

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА НА ФЕРМЕНТЫ ГЛИКОГЕНОЛИЗА

©2007 г.

Н. А. ЧЕБОТАРЕВА

Институт биохимии им. А.Н Баха РАН, Москва

I. Введение. II. Молекулярный краудинг, создаваемый осмолитами.
III. Влияние молекулярного краудинга на ферменты гликогенолиза.
IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КРАУДИНГ

Все биохимические процессы в клетке протекают в высоко концентрированной среде, содержащей белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и низкомолекулярные соединения. В совокупности концентрация макромолекул достигает величины 50–400 мг/мл [обз. 1–3], при этом молекулы занимают значительную часть объема среды – до 40% [1]. Подобные условия в клетке обозначаются как «молекулярный краудинг» (crowding – столпотворение). Рис. 1 демонстрирует условия краудинга в интактной клетке [4]. Согласно современной точке зрения, цитоплазма скорее заполнена крупными ансамблями макромолекул, образующими функциональные комплексы, чем свободно диффундирующими и сталкивающимися макромолекулами [3]. Краудинг подразумевает наличие неспецифического стерического отталкивания молекул, которое присутствует всегда, независимо от других взаимодействий макромолекул, например, электростатических или гидрофобных. Более точно «молекулярный краудинг» означает эффект «исключенного объема», обусловленного взаимной непроницаемостью всех молекул растворенных веществ [5–7].

Принятые сокращения: Phb – гликогенфосфоорилаза *b*, PhK – киназа фосфоорилазы, ТМАО - триметиламин-N-оксид, ПЭГ – полиэтиленгликоль.

Адрес для корреспонденции: chebotareva@inbi.ras.ru

Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ № 05-04-48691а, 06-04-39008-ГФЕН_а, 07-04-07054-д) и Программой «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

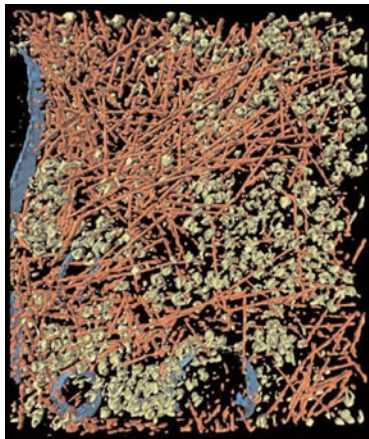


Рис. 1. Условия краудинга в цитоплазме интактной подвижной клетки *Dictyostelium discoideum*. Цитоплазма заполнена макромолекулярными компонентами, создающими условия краудинга: филаменты актина (обозначены красноватым цветом), рибосомы и другие макромолекулярные комплексы (зеленый цвет) и мембраны (синий цвет) (перепечатано с разрешения из статьи [4] © 2002 AAAS).

нию скоростей биохимических реакций или сдвигу положения равновесия реакций в сторону ассоциации [5, 6, 8, 9]. Влияние краудинга на гидродинамические и термодинамические свойства растворов компактных глобулярных белков можно объяснить с помощью простой модели, рассматривающей молекулы белка как жесткие частицы сферической формы. Исключается объем, который недоступен центру сферы (рис. 2). Чем больше объем рассматриваемой макромолекулы и чем выше концентрация остальных молекул, тем для нее меньше доступный объем в условиях краудинга [6].

ИСКЛЮЧЕННЫЙ ОБЪЕМ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВЕЩЕСТВА

Молекулярный краудинг оказывает значительное влияние на термодинамические активности всех растворенных молекул как больших, так и малых. В растворе, содержащем макромолекулы, которые

Условия краудинга в клетке могут создаваться не только присутствием макромолекул, но и высокими концентрациями осмолитов [8]. Осмолиты – это низкомолекулярные органические соединения, такие как полиолы, некоторые аминокислоты и метиламины.

Теоретические аспекты влияния эффекта исключенного объема на биохимические реакции подробно рассмотрены в ряде обзоров и статей [6–19]. Экспериментальные данные по влиянию молекулярного краудинга на положение равновесия и скорость таких биохимических процессов, как ассоциация, обратимая денатурация и фолдинг белка, полимеризация актина, сборка прототфибрилл и фибрилл и др., изученные в модельных системах *in vitro*, приведены в обзорах [3, 5–9]. Во всех случаях внесение инертных молекул (агентов краудинга) в достаточно высоких концентрациях приводит к усилению взаимодействий, повышению

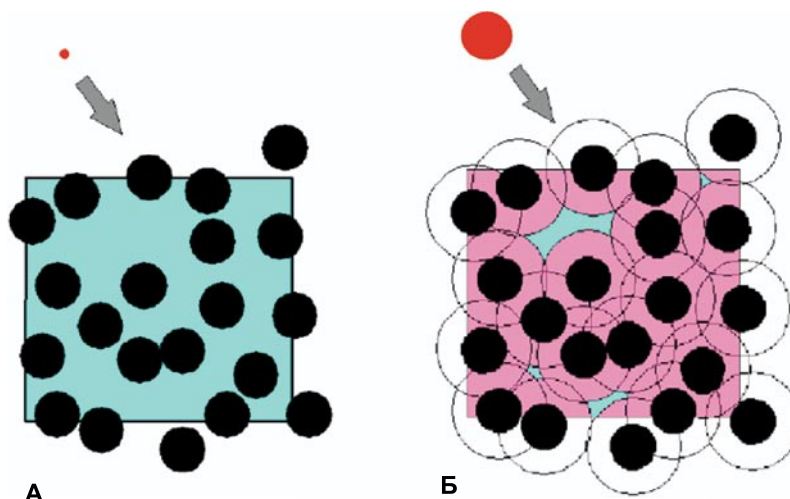


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая концепцию исключенного объема.

Квадраты представляют элементы объема, содержащие макромолекулы (черный цвет), занимающие ~ 30% общего объема. Доступный объем (голубой цвет) – это часть объема, которая доступна центру другой молекулы (красный цвет).

А. Центр молекулы небольшого размера может занять почти 70% оставшегося объема (голубой цвет).

Б. Для центра молекулы, сравнимой по размеру с черными сферами, исключается почти весь оставшийся объем (черный и розовый цвет), так как центр этой молекулы (красный цвет) не может приблизиться к макромолекулам (черный цвет) на расстояние меньшее, чем показано полыми кругами (перепечатано с разрешения из статьи [6]).

взаимодействуют исключительно через стерическое отталкивание, существует очень простое соотношение между эффективной и действительной концентрациями каждого растворенного вещества [6]:

$$\gamma_i = a_i/c_i = v_{\text{total}}/v_{a,i} \quad (1)$$

где a_i – эффективная концентрация, или термодинамическая активность, γ_i – коэффициент активности, c_i – концентрация, v_{total} – общий объем, $v_{a,i}$ – объем, доступный веществу i -го типа. Очевидно, что в условиях краудинга $\gamma_i > 1$, так как $v_{a,i} < v_{\text{total}}$.

Рассмотрим обратимую реакцию гетероассоциации $A + B \leftrightarrow AB$.

Поскольку внутриклеточная среда является термодинамически неидеальной, константа равновесия выражается через термодинамические активности:

$$K = a_{AB} / a_A a_B = \gamma_{AB} [AB] / \gamma_A \gamma_B [A][B] \quad (2)$$

В условиях краудинга кажущаяся константа равновесия K_{app} связана с истинной константой K уравнением вида:

$$K_{app} = K \cdot \Gamma, \quad (3)$$

где Γ – фактор неидеальности, $\Gamma = (\gamma_A \gamma_B) / \gamma_{AB}$. В условиях краудинга фактор неидеальности может быть значительно больше единицы [11, 20]. Коэффициенты термодинамической активности белков можно оценить, исходя из простых структурных моделей, в которых глобулярные белки представлены сферами, эллипсоидами или сфероцилиндрами [21]. Оценивая подобным путем коэффициенты активности биомолекул и величину фактора неидеальности, можно предсказать эффект краудинга на положение равновесия и скорости биохимических реакций.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КРАУДИНГ И РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ОБЪЕМА

В настоящее время отмечается особый интерес к роли краудинга в поддержании постоянного объема клетки [22]. Теория краудинга постулирует, что термодинамическая активность белка в условиях краудинга превышает активность того же белка при равной концентрации в разбавленном растворе [11, 20]. В условиях краудинга реакционная способность любого растворимого макромолекулярного вещества будет сильно зависеть от доступного объема [6]. Отсюда следует, что относительно небольшие изменения объема, занятого макромолекулами, могут значительно влиять на равновесие и кинетику разнообразных внутриклеточных реакций [6, 22, 23].

