

ISSN 0233-4755

Том 41, Номер 5–6

Сентябрь-Декабрь 2024



Журналу

40

лет

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

*Журнал мембранной
и клеточной биологии*



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 41, номер 5-6, 2024

К 40-летию журнала «Биологические мембраны» <i>С. С. Колесников</i>	353
К 90-летию со дня рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова <i>С. С. Колесников, Т. В. Овчинникова</i>	355

ОБЗОРЫ

Проект «Родопсин» <i>М. А. Островский</i>	358
Нарушения депо-управляемого входа кальция при нейродегенеративных патологиях: история, факты, перспективы <i>В. А. Вигонт, Е. В. Казначеева</i>	368
Структурные исследования ионных каналов: достижения, проблемы и перспективы <i>Б. С. Жоров, Д. Б. Тихонов</i>	383
Структура и функции протонного канала OTOF1 <i>К. Д. Сладков, С. С. Колесников</i>	400
Роль мембранного транспорта протонов и возбудимости плазмалеммы в пространственных структурах, дальнем транспорте и фотосинтезе харовых водорослей <i>А. А. Булычев, Н. А. Крупенина</i>	413
Мембранные реакции системы свертывания крови: классический взгляд и современные представления <i>Т. А. Коваленко, М. А. Пантелеев</i>	427
Эволюционный выбор между холестерином и эргостерином <i>С. С. Соколов, С. А. Акимов, Ф. Ф. Северин</i>	448
Холестерин клеточных мембран и регуляция клеточных процессов: новое и хорошо забытое старое <i>А. Я. Дунина-Барковская</i>	454
Липид-опосредованная адаптация белков и пептидов в клеточных мембранах <i>А. А. Полянский, Р. Г. Ефремов</i>	473
Плоские липидные бислои в изучении механизмов липид-опосредованной регуляции порообразующей активности антимикробных агентов <i>С. С. Ефимова, О. С. Остроумова</i>	492

CONTENTS

Vol. 41, No. 5-6, 2024

To the 40th Anniversary of the Journal. To the readers and authors of the journal
Biologicheskie Membrany
S. S. Kolesnikov 353

To the 90th Anniversary of the Birth of Academician Yuri Anatolievich Ovchinnikov
S. S. Kolesnikov, T. V. Ovchinnikova 355

REVIEWS

Rhodopsin Project
M. A. Ostrovsky 358

Alterations In Store-Operated Calcium Entry in Neurodegenerative Pathologies: History,
Facts, Perspectives
V. A. Vigont, E. V. Kaznacheyeva 368

Structural Studies of Ion Channels: Achievements, Problems and Perspectives
B. S. Zhorov, D. B. Tikhonov 383

Structure and Function of the Proton Channel OTOPI
K. D. Sladkov, S. S. Kolesnikov 400

Role of Membrane H⁺ Transport and Plasmalemma Excitability in Pattern Formation, Long-Distance
Transport and Photosynthesis of Characean Algae
A. A. Bulychev, N. A. Krupenina 413

Membrane-Dependent Reactions of Blood Coagulation: Classical View and State-of-the-Art Concepts
T. A. Kovalenko, M. A. Pantelev 427

Evolutionary Choice between Cholesterol and Ergosterol
S. S. Sokolov, S. A. Akimov, F. F. Severin 448

Cell Membrane Cholesterol and Regulation of Cellular Processes: New and the Same Old Thing
A.Y. Dunina-Barkovskaya 454

Lipid-Mediated Adaptation of Proteins and Peptides in Cell Membranes
A.A. Polyansky, R. G. Efremov 473

Mechanisms of Lipid-Mediated Regulation of the Pore-Forming Activity of Antimicrobial Agents:
Studies on Planar Lipid Bilayers
S. S. Efimova, O. S. Ostroumova 492

К 40-ЛЕТИЮ ЖУРНАЛА К ЧИТАТЕЛЯМ И АВТОРАМ ЖУРНАЛА «БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ»

Дорогие коллеги!

Два юбилейных и скоррелированных события ознаменовали 2024 год — исполнилось 90 лет со дня рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова и 40 лет со дня основания им журнала «Биологические мембраны». Этим знаменательным датам и посвящен настоящий специальный выпуск.

Журнал был основан в 1984 г. Ю.А. Овчинниковым, который был его первым главным редактором. Для Юрия Анатольевича мембранология — от свойств липидов и искусственных мембран до мембранных белков и мембранно-ассоциированных биологических процессов — всегда была в сфере ключевых научных интересов. Без всякого преувеличения можно считать, что Ю.А. Овчинников стоял у истоков отечественной мембранологии. Юрий Анатольевич рассматривал журнал как важную площадку для координации работ в рамках различных научных проектов, им инициированных и поддержанных, включая «Родопсин», «Нервный импульс», «Ионные каналы» и ряд других. В этом спецвыпуске замечательный ретроспективный очерк о проекте «Родопсин» представлен его ключевым участником, академиком М.А. Островским.

После безвременной кончины Ю.А. Овчинникова в 1988 г. журнал возглавил и руководил им до 2009 г. чл.-корр. РАН Ю.А. Чизмаджев — специалист мирового уровня в области биофизики мембран.

Журнал с самого начала был ежемесячным, переводился на английский язык и был весьма востребован в научном сообществе. Между тем, наступили непростые 90-е, когда рушились устои общества, множились экономические проблемы, а отечественная наука стремительно деградировала по целому ряду причин. Кроме того, классические биофизика, мембранология и электрофизиология прошли пик своего доминирования в инструментальной и аналитической биологии, и начиналось шествие молекулярной биологии, фотоники клетки и биофизики одиночных молекул. Юрию Александровичу и его соратнику Ю.А. Ермакову, ответственному секретарю, пришлось провести журнал через непростые

времена — пустел редакционный портфель, росла цена подписки, падал тираж. В итоге, объем журнала пришлось сократить до 6 выпусков, а на обложке журнала появился подзаголовок «Журнал мембранной и клеточной биологии» как отражение расширения области интересов издания. В 2001 г. прекратила свое существование компания Gordon and Breach, которая переводила журнал на английский и занималась его распространением в международной научной среде. С 2007 г. журнал вновь стал переводиться, и его английская версия стала выходить как приложение к английской версии журнала «Биохимия» — Biochemistry (Moscow), Supplementary Series A: Membrane and Cell Biology. Количество выпусков английской версии уменьшилось до 4, и фактически она стала отдельным журналом со своим ISSN (PRINT: 1990-7478; ONLINE: 1990-7494). Разумеется, это существенно снизило импакт-фактор собственно «Биологических мембран».

В настоящий момент журнал фокусируется на освещении проблем в области физико-химических и молекулярных механизмов функционирования клеток и клеточных систем. Приоритетными являются работы, в которых исследуются связь между структурой и функцией мембран, молекулярные механизмы мембранного транспорта, рецепторные системы и внутриклеточная сигнализация, клеточные функции и клеточные патологии, ассоциированные с плазматической мембраной клеток (рецепторы, ионные каналы, экзоцитоз, эндоцитоз, фагоцитоз, межклеточные контакты) и с мембранами внутриклеточных структур (биоэнергетика, фотосинтез, ядерно-цитоплазматические отношения, апоптоз, Ca^{2+} -сигнализация). Трудно переоценить вклад в прошлую и текущую деятельность журнала к.х.н. Н.Ю. Деевой и к.б.н. А.Я. Дуниной-Барковской. Наталья Юльевна осуществляла редакторское сопровождение журнала с момента его основания, а с 1991 г. и по сей день возглавляет его редакцию. Антонина Яковлевна не только является членом редколлегии, но и с 2007 г. выполняет функции редактора английской версии.

Меняются приоритеты в науке, меняются методы и подходы к решению задач мембранологии,

клеточной физиологии и молекулярной биологии, неизменным остается редакционная политика журнала, основы которой были заложены Ю.А. Овчинниковым и продолжены Ю.А. Чизмаджевым — профессиональное и быстрое рецензирование при доброжелательном отношении к авторам. Редколлегия журнала по-прежнему считает, что основная цель рецензирования — помочь авторам вывести работу на

необходимо высокий научный уровень при достаточно изящной стилистике.

Поздравляю всех наших авторов, рецензентов и редакторов с 40-летним юбилеем «Биологических мембран», надеюсь на дальнейшее сотрудничество и процветание нашего журнала.

Главный редактор

Чл.-корр. РАН С.С. Колесников

К 90-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АКАДЕМИКА ЮРИЯ АНАТОЛЬЕВИЧА ОВЧИННИКОВА



Юрий Анатольевич Овчинников (1934–1988)

2 августа 2024 года исполнилось 90 лет со дня рождения основателя и первого главного редактора журнала «Биологические мембраны» академика Юрия Анатольевича Овчинникова. Ю.А. Овчинников — выдающий советский ученый, один из основоположников биоорганической химии и биотехнологии, создатель отечественной школы химиков-биооргаников и биотехнологов. С 1970 по 1988 годы он был бессменным директором Института биоорганической химии, ныне носящего имени его отцов-основателей — академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Созданный им научно-образовательный и научно-производственный комплекс в Москве на улице Миклухо-Маклая и в Пушкино на проспекте Науки до настоящего времени остается одним из ведущих научных центров в мире. Высокий уровень подготовки кадров и научных исследований, первоклассное оснащение, удивительное по красоте архитектурное решение комплекса — всё это было заложено и создано благодаря лидерскому характеру и незаурядным качествам личности Ю.А. Овчинникова.

За свою короткую жизнь Ю.А. Овчинников успел опубликовать более 500 научных работ, получивших высокую оценку мирового научного сообщества. Главным приоритетом Юрия Анатольевича всегда была мембранная биология. Академик В.П. Скулачев в своей статье «Мембранолог в главной роли» [1] написал: «Юрий Овчинников и его команда сделали ряд выдающихся открытий, прежде всего в области изучения биологических мембран. По сути, Овчинников является основателем отечественной мембранологии».

Первые шаги в области изучения мембрано-активных веществ были сделаны Юрием Овчинниковым в только что созданном Институте химии природных соединений АН СССР, где академик М.М. Шемякин предложил ему заняться исследованием необычных по составу антибиотиков-депсипептидов, содержащих наряду с аминокислотными гидроксикислотные остатки. Ю.А. Овчинниковым и его сотрудниками были решены непростые задачи по получению оптически активных N-метилованных аминокислот,

обратимой защиты гидроксильных групп гидроксикислот, синтеза линейных депсипептидов и их циклизации. В результате были синтезированы депсипептиды энниатины А и В, споридесмолиды I–IV, валиномицин, анголид, серратамолид, эсперин, боверицин. Эти работы составили основу докторской диссертации Ю.А. Овчинникова, которую он защитил в 1966 г.

Основываясь на способности депсипептидов индуцировать проницаемость липидных мембран для ионов щелочных металлов, Ю.А. Овчинников с сотрудниками провел цикл работ по изучению механизма действия антибиотиков этого класса. В частности, была установлена пространственная структура валиномицина в растворе и показана его выраженная избирательность по отношению к ионам K^+ при комплексообразовании с моновалентными катионами. Это объясняло K^+ -специфичность трансмембранного переноса ионов, индуцированного этим ионофором. В итоге этих комплексных исследований впервые были установлены молекулярные механизмы селективного транспорта ионов через биологические мембраны при участии синтетических переносчиков. Кроме того, новый термин «ионофор» обязан своим происхождением именно исследованиям антибиотиков-депсипептидов. Результаты этих работ были представлены в целом ряде экспериментальных статей и обзоров, докладов на международных форумах и в монографии «Мембрано-активные комплексоны», изданной в 1974 г. на русском и английском языках в издательствах «Наука» и «Elsevier» [2]. Эта монография принесла академикам Ю.А. Овчинникову и В.Т. Иванову Ленинскую премию в 1978 г. В память об этом захватывающем периоде в исследовании мембраноактивных пептидов перед зданием Института биоорганической химии установлено скульптурное изображение комплекса антибиотика валиномицина с ионом калия.

Логическим продолжением исследования депсипептидных ионофоров стало изучение ион-транспортирующих мембранных белков. Эти исследования потребовали разработки особых методических подходов, поскольку мембранные белки по ряду своих свойств (низкое содержание в клетках, плохая растворимость в воде, структурная лабильность, значительная молекулярная масса) кардинально отличаются от глобулярных белков. Наибольших успехов Ю.А. Овчинникову и его команде удалось достичь в исследовании фоторецепторных белков — бактериородопсина из галофильных бактерий и сенсорного родопсина из фоторецепторных клеток сетчатки глаза. Развитие работ тормозилось отсутствием информации об аминокислотных последовательностях белков зрительного каскада.

Стратегическим было решение Юрия Анатольевича выполнить расшифровку первичной структуры бактериородопсина, а также родопсина и других белков каскада фототрансдукции в палочках сетчатки. Опередив команду лауреата нобелевской премии Г. Кораны (США), лаборатория под руководством Ю.А. Овчинникова в 1978 г. опубликовала полную аминокислотную последовательность бактериородопсина, а в 1981 г. — полную первичную структуру родопсина. Ю.А. Овчинниковым и его сотрудниками было показано, что структуры обеих молекул включают семь трансмембранных альфа-спиральных доменов, связанных короткими внемембранными пептидными петлями. Таким образом, бактериородопсин стал первым в мире мембранным белком, а родопсин — первым рецептором, сопряженным с G-белком (G protein-coupled receptor) с полностью расшифрованной первичной структурой и мембранной топологией.

Далее последовали работы по установлению структуры других белков зрительного каскада — трансдуцина и фосфодиэстеразы циклического GMP. В развитие этих работ Юрий Анатольевич создал и возглавил межведомственную исследовательскую программу «Родопсин» и сформировал высококласный творческий коллектив, включавший, помимо возглавляемой им команды, лаборатории академика М.А. Островского, академика В.П. Скулачева и профессора Л.П. Каюшина. История создания и развития программы «Родопсин» детализирована в обзоре академика Михаила Аркадьевича Островского, вошедшего в настоящий спецвыпуск журнала.

Последним блестящим циклом работ Ю.А. Овчинникова в области изучения структурных и функциональных свойств мембранных белков стало исследование систем активного транспорта ионов через мембрану, включая Na^+ , K^+ -АТФ-азу и ряд родственных аденозинтрифосфатаз. Была доказана олигомерная организация функционально активного фермента в мембране. Была установлена полная первичная структура Na^+ , K^+ -АТФ-азы из почек свиньи. Впервые были установлены пространственные структуры бета-субъединицы и полного фермента, что позволило предложить первую топологическую модель полипептидных цепей фермента в мембране и вне ее. В значительной степени этому способствовало использование оригинального подхода — ограниченного протеолиза фермента непосредственно в мембранах.

В ходе совместных исследований, проведенных в лабораториях под руководством академиков Ю.А. Овчинникова и Е.Д. Свердлова, были идентифицированы участки генома человека,

кодирующие системы активного транспорта. Было показано наличие в геноме человека мультигенного семейства, кодирующего различные изоформы каталитической субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы, а также субъединицы родственных ион-транспортующих ферментов. Была расшифрована структура протяженного участка генома человека, позволяющая получить полную информацию о структуре фермента, в том числе впервые было установлено строение ранее неизвестной формы каталитической субъединицы Na^+ , K^+ -АТФ-азы. Установление химической структуры и пространственной организации Na^+ , K^+ -АТФ-азы в сочетании с выяснением основ генетической регуляции их функциональной активности открыли качественно новую страницу в понимании механизмов активного транспорта ионов в клетках человека.

Пионерские работы Ю.А. Овчинникова, нацеленные на структурно-функциональные исследования мембраноактивных пептидов и их синтез, на выяснение структуры мембранных белков и взаимосвязи между структурой и функцией, а также на анализ молекулярных механизмов, ассоциируемых с их физиологической активностью, широко известны во всем мире. Научное наследие академика Ю.А. Овчинникова получило заслуженное признание. Он был лауреатом Ленинской и Государственной премий СССР, премии Правительства РФ в области науки и техники (посмертно), премии им. А. Карпинского (Германия), почетным иностранным членом 13 академий наук и ряда научных обществ, включая Академию естествоиспытателей «Леопольдина» (Германия), Европейскую академию наук, искусств и литературы (Франция), Испанскую Королевскую академию точных, физических и естественных наук, Всемирную академию наук и искусств (Швеция), Японское биохимическое общество, Американское философское общество

(США). Он был профессором МГУ, почетным доктором 8 зарубежных университетов, в том числе Парижского им. Пьера и Марии Кюри (Сорбонна, Франция), Уппсальского (Швеция), Йенского им. Фридриха Шиллера (Германия), и это далеко не полный перечень научных наград академика Ю.А. Овчинникова.

Лауреат Нобелевской премии в области химии Джон Эрнест Уолкер (Великобритания) в своих воспоминаниях написал: «Его имя будут долго помнить благодаря тому значительному вкладу, который внесли он и его коллеги в изучение мембран — область, в которой он был пионером и лидером» [3].

Редколлегия журнала «Биологические мембраны» выражает искреннюю благодарность всем, кто представил свои статьи в специальный номер, посвященный памяти основателя журнала академика Ю.А. Овчинникова.

Главный редактор журнала «Биологические мембраны», член-корреспондент РАН

С.С. Колесников

Руководитель Учебно-научного центра ИБХ РАН, профессор МГУ, д.х.н.

Т.В. Овчинникова

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скулачев В.П. 2017. Мембранолог в главной роли. *Кот Шрёдингера*. № 6 (32).
2. Овчинников Ю.А., Иванов В.Т., Шкроб А.М. *Мембрано-активные комплексы*. М.: Изд-во Наука, 1974. 463 с.
3. Соркина Т.И., Егорова В.В., Овчинникова Т.В. 1991. *Юрий Анатольевич Овчинников. Жизнь и научная деятельность*. Ред. Иванов В.Т. М.: Изд-во Наука. 233 с.

ОБЗОРЫ

УДК 577.354

ПРОЕКТ «РОДОПСИН»

© 2024 г. М. А. Островский^{a, b, *}

^aМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра молекулярной физиологии, Москва, 119234 Россия

^bИнститут биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334 Россия

*e-mail: ostrovsky3535@mail.ru

Поступила в редакцию 27.04.2024

После доработки 14.05.2024

Принята к печати 15.05.2024

В обзоре рассматривается история возникновения, развитие и достижения Проекта «Родопсин», организованного Ю.А. Овчинниковым в 1973 г. Также представлено современное состояние некоторых вопросов, связанных со структурой и функцией ретиналь-содержащих белков — родопсинов I и II типов.

Ключевые слова: родопсин, бактериородопсин

DOI: 10.31857/S0233475524050018, **EDN:** ccbyml

ВВЕДЕНИЕ

Совпало два юбилейных события — 90-летие со дня рождения Ю.А. Овчинникова и 40-летие основанного им журнала «Биологические мембраны». Оба этих юбилея дают повод вспомнить о Проекте «Родопсин», ибо он стал яркой страницей в научной жизни как самого Юрия Анатольевича, так и многих участников этого, можно сказать, уникального проекта. А десятилетие спустя после начала Проекта его успех стал одним из веских оснований для создания в 1984 году специального журнала «Биологические мембраны».

У Ю.А. Овчинникова было счастливое сочетание ума и энергии. Отличное университетское образование и ранняя вовлеченность в науку и в жизнь научного сообщества позволили ему понимать и чувствовать ее «горячие точки». А его выдающиеся организаторские способности позволили этим «горячим точкам» разгореться. Родопсин как классический мембранный белок был именно такой «точкой». Для самого Овчинникова интерес к родопсину был логическим продолжением работ по ион-транспортным системам, которые давно и успешно велись в его лаборатории и к началу 70-х годов получили мировое признание.

К началу 70-х годов нарастал интерес к родопси-нам животного происхождения, в первую очередь, естественно, к зрительному родопсину. Связано

это было как с Нобелевской премией Дж. Уолда 1967 года и первыми успехами в понимании механизмов фототрансдукции, так и с тем, что зрительный родопсин представлял собой классический G-белок-связывающий рецептор. Конкретный механизм его участия в запуске ферментативного каскада усиления светового сигнала был в то время самой актуальной проблемой молекулярной физиологии зрения. И вот, в 1971 году появилась работа Уолтера Стокениуса и Дитера Остерхельда о существовании у галофильных бактерий *Halobacterium salinarum* (ранее *Halobacterium halobium*) белка — бактериородопсина, очень похожего на зрительный белок родопсин [1]. Первоначально авторы даже предположили, что новый ретиналь-содержащий белок, который они называли бактериородопсином, каким-то образом участвует в фоторецепции — фототаксисе галобактерий. Однако скоро выяснилось, что функция бактериородопсина — преобразование энергии солнечного света в электрохимический потенциал ионов водорода, используемый клеткой для синтеза АТФ в полном соответствии с гипотезой Митчелла. Об открытии бактериородопсина очень скоро стало известно, причем, насколько я знаю, независимо, и самому Ю.А. Овчинникову, и В.П. Скулачеву, и Л.П. Каюшину. Лично я впервые услышал о бактериородопсине от Каюшина. Становилось ясно, что сравнительное исследование светочувствительных мембранных белков — нового бактериального и классического

животного родопсинов — чрезвычайно интересная и важная задача.

В 1972 году состоялась Школа по биологическим мембранам, на которой подряд, одна за другой, были прочитаны лекции — В.П. Скулачевым по бактериородопсину и мною по зрительному родопсину. После Школы состоялась наша встреча с Овчинниковым. Юрий Анатольевич говорил, что ему нужно срочно заняться структурой родопсинов, а Скулачеву и мне — их функцией, и что нужно организовать Проект. Понадобился год, и Проект «Родопсин» Ю.А. Овчинниковым был создан. Первыми участниками Проекта были четыре лаборатории: лаборатория самого Ю.А. Овчинникова в Институте биоорганической химии АН СССР, В.П. Скулачева в Межфакультетской лаборатории молекулярной биологии и биоорганической химии Московского университета, Л.П. Каюшина в Институте биофизики АН СССР в Пушкино и М.А. Островского в Институте химической физики АН СССР. Цель Проекта состояла в определении первичной структуры светочувствительных ретиналь-содержащих мембранных белков — бактериального родопсина и зрительного пигмента родопсина — и в исследовании их функции. Что касается функции, то фактически речь шла механизмах фотосинтеза и фототаксиса у этих бактерий и о механизмах зрительной рецепции — фоторецепции.

Институт биоорганической химии АН СССР

В лаборатории Ю.А. Овчинникова ключевую роль в определении первичной структуры бактериородопсина и зрительного родопсина играл Н.Г. Абдулаев. Главная сложность в решении этой задачи заключалась в высокой гидрофобности этих мембранных белков. Поэтому определение их первичной структуры не могло основываться на известных методах, применяемых для определения первичной структуры гидрофильных белков. Именно разработка новых методов для структурного анализа интегральных мембранных белков позволила успешно решить эту очень непростую задачу. Получив в результате полную аминокислотную последовательность сначала бактериородопсина (1978 г.), а затем и зрительного родопсина (1982 г.), стало возможным установить их топографию, соответственно, в пурпурной и фоторецепторной мембранах. Эта классическая 7-альфа-спиральная картина микробных и животных родопсинов вошла теперь во все учебники.

Для определения структуры бактериородопсина и зрительного родопсина нужны были сами пурпурные и фоторецепторные мембраны. Задача

получения в препаративных количествах этих мембран была возложена на лабораторию Л.П. Каюшина в Пушкино и мою лабораторию в Москве. Если у нас процедура получения фоторецепторных мембран и самого родопсина из сетчаток бычьих глаз уже была налажена, то методику наработки пурпурных мембран из галобактерий *Halobacterium halobium* еще предстояло освоить. Благодаря огромным усилиям Л.П. Каюшина и самоотверженной работе его сотрудницы Л.Н. Чекулаевой задача эта была решена [2]. В результате Абдулаев получал пурпурные мембраны для определения первичной структуры бактериородопсина, а Скулачев — его функции. Вот, что Владимир Петрович сам пишет: «Мы занялись изучением бактериородопсина, используя препарат, полученный в Институте биофизики Л.Н. Чекулаевой, тогда сотрудницей лаборатории Л. Каюшина. Были приготовлены протеолипосомы с бактериородопсином в качестве белка. Затем методом проникающих ионов была доказана способность бактериородопсина превращать свет в разность электрических потенциалов». Вероятно, Владимир Петрович имеет при этом в виду работу, опубликованную им совместно с Л.П. Каюшиным в *FEBS Letters*, в которой впервые в протеолипосомах с инкорпорированным бактериородопсином был зарегистрирован электрический потенциал и градиент pH [3]. Рукопись этой статьи была получена журналом 13 ноября 1973 года. Иными словами, хронологически эта работа В.П. Скулачева и Л.П. Каюшина была, по-видимому, первой опубликованной работой Проекта «Родопсин».

Можно сказать, драматически складывалась «гонка» за структурой сначала бактериородопсина, а затем и зрительного родопсина. О том, что Гобинд Корана, получивший в 1968 году Нобелевскую премию «за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков», занялся бактериородопсином, информации не было. Как потом выяснилось, Корана старался не пропускать докладов Ю.А. Овчинникова и даже, говорят, фотографировал его слайды. Как бы то ни было, но работа Ю.А. Овчинникова, Н.Г. Абдулаева и сотрудников о полной аминокислотной последовательности и топографии бактериородопсина в пурпурной мембране галобактерий была опубликована в международном журнале практически одновременно со статьей Корана — работа Овчинникова в *FEBS Letters* [4], а Кораны в *PNAS* [5].

История почти полностью повторилась и со зрительным родопсином. На этот раз конкурентами была команда Пола Харгрейва из Иллинойса. Хотя Корана в мире молекулярной биологии был известнее, чем Харгрейв в мире зрительных

наук (*Visual Sciences*), но он был тоже неслабым конкурентом. Результат «гонки» оказался таким же — статьи Ю.А. Овчинникова, Н.Г. Абдулаева и сотрудников о полной аминокислотной последовательности и топографии зрительного родопсина в фоторецепторной мембране наружного сегмента палочки сетчатки были опубликованы практически одновременно в 1983 году со статьей Харгрейва и его команды: Овчинникова — в «Биоорганической химии» [6], а Харгрейва — в «Biophysics of Structure and Mechanism» [7]. Что касается топографии зрительного родопсина в фоторецепторной мембране, то, как нами недавно было показано, молекулы родопсина расположены в мембране фоторецепторного диска диффузно, с исключительно высокой плотностью, явно без какой-либо регулярной упаковки и, скорее всего, находятся в мономерно-димерных формах [8].

Вслед за родопсином позвоночных Ю.А. Овчинниковым, Н.Г. Абдулаевым и сотрудниками совместно с известным японским исследователем зрительных пигментов беспозвоночных М. Тсуда была установлена первичная структура родопсина осьминога — классического представителя родопсинов беспозвоночных [9].

После работ по бактериородопсину и зрительному родопсину Ю.А. Овчинников обратился к белкам ферментативного каскада усиления фоторецепторного сигнала в зрительных клетках сетчатки — фактически к механизму фототрансдукции. Совместно с В.М. Липкиным и сотрудниками была опубликована чрезвычайно актуальная в то время работа, касавшаяся первичной структуры гамма-субъединицы трансдуцина [10], а уже после кончины Юрия Анатольевича была сделана не менее важная работа, касавшаяся структуры ингибиторной гамма-субъединицы фосфодиэстеразы α ГМФ [11].

Работы группы Ю.А. Овчинникова, выполненные в первое десятилетие Проекта «Родопсин», и групп Корана и Харгрейва, касавшиеся первичной структуры и топографии в мембране бактериородопсина и зрительного родопсина, а затем последовавшие с начала 2000-х годов рентгеноструктурные работы, позволившие установить их трехмерную структуру, — открыли путь для по сей день активно продолжающихся подробнейших исследований семейств микробных и животных родопсинов — родопсинов I и II типов.

При дальнейших исследованиях довольно быстро выяснилось, что галофильная бактерия *H. salinarum* содержит не только бактериородопсин — протонный насос, ответственный за фотосинтез, но и галородопсин — управляемый светом насос,

качающий внутрь клетки ионы хлора, а также еще и сенсорные родопсины I и II — датчики положительного и отрицательного фототаксиса. Широко развернувшиеся в последние десятилетия поиски новых родопсинов I типа привели к обнаружению их во всех доменах живой природы — бактериях, археях и эукариотах, и даже в гигантских вирусах. Сравнительно недавно были обнаружены так называемые гелиородопсины, которые отнесли к III типу родопсинов. Интересно, что топология в мембране родопсина III типа отличается от классической топологии родопсинов I и II типов: если в родопсинах I и II типов N-конец обращен наружу клетки, а C-конец — внутрь, то в родопсинах III типа N-конец, наоборот, обращен внутрь клетки, а C-конец — наружу [12].

