играет важную роль в

образовании поры. Делеция N-концевой части приводит к снижению активности белка и замедлению стадий формирования препоры и поры [85]. У мономера, связанного с мембраной, центральный район, но не N-концевой, становится устойчивым к протеолизу.

На второй стадии семь мономеров, находящихся в плоскости мембраны, олигомеризуются и формируют не обладающий литической активностью интермедиат – препору. Вначале препора чувствительна к додецилсульфату натрия (SDS), но в присутствии неденатурирующих детергентов (например, дезоксихолата) семь субъединиц остаются прочно связанными с мембраной. Далее, вследствие кооперативных взаимодействий внутри олигомера образуется препора, нечувствительная к SDS. На этой стадии центральные домены мономеров не заканчивают свое полное перемещение в гидрофобную среду липидного бислоя. Центральный домен играет главную роль во внедрении в мембрану. Получены мутанты с делецией в центральном домене. Они проявляют способность быстро гептамеризоваться, но не могут образовывать поры [86]. N-концевая часть остается чувствительной к протеолизу. Атомно-силовая микроскопия показывает, что препора ориентирована перпендикулярно мембранной поверхности [87].

На третьей, финальной стадии реализуется переход гептамерной препоры в полностью собранную пору, в которой  $\beta$ -структурный центральный глицин-насыщенный домен каждой субъединицы внедрен в мембрану и сформирована антипараллельная « $\beta$ -бочка» из 14 цепей. Формирование «бочки» сопровождается конформационным изменением, и каждая N-концевая часть фиксируется в соседней субъединице, приобретая устойчивость к действию протеаз. Собранная структура представляет собой устойчивую к SDS, литическую, гептамерную пору (рис. 4Б).

В сформированной поре выделяют следующие структуры: «кэп» и краевой домены, образующие «шляпку гриба», а также стеблевой домен. «Кэп» домен гептамера состоит из семи  $\beta$ -слоев и аминокислотных застёжек каждого протомера. Краевые домены участвуют в протомер-протомер взаимодействии и тесно сближены с мембранным бислоем. Стеблевые домены формируют трансмембранный канал. В водорастворимом мономере аминокислотная застёжка и престолевого домен располагаются близко к домену, имеющему структуру « $\beta$ -сэндвича», который впоследствии участвует в формировании «кэп» домена. Когда пора сформирована, аминокислотная застёжка контактирует с соседним протомером, а престолевого домен теперь формирует трансмембранную « $\beta$ -бочку» и уже называется стеблевым доменом.

Между стеблевым и «β-сэндвич» доменами находится треугольный район (рис. 3Д) [88]. Область между верхушкой стеблевого домена и краевого домена включена во взаимодействие с фосфолипидными группами мембраны.

Как показано методом кристаллографии высокого разрешения, гептамер α-гемолизина предпочтительно формируется в глицерофосфохолиновых мембранах. Фосфатидилхолин связывается с каждой субъединицей белка в области между краевым и стеблевым доменами. Аммонийные группы головки фосфатидилхолина взаимодействуют с индольным кольцом триптофана 179, а его фосфатная группа образует опосредованные водой водородные связи с аргинином 200. При этом весь гептамерный комплекс создает локальный дефект в структуре бислоя и замещает приблизительно 14 молекул липида [89].

В стеблевом домене α-гемолизина имеется семь остатков His 144 каждого из протомеров, протонирование которых влияет на проводимость канала. Предполагается, что гистидиновое кольцо может быть сенсором pH в структуре αHL-поры, и закисление среды вызывает уменьшение времени жизни канала в открытом состоянии [90].

Существуют клетки, например человеческие гранулоциты, устойчивые к действию α-гемолизина. Показано, что на мембранах гранулоцитов токсин формирует препору, устойчивую к SDS, однако не образует проводящих пор. Механизм данной устойчивости пока неизвестен. Токсин может связываться с мембранами при низких концентрациях, взаимодействуя со специфическими белковыми рецепторами, или путем неспецифического связывания, требующее гораздо более высоких концентраций этого белка.

Стафилококковый α-гемолизин считается основным фактором патогенности в развитии заболеваний, вызываемых *S. aureus* [91]. Формирование пор в мембранах клеток хозяина ведет, как правило, к их лизису по коллоидно-осмотическому типу и бактерии получают доступ к питательным веществам. Имеются данные о том, что формирование пор α-гемолизином может инициировать апоптотические механизмы в клетках хозяина [91]. К тому же, *S. aureus* при помощи своих токсинов убивает фагоциты и лейкоциты, что ослабляет иммунитет хозяина и обеспечивает дополнительные благоприятные условия для протекания жизненного цикла микробов [92]. Показано, что α-гемолизин также необходим бактериальным клеткам для формирования биопленок на границе сред [93], значительно повышающих устойчивость микроорганизма к антимикробным агентам.

Гемолизин II (НлуII) – один из  $\beta$ -складчатых каналобразующих цитолизинов *B. cereus*, ген которого широко распространен среди бацилл цереусной группы и обнаружен не только в *B. cereus*, но и в *B. thuringiensis* [94], являющимся патогенным для насекомых и используемым поэтому для производства инсектицидных препаратов, он присутствует в клетках *B. anthracis*, вызывающего сибирскую язву. Гемолизин II *B. cereus* является порообразующим цитолитическим токсином, который синтезируется в бактериях в форме предшественника, имеющего сигнальный пептид из 31 а. о., который в ходе процессинга отщепляется сигнальной пептидазой с образованием зрелого белка с молекулярной массой 42 кДа [95]. Гемолизин II секретируется бактериями в окружающую среду в форме мономера. Полное связывание НлуII, с мембраной в виде мономера является самой быстрой стадией и не зависит от температуры [96]. В дальнейшем формирование поры осуществляется в плоскости мембраны, что лимитирует скорость всего процесса и является зависимым от температуры. Мономеры НлуII взаимодействуя с мембранами, олигомеризуются и образуют анион-селективные и потенциал-зависимые трансмембранные гекса-, гепта- и октамерные поры с функциональным диаметром 1,2–1,6 нм и с внешним диаметром 8–10 нм (рис. 2Г, Д) [96]. Средняя проводимость каналов соответствующих олигомеров в среде 0.1 М КСl составляла  $18 \pm 6$ ,  $31 \pm 3$  и  $46 \pm 9$  пСм. Поскольку физико-химические свойства гемолизина II *B. cereus* близки к свойствам  $\alpha$ -гемолизина *S. aureus* и эти белки имеют 32% гомологии по аминокислотному составу, мы предполагаем, что основные стадии порообразования сходны для обоих токсинов (рис. 5).

Как показано нами, цитолитическое и патогенное действие НлуII на эукариотические клетки разных тканей и макроорганизмы обусловлено образованием ионпроводящих каналов в клеточных мембранах [95, 97]. Как известно, клетка представляет собой двойную Донановскую систему, осмотическое равновесие которой определяется как внутриклеточной концентрацией белков, так и концентрациями ионов внутри и снаружи клетки [98]. Электролиты и низкомолекулярные вещества начинают свободно проходить через поры, образованные токсином, что приводит к нарушению гомеостаза и в итоге к лизису клетки, по коллоидно-осмотическому механизму. Согласно этим представлениям, через поры внутрь клетки по градиенту концентрации начинают поступать ионы, и высокое внутриклеточное содержание белков, которое при этом остается постоянным, перестает компенсироваться внешним содержанием ионов, при этом осмотическое давление в клетке возрастает. Чтобы

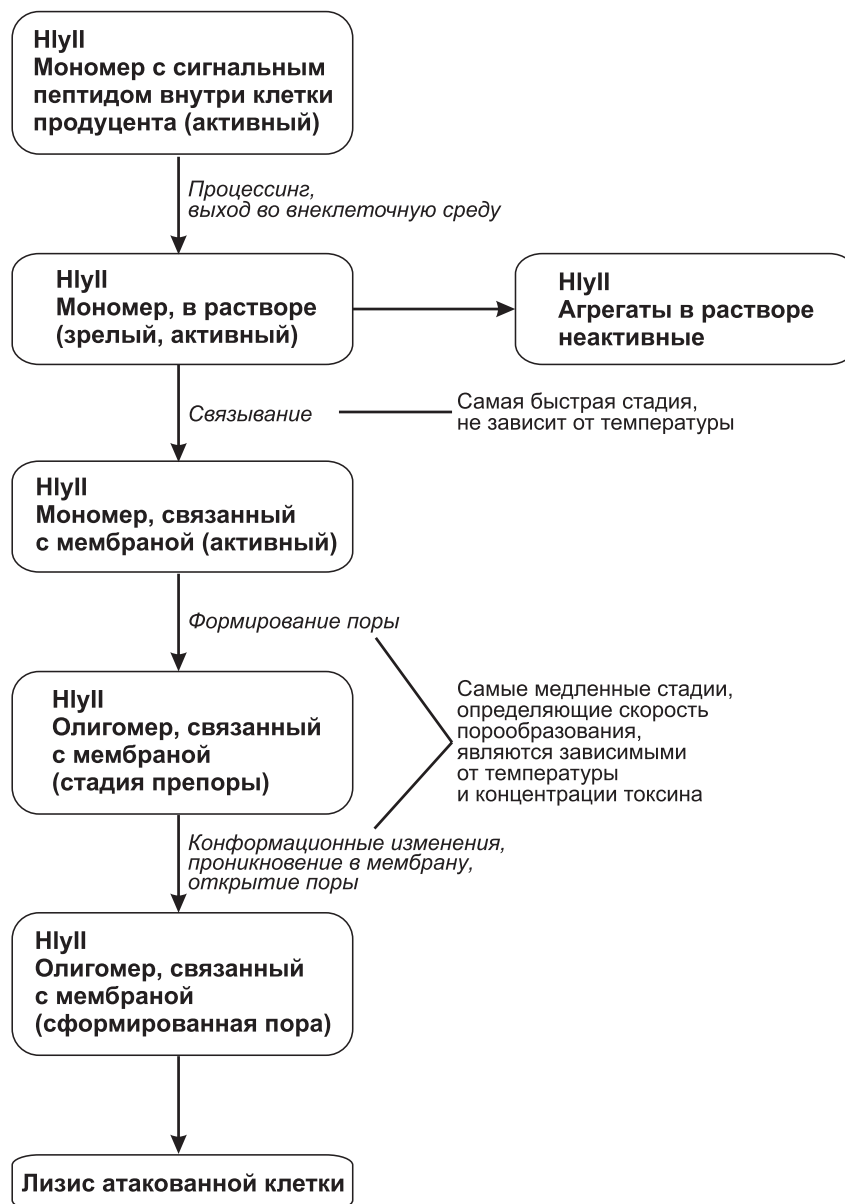


Рис. 5. Последовательность процессов, ведущих к формированию трансмембранной поры гемолизина II *Bacillus cereus*.