Поддержание клеточного объема – это фундаментальный физиологический процесс и необходимое требование для выживания клетки [22, 24–29]. Постоянство клеточного объема требует непрерывной работы регуляторных механизмов, таких как транспорт ионов через клеточную мембрану, аккумуляция или удаление органических осмотитов и метаболитов. Многие типы клеток в ответ на осмотическое разбухание или сжатие активизируют функцию транспортеров или метаболические реакции, которые находятся в латентном состоянии в клетках нормального объема. Разбухание клеток сопровождается увеличением синтеза гликогена и ингибированием гликолиза [22, 30–32], ингибированием протеолиза и стимулированием синтеза белка [33–34]. Молекулярный краудинг может быть тем самым механизмом, благодаря которому клетка «чувствует» относительно малые изменения объема, а точнее изменения концентрации внутриклеточных веществ [22]. Получены данные, согласно которым изменения

общей концентрации цитоплазматических белков, а следовательно и краудинга, может служить сигналом изменения клеточного объема [35–37]. Даже небольшие изменения (10%) концентрации внутриклеточных белков могут привести в условиях краудинга к 10-кратному увеличению термодинамической активности регуляторных белков и, таким образом, изменить их способность связываться с мембраной и активизировать транспортеры ионов [22].

Молекулярный краудинг может играть важную роль в биологии и физиологии клетки [3, 5–8, 22, 38–40], а также иметь решающее влияние на эволюцию сигнальных путей клетки [41].

Как уже упоминалось, любые реакции, приводящие к увеличению доступного клеточного объема, должны будут стимулироваться в условиях краудинга. К таким реакциям относятся ассоциация макромолекул, образование мультиферментных комплексов и надмолекулярных структур, фолдинг белков и нуклеиновых кислот, образование агрегатов и амилоидных тел включения при некоторых заболеваниях (болезни Паркинсона, Альцгеймера и др.) [3]. Так, например, взаимодействие гликолитических ферментов со структурой цитоскелета усиливается при увеличении степени краудинга, достигавшегося путем добавления белка. Наблюдалось усиление связывания гликолитических ферментов, но особенно увеличивалось связывание фосфофруктокиназы, энолазы и пируваткиназы [42]. Увеличение ионной силы при добавлении физиологических концентраций соли лишь незначительно снижало прочность связывания ферментов, а создание физиологических концентраций, как соли, так и белка, приводило к увеличению связывания всех гликолитических ферментов [43].

Цель настоящего обзора – обсуждение влияния краудинга на ферменты гликогенолиза (гликогенфосфорилазу *b* и киназу фосфорилазы). В обзоре будет рассмотрено влияние молекулярного краудинга, создаваемого высокими концентрациями осмолитов, на такие реакции ферментов гликогенолиза, как ассоциация, изомеризация, денатурация макромолекул, образование надмолекулярных структур и взаимодействие макромолекул с лигандами.

II. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КРАУДИНГ, СОЗДАВАЕМЫЙ ОСМОЛИТАМИ

В ответ на стресс (осмотический, химический или термический) многие живые организмы накапливают высокие концентрации осмолитов, которые защищают белки в условиях стресса [44–48]

и регулируют объем клетки [49]. Например, ткани акул и скатов содержат высокую концентрацию мочевины. Известно, что мочевина вызывает денатурацию белков, однако этот эффект может быть компенсирован за счет поддержания в клетке высокой концентрации «противодействующих» (counteracting) осмолитов, особенно таких как триметиламин-N-оксид (ТМАО), бетаин и саркозин [44–48]. Было показано *in vivo*, что ТМАО компенсирует повреждающее действие избытка солей и гидростатического давления [50] у глубоководных животных.

Эффект ТМАО на стабильность белков и ферментативную активность широко изучался *in vitro* [8, 44, 46–48, 51–56]. ТМАО находится в нейтральном состоянии (форме цвиттериона) при pH больше, чем его $pK_a = 4,66$ [51–53] и в положительно заряженной форме – при $pH < pK_a$. В области pH 6,0–8,0 ТМАО оказывает стабилизирующее действие на белки [53]. На примере анализа термоденатурации трех белков (лизоцима, рибонуклеазы-А и апо- α -лактальбумина) было показано стабилизирующее действие ТМАО при $pH > 5$, а при $pH < 5$ – дестабилизирующее [53]. Стабилизирующий эффект осмолита авторы объясняют преимущественно «эффектом исключенного объема», подразумевая под этим исключение осмолита из ближайшего окружения белка (предпочтительная гидратация белка). Дестабилизирующее действие положительно заряженной формы ТМАО при значениях $pH < 5$ объясняется предпочтительным связыванием осмолита с белком [53].

Некоторые организмы, накапливающие пролин, адаптировались к жизни в условиях высоких концентраций солей и используют осмолиты для компенсации высокого внешнего осмотического давления [45]. В воде океана средняя осмотическая концентрация соли (в основном NaCl) порядка 1000 мОсм (или 1,0 Осм). У одной группы глубоководных животных (осмоконформеров) предотвращение осмотического сжатия клеток достигается тем, что внутриклеточная жидкость имеет такое же осмотическое давление – 1,0 Осм [49].

В опытах *in vivo* [57] Кейли и др. изучали рост *E. coli* в условиях осмотического стресса, когда осмоляльность внешней среды менялась в широких пределах (1.02–2.17 Осм). При этом в условиях осмотического стресса было установлено, что с повышением осмотического давления повышалось количество бетаина в цитоплазме, а количество K^+ и количество биополимеров оставалось относительно постоянным. С ростом осмоляльности наблюдалось значительное снижение скорости роста *E. coli* и уменьшение количества цитоплазматической воды в клетке, что приводило к повышению concentra-

ции биополимеров и всех растворенных веществ, то есть к усилению краудинга. При росте осмоляльности внешней среды увеличивалась концентрация бетаина в цитоплазме. Так, при внешней осмоляльности 1.02 Осм концентрации бетаина и K^+ составляли 0.54 М и 0.48 М, а при внешней осмоляльности 2.17 Осм – 1.67 и 0.72 М, соответственно. Бетаин выступал в качестве осмопротектора. Оказалось, что при увеличении осмоляльности скорость роста *E. coli* падает, добавление же бетаина в культуральную среду значительно увеличивало период сохранения максимальной скорости роста. Авторы установили, что корреляционное соотношение между скоростью роста, количеством цитоплазматической воды и цитоплазматической концентрацией K^+ одинаково в среде, содержащей и не содержащей бетаин. На основании этих данных было высказано предположение, что увеличение молекулярного краудинга, которое происходит с ростом осмоляльности среды, дает фундаментальное объяснение как снижению скорости роста, так и нечувствительности взаимодействий типа белок-ДНК к изменению концентрации K^+ в цитоплазме [57]. Краудинг усиливается с ростом осмоляльности и, в свою очередь, делает нечувствительным связывание белков с нуклеиновыми кислотами к изменениям концентраций K^+ (путем воздействия на диффузию биополимеров и /или равновесие сборки) и является определяющим фактором роста клеток в условиях осмотического стресса. Изменение концентраций биополимеров и краудинга может объяснить увеличение коэффициента активности цитоплазматической воды с повышением осмоляльности у растущей *E. coli* [57, 58].

Накоплено много экспериментальных данных по защитному действию осмолитов [8, 47, 48, 51–53, 59–66], однако молекулярные механизмы их действия в значительной степени неясны. Зачастую одни и те же экспериментальные данные объясняются с помощью механизмов, противоречащих друг другу: эффект осмолитов интерпретируется либо как слабое взаимодействие осмолита с макромолекулой (предпочтительное связывание), либо – как стерическое отталкивание, т.е. эффект краудинга [см. обзор 17].

КРАУДИНГ, ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНАЯ ГИДРАТАЦИЯ И ОСМОТИЧЕСКИЙ СТРЕСС

Следует отметить, что существуют разные интерпретации влияния осмолитов на биохимические реакции. Одни исследователи рассматривают эффект осмолитов в терминах статистической механики,

используя теорию исключенного объема (краудинга) и рассчитывая вторые вириальные коэффициенты, характеризующие взаимодействия молекул в растворе [12–16, 67–74]. Другие – в терминах предпочтительной гидратации белков [46, 47, 51, 52, 54, 59–61, 73–80], рассматривая пограничный слой вблизи поверхности макромолекулы, из которого исключаются молекулы осмолита, а их место занимают молекулы воды, причем, по мнению некоторых авторов, свойства молекул воды граничного (гидратированного) слоя отличаются от свойств воды в свободном объеме [81, 82]. Винзор и Вилс [12, 15] и Дэвис-Сирл и др. [17] в своих работах проанализировали оба подхода и показали, что они практически эквивалентны.