Все обнаруженные родопсины весьма разнообразны по выполняемым функциям. Основные для микробных родопсинов — фотоэнергетическая (ионные насосы) и фотоинформационная (сенсорные родопсины, катионные и анионные каналы), а для животных — фотоинформационная. Исследования животных родопсинов II типа как G-белок-связывающих рецепторов позволили существенно продвинуться в понимании механизмов фототрансдукции, понимании структуры и функции всего семейства G-белок-сопряженных рецепторов, а также продвинуться в понимании молекулярных механизмов дегенеративных заболеваний сетчатки глаза (см. обзоры [13–17]).

Несмотря на разнообразие функций, принципиальное сходство структуры — 7-альфа-спиральная трансмембранная топография белковой части и ретиналь, хоть и в разных изомерных формах, в качестве хромофора — встает вопрос об эволюционном происхождении родопсинов I, II и III типов. При всей противоречивости мнений по этому поводу чаша весов склоняется в пользу их конвергентной эволюции. Предполагается, что нет общего предка для всех трех типов родопсинов и что, скорее всего, давление внешних факторов (дарвиновский естественный отбор) и физиологическая потребность привели к столь удивительному сходству столь неродственных родопсинов (подробнее см. [15, 18–21]).

Довольно неожиданно каналные родопсины одноклеточных водорослей (родопсины I типа) дали начало новому, мощному методическому направлению — оптогенетике, позволившей в последнее десятилетие совершить подлинный прорыв в нейробиологии. Перспективным представляется использование в оптогенетике опсинов животного происхождения — родопсинов II типа, способных инициировать ферментативный каскад усиления

светового сигнала. В самое последнее время появилась реальная надежда оптогенетического протезирования с помощью родопсинов I типа дегенеративной, лишенной зрительных клеток («слепой») сетчатки, а в перспективе и с помощью родопсинов II типа (см. обзор [22]). В случае успеха это будет первый случай применения методов оптогенетики в медицине.

**Межфакультетская лаборатория молекулярной
биологии и биоорганической химии
Московского университета**

Что касается функции бактериородопсина, то В.П. Скулачевым с сотрудниками эти исследования, как уже было сказано, начались практически одновременно с началом Проекта «Родопсин». В большой мере этому способствовал как раз в это время разработанный Л.А. Драчевым в его лаборатории метод прямого электрометрического измерения генерации электрического потенциала на мембране с разрешением ~200 нс [23]. Следует подчеркнуть, что результаты работ, выполненных в лаборатории В.П. Скулачевым с помощью этого метода и касавшихся электрогенеза мембранных белков фотосинтетических и дыхательных электрон-транспортных цепей, включая, естественно, бактериородопсин, внесли значительный вклад в обоснование справедливости хемиосмотической концепции Питера Митчелла, получившего в результате Нобелевскую премию.

Основной результат обширных исследований электрогенной активности молекулы бактериородопсина в пурпурной мембране как светозависимого протонного насоса состоит в следующем: первая электрогенная фаза отражает перенос протона от протонированного основания Шиффа внутрь мембраны, вторая — перенос протона наружу, а третья — обратно к Шиффову основанию [24–26]. Важным достижением было сопоставление кинетики ранних и промежуточных стадий фотоцикла бактериородопсина и индуцируемого на этих стадиях фотоэлектрического потенциала с использованием оригинальной системы — протеолипосомы, ассоциированные с тонкими коллоидными пленками [25]. Ключевая роль в этих исследованиях принадлежала А.Д. Каулену.

Следует обратить внимание на работу, выполненную В.П. Скулачевым совместно с Д. Остерхельтом и сотрудниками, в которой было показано, что введение гена бактериородопсина в «слепой» мутант *H. salinarum*, у которого отсутствуют все четыре белка — бактериородопсин, галородопсин и сенсорные родопсины I и II — приводит к восстановлению реакции бактерии на свет [27]. Из этой

работы следовало, что у галобактерий не только сенсорные родопсины, но и бактериородопсин принимает участие в фоторецепции.

В те же годы совместно с В.П. Скулачевым и его сотрудниками, и используя те же методы регистрации электрического потенциала, мы проводили сравнение электрогенной активности двух ретиналь-содержащих белков — бактериородопсина и зрительного родопсина позвоночных [28–30]. В их фотоэлектрических реакциях проявились сходство ранних, фотохимических стадий и существенное различие поздних, связанных с замкнутым фотоциклом бактериородопсина и фотолизом зрительного родопсина. Как и следовало ожидать, переходы ретиналя *полностью-транс* → *13-цис*-форма в бактериородопсине и переход *11-цис* → *полностью-транс*-форма в зрительном родопсине сопровождалась возникновением быстрого фотоэлектрического ответа. Однако затем фотоэлектрические ответы вели себя совершенно по-разному. В случае бактериородопсина на пурпурной мембране в течение всего периода освещения сохранялся устойчивый электрический потенциал. Причина тому — его замкнутый фотоцикл. В случае же зрительного родопсина в силу фотолиза фотоэлектрический ответ быстро и необратимо падал. Генерация бактериородопсином электрического потенциала сопровождается переносом протона через пурпурную мембрану, что принципиально важно для его функции — фотосинтеза. В случае же зрительного родопсина перенос протона отсутствует. Отсутствие переноса протона через фоторецепторную мембрану диска наружного сегмента палочки было нами показано в прямом эксперименте [31]. Суть дела в том, что в зрительном родопсине одновременно с разделением зарядов происходят существенные конформационные изменения белковой части молекулы — опсина. В конечном счете, это приводит к обнажению мест связывания с G-белком (трансдуцином), т.е. к запуску процесса фототрансдукции [32] (см. также обзор [33]).

Быстрый компонент фотоэлектрического ответа зрительного родопсина по своим характерным временам и полярности является, по существу, не чем иным, как хорошо известным ранним рецепторным потенциалом, который регистрируется от сетчатки при обычном электрофизиологическом отведении [34].

Институт биофизики АН СССР в Пушкино

Важным участником Проекта «Родопсин» был Л.П. Каюшин и Институт биофизики в Пушкино. Благодаря усилиям Л.П. Каюшина Л.Н. Чекулаева,

как говорилось выше, смогла наладить препаративную наработку из галобактерий пурпурных мембран. Они были необходимы и передавались Н.Г. Абдулаеву для установления первичной структуры бактериородопсина, В.П. Скулачеву для исследования механизма его функционирования. Естественно, они были нужны и самому Институту биофизики.

В рамках Проекта «Родопсин» Н.Н. Всеволодовым в этом Институте было начато новое, оригинальное направление — создание на основе бактериородопсина новых светочувствительных регистрирующих сред. Речь шла об иммобилизации пурпурных мембран в полимерных матрицах. Созданная в результате пленка была названа «Биохромом» [35, 36]. Фактически это было биотехнологическое устройство, основанное на уникальных свойствах бактериородопсина. Действительно, молекулы бактериородопсина имеют квазикристаллическую упаковку, что придает всей структуре чрезвычайно высокую устойчивость к различным физическим и химическим воздействиям. Далее, количество фотоциклов бактериородопсина как природного фотохрома исключительно велико, намного больше, чем многих неорганических и синтетических материалов. И что еще очень важно, молекула бактериородопсина может быть подвергнута различным модификациям как ее белковой части, так и хромофора. Иными словами, бактериородопсин стал своеобразной платформой для целого класса новых фотохромных материалов. Работы в этом направлении были успешно развиты как самим Всеволодовым и его группой, так и многими зарубежными лабораториями. Большое внимание использованию бактериородопсина для создания светочувствительных носителей информации было уделено в США, в знаменитом NIST — National Institute of Standards and Technology. В 90-е годы в этот Институт был приглашен и некоторое время работал Н.Н. Всеволодов и его сотрудница А.Б. Дружко. В 2011 г. в США вышла монография Н.Н. Всеволодова как зачинателя целого направления, названного «биомолекулярной электроникой» [37]. Недавно опубликован подробный обзор А.Б. Дружко, посвященный современному состоянию проблемы светочувствительных систем на основе бактериородопсина [38].

В Институте биофизики велись активные исследования зрительного родопсина и механизмов фоторецепции. В середине 80-х годов там была сделана принципиально важная работа как для понимания механизма генерации фоторецепторного потенциала в зрительной клетке сетчатки позвоночных, так и вообще для понимания молекулярных механизмов регуляции проводимости

плазматической мембраны. Речь идет о работе Е.Е. Фесенко, С.С. Колесникова и А.Л. Любарского [39]. Ко времени появления этой работы уже было твердо установлено, что фоторецепторные клетки сетчатки позвоночных — палочки и колбочки — в ответ на свет гиперполяризуются и что эта гиперполяризация вызывается блокированием катион-селективных каналов в плазматической мембране их наружного сегмента. Однако механизм, контролирующий открытие и закрытие этих каналов, оставался неизвестным. Авторами работы впервые было показано, что увеличение проводимости плазматической мембраны наружного сегмента фоторецепторной клетки является результатом прямого действия на нее цГМФ. Результат этот был затем многократно подтвержден и в настоящее время вошел во все руководства по молекулярной физиологии зрения.

Институт химической физики АН СССР

Основным предметом исследований лаборатории М.А. Островского в Институте химической физики АН СССР был зрительный родопсин. Сотрудничая в этом Институте с физиками и химиками высочайшей квалификации, естественно было применить их подходы, методы и использовать уникальные экспериментальные установки. Работа лаборатории в те годы шла, в основном, в трех направлениях: фотохимия родопсина, его конформационные перестройки при действии света, а также связанные с родопсином механизмы фотоповреждения сетчатки и ретинального пигментного эпителия. Эти направления сохраняются и сейчас.

Что касается фотохимии родопсина, то большое внимание уделялось его фотообратимым реакциям. В последнее время интерес к ним существенно возрос, поскольку фотохромные реакции ретиналь-содержащих белков рассматриваются в качестве прообраза молекулярных фотоперехватчиков, обладающих исключительно высокой скоростью, высоким квантовым выходом и спектрально разнесенными исходной, темновой и светиндуцированной формами.

При сравнительно низких температурах, на стадии метародопсина I, вначале нами были исследованы фотохромные реакции родопсина позвоночных [40–42]. В этих работах, в частности, было обнаружено явление изохромии фоторегнерированного родопсина. Исследовались также фотохромные реакции родопсина беспозвоночных. В ситуации *in vitro* были продемонстрированы многократные фотопереходы родопсина осьминога в метародопсин и обратно [43]. Однако наиболее

интересными стали исследования прямой и обратной фотореакций родопсина позвоночных на стадиях фото- и батородопсина в области фемто- и пикосекундных времен [44–46]. Интересно, что сравнительный анализ динамики прямой и обратной фотохимической реакции бактериородопина и зрительного родопсина, проведенный в этих работах, показал, что у зрительного родопсина квантовый выход обратной фотореакции намного (примерно в 6 раз) ниже, чем у бактериородопсина, и это при том, что квантовые выходы прямой реакции у них практически одинаковы [15, 46]. Можно думать, что высокий квантовый выход прямой реакции и низкий квантовый выход обратной реакции повышает надежность работы зрительного родопсина как триггера процесса фототрансдукции.

Наши основные результаты, касавшиеся конформационных перестроек родопсина в фоторецепторной мембране при действии света, были получены с использованием метода спиновых меток и зондов, создателем которого, по существу, был Институт химической физики. В одной из первых работ с помощью спинового зонда нами были показаны вызванные светом конформационные изменения в фоторецепторной мембране [47]. Позже, используя метод ЭПР-спектроскопии с переносом насыщения и спиновые метки, ковалентно связанные с доступными гидрофильными SH-группами цистеиновых остатков родопсина (Cys140 и Cys316), нам впервые удалось показать увеличение конформационной подвижности цитоплазматических «петель» при светоиндуцированном переходе родопсина в метародопсин II [32]. При этом были показаны не только внутримолекулярные перестройки в гидрофильных «петлях», но и смещения трансмембранных «тяжей» на стадии образования метародопсина II [48]. Эти конформационные перестройки являются принципиально важными для передачи сигнала от родопсина как G-белок-сопряженного рецептора к G-белку (трансдукцию). ЭПР-исследования в этом направлении получили затем мощное развитие во многих лабораториях мира, поскольку появилась возможность наблюдать динамику конформационных перестроек в механизме функционирования G-белок-связывающих рецепторов (см. обзор [49]).

В рамках Проекта «Родопсин» начались и наши работы по механизмам светового повреждения сетчатки и ретинального пигментного эпителия. Речь шла о так называемом «фотобиологическом парадоксе зрения», когда свет выступает не только как носитель зрительной информации, но и как потенциально опасный повреждающий фактор. Фотосенсибилизаторами в механизме

повреждения выступают, в основном, свободный *полностью-транс*-родопсин, высвобождающийся в ходе фотолиза родопсина, и образующиеся из *полностью-транс*-родопсина бисретиноиды.

В одной из первых работ нами было показано, что в ходе фотоповреждения молекулы родопсина окисляются его SH-группы и что при этом спектр действия окисления находится в коротковолновой (фиолетово-синей) области спектра [50]. Эта работа послужила началом большой серии работ, практическим результатом которых стало создание и внедрение в офтальмологическую практику нового поколения интраокулярных линз, частично отсекающих от сетчатки коротковолновую часть видимого спектра и тем самым предохраняющих ее после удаления катарактального хрусталика от фотоповреждения (см. [51, 52]).

В механизме фотоповреждения сетчатки и особенно ретинального пигментного эпителия важную роль играют бисретиноиды как эффективные фотосенсибилизаторы. В основном бисретиноиды локализованы в липофусциновых гранулах клеток ретинального пигментного эпителия, которые считались инертным внутриклеточным «шлаком». Нами было впервые показано, что эти гранулы фотоактивны и что при действии видимого света они способны образовывать активные формы кислорода, при этом максимум спектра действия их образования находится в коротковолновой области спектра [53]. Эта работа дала начало целому направлению исследований, связанных с повреждающим действием света и ускорением развития дегенеративных заболеваний сетчатки. Как недавно нами было показано, генерация липофусциновыми гранулами активных форм кислорода приводит в том числе к исчезновению в клетках ретинального пигментного эпителия меланосом, усугубляя тем самым опасность их светового повреждения [54, 55].

Конференции и школы

Проект «Родопсин» быстро расширился и вовлекал в свою орбиту все новых участников. Этому способствовали как сама тематика проекта, актуальность которой все более возрастала, так и периодически проводившиеся конференции и школы.

Созданный Ю.А. Овчинниковым Научный совет АН СССР по биологическим мембранам активно работал. Школы, которые этот Совет организовывал, в основном в Пушкино, привлекали огромное число участников. Тематика лекций была довольно широкая, а лекторы, которые приглашались, сами активно работали в своих областях науки.

Конференций же, связанных с мембранной тематикой, проводилось множество. Одной из таких, организуемых М.А. Островским, была «Механизмы сенсорной рецепции». В течение многих лет она проводилась в Пушкино. Конференция собирала почти всех специалистов, в то время активно работавших в этой области. Доклады по фоторецепции и зрительному родопсину были на ней доминирующими.

Что касается международных конференций, которых тоже было немало, то лично я помню две, в которых принимал участие.

Первая — это советско-американская конференция по биологическим мембранам в США, в Чикаго, в 1976 году. О ее организации Ю.А. Овчинников договорился с Даниэлем Тостесоном, в тот период он был деканом в Чикагском университете. Условие было такое: американская сторона принимает и оплачивает все расходы, включая перелеты и посещения советскими учеными ряда университетов и научных центров США после окончания конференции. Но при этом список советских ученых — участников конференции составляет Тостесон и присылает его затем Овчинникову. Всего договорились о 15 участниках с каждой стороны. После консультаций с коллегами, Тостесон прислал этот список. В нем были, действительно, самые известные, активно работавшие в то время в области биологических мембран ученые, например П.Г. Костюк. С немалыми трудностями Ю.А. Овчинников выполнил договоренность, и эти «самые известные советские специалисты» поехали в Америку. Их имена можно найти в книге, которая затем вышла по материалам этой конференции [56].

Второй конференцией — самой, пожалуй, яркой, важной и впечатляющей была международная конференция по ретинальсодержащим белкам в Иркутске, точнее в поселке Листвянка на Байкале. Проходила она с 22 по 28 июля 1986 года. Только Ю.А. Овчинников, будучи в то время вице-президентом АН СССР и обладая огромным авторитетом в международном научном сообществе, способен был ее организовать. Его приглашение приняли самые выдающиеся ученые. Не побоюсь сказать, это был пир родопсинового сообщества.

Конференция открывалась докладом Н.Г. Абдулаева «Антигенная структура родопсина». С докладами выступали и другие непосредственные участники Проекта «Родопсин»: В.П. Скулачев «Бактериородопсин в ряду $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов: сравнительный анализ», М.А. Островский «Обратимые и необратимые изменения родопсина при действии света», В.М. Липкин «Белки зрительного каскада. Аминокислотная последовательность

субъединиц трансдуцина и цГМФ-фосфодиэстеразы», С.С. Колесников «Прямое действие цГМФ на плазматическую мембрану НСП». Из иностранных корифеев доклады делали первооткрыватели бактериородопсина Уолтер Стокениус (США) «Индукцированные катионами конформационные переходы в бактериородопсине» и Дитер Остерхелт (ФРГ) «Ген галоопсина», будущий лауреат Нобелевской премии Ричард Хендерсон (Великобритания) «Структурный анализ бактериородопсина». Довольно много докладов известных для меня по литературе людей было по зрительному родопсину и механизмам фоторецепции. Например, по зрительному родопсину особенно интересны были доклады классика фотохимии зрительного родопсина Тори Ешизава (Япония) «Механизм передачи световой информации в наружных сегментах палочек», известного физикохимика Юджина Хонига (США) «Структура, энергетика и функция ретинальсодержащих белков» и Мэри Апплебюри (США) «Эволюция зрительных пигментов». Из биохимиков и физиологов очень интересны были доклады М. Тсуда (Япония) «G-белок осьминога, передающий сигнал в фоторецепторе беспозвоночных», Марка Шабра (Франция) «Как выключается каскад ферментативных реакций, запускаемый родопсином?», Майкла Баундса (США) «Биохимические принципы возбуждения и адаптации палочек позвоночных».

Следствием успеха Проекта «Родопсин» (публикации, школы, конференции), как и следствием все возрастающего интереса к мембранным ретинальсодержащим белкам микробного и животного происхождения (их структуре, функции и возможности биотехнологического использования) стало то, что все больше людей и лабораторий вовлекались в 70-е и 80-е годы в эту тематику. Поэтому, когда в начале 90-х годов началась «утечка мозгов», то многие российские специалисты получили приглашения работать в лабораториях США и Европы. В результате многие из них в «родопсиновом мире» стали в этих странах ведущими специалистами. Рассказывают, что в 90-е годы симпозиум по ретинальсодержащим белкам на Биофизическом съезде США шел на русском языке. В России в настоящее время исследования по этой тематике продолжают, но, к сожалению, не столь интенсивно, как хотелось бы. Хотя в некоторых научных центрах работы по родопсином микробного и вирусного происхождения (родопсины I типа) и зрительного родопсина (родопсин II типа) ведутся весьма и весьма успешно.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 122041400102-9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Oesterhelt D., Stoerkenius W. 1971. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat. New. Biol.* **233**, 149–152. doi 10.1038/newbio233149a0
- Чекулаева Л.Н. 1977. Особенности развития культуры *Halobacterium halobium*. *Микробиология.* **46** (2), 288–294.
- Kayushin L.P., Skulachev V.P. 1974. Bacteriorhodopsin as an electrogenic proton pump: reconstitution of bacteriorhodopsin proteoliposomes generating delta psi and delta pH. *FEBS Lett.* **39** (1), 39–42. doi 10.1016/0014-5793(74)80011-6. PMID: 4850730
- Ovchinnikov Y.A., Abdulaev N.G., Feigina M.Y., Kiselev A.V., Lobanov N.A. 1979. The structural basis of the functioning of bacteriorhodopsin: an overview. *FEBS Lett.* **100** (2), 219–224. doi 10.1016/0014-5793(79)80338
- Khorana H.G., Gerber G.E., Herlihy W.C., Gray C.P., Anderegg R.J., Nihei K., Biemann K. 1979. Amino acid sequence of bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76** (10), 5046–5050. doi 10.1073/pnas.76.10.5046
- Овчинников Ю.А., Абдулаев Н.Г., Фейгина М.Ю., Артамонов И.Д., Богачук А.С. 1983. Зрительный родопсин: Полная аминокислотная последовательность и топология в мембране. *Биоорганическая химия.* **10**, 1331–1340.
- Hargrave P.A., McDowell J.H., Curtis D.R., Wang J.K., Juszczak E., Fong S.L., Rao J.K., Argos P. 1983. The structure of bovine rhodopsin. *Biophys. Struct. Mech.* **9**, 235–244.
- Feldman T.B., Ivankov O.I., Kuklin A.I., Murugova T.N., Yakovleva M.A., Smitienko O.A., Kolchugina I.B., Round A., Gordeliy V.I., Belushkin A.V., Ostrovsky M.A. 2019. Small-angle neutron and X-ray scattering analysis of the supramolecular organization of rhodopsin in photoreceptor membrane. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1861** (10), 183000. doi 10.1016/j.bbamem.2019.05.022
- Ovchinnikov Yu.A., Abdulaev N.G., Zolotarev A.S., Artamonov I.D., Bepalov I.A., Dergachev A.E., Tsuda M. 1988. Octopus rhodopsin. Amino acid sequence deduced from cDNA. *FEBS Lett.* **232** (1), 69–72. doi 10.1016/0014-5793(88)80388-0
- Ovchinnikov Yu.A., Lipkin V.M., Shuvaeva T.M., Bogachuk A.P., Shemyakin V.V. 1985. Complete amino acid sequence of gamma-subunit of the GTP-binding protein from cattle retina. *FEBS Lett.* **179** (1), 107–110. doi 10.1016/0014-5793(85)80201-5
- Lipkin V.M., Udovichenko I.P., Bondarenko V.A., Yurovskaya A.A., Telnykh E.V., Skiba N.P. 1990. Site-directed mutagenesis of the inhibitory subunit of retinal rod cyclic GMP phosphodiesterase. *Biomed. Sci.* **1** (3), 305–308.
- Kovalev K., Volkov D., Astashkin R., Alekseev A., Gushchin I., Haro-Moreno J.M., Chizhov I., Siletsky S., Mamedov M., Rogachev A., Balandin T., Borshchevskiy V., Popov A., Bourenkov G., Bamberg E., Rodriguez-Valera F., Büldt G., Gordeliy V. 2020. High-resolution structural insights into the heliorhodopsin family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 4131–4141. doi 10.1073/pnas.1915888117
- Rozenberg A., Inoue K., Kandori H., Bèjà O. 2021. Microbial rhodopsins: The last two decades. *Annu. Rev. Microbiol.* **75**, 427–447. doi.org/10.1146/annurev-micro-031721-020452
- Gordeliy V., Kovalev K., Bamberg E., Rodriguez V., Zinovev E., Zabelskii D., Alekseev A., Rosselli R., Gushchin I., Okhrimenko I. 2022. Microbial rhodopsins, *Methods Mol. Biol.* **2501**, 1–52. doi 10.1007/978-1-0716-2329-9_1
- Островский М.А., Смитиенко О.А., Боченкова А.В., Фельдман Т.Б. 2023. Сходство и различия родопсинов фотохимии родопсинов I и II типов. *Биохимия.* **88** (10), 1847–1866.
- Hofmann K.P., Lamb T.D. 2023. Rhodopsin, light-sensor of vision. *Prog. Retin. Eye Res.* **93**, 101116. doi 10.1016/j.preteyeres.2022.101116
- Островский М.А. 2020. Молекулярная физиология зрительного пигмента родопсина: актуальные направления. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* **106** (4), 401–420. Doi 10.31857/S0869813920040056
- Островский М.А. 2017. Родопсин: эволюция и сравнительная физиология. *Палеонтол. журн.* **5**, 103–113.
- Feuda R., Menon A.K., Göpfert M.C. 2022. Rethinking opsins. *Mol Biol Evol.* **39** (3), msac033. doi 10.1093/molbev/msac033
- Bulzu P.-A., Kavagutti V.S., Andrei A.-S., Ghai R. 2022. The evolutionary kaleidoscope of rhodopsins. *mSystems.* **7**, e00405-22. doi 10.1128/mSystems.00405-22
- Kojima K., Sudo Y. 2023. Convergent evolution of animal and microbial rhodopsins, *RSC Adv.* **13**, 5367–5381. doi 10.1039/d2ra07073a
- Кирпичников М.П., Островский М.А. 2023. Оптогенетика: фундаментальные и прикладные аспекты. *Вестник РАН.* **93** (9), 798–805. doi 10.31857/S0869587323090086
- Drachev L.A., Jasaitis A.A., Kaulen A.D., Kondrashin A.A., Liberman E.A., Nemecek I.B., Ostroumov S.A., Semenov A.Yu., Skulachev V.P. 1974. Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin. *Nature.* **249**, (455), 321–324. doi 10.1038/249321a0
- Drachev L.A., Jasaitis A.A., Mikelsaar H., Nemecek I.B., Semenov A.Y., Semenova E.G., Severina I.I., Skulachev V.P. 1976. Reconstitution of biological molecular generators of electric current. H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **251** (22), 7077–7082.
- Drachev L.A., Kaulen A.D., Skulachev V.P. 1978. Time resolution of the intermediate steps in the bacteriorhodopsin-linked electrogenesis. *FEBS Lett.* **87** (1), 161–167. doi 10.1016/0014-5793(78)80157-4