выровнять давление, вода начинает поступать в клетку до тех пор, пока мембрана не лопнет. Проникая первоначально в одни органы, бактерии посредством лизиса множества клеток и их некроза увеличивают свое жизненное пространство и могут переходить в другие органы [97]. Гемолизины, продуцируемые бактериями, обитающими в организме животного, служат им для высвобождения питательных веществ и других необходимых продуктов обмена. Например, показано, что *B. cereus* используют вышедший в процессе гемолиза гемоглобин как источник ионов железа [99].

Аэролизин, секретируемый *Aeromonas hydrophila*, – каналоформирующий токсин с молекулярной массой 52 кДа. Этот белок синтезируется бактерией как пре-протоксин. Пре-проаэролизин имеет N-концевую сигнальную последовательность, которая направляет его в транслокационный путь через внутреннюю мембрану, а потом отщепляется от молекулы. Затем из переплазмы проаэролизин транслоцируется аппаратом второго типа секреции во внеклеточную среду. Белок может находиться в растворе в форме димера, но связывается с мембраной только в виде мономера [100]. После связывания с GPI (гликозилфосфатидилинозитол)–заякоренными белками на поверхности клетки-хозяина, мономеры проаэролизина переходят в активную форму путем протеолитического удаления C-концевого пептида, состоящего из 40 аминокислот.

Зрелый аэролизин имеет L-образную форму с меньшей N-концевой частью (1 домен) и, как правило, состоит из 3 доменов. 1 и 2 домены участвуют в связывании с GPI-заякоренными рецепторами. В частности, домен 2 связывается с гликановым ядром GPI-заякоренного белка, а домен 1 взаимодействует с сахарным остатком на белковой части молекулы рецептора [101]. Это двойное связывание обеспечивает высокоаффинное взаимодействие аэролизина с рецептором. Домен 2 также включен в инициацию процесса олигомеризации, тогда как домены 3 и 4 участвуют непосредственно в сборке гептамера. Часть молекулы токсина, внедряющаяся в гидрофобную область мембраны, представляет собой петлю из 20 аминокислот, которая входит в состав домена 3 и образует амфифильную  $\beta$ -шпильку. После протеолитического расщепления происходит конформационное изменение, требующееся для олигомеризации и пороформирования и в конечном итоге токсин формирует гептамерные поры [102].

Пороформирующий цитолизин  $\alpha$ -токсин *Clostridium septicum* обладает летальным и некротическим действием. Его первичная структура подобна аэролизину *Aeromonas hydrophila*. Токсин секретируется как неактивный протоксин (46,5 кДа), который затем расщепляется в

мотиве RGKR протеазами клетки хозяина, с образованием активных мономеров (41,3 кДа) и имеющих 45 аминокислотные С-концевые пептиды. Как и в случае с аэролизинном, мономеры токсина связываются с GPI-заякоренными белками, затем олигомеризуются в гексамерные комплексы и внедряются в клеточную мембрану, формируя пору с функциональным диаметром 1.3–1.6 нм [103].

Цитолизин VCC *Vibrio cholerae* также секретируется в виде неактивного протоксина с молекулярной массой 80 кДа. N-концевой продомен с молекулярной массой 15 кДа имеет гомологию с семейством белков теплового шока Hsp90. Функционально он является шапероном для VCC и, таким образом, необходим для экспрессии активного токсина. В молекуле токсина N-концевой продомен взаимодействует с цитолитическим доменом и маскирует область, участвующую во взаимодействии между мономерами при образовании олигомера. Поэтому для активации токсина необходимо протеолитическое отщепление продомена. К цитолитическому домену присоединен престолевого домен, который при внедрении в мембрану образует «β-бочку». В С-конце мономера находятся два лектиновых домена, которые обуславливают взаимодействие токсина с рецепторами. Мономеры обратимо связываются с клеточной поверхностью через углеводные рецепторы, расположенные на мембранных гликопротеинах и гликолипидах, и образуют анионселективные гептамерные поры по механизму, сходному со стафилококковым α-гемолизинном [104].

Лейкоцидин и γ-гемолизин, так же как и α-гемолизин, секретируются *Staphylococcus aureus* и по своей структуре являются β-складчатыми каналобразующими цитолизинами. В отличие от гомогептамерных пор α-гемолизина лейкоцидиновые и γ-гемолизинные поры образуются субъединицами двух классов (F и S). Они формируют функциональную гетероолигомерную пору. Существует 6 классов F белков (LukF-PV, LukF-R, LukD, LukF'-PV, HlgB и LukF-I) и 7 классов S белков (LukS-PV, LukS-R, LukE, LukM, HlgA, HlgC и LukS-I), продуцируемых различными штаммами *S. aureus* [105]. Лейкоцидиновые поры состоят из компонентов HlgB или LukF и HlgC или LukS. Близкие к ним γ-гемолизинные поры состоят из HlgB или LukF и HlgA или γHLP. Для лейкоцидиновой поры характерно эквимоллярное соотношение компонентов LukF к LukS. Четыре субъединицы LukF и четыре субъединицы LukS формируют октамерную пору. Субъединицы LukF и LukS, ассоциированные друг с другом, тандемно располагаются вокруг центральной оси поры [106]. Гидродинамический диаметр лейкоцидиновой поры составляет 2.1 нм, внутренний и внешний диаметр комплекса, изме-

ренный с помощью электронной микроскопии, составляют 3 и 9 нм соответственно. Для проявления лейкоцидинспецифической лейкоцитолитической активности необходимо фосфорилирование LukS протеин киназой А, которое инициирует связывание с мембраной. После этого водорастворимые мономеры формируют неактивную олигомерную препору, которая внедряется в липидный бислой и образует проводящую пору.

Стафилококковый  $\gamma$ -гемолизин также представляет собой двухкомпонентный гетероолигомерный пороформирующий цитолитический токсин.  $\gamma$ -Гемолизиновые поры состоят из компонентов LukF и  $\gamma$ HLP, которые входят в состав поры в молярном соотношении 3:4 или 4:3, и формируют гептамерную структуру [107]. Мономер LukF имеет структурное сходство с мономером  $\alpha$ -гемолизина. Он состоит из краевого домена, который связывается с мембраной, « $\beta$ -сэндвич» домена, необходимого для олигомеризации с  $\gamma$ HLP и престолевого домена. Престолевой домен LukF первоначально примыкает к « $\beta$ -сэндвич» домену, а затем, в процессе образования поры, разворачивается и проникает в мембрану. N-концевая аминокислотная цепочка LukF располагается на « $\beta$ -сэндвич» домене своего протомера, в отличие от аминокислотной цепочки протомера  $\alpha$ -гемолизина, которая взаимодействует с соседним протомером.

Установлено, что формирование поры начинается со связывания мономеров с мембраной, затем собираются димеры, мелкие олигомеры и формируется единичная пора. Поры образуются лишь при совместном связывании LukF и  $\gamma$ HLP, которые объединяются только в гетеродимеры, и строго на мембране, а не в растворе. Установлено также, что димер-димерное взаимодействие между комплементарными сторонами LukF и  $\gamma$ HLP приводит к образованию тетрамеров. В конечном итоге токсин формирует поры с функциональным диаметром 2.5 нм. Электронная микроскопия пор показала, что внутренний и внешний диаметр порового комплекса составляют 3 и 7 нм соответственно. При высоких концентрациях белка единичные поры связываются в кластеры из трех, четырех пор и т.д. Связывание происходит посредством взаимодействия аминокислот, расположенных на внешней поверхности пор [108]. Другие токсины патогенных бактерий (такие как аэролизин, стрептолизин, перфринголизин О, стафилококковый  $\alpha$ -гемолизин), которые формируют гомоолигомерные поры, могут также собираться в кластеры подобно  $\gamma$ -гемолизину [109, 110].