Парсегиан и др. [83] сравнили три термодинамических подхода: осмотический стресс, краудинг и предпочтительную гидратацию белка. Анализ, как предпочтительной гидратации, так и осмотического стресса – базируются на соотношении Гиббса-Дюгема [83]. В работе [83] показана эквивалентность трех подходов. Детальное рассмотрение, включая математические формулы и термодинамические параметры, можно найти в оригинальных работах [12, 15, 17, 77–79, 83].

При моделировании условий молекулярного краудинга *in vitro* к раствору добавляют краудинг-агенты для заполнения части объема. Основное требование к этим агентам – они должны быть нейтральны и не взаимодействовать с исследуемыми макромолекулами, поскольку понятие краудинга подразумевает наличие лишь стерического отталкивания между отдельными молекулами. Наиболее часто в качестве агентов краудинга используют бычий сывороточный альбумин, овальбумин, фикоил 70, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и осмолиты (см. таблицы в обзоре [8]).

Ниже обсуждается влияние краудинга, создаваемого высокими концентрациями осмолитов, на реакции ферментов гликогенолиза – ассоциацию, изомеризацию макромолекул, денатурацию, взаимодействие макромолекул с лигандами и образование надмолекулярных структур.

III. ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА НА ФЕРМЕНТЫ ГЛИКОГЕНОЛИЗА

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФОСФОРИЛАЗЫ *b* С FAD

Гликогенфосфорилаза (Phb; КФ 2.4.1.1) – один из ключевых ферментов гликогенолиза, катализирует фосфоролит гликогена. В покоя-

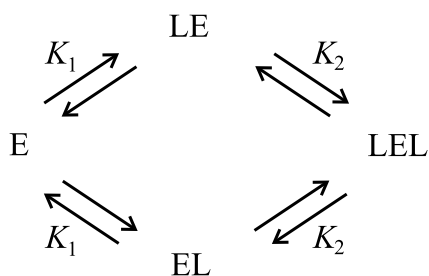


Рис. 3. Схема связывания FAD (L) димерной молекулой Phb (E).

EL и LE – обозначают 1:1 комплексы фермент-лиганд, LEL – тройной комплекс.

щейся мышце Phb существует в виде неактивной без AMP, нефосфорилированной формы *b*. Активность Phb регулируется как путем фосфорилирования, так и посредством конформационных изменений фермента при взаимодействии с аллостерическими эффекторами. Молекула Phb представляет собой димер, состоящий из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 97,4 кДа [84]. Флавины (рибофлавин, FMN и FAD) являются аллостерическими ингибиторами мышечной Phb и обладают высоким сродством к ферменту [85–89]. Известно, что FAD является доминирующей формой среди флавинов в мышечной ткани. Влияние молекулярного краудинга, создаваемого высокими концентрациями осмолитов, триметиламин-N-оксида (ТМАО), бетаина и пролина, на взаимодействие мышечной Phb с FAD было изучено нами методом скоростной седиментации с использованием абсорбционной сканирующей системы при 20 °C [90, 91]. В отсутствие осмолитов связывание FAD с Phb хорошо описывается одной гиперболической зависимостью функции насыщения, Y , от концентрации свободного FAD, $[L]$, и одной константой диссоциации (K_{diss}) 17.8 (± 0.5) мкМ для двух эквивалентных и независимых центров димерной молекулы фермента. В условиях молекулярного краудинга, создаваемого осмолитами, зависимость Y от $[L]$ имеет S-образную форму. Кривая связывания приобретает все более выраженную сигмоидную форму по мере возрастания концентрации осмолита. Связывание лиганда (L) димерной молекулой Phb (E) представлено на следующей схеме, описывающей взаимодействие FAD и молекулы Phb с учетом двух констант диссоциации (рис. 3).

Константа диссоциации K_1 характеризует связывание первой молекулы FAD с димером Phb. Константа K_2 характеризует связывание второй молекулы FAD с комплексом димера фермента с одной молекулой лиганда. Влияние осмолитов на связывание FAD с Phb показано на рис. 4, на котором сопоставляются кривые насыщения, полученные в присутствии ТМАО, бетаина и пролина. Линии,

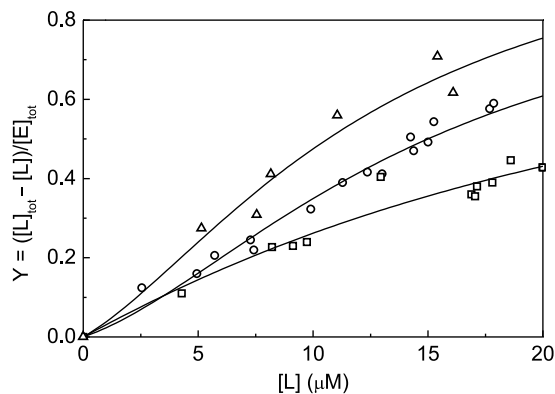


Рис. 4. Кривые насыщения для взаимодействия FAD с фосфорилазой *b* в присутствии осмолитов.

Линии представляют лучший фитинг [ур. (4)] результатов, полученных в присутствии 1 М концентраций бетаина (Δ), ТМАО (○) и пролина (□).

проведенные на рисунке через экспериментальные точки, представляют наилучшую аппроксимацию в терминах выражения:

$$Y = ([L]/K_1)(1 + [L]/K_2)/(1 + 2[L]/K_1 + [L]^2/(K_1K_2)) \quad (4)$$

где K_1 и K_2 обозначают микроскопические константы диссоциации, описывающие связывание FAD с E и EL (или LE) соответственно. Величины этих параметров приведены в табл. 1.

Чеботаревой и др. [90] установлено, что в присутствии осмолитов (0,5–1 М ТМАО, 1 М бетаина или 1 М пролина) зависимость степени насыщения димера Phb флавином от концентрации свободного FAD имеет S-образную форму. В условиях молекулярного краудинга,

Таблица 1

Кажущиеся константы диссоциации взаимодействия FAD с фосфорилазой *b* [91]

Осмолит	Концентрация (М)	K_1 (мкМ)	K_2 (мкМ)
–	–	17,8 (± 0,3)	17,8 (± 0,3)
ТМАО	0,5	21 (± 3)	7,5 (± 1,2)
ТМАО	1,0	50 (± 12)	5,5 (± 3,0)
Бетаин	1,0	36 (± 18)	4,8 (± 3,5)
Пролин	1,0	32 (± 8)	21 (± 14)

создаваемого осмолитами, появляются положительные кооперативные взаимодействия FAD-связывающих центров в димере Phb.

Существование индуцированных FAD конформационных изменений молекулы Phb в условиях молекулярного краудинга [90] подтверждено также методом разностной (скоростной) седиментации. Полученные результаты позволили сделать вывод, что в условиях краудинга равновесие изомеризации димера сдвигается в сторону образования более компактного состояния фермента с пониженным средством к FAD [90, 91].

АССОЦИАЦИЯ Phb В УСЛОВИЯХ МОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА

При нейтральном pH гликогенфосфоорилаза *b* (Phb) существует в форме димера. Конформационные изменения, индуцируемые связыванием AMP в аллостерическом активаторном центре, способствуют ассоциации Phb [84, 87]. Положение равновесия димер–тетрамер зависит от концентрации Phb, pH, ионной силы, температуры и присутствия аллостерических эффекторов и субстратов. Глюкозо-1-фосфат способствует ассоциации, в то время как гликоген и ингибиторы (АТР, АДР, флавины и др.) препятствуют образованию тетрамерной формы [86–88, 92–94]. При 15 °С переход димер–тетрамер является относительно медленным процессом, что позволяет разделить эти две формы методом скоростной седиментации, определить долю димера и тетрамера и рассчитать константу ассоциации K_{acc} в отсутствие и в присутствии осмолита. Константа ассоциации $K_{2,4}$ для равновесия димер–тетрамер в присутствии 1 М ТМАО увеличивается в 2 раза [95]. Сдвиг равновесия в сторону тетрамерной формы наблюдался и в том случае, когда в качестве краудинг-агента использовали ПЭГ (37 мг/мл) с молекулярной массой 4000, 15000 и 40000 [96].