26. Skulachev V.P. 1976. Conversion of light energy into electric energy by bacteriorhodopsin. *FEBS Lett.* **64** (1), 23–25. doi 10.1016/0014-5793(76)80239-6
27. Bibikov S.I., Grishanin R.N., Kaulen A.D., Marwan W., Oesterhelt D., Skulachev V.P. 1993. Bacteriorhodopsin is involved in halobacterial photoreception. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90** (20), 9446–9450. doi 10.1073/pnas.90.20.9446
28. Большаков В.И., Драчев Л.А., Каламкаров Г.Р., Каулен А.Д., Островский М.А., Скулачев В.П. 1979. Общность свойств бактериального и зрительного родопсина: превращение энергии света в разность электрических потенциалов. *ДАН СССР.* **249**, 1462–1466.
29. Drachev L.A., Kalamkarov G.R., Kaulen A.D., Ostrovsky M.A., Skulachev V.P. 1981. Fast stages of photoelectric processes in biological membranes. II. Visual rhodopsin. *Eur. J. Biochem.* **117**, 471–481. doi 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06362.x
30. Drachev L.A., Kaulen A.D., Khitrina L.V., Skulachev V.P. 1981. Fast stages of photoelectric processes in biological membranes. I. Bacteriorhodopsin. *Eur. J. Biochem.* **117**, 461–470. doi 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06361.x
31. Шевченко Т.Ф., Каламкаров Г.Р., Островский М.А. 1987. Отсутствие переноса H^+ через фоторецепторную мембрану в ходе фотолиза родопсина. *Сенсорные системы.* **1**, 117–126.
32. Погожева И.Д., Кузнецов В.А., Лившиц В.А., Федорович И.Б., Островский М.А. 1985. Фотоиндуцированные изменения в гидрофильной области молекулы родопсина. Исследование методом ЭПР-спектроскопии с переносом насыщения, *Биол. мембраны.* **2** (9), 880–896.
33. Hofmann K.P., Lamb T.D. 2023. Rhodopsin, light-sensor of vision. *Prog. Retin. Eye Res.* **93**, 101116. doi 10.1016/j.preteyeres.2022.101116
34. Brindley G.S., Gardner-Medwin A.R. 1966. The origin of the early receptor potential of the retina. *J. Physiol.* **182**, 185–194. doi 10.1113/jphysiol.1966.sp007817
35. Всеволодов Н.Н., Чекулаева Л.Н. 1978. Спектральные превращения фотопродуктов в клетках *Halobacterium halobium*. *Биофизика.* **23** (1), 99–104.
36. Всеволодов Н.Н., Иваницкий Г.Р. 1985. Биологические светочувствительные комплексы как фотоносители технической информации. *Биофизика.* **30** (5), 962–967.
37. Vsevolodov N. 2011. *Biomolecular Electronics: An Introduction via Photosensitive Proteins*. Boston: Birkhäuser, 296 p.
38. Druzhko A.B. 2023. Some aspects of using the fundamental properties of bacteriorhodopsin for recording, processing, and storage of optical information. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem.* **56**, 100620. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2023.100620>
39. Fesenko E.E., Kolesnikov S.S., Lyubarsky A.L. 1985. Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature.* **313** (6000), 310–313. doi 10.1038/313310a0
40. Кронгауз В.А., Шифрина Р.Р., Федорович И.Б., Островский М.А. 1975. Фотохромия зрительных пигментов. 1. Образование изохромных продуктов при обратимых превращениях родопсина лягушки. *Биофизика.* **20** (2), 219–224.
41. Кронгауз В.А., Шифрина Р.Р., Федорович И.Б., Островский М.А. 1975. Фотохромия зрительных пигментов. 2. Кинетика фотопревращений родопсина лягушки. *Биофизика.* **20** (3), 419–424.
42. Кронгауз В.А., Шифрина Р.Р., Федорович И.Б., Островский М.А. 1975. Фотохромия зрительных пигментов. 3. Сравнительное исследование фотопревращений родопсина быка и лягушки, *Биофизика.* **20** (3), 426–430.
43. Ostrovsky M.A., Weetall H.H. 1998. Octopus rhodopsin photoreversibility of a crude extract from whole retina over several weeks duration. *Biosens Bioelectron.* **13** (1), 61–65.
44. Smitienko O., Nadtochenko V., Feldman T., Balatskaya M., Shelaev I., Gostev F., Sarkisov O., Ostrovsky M. 2014. Femtosecond laser spectroscopy of the rhodopsin photochromic reaction: A concept for ultrafast optical molecular switch creation (ultrafast reversible photoreaction of rhodopsin). *Molecules.* **19**, 18351–18366. doi 10.3390/molecules191118351
45. Feldman T.B., Smitienko O.A., Shelaev I.V., Gostev F.E., Nekrasova O.V., Dolgikh D.A., Nadtochenko V.A., Kirpichnikov M.P., Ostrovsky M.A. 2016. Femtosecond spectroscopic study of photochromic reactions of bacteriorhodopsin and visual rhodopsin. *J. Photochem. Photobiol. B.* **164**, 296–305. doi 10.1016/j.jphotobiol.2016.09.041
46. Островский М.А., Надточенко В.А. 2021. Фемтохимия родопсина. *Химическая физика.* **40**, 76–84. doi 10.31857/S0207401X21040117
47. Гендель Л.Я., Шапиро А.Б., Федорович И.Б., Крылякова К.Е., Островский М.А. 1972. Исследование методом спиновых зондов фотоиндуцированных конформационных переходов в фоторецепторной мембране. *ДАН СССР.* **206** (6), 1469–1472.
48. Погожева И.Д., Кузнецов В.А., Лившиц В.А., Островский М.А. 1985. Конформационная подвижность и взаимодействие доменов родопсина. *Биол. мембраны.* **2** (9), 897–905.
49. Van Eps N., Caro L.N., Morizumi T. 2015. Characterizing rhodopsin signaling by EPR spectroscopy: From structure to dynamics. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14** (9), 1586–1597. <https://doi.org/10.1039/c5pp00191a>
50. Погожева И.Д., Федорович И.Б., Островский М.А., Эмануэль Н.М. 1981. Фотоповреждение молекулы родопсина. Окисление SH-групп. *Биофизика.* **26** (3), 398–403.
51. Meyers S.M., Ostrovsky M.A., Bonner R.F. 2004. A model of spectral filtering to reduce photochemical

- damage in age-related macular degeneration. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **102**, 83–93.
52. Зак П., Егорова Т., Розенблюм Ю., Островский М. 2005. *Спектральная коррекция зрения: научные основы и практические приложения*. М.: Научный мир. 192 с.
 53. Boulton M., Dontsov A., Jarvis-Evans J., Ostrovsky M. 1993. Lipofuscin is a photoinducible free radical generator. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **19**, 201–204.
 54. Dontsov A.E., Yakovleva M.A., Vasin A.A., Gulin A.A., Aybush A.V., Nadochenko V.A., Ostrovsky M.A. 2023. Understanding the mechanism of light-induced age-related decrease in melanin concentration in retinal pigment epithelium cells. *Int. J. Mol. Sci.* **24** (17), 13099. doi 10.3390/ijms241713099
 55. Dontsov A., Ostrovsky M. 2024. Retinal pigment epithelium pigment granules: Norms, age relations and pathology. *Int. J. Mol. Sci.* **25** (7), 3609. doi.org/10.3390/ijms25073609
 56. *Membrane transport processes*. 1978. Eds Ovchinnikov Yu.A., Tosteson D., Latorre R. New York: Raven Press. 243 p.

Rhodopsin Project

© 2024 г. М. А. Ostrovsky^{1, 2, *}

¹Department of Molecular Physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

²Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: ostrovsky3535@mail.ru

The review examines the history of the emergence, development, and achievements of the Rhodopsin project, organized by Yu.A. Ovchinnikov in 1973. The current state of some issues related to the structure and function of retinal-containing proteins – types I and II rhodopsins – is also presented.

Keywords: rhodopsin, bacteriorhodopsin

УДК 577.352.465

НАРУШЕНИЯ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПАТОЛОГИЯХ: ИСТОРИЯ, ФАКТЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2024 г. В. А. Вигонт^а, Е. В. Казначеева^{а, *}

^аИнститут цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*e-mail: evkazn@incras.ru

Поступила в редакцию 24.04.2024

После доработки 10.05.2024

Принята к печати 14.05.2024

Нейродегенеративные заболевания, наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими патологиями, являются одной из наиболее острых проблем современной медицины, требующих комплексного подхода к изучению молекулярных механизмов их патогенеза и поиску новых мишеней для терапевтического воздействия. Пристального внимания исследователей заслуживает нейрональная кальциевая сигнализация, многочисленные нарушения которой были отмечены при изучении ряда нейродегенеративных патологий. В данном обзоре мы сфокусировались на одном из наиболее общих и важных путей поступления кальция в клетку: входе кальция через депо-управляемые каналы плазматической мембраны. Здесь собраны исследования, демонстрирующие нарушения депо-управляемого входа кальция при различных нейродегенеративных заболеваниях, прежде всего, при болезнях Альцгеймера, Паркинсона и Хантингтона, проанализированы молекулярные детерминанты, опосредующие данные нарушения, предложены пути их фармакологической коррекции. Обобщенная в обзоре информация позволит взглянуть на депо-управляемые каналы как на одну из наиболее перспективных мишеней в поиске новых терапевтических агентов для борьбы с нейродегенеративными патологиями и наметить дальнейшие перспективные направления исследований в данной области.

Ключевые слова: нейродегенерация, кальций, депо-управляемый вход кальция, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера

DOI: 10.31857/S0233475524050021, **EDN:** cbxvma

ВВЕДЕНИЕ

Ионы кальция являются одними из наиболее важных внутриклеточных посредников и контролируют множество клеточных процессов, включая экспрессию генов, пролиферацию, клеточную гибель, миграцию, экзоцитоз и т.д. [1]. Для осуществления тонкой кальциевой регуляции необходимо согласованное функционирование множества компонентов клеточной машинерии, включая ионные каналы, кальций-связывающие белки, внутриклеточные кальциевые депо, кальциевые АТФ-азы и обменники.

Депо-управляемый вход кальция (SOCE) является одним из наиболее общих путей поступления ионов кальция в клетку. Изначально модель входа ионов кальция через каналы плазматической мембраны (ПМ) в ответ на кальциевый выброс

из эндоплазматического ретикулума (ЭР) была предложена в 1986 году проф. Джеймсом Патни, который использовал термин «емкостной кальциевый вход» [2]. Значимыми вехами в изучении депо-управляемых (SOC) каналов являлись: регистрация SOCE в тучных клетках, когда впервые был введен термин «кальциевые каналы, активируемые высвобождением кальция» (calcium release-activated calcium channel, CRAC channels) [3], открытие белков STIM, как активаторов этих каналов [4, 5], белков Orai в качестве каналобразующих субъединиц CRAC-каналов [6, 7], получение кристаллической структуры канала, образованного шестью субъединицами белков семейства Orai [8], изучение депо-зависимости каналов, образованных белками семейства TRPC [9, 10]. Более подробно работы, посвященные открытию и раннему описанию феномена SOCE, обсуждены в историческом обзоре

Джеймса Патни [11]. Долгое время считалось, что SOCE является атрибутом исключительно электровозбудимых клеток, но позднее было показано, что данный тип входа кальция присутствует и в нейронах [12–15], и в кардиомиоцитах [16, 17].

Физиологическая активация SOC-каналов в клетках вызывается снижением концентрации ионов кальция во внутриклеточных кальциевых депо вследствие запуска фосфатидил-инозитольного каскада. Инициация данного каскада происходит при поступлении сигнала от рецепторов ПМ, которые посредством G-белков либо с помощью собственной тирозинкиназной активности активируют одну из изоформ фосфолипазы C, осуществляющей гидролиз минорного липида ПМ – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата с образованием вторичного посредника – инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP_3). Последний, связываясь со своим рецептором, локализованным в мембране ЭР, индуцирует выброс кальция из депо, что приводит к потере связи с кальцием белков STIM1 и STIM2, являющихся сенсорами кальция в люмене ЭР. В результате этого происходит конформационная перестройка STIM1 и STIM2, их олигомеризация и транслокация в область, прилежащую к ПМ, где они взаимодействуют с SOC-каналами ПМ, активируя их и обеспечивая приток ионов кальция из внеклеточной среды, которые могут быть использованы как для осуществления внутриклеточной сигнализации, так и для перезаполнения депо, обеспечивая, таким образом, стабильность системы.

Основные участники SOCE представлены в клетках уже упомянутыми белками-активаторами STIM1 и STIM2, а также каналобразующими белками семейств Orai и TRPC. Также к белкам, принимающим участие в функционировании SOC-каналов, можно отнести рецепторы IP_3 и рианодина, которые отвечают за выброс кальция из внутриклеточных депо, и кальциевые АТФ-азы саркоплазматического ретикула (SERCA), напротив, обеспечивающие низкую концентрацию кальция в цитозоле и высокую в депо. Как правило, именно ингибирующее воздействие на SERCA с помощью тапсигаргина либо циклопиазоновой кислоты является наиболее часто используемым способом снизить концентрацию кальция в депо и вызвать SOCE в экспериментальных условиях. Еще одним относительно новым позитивным модулятором SOCE является белок аннексин 3, для гена которого было показано значительное увеличение экспрессии в *stim2b* нокаутных рыбках *Danio Rerio* (Zebrafish) [18]. Затем на клетках HeLa и HEK293 с помощью как флуоресцентных, так и электрофизиологических методов подтверждено,

что оверэкспрессия аннексина 3 приводит к увеличению амплитуды SOCE [19]. В то же время, конкретных молекулярных механизмов влияния аннексина 3 на SOC-каналы пока не выявлено.

Важной особенностью SOCE является долговременность его эффектов. В то время как нарушение входа кальция, например, через потенциал-управляемые кальциевые каналы будет приводить к мгновенным эффектам, связанным с высвобождением нейромедиатора или мышечным сокращением, дисфункция SOC-каналов имеет тенденцию к накоплению ошибки и постепенному сдвигу кальциевого гомеостаза клетки, влиянию на экспрессионный клеточный аппарат. Нарушения аппарата SOCE были отмечены при развитии ряда патологий [20, 21], что предполагает необходимость уделить SOC-каналам пристальное внимание, как потенциальной мишени для проведения фармакологической коррекции. В данном обзоре мы сфокусировались на нарушениях SOCE, наблюдаемых при нейродегенеративных патологиях, в попытке проследить общие закономерности, определить наиболее вероятные молекулярные мишени для разработки лекарств и наметить перспективные пути дальнейших исследований в данной области.

SOCE И БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Болезнь Альцгеймера (БА) является тяжелой нейродегенеративной патологией и самой частой причиной развития деменции. В подавляющем числе случаев заболевание носит спорадический характер, и лишь небольшая его часть имеет наследственные причины. Основные случаи наследственных форм БА связаны с множеством различных мутаций в нескольких генах, кодирующих белок предшественник амилоида (APP) и белки пресенилин-1 и пресенилин-2. Множество подтипов наследственных форм БА затрудняют выявление общих молекулярных механизмов для данного заболевания и разработку высокоспецифичных лекарств. В основе заболевания, согласно доминирующей амилоидной гипотезе нейродегенерации, лежит накопление фрагмента мутантного APP – амилоида $\beta 42$ ($A\beta 42$). Тем не менее, еще в конце XX века З.С. Хачатурян сформулировал так называемую «Кальциевую гипотезу», в которой главенствующую роль в патогенезе БА занимают нарушения кальциевой сигнализации [22]. Впоследствии идея кальциевой гипотезы была развита и распространена на другие нейродегенеративные заболевания И.Б. Безпрозванным [23, 24].

Нарушения SOCE при БА, прежде всего, ассоциированы с низкими уровнями белка STIM2 (рис. 1), что было показано в фибробластах,

Болезнь Альцгеймера

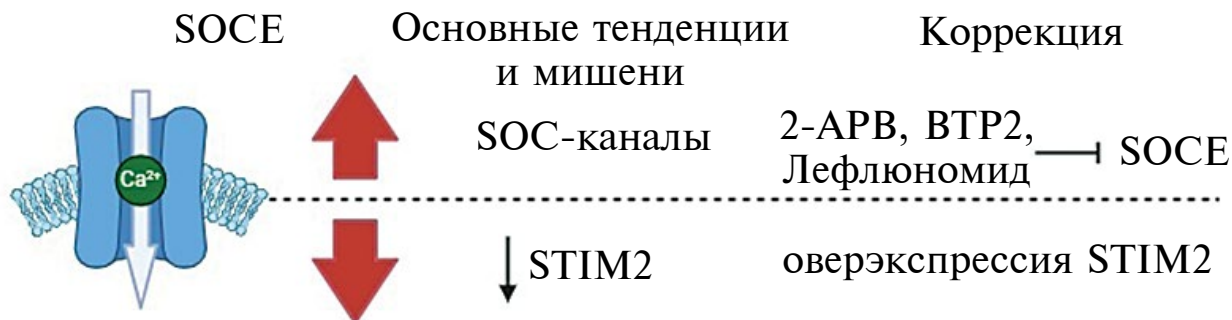


Рис. 1. Основные тенденции изменений SOCE при БА и путей их коррекции. Черной стрелочкой показано изменение экспрессии гена, соответствующего обозначенному белку.

специфичных для пациентов с БА [25], кортикальных нейронах пациентов со спорадической формой БА [26] и гиппокампальных нейронах мыши PS1-M146V-KI, моделирующей БА [26]. При этом в гиппокампальных нейронах мыши PS1-M146V-KI было отмечено снижение плотности грибовидных дендритных шипиков и почти полное отсутствие SOCE, активируемого белком STIM2 [26, 27]. В то же время некоторые данные позволяют предположить, что опосредованное пресенилинами расщепление белка STIM1 также может приводить к дисфункции SOCE при БА [28]. В более современных работах было показано, что токсичность мутантного амилоида $\text{A}\beta 42$ в импортизированной гиппокампальной мышечной клеточной линии HT-22 связана с его интернализацией и непосредственным связыванием со STIM1, что приводит к угнетению SOCE [29].

Несмотря на то что излишнее поступление кальция в клетку, как правило, более опасно, нежели недостаточное, судя по всему, при БА именно угнетение SOCE является токсичным для нейронов. Так, снижение амплитуды SOCE было отмечено в мышечной модели БА, экспрессирующей мутантный белок предшественник амилоида, и при обработке первичной культуры нейронов гиппокампа мыши мутантным амилоидом $\text{A}\beta 42$ [30, 31]. Аналогичные результаты, демонстрирующие подавление SOCE, были получены на клетках БА-специфичной микроглии либо микроглии, обработанной амилоидом $\text{A}\beta 42$. Вдобавок на клетках микроглии также было показано уменьшение кальциевого выброса из ЭР [32]. Высказываются предположения, что правильная регуляция SOCE крайне важна для стабильности грибовидных дендритных шипиков в нейронах гиппокампа, а изначально компенсаторное протекторное снижение SOCE

со временем становится токсичным для клеток [27, 33]. В поддержку данного мнения можно привести результаты, свидетельствующие, что фармакологическая активация SOCE либо гиперэкспрессия генов, отвечающих за синтез компонентов SOCE, приводит к восстановлению нормальной плотности шипиков в нейронах гиппокампа, выделенных из мышечных моделей БА с мутациями в пресенилинах и белке предшественнике амилоида [26, 27, 30, 31]. Полногеномный скрининг, выполненный на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* с гиперэкспрессией человеческого $\text{A}\beta 42$, и последующий интерактоновый анализ также выявили компоненты SOCE, как один из основных путей токсичности $\text{A}\beta 42$ [34]. В данном исследовании особо был отмечен модулятор SOCE — белок SURF4 [35], для которого было показано, что гиперэкспрессия кодирующего его гена в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y связана с уменьшением SOCE и повышенной токсичностью амилоида $\text{A}\beta 42$, в то время как сайленсинг *SURF4* с помощью малых интерферирующих РНК, напротив, приводит к увеличению SOCE и снижению токсичности $\text{A}\beta 42$ [34]. Таким образом, высокой актуальностью обладают исследования, направленные на поиск новых модуляторов SOCE, прежде всего нацеленных на триаду TRPC6, Orai2 и STIM2, отвечающую за поддержание SOCE в нейронах гиппокампа, популяция которых является одной из наиболее уязвимых при БА [36]. В частности можно отметить, что в клетках нейроглиомы человека H4, супрессия Orai2 приводила к увеличению амплитуды SOCE и предотвращала агрегацию $\text{A}\beta 42$ [37].

В целом можно заключить, что путь поступления кальция через SOC-каналы подавлен при БА, а восстановление нормального уровня SOCE является перспективной стратегией для терапии БА.

В то же время, следует отметить высокую гетерогенность БА и очевидный факт, что различные мутации, связанные с наследственными формами БА, могут иметь кардинально различающиеся молекулярные механизмы, лежащие в основе нейродегенеративных процессов. Так, в клетках нейробластомы мыши Neuro-2a и в первичной культуре гиппокампальных нейронов мыши, экспрессирующих мутантный ген, кодирующий пресенилин 1, с делецией девятого экзона (PS1 ΔE9), SOCE оказался существенно повышен, причем данное увеличение оказалось связано исключительно с каналами, активируемыми STIM1, и могло быть компенсировано супрессией гена, кодирующего STIM1 (но не STIM2), либо с помощью известного блокатора SOC-каналов — соединения 2-APB [38]. Более того, 2-APB оказывал положительное воздействие на дрозодильную модель БА с PS1 ΔE9, снижая наблюдаемый эффект потери кратковременной памяти [38]. Чуть ранее на мышинных эмбриональных фибробластах, клетках нейробластомы мыши и первичной культуре нейронов гиппокампа мыши была показана связь между нарушением эндопротеолиза пресенилина 1 и увеличением SOCE, причем данный эффект не зависел от гамма-секретазной активности пресенилина, в результате которой происходит накопление Aβ42 [39]. Также увеличение SOCE было отмечено в 5xFAD мышинной модели БА, где авторы, помимо прочего, показали возможность компенсировать патологически повышенную активность SOC-каналов с помощью ингибиторов BTP-2 и лефлюномида [40]. Таким образом, широко наблюдаемое в различных моделях БА снижение уровня STIM2 может быть компенсаторным эффектом, направленным на снижение изначальной гиперактивности SOC-каналов [39], что подтверждается, в частности, наблюдаемой

спонтанной активацией STIM2-управляемых SOC-каналов в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, экспрессирующих ген, кодирующий пресенилин 1 с мутацией M146V [41]. Поэтому можно резюмировать, что обе стратегии как позитивной, так и негативной модуляции SOCE имеют хорошие клинические перспективы, а разработка терапии против наследственных форм БА должна обязательно учитывать разнонаправленность влияния различных мутаций на нейрональную кальциевую сигнализацию (рис. 1).

SOCE И БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА

Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием, характеризующимся избирательной гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции, и носящим, как и БА, преимущественно спорадический характер. Среди наследственных форм БП наиболее часто встречающиеся случаи связаны с мутациями в доминантных генах *SNCA*, *LRKK2*, *GBA* и *VPS35*, а также рецессивных генах *Parkin*, *PINK1* и *DJ1* [42]. Основные симптомы БП включают такие моторные нарушения как асимметричная брадикинезия, тремор, ригидность и поструральная нестабильность [43]. Молекулярные механизмы патогенеза при БП на данный момент остаются невыясненными, но вовлеченность в них нарушений кальциевой сигнализации и, в частности, SOCE отмечается во множестве исследований [44–49].

Прежде всего стоит отметить работы, демонстрирующие ключевую роль каналообразующего белка TRPC1 в развитии БП (рис. 2). Показано, что широко используемые для моделирования БП нейротоксины 1-метил-4-фенилпиридин ион/1-метил-4-фенил-1,2,4,6-тетрагидропиридин (MPP⁺/

Болезнь Паркинсона

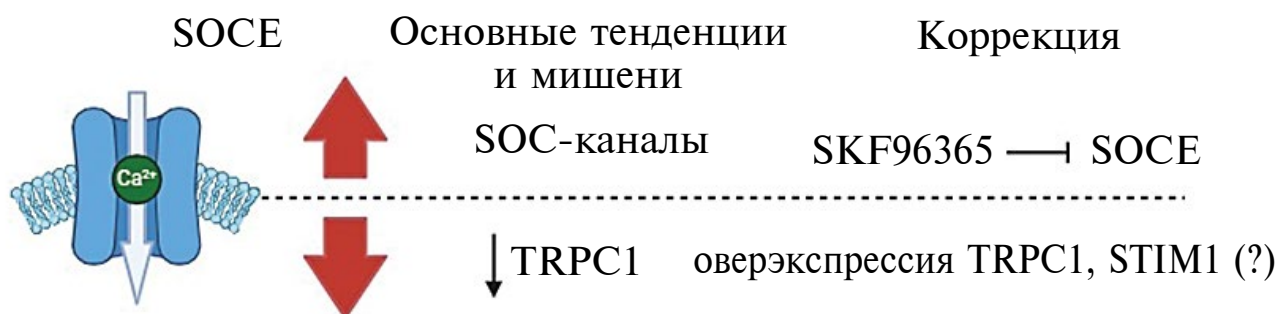


Рис. 2. Основные тенденции изменений SOCE при БП и путей их коррекции. Черной стрелочкой показано изменение экспрессии гена, соответствующего обозначенному белку.

МРТР) снижают уровень TRPC1, что уменьшает образование функциональных комплексов TRPC1 со STIM1 и, в конечном итоге, приводит к прогрессии нейрональной гибели [50, 51]. Полученные с использованием MPP⁺ данные были подтверждены на постмортальных образцах нигростриальной области мозга пациентов с БП, которые также демонстрировали существенное снижение уровня TRPC1 [52]. Молекулярные механизмы клеточной гибели при этом обусловлены тем, что в нормальном состоянии комплекс TRPC1 и STIM1 подавляет чрезмерную активность потенциал-управляемых кальциевых каналов L-типа CaV1.3, в то время как сайленсинг TRPC1 либо STIM1 приводят к увеличению пейсмейкерной активности CaV1.3 и дегенерации дофаминергических нигростриальных нейронов [53], что также сопровождается снижением экспрессии маркеров аутофагии и увеличением экспрессии маркеров апоптоза [52]. При этом, действие нейротоксина MPP⁺ ожидаемо приводит к снижению SOCE, что было показано на модели дофаминергических нейронов, дифференцированных из мезенхимных стволовых клеток [54]. В приведенных выше работах восстановление нормальной экспрессии TRPC1 приводило к увеличению выживаемости клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, моделирующей БП с помощью MPP⁺ [53], а фармакологическое ингибирование SOC-каналов соединением SKF96365 имело выраженный токсический эффект и приводило к резкому падению выброса дофамина и двукратному снижению выживаемости дофаминергических нейронов, дифференцированных из мезенхимных стволовых клеток, причем эффект наблюдался как в обработанных MPP⁺, так и в интактных нейронах [54].

В то же время для клеточной линии PC12 ингибирование SOCE с помощью SKF96365 оказывало протекторный эффект [55], а нокдаун *Stim1* значительно уменьшал токсичность, вызванную аппликацией 6-гидроксидофамина или MPP⁺ [56, 57]. Также на модели дофаминергических нейронов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), специфичных для пациентов с БП, ассоциированной с мутацией G2019S в гене *LRK2*, было показано существенное увеличение SOCE по сравнению с нейронами, специфичными для здоровых доноров [49]. Еще одним косвенным доказательством того, что при БП подавление SOCE может иметь терапевтическое значение можно считать работу, демонстрирующую, что пимавансерин тартрат, успешно используемый для купирования психиатрических симптомов, ассоциированных с БП, также является перспективной фармацевтической

субстанцией для терапии глиобластомы, где он ингибирует сигнальный путь транскрипционного фактора NFAT посредством подавления входа кальция через SOC-каналы [58].

Вовлеченность Orai1-опосредованного SOCE в патогенез БП изучена довольно слабо, тем не менее в одной из работ показано, что в фибробластах пациентов с БП наблюдаются пониженные уровни активатора SOCE — кальций-независимой фосфолипазы A2 β [59], что приводит к угнетению SOCE, как пишут авторы работы, вероятно, за счет снижения активности Orai1 [59]. Для другого представителя семейства Orai — белка Orai3, было показано увеличение экспрессии кодирующего его гена в первичной культуре астроцитов крысы, клеточной линии глиобластомы человека U87, а также в дифференцированных из ИПСК астроцитах человека, обработанных агрегатами α -синуклеина, прион-подобная активность которых считается одним из основных патогенетических механизмов при БП [60]. В данной работе гиперэкспрессия Orai3 коррелировала с повышенным уровнем SOCE, а также обсуждалась ключевая роль липидных рафтов, ассоциация с которыми помогает агрегатам α -синуклеина взаимодействовать с белками ПМ и модулировать SOCE [60]. Примечательно, что с холестерол- и сфинголипид-богатыми липидными микродоменами ассоциированы также большинство белков семейства TRPC, и вход кальция через них зависит от целостности данных рафтов [61]. При этом, очевидно, что взаимодействие ионных каналов и, в частности, SOC-каналов с липидным микроокружением, в том числе в контексте нейродегенеративных патологий, изучено недостаточно и может стать одним из магистральных векторов развития науки в ближайшее время.

SOCE И БОЛЕЗНЬ ХАНТИНГТОНА

Болезнь Хантингтона — одно из десяти известных на сегодняшний день полиглутаминовых заболеваний. В отличие от БА и БП, данная патология носит исключительно наследственный характер и является моногенной. Причиной БХ является мутация в гене, кодирующем белок хантингтин, в результате которой происходит увеличение числа глутамин-кодирующих кодонов и, как следствие, появление длинного полиглутаминового тракта в N-концевой области хантингтина. При длине полиглутаминового тракта свыше 35 остатков глутамина развивается БХ, причем возраст манифестации заболевания обратно коррелирует с длиной мутантного тракта [62]. БХ характеризуется избирательной гибелью ГАМКергических срединных шипиковых нейронов стриатума (MSNs) [63].

Болезнь Хантингтона

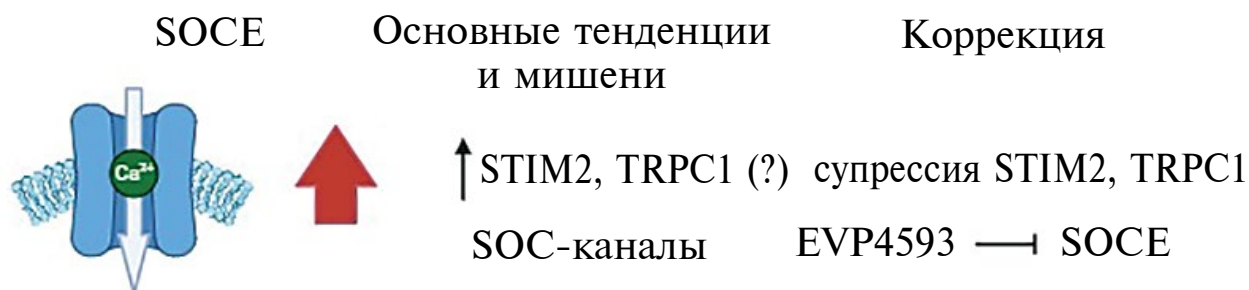


Рис. 3. Основные тенденции изменений SOCE при БХ и путей их коррекции. Черной стрелочкой показано изменение экспрессии генов, соответствующих обозначенным белкам.