*E. coli* секретирует пороформирующий токсин гемолизин Е (HlyE). Это белок с молекулярным весом 34 кДа, стержнеобразной



формы, состоящий из четырех длинных  $\alpha$ -спиралей (рис. 3Г). Конец молекулы (хвостовой домен), который содержит N-концевой участок, имеет дополнительную, более короткую спираль, ответственную за токсическую активность HlyE. На противоположном конце молекулы (головной домен) находится субдомен, состоящий из короткого двухцепочечного антипараллельного  $\beta$ -слоя, фланкированного двумя короткими спиральями ( $\beta$ -язык) и локализованного между третьей и четвертой спиральями главного пучка. Гидрофобная природа  $\beta$ -языка обеспечивает взаимодействие между HlyE и мембранами. Гемолизин E из штамма *E. coli* JM4660 находится в растворе в виде димера, тогда как HlyE из *E. coli* K-12 был обнаружен в различных олигомерных состояниях (мономер, димер и 8–12-мер). Димер сформирован из субъединиц, расположенных «голова к хвосту». Белок HlyE формирует в мембране октамерные поры, которые имеют кольцеобразную форму с внутренним диаметром 4.2–5.2 нм и внешним – 7–10 нм [111–113].

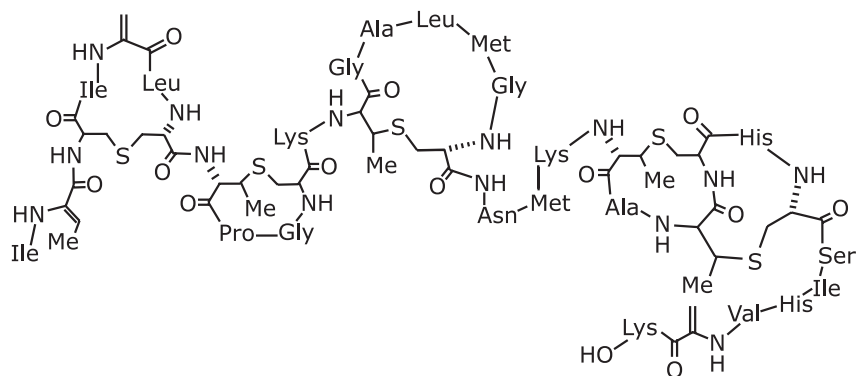
К  $\beta$ -складчатым каналобразующим цитоллизинам относят также двухкомпонентные АВ токсины или, так называемые, «бинарные» токсины. Принцип действия данных токсинов основан на том, что компонент «В» играет роль порообразующего белка, с помощью которого компонент «А» проникает внутрь клетки-мишени и вызывает ее гибель. К такого вида белкам относятся токсин C2 *Clostridium botulinum* (возбудитель ботулизма – тяжелой пищевой интоксикации, сопровождающейся поражением нервной системы), VIP токсин *Bacillus cereus*, токсины *Bacillus anthracis*, приводящие к отекам и летальным исходам. Действие токсинов начинается со специфического связывания компонентов «В» (C2II *C. botulinum*, VIP1 *B. cereus*, PA *B. anthracis*) с рецепторами клеток в виде мономеров, затем на клеточной поверхности происходит формирование гомогептамеров. Например, рецепторами для связывания PA являются убиквитиновые белки (TEM8 и SMG2), а рецептором для C2II гликобелки. Активация молекул компонента «В» осуществляется сериновыми протеиназами, такими как химотрипсин, трипсин или фурин. В результате протеолиза происходит отщепление N-концевого пептида от молекулы токсина, приводящее к конформационным изменениям, после чего компонент «В» гомогептамеризуется.

В первом N-концевом домене активного компонента «В» локализован участок, отвечающий за связывание с компонентом «А», а в четвертом C-концевом домене участок, отвечающий за связывание с рецептором. Второй домен вовлечен в формирование канала в липид-

ных мембранах, а третий домен отвечает за олигомеризацию. Второй домен способен разворачиваться, формируя  $\beta$ -шпильку, которая внедряется в мембрану и это обеспечивает переход гептамерного комплекса препоры в открытую пору. Далее с гептамерным комплексом связывается ферментативный компонент «А» (С2I *C. botulinum*, VIP2 *B. cereus*, EF и LF *B. anthracis*), который транслоцируется в цитозоль клетки.

Компоненты «А» ингибируют функции нормальных клеток посредством различных механизмов. С2I и VIP2 осуществляют ADP-рибозилирование G-актина, что ведет к разрушению цитоскелета и гибели клетки. LF вызывает протеолиз MAPKK, нарушая тем самым клеточную сигнализацию, а EF увеличивает уровень cAMP, конечным результатом чего на организменном уровне является появление отеков или подавление иммунитета [114]. У *B. anthracis* компоненты PA<sub>63</sub> связываются с рецепторами на клеточной поверхности [115]. Затем фурин-подобные протеазы от N-конца отщепляют 20 кДа фрагмент, тем самым раскрывая сайты для связывания с LF и EF. Далее происходит олигомеризация PA<sub>63</sub> в препоровый гептамерный комплекс и связывание с ним трех молекул EF и/или LF [116]. Этот комплекс путем эдцитоза проникает внутрь клетки [117]. Кислые значения pH внутри эндосомы индуцируют внедрение гептамеров в мембрану и формирование канала, после чего происходит высвобождение LF и EF в цитозоль. Токсины *B. anthracis* могут приводить к апоптозу эндотелиальных клеток [118], а LF – дополнительно к некрозу макрофагов, это приводит к снижению иммунитета и обеспечивает возможность размножения бактерий [119].

Бактериоцины – антимикробные пептиды, продуцируемые многими штаммами бактерий родов *Eubacteria* и *Archaeobacteria* и служащими в качестве антибиотических агентов, действие которых направлено против клеток близкородственных видов. Они секретируются во внеклеточную среду и затем распознаются рецепторами на поверхности чувствительных к ним бактериальных клеток. Предполагается, что основная роль бактериоцинов заключается в регуляции популяционной динамики близкородственных видов. Токсичность бактериоцинов реализуется посредством различных механизмов, но наиболее значимый из них – образование трансмембранных пор. В настоящее время данные соединения интенсивно изучаются как потенциальные консерванты для нужд пищевой промышленности, а также для клинического использования. По современной классификации к бактериоцинам относят следующие классы соединений: I – лантибиотики, II класс,

Рис. 6. Структура низина *Lactococcus lactis* [122].

подразделяющийся на класс Па (педиоцин–подобные бактериоцины), класс Пб (двух-пептидные бактериоцины), и класс Пс (одно-пептидные бактериоцины, не относящиеся к педиоциноподобным), класс Пг (термочувствительные бактериоцины) [120, 121].

По своему строению бактериоцины достаточно разнообразны:  $\alpha$ -спиральные,  $\beta$ -складчатые пептиды и антибиотики, имеющие в составе циклические структуры.

Наиболее изученным в настоящее время антибиотиком является низин, секретируемый *Lactococcus lactis*. Как и все антибиотики, после рибосомального синтеза, молекула низина, содержащая 34 аминокислотных остатка, подвергается посттрансляционной модификации, вследствие чего в ее составе образуется аминокислота лантионин, представляющая собой два аланиновых остатка, стабилизированных тиоэфирной связью между  $\beta$ -углеродами [122] (рис. 6). Трехмерная структура низина содержит два амфифильных винтообразных домена, состоящих из N-концевых А, В и С колец и C-концевых D и E колец. Последние кольца соединены между собой подвижным участком, состоящим из трех аминокислотных остатков.

Антибактериальная активность низина обусловлена его способностью формировать в мембранах, содержащих преимущественно анионные липиды, поры диаметром от 0.2 до 1–2 нм с временем жизни несколько сотен микросекунд. Для образования низиновой поры необходимо наличие положительного мембранного потенциала. Сам пептид обладает достаточно большим положительным зарядом. В мембранах бактериальных клеток содержится высокоаффинный рецептор низина липид II (undecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-

(pentapeptide)-GlcNAc). В присутствии этого компонента порообразующая активность низина возрастает на 3 порядка. Предполагается, что липид II входит в структуру сформированной поры, состоящей из 5–8 молекул низина и идентичного числа липида II [123].

Поскольку даже в бактериальных клетках содержание липида II варьирует в широких пределах (от  $10^3$  молекул на клетку для *E. coli* до  $10^5$  молекул на клетку для *Micrococcus lysodeikticus*), антибиотическая селективность низина должна быть высокой даже для микроорганизмов [122]. Исчерпывающую информацию об этих соединениях можно найти в базе данных APD (Antimicrobial Peptide Database <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

Очевидно, что продукция пороформирующих токсинов приводит к гибели клеток, при этом бактерии снижают иммунитет хозяина, открывают доступ к питательным веществам, содержащимся внутри клеток хозяина, что позволяет бактериям размножаться и распространяться по организму хозяина. Токсины, формируя дополнительные поры в мембранах, способны запускать различные механизмы клеточной гибели, например, некроз или апоптоз. Кроме того, бактерии используют антимикробные свойства пороформерных токсинов для уничтожения чувствительных к ним бактериальных штаммов. Эти токсины секретируются в условиях стресса, при нехватке питательных веществ или перенаселенности. Бактериальные пороформирующие токсины принимают также участие в и других процессах. Например, пневмолизин (Ply) [77] участвует в сложном процессе каннибализма вегетативных форм грам-положительных бактерий, который описан на начальной стадии спорообразования популяции. Каннибализм обеспечивает лизис клеток популяции, которые не переходят в состояние споры [124].