Для количественной характеристики эффекта ТМАО на ассоциацию Phb были построены зависимости логарифма отношения кажущейся константы ассоциации $(K_{2,4})_M$ к истинной $(K_{2,4})$, $\ln[(K_{2,4})_M / K_{2,4}]$, от молярной концентрации осмолита, M , (C_M), которые оказались линейными (рис. 5). Теория исключенного объема достаточно хорошо предсказывает линейную зависимость $\ln(K_{2,4})_M$ от C_M :

$$\ln[(K_{2,4})_M / K_{2,4}] = (2V_{2,M} - V_{4,M})C_M, \quad (5)$$

где второй вириальный коэффициент ($V_{2,M}$ для димера и $V_{4,M}$ для тетрамера) выражается через исключаемый объем совместный с ТМАО. Молекула ТМАО рассматривается в виде сферы с радиусом, R_M , 0,3 нм. Величину $V_{2,M}$ и $V_{4,M}$ можно вычислить, аппроксимируя димер и тетрамер Phb эллипсоидами вращения. Значения парамет-

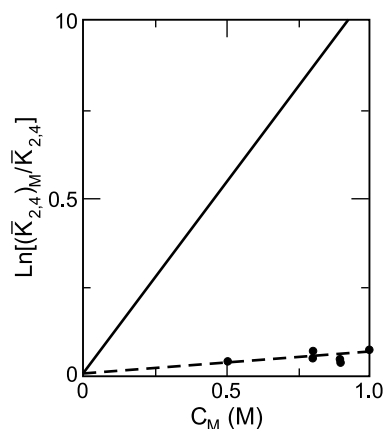


Рис. 5. Зависимость степени ассоциации Phb от концентрации ТМАО.

Кажущиеся константы ассоциации представлены графически в соответствии с уравнением (5). Точки – экспериментальные данные, сплошная линия проведена в соответствии с теоретической оценкой величины наклона $(2V_{2,M} - V_{4,M})$.

Величина константы изомеризации, контролирующей стадию перехода $T_2 \leftrightarrow R_2$ в присутствии АМР, берется много меньше единицы. Последствия от добавления концентрации C_M инертного вещества (ТМАО) являются двойственными. Наряду с эффектом краудинга на равновесие димер–тетрамер, проявляется его компенсирующее влияние на стадию изомеризации димера, $T_2 \leftrightarrow R_2$, в результате которого равновесие смещается в сторону более компактной, не ассоциирующей T_2 -конформации димерной молекулы Phb [91, 95].

Выражение для зависимости логарифма отношения кажущейся константы ассоциации $(K_{2,4})_M$ к истинной $(K_{2,4})$ от концентрации ТМАО (C_M) имеет вид:

$$\ln[(K_{2,4})_M / K_{2,4}] \approx [(2V_{2R,M} - V_{4R,M}) + 2(V_{2T,M} - V_{2R,M})]C_M, \quad (6)$$

где второй вириальный коэффициент для димера Phb в T_2 - или R_2 -конформации ($V_{2T,M}$ и $V_{2R,M}$) выражается через исключаемый объем совместный с ТМАО. Совпадение предсказанной величины угла наклона с экспериментальной достигается при условии, что $V_{2R,M}$ превышает $V_{2T,M}$ всего на 5 л/моль (т.е., 1,2% от величины $V_{2T,M}$). Относительное изменение объема (1,2%) сравнимо с соответствующим

ров были вычислены из геометрии молекул (фермента и осмолита) и равны 422 л/моль для $V_{2,M}$ и 833 л/моль для $V_{4,M}$ [95].

Сравнение величины тангенса угла наклона, полученного экспериментально, с теоретической величиной, полученной на основании оценки разности $(2V_{2,M} - V_{4,M})$, показало, что теория исключенного объема предсказывает больший эффект, чем наблюдаемый. Это может указывать на неадекватность простой модели «димер–тетрамер», используемой для расчета исключенного объема.

Для объяснения полученных данных была введена обратимая стадия изомеризации димера ($T_2 \leftrightarrow R_2$), которая предшествует ассоциации ($2R_2 \leftrightarrow R_4$). Соответствующая модель описывается схемой: $2T_2 \leftrightarrow 2R_2 \leftrightarrow R_4$.

значением (2,8%), полученным для дрожжевой гексокиназы [97].

Таким образом, незначительное увеличение степени ассоциации фосфорилазы *b* в присутствии ТМАО в сравнении с теоретическими предсказаниями означает, что эффект молекулярного краудинга на равновесие димер–тетрамер компенсируется сдвигом равновесия в реакции изомеризации димера $T_2 \leftrightarrow R_2$ в сторону более компактного, не ассоциирующего состояния T_2 .

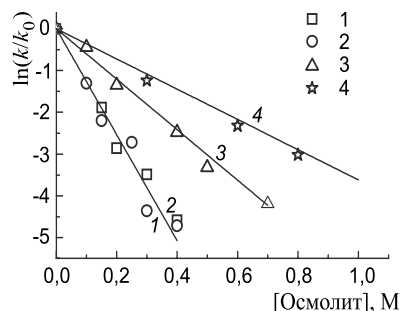


Рис. 6. Защитное действие осмолитов – ТМАО (1), бетаина (2), пролина (3), глицина (4) – при инактивации фосфорилазы *b* под действием 0,7 М GuHCl при 25 °С.

ВЛИЯНИЕ КРАУДИНГА НА ХИМИЧЕСКУЮ ДЕНАТУРАЦИЮ Phb

Согласно предсказаниям теории краудинга, осмолиты в высоких концентрациях должны сдвигать равновесие $N \leftrightarrow D$ (где N – нативный белок, а D – денатурированный) в сторону нативного белка [19]. При исследовании влияния осмолитов на кинетику химической денатурации Phb гуанидингидрохлоридом показано защитное действие ТМАО, бетаина, пролина и глицина [56]. В рамках теории активированного комплекса стабильность фермента характеризуется изменением свободной энергии активации (ΔG_0^\ddagger) процесса денатурации, а стабилизирующий эффект – изменением величины $\Delta\Delta G_0^\ddagger = \Delta G_{0\text{осм}}^\ddagger - \Delta G_0^\ddagger$ или $\Delta\Delta G_0^\ddagger = -RT \ln(k/k_0)$, где ΔG_0^\ddagger и $\Delta G_{0\text{осм}}^\ddagger$ – изменение свободной энергии активации, k_0 и k – константы скорости инактивации Phb в 0,7 М GuHCl в отсутствие и в присутствии осмолита соответственно.

Мерой стабилизации белка является величина тангенса угла наклона прямой на графике зависимости $\ln(k/k_0)$ от концентрации осмолита (рис. 6). Наиболее выраженный стабилизирующий эффект оказывают ТМАО и бетаин, наименее выражен эффект глицина (табл. 2) [56].

АССОЦИАЦИЯ РНК В УСЛОВИЯХ МОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА

Киназа фосфорилазы [PhK; КФ 2.7.1.38] играет ключевую роль в нервной и гормональной регуляции гликогенолиза в скелетных мышцах. PhK катализирует Ca^{2+} , cAMP-зависимое фосфорилирование и активацию Phb. Молекула фермента с молекулярной массой 1320 кДа [98–100] имеет сложную молекулярную организацию и представляет

Таблица 2
Стабилизирующий эффект осмолитов при инактивации фосфоорилазы *b* под действием 0,7 М GuHCl [56]

Осмолит	$\Delta\Delta G_0^\ddagger$ (кДж/моль)
ТМАО	26,7
Бетаин	24,9
Пролин	12,9
Глицин	6,6

собой гексадекамер, состоящий из четырех различных субъединиц со стехиометрией $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$, причем γ -субъединица является каталитической, а α -, β - и δ -субъединицы регуляторными [101–104]. Ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} стимулируют активность PhK, индуцируя изменения третичной и четвертичной структуры молекулы [102–106], а также стимулируют ассоциацию гексадекамера [91, 107–109]. Влияние молекулярного краундинга на ассоциацию PhK из скелетных мышц кролика было изучено методами скоростной седиментации, динамического светорассеяния и турбодиметрии. Методом скоростной седиментации показано, что (0,5–1,4 М) ТМАО и 1 М бетаин стимулируют ассоциацию киназы, индуцированную ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} . В присутствии ТМАО помимо ассоциатов, состоящих из относительно небольшого числа (n) молекул гексадекамера фермента ($n = 2, 3, 4, \dots$), были зарегистрированы крупные ассоциаты, включающие сотни молекул PhK [91, 107, 108]. Стимулирующее влияние ТМАО на ассоциацию PhK (в присутствии 0,1 мМ Ca^{2+} и 10 мМ Mg^{2+}) было подтверждено также методами турбидиметрии и динамического светорассеяния [107, 108]. Начальная скорость ассоциации, измеренная турбидиметрическим методом, нелинейно возрастала с ростом концентрации осмолита (0,4–1,4 М) [107].

Метод динамического светорассеяния позволяет оценить гидродинамический радиус образующихся ассоциатов. Как видно из рис. 7, в присутствии 0,5 М ТМАО (кривая 2) образуются частицы большего размера. На рис. 7. показаны только радиусы ассоциатов PhK. Радиус молекулы PhK равен 13 ± 1 нм.