Клинические проявления БХ включают в себя хореические движения, ригидность, дистонию, судороги, деменцию, нарушения настроения и когнитивных способностей и психиатрические симптомы [64, 65]. На молекулярном уровне БХ, также как БА и БП, характеризуется наличием нерастворимых агрегатов [66] и нарушениями кальциевой сигнализации [23, 44, 67]. Предпосылкой для пристального изучения дисфункции SOCE при БХ стало обнаружение способности мутантного хантингтина связываться с рецептором IP_3 и увеличивать аффинность последнего к своему лиганду [68]. Поскольку рецептор IP_3 является кальциевым каналом в мембране ЭР, это приводит к нарушению депонирования кальция и, очевидно, должно сказаться на функционировании SOC-каналов.

Действительно, ранние исследования показали, что в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, экспрессирующих полноразмерный мутантный хантингтин с длиной тракта 138 остатков глутамина, SOCE значительно повышен по сравнению с клетками, экспрессирующими нормальный хантингтин с длиной тракта 15 остатков глутамина [69]. Аналогичные данные были получены на первичных культурах MSNs, выделенных из мышинной модели БХ YAC128 [69]. Позднее увеличение входа кальция через SOC-каналы было многократно подтверждено в различных клеточных моделях БХ, включая клетки нейробластомы человека SK-N-SH, экспрессирующие N-концевой фрагмент хантингтина с мутантным полиглутаминовым трактом 138Q [70], клетки нейробластомы мыши Neuro-2A и первичную культуру MSNs мыши, экспрессирующие тот же N-концевой фрагмент мутантного хантингтина [71], а также MSNs человека, дифференцированные из ИПСК, специфичных для

пациентов с БХ [72, 73]. Пациент-специфичные модели БХ представляют особый интерес как в свете того, что экспрессия мутантного хантингтина в них эндогенная, за счет чего модели получаются более физиологичными, так и по причине впервые продемонстрированных выраженных нарушений SOCE в так называемых «низкоповторных» моделях БХ, где длина мутантного полиглутаминового тракта невелика и находится почти на границе с нормой (40–47 остатков глутамина) [72], в то время как ранее ни на клеточных, ни на животных моделях не удавалось получить патологический фенотип при экспрессии мутантного хантингтина с небольшой длиной полиглутаминового тракта. Сравнивая амплитуды SOCE в низкоповторных и в ювенильной (76 остатков глутамина) моделях БХ, было показано, что степень увеличения SOCE не зависит от длины полиглутаминового тракта мутантного хантингтина [73], что в целом не вызывает противоречий, поскольку, вероятно, наличие мутантного хантингтина даже с небольшой длиной тракта уже является достаточным для достижения максимально возможной амплитуды SOCE, лимитированной количеством каналов либо их активаторов. Похожая картина наблюдалась в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, в которых для моделирования БХ был экспрессирован не только хантингтин с длинным полиглутаминовым трактом 138Q, но и хантингтин-ассоциированный белок 1, который должен был еще больше усиливать утечку кальция из депо через рецептор IP_3 . Однако дальнейшая дестабилизация депонирования кальция не привела к увеличению амплитуды SOCE, а лишь облегчила активацию части SOC-каналов, переведя их в статус конститутивно активных [74]. Отдельно следует отметить недавнюю работу, демонстрирующую гиперактивность SOC-каналов в immortalized клетках скелетных мышц

человека нокаутных по хантингтину, что предполагает вовлеченность нормального хантингтина в функционирование SOC-каналов и необходимость учитывать утрату его влияния при возникновении мутации [75].

На молекулярном уровне среди белков, принимающих участие в депо-управляемом кальциевом ответе, в качестве основных игроков, опосредующих нарушения SOCE при БХ и имеющих хорошие перспективы быть использованными в качестве мишеней для нацеливания лекарств, можно выделить белки TRPC1 и STIM2. Было показано, что нокаут гена, кодирующего TRPC1, с помощью малых интерферирующих РНК снижает амплитуду SOCE в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, моделирующих БХ [69], защищает MSNs, выделенные из YAC128 мышей от глутамат-индуцированного апоптоза [69], а также приводит к восстановлению плотности дендритных шипиков в MSNs в составе кортикостриатальных культур изолированных из мышей YAC128 [76]. Более того, скрещивание YAC128 с мышами с нокаутированным геном *TRPC1* приводило к улучшению моторного фенотипа животных, а также восстанавливало нормальную плотность дендритных шипиков *in vitro* и *in vivo* [76]. Что касается белка STIM2, то его оверэкспрессия была отмечена в YAC128 мышцах [69, 77] и в пациент-специфичных MSNs, дифференцированных из ИПСК [73], причем эксперименты с супрессией STIM2 с помощью РНК-интерференции либо с использованием антисмысловых олигонуклеотидов подтвердили связь между высокими уровнями STIM2 и увеличенной амплитудой нейронального SOCE [73, 77]. Также супрессия STIM2 предотвращала потерю дендритных шипиков в MSNs, изолированных из YAC128 мышей [77]. Разумеется, спектр участников SOCE, принимающих участие в aberrантном кальциевом ответе при БХ, не ограничивается двумя приведенными выше белками. Так для MSNs, дифференцированных из ИПСК пациентов с БХ, было показано наличие как минимум двух различных типов каналов, участвующих в поддержании аномально высокого SOCE [78], причем форма вольт-амперных характеристик одного из них дает веские основания предполагать вовлеченность белков семейства Orai в aberrантный SOCE при БХ. Также следует отметить, что в уже упомянутом выше исследовании, демонстрирующем восстановление плотности дендритных шипиков в MSNs, изолированных из YAC128 мышей, эффективной оказалась супрессия не только TRPC1, но также TRPC6, Orai1 и Orai2 (но не других белков семейства TRPC и не Orai3) [76], что предполагает, что конечная картина нарушений SOCE при БХ может

оказаться существенно более сложной, чем та, что известна к настоящему моменту.

Утверждение компонентов SOCE в качестве потенциальных мишеней для лекарств при терапии БХ сделало крайне актуальной задачей поиск новых модуляторов SOCE. Так, еще в 2011 году было показано, что ингибитор NF- κ B сигнального пути EVP4593 [79] является негативным модулятором SOC-каналов, вход кальция через которые необходим для инициации NF- κ B сигналинга [69]. При этом нейропротективный потенциал EVP4593 был неоднократно подтвержден в различных экспериментах, включая защиту выделенных из YAC128 мышей MSNs от глутамат-индуцированного апоптоза [69], улучшение моторных функций в модели БХ на *Drosophila melanogaster* [69], уменьшение смертности БХ-специфичных MSNs, дифференцированных из ИПСК, в модели клеточного старения, индуцированного протеасомным ингибитором MG132 [72]. Примечательно, что помимо острого эффекта EVP4593, заключающегося в непосредственном ингибировании входа кальция через SOC-каналы, была показана его способность при инкубации с клетками в течение 48 ч снижать уровень STIM2 в БХ-специфичных MSNs, дифференцированных из ИПСК, и таким образом, нормализовать амплитуду SOCE [73]. Другая группа исследователей показала перспективность использования соединения 6-бромо-N-(2-фенилэтил)-2,3,4,9-тетрагидро-1H-карбазол-1-амин гидрохлорида (а также других тетрагидрокарбазолов), способного исправлять нарушения кальциевого гомеостаза и нормализовать aberrантный SOCE в культуре MSNs, выделенных из YAC128 мышей [80]. Перспективы дальнейших исследований могут быть связаны с поиском высокоселективных модуляторов SOC-каналов, способных избирательно модулировать каналы, активируемые только STIM1 либо STIM2, для чего стоит обратить пристальное внимание на недавно обнаруженный новый класс ингибиторов SOC-каналов – производные 1,2,3,4-дигидроадиазолов [81, 82], а также на изучение мембранных маркеров, которые позволят осуществить селективную доставку лекарственных соединений именно к тем клеткам, где наблюдается повышенный уровень SOCE, что позволило бы существенно снизить их токсичность для клеток с нормальной кальциевой сигнализацией. Потенциально в качестве подобных маркеров мог бы быть использован фосфатидилсерин, поскольку активность скрамблаз, осуществляющих его перенос на внешний листок ПМ, может быть связана с активностью SOC-каналов [83].

SOCE И ДРУГИЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Среди других нейродегенеративных патологий, прежде всего, следует выделить большую и достаточно разнородную группу спиноцереbellарных атаксий (СЦА), общей чертой которых является аутосомно-доминантный механизм наследования и выраженная дегенерация мозжечковой области мозга и, прежде всего, клеток Пуркинье [84]. В настоящий момент известно более 40 генетически обусловленных форм СЦА [85]. Несмотря на разнообразие генетических причин, приводящих к развитию атаксий, общей чертой для этих генов является участие в поддержании кальциевого гомеостаза в мозжечке [86]. Про нарушения SOCE при СЦА известно немного. Основной предпосылкой, позволяющей предположить такие нарушения, является вовлеченность в патогенез многих СЦА такого важного регулятора SOCE, как рецептор IP_3 . Так, в обзоре Egorova et al. обобщены данные, демонстрирующие что СЦА 15/16 связана с мутацией в рецепторе IP_3 [87]. Для мышинной модели СЦА1, относящейся к классу полиглутаминовых заболеваний и связанной с мутацией в гене, кодирующем белок атаксин 1, также показано снижение уровня рецептора IP_3 [88]. Помимо этого, в данной модели отмечалась супрессия и других генов, связанных с кальциевой сигнализацией и SOCE, а именно генов, кодирующих кальциевую АТФ-азу SERCA2, ответственную за депонирование кальция в ЭР, участника фосфатидилинозитольного каскада инозитол-полифосфат-5-фосфатазу 1 и каналобразующую субъединицу SOC-каналов TRPC3 [88]. Таким образом, можно ожидать, что SOCE окажется подавлен в СЦА1 по сравнению с нормой. Напротив, для СЦА14 можно ожидать гиперфункционирование SOC-каналов, поскольку данный тип атаксии связан с мутацией в протеинкиназе $C\gamma$, которая в норме осуществляет негативную регуляцию TRPC3 посредством его фосфорилирования, а при СЦА14 теряет эту способность [89]. В целом именно TRPC3 (рис. 4) представляется одной из ключевых молекулярных детерминант, опосредующих нарушения кальциевого гомеостаза при атаксических состояниях, что подтверждается, в частности конститутивной активностью данных каналов в *Mwk* мышах (*moonwalker mice*), довольно точно воспроизводящих патологический фенотип, наблюдаемый при атаксиях, включая прогрессирующую гибель клеток Пуркинье [90].

Похожий на БХ механизм, приводящий к нарушениям SOCE, был отмечен и в другом полиглутаминовом заболевании — СЦА2: мутантный атаксин 2 в результате полиглутаминовой экспансии

начинает взаимодействовать с рецептором IP_3 1 типа, увеличивая его сродство к IP_3 , что нарушает депонирование кальция в ЭР [91]. Позднее на срезах мозжечка мышей, экспрессирующих мутантный атаксин 2 с длиной тракта 58 остатков глутамин, действительно было показано DHPG-индуцированное увеличение SOCE, а также уменьшение плотности дендритных шипиков по сравнению с образцами, полученными от мышей дикого типа [92]. Анализ данных иммуноблоттинга продемонстрировал значительное увеличение уровня активатора SOCE STIM1 в СЦА2-специфичных лизатах мозжечка, при этом уровень STIM2 оказался понижен в сравнении с нормой [92]. Молекулярный нокдаун *Stim1* с помощью малых интерферирующих РНК восстанавливал нормальную кальциевую сигнализацию и плотность шипиков, а также улучшал моторные функции в мышах, моделирующих СЦА2, предполагая ключевую роль STIM1 в патогенезе СЦА2 [92].

Среди нарушений SOCE при других нейродегенеративных патологиях можно отметить работу, демонстрирующую подавление SOCE в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y с сайленсингом гена *GDAP1*, ассоциированного с болезнью Шарко—Мари—Тута [93], а также исследования различных моделей бокового амиотрофического склероза (БАС). БАС имеет преимущественно спорадический характер, но в то же время мутации в генах, кодирующих супероксиддисмутазу 1 (SOD1), TAR ДНК-связывающий белок 43 и белок C9orf72, ассоциированы с наследственными формами заболевания [94–96]. Для БАС характерна избирательная гибель мотонейронов в моторном кортексе, стволе головного мозга и в спинном мозге [97–99]. Впервые увеличение SOCE при БАС было показано на модели первичной культуры астроцитов спинного мозга, выделенной из взрослых мышей, экспрессирующих SOD1 с мутацией G93A [100]. В основе повышения SOCE в астроцитах, моделирующих БАС, лежит вызванное мутацией в SOD1 увеличение такой посттрансляционной модификации STIM1, как глутатионилирование [100], что, в свою очередь, может приводить к потенцированию взаимодействия между STIM1 и Orai1, вызывая конститутивную активность SOC-каналов [101]. Позднее на той же модели первичной культуры астроцитов спинного мозга, выделенных из новорожденных мышат, экспрессирующих SOD1 G93A, было подтверждено увеличение SOCE, а также показано отсутствие изменений в экспрессии генов, кодирующих STIM1, STIM2 и белки семейства Orai, но при этом значимое снижение уровня кальциевой АТФ-азы SERCA2 [102]. Противоположные данные были получены на мотонейрон-подобных клетках

а Спинаocerebellарная атаксия 1-го типа



б Спинаocerebellарная атаксия 2-го типа



в Боковой амиотрофический склероз



Рис. 4. Основные тенденции изменений SOCE при СЦА1 (а), СЦА2 (б) и БАС (в), а также путей их коррекции. Черными стрелочками показаны изменения экспрессии генов, соответствующих обозначенным белкам.

мышы линии NSC-34, моделирующих симптомы БАС с помощью добавления твердых частиц ультрамелкого размера (менее 100 нм и менее 20 нм) [103]. В данном исследовании было продемонстрировано подавление SOCE и увеличение экспрессии SERCA2, SERCA3, рецепторов IP_3 и рианоина 3 типа [103]. Противоречивость и недостаточность накопленных данных открывают широкие перспективы для изучения БАС-ассоциированных нарушений SOCE, наибольший интерес среди которых, вероятно, будут представлять исследования, выполненные на пациент-специфичных мотонейронах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Связь множества нейродегенеративных патологий с нарушениями работы SOC-каналов открывает широкие перспективы использования компонентов SOCE в качестве молекулярных мишеней при разработке новых лекарств. Важными направлениями современной нейробиологии являются: расширение спектра физиологически релевантных пациент-специфичных моделей заболеваний, основанных на ИПСК, что позволит существенно сократить процент неудач при переходе

от фундаментальной науки к доклиническим и клиническим исследованиям, разработка систем направленной доставки лекарств, учитывающих нейрональную специфичность нарушений кальциевой сигнализации и выявление маркеров, способных обеспечить таргетность такой доставки, а также поиск селективных модуляторов кальциевой сигнализации и, в частности, SOC-каналов, что будет способствовать переходу от симптоматической терапии к новым высокоспецифичным подходам к лечению конкретных заболеваний. В контексте SOCE данный поиск означает необходимость обнаружения блокаторов, способных селективно воздействовать на SOC-каналы, активируемые белками STIM1 либо STIM2, а также способных избирательно блокировать вход кальция через каналы TRPC различного субъединичного состава. Приведенные в обзоре данные недвусмысленно демонстрируют важность SOCE в нейрональной кальциевой сигнализации и необходимости разработки путей генетической и фармакологической коррекции функционирования SOC-каналов.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00218 (ВВ) и грант № 23-44-00054 (ЕК)).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья является обзорной и не содержит первичного описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bootman M.D. 2012. Calcium signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4** (7), a011171.
2. Putney J.W.Jr. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell calcium.* **7** (1), 1–12.
3. Hoth M., Penner R. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature.* **355** (6358), 353–356.
4. Liou J., Kim M.L., Heo W.D., Jones J.T., Myers J.W., Ferrell J.E. Jr., Meyer T. 2005. STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Curr. Biol.* **15** (13), 1235–1241.
5. Roos J., DiGregorio P.J., Yeromin A.V., Ohlsen K., Lioudyno M., Zhang S., Safrina O., Kozak J.A., Wagner S.L., Cahalan M.D., Velicelebi G., Stauderman K.A. 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *J. Cell. Biol.* **169** (3), 435–445.
6. Feske S., Gwack Y., Prakriya M., Srikanth S., Puppel S.H., Tanasa B., Hogan P.G., Lewis R.S., Daly M., Rao A. 2006. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature.* **441** (7090), 179–185.
7. Vig M., Peinelt C., Beck A., Koomoa D.L., Rabah D., Koblan-Huberson M., Kraft S., Turner H., Fleig A., Penner R., Kinet J.P. 2006. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca^{2+} entry. *Science.* **312** (5777), 1220–1223.
8. Hou X., Pedi L., Diver M.M., Long S.B. 2012. Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science.* **338** (6112), 1308–1313.
9. Hofmann T., Obukhov A.G., Schaefer, M., Harteneck C., Gudermann T., Schultz G. 1999. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature.* **397** (6716), 259–263.
10. Ambudkar I.S., Ong H.L. 2007. Organization and function of TRPC channelosomes. *Pflugers Arch.* **455** (2), 187–200.
11. Putney J.W. 2017. Store-operated calcium entry: An historical overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* **981**, 205–214.
12. Garaschuk O., Yaari Y., Konnerth A. 1997. Release and sequestration of calcium by ryanodine-sensitive stores in rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* **502** (Pt 1), 13–30.
13. Sakaki Y., Sugioka M., Fukuda Y., Yamashita M. 1997. Capacitative Ca^{2+} influx in the neural retina of chick embryo. *J. Neurobiol.* **32** (1), 62–68.
14. Antaramián A., Butanda-Ochoa A., Vázquez-Martínez O., Díaz-Muñoz M., Vaca L. 2001. Functional expression of recombinant type 1 ryanodine receptor in insect cells. *Cell calcium.* **30** (1), 9–17.
15. Putney J.W. Jr. 2003. Capacitative calcium entry in the nervous system. *Cell calcium.* **34** (4–5), 339–344.
16. Uehara A., Yasukochi M., Imanaga I., Nishi M., Takeshima H. 2002. Store-operated Ca^{2+} entry uncoupled with ryanodine receptor and junctional membrane complex in heart muscle cells. *Cell calcium.* **31** (2), 89–96.
17. Gusev K.O., Vigont V.V., Grekhnev D.A., Shalygin A.V., Glushankova L.N., Kaznacheeva E.V. 2019. Store-operated calcium entry in mouse cardiomyocytes. *Bull. Exp. Biol. Med.* **167** (3), 311–314.
18. Wasilewska I., Gupta R.K., Wojtaś B., Palchevska O., Kuźnicki J. 2020. *stim2b* Knockout induces hyperactivity and susceptibility to seizures in zebrafish larvae. *Cells.* **9** (5), 1285.
19. Dyrda A., Kuznicki J., Majewski L. 2021. Annexin A3: A newly identified player in store-operated calcium entry. *Acta Neurobiol. Exp.* **81** (4), 307–313.
20. Feske S. 2010. CRAC channelopathies. *Pflugers Arch.* **460** (2), 417–435.
21. Ruhle B., Trebak M. 2013. Emerging roles for native Orai Ca^{2+} channels in cardiovascular disease. *Curr. Top. Membr.* **71**, 209–235.

22. Khachaturian Z.S. 1994. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **747**, 1–11.
23. Bezprozvanny I., Hayden M.R. 2004. Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322** (4), 1310–1317.
24. Bezprozvanny I. 2009. Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol. Med.* **15** (3), 89–100.
25. Bojarski L., Pomorski P., Szybinska A., Drab M., Skibinska-Kijek A., Gruszczynska-Biegala J., Kuznicki J. 2009. Presenilin-dependent expression of STIM proteins and dysregulation of capacitative Ca^{2+} entry in familial Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1793** (6), 1050–1057.
26. Sun S., Zhang H., Liu J., Popugaeva E., Xu N.J., Feske S., White C.L. 3rd, Bezprozvanny I. 2014. Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice. *Neuron.* **82** (1), 79–93.
27. Zhang H., Sun S., Wu L., Pchitskaya E., Zakharova O., Fon Tacer K., Bezprozvanny I. 2016. Store-operated calcium channel complex in postsynaptic spines: A new therapeutic target for Alzheimer's disease treatment. *J. Neurosci.* **36** (47), 11837–11850.
28. Tong B.C., Lee C.S., Cheng W.H., Lai K.O., Foscett J.K., Cheung, K.H. 2016. Familial Alzheimer's disease-associated presenilin 1 mutants promote γ -secretase cleavage of STIM1 to impair store-operated Ca^{2+} entry. *Sci. Signal.* **9** (444), ra89.
29. Poejo J., Orantos-Aguilera Y., Martin-Romero F.J., Mata A.M., Gutierrez-Merino C. 2022. Internalized amyloid- β (1–42) peptide inhibits the store-operated calcium entry in HT-22 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **23** (20), 12678.
30. Popugaeva E., Pchitskaya E., Speshilova A., Alexandrov S., Zhang H., Vlasova O., Bezprozvanny I. 2015. STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity. *Mol. Neurodegener.* **10**, 37.
31. Zhang H., Wu L., Pchitskaya E., Zakharova O., Saito T., Saido T., Bezprozvanny I. 2015. Neuronal store-operated calcium entry and mushroom spine loss in amyloid precursor protein knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **35** (39), 13275–13286.
32. McLarnon J.G. 2020. Microglial Store-operated calcium signaling in health and in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **17** (12), 1057–1064.
33. Popugaeva E., Pchitskaya E., Bezprozvanny I. 2017. Dysregulation of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease - A therapeutic opportunity? *Biochem. Biophys. Res Commun.* **483** (4), 998–1004.
34. Picón-Pagès P., Fanlo-Ucar H., Herrera-Fernández V., Ausellé-Bosch S., Galera-López L., Gutiérrez D.A., Ozaita A., Álvarez A.R., Oliva B., Muñoz F.J. 2022. Amyloid β -peptide causes the permanent activation of CaMKII α through its oxidation. *Int. J. Mol. Sci.* **23** (23), 15169.
35. Fujii Y., Shiota M., Ohkawa Y., Baba A., Wanibuchi H., Kinashi T., Kurosaki T., Baba Y. 2012. Surf4 modulates STIM1-dependent calcium entry. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **422** (4), 615–620.
36. Hunanyan L., Ghamaryan V., Makichyan A., Popugaeva E. 2021. Computer-based drug design of positive modulators of store-operated calcium channels to prevent synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (24), 13618.
37. Scremin E., Agostini M., Leparulo A., Pozzan T., Grotti E., Fasolato C. 2020. *ORAI2* Down-regulation potentiates SOCE and decreases A β 42 accumulation in human neuroglioma cells. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (15), 5288.
38. Ryazantseva M., Goncharova A., Skobeleva K., Erokhin M., Methner A., Georgiev P., Kaznacheyeva E. 2018. Presenilin-1 Δ E9 mutant induces STIM1-driven store-operated calcium channel hyperactivation in hippocampal neurons. *Mol. Neurobiol.* **55** (6), 4667–4680.
39. Ryazantseva M., Skobeleva K., Glushankova L., Kaznacheyeva E. 2016. Attenuated presenilin-1 endoproteolysis enhances store-operated calcium currents in neuronal cells. *J. Neurochem.* **136** (5), 1085–1095.
40. Skobeleva K., Shalygin A., Mikhaylova E., Guzhovala I., Ryazantseva M., Kaznacheyeva E. 2022. The STIM1/2-regulated calcium homeostasis is impaired in hippocampal neurons of the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **23** (23), 14810.
41. Ryazantseva M., Skobeleva K., Kaznacheyeva E. 2013. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutation M146V affects store-operated calcium entry: Does gain look like loss? *Biochimie.* **95** (7), 1506–1509.
42. Post B., van den Heuvel L., van Prooije T., van Ruisen X., van de Warrenburg B., Nonnekes J. 2020. Young onset Parkinson's disease: A modern and tailored Approach. *J. Parkinsons Dis.* **10** (s1), S29–S36.
43. Ali K., Morris H.R. 2015. Parkinson's disease: Chameleons and mimics. *Pract. Neurol.* **15** (1), 14–25.
44. Secondo A., Bagetta G., Amantea D. 2018. On the role of store-operated calcium entry in acute and chronic neurodegenerative diseases. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 87.
45. Tabata Y., Imaizumi Y., Sugawara M., Andoh-Noda T., Banno S., Chai M., Sone T., Yamazaki K., Ito M., Tsukahara K., Saya H., Hattori N., Kohyama J., Okano H. 2018. T-type calcium channels determine the vulnerability of dopaminergic neurons to mitochondrial stress in familial Parkinson disease. *Stem Cell Reports.* **11** (5), 1171–1184.
46. Wegierski T., Kuznicki J. 2018. Neuronal calcium signaling via store-operated channels in health and disease. *Cell Calcium.* **74**, 102–111.
47. Korecka J.A., Talbot S., Osborn T.M., de Leeuw S.M., Levy S.A., Ferrari E.J., Moskites A., Atkinson E., Jodelka F.M., Hinrich A.J., Hastings M.L., Woolf C.J., Hallett P.J., Isacson O. 2019. Neurite collapse and