#### ПОРОФОРМИРУЮЩИЕ БЕЛКИ ВИРУСОВ

По всей вероятности, способность синтезировать пороформирующие агенты возникла на самых ранних стадиях эволюции живых организмов. Например, реовирусы синтезируют пептиды, которые формируют поры в мембранах атакуемых клеток для проникновения в них [125]. Многие виды вирусов, такие как вирус гепатита С (HCV), вирус иммунодефицита (HIV) и вирус гриппа, продуцируют  $\alpha$ -пороформирующие белки – виропорины, которые по основным свойствам сходны с пороформерами про- и эукариот. Виропорины выполняют разнообразные функции, включая высвобождение вирусных частиц из клетки. Лучшее всего исследованы виропорины РНК-вирусов

позвоночных. Однако, их роль в жизненном цикле ДНК вирусов и бактериофагов на сегодня еще недостаточно изучена. Главные усилия исследователей сосредоточены на проблеме структуры и функции виropоринов вируса гепатита р7, вируса иммунодефицита Vpu и вируса гриппа М2.

Как правило, белки виropоринов имеют небольшие размеры, 60–120 аминокислот. Гидрофобный трансмембранный домен виropоринов взаимодействует с липидным матриксом мембраны, олигомеризуется и образует гидрофильные поры в мембранах клеток, инфицированных вирусом. Белок р7 вируса гепатита С состоит из 63 аминокислот, которые образуют две трансмембранные спирали по 23 аминокислоты в каждой, разделенные короткой основной петлей [126]. Как показано методами трансмиссионной электронной микроскопии, масс-спектроскопии и экспериментами на планарных липидных мембранах, р7 олигомеризуется и образует гептамерную пору [127]. Виropорин р7 функционирует в искусственных мембранах как катион-селективный ионный канал со средней величиной проводимости равной 21 пСм в 1 МКСl. Виropорины других вирусов также обладают способностью олигомеризоваться в мембранах и образовывать в них поры, состоящие из вариабельного числа субъединиц.

Мутации р7 в вирусном геноме приводят к уменьшению продукции вирусных частиц, но не влияют на инфекционность, что указывает на то, что белок р7 необходим на поздних стадиях сборки вируса и не участвует в проникновении вируса в клетку [128]. Виropорин вируса гриппа М2 напротив, являясь частью вириона, необходим на начальных стадиях вирусной атаки. Экспрессия некоторых виropоринов приводит к апоптозу.

Таким образом, можно заключить, что виropорины широко участвуют во взаимодействии вирусов с клеткой на различных этапах. Функция нескольких виropоринов *in vitro* ингибируется неспецифическим противовирусным средством амантидином, что указывает на направление разработки новых противовирусных препаратов широкого действия. По всей видимости, список виropоринов в ближайшем будущем будет расширяться и их углубленное изучение станет одной из горячих точек молекулярной вирусологии.

### **III. ПОРОФОРМИРУЮЩИЕ БЕЛКИ КАК ОДИН ИЗ ФАКТОРОВ ЭВОЛЮЦИИ**

Возникновение биологических мембран является ключевым моментом возникновения жизни на Земле. Именно наличие барьера, отделяющего самовоспроизводящиеся живые структуры от окружающей среды, положило начало процессу жизни как мы его теперь представляем [129]. Многие мембранные белки возникли на этой стадии образования мембран и широко распространились во всех живых царствах. Ионные каналы, которые образуются при участии таких белков, обеспечивают избирательную проницаемость биологических мембран. Помимо каналов, интегрированных в мембраны, эволюционно развился большой класс порообразующих белков, выделяющихся во внешнюю или внутреннюю среду клетки. Они обнаруживаются во всех организмах, от примитивных бактерий до человека, а также во многих вирусах. Удивительно существование принципиального сходства, бактериальных цитолитических токсинов и белков врожденного иммунитета высших прокариот – перфоринов. Трехмерная структура образующихся пор, а также цитолитическая функция были сохранены в процессе эволюции, несмотря на слабовыраженное сходство аминокислотных последовательностей. Однако остается не ясным, имеют ли сравниваемые порообразующие белки общего предшественника, возникли ли они у тех или иных организмов путем горизонтального переноса кодирующих их генов или за счет вертикальной эволюции. Кроме того, нельзя исключить, что эти белки имеют конвергентное сходство, так как выполняют схожие функции. Накапливающаяся информация о последовательностях этих белков в различных организмах возможно позволит ответить на этот вопрос уже в близком будущем.

Эволюционные аспекты пороформирующих белков тесно связаны с проблемой выживания отдельных видов. Наличие у организма одного или нескольких цитолитических белков обеспечивает ему явное преимущество в приспособлении к изменяющимся условиям окружающей среды. Однако синтез цитотоксинов, как правило, осуществляется только в ответ на соответствующий сигнал, воспринимаемый клеткой, так как бесконтрольный синтез этих компонентов и требует избыточной траты ресурсов и может быть опасен для самого организма-производителя. В связи с этим можно предположить, что синтез и разрушение пороформирующих белков должны быть строго контролируемыми.

Часто адаптация патогенного организма к новому хозяину сопровождается не только обретением, но и потерей функции многих

генов. Такие гены принято называть авирулентными [130]. Гены, которые становятся несовместимыми с новыми условиями жизни патогенного организма, инактивируются путем точечных мутаций, вставок и делеций. Иногда, когда приспособление носит экстремальный характер, в организме патогена могут отсутствовать целые куски генома, называемые «черными дырами». Интересно, что авирулентными генами иногда являются и гены порообразующих цитотоксинов, которые необходимы для проявления патогенности в других хозяевах, например, насекомых. Так, например, инактивация гена гемолизина II в геноме *B. anthracis* путем точечной мутации, приводит к сбивки рамки считывания, а ингибирование синтеза цитолизина K осуществляется путем инактивации транскрипционного активатора PlcR. *B. anthracis* практически лишен гемолитической активности, что может указывать на инактивацию и других цитотоксинов.

Во многих микроорганизмах контроль синтеза токсинов осуществляется обычно несколькими регуляторами на разных уровнях – от транскрипции до ускоренной деградации белка. Возникновение бактериальных патогенов из непатогенных предшественников сопровождается приобретением различных факторов патогенности, кодируемых фагами, островками патогенности или плазмидами, путем горизонтального переноса или путем приспособления имеющихся факторов к действию в условиях нового организма хозяина. Таким образом, смена хозяев или добавление в жизненный цикл новых хозяев равнозначна приспособлению к новой экологической нише [130].

Многие патогенные и условно-патогенные микроорганизмы содержат в своих геномах больше одного цитотоксина. Часть из них идентифицируется по гомологии с последовательностями известных порообразующих белков, для многих установлена и подтверждена экспрессия и наличие цитотоксической функций. У *B. cereus* и *S. aureus* обнаруживаются сразу несколько  $\beta$ -пороформирующих токсинов, их регуляция осуществляется избирательно, хотя аминокислотные последовательности этих белков являются гомологичными  $\alpha$ -гемолизину *S. aureus*. Множественность подобных белков имеются и у других бактерий. По-видимому, бактерии использовали дубликацию генов цитотоксических белков для приспособления к изменяющимся условиям окружающей среды. При этом эволюционным изменением подверглась и регуляция экспрессии каждого токсина. Интересно отметить, что разные штаммы *B. cereus*, в зависимости от места изоляции при одном и том же наборе генов цитотоксических белков могут использовать различные способы регуляции экспрессии. Это может указывать на то, что отбор бактерий, максимально приспособ-

ленных к доминирующим окружающим условиям, происходит очень быстро [131].

Гены цитотоксинов были обнаружены в геномах бактериофагов родов *Bacillus* и *Staphylococcus*. Бактериофаги phiSLT и tp310-1 *S. aureus* обладают способностью трансформировать условно-патогенные штаммы в высокопатогенные, вызывающие системные стафилококковые инфекции, приводящие к летальному исходу. Антраксный летальный токсин локализуется на плазмиде pXO1. Последовательности геномной ДНК *B. cereus* и *B. anthracis* идентичны, но в то же время у них выявлены различия (часто точечные мутации, приводящие к нокаутам различных генов), которые отражают возможность приспособления возбудителя сибирской язвы к паразитическому образу жизни. Интересно, что система биосинтеза другого фактора вирулентности *B. cereus*-эметического валиномицино-подобного депептида цереулида, также локализуется на гигантской плазмиде, имеющей высокую степень сходства с антраксной плазмидой pXO1 [132]. Гены инсектицидных токсинов *B. thuringiensis* также локализируются на плазмидах. Это может означать, что существовала некая исходная плаزمиды *B. cereus*, которая с течением времени аккумулировала факторы патогенности [132].

Мобильные элементы, например, плазмиды, являются одним из основных средств перемещения генетического материала при горизонтальном переносе генов. Классическим примером является плазмиды ColE1, которая несет ген колицина, и за счет генов, лежащих на плазмиде, способна к мобилизации различными конъюгативными плазмидами [133]. Кроме того, район локализации генов колицинов на мультикопийных плазмидах совпадает с районом расположения генов систем рестрикции-модификации ДНК, для которых описана возможность участия в межплазмидной рекомбинации, обеспечивающая вертикальный перенос генов [134, 135]. Эта плазмиды и ее производные встречаются практически во всех энтеробактериях. Она способна участвовать в горизонтальном переносе генов пороформирующих токсинов. Таким образом, плазмиды являются основным средством горизонтального и вертикального переноса генов порообразующих белков среди микроорганизмов.



#### IV. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОРОФОРМИРУЮЩИХ БЕЛКОВ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ПРИКЛАДНЫХ ЗАДАЧ, НАНОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ

Один из наиболее иллюстративных примеров практического применения порообразующих белков – это создание трансгенных растений, экспрессирующих ген Cry-токсина *B. thuringiensis*, придающего растениям устойчивость к самым различным насекомым. Стоит отметить, что продолжающиеся исследования механизма порообразования позволили значительно усилить устойчивость первоначально созданных сортов растений. В сельском хозяйстве также активно применялись споры *B. thuringiensis*, обладающие инсектицидным эффектом. Указанные способы защиты растений совершенно безвредны для теплокровных [136].