Усиление ассоциации PhK в присутствии ТМАО можно объяснить в терминах термодинамической неидеальности. Согласно теории

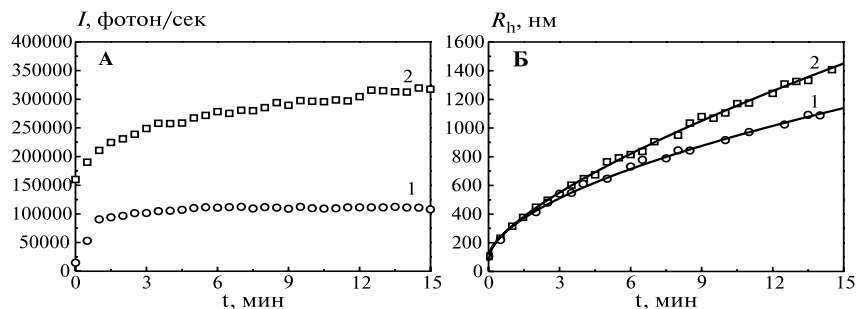


Рис. 7. Влияние ТМАО на ассоциацию PhK (0,3 г/л).

Зависимости интенсивности динамического светорассеяния (I) от времени (А) и гидродинамического радиуса от времени (Б), полученные в отсутствие ТМАО (1) и в присутствии 0,5 М ТМАО (2).

абсолютных скоростей реакций константу скорости второго порядка (k) характеризующую взаимодействие двух частиц ($P_i + P_j \rightarrow P_{i+j}$) можно записать следующими выражениями [9]:

$$k = \frac{k_B T}{h} K^\ddagger; \quad K^\ddagger = \frac{c^\ddagger}{c_i c_j}, \tag{7}$$

где k_B – константа Больцмана, T – абсолютная температура, K^\ddagger константа равновесия между начальными компонентами (P_i и P_j , концентрации c_i и c_j соответственно) и активированным комплексом (P^\ddagger , концентрация c^\ddagger). В условиях краудинга константа K^\ddagger рассматривается как кажущаяся константа равновесия:

$$K^\ddagger = K_0^\ddagger \frac{\gamma_i \gamma_j}{\gamma^\ddagger}, \tag{8}$$

где K_0^\ddagger – истинная константа равновесия, γ_i и γ_j коэффициенты термодинамической активности для частиц P_i и P_j , и γ^\ddagger – коэффициент термодинамической активности активированного комплекса. Термодинамические активности (a) и концентрации (c) связаны следующими соотношениями: $a_i = \gamma_i c_i$, $a_j = \gamma_j c_j$, и $a^\ddagger = \gamma^\ddagger c^\ddagger$.

Константа скорости реакций k , измеренная в присутствии краудинг-агента описывается следующим выражением:

$$k = k_0 \Gamma = k_0 \frac{\gamma_i \gamma_j}{\gamma^\ddagger}, \tag{9}$$

где k_0 – константа скорости в отсутствие краудинг-агента и Γ – фактор неидеальности ($\Gamma = \gamma_i \gamma_j / \gamma^\ddagger$). Коэффициент термодинамической актив-

ности для вещества m -го типа определяется долей общего объема, доступной этому веществу:

$$\gamma_m = \frac{V_{\text{total}}}{V_m}, \quad (10)$$

где v_{total} – общий объем и v_m – объем, доступный веществу m -го типа. Очевидно, что $\gamma_m > 1$, так как $v_m < v_{\text{total}}$. Поскольку размер активированного комплекса больше, чем размер частицы P_i или P_j , объем $v^\#$ (объем, доступный для активированного комплекса) меньше, чем объем v_i или v_j (объемы, доступные для частиц P_i и P_j , соответственно). Поэтому $\gamma^\#$ (коэффициент термодинамической активности активированного комплекса) больше, чем γ_i и γ_j (коэффициенты термодинамической активности частиц P_i и P_j). Так как значения $\gamma_i > 1$ и $\gamma_j > 1$, произведение $\gamma_i \gamma_j$ может быть больше, чем $\gamma^\#$ и $k > k_0$. Это означает, что термодинамическая неидеальность создаваемая осмолитами, приводит к ускорению ассоциации макромолекул. Такое рассмотрение позволяет объяснить увеличение скорости ассоциации PhK в присутствии ТМАО [108].

Эффект ТМАО и бетаина на ассоциацию PhK согласуется с выводами теории исключенного объема. Способность PhK образовывать ассоциаты большого размера в среде с высокой концентрацией осмолитов позволяет предполагать, что в клетке, благодаря эффекту молекулярного краудинга, часть фермента может существовать в ассоциированном виде или в виде надмолекулярных структур (в составе белок-гликогенового комплекса или в связанном виде с мембранами саркоплазматического ретикула [110, 111]).

Обсуждая возможное физиологическое значение образования высокомолекулярных ассоциатов PhK, пока можно высказать лишь предположение, что образование таких ассоциатов является либо одним из способов перехода фермента из активной в неактивную форму, либо, что ассоциированная форма PhK может фосфорилировать какой-то иной субстрат, помимо фосфоорилазы, например, гликогенсинтазу [110]. Авторы этой работы предполагают, что PhK может выполнять двойную функцию в биосинтезе гликогена: во-первых, контролировать деградацию гликогена в белок-гликогеновом комплексе посредством фосфорилирования Phb и, во-вторых, – регулировать биосинтез гликогена на мембранах саркоплазматического ретикула посредством фосфорилирования и, связанного с этим, ингибирования гликогенсинтазы. Правда, второе предположение может быть подтверждено или отвергнуто только в ходе дальнейших исследований.

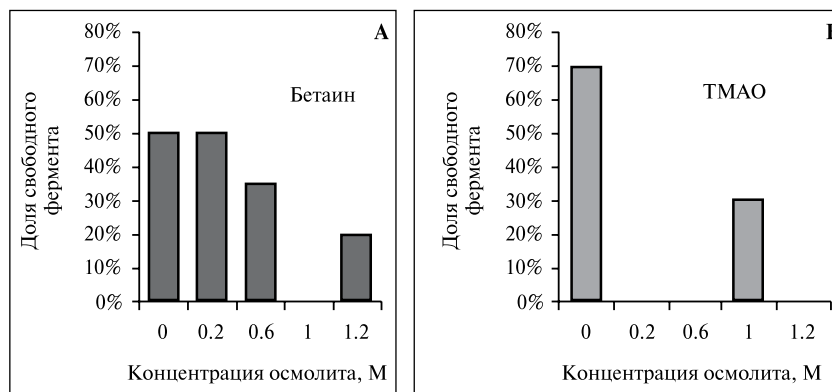


Рис. 8. Влияние ТМАО и бетаина на связывание PhK с гликогеном (40 мМ Hepes, pH 6,8, 0,1 мМ CaCl₂, 10 мМ MgCl₂; 20 °С). Зависимость доли свободного фермента от концентрации осмолита: бетаина (А) при общей концентрации PhK 0,25 мг/мл, гликогена 0,9 мг/мл; ТМАО (Б) при общей концентрации PhK 0,18 мг/мл, гликогена 0,08 мг/мл. Данные получены методом скоростной седиментации.

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КИНАЗЫ ФОСФОРИЛАЗЫ С ГЛИКОГЕНОМ И ФОСФОРИЛАЗОЙ *b*

Для понимания механизма действия ферментов гликогенолиза было важно изучить не только белок-белковые взаимодействия, но и взаимодействие ферментов с гликогеном в условиях краудинга, имитирующих условия в клетке. Влияние краудинга на образование надмолекулярных структур показано на примере взаимодействия PhK с гликогеном [112]. Это особенно важно, так как большая часть ферментов в мышечных клетках локализована в цитоплазме в ассоциированном состоянии с гликогеновыми гранулами [110, 113]. Методом седиментационного анализа мы показали, что ТМАО и бетаин усиливают взаимодействие PhK с гликогеном (рис. 8). В присутствии бетаина или ТМАО доля свободной PhK, зарегистрированная после осаждения гликогена и комплекса PhK-гликоген, уменьшается при возрастании концентрации осмолита (рис. 8). Согласно данным турбидиметрии бетаин увеличивает скорость и степень взаимодействия PhK с гликогеном [112].

Эффект пролина отличается от действия метиламинов. Согласно данным турбидиметрии и скоростной седиментации пролин препятствует образованию комплекса белок-гликоген [91, 112].

Наблюдаемое в наших исследованиях влияние ТМАО и бетаина на ассоциацию PhK и ее взаимодействие с гликогеном согласуется с основными положениями теории молекулярного краудинга, согласно которым краудинг благоприятствует олигомеризации белка и образованию надмолекулярных структур [5, 114–116].

Подавление этих процессов пролином свидетельствует об ином механизме действия, – предполагается слабое взаимодействие пролина с PhK.