- altered ER Ca^{2+} control in human Parkinson disease patient iPSC-derived neurons with LRRK2 G2019S mutation. *Stem Cell Reports*. **12** (1), 29–41.
48. Kim J.W., Yin X., Jhaldiyal A., Khan M.R., Martin I., Xie Z., Perez-Rosello T., Kumar M., Abalde-Atristain L., Xu J., Chen L., Eacker S.M., Surmeier D.J., Ingolia N.T., Dawson T.M., Dawson V.L. 2020. Defects in mRNA translation in LRRK2-mutant hiPSC-derived dopaminergic neurons lead to dysregulated calcium homeostasis. *Cell Stem Cell*. **27** (4), 633–645.e7.
 49. Lebedeva O.S., Sharova E.I., Grekhnev D.A., Skorodumova L.O., Kopylova I.V., Vassina E.M., Oshkolo-va A., Novikova I.V., Krisanova A.V., Olekhovich E.I., Vigont V.A., Kaznacheyeva E.V., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A. 2023. An efficient 2D potocol for differentiation of iPSCs into mature postmitotic dopaminergic neurons: Application for modeling Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **24** (8), 7297.
 50. Bollimuntha S., Singh B.B., Shavali S., Sharma S.K., Ebadi M. 2005. TRPC1-mediated inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion neurotoxicity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *The J. Biol. Chem.* **280** (3), 2132–2140.
 51. Selvaraj S., Sun Y., Watt J.A., Wang S., Lei S., Birnbaumer L., Singh B.B. 2012. Neurotoxin-induced ER stress in mouse dopaminergic neurons involves down-regulation of TRPC1 and inhibition of AKT/mTOR signaling. *J. Clin. Invest.* **122** (4), 1354–1367.
 52. Sukumaran P., Sun Y., Antonson N., Singh B.B. 2018. Dopaminergic neurotoxins induce cell death by attenuating NF- κ B-mediated regulation of TRPC1 expression and autophagy. *FASEB J.* **32** (3), 1640–1652.
 53. Sun Y., Zhang H., Selvaraj S., Sukumaran P., Lei S., Birnbaumer L., Singh B.B. 2017. Inhibition of L-type Ca^{2+} channels by TRPC1-STIM1 complex is essential for the protection of dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* **37** (12), 3364–3377.
 54. Sun Y., Selvaraj S., Pandey S., Humphrey K.M., Foster J.D., Wu M., Watt J.A., Singh B.B., Ohm J.E. 2018. MPP⁺ decreases store-operated calcium entry and TRPC1 expression in mesenchymal stem cell derived dopaminergic neurons. *Sci. Rep.* **8** (1), 11715.
 55. Chen T., Zhu J., Zhang C., Huo K., Fei Z., Jiang X.F. 2013. Protective effects of SKF-96365, a non-specific inhibitor of SOCE, against MPP⁺-induced cytotoxicity in PC12 cells: Potential role of Homer1. *PloS One*. **8** (1), e55601.
 56. Li X., Chen W., Zhang L., Liu W.B., Fei Z. 2013. Inhibition of store-operated calcium entry attenuates MPP⁺-induced oxidative stress via preservation of mitochondrial function in PC12 cells: Involvement of Homer1a. *PloS One*. **8** (12), e83638.
 57. Li B., Xiao L., Wang Z.Y., Zheng P.S. 2014. Knockdown of STIM1 inhibits 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress through attenuating calcium-dependent ER stress and mitochondrial dysfunction in undifferentiated PC12 cells. *Free Radic. Res.* **48** (7), 758–768.
 58. Liu Z.Z., Liu X.N., Fan R.C., Jia Y.P., Zhang Q.K., Gao X.Q., Wang Y.Q., Yang M.Q., Ji L.Z., Zhou Y.Q., Li H.L., Li P., Tang B. 2021. Identification of pimavanserin tartrate as a potent Ca^{2+} -calcineurin-NFAT pathway inhibitor for glioblastoma therapy. *Acta Pharmacol. Sin.* **42** (11), 1860–1874.
 59. Zhou Q., Yen A., Rymarczyk G., Asai H., Trengrove C., Aziz N., Kirber M.T., Mostoslavsky G., Ikezu T., Wolozin B., Bolotina V.M. 2016. Impairment of PARK14-dependent Ca^{2+} signalling is a novel determinant of Parkinson's disease. *Nat. Commun.* **7**, 10332.
 60. Raj A., Banerjee R., Santhoshkumar R., Sagar C., Datta I. 2023. Presence of extracellular alpha-synuclein aggregates trigger astrocytic degeneration through enhanced membrane rigidity and deregulation of store-operated calcium entry (SOCE) into the endoplasmic reticulum. *Mol. Neurobiol.* **60** (9), 5309–5329.
 61. Pani B., Singh B.B. 2009. Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell Calcium*. **45** (6), 625–633.
 62. Illarioshkin S.N., Igarashi S., Onodera O., Markova E.D., Nikolskaya N.N., Tanaka H., Chabrashwili T.Z., Insarova N.G., Endo K., Ivanova-Smolenskaya I.A. 1994. Trinucleotide repeat length and rate of progression of Huntington's disease. *Ann. Neurol.* **36** (4), 630–635.
 63. Vonsattel J.P., DiFiglia M. 1998. Huntington disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **57** (5), 369–384.
 64. Bates G.P., Dorsey R., Gusella J.F., Hayden M.R., Kay C., Leavitt B.R., Nance M., Ross C.A., Scahill R. I., Wetzel R., Wild E. J., Tabrizi S.J. 2015. Huntington Disease. *Nat. Rev. Dis. Primers*. **1**, 15005.
 65. Quigley J. 2017. Juvenile Huntington's disease: Diagnostic and treatment considerations for the psychiatrist. *Curr. Psychiatry Rep.* **19** (2), 9.
 66. Ross C.A. 2002. Polyglutamine pathogenesis: Emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron*. **35** (5), 819–822.
 67. Pchitskaya E., Popugaeva E., Bezprozvanny I. 2018. Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases. *Cell Calcium*. **70**, 87–94.
 68. Tang T.S., Tu H., Chan E.Y., Maximov A., Wang Z., Wellington C.L., Hayden M.R., Bezprozvanny I. 2003. Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1. *Neuron*. **39** (2), 227–239.
 69. Wu J., Shih H.P., Vigont V., Hrdlicka L., Diggins L., Singh C., Mahoney M., Chesworth R., Shapiro G., Zimina O., Chen X., Wu Q., Glushankova L., Ahljanian M., Koenig G., Mozhayeva G.N., Kaznacheyeva E., Bezprozvanny I. 2011. Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel

- therapeutic target for Huntington's disease treatment. *Chem. Biol.* **18** (6), 777–793.
70. Vigont V.A., Zimina O.A., Glushankova L.N., Kolobkova J.A., Ryazantseva M.A., Mozhayeva G.N., Kaznacheyeva E.V. 2014. STIM1 Protein activates store-operated calcium channels in cellular model of Huntington's disease. *Acta Naturae.* **6** (4), 40–47.
 71. Vigont V., Kolobkova Y., Skopin A., Zimina O., Zenin V., Glushankova L., Kaznacheyeva E. 2015. Both Orail and TRPC1 are involved in excessive store-operated calcium entry in striatal neurons expressing mutant Huntingtin exon 1. *Front Physiol.* **6**, 337.
 72. Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A., Lebedeva O.S., Vassina E.M., Bogomazova A.N., Chestkov I.V., Semashko T.A., Kiseleva E., Suldina L.A., Bobrovsky P.A., Zimina O.A., Ryazantseva M.A., Skopin A.Y., Illarioshkin S.N., Kaznacheyeva E.V., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. 2016. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Mol. Neurodegener.* **11**, 27.
 73. Vigont V.A., Grekhnev D.A., Lebedeva O.S., Gusev K.O., Volovikov E.A., Skopin A.Y., Bogomazova A.N., Shuvalova L.D., Zubkova O.A., Khomyakova E.A., Glushankova L.N., Klyushnikov S.A., Illarioshkin S.N., Lagarkova M.A., Kaznacheyeva E.V. 2021. STIM2 mediates excessive store-operated calcium entry in patient-specific iPSC-derived neurons modeling a juvenile form of Huntington's disease. *Front. Cell. Dev. Biol.* **9**, 625231.
 74. Czeredys M., Vigont V.A., Boeva V.A., Mikoshiba K., Kaznacheyeva E.V., Kuznicki J. 2018. Huntingtin-associated protein 1A regulates store-operated calcium entry in medium spiny neurons from transgenic YAC128 mice, a model of Huntington's disease. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 381.
 75. Chivet M., McCluskey M., Nicot A.S., Brocard J., Beaufils M., Giovannini D., Giannesini B., Poreau B., Brocard J., Humbert S., Saudou F., Fauré J., Marty I. 2023. Huntingtin regulates calcium fluxes in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **155** (1), e202213103.
 76. Wu J., Ryskamp D., Birnbaumer L., Bezprozvanny I. 2018. Inhibition of TRPC1-dependent store-operated calcium entry improves synaptic stability and motor performance in a mouse model of Huntington's disease. *J. Huntingtons Dis.* **7** (1), 35–50.
 77. Wu J., Ryskamp D.A., Liang X., Egorova P., Zakharova O., Hung G., Bezprozvanny I. 2016. Enhanced store-operated calcium entry leads to striatal synaptic loss in a Huntington's disease mouse model. *J. Neurosci.* **36** (1), 125–141.
 78. Vigont V., Nekrasov E., Shalygin A., Gusev K., Klushnikov S., Illarioshkin S., Lagarkova M., Kiselev S.L., Kaznacheyeva E. 2018. Patient-specific iPSC-based models of Huntington's disease as a tool to study store-operated calcium entry drug targeting. *Front. Pharmacol.* **9**, 696.
 79. Tobe M., Isobe Y., Tomizawa H., Nagasaki T., Takahashi H., Hayashi H. 2003. A novel structural class of potent inhibitors of NF- κ B activation: Structure-activity relationships and biological effects of 6-aminoquinazoline derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 3869–3878.
 80. Czeredys M., Maciag F., Methner A., Kuznicki J. 2017. Tetrahydrocarbazoles decrease elevated SOCE in medium spiny neurons from transgenic YAC128 mice, a model of Huntington's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **483**, 1194–1205.
 81. Grekhnev D.A., Novikova I.V., Krisanova A.V., Yuskovets V.N., Chernov N.M., Yakovlev I.P., Kaznacheyeva E.V., Vigont V.A. 2022. Dithiadiazole derivative 3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-3H-1,2,3,4-dithiadiazole-2-oxide - Novel modulator of store-operated calcium entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **626**, 38–43.
 82. Novikova I.V., Grekhnev D.A., Oshkolova A., Nomerovskaya M.A., Kolesnikov D.O., Krisanova A.V., Yuskovets V.N., Chernov N.M., Yakovlev I.P., Kaznacheyeva E.V., Vigont V.A. 2024. 1,2,3,4-dithiadiazole derivatives as a novel class of calcium signaling modulators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **691**, 149333.
 83. Cabrita I., Benedetto R., Fonseca A., Wanitchakool P., Sirianant L., Skryabin B.V., Schenk L.K., Pavenstädt H., Schreiber R., Kunzelmann K. 2017. Differential effects of anoctamins on intracellular calcium signals. *FASEB J.* **31** (5), 2123–2134.
 84. Sullivan R., Yau W.Y., O'Connor E., Houlden H. 2019. Spinocerebellar ataxia: An update. *J. Neurol.* **266** (2), 533–544.
 85. De Mattei F., Ferrandes F., Gallone S., Canosa A., Calvo A., Chiò A., Vasta R. 2023. Epidemiology of spinocerebellar ataxias in Europe. *Cerebellum*. 10.1007/s12311-023-01600-x. Advance online publication.
 86. Mark M.D., Schwitalla J.C., Groemmke M., Herlitze S. 2017. Keeping our calcium in balance to maintain our balance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **483** (4), 1040–1050.
 87. Egorova P., Popugaeva E., Bezprozvanny I. 2015. Disturbed calcium signaling in spinocerebellar ataxias and Alzheimer's disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* **40**, 127–133.
 88. Lin X., Antalffy B., Kang D., Orr H.T., Zoghbi H.Y. 2000. Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. *Nat. Neurosci.* **3** (2), 157–163.
 89. Adachi N., Kobayashi T., Takahashi H., Kawasaki T., Shirai Y., Ueyama T., Matsuda T., Seki T., Sakai N., Saito N. 2008. Enzymological analysis of mutant protein kinase C γ causing spinocerebellar ataxia type 14 and dysfunction in Ca²⁺ homeostasis. *J. Biol. Chem.* **283** (28), 19854–19863.
 90. Becker E.B., Oliver P.L., Glitsch M.D., Banks G.T., Achilli F., Hardy A., Nolan P.M., Fisher E.M., Davies K.E. 2009. A point mutation in TRPC3 causes abnormal Purkinje cell development and cerebellar

- ataxia in moonwalker mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106** (16), 6706–6711.
91. Liu J., Tang T.S., Tu H., Nelson O., Herndon E., Huynh D.P., Pulst S.M., Bezprozvanny I. 2009. Deregulated calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 2. *J. Neurosci.* **29** (29), 9148–9162.
 92. Egorova P.A., Marinina K.S., Bezprozvanny I.B. 2023. Chronic suppression of STIM1-mediated calcium signaling in Purkinje cells rescues the cerebellar pathology in spinocerebellar ataxia type 2. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* **1870** (5), 119466.
 93. Pla-Martín D., Rueda C.B., Estela A., Sánchez-Piris M., González-Sánchez P., Traba J., de la Fuente S., Soriano L., Renau-Piqueras J., Alvarez J., Satrustegui J., Palau F. 2013. Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene *GDAP1* induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca^{2+} homeostasis by reducing store-operated Ca^{2+} entry. *Neurobiol. Dis.* **55**, 140–151.
 94. Rosen D.R., Siddique T., Patterson D., Figlewicz D.A., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., Goto J., O'Regan J.P., Deng H.X. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*. **362** (6415), 59–62.
 95. DeJesus-Hernandez M., Mackenzie I.R., Boeve B.F., Boxer A.L., Baker M., Rutherford N.J., Nicholson A.M., Finch N.A., Flynn H., Adamson J., Kouri N., Wojtas A., Sengdy P., Hsiung G.Y., Karydas A., Seeley W.W., Josephs K.A., Coppola G., Geschwind D.H., Wszolek Z.K., Feldman H., Knopman D.S., Petersen R.C., Miller B.L., Dickson D.W., Boylan K.B., Graff-Radford N.R., Rademakers R. 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of *C9ORF72* causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. **72** (2), 245–256.
 96. Renton A.E., Majounie E., Waite A., Simón-Sánchez J., Rollinson S., Gibbs J.R., Schymick J.C., Laaksovirta H., van Swieten J.C., Myllykangas L., Kalimo H., Pae-tau A., Abramzon Y., Remes A.M., Kaganovich A., Scholz S.W., Duckworth J., Ding J., Harmer D.W., Hernandez D.G., et al. 2011. A hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72* is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. **72** (2), 257–268.
 97. Cleveland D.W., Rothstein J.D. 2001. From Charcot to Lou Gehrig: Deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* **2** (11), 806–819.
 98. Taylor J.P., Brown R.H. Jr., Cleveland D.W. 2016. Decoding ALS: From genes to mechanism. *Nature*. **539** (7628), 197–206.
 99. van Es M.A., Hardiman O., Chio A., Al-Chalabi A., Pasterkamp R.J., Veldink J.H., van den Berg L.H. 2017. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*. **390** (10107), 2084–2098.
 100. Kawamata H., Ng S.K., Diaz N., Burstein S., Morel L., Osgood A., Sider B., Higashimori H., Haydon P.G., Manfredi G., Yang Y. 2014. Abnormal intracellular calcium signaling and SNARE-dependent exocytosis contributes to SOD1G93A astrocyte-mediated toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* **34** (6), 2331–2348.
 101. Hawkins B.J., Irrinki K.M., Mallilankaraman K., Lien Y.C., Wang Y., Bhanumathy C.D., Subbiah R., Ritchie M.F., Soboloff J., Baba Y., Kurosaki T., Joseph S.K., Gill D.L., Madesh M. 2010. S-glutathionylation activates STIM1 and alters mitochondrial homeostasis. *J. Cell Biol.* **190**, 391–405.
 102. Norante R.P., Peggion C., Rossi D., Martorana F., De Mario A., Lia A., Massimino M.L., Bertoli A. 2019. ALS-Associated SOD1(G93A) Decreases SERCA pump levels and increases store-operated Ca^{2+} entry in primary spinal cord astrocytes from a transgenic mouse model. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (20), 5151.
 103. Sapienza S., Tedeschi V., Apicella B., Pannaccione A., Russo C., Sisalli M.J., Magliocca G., Loffredo S., Secondo A. 2024. Ultrafine particulate matter pollution and dysfunction of endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: A pathomechanism shared with amyotrophic lateral sclerosis motor neurons? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **273**, 116104.

Alterations In Store-Operated Calcium Entry in Neurodegenerative Pathologies: History, Facts, Perspectives

© 2024 г. V. A. Vigont¹, E. V. Kaznacheyeva^{1, *}

¹Institute of cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

*e-mail: evkazn@incras.ru

Neurodegenerative disorders, along with cardiovascular and oncological pathologies, are one of the most actual issues facing modern medicine. Therefore, the study of the molecular mechanisms of their pathogenesis and the search for new drug targets is highly demanded. Neuronal calcium signalling has

attracted close attention, as altered calcium homeostasis has been demonstrated in the pathogenesis of various neurodegenerative diseases. In this review, we focus on one of the most ubiquitous and important pathways for calcium uptake: store-operated calcium entry. Here we describe studies demonstrating disturbances in store-operated calcium entry in various neurodegenerative pathologies, including Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases. Also, we analyse the molecular determinants underlying these disturbances and propose ways for pharmacological correction of altered calcium signaling. The information summarized in the review will allow us to consider store-operated calcium channels as promising targets for the drug development in order to treat neurodegenerative pathologies and outline further promising directions for the investigation.

Keywords: Neurodegeneration, calcium, store-operated calcium entry Huntington's disease, Parkinson's disease, Alzheimer's disease

УДК 577.25

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИОННЫХ КАНАЛОВ: ДОСТИЖЕНИЯ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2024 г. Б. С. Жоров^{a, b}, Д. Б. Тихонов^{a, *}

^aИнститут эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223 Россия

^bОтдел биохимии и биомедицинских наук, Университет МакМастер, Гамильтон, Канада

*e-mail: denistikhonov2002@yahoo.com

Поступила в редакцию 26.03.2024

После доработки 07.05.2024

Принята к печати 08.05.2024

Семейство мембранных белков, известное как P-лоор-каналы, включает в себя калиевые, натриевые и кальциевые каналы, а также TRP-каналы и ионотропные глутаматные рецепторы. Быстро растущее число кристаллических и криоэлектронных структур раскрывает как общие, так и специфические особенности этих каналов. В настоящее время твердо установлены основные принципы их укладки, расположение структурных сегментов, ключевые остатки, которые влияют на ионную селективность, активацию и сайты связывания токсинов и лигандов, имеющих отношение к медицине. Появление моделей AlphaFold2 представляет собой еще один важный шаг в компьютерном прогнозировании структур белков. Сравнение экспериментальных структур каналов P-лоор с соответствующими моделями показывает, что в экспериментально разрешенных областях наблюдаются согласованные закономерности укладки. Несмотря на этот значительный прогресс, многие структурные детали, особенно важные для прогнозирования результатов мутаций и разработки новых медицински значимых лигандов остаются нерешенными. Ряд методологических проблем в настоящее время препятствует прямой оценке таких деталей. Пока не произойдет следующего методологического прорыва, перспективный подход к более глубокому анализу структур ионных каналов предполагает интеграцию различных экспериментальных и теоретических методов.

Ключевые слова: ионные каналы, рентгеновские структуры, криоэлектронные структуры, компьютерные модели

DOI: 10.31857/S0233475524050033, **EDN:** cbwmyt

ВВЕДЕНИЕ

Ионные каналы — это трансмембранные белки, которые образуют водные поры и позволяют ионам проходить через мембрану в соответствии с электрохимическим градиентом. Они участвуют в реализации многих физиологических функций особенно в возбудимых клетках. Перенос ионов по каналам происходит с очень высокой скоростью (более миллиона ионов в секунду). В результате они опосредуют большинство быстрых нейрофизиологических процессов, таких как установление мембранного потенциала покоя, генерация и формирование потенциалов действия, синаптическое высвобождение нейромедиаторов, постсинаптические реакции, сокращение мышц, доставка кальция и т.д. Многочисленные токсины, вырабатываемые пауками, скорпионами,

змеями, рыбами, пчелами, морскими улитками и другими организмами, имеют своими мишенями ионные каналы. В медицине ионные каналы являются одними из наиболее важных мишеней для фармакологического воздействия. Многие запрещенные препараты также воздействуют на ионные каналы. Множественные наследственные (генетические) нарушения, которые называются каналопатиями, связаны с мутациями в генах ионных каналов, а также в белках (субъединицах), которые регулируют эти каналы. Дисфункции ионных каналов имеют катастрофические последствия для организма.

КЛАССИФИКАЦИЯ ИОННЫХ КАНАЛОВ

Традиционно ионные каналы классифицируются по типу управляющих воздействий

(потенциал-зависимые, лиганд-зависимые) или по типу проникающих ионов (натриевые, кальциевые, калиевые, хлорные). Однако некоторые каналы проводят различные ионные токи. Например, NMDA-рецепторы, являющиеся подтипом ионотропных глутаматных рецепторов, проницаемы для ионов натрия, калия и кальция. Они играют важнейшую роль в синаптической передаче и пластичности центральной нервной системы. Рецепторы P2X представляют собой лиганд-зависимые ионные каналы, которые активируются внеклеточным АТР и проницаемы для натрия, калия и кальция [1]. Каналы TRP образуют разнообразное семейство, поры которых проницаемы для различных катионов, включая кальций, натрий и магний. Они участвуют в сенсорной трансдукции и регуляции внутриклеточной кальциевой сигнализации [2]. Некоторые каналы регулируются несколькими механизмами. Так, каналы TRPV1 активируются множеством раздражителей, включая температуру ($> 43^{\circ}\text{C}$), протоны (низкий pH) и различные эндогенные и экзогенные лиганды, такие как капсаицин [3]. Каналы семейства ASIC активируются изменениями внеклеточного pH или другими факторами, такими как механические раздражители и определенные липидные молекулы [4]. Калиевые каналы большой проводимости регулируются как изменениями мембранного потенциала, так и внутриклеточной концентрацией кальция [5].

В целом, классификации, основанные на функциональных характеристиках, обычно не коррелируют со структурной организацией и эволюцией этих белков, поскольку структурно сходные гомологичные каналы часто демонстрируют различные функциональные свойства, и наоборот, сходные свойства часто наблюдаются у структурно отличающихся каналов, например, у пентамерных никотиновых рецепторов ацетилхолина и тетрамерных ионотропных рецепторов глутамата. Никотиновые рецепторы ацетилхолина структурно схожи с ГАМК_A-рецепторами, в то время как каналы глутаматных рецепторов структурно похожи на натриевые, калиевые и кальциевые каналы, управляемые потенциалом. За последние два десятилетия были достигнуты значительные успехи в структурных исследованиях ионных каналов. Однако было бы преждевременно утверждать, что наше понимание сложных взаимосвязей между структурой и функцией ионных каналов, особенно в отношении их взаимодействия с фармакологическими препаратами и токсинами, является полным.

В силу большой структурной изменчивости, наблюдаемой в различных типах ионных каналов, всесторонний обзор этой группы белков был бы не рациональным. В данной статье наше внимание

сосредоточено на значительном и разнообразном подмножестве ионных каналов, известных как каналы P-loop.

ТЕТРАМЕРНЫЕ P-LOOP-КАНАЛЫ

Тетрамерные P-loop-каналы выделяются среди различных семейств ионных каналов из-за их функционального и структурного разнообразия и значимости в физиологии, патофизиологии, фармакологии и токсикологии. Эта группа включает в себя потенциал- и лиганд-управляемые калиевые каналы, потенциал-управляемые натриевые и кальциевые каналы, TRP-каналы и ионотропные рецепторы глутамата [6–13]. Каналы P-loop бывают гомо- или гетеро-тетрамерами (рецепторы глутамата, TRP и калиевые каналы), псевдотетрамерами (кальциевые и натриевые каналы эукариот) и димерами димеров (двухпоровые каналы) [14]. В псевдотетрамерных каналах крупные порообразующие субъединицы образуют однополипептидную цепь из четырех гомологичных повторов. Фундаментальной структурной особенностью, общей для всех P-loop-каналов, является порообразующий домен, который включает внутреннюю (выстилающую пору) и внешнюю трансмембранные спирали, соединенные P-петлей. Концы четырех P-спиралей сходятся к оси пор, образуя сужение селективного фильтра. Ориентация P-петли в мембране не является консервативной: P-петли в глутаматных рецепторах входят в мембрану со стороны цитоплазмы, а в других типах P-петли входят в мембрану со стороны внеклеточного пространства [15, 16]. Механизмы активации каналов P-loop значительно различаются из-за отличительных структурных и функциональных характеристик доменов, управляющих активацией порообразующего домена [17–22]. Разнообразие топологии и доменной организации среди различных членов суперсемейства P-loop, как показано на рис. 1, сочетается с консервативным характером укладки в порообразующем домене. Субъединица тетрамерных потенциал-активируемых каналов содержит чувствительный к напряжению домен, состоящий из трансмембранных сегментов S1–S4, а также сегментов S5, S6 и P-петли, составляющих четверть порообразующего домена. Последний окружает центральную пору, в то время как потенциал-чувствительные домены расположены по периферии. Такая архитектура была обнаружена задолго до того, как стали доступны кристаллические структуры. Расположение активационных ворот в цитоплазматической части поры [23], расположение селективного фильтра на поворотах P-петли [24] и расположение по часовой стрелке

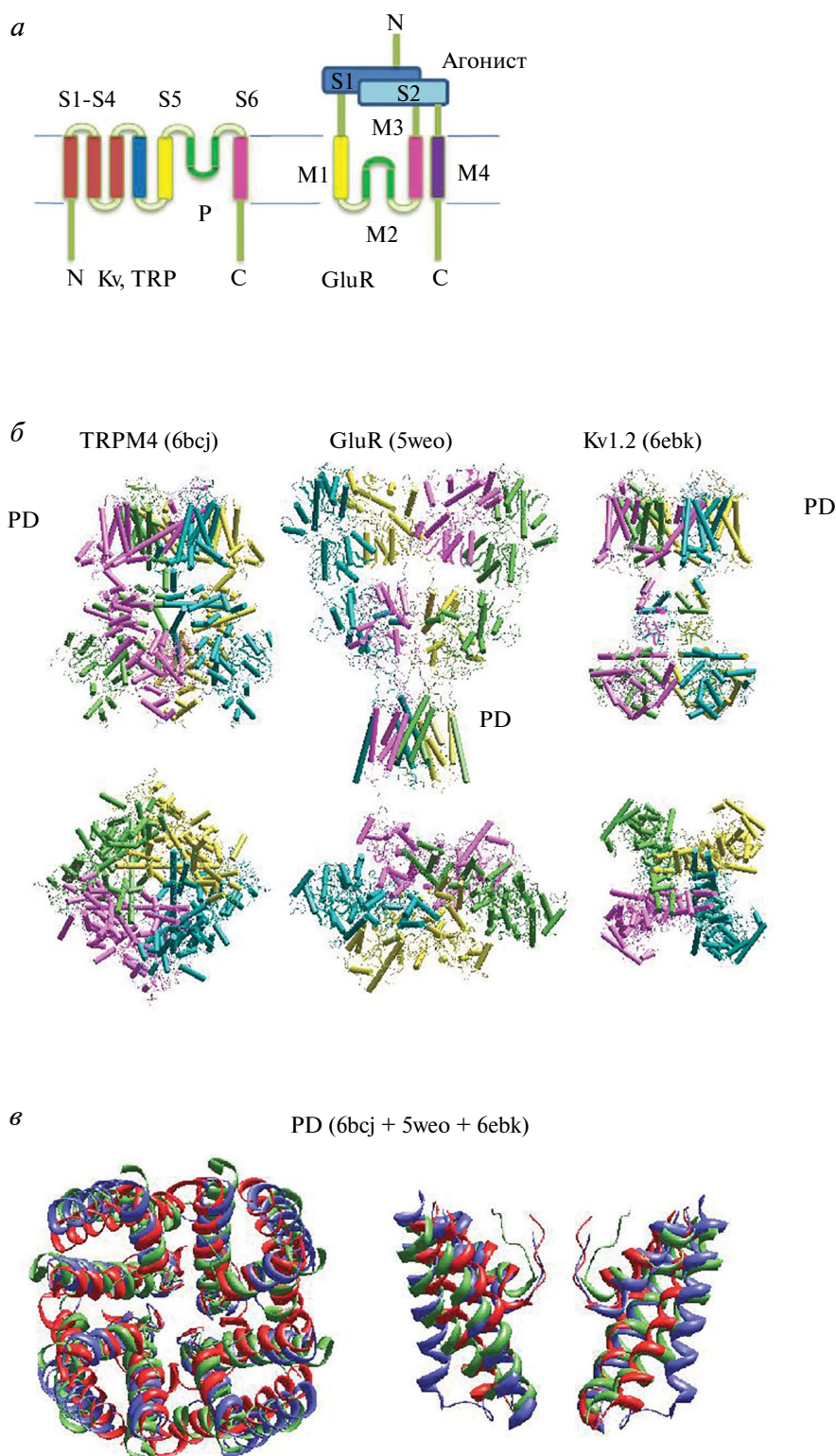


Рис. 1. Разнообразие структурной организации P-loop-каналов и консервативность их порообразующих доменов. *a* – Трансмембранная топология субъединицы TRP и 6-ТМ калиевого канала (K_v) отличается от топологии субъединицы глутаматного рецептора (GluR), включая противоположную ориентацию P-петли. *б* – Общая архитектура и доменная организация TRP, глутаматных рецепторов и 6-ТМ калиевых каналов совершенно различны. PD – порообразующий домен. *в* – Наложение порообразующих доменов показывает их высокое сходство. Структуры 6dm0, 6ebk и 6bcj показаны синим, красным и зеленым.

повторов I, II, III и IV в натриевых каналах [25] были выявлены с помощью различных экспериментальных методов, включая мутагенез, электрофизиологию и анализ воздействия специфических лигандов.

КРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ И КРИОЭЛЕКТРОННЫЕ СТРУКТУРЫ P-LOOP-КАНАЛОВ

Рентгеновская кристаллография произвела революцию в нашем понимании ионных каналов, поскольку до 1998 года не было данных об их структурах на атомарном уровне. Технические препятствия, в частности проблемы с кристаллизацией мембранных белков, препятствовали получению рентгеноструктурных данных. Таким образом, наши знания в значительной степени основывались на косвенных данных, таких как стехиометрия субъединиц, локализация сегментов, пронизывающих мембрану, и мутационный анализ остатков, влияющих на свойства каналов и их взаимодействия с лигандами. Компьютерные модели в доструктурную эпоху были ограниченными и спекулятивными, однако некоторые важные аспекты были успешно предсказаны [26]. Прорыв в решении проблемы нехватки структурных данных высокого разрешения произошел благодаря новаторской работе Родерика Маккиннона, который опубликовал первое рентгеноструктурное исследование калиевого канала бактерии [27]. Это достижение стало поворотным моментом, подготовившим почву для нескольких последовательных публикаций, разъясняющих тонкости архитектуры калиевых каналов. Коллективное признание значимости этих работ привело к присуждению Нобелевской премии в 2003 году.