Для медицины несомненно важны знания о механизмах порообразования различных бактериальных цитотоксинов, а также порообразующих пептидов, обуславливающих иммунный ответ макроорганизма. До самого последнего времени лечение и профилактика бактериальных инфекций заключались в предотвращении или подавлении бактериального размножения в организме антибиотиками, в тяжелых случаях использовались также различные методы модуляции иммунного ответа с помощью кортикостероидных гормонов. Однако в случаях интенсивных инфекций, когда классические способы не дают эффекта в силу множественной антибиотической устойчивости микроорганизмов, очень важна терапия, направленная на эффективную детоксикацию организма, или на предотвращение действия уже синтезированных токсинов (многие из которых являются пороформерами). Сравнительно недавно, благодаря многолетним исследованиям процессов порообразования, были синтезированы вещества, которые угнетают функцию стафилококкового и антраксного токсинов [137]. По всей вероятности, эти вещества способны ингибировать функцию цитотоксических пороформомеров других бактерий, так как структура поры различных токсинов похожа на структуру пор, образуемых стафилококковым токсином. В настоящее время ведутся клинические испытания новых лекарств, эффективность которых в опытах на мышах уже была продемонстрирована. Перспективность этого направления будет выяснена в ближайшем будущем [138].

Очень важным направлением представляется использование пороформомеров в качестве высокоизбирательных антибиотиков. Некоторые штаммы бактерий, продуцирующие эти вещества, такие как «болгарская палочка», *Lactobacterium bulgaricum*, и бифидобактерии,

используются уже очень давно. Их оздоравливающий эффект во многом связан с продукцией бактериоцинов, которые подавляют рост вредных и опасных микроорганизмов, не оказывая при этом угнетающего действия на нормальную микрофлору кишечника. Очищенные препараты порообразующих бактериоцинов находят применения в пищевой промышленности, позволяя существенно увеличить срок хранения свежих продуктов, например мяса. Это более безопасно, чем использование для тех же целей антибиотиков [139, 140].

В настоящее время особенное внимание привлекают использование пор нанометрового размера (нанопоры) в самых различных технологических приложениях. В частности, как стохастические сенсоры для биомолекул и ионов металлов [141]. Принципы функционирования таких устройств кажутся простыми, молекулы, несущие электрический заряд, под действием электрического поля проходят через пору и блокируют ее физически, что приводит к регистрируемому изменению ее проводимости. Прохождение каждой молекулы может регистрироваться индивидуально. На этом принципе базируются широко известные счетчики Коултера [142].

Первая попытка использовать нанопоры для обнаружения одиночных молекул ДНК была сделана с использованием хорошо изученного  $\alpha$ -гемолизина *S. aureus* [143]. Эти поры, сформированные в модельных мембранах, практически постоянно находятся в высокопроводящем состоянии в широком диапазоне экспериментальных условий. Такие поры были использованы для детектирования одно и двухцепочных молекул ДНК [144]. Путем подбора условий можно различать также ДНК и РНК, поскольку они характеризуются разным временем транслокации через пору. Нанопоры также могут быть использованы для контроля качества ДНК: короткие и длинные фрагменты ДНК при своем прохождении через канал по-разному модулируют его проводимость. На основании полученных данных несколько групп исследователей пытаются создать искусственные нанопоры, которые могут быть использованы в будущем для *de novo* автоматического определения последовательности нуклеотидов молекул ДНК и РНК. Однако стоит заметить, что поры, образованные стафилококковым альфа-гемолизином, обладают практически идеальными свойствами для детекции одноцепочечной ДНК, а создание синтетических нанопор все еще сталкивается с большими трудностями. Используя одиночный альфа-гемолизиновый канал, группе авторов удалось создать «масс-спектрометр», достаточно достоверно определяющий молекулярную массу проходящих через пору молекул. Устройство основано на зависимости уровня проводимости одиночного канала

от молекулярной массы транслоцируемых молекул (в том числе и не заряженных) [145].

Альфа-гемолизинные поры были применены для создания везикулярного клетко-подобного биореактора, что позволило значительно увеличить количество экспрессированных белков [146]. Клетко-подобным биореактором называют фосфолипидную везикулу (липосома), во внутрь которой помещена безклеточная система экспрессии *E. coli*. Везикулы формируют в растворе, содержащем рибонуклеотиды и аминокислоты. Экспрессия останавливалась через пару часов, необходимо было решить энергетические и материальные ограничения и увеличить возможности реактора. Пороформирующий белок  $\alpha$ -гемолизин *S. aureus*, экспрессируемый внутри везикул, сделал возможным поступление необходимых для синтеза веществ во внутрь реактора через поры и реактор стал способен экспрессировать до 4 дней, тем самым увеличил количество продуцируемого белка. Благодаря всестороннему изучению свойств бактериальных ионных каналов, стало возможным изготовление портативного одноканального биосенсора длительного действия, который может стать частью многих полезных устройств [147, 148]. Это устройство представляет из себя «микрочип», в котором одиночная нанопора, погруженная в мембранный бислой, заключена между двумя слоями агарозного геля, что позволяет длительное хранение и многократное использование устройства. Генетически измененный стафилококковый гемолизин был использован для создания подобного микрочипа детектирующего inositol 1,4,5-trisphosphate (вторичный мессенджер) [147]. Недавно нанопоры на основе модифицированного стафилококкового гемолизина были использованы для создания устройств, способных быстро обнаруживать азотистый иприт в концентрации менее 50 мкМ [149]. Значительная часть нанотехнологических устройств были получены на основании поры хорошо изученного стафилококкового альфа-гемолизина. Однако, нанопоры на основании других порообразующих белков иногда рассматриваются в качестве альтернативы. В качестве нанопор также пробовали использовать порины из *E. coli* и ионный канал из *B. subtilis*, обладающие отличными от  $\alpha$ -гемолизина свойствами [150]. Так, например, бактериальный ионный канал из *B. subtilis* обладает значительно большим диаметром, что позволило использовать его для транслокации двухцепочечной ДНК плазмиды 4.2 kb и регистрации изменения сопротивления канала в результате транслокации. Белок наружной мембраны *E. coli* порин OmpF, образующий тримерную пору диаметром 1.0–1.2 нм был

использован для детекции водорастворимых полимеров типа полиэтиленгликоля [150]. Интересным представляется также использование механочувствительных каналов *E. coli* MscL и MscS, которые обладают рядом свойств, позволяющих повысить чувствительность биосенсоров в будущем [151]. Антимикробные пептиды уже используются в медицине в качестве антибиотических агентов. Также предполагается использование термочувствительных пор в медицине [152]. Термочувствительные поры были получены путем введения эластинподобного полипептида в структуру гептамера (в «β-сэндвич» домен), образованного стафилококковым альфа-гемолизинном. Петля эластинподобного полипептида выступает во внутрь канала, и в зависимости от температуры либо не блокирует ионный поток так как свернута, либо разворачивается и полностью блокирует проводимость канала, но этот процесс обратимый. Температура перехода петли из одного конформационного состояния в другое примерно равна 40 °С. При температуре ниже температуры перехода полипептид развернут, а выше – свернут. Такие поры могут быть встроены в липосомы и использоваться для контролируемого температурой высвобождения медикаментов из липосом или встроены в клетки для контролируемого введения веществ в них. Активное исследование свойств прочих порообразующих белков может в будущем привести к созданию совершенно новых устройств с принципиально новыми свойствами.

## V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Трудно описать в рамках одного обзора всех представителей пороформирующих белков, известных к настоящему времени. Однако, даже из представленных данных видно, что практически все живые существа от вирусов до млекопитающих (включая человека) синтезируют в своем организме эти соединения и активно используют их для выживания. В зависимости от «специализации» живого организма пороформеры могут выполнять различные функции. Многие организмы используют их для защиты от внешних врагов и в частности как антимикробные агенты. Хищники, вырабатывающие яд, применяют пороформеры для обездвиживания и умерщвления добычи. Часто тот же компонент яда используется ими для обеззараживания поглощаемой жертвы от патогенных микроорганизмов. Особенно следует отметить, что порообразующие белки являются важным компонентом иммунной системы. Например, пороформирующие цитотоксические вещества, продуцируемые лейкоцитами, перфорины и дефенсины, являются