Влияние молекулярного краудинга на взаимодействие киназы фосфорилазы с фосфорилазой b

Исследование эффекта краудинга на взаимодействие PhK с Phb представляет особый интерес по нескольким причинам. Во-первых, физиологическим субстратом PhK является белок – Phb (195 кДа), поэтому взаимодействие фермент–субстрат представляет собой взаимодействие белок–белок. Во-вторых, оба белка локализованы на высокомолекулярной матрице –гликогеновых частицах и непосредственно взаимодействуют с гликогеном [117–122]. Каждая субъединица димерной молекулы Phb содержит специфический центр связывания гликогена [123]. Для PhK установлено, что в связывании с гликогеном участвует α субъединица [124]. Присутствие Phb способствует связыванию PhK с гликогеном [121, 122, 125]. На рис. 9 показано седиментационное поведение смеси PhK и Phb в отсутствие осмолитов (А), в присутствии 0,6 М пролина (Б), 0,7 М бетаина (В) и 0,3 М ТМАО (Г). Медленно седиментирующая граница соответствует Phb ($s_{20,w} = 8.79$ S). Так как коэффициент седиментации PhK значительно больше, чем Phb, то PhK и ее комплекс с Phb седиментируют быстрее, чем Phb. Поэтому плато, образующееся в области мениска после оседания PhK и ее комплекса с Phb, соответствует концентрации свободной Phb. Фракция свободной Phb возрастает в 1,5 раза в присутствии 0,6 М пролина, 0,7 М бетаина или 0,3 М ТМАО. Таким образом, высокие концентрации пролина, бетаина и ТМАО полностью подавляют образование комплекса PhK–Phb [91, 112].

При интерпретации эффекта осмолитов на взаимодействие PhK–Phb необходимо принять во внимание то, что краудинг может влиять на конформацию белка. Мы показали, что ТМАО смещает равновесие реакции изомеризации димера Phb в сторону более компактной неактивной Т-конформации [91, 95]. Возможно, что конформационный переход Phb препятствует ее взаимодействию с PhK. Однако, условия молекулярного краудинга могут также оказывать влияние и на конформацию PhK.

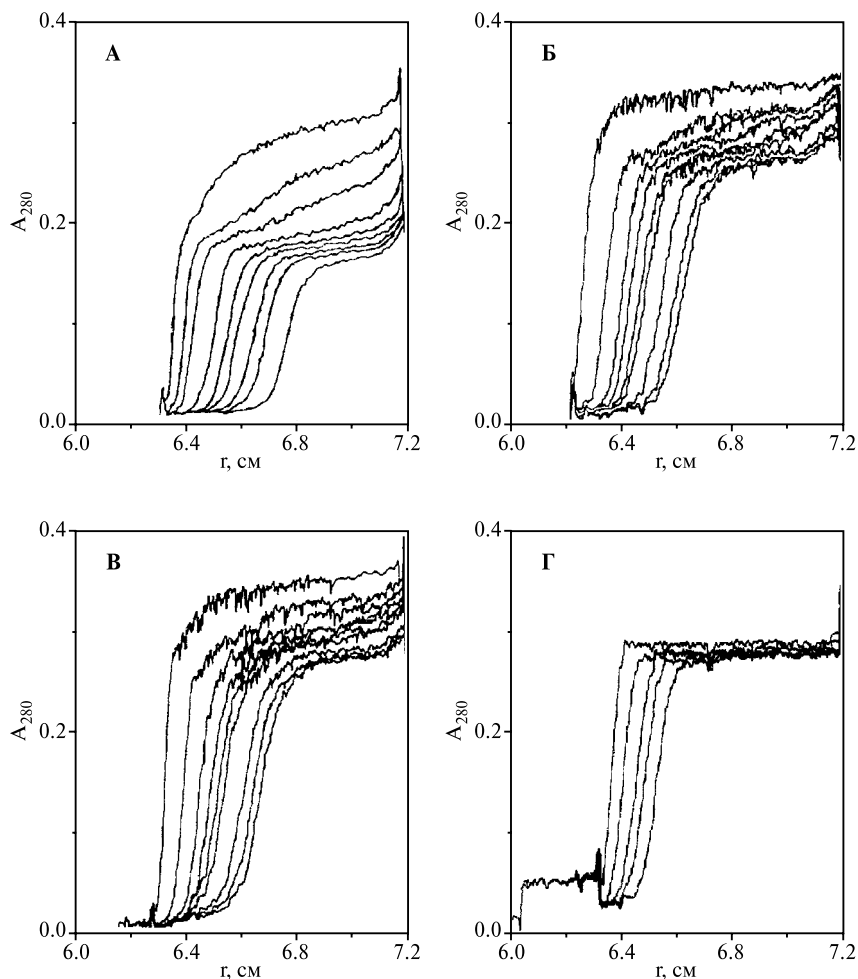


Рис. 9. Седиментационный анализ взаимодействия PhK (0,18 г/л) с Phb (0,39 г/л) pH 6,8, 0,1 мМ Са²⁺, 2 мМ Mg²⁺, 20 °С).

(А) Седиментационные профили в отсутствие осмолитов, (Б) в присутствии 0,6 М пролина, (В) в присутствии 0,7 М бетаина, (Г) в присутствии 0,3 М ТМАО. Скорость вращения ротора 48 000 об/мин. Время седиментации: 11, 16, 25, 32, 37, 44, 49, 58 мин (А); 6, 19, 28, 33, 38, 41, 50, 57, 61 мин (Б); 13, 20, 29, 35, 39, 42, 51, 56, 59 (В); 4, 10, 16, 20, 27 мин (Г).

Тот факт, что условия краудинга препятствуют образованию комплекса между PhK и ее субстратом, Phb, на первый взгляд, кажется физиологически нецелесообразным. Однако, еще ранее было установлено, что гликоген сильно влияет на взаимодействие PhK с Phb [120, 126]. Мы показали, что условия краудинга, создаваемые высокими концентрациями триметиламинов, благоприятствуют связыванию PhK и Phb с гликогеном. Согласно новейшим данным, полученным методом динамического светорассеяния, краудинг, создаваемый 1 М ТМАО, значительно усиливает взаимодействие в тройной системе PhK–Phb–гликоген (Меремьянин А.В., неопубликованные данные). Поскольку в живой клетке PhK и Phb входят в состав белок-гликогенового комплекса, то, вероятно, что специфические взаимодействия PhK и Phb с гликогеном позволяют преодолеть негативные последствия влияния молекулярного краудинга на белок-белковые взаимодействия.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно современным представлениям все биохимические процессы в живой клетке протекают в условиях молекулярного краудинга, оказывающего заметное влияние на скорость и равновесие различных реакций и стимулирующего процессы образования более компактных структур. К таким процессам относятся белок-белковые взаимодействия, конформационные переходы биомолекул, фолдинг и агрегация белка, а также возникновение мультиферментных комплексов и надмолекулярных структур. Предполагается, что краудинг играет заметную роль в такой важной физиологической функции клетки, как поддержание постоянного объема клетки.

Для понимания биохимических процессов, происходящих в живой клетке, необходимо имитировать условия краудинга в экспериментах *in vitro*.

Для ключевых ферментов гликогенолиза молекулярный краудинг служит фактором, оказывающим существенное влияние на взаимодействия типа белок-лиганд, белок-белок, конформационные переходы и образование надмолекулярных структур и, как следствие, на механизмы функционирования ферментов *in vivo*.

Обнаружено влияние краудинга на ассоциацию PhK и Phb. Показано, что краудинг стимулирует ассоциацию PhK в присутствии Ca^{2+} и Mg^{2+} с образованием надмолекулярных структур, включающих сотни молекул фермента. Краудинг способствует образованию надмо-

лекулярных структур при взаимодействии PhK и Phb с высокомолекулярной матрицей – гликогеном. Влияние высоких концентраций ТМАО и бетаина на ассоциацию ферментов гликогенолиза, а также на взаимодействие этих ферментов с гликогеном согласуется с теоретически предсказанными эффектами молекулярного краудинга.

Обнаружено влияние краудинга на взаимодействие Phb с аллостерическим эффектором – FAD. При взаимодействии Phb с FAD в условиях краудинга происходит конформационный переход димерной молекулы, в результате которого появляются кооперативные взаимодействия флавин-связывающих центров фермента.

Поскольку константы связывания лигандов с белками изменяются в условиях краудинга, можно ожидать, что краудинг будет оказывать влияние на взаимодействие лекарственных препаратов с белками-мишенями. Известно, что фосфорилаза является мишенью для испытания противодиабетических препаратов [127]. Проведенные нами исследования показывают, что эффекты краудинга должны учитываться при испытании новых лекарственных препаратов.