Структурный анализ ионных каналов осложняется тем, что они имеют несколько функционально и структурно различных состояний, которые обычно подразделяются на закрытые, открытые и инактивированные (называемые «десенситизированными» в лиганд-управляемых каналах). Хотя многочисленные мутационные исследования, особенно с использованием метода цистеинового сканирования, показали, что сегменты S6 являются ключевым элементом воротного механизма, и раскрыли принципиальный механизм, управляющий активацией и инактивацией, структурное понимание этих различных состояний отсутствовало. Кристаллическая структура открытого кальций-зависимого калиевого канала MthK продемонстрировала, что при активации С-части внутренних спиралей, которые в закрытом состоянии образуют плотную связку, расходятся радиально и формируют

широкий «вестибюль» [28]. Несмотря на различную конфигурацию спиралей S6 в открытых состояниях MthK и в потенциал-управляемом Kv1.2, основной механизм активации остается неизменным. В обоих каналах раскрытие включает радиальное смещение и скручивание С-концевых частей спиралей за счет конформационных изменений в консервативных остатках глицина, играющих роль «активационного шарнира». Сравнение структур открытого канала Kv1.2 и закрытого бактериального канала MlotiK1, регулируемого циклическими нуклеотидами [29], выявило решающую роль линкерных спиралей S4–S5, образующих манжету вокруг пучка спиралей S6, что ограничивает их движение при активации. В дальнейшем было показано, что активационный механизм, характеризующийся расхождением внутренних спиралей, является общей чертой всех P-loop-каналов. Рис. 2 иллюстрирует ключевую особенность активационного механизма. N-части сегментов S6 остаются неизменными в разных состояниях, в то время как С-части перемещаются радиально.

Было показано, что область селективного фильтра канала KcsA также служит в качестве воротного механизма при медленной инактивации [30, 31]. Перестройки в области селективности фильтра, способные препятствовать потоку ионов, также наблюдались в других каналах, включая Nav1.4 [32], Cav1.2 [33], Kv7.1 [34], TRPV1 [35] и GluR [36].

К середине 2000-х годов был достигнут значительный прогресс в изучении нескольких ключевых структур P-loop-каналов. Однако для значительной части каналов структур высокого разрешения по-прежнему не имелось. Этот пробел в знаниях стимулировал использование гомологического моделирования. В этом теоретическом методе структура известного белка (шаблона) используется для построения модели другого родственного белка, структура которого точно неизвестна. Гомологическое моделирование сыграло важную роль в углублении понимания структуры ионных каналов. Кристаллические структуры гомотетрамерных калиевых каналов были использованы в качестве шаблонов для моделирования эукариотических натриевых, кальциевых каналов и каналов глутаматных рецепторов [37–44]. Сходство между калиевыми каналами и другими каналами часто служило основой для интерпретации экспериментальных данных (таких как мутационный анализ и действие фармакологических препаратов), даже в отсутствие гомологических моделей [45–47]. За последние два десятилетия были опубликованы экспериментальные структуры многих различных P-loop-каналов. Эти структуры подтвердили консервативность общей архитектуры различных

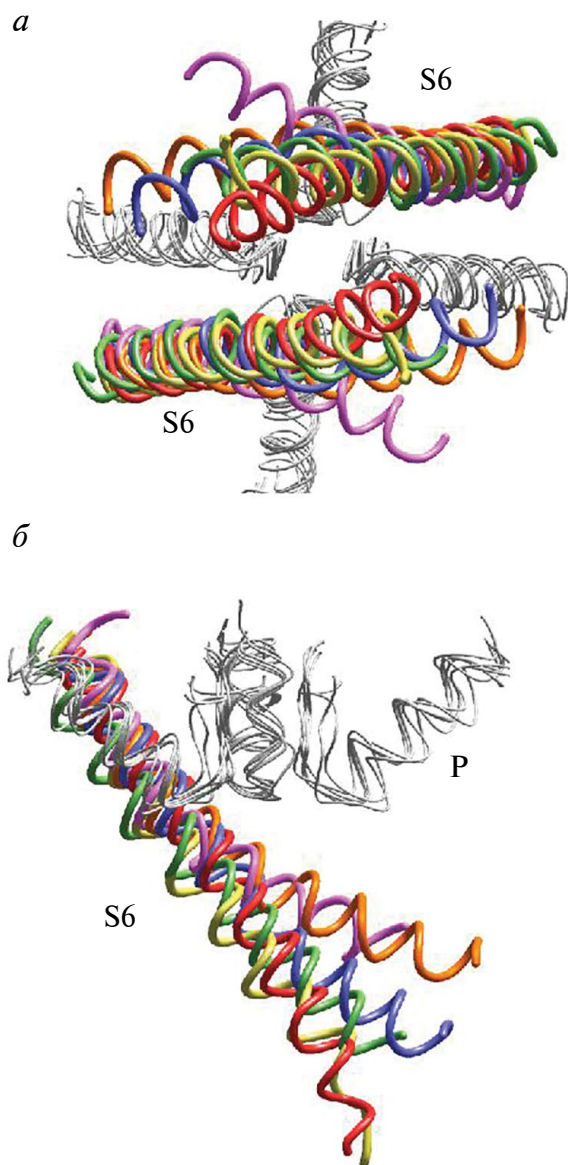


Рис. 2. Разнообразие активационных перестроек во внутренних спиралях. *а* — Вид в плоскости мембраны, *б* — боковая проекция. Закрытое состояние KcsA (1bl8) показано красным. В открытых состояниях MthK (1lnq), KvAP (1orq), AMPA-типа рецептора глутамата (5weo), Kv1.2 (2r9r) и TRPV6 (6bo8), внутренние спирали показаны фиолетовым, оранжевым, желтым, синим и зеленым соответственно.

каналов семейства. Несмотря на различия в функциональных свойствах, ионной селективности, конкретных активационных механизмах, длине и укладке внутри- и внеклеточных петель, было показано, что укладка и расположение сегментов в порообразующем домене высоко консервативны. Это общее структурное сходство наблюдается даже тогда, когда гомология последовательностей низкая и их выравнивание не очевидно.

Большинство экспериментальных структур дают потенциал-управляемые каналы в их энергетически выгодном состоянии, при этом порообразующий домен предположительно находится в инактивированном состоянии, а потенциал-чувствительный — в активированном [48]. Среди исключений — криоэлектронные структуры эукариотических натриевых каналов с открытыми порами [49] или потенциал-чувствительными доменами, которые становятся неактивными из-за белковых токсинов [50, 51]. Кристаллические структуры канала NavAB с дисульфидными мостиками, которые стабилизируют порообразующий домен в закрытом или открытом состояниях [52] или потенциал-чувствительный домен в деактивированном состоянии [53], служат важными шаблонами для моделирования эукариотических каналов в статистически малозаселенных, но функционально значимых состояниях. Эти структуры сыграли особенно важную роль в построении моделей каналов, имеющих отношение к медицине, таких как hCav1.2 и hNav1.5, в различных состояниях, выявлении зависящих от состояния взаимодействий с лигандами и в изучении структурных механизмов, лежащих в основе дисфункции различных вариантов каналов [54–56]. Доступность трехмерных структур открыла путь для вычислительных исследований важнейших проблем, которые в настоящее время не поддаются экспериментальному разрешению. Например, моделирование молекулярной динамики было использовано для изучения проникновения ионов через калиевые каналы [57–59]. В компьютерных исследованиях также изучалась ионная селективность калиевых [60–62] и натриевых каналов [63–66], заполняя критические пробелы в нашем понимании этих процессов.

Экспериментальные трехмерные структуры выявили не только общие черты, но и отличительные признаки различных каналов Р-типа, значительно улучшив наше понимание механизмов проникновения ионов, селективности, активации и чувствительности к фармакологическим препаратам и токсинам [8, 67–69]. В частности, в то время как Р-петля калиевых каналов содержит одну спираль (мембранно-нисходящая Р-спираль), натриевые и кальциевые каналы имеют Р-петли с двумя спиралями, разделенными областью селективного фильтра: мембранно-нисходящая Р1-спираль в N-концевой части и восходящая к поверхности мембраны спираль Р2. Кроме того, выяснилось, что зазоры между субъединицами в натриевых каналах заметно шире, чем в калиевых каналах. Это различие определяет возможность доступа низкомолекулярных лигандов в закрытые натриевые и кальциевые каналы.

Экспериментальные 3D-структуры привели к существенному пересмотру некоторых структурных концепций. Например, «шариковый» механизм, предложенный для быстрой инактивации потенциал-зависимых калиевых и натриевых каналов, предполагает участие инактивирующей частицы, попадающей в открытую пору из цитоплазматической области канала, чтобы физически преградить путь проникновения ионов [70–72]. Однако криоэлектронные структуры канала электрического угря Nav1.4 [73] и других эукариотических натриевых каналов показали, что частица быстрой инактивации (IFM- или LFM-мотив во внутриклеточном линкере между повторами III и IV) не блокирует пору. Она связывается в зазоре между спиралями S4–S5 и S6, удерживая последнее в конформации, соответствующей закрытому состоянию. Другой пример относится к трехмерным структурам каналов глутаматных рецепторов. Ранние рентгеновские структуры показали существенные различия с калиевыми каналами. Однако более поздние исследования с использованием усовершенствованных экспериментальных методов продемонстрировали высокую степень сходства между этими подсемействами P-loop-каналов [74].

СТРУКТУРЫ P-LOOP-КАНАЛОВ С ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ И ТОКСИНАМИ

Каналы семейства P-loop являются мишенями для широкого спектра природных токсинов, средств медицинского назначения, как легальных, так и запрещенных [75, 76], а также инсектицидов [77]. Сайты связывания и механизмы действия лигандов каналов очень разнообразны (рис. 3). Теоретические и экспериментальные исследования значительно продвинули наше понимание того, как ионные каналы реагируют на различные лиганды. До появления экспериментальных структур комплексов лиганд–канал исследователи полагались на гомологические модели, основанные на кристаллических структурах калиевых каналов, и компьютерные методы докинга лигандов для интерпретации в структурных терминах огромного объема данных, накопленных за десятилетия экспериментальных исследований. Для построения моделей связывания лигандов с каналами в вычислительных экспериментах учитывали данные мутационных исследований, электрофизиологических экспериментов для определения областей связывания лигандов и важнейших взаимодействий лиганд–канал, как описано в [41, 78]. Следующее поколение более совершенных моделей основано на кристаллографических и криоэлектронных

структурах соответствующих каналов или их близкородственных гомологов. Эти модели не только служат для рационализации существующих экспериментальных результатов, но и облегчают прогнозирование структур для новых лигандов (см. в [79, 80]).

Экспериментальные структуры комплексов лиганд–канал позволили оценить точность прогнозирования ранних моделей. Например, гомологические модели каналов глутаматных рецепторов NMDA и AMPA со связанными лигандами были опубликованы раньше, чем появились экспериментальные структуры соответствующих комплексов, которые подтвердили ключевые аспекты прогнозов, сделанных с помощью моделирования, как описано в обзоре [74].

Первоначально исследователи использовали гомологические модели, основанные на кристаллических структурах калиевых каналов для анализа связывания важных препаратов, включая местные анестетики и антиконвульсанты. В частности, было высказано предположение, что низкомолекулярные лиганды могут получать доступ к участку связывания во внутренней поре через щель между соседними спиралями S6 [81, 82]. Эти модели дали структурное представление о том, как местные анестетики и другие низкомолекулярные лекарственные препараты могут проникать во внутреннюю пору закрытого натриевого канала по гидрофобному пути доступа [83]. Впоследствии кристаллическая структура канала NavAb показала, что зазоры между спиралями S6 в натриевых каналах значительно шире, чем в калиевых каналах [84], что обеспечивает доступ лигандов в закрытый канал. Экспериментальные структуры натриевых каналов были затем использованы для разработки моделей нового поколения, направленных на изучение действия местных анестетиков и родственных препаратов [85–88]. Недавние кристаллографические и криоэлектронные структуры натриевых каналов с лигандами, связанными во внутренней поре [48, 89], согласуются с ранее предложенными моделями взаимодействий лиганд–канал.

Природные токсины, такие как тетродотоксин, сакситоксин и μ -конотоксины, которые связываются с внешними порами натриевых каналов, послужили ценным инструментом для картирования мест их связывания и понимания фундаментальных аспектов взаимодействия токсинов и каналов. Ранние модели, основанные на данных о структуре и активности токсинов и мутационном анализе каналов, успешно предсказывали сайты связывания токсинов и их ориентацию в канале Nav1.4 [26, 42, 90]. После публикации кристаллической

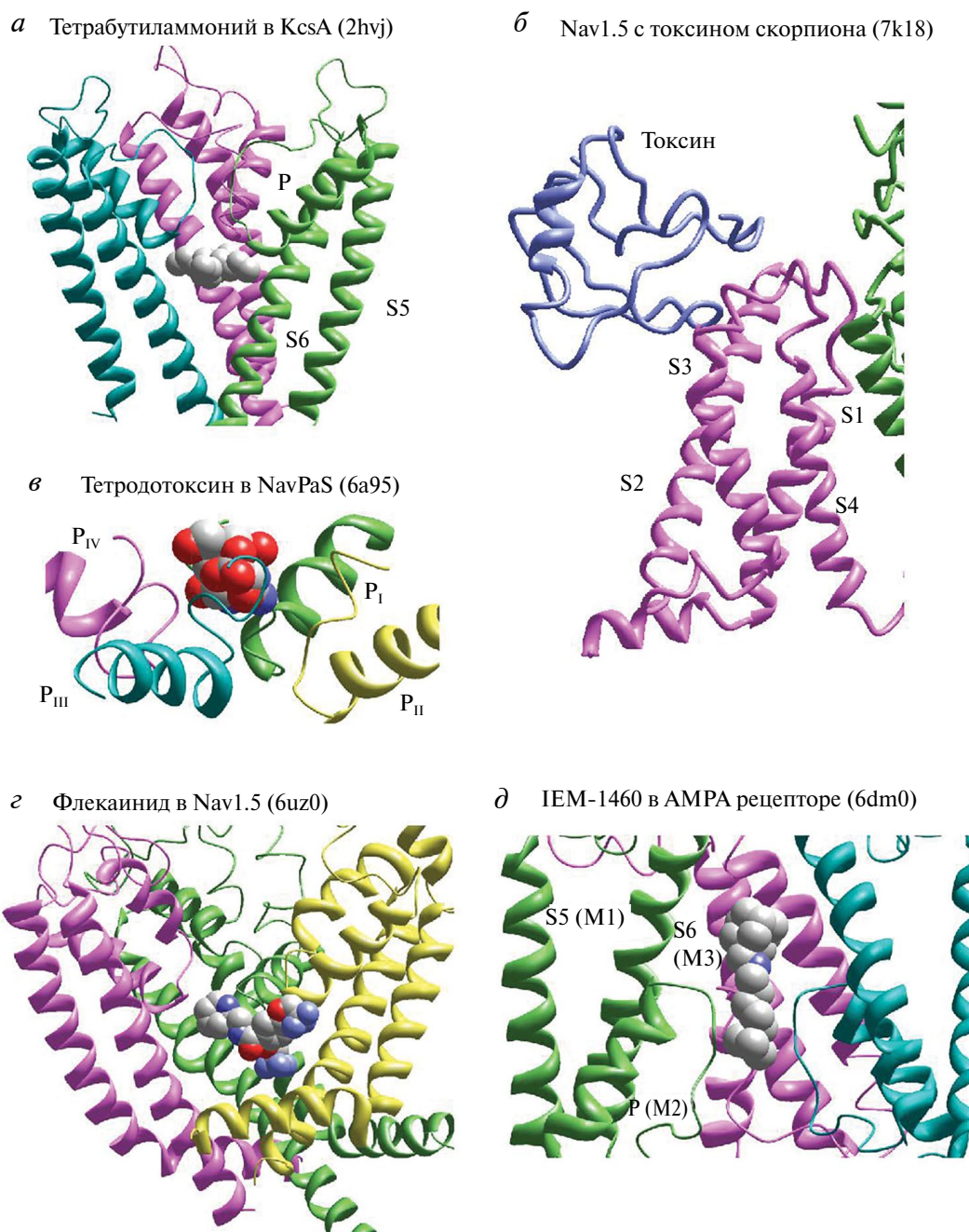


Рис. 3. Связывание лигандов в P-loop-каналах. *a* – Тетрабутиламмоний связывается в центральной полости KcsA. *б* – Пептидный токсин яда скорпиона связывается с потенциал-чувствительным доменом натриевого канала. *в* – Тетродотоксин связывается во внешнем вестибуле натриевого канала. *г* – Флекаинид связывается в центральной полости натриевого канала. *д* – IEM-1460 связывается во внешнем вестибуле канала AMPA-рецептора и частично проникает в селективный фильтр.

структуры канала NavAB [84] были разработаны более совершенные модели каналов, связанных с токсинами [78, 91–94]. Криоэлектронные структуры связанных с токсинами эукариотических натриевых каналов продемонстрировали как достоинства, так и ограничения гомологических моделей [95–97].

Препараты, нацеленные на кальциевые каналы L-типа, такие как фенилалкиламины, бензодиазепины и дигидропиридины, играют важную роль в лечении сердечно-сосудистых заболеваний [98]. Мутационные исследования выявили специфические аминокислотные остатки, мутации которых влияют на эффективность препаратов [47, 99].

Эти результаты сыграли важную роль в построении моделей канала Cav1.2, связанного с этими лекарственными средствами [39, 44, 100–103]. Криоэлектронная структура кальциевого канала Cav1.1 подтвердила область связывания дигидропиридинов [104], которая ранее была выяснена в ходе обширных мутационных исследований и визуализирована в гомологических моделях.

π-ВЫПУКЛОСТИ

Структуры атомарного масштаба выявили интригующие особенности каналов, которые ранее не были известны. Оказалось, что каналообразующие S6 спирали в некоторых P-loop-каналах не полностью α-спирали, а имеют элементы π-спирали. π-выпуклость, вызванная наличием дополнительного остатка на виток спирали, вызывает переориентацию остатков вверх или вниз по белковой цепи на ~90° по сравнению с классической α-спиралью (рис. 4). Это значительное изменение ориентации существенно влияет на структуру межсегментных контактов и изменяет расположение остатков, обращенных внутрь поры, и соответственно, взаимодействия с лигандами внутри поры. π-выпуклости были обнаружены в натриевых, кальциевых и TRP-каналах, где в S6 имеется высоко консервативный остаток аспарагина, появившийся, вероятно, в результате вставки [105]. Наличие π-выпуклостей позволяет при вставке сохранить ориентацию остатков за пределами π-спирального элемента и их межсегментные контакты, обеспечивая, таким образом, исходную структурную толерантность для вставки.

Различные структуры одного и того же канала могут различаться по наличию π-выпуклостей, что указывает на их динамическую природу. В ряде случаев наблюдались структурные перестройки, связанные с π-выпуклостями, которые могут быть вызваны связыванием лиганда. Например, канал hCav3.1 в его свободном состоянии и в комплексе со специфическим блокатором каналов Т-типа Z944, а также структуры канала Cav1.1 кролика с верапамилом или дилтиаземом демонстрируют такие перестройки. В дополнение к влиянию на взаимодействие лиганд–канал π-выпуклости могут существенно изменять контакты между спиралями S6, S5 и S4–S5, тем самым влияя на структурную стабильность порообразующего домена и переходы между функциональными состояниями канала.

Спирали S6 TRP-каналов демонстрируют большое разнообразие π-выпуклостей [106, 107]. Интересно, что спирали в разных структурах одного и того же канала могут либо не иметь π-выпуклостей, либо обладать ими. Эта

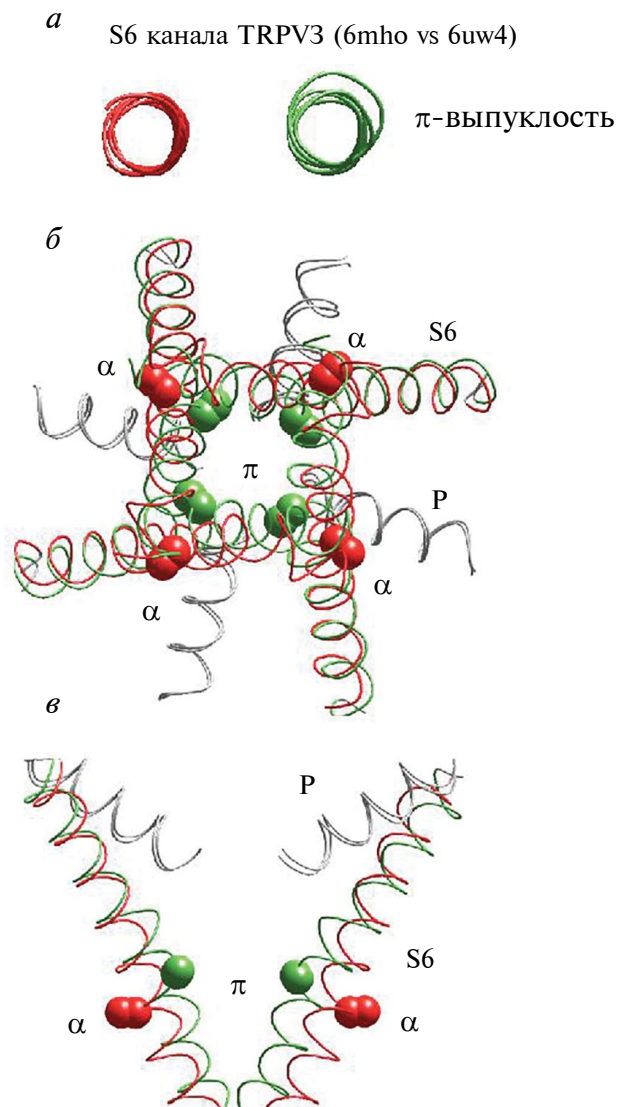


Рис. 4. Полностью α-спиральные сегменты TRPV3 (6mh0, красный) и сегменты с элементами π-спирали (6uw4, зеленый). *а* – π-спиральный элемент в спирали выглядит как выпуклость. *б, в* – Поскольку π-спираль имеет дополнительный остаток на виток, наличие такого элемента вызывает переориентацию остатков в С-части спирали. СА и СВ атомы консервативных остатков аспарагина показаны сферами.

изменчивость предполагает, что динамические π-выпуклости могут регулировать конформационные перестройки в канале. Действительно, анализ структур каналов TRPM6 показывает, что сегменты S6 претерпевают конформационный переход от α-спирали к π-выпуклой спирали при открытии канала [108]. В каналах TRPV1 и TRPV2 наличие α-спиральных сегментов S6 по сравнению со спиралями S6 с энергетически менее выгодными π-выпуклостями может отражать различные функциональные состояния каналов [109].

Сравнение структур класса II и класса III канала Cav1.1 кролика позволяет предположить, что переход спирали S6III из конформации с π -спиральным элементом в α -спиральную связан с движением спирали наружу и осевым вращением [110]. Исчезновение π -выпуклостей связано с расширением ворот активации в Cav1.1, но с сужением в TRPV6. Таким образом, четкая взаимосвязь между размерами поры в области активационных ворот и наличием π -выпуклостей не очевидна. Вероятно, π -выпуклости увеличивают гибкость спиралей S6 в каналах, в которых отсутствуют глициновые шарниры, присутствующие в калиевых каналах.

Обнаружение зависящих от состояния и вызванных связыванием лигандов π -выпуклостей в некоторых структурах наводит на мысль об интересном механизме, с помощью которого лиганды могут влиять на процесс активации. Например, было показано, что активаторы натриевых каналов, такие как батрахотоксин и вератридин, наряду с агонистами дигидропиридина и антагонистами кальциевых каналов L-типа, изменяют вероятность открытия и закрытия каналов [47, 111–114]. Однако криоэлектронные структуры канала Cav1.1 показывают, что изменения в области активационных ворот минимальны и не позволяют полностью объяснить основной механизм действия этих важнейших лигандов [104]. Появление вызванных связыванием лигандов π -выпуклостей потенциально может переориентировать остатки S6, тем самым влияя на стабильность конформаций с открытыми и закрытыми воротами [115]. Этот механизм предлагает новый взгляд на то, как лиганды могут влиять на активацию каналов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТРУКТУРЫ И МОДЕЛИ

Недавний прорыв в структурной биологии был обусловлен вычислительными подходами, которые объединяют искусственный интеллект и методы оптимизации энергии. Исключительным достижением является нейронная сеть AlphaFold2, которая успешно предсказывает трехмерные структуры многих белков [116, 117]. Другим важным ресурсом является сервер RoseTTAFold [118], который также основан на методах искусственного интеллекта. Несмотря на то что рекомендуется соблюдать осторожность при интерпретации моделей белков из-за потенциальных ограничений в точности, наложение криоэлектронной структуры hNav1.5 и структуры, предсказанной AlphaFold2, выявляет значительное сходство в трансмембранных сегментах и внеклеточном домене. Кроме того, структура AlphaFold2 показывает некоторые структурированные сегменты

в цитоплазматических областях, которые отсутствуют в криоэлектронной структуре. Ниже мы сравним некоторые экспериментальные структуры с соответствующими моделями, подробный анализ которых можно найти в недавнем обзоре [119].

Сравнение пяти экспериментальных структур натриевых каналов (hNav1.2, hNav1.7, hNav1.4 и rNav1.5), с семью структурами AlphaFold2 (hNav2.1, hNav1.4, hNav1.5, rNav1.5, mNav1.5, hNav1.4 и hNav1.9) выявило высокую степень структурного сходства. Различия между моделями AlphaFold2 и экспериментальными структурами того же порядка, что и различия экспериментальных структур между собой. Наложение кристаллической структуры открытого канала Kv1.2 на структуры AlphaFold2 каналов hKv1.2, hKv1.6, hKv2.1 и hKv3.1 показывает, что конформации калиевых каналов в этих структурах в значительной степени схожи. Основные детали, включая конфигурацию S6-спиралей с открытыми воротами, точно предсказаны в моделях. Модели AlphaFold2 для каналов hKv1.6, hKv2.1 и hKv3.1 также полностью соответствуют экспериментальным структурам [119].

Наложение экспериментальных структур и моделей калиевых каналов, Kv1.2 и Kv7.1, показало, что, хотя укладка Р-петель сходная, потенциально чувствительные домены демонстрируют заметные различия. Кроме того, конформации активационных ворот также значительно различаются между двумя каналами. Интересно, что, несмотря на эти различия, модели AlphaFold2 очень похожи на экспериментальные структуры для каждого канала.

КАНАЛОПАТИИ

Различные наследственные нарушения, известные как каналопатии, являются результатом мутаций, происходящих как в генах ионных каналов, так и в генах белков, участвующих в регуляции этих каналов. Дисфункция ионных каналов может иметь серьезные последствия для организма. Понимание молекулярных механизмов каналопатий и разработка новых медицинских подходов и препаратов требуют точного знания структуры ионных каналов. Ниже приведены несколько примеров каналопатий, связанных с Р-loop-каналами.

Синдром удлинённого интервала QT — это заболевание, характеризующееся удлинением интервала QT на электрокардиограмме, что предрасполагает к опасным для жизни аритмиям, таким как резкие сокращения и внезапная остановка сердца. В синдром вовлечено несколько генов, в том числе те, которые кодируют калиевые ионные каналы (например, KCNQ1, KCNH2) и натриевые ионные

каналы (например, SCN5A), которые играют решающую роль в реполяризации. Мутации в этих генах нарушают нормальную функцию ионных каналов, приводя к нарушению электрической активности сердца и повышенной восприимчивости к аритмиям [120].

Синдром Бругада — редкое, но потенциально опасное для жизни генетическое нарушение сердечного ритма. Оно может привести к быстрому сердцебиению, известному как желудочковая тахикардия, или даже внезапной остановке сердца. Синдром часто вызывается мутациями в гене SCN5A, который кодирует натриевые каналы Nav1.5 в сердце. Симптомы варьируются в широких пределах и могут включать обморок, учащенное сердцебиение, нерегулярное сердцебиение. Однако у некоторых людей это заболевание может протекать бессимптомно. Лечение направлено на предотвращение опасных сердечных ритмов и снижение риска внезапной остановки сердца. Может включать медикаментозное лечение, установку имплантата дефибриллятора или изменение образа жизни. Кроме того, людям с синдромом Бругада и членам их семей может быть полезно генетическое консультирование и скрининг для оценки риска и выработки эффективного лечения [121]. Структурные обоснования дисфункций Nav1.5, вызванных различными генетическими мутациями, можно найти в [55].