эффективной первоначальной защитой организма от проникновения внутрь его чужеродных организмов. У прокариот пороформирующие токсины также выполняют сходные функции. Бактерии, лизирующие клетки-хозяина, получают доступ к питательным веществам, необходимым для их собственного метаболизма, а разрушение тканей и органов открывает микроорганизмам дополнительное пространство для размножения и распространения. Практически все организмы, включая микроорганизмы, синтезируют антимикробные пептиды (например бактериоцины), которые приводят к изменению состава окружающей микрофлоры, подавляя или убивая отдельные виды микроорганизмов, обеспечивая тем самым себе определенное преимущество. Так, в случае перенаселенности пороформеры используются микроорганизмами в процессах внутри- и межвидовой конкуренции в качестве антибиотиков. По своей структуре пороформирующие белки достаточно разнообразны, но их можно подразделить на два основных класса –  $\alpha$ -спиральные и  $\beta$ -слоистые. Причем, пороформеры обоих классов синтезируются как про- так и эукариотами. Как правило, это амфифильные молекулы, содержащие выраженный гидрофобный фрагмент, который непосредственно пронизывает мембрану. Первоначально молекулы пороформера прикрепляются к мембране за счет электростатического взаимодействия с заряженными головками липидов или вступают в высокоаффинную связь со своими рецепторами. Затем, многие из них проходят стадию олигомеризации, процесс, который сопровождается структурными перестройками всего комплекса, усиливающими его гидрофобность. После этого происходит проникновение порообразующей части олигомера в гидрофобную область бислоя и открывается пора. Образующие поры можно разделить на два основных вида: бочкообразные, у которых внутренняя полость сформирована только белковыми мономерами, и тороидальные, у которых в выстилке проводящего пути дополнительно участвуют липидные молекулы мембраны. Сформированная пора представляет собой, как правило, олигомерный комплекс, внешний и внутренний диаметры которого могут колебаться в широких пределах (1–200 нм), в зависимости от природы и числа образующих его мономеров. Поры сравнительно небольшого диаметра проницаемы преимущественно для ионов и низкомолекулярных компонентов. Основой их токсического действия, как описано выше, является нарушение ионного гомеостаза клетки и ее осмотического баланса. В простейшем случае это приводит к лизису клеток и некрозу тканей. Однако, даже если клетка способна противостоять осмотическому дисбалансу, увеличение в цитоплазме

концентрации некоторых ионов, например  $\text{Ca}^{2+}$ , способно приводить к другим драматическим последствиям – запуску процессов экзоцитоза, эндоцитоза или апоптоза. В то же время интенсивно изучается эффект порообразующих цитотоксинов на подавление апоптоза, который является одним из ключевых процессов защиты макроорганизма от широкомасштабной атаки вирусов и бактерий, когда клетка макроорганизма, погибая, сигнализирует оставшимся о неблагополучии и о необходимости адекватного ответа на вторжение путем активации иммунной системы [153]. Поры большого диаметра, проницаемые для белков, также используются не только для прямого лизиса клеточек-мишеней, но и для транспорта в ее цитоплазму энзиматически активных компонентов, что приводит, например, к нарушению синтеза белка в клетке или инициации апоптотических реакций. Иногда, как в случае латротоксина, только стадия формирования препоры способна запустить механизмы, дестабилизирующие клетку. Избирательность действия пороформирующих токсинов может варьировать в широких пределах: от полного ее отсутствия до высокой специфичности, связанной с наличием имеющих различную природу рецепторных структур. Ими могут быть липиды (холестерин, фосфатидилхолин и др.), мембранные белки (гликолипопротеины) или высокоспецифические белковые рецепторы. В зависимости от этого токсин может повреждать только прокариотические клетки либо только клетки эукариот, или же клетки определенных тканей. В связи с этим семейство пороформирующих белков является прекрасным материалом для нанотехнологических конструкций. Выяснение деталей механизмов избирательности того или иного пороформера позволит, с применением методов геномной инженерии, создавать токсины, поражающие клетки-мишени преимущественно одного типа, например, раковые.

Интересно отметить, что организмы, неимоверно далеко отстоящие друг от друга на эволюционной лестнице, используют пороформеры сходного механизма действия, примером могут служить дифтерийный токсин и перфорины иммунной системы млекопитающих. Это прямо указывает на универсальность этих способов защиты и нападения, получения питательных веществ и распространения в пространстве все, что можно определить общим термином адаптация к условиям окружающей среды.

Авторы выражают благодарность Ж.И.Бударинной за внимательное прочтение и помощь в подготовке текста статьи.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Titball, R.W. (1998) Symp. Ser.Soc. Appl. Microbiol., **27**, 127–137.
2. Gonzalez, M.R., Bischofberger, M., Pernot, L., van der Goot, F.G., Freche, B. (2008) Cell. Mol. Life Sci., **65**, 493–507.
3. Durell, S.R., Gopalan, R., Guy, H.R. (1992) Biophys. J., **63**, 1623–1631.
4. Gregory, S.M., Cavanaugh, A., Journigan, V., Pokorny, A., Almeida, P.F. (2008) Biophys. J., **94**, 1667–1680.
5. Corzo, G., Villegas, E., Gomez-Lagunas, F., Possani, L.D., Belokoneva, O.S., Nakajima T. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 26, 23627–23637.
6. Yang L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., Huang, H.W. (2001) Biophys. J., **81**, 1475–1485.
7. Matsuzaki, K., Yoneyama, S., Miyajima, K. (1997) Biophys. J., **73**, 831–838.
8. Ladokhin A.S., Selste, M.E., White, S.H. (1997) Biophys. J., **72**, 1762–1766.
9. Allende, D., Simon, S.A., McIntosh, T.J. (2005) Biophys. J., **88**, 1828–1837.
10. Park, S., Kim, J., Shin, S., Jeong, C., Kim, M., Shin, S., Cheong, G., Park, Y., Hamm, K. (2006) Biochem. Biophys. Res. Commun., **343**, 222–228.
11. Zemel, A., Fattal, D.R., Ben-Shaul, A. (2003) Biophys. J., **84**, 2242–2255.
12. Yan, L., Adams, M.E. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 4, 2059–2066.
13. Van Renterghem, C., Iborra, C., Martin-Moutot, N., Lelianova, V., Ushkaryov, Y., Seagar, M. (2000) Eur. J. Neurosci., **12**, 3953–3962.
14. Orlova, E.V., Rahman, M.A., Gowen, B., Volynski, K.E., Ashton, A.C., Manser, C., van Heel, M., Ushkaryov, Y.A. (2000) Nat. Struct. Biol., **7**, 48–52.
15. Ashton, A.C., Volynski, K.E., Lelianova, V.G., Orlova, E.V., Renterghem, C.V., Canepari, M., Seagar, M., Ushkaryov, Y.A. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 48, 44695–44703.
16. Lajus, S., Vacher, P., Huber, D., Dubois, M., Benassy, M., Ushkaryov, Y., Lang, J. (2006) J. Biol. Chem., **281**, 9, 5522–5531.
17. Elgar, D., Verdonck, F., Grobler, A., Fourie, C., du Plessis, J. (2006) Peptides, **27**, 55–61.
18. Nomura, K., Corzo, G., Nakajima, T., Iwashita, T. (2004) Biophys. J., **87**, 2497–2507.
19. Malovrh, P., Viero, G., Serra, M., Podlesek, Z., Lakey, J.H., Macek, P., Menestrina, G., Anderluh, G. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 25, 22678–22685.
20. Gutierrez-Aguirre, I., Barlic, A., Podlesek, Z., Macek, P., Anderluh, G., and Gonzalez-Manas, J.M. (2004) Biochem. J., **384**, 421–428.
21. Kem, W.R. (1994) Toxicology, **87**, 189–203.
22. Hallock, K.J., Lee, D., Omnaas, J., Mosberg, H.L., Ramamoorthy, A. (2002) Biophys. J., **83**, 1004–1013.
23. Matsuzaki, K., Sugishita, K., Ishibe, N., Ueha, M., Nakata, S., Miyajima, K., Epan, R.M. (1998) Biochemistry, **37**, 11856–11863.
24. Wang, C.H., Wu, W.G. (2005) FEBS Lett., **579**, 3169–3174.
25. Wang, C.-H., Liu, J.-H., Lee, S.-C., Hsiao, C.-D., Wu, W.-g. (2006) J. Biol. Chem., **281**, 656–667.
26. Barbosa, P.S., Martins, A.M., Havt, A., Toyama, D.O., Evangelista, J.S., Ferreira, D.P., Joazeiro, P.P., Beriam, L.O., Toyama, M.H., Fonteles, M.C., and Monteiro, H.S. (2005) Toxicol., **46**, 376–386.
27. Nair, D.G., Fry, B.G., Alewood, P., Kumar, P.P. Kini, R.M. (2007) Biochem. J., **402**, 93–104.
28. Gidalevitz, D., Ishitsuka, Y., Muresan, A. S., Kononov, O., Waring, A.J., Lehrer, R.I., Lee, K. (2003) Proc.Natl. Acad.Sci. USA, **100**, 11, 6302–6307.