Оценивая возможную практическую значимость исследований протекания биохимических процессов в условиях краудинга для медицины, следует также принимать во внимание, что целый ряд заболеваний (таких, как нейродегенеративные болезни) связаны с образованием нефункциональных белковых агрегатов, формирование которых стимулируется в условиях краудинга.

Защитный стабилизирующий эффект осмолитов при стрессах различной природы – термическом, химическом или осмотическом – в ряде случаев объясняется эффектом исключенного объема. В настоящей работе показано защитное действие молекулярного краудинга, создаваемого осмолитами (ТМАО, бетаином, пролином и глицином), при инактивации Phb под действием гуанидингидрохлорида.

Методические приемы стабилизации белков, основанные на использовании эффектов краудинга, могут быть использованы при решении биотехнологических задач и при разработке методов хранения белковых препаратов медицинского назначения.

Автор выражает искреннюю благодарность проф. Н.Б. Ливановой за внимание и полезные советы при обсуждении обзора.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fulton, A.B.* (1982) *Cell*, **30**, 345–347.
2. *Zimmerman, S.B., Trach, S.O.* (1991) *J. Mol. Biol.*, **222**, 599–620.
3. *Ellis, R.J., Minton, A.P.* (2003) *Nature*, **425**, 27–28.
4. *Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A.S., Nicastro, D., Gerisch, G., Baumeister, W.* (2002) *Science*, **298**, 1209–1213.
5. *Zimmerman, S.B., Minton, A.P.* (1993) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **22**, 27–65.
6. *Minton, A.P.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 10577–10580.
7. *Ellis, R.J.* (2001) *TRENDS Biochem. Sci.*, **26**, 597–604.
8. *Чеботарева Н.А., Курганов Б.И., Ливанова Н.Б.* (2004) *Биохимия*, **69**, 1522–1536.
9. *Hall, D., Minton, A.P.* (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, **1649**, 127–139.
10. *Minton, A.P.* (1981) *Biopolymers*, **20**, 2093–2120.
11. *Minton, A.P.* (1983) *Mol. Cell. Biochem.*, **55**, 119–140.
12. *Wills, P.R., Winzor, D.J.* (1993) *Biopolymers*, **33**, 1627–1629.
13. *Wills, P.R., Comper, W.D., Winzor, D.J.* (1993) *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 206–212.
14. *Winzor, C.L., Winzor, D.J., Paleg, L.G., Jones, G.P., Naidu, B.P.* (1992) *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**, 102–107.
15. *Winzor, D.J., Wills, P.R.* (1995) in *Protein-Solvent Interactions* (Gregory, R.B., ed.), Marcel Dekker, N.Y., 483–520.
16. *Winzor, D.J., Wills, P.R.* (1995) *Biophys. Chem.*, **57**, 103–110.
17. *Davis-Searles, P.R., Saunders, A.J., Erie, D.A., Winzor, D.J., Pielak, G.J.* (2001) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **30**, 271–306.
18. *Minton, A.P.* (2005) *J. Pharm. Sci.*, **94**, 1668–1675.
19. *Rivas, G., Ferrone, F., Herzfeld, J.* (2004) *EMBO reports*, **5**, 23–27.
20. *Minton, A.P., Colclasure G.C., Parker J.C.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 10504–10506.
21. *Ellis R.J., Minton A.P.* (2006) *Biol. Chem.*, 387, 485–497.
22. *Al-Habori, M.* (2001) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **33**, 844–864.
23. *Minton, A.P.* (2000) *Curr. Opinion Struct. Biol*, **10**, 34–39.
24. *Chamberlin, M.E., Strange, K.* (1989) *Am. J. Physiol.*, **257**, F1–F10.
25. *Sarkadi, B., Parker, J.C.* (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1071**, 407–427.
26. *Hoffmann, E.K., Dunham, P.B.* (1995) *Int. Rev. Cytology*, **161**, 173–262.
27. *Strange, K., Emma, F., Jackson, P.S.*, (1996) *Am. J. Physiol.*, **270**, C711–C730.
28. *Al-Habori, M.* (1994) *Int. J. Biochem.*, **26**, 319–334.
29. *Eveloff, J.L., Warnock, D.G.* (1987) *Am. J. Physiol.*, **252**, F1–F10.
30. *Baquet, A., Hue, L., Meijer, A.J., Van Woerkom, G.M., Plomp, P.J.A.M.* (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 955–959.
31. *Peak, M., Al-Habori, M., Agius, L.* (1992) *Biochem. J.*, **282**, 797–805.
32. *Meijer, A.J., Baquet, A., Gustafson, L., Van Woerkom, G.M., Hue, I.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 5823–5828.
33. *Haussinger, D., Hallbrucker, C., Vom Dahl, S., Decker, S., Schweizer, U., Lang, F., Gerok, W.* (1991) *FEBS Lett.*, **283**, 70–72.

34. *Stoll, B., Gerok, W., Lang, F., Haus-singer, D.* (1992) *Biochem. J.*, **287**, 217–222.
35. *Minton, A.P.* (1997) *Curr. Opin. Biotech.*, **8**, 65–69.
36. *Garner, M.M., Burg, M.B.* (1994) *Am. J. Physiol.*, **266**, C877–C892.
37. *Parker, J.C., Colclasure, G.C.* (1992) *Mol. Cell Biochem.*, **114**, 9–11.
38. *Ellis R.J.* (1997) *Curr. Biol.*, **7**, R531–R533.
39. *Van den Berg, B., Wain R., Dobson, C.M., Ellis, R.J.* (2000) *EMBO J.*, **19**, 3870–3875.
40. *Zimmerman, S.B.* (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1216**, 175–185.
41. *Bray D.* (1998) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **27**, 59–75.
42. *Shearwin, K., Nanhua, C., Masters, C.* (1989) *Biochem. Int.*, **19**, 723–729.
43. *Shearwin, K., Nanhua, C., Masters, C.* (1990) *Biochem. Int.*, **21**, 53–60.
44. *Yancey, P.H., Somero, G.N.* (1979) *Biochem. J.*, **183**, 317–323.
45. *Yancey, P.H., Clark, M. E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., Somero, G.N.* (1982) *Science*, **217**, 1214–1222.
46. *Wang, A., Bolen, D.W.* (1997) *Biochemistry*, **36**, 9101–9108.
47. *Bolen, D.W., Baskakov, I.V.* (2001) *J. Mol. Biol.*, **310**, 955–963.
48. *Burg, M.B., Peters E.M.* (1997) *Am. J. Physiology*, **273**, F1048–53.
49. *Yancey, P.H.* (2005) *J. Exp. Biol.* **208**, 2819–2830.
50. *Yancey P.H., Fyfe-Johnson, A.L., Kelly, R.H., Walker, V.P., Aunon, M.T.* (2001) *J. Exp. Zool.* **289**, 172–176.
51. *Lin T.Y., Timasheff, S.N.* (1994) *Biochemistry*, **33**, 12695–12701.
52. *Qu Y., Bolen, D.W.* (2003) *Biochemistry*, **36**, 9101–9108.
53. *Singh, R., Haque, I., Ahmad, F.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 11035–11042.
54. *Qu, Y., Bolen, C.L., Bolen D.W.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9268–9279.
55. *Palmer, H.R., Bedford, J.J., Leader, J.P., Smith, R.A.J.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **36**, 27708–27711.
56. *Еронина Т.Б., Чеботарева Н.А., Курганов Б.И., Ливанова Н.Б.* (2005) *Биохимия*, **70**, 1237–1244.
57. *Cayley, S., Record, M.T.* (2003) *Biochemistry*, **42**, 12596–12609.
58. *Cayley, S., Record, M.T. Jr.* (2004) *J. Mol. Recognit.*, **17**, 488–496.
59. *Baskakov, I.V., Bolen, D.W.* (1998) *Biophysical J.*, **74**, 2658–2665.
60. *Baskakov, I.V., Bolen, D.W.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 4831–4834.
61. *Liu, Y., Bolen D.W.* (1995) *Biochemistry*, **34**, 12884–12891.
62. *Mashino, T., Fridovich I.* (1987) *Arch. Biochem Biophys.*, **258**, 356–360.
63. *Meng, F-G., Park, Y-D., Zhou, H-M.* (2001) *Intern. J. Biochem. Cell Biol.*, **33**, 701–709.
64. *Satoro, M.M., Liu, Y., Khan, S.M.A., Hou, L.-X., Bolen, D.W.* (1992) *Biochemistry*, **31**, 5278–5283.
65. *Yancey, P.H., Somero, G.N.* (1980) *J. Exp. Zool.*, **212**, 205–213.
66. *Zou, Q., Bennion, B.J., Daggett, V., Murphy, K.P.* (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1192–1202.
67. *Poon, J., Bailey, M., Winzor, D.J., Davidson, B.E., Sawyer, W.H.* (1997) *Biophysical J.*, **73**, 3257–3264.
68. *Patel, C.N., Noble, S.M., Weatherly, G.T., Tripathy, A., Winzor, D.J., Pielak, G.J.* (2002) *Prot. Sci.*, **11**, 997–1003.