Эпилепсия — это неврологическое заболевание, характеризующееся повторяющимися припадками, которые возникают в результате аномальной возбудимости и синхронизации активности нейронов мозга. Хотя эпилепсия имеет разнообразную этиологию, включая приобретенные повреждения и структурные аномалии, часть случаев обусловлена генетическими факторами, в частности мутациями в генах ионных каналов. Например, мутации генов потенциал-управляемых натриевых каналов (SCN1A, SCN2A) связаны с различными формами эпилепсии, такими как синдром Драве и генетическая эпилепсия с фебрильными припадками. Эти мутации приводят к повышенной возбудимости кортикальных нейронов, способствуя возникновению судорожных припадков [122, 123].

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Несмотря на значительные достижения в структурной биологии P-loop-каналов, определенные проблемы сохраняются. Одна из важнейших проблем заключается в том, что статические кристаллические и криоэлектронные структуры описывают низкоэнергетическое состояние, получаемое в нефизиологических условиях, что

дает ограниченное представление о механизмах перехода между функциональными состояниями и зависящим от состояния связыванием фармакологических агентов. Например, криоэлектронные структуры кальциевых каналов L-типа с агонистами и антагонистами дигидропиридина практически идентичны, что не позволяет объяснить принципиально различное действие этих типов лигандов [104]. Другим ограничением экспериментальных структур является потенциальное влияние ионов, молекул воды, липидов и молекул детергента, которые не всегда поддаются определению и состояние которых может отличаться от физиологических условий. Например, в криоэлектронной структуре кальциевого канала L-типа с верапамилом [110] молекулы липидов и детергента сильно взаимодействуют с лигандом в поре канала, потенциально влияя на наблюдаемую картину связывания (рис. 5). В результате физиологическая значимость экспериментальных структур может оказаться сомнительной, а некоторые выводы, сделанные на их основе, могут быть спекулятивными.

Существенная проблема, что большинство экспериментальных структур изображают каналы в энергетически выгодных состояниях, полученных в нефизиологических условиях, также отражена в моделях AlphaFold2. Модели предсказывают только одну структуру для каждого белка, не имея возможности предложить различные структуры для состояний покоя, открытого и инактивированного. Кроме того, остается неясным, какое состояние канала предсказывает модель и что за этим стоит. Мы не можем получить модели для различных напряжений на мембране, температур

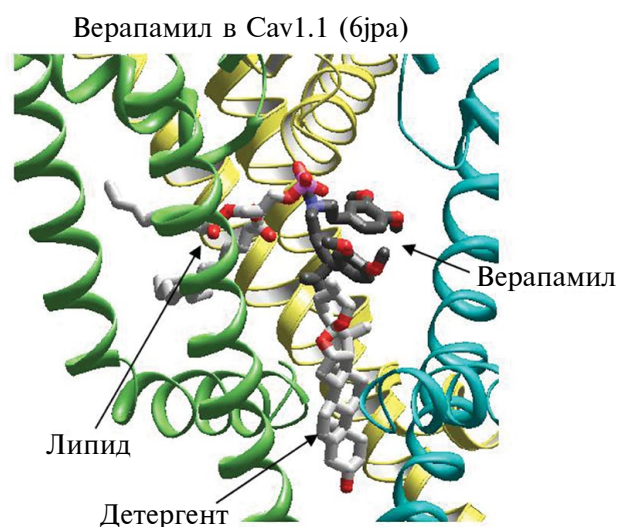


Рис. 5. Молекулы липида и детергента взаимодействуют с молекулой верапамила в поре кальциевого канала.

или в присутствии лигандов, что затрудняет нашу способность моделировать, как эти важнейшие факторы влияют на структуру каналов.

Например, экспериментальные структуры каналов Nav1.2, Nav1.4, Nav1.5 и Nav1.7 демонстрируют π -выпуклости в спиралях S6I и S6II. Большинство моделей для каналов hNav1.1, hNav1.2, hNav1.4, hNav1.5 и hNav1.9 демонстрируют π -выпуклости в спиралях S6I, S6III и S6IV, тогда как в экспериментальных конструкциях отсутствует π -выпуклость в S6IV. Модели каналов Nav1.5 мыши и Nav1.9 человека имеют π -выпуклости во всех четырех повторах, что соответствует паттерну π -выпуклостей, наблюдаемому в экспериментальной структуре нефункционального канала NavPaS. Интересно, что несмотря на очень похожие последовательности каналов Nav1.5 мыши, крысы и человека, модель AlphaFold2 для Nav1.5 мыши отличается от моделей для канала крысы и человека. Экспериментальные структуры кальциевых каналов также подразделяются на несколько классов в зависимости от наличия или отсутствия π -выпуклостей в спиралях S6 [124]. Структуры класса I не имеют π -выпуклостей, структуры класса II имеют π -выпуклости в повторах I, II и III, в то время как структуры класса III имеют выпуклости в повторах I и II. Модель AlphaFold2 кальциевого канала T-типа hCav3.1 точно воспроизводит π -выпуклости, наблюдаемые в экспериментальной структуре класса II. И наоборот, модель кальциевого канала Cav1.1 демонстрирует π -выпуклость только в повторе I. Модели Cav1.3, Cav1.4, Cav2.1 и Cav2.2 демонстрируют выпуклости в повторах I и III, что чаще наблюдается в экспериментальных структурах натриевых, а не кальциевых каналов. Кроме того, модели hCav3.2 и hCav3.3 имеют π -выпуклости во всех четырех повторах.

Таким образом, паттерны выпуклостей π -спирали в спиралях S6 демонстрируют значительное разнообразие как в экспериментальных структурах, так и в моделях. Причины, лежащие в основе этих различий, остаются неясными. Вероятно, что существуют альтернативные конформации со сходными энергиями и возможны переходы между этими конформациями. Однако структурные детерминанты, ответственные за такие переходы, остаются неизвестными, что представляет собой интригующую проблему в области структурной биологии P-loop-каналов. Для решения этих важных проблем, связанных со структурой каналов, AlphaFold2 и аналогичные системы не обеспечивают прорыва.

Каналы P-loop регулируются множеством вспомогательных субъединиц и многочисленными

цитоплазматическими белками [125–128]. В то время как в некоторых структурах обнаружены комплексы каналов со вспомогательными субъединицами, трехмерные структуры обширных цитоплазматических доменов многих каналов, которые взаимодействуют с различными белками, остаются неразрешенными как в экспериментальных структурах, так и в моделях. Предсказание структуры каналов в комплексе с цитоплазматическими белками имеет решающее значение для расшифровки того, как мутации в этих цитоплазматических белках приводят к дисфункции ионных каналов.

Вычислительные методики могут быть использованы для преобразования энергетически выгодных экспериментальных структур в функционально значимые, но статистически малозаселенные состояния. Модели разных функциональных состояний играют важную роль в раскрытии механизмов, лежащих в основе дисфункции каналов из-за болезнетворных мутаций и воздействия лигандов на каналы [54, 56, 129]. Вычислительные исследования, включающие моделирование молекулярной динамики и высокопроизводительный докинг лигандов, могут извлечь выгоду из множественности доступных экспериментальных структур и моделей каналов P-loop. Компьютерные исследования позволяют изучить динамическое поведение каналов и предсказать взаимодействия между белками каналов и различными лигандами.

Мутационные исследования, выясняющие остатки, участвующие в межбелковых взаимодействиях, дают ценную информацию, служащую основой для прогнозирования межбелковых комплексов с использованием нейронных сетей или программного обеспечения для стыковки белок–белок на основе физики взаимодействий. Дальнейшее изучение каналов P-loop в различных состояниях и в комплексе с различными лигандами необходимо для решения сложных вопросов, особенно касающихся механизмов, лежащих в основе мутаций, связанных с заболеваниями. Несмотря на замечательные прогностические возможности AlphaFold2, он не может последовательно предвидеть последствия миссенс-мутаций, что подчеркивает необходимость комбинированного экспериментального и теоретического подхода [115, 130]. Только объединяя экспериментальные данные с расчетными прогнозами, исследователи могут получить более глубокое представление о функционировании и регуляции каналов семейства P-loop, прокладывая путь для разработки новых терапевтических стратегий, нацеленных на эти каналы при различных заболеваниях.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена без поддержки грантовым финансированием.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khakh B.S., North R.A. 2012. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron*. **76** (1), 51–69. doi 10.1016/j.neuron.2012.09.024
2. Nilius B., Owsianik G. 2011. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* **12** (3), 218. doi 10.1186/gb-2011-12-3-218
3. Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D. 1997. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. **389** (6653), 816–824. doi 10.1038/39807
4. Wemmie J.A., Price M.P., Welsh M.J. 2006. Acid-sensing ion channels: Advances, questions and therapeutic opportunities. *Trends Neurosci.* **29** (10), 578–586. doi 10.1016/j.tins.2006.06.014
5. Latorre R., Castillo K., Carrasquel-Ursulaez W., Sepulveda R.V., Gonzalez-Nilo F., Gonzalez C., Alvarez O. 2017. Molecular determinants of BK channel functional diversity and functioning. *Physiol. Rev.* **97** (1), 39–87. doi 10.1152/physrev.00001.2016
6. MacKinnon R. 2003. Potassium channels. *FEBS Lett.* **555** (1), 62–65. doi 10.1016/s0014-5793(03)01104-9
7. Venkatachalam K., Montell C. 2007. TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 387–417. doi 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819
8. Wulff H., Zhorov B.S. 2008. K⁺ channel modulators for the treatment of neurological disorders and autoimmune diseases. *Chem. Rev.* **108** (5), 1744–1773. doi 10.1021/cr078234p
9. Hansen K.B., Wollmuth L.P., Bowie D., Furukawa H., Menniti F.S., Sobolevsky A.I., Swanson G.T., Swanger S.A., Greger I.H., Nakagawa T., McBain C.J., Jayaraman V., Low C.M., Dell'Acqua M.L., Diamond J.S., Camp C.R., Perszyk R.E., Yuan H., Traynelis S.F. 2021. Structure, function, and pharmacology of glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **73** (4), 298–487. doi 10.1124/pharmrev.120.000131
10. Catterall W.A. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3** (8), a003947. doi 10.1101/cshperspect.a003947
11. Catterall W.A. 2012. Voltage-gated sodium channels at 60: Structure, function and pathophysiology. *J. Physiol.* **590** (11), 2577–2589. doi 10.1113/jphysiol.2011.224204
12. Huang Y., Fliegert R., Guse A.H., Lu W., Du J. 2020. A structural overview of the ion channels of the TRPM family. *Cell Calcium*. **85**, 102111. doi 10.1016/j.ceca.2019.102111
13. Noreng S., Li T., Payandeh J. 2021. Structural pharmacology of voltage-gated sodium channels. *J. Mol. Biol.* **433** (17), 166967. doi 10.1016/j.jmb.2021.166967
14. Enyedi P., Czirjak G. 2010. Molecular background of leak K⁺ currents: two-pore domain potassium channels. *Physiol. Rev.* **90** (2), 559–605. doi 10.1152/physrev.00029.2009
15. Wollmuth L.P., Sobolevsky A.I. 2004. Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci.* **27** (6), 321–328. doi 10.1016/j.tins.2004.04.005
16. Zhorov B.S., Tikhonov D.B. 2004. Potassium, sodium, calcium and glutamate-gated channels: Pore architecture and ligand action. *J. Neurochem.* **88** (4), 782–799. doi 10.1111/j.1471-4159.2004.02261.x
17. Lipscombe D., Helton T.D., Xu W. 2004. L-type calcium channels: The low down. *J. Neurophysiol.* **92** (5), 2633–2641. doi 10.1152/jn.00486.2004
18. Mayer M.L., Armstrong N. 2004. Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* **66**, 161–181. doi 10.1146/annurev.physiol.66.050802.084104
19. Mazzolini M., Marchesi A., Giorgetti A., Torre V. 2010. Gating in CNGA1 channels. *Pflugers Arch.* **459** (4), 547–555. doi 10.1007/s00424-009-0751-2
20. Grizel A.V., Glukhov G.S., Sokolova O.S. 2014. Mechanisms of activation of voltage-gated potassium channels. *Acta Naturae*. **6** (4), 10–26.
21. Bagnieris C., Naylor C.E., McCusker E.C., Wallace B.A. 2015. Structural model of the open-closed-inactivated cycle of prokaryotic voltage-gated sodium channels. *J. Gen. Physiol.* **145** (1), 5–16. doi 10.1085/jgp.201411242
22. Liu C., Montell C. 2015. Forcing open TRP channels: Mechanical gating as a unifying activation mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **460** (1), 22–25. doi 10.1016/j.bbrc.2015.02.067
23. Armstrong C.M., Hille B. 1972. The inner quaternary ammonium ion receptor in potassium channels of the node of Ranvier. *J. Gen. Physiol.* **59** (4), 388–400. doi 10.1085/jgp.59.4.388
24. Heinemann S.H., Terlau H., Stuhmer W., Imoto K., Numa S. 1992. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*. **356** (6368), 441–443. doi 10.1038/356441a0
25. Dudley S.C. Jr., Chang N., Hall J., Lipkind G., Fozzard H.A., French R.J. 2000. μ -conotoxin GIIIA interactions with the voltage-gated Na(+) channel predict a clockwise arrangement of the domains.

- J. Gen. Physiol.* **116** (5), 679–690.
doi 10.1085/jgp.116.5.679
26. Lipkind G.M., Fozzard H.A. 1994. A structural model of the tetrodotoxin and saxitoxin binding site of the Na⁺ channel. *Biophys. J.* **66** (1), 1–13.
doi 10.1016/S0006-3495(94)80746-5
 27. Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. **280** (5360), 69–77.
doi 10.1126/science.280.5360.69
 28. Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. 2002. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*. **417** (6888), 515–522. doi 10.1038/417515a
 29. Clayton G.M., Altieri S., Heginbotham L., Unger V.M., Morais-Cabral J.H. 2008. Structure of the transmembrane regions of a bacterial cyclic nucleotide-regulated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105** (5), 1511–1515. doi 10.1073/pnas.0711533105.
 30. Cordero-Morales J.F., Cuello L.G., Zhao Y., Jogini V., Cortes D.M., Roux B., Perozo E. 2006. Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13** (4), 311–318. doi 10.1038/nsmb1069
 31. Cuello L.G., Jogini V., Cortes D.M., Pan A.C., Gagnon D.G., Dalmas O., Cordero-Morales J.F., Chakrapani S., Roux B., Perozo E. 2010. Structural basis for the coupling between activation and inactivation gates in K⁺ channels. *Nature*. **466** (7303), 272–275. doi 10.1038/nature09136
 32. Xiong W., Li R.A., Tian Y., Tomaselli G.F. 2003. Molecular motions of the outer ring of charge of the sodium channel: Do they couple to slow inactivation? *J. Gen. Physiol.* **122** (3), 323–332.
doi 10.1085/jgp.200308881
 33. Abderemane-Ali F., Findeisen F., Rossen N.D., Minor D.L.Jr. 2019. A selectivity filter gate controls voltage-gated calcium channel calcium-dependent inactivation. *Neuron*. **101** (6), 1134–1149 e3.
doi 10.1016/j.neuron.2019.01.011
 34. Gibor G., Yakubovich D., Rosenhouse-Dantsker A., Peretz A., Schottelndreier H., Seeböhm G., Dascal N., Logothetis D.E., Paas Y., Attali B. 2007. An inactivation gate in the selectivity filter of KCNQ1 potassium channels. *Biophys. J.* **93** (12), 4159–4172.
doi 10.1529/biophysj.107.107987
 35. Cao E., Liao M., Cheng Y., Julius D. 2013. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*. **504** (7478), 113–118.
doi 10.1038/nature12823
 36. Twomey E.C., Yelshanskaya M.V., Grassucci R.A., Frank J., Sobolevsky A.I. 2017. Channel opening and gating mechanism in AMPA-subtype glutamate receptors. *Nature*. **549** (7670), 60–65.
doi 10.1038/nature23479
 37. Tikhonov D.B., Zhorov B.S., Magazanik L.G. 1999. Intersegment hydrogen bonds as possible structural determinants of the N/Q/R site in glutamate receptors. *Biophys. J.* **77** (4), 1914–1926.
doi 10.1016/S0006-3495(99)77033-5
 38. Huber I., Wappler E., Herzog A., Mitterdorfer J., Glossmann H., Langer T., Striessnig J. 2000. Conserved Ca²⁺-antagonist-binding properties and putative folding structure of a recombinant high-affinity dihydropyridine-binding domain. *Biochem. J.* **347** (Pt 3), 829–836.
 39. Lipkind G.M., Fozzard H.A. 2003. Molecular modeling of interactions of dihydropyridines and phenylalkylamines with the inner pore of the L-type Ca²⁺ channel. *Mol. Pharmacol.* **63** (3), 499–511.
doi 10.1124/mol.63.3.499
 40. Corry B., Vora T., Chung S.H. 2005. Electrostatic basis of valence selectivity in cationic channels. *Biochim. Biophys. Acta*. **1711** (1), 72–86.
doi 10.1016/j.bbame.2005.03.002
 41. Lipkind G.M., Fozzard H.A. 2005. Molecular modeling of local anesthetic drug binding by voltage-gated sodium channels. *Mol. Pharmacol.* **68** (6), 1611–1622. doi 10.1124/mol.105.014803
 42. Tikhonov D.B., Zhorov B.S. 2005. Modeling P-loops domain of sodium channel: homology with potassium channels and interaction with ligands. *Biophys. J.* **88** (1), 184–197. doi 10.1529/biophysj.104.048173
 43. O'Reilly A.O., Khambay B.P., Williamson M.S., Field L.M., Wallace B.A., Davies T.G. 2006. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochem. J.* **396** (2), 255–263.
doi 10.1042/BJ20051925
 44. Cosconati S., Marinelli L., Lavecchia A., Novellino E. 2007. Characterizing the 1,4-dihydropyridines binding interactions in the L-type Ca²⁺ channel: Model construction and docking calculations. *J. Med. Chem.* **50** (7), 1504–1513. doi 10.1021/jm061245a
 45. Alpert L.A., Fozzard H.A., Hanck D.A., Makielski J.C. 1989. Is there a second external lidocaine binding site on mammalian cardiac cells? *Am. J. Physiol.* **257** (1 Pt 2), H79–84.
doi 10.1152/ajpheart.1989.257.1.H79
 46. Catterall W.A., Striessnig J. 1992. Receptor sites for Ca²⁺ channel antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* **13** (6), 256–262. doi 10.1016/0165-6147(92)90079-1
 47. Hockerman G.H., Peterson B.Z., Johnson B.D., Catterall W.A. 1997. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 361–396.
doi 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.361
 48. Jiang D., Shi H., Tonggu L., Gamal El-Din T.M., Lenaus M.J., Zhao Y., Yoshioka C., Zheng N., Catterall W.A. 2020. Structure of the cardiac sodium channel. *Cell*. **180** (1), 122–134 e10.
doi 10.1016/j.cell.2019.11.041
 49. Jiang D., Banh R., Gamal El-Din T.M., Tonggu L., Lenaus M.J., Pomes R., Zheng N., Catterall W.A.

2021. Open-state structure and pore gating mechanism of the cardiac sodium channel. *Cell*. **184** (20), 5151–5162 e11. doi 10.1016/j.cell.2021.08.021
50. Xu H., Li T., Rohou A., Arthur C.P., Tzakoniati F., Wong E., Estevez A., Kugel C., Franke Y., Chen J., Ciferri C., Hackos D.H., Koth C.M., Payandeh J. 2019. Structural basis of Nav1.7 inhibition by a gating-modifier spider toxin. *Cell*. **176** (5), 1238–1239. doi 10.1016/j.cell.2019.01.047
 51. Jiang D., Tonggu L., Gamal El-Din T.M., Banh R., Pomes R., Zheng N., Catterall W.A. 2021. Structural basis for voltage-sensor trapping of the cardiac sodium channel by a deathstalker scorpion toxin. *Nat. Commun.* **12** (1), 128. doi 10.1038/s41467-020-20078-3
 52. Lenaeus M.J., Gamal El-Din T.M., Ing C., Ramanadane K., Pomes R., Zheng N., Catterall W.A. 2017. Structures of closed and open states of a voltage-gated sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114** (15), E3051–E3060. doi 10.1073/pnas.1700761114
 53. Wisedchaisri G., Tonggu L., McCord E., Gamal El-Din T.M., Wang L., Zheng N., Catterall W.A. 2019. Resting-state structure and gating mechanism of a voltage-gated sodium channel. *Cell*. **178** (4), 993–1003 e12. doi 10.1016/j.cell.2019.06.031
 54. Korkosh V.S., Kiselev A.M., Mikhaylov E.N., Kostareva A.A., Zhorov B.S. 2019. Atomic mechanisms of timothy syndrome-associated mutations in calcium channel Cav1.2. *Front. Physiol.* **10**, 335. doi 10.3389/fphys.2019.00335
 55. Korkosh V.S., Zaytseva A.K., Kostareva A.A., Zhorov B.S. 2021. Intersegment contacts of potentially damaging variants of cardiac sodium channel. *Front. Pharmacol.* **12**, 756415. doi 10.3389/fphar.2021.756415
 56. Zaytseva A.K., Boitsov A.S., Kostareva A.A., Zhorov B.S. 2021. Possible interactions of extracellular loop IVP2-S6 with voltage-sensing domain III in cardiac sodium channel. *Front. Pharmacol.* **12**, 742508. doi 10.3389/fphar.2021.742508
 57. Berneche S., Roux B. 2000. Molecular dynamics of the KcsA K(+) channel in a bilayer membrane. *Biophys. J.* **78** (6), 2900–2917. doi 10.1016/S0006-3495(00)76831-7
 58. Shrivastava I.H., Sansom M.S. 2000. Simulations of ion permeation through a potassium channel: Molecular dynamics of KcsA in a phospholipid bilayer. *Biophys. J.* **78** (2), 557–570. doi 10.1016/S0006-3495(00)76616-1
 59. Ulmschneider M.B., Bagneris C., McCusker E.C., Decaen P.G., Delling M., Clapham D.E., Ulmschneider J.P., Wallace B.A. 2013. Molecular dynamics of ion transport through the open conformation of a bacterial voltage-gated sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110** (16), 6364–6369. doi 10.1073/pnas.1214667110
 60. Allen T.W., Kuyucak S., Chung S.H. 1999. Molecular dynamics study of the KcsA potassium channel. *Biophys. J.* **77** (5), 2502–2516. doi 10.1016/S0006-3495(99)77086-4
 61. Biggin P.C., Smith G.R., Shrivastava I., Choe S., Sansom M.S. 2001. Potassium and sodium ions in a potassium channel studied by molecular dynamics simulations. *Biochim. Biophys. Acta*. **1510** (1–2), 1–9. doi 10.1016/S0005-2736(00)00345-x
 62. Noskov S.Y., Berneche S., Roux B. 2004. Control of ion selectivity in potassium channels by electrostatic and dynamic properties of carbonyl ligands. *Nature*. **431** (7010), 830–834. doi 10.1038/nature02943
 63. Corry B., Thomas M. 2012. Mechanism of ion permeation and selectivity in a voltage gated sodium channel. *J. Am. Chem. Soc.* **134** (3), 1840–1846. doi 10.1021/ja210020h
 64. Chakrabarti N., Ing C., Payandeh J., Zheng N., Catterall W.A., Pomes R. 2013. Catalysis of Na⁺ permeation in the bacterial sodium channel Na(V)Ab. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110** (28), 11331–11336. doi 10.1073/pnas.1309452110
 65. Flood E., Boiteux C., Allen T.W. 2018. Selective ion permeation involves complexation with carboxylates and lysine in a model human sodium channel. *PLoS Comput. Biol.* **14** (9), e1006398. doi 10.1371/journal.pcbi.1006398
 66. Zhorov B.S. 2021. Possible mechanism of ion selectivity in eukaryotic voltage-gated sodium channels. *J. Phys. Chem. B*. **125** (8), 2074–2088. doi 10.1021/acs.jpcc.0c11181
 67. Ahern C.A., Payandeh J., Bosmans F., Chanda B. 2016. The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *J. Gen. Physiol.* **147** (1), 1–24. doi 10.1085/jgp.201511492
 68. Catterall W.A., Lenaeus M.J., Gamal El-Din T.M. 2020. Structure and pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **60**, 133–154. doi 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021757
 69. Koivisto A.P., Belvisi M.G., Gaudet R., Szallasi A. 2022. Advances in TRP channel drug discovery: From target validation to clinical studies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **21** (1), 41–59. doi 10.1038/s41573-021-00268-4
 70. Hoshi T., Zagotta W.N., Aldrich R.W. 1990. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science*. **250** (4980), 533–538. doi 10.1126/science.2122519
 71. Zagotta W.N., Hoshi T., Aldrich R.W. 1990. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science*. **250** (4980), 568–571. doi 10.1126/science.2122520
 72. Gomez-Lagunas F., Armstrong C.M. 1994. The relation between ion permeation and recovery from inactivation of ShakerB K⁺ channels. *Biophys. J.* **67** (5), 1806–1815. doi 10.1016/S0006-3495(94)80662-9
 73. Yan Z., Zhou Q., Wang L., Wu J., Zhao Y., Huang G., Peng W., Shen H., Lei J., Yan N. 2017. Structure of

- the Nav1.4-beta1 complex from electric eel. *Cell*. **170** (3), 470–482 e11. doi 10.1016/j.cell.2017.06.039
74. Tikhonov D.B., Zhorov B.S. 2020. The pore domain in glutamate-gated ion channels: Structure, drug binding and similarity with potassium channels. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* **1862** (10), 183401. doi 10.1016/j.bbamem.2020.183401
 75. Catterall W.A., Swanson T.M. 2015. Structural basis for pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels. *Mol. Pharmacol.* **88** (1), 141–150. doi 10.1124/mol.114.097659
 76. Catterall W.A. 2014. Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **54**, 317–338. doi 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140232
 77. Silver K.S., Du Y., Nomura Y., Oliveira E.E., Salgado V.L., Zhorov B.S., Dong K. 2014. Voltage-gated sodium channels as insecticide targets. *Adv. In Insect. Phys.* **46**, 389–433. doi 10.1016/B978-0-12-417010-0.00005-7
 78. Korkosh V.S., Zhorov B.S., Tikhonov D.B. 2014. Folding similarity of the outer pore region in prokaryotic and eukaryotic sodium channels revealed by docking of conotoxins GIIIA, PIIIA, and KIIIA in a NavAb-based model of Nav1.4. *J. Gen. Physiol.* **144** (3), 231–244. doi 10.1085/jgp.201411226
 79. Tomasic T., Hartzoulakis B., Zidar N., Chan F., Kirby R.W., Madge D.J., Peigneur S., Tytgat J., Kikelj D. 2013. Ligand- and structure-based virtual screening for clathrocin-derived human voltage-gated sodium channel modulators. *J. Chem. Inf. Model.* **53** (12), 3223–3232. doi 10.1021/ci400505e
 80. Palestro P.H., Enrique N., Goicoechea S., Villalba M.L., Sabatier L.L., Martin P., Milesi V., Bruno Blanch L.E., Gavernet L. 2018. Searching for new leads to treat epilepsy: Target-based virtual screening for the discovery of anticonvulsant agents. *J. Chem. Inf. Model.* **58** (7), 1331–1342. doi 10.1021/acs.jcim.7b00721
 81. Tikhonov D.B., Bruhova I., Zhorov B.S. 2006. Atomic determinants of state-dependent block of sodium channels by charged local anesthetics and benzocaine. *FEBS Lett.* **580** (26), 6027–6032. doi 10.1016/j.febslet.2006.10.035
 82. Bruhova I., Tikhonov D.B., Zhorov B.S. 2008. Access and binding of local anesthetics in the closed sodium channel. *Mol. Pharmacol.* **74** (4), 1033–1045.
 83. Hille B. 1977. Local anesthetics: Hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J. Gen. Physiol.* **69** (4), 497–515. doi 10.1085/jgp.69.4.497
 84. Payandeh J., Scheuer T., Zheng N., Catterall W.A. 2011. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*. **475** (7356), 353–358. doi 10.1038/nature10238
 85. Martin L.J., Corry B. 2014. Locating the route of entry and binding sites of benzocaine and phenytoin in a bacterial voltage gated sodium channel. *PLoS Comput. Biol.* **10** (7), e1003688. doi 10.1371/journal.pcbi.1003688
 86. Tikhonov D.B., Zhorov B.S. 2017. Mechanism of sodium channel block by local anesthetics, antiarrhythmics, and anticonvulsants. *J. Gen. Physiol.* **149** (4), 465–481. doi 10.1085/jgp.201611668
 87. Buyan A., Sun D., Corry B. 2018. Protonation state of inhibitors determines interaction sites within voltage-gated sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **115** (14), E3135–E3144. doi 10.1073/pnas.1714131115
 88. Nguyen P.T., DeMarco K.R., Vorobyov I., Clancy C.E., Yarov-Yarovoy V. 2019. Structural basis for antiarrhythmic drug interactions with the human cardiac sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116** (8), 2945–2954. doi 10.1073/pnas.1817446116
 89. Li Z., Jin X., Wu T., Huang G., Wu K., Lei J., Pan X., Yan N. 2021. Structural basis for pore blockade of the human cardiac sodium channel Nav 1.5 by the antiarrhythmic drug Quinidine*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **60** (20), 11474–11480. doi 10.1002/anie.202102196
 90. Fozzard H.A., Lipkind G.M. 2010. The tetrodotoxin binding site is within the outer vestibule of the sodium channel. *Mar. Drugs*. **8** (2), 219–234. doi 10.3390/md8020219
 91. Chen R., Chung S.H. 2012. Binding modes of muconotoxin to the bacterial sodium channel (NavAb). *Biophys. J.* **102** (3), 483–488. doi 10.1016/j.bpj.2011.12.041
 92. Tikhonov D.B., Zhorov B.S. 2012. Architecture and pore block of eukaryotic voltage-gated sodium channels in view of NavAb bacterial sodium channel structure. *Mol. Pharmacol.* **82** (1), 97–104. doi 10.1124/mol.112.078212
 93. Mahdavi S., Kuyucak S. 2014. Molecular dynamics study of binding of micro-conotoxin GIIIA to the voltage-gated sodium channel Nav1.4. *PLoS One*. **9** (8), e105300. doi 10.1371/journal.pone.0105300
 94. Xu L., Li D., Ding J., Pan L., Ding X. 2018. Insight into tetrodotoxin blockade and resistance mechanisms of Nav 1.2 sodium channel by theoretical approaches. *Chem. Biol. Drug Des.* **92** (2), 1445–1457. doi 10.1111/cbdd.13310
 95. Shen H., Li Z., Jiang Y., Pan X., Wu J., Cristofori-Armstrong B., Smith J.J., Chin Y.K.Y., Lei J., Zhou Q., King G.F., Yan N. 2018. Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins. *Science*. **362** (6412), eaau259. doi 10.1126/science.aau2596
 96. Shen H., Liu D., Wu K., Lei J., Yan N. 2019. Structures of human Nav1.7 channel in complex with auxiliary subunits and animal toxins. *Science*. **363** (6433), 1303–1308. doi 10.1126/science.aaw2493
 97. Pan X., Li Z., Huang X., Huang G., Gao S., Shen H., Liu L., Lei J., Yan N. 2019. Molecular basis for pore blockade of human Na(+) channel Nav1.2 by the