29. Yang, L., Weiss, T.M., Lehrer, R.I., Huang, H.W. (2000) *Biophys. J.*, **79**, 2002–2009.
30. Mani, R., Cady, S.D., Tang, M., Waring, A.J., Lehrer, R.I., Hong, M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 44, 16242–16247.
31. Jang, H., Ma, B., Nussinov, R. (2007) *BMC Struct. Biol.*, **7**, 21.
32. Voskoboinik, I., Trapani, J. (2006) *Immunol. Cell Biol.*, **84**, 66–71.
33. Masson, D., Tschopp, J. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 9069–72.
34. Podack, E.R., Young, J., Cohn, Z.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 8629–33.
35. Hadders, M.A., Beringe, D.X., Gros, P. (2007) *Science*, **317**, 1552–1554.
36. Rosado, C.J., Buckle, A.M., Law, R.H., Butcher, R.E., Kan, W.T., Bird, C.H., Ung, K., Browne, K.A., Baran, K., Bashtannyk-Puhalovich, T.A., Faux, N.G., Wong, W., Porter, C.J., Pike, R.N., Ellisdon, A.M., Pearce, M.C., Bottomley, S.P., Emsley, J., Smith, A.I., Rossjohn, J., Hartland, E.L., Voskoboinik, I., Trapani, J.A., Bird, P.I., Dunstone, M.A., Whistock, J.C. (2007) *Science*, **317**, 1548–1551.
37. Lukyanova, N., Saibil, H.R. (2008) *Trends in Immunol.*, **29**, 2, 51–53.
38. Bolitho, P., Voskoboinik, I., Trapani, J.A., Smyth, M.J. (2007) *Curr. Opin. Immunol.*, **19**, 339–347.
39. Pipkin, M.E., Lieberman, J. (2007) *Curr. Opin. Immunol.*, **19**, 301–308.
40. Aerts, A.M., Francois, I.E., Cammue, B.P.m., Thevissen, K. (2008) *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 2069–2079.
41. Verma, C., Seebah, S., Low, S.M., Zhou, L., Liu, S.P., Li, J., Beuerman, R.W. (2007) *Biotechnol. J.*, **2**, 1353–1359.
42. Matsuzaki, K. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1462**, 1–10.
43. Madison, M.N., Kleshchenko, Y.Y., Nde, P.N., Simmons, K.J., Lima, M.F., Villalta, F. (2007) *Infect. Immun.* **75**, 10, 4780–4791.
44. Hoover, D.M., Rajashankar, K.R., Blumenthali, R., Purii, A., Oppenheim, J.J., Chertov O., Lubkowski, J. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 42, 32911–32918.
45. Warren, W.C., Hillier, L.W., Marshall Graves, J.A., Birney, E., Ponting, C.P., Grützner, F., Belov, K., Miller, W., Clarke, L., Chinwalla, A.T., Yang, S.P., Heger, A., Locke, D.P., Miethke, P., Waters, P.D., Veyrumes, F., Fulton, L., Fulton, B., Graves, T., Wallis, J., Puente, X.S., López-Otín, C., Ordycze, G.R., Eichler, E.E., Chen, L., Cheng, Z., Deakin, J.E., Alsop, A., Thompson, K., Kirby, P., Papenfuss, A.T., Wakefield, M.J., Olender, T., Lancet, D., Huttley, G.A., Smit, A.F., Pask, A., Temple-Smith, P., Batzer, M.A., Walker, J.A., Konkel, M.K., Harris, R.S., Whittington, C.M., Wong, E.S., Gemmell, N.J., Buschiazio, E., Vargas, Jentsch, I.M., Merkel, A., Schmitz, J., Zemann, A., Churakov, G., Kriegs, J.O., Brosius, J., Murchison, E.P., Sachidanandam, R., Smith, C., Hannon, G.J., Tsend-Ayush, E., McMillan, D., Attenborough, R., Rens, W., Ferguson-Smith, M., Lefevre, C.M., Sharp, J.A., Nicholas, K.R., Ray, D.A., Kube, M., Reinhardt, R., Pringle, T.H., Taylor, J., Jones, R.C., Nixon, B., Dacheux, J.L., Niwa, H., Sekita, Y, Huang, X., Stark, A., Kheradpour, P, Kellis, M, Flicek, P, Chen, Y, Webber, C, Hardison, R, Nelson, J, Hallsworth-Pepin, K., Delehaunty, K., Markovic, C., Minx, P., Feng, Y., Kremitzki, C., Mitreva, M., Glasscock, J., Wylie, T., Wohldmann, P., Thiru, P., Nhan, M.N., Pohl, C.S., Smith, S.M., Hou, S., Renfree, M.B., Mardis E.R., Wilson, R.K. (2008) *Nature*, **453**, 175–184.
46. Masi, M., Vuong, P., Humbard, M., Malone, K., Misra, R. (2007) *J. Bact.*, **189**, 7, 2667–2676.



47. Zakharov, S.D., Kotova, E.A., Antonenko, Y.N., Cramer, W.A. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1666**, 239–249.
48. Красильников О.В., Сабиров П.З., Терновский В.И. Белки, ионные каналы и регуляция транспорта ионов через мембраны (1991) Ташкент: Фан, с.208.
49. Sobko, A.A., Kotova, E.A., Antonenko, Y.N., Zakharov, S.D., Cramer, W.A. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 20, 14408–14416.
50. Kent, M.S., Yim, H., Murton, J. K., Satija, S., Majewski, J., Kuzmenko, I. (2008) *Biophys. J.*, **94**, 2115–2127.
51. Senzel, L., Gordon, M., Blaustein, R.O., Oh, K.J., Collier, R.J., Finkelstein, A. (2000) *J. Gen. Physiol.*, **115**, 421–434.
52. Gordon, M., Finkelstein, A. (2001) *J. Gen. Physiol.*, **118**, 471–480.
53. Sharpe, J.C., London, E. (1999) *J. Membr. Biol.*, **171**, 209–221.
54. D'Silva, P.R. Lala, A.K. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 16, 11771–11777.
55. Czajkowsky, D.M., Iwamoto, H., Cover, T.L., Shao, Z. (1999) *Biochemistry*, **96**, 2001–2006.
56. Nakayama, M., Hisatsune, J., Yamasaki, E., Nishi, Y., Wada, A., Kurazono, H., Sap, J., Yahiro, K., Moss, J., Hirayama, T. (2006) *Infect. Immun.*, **74**, 12, 6571–6580.
57. Kim, S., Chamberlain, A.K., Bowie, J.U. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16, 5988–5991.
58. Szabo, I., Brutsche, S., Tombola, F., Moschioni, M., Satin, B., Telford, J.L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E. and Zoratti, M. (1999) *EMBO J.*, **18**, 20, 5517–5527.
59. Cotte, J.G. (1992) *Microbiol. Rev.*, **88**, 137–162.
60. Cortajarena, A.L., Goni, F.M., Ostolaza, H. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 26, 23223–23229.
61. Cortajarena, A.L., Goni, F.M., Ostolaza, H. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 19159–19163.
62. Menestrina, G., Moser, C., Pellet, S., and Welch, R. (1994) *Toxicology*, **87**, 249–267.
63. Moayeri, M., Welch, R.A. (1994) *Infect. Immun.*, **62**, 10, 41241–4134.
64. Bakas, L., Chanturiya, A., Herlax, V., and Zimmerberg, J. (2006) *Biophys. J.*, **91**, 3748–3755.
65. Welch, R.A. (1991) *Mol. Microbiol.*, **5**, 521–528.
66. Hertle, R. (2005) *Curr. Protein Pept. Sci.*, **6**, 313–325.
67. Walker, G., Hertle, R., Braun, V. (2004) *Infect. Immun.*, **72**, 1, 611–614.
68. Schönherr, R., Hilger, M., Broer, S., Benz, R., Braun, V. (1994) *Eur. J. Biochem.*, **223**, 655–663.
69. Hertle, R. (2002) *J. Membr. Biol.*, **189**, 1, 1–14.
70. Tweten, R.K. (2005) *Infect. Immun.*, **73**, 10, 6199–6209.
71. Shannon, J.G., Ross, C.L., Koehler, T.M., Rest, R.F. (2003) *Infect. Immun.*, **71**, 6, 3183–3189.
72. Mosser, E.M. Rest, R.F. (2006) *BMC Microbiol.*, **6**, 56.
73. Dang, T.X., Hotze, E.M., Rouiller, I., Tweten, R.K., Wilson-Kubalek, E.M. (2005) *J. Struct. Biol.*, **150**, 100–108.
74. Schuerch, D.W., Wilson-Kubalek, E.M. Tweten, R.K. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 35, 12537–12542.
75. Bavdek, A., Gekara, N.O., Priselac, D., Aguirre, I.G., Darji, A., Chakraborty, T., Macek, P., Lakey, J.H., Weiss, S., Anderluh, G. (2007) *Biochemistry*, **46**, 4425–4437.
76. Soltani, C.E., Hotze, E.M., Johnson, A.E., Tweten, R.K. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 51, 20226–20231.