69. *Wills, P.R., Jacobsen, M.P., Winzor, D.J.* (1996) *Biopolymers*, **38**, 119–130.
70. *Lonhienne, T.G.A., Winzor, D.J.* (2001) *Biochemistry*, **40**, 9618–9622.
71. *Lonhienne, T.G.A., Winzor, D.J.* (2002) *Biochemistry*, **41**, 6897–6901.
72. *Jacobsen, M.P. Wills, P.R., Winzor, D.J.* (1996) *Biochemistry*, **35**, 13173–13179.
73. *Hall, D.R., Jacobsen, M.P., Winzor, D.J.* (1995) *Biophys. Chem.*, **57**, 47–54.
74. *Wills, P.R., Hall, D.R., Winzor D.J.* (2000) *Biophys. Chem.*, **84**, 217–225.
75. *Timasheff, S.N.* (1993) *Annu. Rev. Biophys. Biochem. Struct.*, **22**, 67–97.
76. *Baskakov, I.V., Bolen, D.W.* (1998) *Biophys. J.*, **74**, 2666–2673.
77. *Timasheff, S.N.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7363–7367.
78. *Timasheff, S.N.* (2002) *Biochemistry*, **41**, 13473–13482.
79. *Timasheff, S.N.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9721–9726.
80. *Qu Y., Bolen D.W.* (2002) *Biophys. Chem.*, **101**, 155–165.
81. *Despa, F., Fernandez, A, Berry, R.S.* (2004) *Phys. Rev. Lett.*, **93**, 228104.
82. *Despa F., Orgill D.P., Lee R.C.* (2005) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1066**, 54–66.
83. *Parsegian, V.A., Rand, R.P., Rau, D.C.* (2000) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **97**, 3987–3992.
84. *Barford, D., Johnson, L.N.* (1989) *Nature*, **340**, 606–616.
85. *Chebotareva, N.A., Kurganov, B.I., Pekel, N.D., Beresovskii, V.M.* (1986) *Biochem. Int.*, **13**, 189–197.
86. *Chebotareva, N.A., Kurganov, Lubarev, A.E., Davydov, D.R., B.I., Pekel, N.D.* (1991) *Biochimie*, **73**, 1339–1343.
87. *Chebotareva, N.A., Klinov, S.V., Kurganov, B.I.* (2001) *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, **18**, 265–297.
88. *Курганов Б.И., Клинов С.В., Чеботарева Н.А.* (1994) *Успехи биологической химии*, **34**, 83–110.
89. *Kurganov, B.I., Schors, E.I., Livanova, N.B., Chebotareva, N.A., Eronina, T.B., Andreeva, I.E., Makeeva, V.P., Pekel, N.D.* (1993) *Biochimie*, **75**, 481–485.
90. *Chebotareva, N.A., Kurganov, B.I., Harding, S.E., Winzor, D.J.* (2005) *Biophysical Chemistry*, **113**, 61–66.
91. *Чеботарева Н.А.* (2006) *Взаимодействия ферментов гликогенолиза в условиях молекулярного краудинга. Дисс. докт. биол. наук. М.: Институт биохимии им. А.Н.Баха, РАН, 50 с.*
92. *Sprang, S.R., Acharya, K.R., Goldsmith, E.J., Stuart, D.L., Varvill, K., Fletterick, R.J., Madsen, N.B., Johnson, L.N.* (1988) *Nature*, **336**, 219–221.
93. *Sprang, S.R., Withers, S.G., Goldsmith, E.J., Fletterick, R.J., Madsen, N.B.* (1991) *Science*, **254**, 1367–1371.
94. *Ливанова Н.Б., Корнилаев Б.А.* (1996) *Биохимия*, **61**, 2005–2017.
95. *Chebotareva, N.A., Harding, S.E., Winzor, D.J.* (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 506–513.
96. *Курганов Б.И., Топчиева И.Н., Лисовская Н.П., Чеботарева Н.А., Натариус О.Я.* (1979) *Биохимия*, **44**, 629–633.
97. *Jacobsen, M.P., Winzor, D.J.* (1997) *Prog. Colloid Polym. Sci.*, **107**, 82–87.

98. Krebs, E.G., Graves, D.J., Fisher, E.H. (1959) *J. Biol. Chem.*, **23**, 2867–2873.
99. Brusharia, R.J., Walsh, D.A. (1999) *Frontiers Biosci.*, **4**, 618–641.
100. Ливанова Н.Б. (1993) *Биохимия*, **58**, 1677–1684.
101. Cohen, P. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **34**, 1–14.
102. Nadeau, O.W., Traxler, K.W., Fee, L.R., Baldwin, B.A., Carlson, G.M. (1999) *Biochemistry*, **38**, 2551–2559.
103. Wilkinson, D.A., Fitzgerald, T.J., Marion, T.N., Carlson, G.M. (1999) *J. Protein Chem.*, **18**, 157–164.
104. Priddy, T.S., Middaugh C.R., Carlson G.M. (2007) *Protein Science*, **16**, 517–527.
105. Priddy, T.S., MacDonald, B.A., Heller, W.T., Nadeau, O.W., Trehwella, J., Carlson, G.M. (2005) *Protein Sci.*, **14**, 1039–1048.
106. Priddy, T.S., Price, E.S., Johnson, C. K., Carlson G.M. (2007) *Protein Sci.*, **16**, 1017–1023.
107. Chebotareva, N.A., Andreeva, I.E., Makeeva, V.F., Kurganov, B.I., Livanova, N.B., Harding, S.E. (2002) *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **119**, 70–76.
108. Chebotareva, N.A., Meremyanin, A.V., Makeeva, V.F., Kurganov, B.I. (2006) *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **131**, 83–92.
109. Меремьянин А.В., Чеботарева Н.А., Макеева В.Ф., Курганов Б.И. (2007), Доклады Академии Наук, РАН, **415**, 1–3.
110. Polishchuk, S. V., Brandt, N.R., Meyer, H.E., Varsanyi, M., Heilmeyer, L.M. Jr. (1995), *FEBS Lett.*, **362**, 271–275.
111. Singh, P., Salih, M., Leddy J.J., Tuana, B.S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 35176–35182.
112. Chebotareva, N.A., Andreeva, I.E., Makeeva, V.F., Livanova, N.B., Kurganov, B.I. (2004) *J. Mol. Recognit.*, **17**, 426–432.
113. Meyer, H.E., Heilmeyer, Jr., L.M.G., Haschke, R.H. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 6642–6648.
114. Shearwin, K.E., Winzor, D.J. (1988) *Biophys. Chem.*, **31**, 287–294.
115. Cann, J.R., Coombs, R.O., Howlett, G.R., Jacobsen, M.P., Winzor, D.J. (1994) *Biochemistry*, **33**, 10185–10190.
116. Shtilerman, M.D., Ding, T.T., Lansbury, P.T., Jr. (2002) *Biochemistry*, **41**, 3855–3860.
117. Чеботарева Н.А., Лиссовская Н.П., Курганов Б.И. (1979) *Мол. Биол.*, **13**, 228–236.
118. Klinov, S.V., Chebotareva, N.A., Lissovskaya, N.P., Davidov, D.R., Kurganov, B.I. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **709**, 91–98.
119. Steiner, R.F., Marshall, L. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **707**, 38–45.
120. Земскова М.А., Шур С.А., Сколышева Л.К., Вульфсон П.Л. (1989) *Биохимия*, **54**, 662–668.
121. Andreeva, I.E., Makeeva, V.F., Kurganov, B.I., Chebotareva, N.A., Livanova, N.B. (1999) *FEBS Letters*, **445**, 173–176.
122. Андреева И.Е., Макеева В.Ф., Курганов Б.И., Чеботарева Н.А., Ливанова Н.Б. (1999) *Биохимия*, **64**, 159–168.
123. Oikonomakos, N.G., Acharya, K.R., Johnson, L.N. (1992) *Post-Translational Modifications of Proteins* (Harding JJ, Crabbe MJC eds). CRC Press: Boca Raton, FL, 81–151.
124. Chan, K.F., Graves, D.J. (1982) *J. Mol. Biol.*, **257**, 5939–5947.
125. Shmelev, V.K., Serebrenikova, T.P. (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **43**, 867–872.

126. *Morange, M., Buc, H.* (1979) *Biochimie*, **61**, 633–643.
127. *Oikonomakos, N.G.* (2002) *Curr. Protein Pept. Sci.*, **3**, 561–586.