77. Heuck, A.P., Savva, C.G., Holzenburg, A., Johnson, A.E. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 31, 22629–22637.
78. Tilley, S.J., Orlova, E.V., Gilbert, R.J.C., Andrew, P.W., Saibil, H.R. (2005) *Cell*, **121**, 247–256.
79. Rossjohn, J., Polekhina, G., Feil, S.C., Morton, C.J., Tweten, R.K., Parker, M.W. (2007) *J. Mol. Biol.*, **367**, 1227–1236.
80. Красильников О.В., Терновский В.И., Мусаев Ю.М., Таимухамедов Б.А., (1980) Доклады Академии наук УзССР, **7**, 66–68.
81. Красильников О.В., Терновский В.И. и Таимухамедов Б.А. (1981) Биофизика, **26**, 271–275.
82. Merzlyak, P.G., Yuldasheva, L.N., Rodrigues, C., Carneiro, C.M., Krasitsnikov, O.V., Bezrukov S.M. (1999) *Biophys. J.*, **77**, 3023–3033.
83. Gouaux, E., Braha, O., Hobaugh, M., Song, L., Cheley, S., Shustak, C., Bayley, H. (1994) *Biochemistry*, **91**, 12828–12831.
84. Montoya, M., Gouaux, E. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, **1609**, 19–27.
85. Jayasinghe, L., Miles, G., Bayley, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 4, 2195–2204.
86. Cheley, S., Malghani, M.S., Song, L., Hobaugh, M., Gouaux, J.E., Yang, J., Bayley, H. (1997) *Protein Eng.*, **10**, 12, 1433–1443.
87. Gouaux, E. (1998) *J. Struct. Biol.*, **121**, 110–122.
88. Kawate, T., Gouaux, E. (2003) *Protein Sci.*, **12**, 997–1006.
89. Galdiero, S., Gouaux, E. (2004) *Protein Sci.*, **13**, 1503–1511.
90. Aksimentiev, A., Schulten, K. (2005) *Biophys. J.*, **88**, 3745–3761.
91. Bhakdi, S., Walev, I., Husmann, M., Valeva, A. (2005) *Curr. Top. Genet.*, **11**, 91–110.
92. Menestrina, G., Serra, M.D., Comai, M., Viero, M.C., Werner, S., Colin, D.A., Monteil, H., Prevost, G. (2003) *FEBS Lett.*, **552**, 54–60.
93. Caiazza, N.C., O'Toole, G.A. (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 10, 3214–3217.
94. Budarina, Z.I., Sinev, M.A., Mayorov, S.G., Tomashevski, A.Y., Shmelev, I.V., Kuzmin, N.P. (1994) *Arch. Microbiol.*, **161**, 252–257.
95. Andreeva, Zh.I., Nesterenko, V.F., Yurkov, I.V., Budarina, Z.I., Sineva, E.V., Solonin, A.S. (2006) *Protein Expr. Purif.*, **47**, 186–193.
96. Andreeva, Zh.I., Nesterenko, V.F., Fomkina, M.G., Ternovsky, V.I., Suzina, N.E., Bakulina, A.Y., Solonin, A.S., Sineva, E.V. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 253–263.
97. Ковалевская (Андреева) Ж.И. (2007) Выделение и характеристика гемолизина *Bacillus cereus*: Дисс. канд. биол. наук. М.: ФГУП «ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов», 156 с.
98. Кларксон Д. (1978) Транспорт ионов и структура растительной клетки. Москва, Мир, с. 85–86.
99. Sato, N., Kurotaki, H., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T. (1998) *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 311–314.
100. Fivaz, M., Velluz, M., van der Goot, F.G. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 53, 37705–37708.
101. Fukushima, K., Ikehara, Y., Kanai, M., Kochibe, N., Kuroki, M., Yamashita, K. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 38, 36296–36303.
102. Diep, D.B., Nelson, K.L., Lawrence, T.S., Sellman, B.R., Tweten, R.K., Buckley, J.T. (1999) *Mol. Microbiol.*, **31**, 3, 785–794.
103. Kennedy, C.L., Krejany, E.O., Young, L.F., O'Connor, J.R., Awad, M.M., Boyd, R.L., Emmins, J.J., Lyras,

- D. and Rood, J.I.* (2005) *Mol. Microbiol.*, **57**, 5, 1357–1366.
104. *Olson, R., Gouaux, E.* (2005) *J. Mol. Biol.*, **350**, 997–1016.
105. *Jayasinghe, L., Bayley, H.* (2005) *Protein Sci.*, **14**, 2550–2561.
106. *Miles, G., Jayasinghe, L., Bayley, H.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 4, 2205–2214.
107. *Sugawara-Tomita, N., Tomita, T., and Kamio, Y.* (2002) *J. Bacteriol.*, **184**, 17, 4747–4756.
108. *Nguyen, V.T., Kamio, Y., and Higuchi, H.* (2003) *EMBO J.*, **22**, 19, 4968–4979.
109. *Kaneko, J., Kamio, Y.* (2004) *Bio- sci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 5, 981–1003.
110. *Nguyen, V.T., Kamio, Y.* (2004) *J. Biochem.*, **136**, 563–567.
111. *Wallace, A.J., Stillman, T.J., Atkins, A., Jamieson, S.J., Bullough, P.A., Green, J., Artymiuk, P.J.* (2000) *Cell*, **100**, 265–276.
112. *Wyborn, N.R., Clark, A., Roberts, R.E., Jamieson, S.J., Tzokov, S., Bullough, P.A., Stillman, T.J., Artymiuk, P.J., Galen, J.E., Zhao, L., Levine, M.M., Green, J.* (2004) *Microbiology*, **150**, 1495–1505.
113. *Tzokov, S.B., Wyborn, N.R., Stillman, T.J., Jamieson, S., Czudnochowski, N., Artymiuk, P.J., Green, J., Bullough, P.A.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 32, 23042–23049.
114. *Barth, H., Aktories, K., Popoff, M., Stiles, B.* (2004) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**, 3, 373–402.
115. *Rainey, G., Wigelsworth, D.J., Ryan, P.L., Scobie, H.M., Collier, R.J., Young, J.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 37, 13278–13283.
116. *Mogridge, J., Cunningham, K., Collier, R.J.* (2002) *Biochemistry*, **41**, 1079–1082.
117. *Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S.H., van der Goot, F.G.* (2003) *J. Cell Biol.*, **160**, 321–328.
118. *Sherer, K., Li, Y., Cui, X., Eichacker, P.Q.* (2007) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **175**, 211–221.
119. *Muehlbauer, S.M., Evering, T.H., Bonuccelli G., Squires, R. C., Ashton, A.W., Porcelli, S. A., Lisanti, M.P., Brojatsch, J.* (2007) *Cell Cycle*, **6**, 758–766.
120. *Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L.M., Herve, P.* (2006) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 2, 564–582.
121. *Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., Nissen-Meyer, J.* (2005) *J. Pept. Sci.*, **11**, 688–696.
122. *Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., van der Donk, W.A.* (2005) *Chem. Rev.*, **105**, 633–683.
123. *Breukink E., van Heusden H.E., Vollmerhaus. P.J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A.J., de Kruijff, B.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 19898–19903.
124. *Gilmore, M.S., Haas, W.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 24, 8401–8402.
125. *Ivanovic, T., Agosto, M.A., Zhang, L., Chandran, K., Harrison, S.C., Nibert, M.L.* (2008) *EMBO J.*, **27**, 1289–1298.
126. *Pérez-Berná, A.J., Guillén, J., Moreno, M.R., Bernabeu, A., Pabst, G., Laggner, P., Villalain, J.* (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 8089–8101.
127. *Clarke, D., Griffin, S., Beales, L., Gelais, C.S., Burgess, S., Harris, M., Rowlands, D.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 48, 37057–37068.
128. *Steinmann, E., Penin, F., Kallis, S., Patel, A.H., Bartenschlager, R., Pietschmann T.* (2007) *PLoS Pathogens*, **3**, 7.
129. *Cavalier-Smith, T.* (2002) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 297–354.
130. *Maurelli, A.T.* (2007) *FEMS Microbiol. Lett.*, **267**, 1–8.

131. *Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E.* (2008) *FEMS Microbiol Rev*, **32**, 579–606.
132. *Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M., Scherer, S.* (2006) *BMC Microbiol.*, **6**, 20.
133. *Zakharova, M.V., Beletskaya, I.V., Denjmukhametov, M.M., Yurkova, T.V., Semenova, L.M., Shlyapnikov, M.G., Solonin, A.S.* (2002) *Mol. Genet. Genomics*, **267**, 171–178.
134. *Summers, D.* (1998) *Mol. Microbiol.*, **29**, 1137–1145.
135. *Zakharova, M.V., Beletskaya, I.V., Bolovin, D.V., Yurkova, T.V., Semenova, L.M., Solonin, A.S.* (2003) *Mol. Genet. Genomics*, **270**, 415–419.
136. *Chen, M., Zhao, J.Z., Collins, H.L., Earle, E.D., Cao, J., Shelton, A.M.* (2008) *PLoS ONE.*, **3**, 2284–2290.
137. *Karginov, V.A., Nestorovich, E.M., Schmidtman, F., Robinson, T.M., Yohannes, A., Fahmi, N.E., Bezrukov, S.M., Hecht, S.M.* (2007) *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 5424–5431.
138. *Moayeri, M., Robinson, T.M., Leppala, S.H., Karginov, V.A.* (2008) *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, **52**, 6, 2239–2241.
139. *Gillor, O., Kirkup, B.C., Riley, M.A.* (2004) *Adv. Appl. Microbiol.*, **54**, 129–146.
140. *Diez-Gonzalez, F.* (2007) *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, **8**, 15–23.
141. *Braha, O., Gu, L., Zhou, L., Lu, X., Cheley, S., Bayle, H.* (2000) *Nature biotechnol.*, **18**, 1005–1007.
142. *DeBlois, R.W., Bean, C.P.* (1970) *Rev. Sci. Instrum.*, **41**, 909–916.
143. *Kasianowicz, J.J., Brandin, E., Branton, D., Deamer, D.W.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13770–13773.
144. *Howorka, S., Cheley, S., Bayley, H.* (2001) *Nature biotechnol.*, **19**, 636–639.
145. *Robertson, J.W., Rodrigues, C.G., Stanford, V.M., Rubinson, K.A., Krasilnikov, O.V., Kasianowicz, J. J.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 20, 8207–8211.
146. *Noireaux, V., Libchaber, A.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 51, 17669–17674.
147. *Shim, J.W., Gu, L.Q.* (2007) *Anal. Chem.*, **79**, 2207–2213.
148. *Kang, X.F., Cheley, S., Rice-Ficht, A.C., Bayley, H.* (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 4701–4705.
149. *Wu, H.C., Bayley, H.* (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 6813–6819.
150. *Rhee, M., Burns, M.A.* (2007) *Trends Biotechnol.*, **25**, 4, 174–181.
151. *Shapovalov, G., Lester, H.A.* (2004) *J. Gen. Physiol.*, **124**, 151–161.
152. *Jung, Y., Bayley, H., Movileanu, L.* (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 15332–15340.
153. *Faherty, C.S., Maurelli, A.T.* (2008) *Trends Microbiol.*, **16**, 173–180.
154. *Lin J.-H., Baumgaertner, A.* (2000) *Biophys. J.*, **78**, 1714–1724.
155. *Czajkowsky, D.M., Hotze, E.M., Shao, Z., Tweten, R.K.* (2004) *EMBO J.*, **23**, 3206–3215.