- mu-conotoxin KIIIA. *Science*. **363** (6433), 1309–1313. doi 10.1126/science.aaw2999
98. Zamponi G.W., Striessnig J., Koschak A., Dolphin A.C. 2015 The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol. Rev.* **67** (4), 821–870. doi 10.1124/pr.114.009654
 99. Godfraind T. 2017. Discovery and development of calcium channel blockers. *Front. Pharmacol.* **8**, 286. doi 10.3389/fphar.2017.00286
 100. Tikhonov D.B., Zhorov B.S. 2008. Molecular modeling of benzothiazepine binding in the L-type calcium channel. *J. Biol. Chem.* **283** (25), 17594–17604. doi 10.1074/jbc.M800141200
 101. Cheng R.C., Tikhonov D.B., Zhorov B.S. 2009. Structural model for phenylalkylamine binding to L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* **284** (41), 28332–28342. doi 10.1074/jbc.M109.027326
 102. Tikhonov D.B., Zhorov B.S. 2009. Structural model for dihydropyridine binding to L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* **284** (28), 19006–19017. doi 10.1074/jbc.M109.011296
 103. Li W., Shi G. 2019. How CaV1.2-bound verapamil blocks Ca(2+) influx into cardiomyocyte: Atomic level views. *Pharmacol. Res.* **139**, 153–157. doi 10.1016/j.phrs.2018.11.017
 104. Gao S., Yan N. 2021. Structural basis of the modulation of the voltage-gated calcium ion channel Cav 1.1 by dihydropyridine compounds. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **60** (6), 3131–3137. doi 10.1002/anie.202011793
 105. Tikhonov D.B., Zhorov B.S. 2017. Conservation and variability of the pore-lining helices in P-loop channels. *Channels* **11** (6), 660–672. doi 10.1080/19336950.2017.1395536
 106. Zubcevic L., Lee S.Y. 2019. The role of pi-helices in TRP channel gating. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **58**, 314–323. doi 10.1016/j.sbi.2019.06.011
 107. Yelshanskaya M.V., Nadezhdin K.D., Kurnikova M.G., Sobolevsky A.I. 2021. Structure and function of the calcium-selective TRP channel TRPV6. *J. Physiol.* **599** (10), 2673–2697. doi 10.1113/JP279024
 108. McGoldrick L.L., Singh A.K., Saotome K., Yelshanskaya M.V., Twomey E.C., Grassucci R.A., Sobolevsky A.I. 2018. Opening of the human epithelial calcium channel TRPV6. *Nature*. **553** (7687), 233–237. doi 10.1038/nature25182
 109. Zubcevic L., Herzik M.A.Jr., Chung B.C., Liu Z., Lander G.C., Lee S.Y. 2016. Cryo-electron microscopy structure of the TRPV2 ion channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23** (2), 180–186. doi 10.1038/nsmb.3159
 110. Zhao Y., Huang G., Wu J., Wu Q., Gao S., Yan Z., Lei J., Yan N. 2019. Molecular basis for ligand modulation of a mammalian voltage-gated Ca(2+) channel. *Cell*. **177** (6), 1495–1506. e12. doi 10.1016/j.cell.2019.04.043
 111. Kokubun S., Prod'homme B., Becker C., Porzig H., Reuter H. 1986. Studies on Ca channels in intact cardiac cells: Voltage-dependent effects and cooperative interactions of dihydropyridine enantiomers. *Mol. Pharmacol.* **30** (6), 571–584.
 112. Correa A.M., Bezanilla F., Latorre R. 1992. Gating kinetics of batrachotoxin-modified Na⁺ channels in the squid giant axon. Voltage and temperature effects. *Biophys. J.* **61** (5), 1332–1352. doi 10.1016/S0006-3495(92)81941-0
 113. Quandt F.N., Narahashi T. 1982. Modification of single Na⁺ channels by batrachotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79** (21), 6732–6736. doi 10.1073/pnas.79.21.6732
 114. Garber S.S., Miller C. 1987. Single Na⁺ channels activated by veratridine and batrachotoxin. *J. Gen. Physiol.* **89** (3), 459–480. doi 10.1085/jgp.89.3.459
 115. Tikhonov D.B., Zhorov B.S. 2023. Mechanisms of dihydropyridine agonists and antagonists in view of cryo-EM structures of calcium and sodium channels. *J. Gen. Physiol.* **155** (11), e202313418. doi 10.1085/jgp.202313418
 116. Tunyasuvunakool K., Adler J., Wu Z., Green T., Zielinski M., Zidek A., Bridgland A., Cowie A., Meyer C., Laydon A., Velankar S., Kleywegt G.J., Bateman A., Evans R., Pritzel A., Figurnov M., Ronneberger O., Bates R., Kohl S.A.A., Potapenko A., Ballard A.J., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Clancy E., Reiman D., Petersen S., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Birney E., Kohli P., Jumper J., Hassabis D. 2021. Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*. **596** (7873), 590–596. doi 10.1038/s41586-021-03828-1
 117. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Zidek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstern S., Silver D., Vinyals O., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. **596** (7873), 583–589. doi 10.1038/s41586-021-03819-2
 118. Baek M., DiMaio F., Anishchenko I., Dauparas J., Ovchinnikov S., Lee G.R., Wang J., Cong Q., Kinch L.N., Schaeffer R.D., Millan C., Park H., Adams C., Glassman C.R., DeGiovanni A., Pereira J.H., Rodrigues A.V., van Dijk A.A., Ebrecht A.C., Opperman D.J., Sagmeister T., Buhlhellner C., Pavlov-Keller T., Rathinaswamy M.K., Dalwadi U., Yip K., Burke J.E., Garcia K.C., Grishin N.V., Adams P.D., Read R.J., Baker D. 2021. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*. **373** (6557), 871–876. doi 10.1126/science.abj8754
 119. Tikhonov D.B., Zhorov B.S. 2022. P-Loop channels: Experimental structures, and physics-based and neural

- networks-based models. *Membranes*. **12** (2), 229. doi 10.3390/membranes12020229
120. Schwartz P.J., Crotti L., Insolia R. 2012. Long-QT syndrome: From genetics to management. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* **5** (4), 868–877. doi 10.1161/CIRCEP.111.962019
 121. Antzelevitch C., Yan G.X., Ackerman M.J., Borggrefe M., Corrado D., Guo J., Gussak I., Hasdemir C., Horie M., Huikuri H., Ma C., Morita H., Nam G.B., Sacher F., Shimizu W., Viskin S., Wilde A.A. 2016. J-Wave syndromes expert consensus conference report: Emerging concepts and gaps in knowledge. *J. Arrhythm.* **32** (5), 315–339. doi 10.1016/j.joa.2016.07.002
 122. Steinlein O.K. 2004. Genetic mechanisms that underlie epilepsy. *Nat. Rev. Neurosci.* **5** (5), 400–408. doi 10.1038/nrn1388
 123. Catterall W.A., Kalume F., Oakley J.C. 2010. NaV1.1 channels and epilepsy. *J. Physiol.* **588** (Pt 11), 1849–1859. doi 10.1113/jphysiol.2010.187484
 124. Wu J., Yan Z., Li Z., Qian X., Lu S., Dong M., Zhou Q., Yan N. 2016. Structure of the voltage-gated calcium channel Ca(v)1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature*. **537** (7619), 191–196. doi 10.1038/nature19321
 125. Meadows L.S., Isom L.L. 2005. Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovasc. Res.* **67** (3), 448–458. doi 10.1016/j.cardiores.2005.04.003
 126. Haworth A.S., Brackenbury W.J. 2019. Emerging roles for multifunctional ion channel auxiliary subunits in cancer. *Cell. Calcium*. **80**: 125–140. doi 10.1016/j.ceca.2019.04.005
 127. Dolphin A.C. 2016. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: Physiology and pathophysiology and pharmacology. *J. Physiol.* **594** (19), 5369–5390. doi 10.1113/JP272262
 128. Gonzalez-Perez V., Lingle C.J. 2019. Regulation of BK channels by beta and gamma subunits. *Annu. Rev. Physiol.* **81**, 113–137. doi 10.1146/annurev-physiol-022516-034038
 129. Zhorov B.S., Du Y., Song W., Luo N., Gordon D., Gurevitz M., Dong K. 2021. Mapping the interaction surface of scorpion beta-toxins with an insect sodium channel. *Biochem. J.* **478** (14), 2843–2869. doi 10.1042/BCJ20210336
 130. Buel G.R., Walters K.J. 2022. Can AlphaFold2 predict the impact of missense mutations on structure? *Nat. Struct. Mol. Biol.* **29** (1), 1–2. doi 10.1038/s41594-021-00714-2

Structural Studies of Ion Channels: Achievements, Problems and Perspectives

© 2024 г. B. S. Zhorov^{1,2}, D. B. Tikhonov¹, *

¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194223 Russia

²Department of Biochemistry and Biomedical Sciences, McMaster University, Hamilton, Canada

*e-mail: denistikhonov2002@yahoo.com

The superfamily of membrane proteins known as P-loop channels encompasses potassium, sodium, and calcium channels, as well as TRP channels and ionotropic glutamate receptors. An increasing number of crystal and cryo-EM structures are uncovering both general and specific features of these channels. Fundamental folding principles, the arrangement of structural segments, key residues that influence ionic selectivity, gating, and binding sites for toxins and medically relevant ligands have now been firmly established. The advent of AlphaFold2 (AF2) models represents another significant step in computationally predicting protein structures. Comparison of experimental P-loop channel structures with their corresponding AF2 models shows consistent folding patterns in experimentally resolved regions. Despite this remarkable progress, many crucial structural details, particularly important for predicting the outcomes of mutations and designing new medically relevant ligands, remain unresolved. Certain methodological challenges currently hinder the direct assessment of such details. Until the next methodological breakthrough occurs, a promising approach to analyzing ion channel structures in greater depth involves integrating various experimental and theoretical methods.

Keywords: Ligand-channel interactions; sequence alignment; π -bulges; crystal structures; cryo-EM structures; potassium channels; sodium channels; calcium channels; TRP channels, ionotropic glutamate receptors

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПРОТОННОГО КАНАЛА ОТОР1

© 2024 г. К. Д. Сладков^{а, *}, С. С. Колесников^а

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: klimitrich@ya.ru

Поступила в редакцию 6.05.2024

После доработки 3.06.2024

Принята к публикации 10.06.2024

ОТОР1 — мембранный белок, функционирующий как протонный канал в ряде тканей. В частности, ОТОР1 вовлечен в трансдукцию кислых стимулов во вкусовых клетках млекопитающих. Структура белков семейства отопетринов представляет собой гомодимер из двух субъединиц, каждая из которых состоит из двух гомологичных α -бочек. В данном обзоре анализируется связь структуры и функции белка ОТОР1, рассматриваются предполагаемые пути транспорта протона, а также обсуждаются механизмы модуляции протонного тока и существующие кинетические модели ОТОР1. Имеющиеся данные позволяют рассматривать логический элемент исключающего ИЛИ (XOR) как функциональный эквивалент ОТОР1, который обеспечивает поток протонов, только если значения pH по разные стороны мембраны различаются.

Ключевые слова: ОТОР1, отопетрины, протонный канал, вкусовые клетки

DOI: 10.31857/S0233475524050047, **EDN:** cbwmef

ВВЕДЕНИЕ

Реакции протонирования—депротонирования определяют структуру и биологическую активность всех белков, а также регулируют метаболические реакции и заряд биологических мембран [1, 2]. Кроме того, в ряде физиологических процессов протон играет роль первичного медиатора [3]. Поэтому внутриклеточный гомеостаз протона и мониторинг внеклеточного pH являются важнейшими задачами физиологии клетки. Для мониторинга внеклеточного протона клетки используют несколько молекулярных сенсоров, включая гептаспиральные рецепторы нескольких типов и ионные каналы, активность которых зависит от pH внеклеточной среды, включая ASIC, TRP, K2P [4]. В механизмы, обеспечивающие гомеостаз протона, вовлечены транспортирующие протон системы нескольких типов, включая Na^+/H^+ -обменник, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -котранспортер, Na^+ -зависимый $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменник, H^+ -АТФ-азу вакуолярного типа [5] и протонные каналы [6]. До недавнего времени в геномах эукариот был идентифицирован единственный ген, кодирующий протонный канал, а именно H_v1 [7]. Однако исследования последних лет выявили, что белки отопетрины, открытые в 2003 году и функциональная роль которых была не вполне ясна [8], функционируют как протонные

каналы [9]. Данный обзор суммирует накопленные данные о структурно-функциональных характеристиках протонных каналов, формируемых отопетринами.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФУНКЦИИ ОТОР

Отопетрины были открыты при исследовании мышей линий *mlh* (порт. *mergulhador* «ныряльщик») и *tlh* (англ. *tilted* «наклонный»), у которых отсутствовали отолиты — кристаллы карбоната кальция, прикрепленные к волосковым клеткам вестибулярного аппарата. Смещения отолитов под действием силы тяжести или при ускорении тела служат сенсорным стимулом для механорецепторных волосковых клеток, которые обеспечивают мозг информацией о положении тела в пространстве. В отсутствие отолитов мыши утрачивали чувство равновесия, что проявлялось в неумении плавать и наклоне головы при сохранении морфологии улитки костного лабиринта, а также нормальной функции слуха и центральной вестибулярной системы. Генетический анализ выявил, что обе линии несут точечные мутации в гене, получившем название отопетрин-1 (*Otop1*) от греческих слов «*отос*» — ухо и «*петрос*» — камень [8]. Данные мутации приводят к неконсервативной замене аминокислоты в кодируемом белке ОТОР1, что ассоциируется

с нарушением процесса формирования отолитов. Роль OTOP1 в процессе формирования отолитов до сих пор неизвестна.

OTOP1 имеет два гомолога OTOP2 и OTOP3, для которых установлены 34 и 30% сходства аминокислотной последовательности с OTOP1 [8]. Наиболее изученным в семействе отопетринов является белок OTOP1, локализованный у мышей во внутреннем ухе, молочной железе, буром жире, а также во вкусовых клетках типа III. Гомологи OTOP1 также идентифицированы в организмах разных таксонов от дрозофилы до человека, и их функциональная роль в физиологии клетки окончательно не ясна.

Ряд фактов указывал, что OTOP1 вовлечен в процессы клеточного метаболизма, в частности в гомеостаз Ca^{2+} . Так, при гетерологичной экспрессии OTOP1 в клетках COS-7 наблюдалось уменьшение амплитуды их Ca^{2+} -ответов на АТР [10]. Исследование геномов людей с микродентией боковых резцов показало, что это нарушение развития коренных зубов чаще возникает у людей с точечной мутацией в гене *Otop1* [11]. Все эти факты поддерживают идею, что OTOP1 вовлечен в регуляцию внутриклеточного Ca^{2+} , хотя соответствующий механизм пока не идентифицирован. По всей видимости, физиологические функции OTOP1 этим не исчерпываются. Так, ген *Otop1* активно экспрессируется в бурой жировой ткани и тучных клетках мышей. Голодающие мыши с генетическим нокаутом гена *Otop1* испытывали достоверно большее понижение температуры тела и падение физической активности в сравнении с животными дикого типа. Усиление ответа на голодание исчезало, если нокаутные мыши ранее находились на высокожировой диете. Следствием инактивации гена *Otop1* был еще один феномен: максимальная скорость индуцированного FCCP дыхания митохондрий падала, хотя уровень потребления кислорода в покое сохранялся [12].

Демонстрация того, что OTOP1 и другие отопетрины функционируют как протонный канал, сместило акцент исследований с анализа их вклада в регуляцию внутриклеточного Ca^{2+} на выяснение их роли в гомеостазе протона. Хотя связь между двумя этими функциями пока не детализирована, таковая ясно прослеживается на примере мезенхимных клеток в личинках морского ежа, которые участвуют в формировании кальцитового скелета, нарабатывая аморфный CaCO_3 [13]. В этом процессе при создании 1 моль CaCO_3 вырабатывается 1.6 моль ионов H^+ . Было показано, что центральную роль в удалении избыточных протонов из клетки играет OTOP2 [13]. Возможно, OTOP1 играет

аналогичную роль в формировании отолитов, координируя изменения pH и концентрации кальция.

Во вкусовой почке млекопитающих вкусовые клетки типа III являются клеточными сенсорами кислых стимулов [14]. Оказалось, что именно эти клетки экспрессируют OTOP1, который является молекулярным детектором кислых веществ, функционируя как протонный канал [9]. Кислый стимул инициирует открытие OTOP1, тем самым обеспечивая поток протонов в цитозоль клетки и ее деполяризацию [9]. OTOP1 также может участвовать в формировании вкуса лакрицы, содержащей NH_4Cl , который при диссоциации в растворе высвобождает ион NH_4^+ . Плазмалемма клеток хорошо проницаема для NH_4^+ , который, проникая в цитозоль, вызывает ее защелачивание [15], тем самым создавая протонный градиент, достаточный, в случае вкусовых клеток, для инициации входящего тока H^+ через OTOP1. Таким образом, во вкусовых клетках OTOP1 функционирует как протонный канал, активирующийся либо при закислении среды вкусовой поры, либо при защелачивании цитозоля клеток типа III. В соответствии с электрохимическим градиентом протоны входят через активированный OTOP1 в клетку, деполяризуя ее, что запускает генерацию потенциалов действия, вход Ca^{2+} через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы и выброс нейротрансмиттера, кодирующего сенсорную информацию [16].

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Функция OTOP1 как протонного канала была верифицирована при изучении вкусовых клеток типа III мышей. Показано, что эти вкусовые клетки генерируют потенциалы действия (ПД) в ответ на понижение внеклеточного pH (pH_o) [17]. С целью выяснить механизмы этого явления, ионные токи через мембрану вкусовой клетки анализировались методом patch clamp при разных составах внеклеточного раствора [18]. В частности, показано, что величина входящего тока в ответ на различные кислоты, закислявшие внеклеточный раствор до pH_o 5, не зависела ни от типа аниона кислоты, ни от уровня экстраклеточного Na^+ . В то же время потенциал реверсии тока зависел от трансмембранного градиента протонов в соответствии с уравнением Нернста. При этом понижение pH_o сопровождалось уменьшением внутриклеточного pH (pH_i). В совокупности эти результаты свидетельствовали о высокой протонной проницаемости мембраны вкусовых клеток типа III, специализированных на детекции кислого. В 2018 году протонную проницаемость плазмалеммы вкусовых клеток типа III, придающую последним способность детектировать

кислое, удалось связать с экспрессией ОТОР1: вкусовые клетки мышей с *slt*-мутацией *Otop1* не генерировали электрические ответы на кислые стимулы [9].

Otop1 и его гомологи из разных организмов, включая дрозофилу *Drosophila melanogaster*, зебру-фиш *Danio rerio* и человека, были клонированы и гетерологично экспрессированы в клетках НЕК-293 и ооцитах лягушки *Xenopus tropicalis*. Рекombинантные отопетрины индуцировали в трансфицированных клетках отсутствующую в контроле протонную проводимость, которая по биофизическим свойствам была близка к таковой во вкусовых клетках типа III [9, 19, 20]. Это свидетельствовало о том, что электрофизиологические свойства протонного канала ОТОР1 эволюционно достаточно консервативны и слабо зависят от клеточного микроокружения.

Одним из ключевых свойств ОТОР1 является высокая протонная селективность, необходимая всем протонным каналам. Действительно, при нейтральном pH физиологические растворы содержат порядка 10^{-7} моль/л ионов H^+ и 0.1 моль/л Na^+ , т.е. на шесть порядков больше. Поэтому даже при относительно небольшой Na^+ -проницаемости протонный канал переносил бы преимущественно ионы Na^+ . Расчет относительной проницаемости канала из уравнения Гольдмана–Ходжкина–Катца показал, что при pH_o 5.5 проницаемость ОТОР1 для H^+ (P_H) по отношению к Na^+ (P_{Na}) не менее чем 2×10^5 [9]. Более того, отношение P_H/P_{Na} еще больше при щелочном pH_o, достигая 4×10^7 при pH_o 8.5 [21]. Эти оценки сопоставимы с таковыми, полученными для других протонных каналов, для которых $P_H/P_{Na} \approx 10^6$ [6].

При физиологических концентрациях ионов одиночные ионные каналы переносят токи в диапазоне 0.1–10 пА, в котором их можно детектировать с помощью современной электрофизиологической техники [22]. Величина протонного тока через одиночный канал ОТОР1 пока не оценена ни в прямых экспериментах (видимо, ток ниже детектируемого предела 0.1 пА), ни косвенно с использованием методов анализа флуктуаций [23]. Следует отметить, что транспорт ионов через ионный канал условно можно разбить на две стадии – независимую от потенциала диффузию иона к устью канала и перенос иона через пору канала под действием электрического поля. При малых концентрациях иона лимитирующей стадией является диффузия к устью, а при насыщающих – электродиффузия. Концентрация свободных протонов невысока, поэтому можно ожидать, что лимитирующей стадией, как и для большинства транспортирующих

протон белков, является диффузия. В этом случае ток через одиночный протонный канал при pH_o 7 должен быть порядка 10^{-4} пА [6].

Как и другие протонные каналы, ОТОР1 ингибируется ионами двухвалентных металлов во внеклеточном растворе, включая Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} и Cd^{2+} . Наиболее эффективный и обычно используемый при концентрации 1 мМ Zn^{2+} вызывает быстрое и обратимое подавление протонного тока через ОТОР1. ОТОР3 также ингибируется ионами Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} и Zn^{2+} , причем в сопоставимой степени [24]. Подобно другим протонным каналам, ингибирование токов через ОТОР1 внеклеточным Zn^{2+} сильно pH-зависимо [19, 25]. Формально этот феномен мог бы объясняться конкуренцией между протоном и цинком за единый центр связывания. Вполне возможно, что протонирование какой-либо из аминокислот, участвующей в координационном связывании Zn^{2+} может уменьшить аффинность его связывания с ОТОР1. Кроме того, снижение протонного тока в присутствии Zn^{2+} может частично быть обусловлено тем, что связанный цинк экранирует отрицательный заряд мембраны, вследствие чего падает локальная примембранная концентрация протонов и уменьшается электродвижущая сила протонного тока. В последнем случае IC₅₀ для Zn^{2+} должна зависеть от эффективного поверхностного заряда мембраны, который не является инвариантом и отличается у клеток разных типов [26]. Во всяком случае, для клеток НЕК-293 IC₅₀ = 73 мкМ, а для вкусовых клеток IC₅₀ = 266 мкМ [19]. В целом, механизм ингибирования протонного тока через ОТОР1 ионами Zn^{2+} остается дискуссионным.

В отличие от протонного канала вирусов М2 и человеческого Hv1 протонный канал ОТОР1 является слабо потенциал-чувствительным [9]. Об этом свидетельствует линейная вольт-амперная зависимость протонного тока через ОТОР1, которая генерировалась при поляризации ОТОР1-экспрессирующих клеток как пилообразным напряжением, так и серией импульсных потенциалов [9]. В последнем случае ток менялся практически со скоростью фиксации потенциала, что свидетельствовало об отсутствии потенциалзависимой активации ОТОР1.

При импульсном закислении внеклеточного раствора клетки НЕК-293, гетерологично экспрессирующие ОТОР1 мыши (mOTOP1), человека (HsOTOP1), цыпленка (GgOTOP1) или зебры-фиш (DrOTOP1), отвечали сходным образом: стимуляция первоначально инициировала быстрый рост входящего тока протонов, который по достижению пика сменялся на относительно медленное падение (рис. 1a–1g, левые панели). После возвращения pH_o

к нейтральному значению ток быстро снижался и падал практически до нуля. Повышение pH_i раствором NH_4Cl приводило к появлению входящего тока со сходной динамикой в случае ОТОР1 мыши, человека, цыпленка и намного меньшему току в случае зебры-фиш (рис. 1а-1г, правые панели).

Следуя [27], постулируем, что величина интегрального тока протонов I_H определяется следующим выражением, являющимся эмпирическим аналогом закона Ома для ионных токов [28]:

$$I_H = g_H (V_m - E_H) \quad (1)$$

$$E_H = \frac{RT}{F} \ln \frac{10^{pH_o}}{10^{pH_i}} = \ln 10 \frac{RT}{F} (pH_o - pH_i) \quad (2)$$

где g_H – протонная проводимость мембраны, индуцированная протонным каналом, V_m – трансмембранный потенциал, E_H – равновесный потенциал для протонов. Из уравнений (1) и (2) видно, что сила $(V_m - E_H)$ растет, если при постоянном E_H потенциал клетки становится более отрицательным или если при постоянном V_m падает pH_o или растет pH_i .

Концепция протондвижущей силы позволяет правильно предсказать направление протонного тока через отопетрины при определенных мембранном потенциале и градиенте концентраций H^+ . Так, в мезенхимных клетках морского ежа потенциал покоя составляет всего -20 мВ, что позволяет протонам выходить из клетки через ОТОР2 по градиенту протонов [13]. Во вкусовых клетках потенциал покоя около -60 мВ [29], что эквивалентно примерно 10-кратному градиенту протонов, поэтому ток протонов через ОТОР1 в основном входящий, даже при умеренных щелочных стимулах.

В рамках концепции силы также объяснимо, почему в клеточном ответе на кислый стимул (рис. 1а-1г, левые панели) первоначальная фаза роста сменяется на убывание тока через ОТОР1-содержащую мембрану. После подачи кислого стимула в начальный момент времени протондвижущая сила постоянна, и динамика тока определяется кинетикой изменения проводимости g_H при переходе протонного канала в открытое состояние. Далее вход протонов в цитозоль клетки приводит к постепенному повышению внутриклеточной концентрации H^+ и падению протондвижущей силы, следствием чего является убывание тока при установившейся проводимости (уравнение (1)). Когда

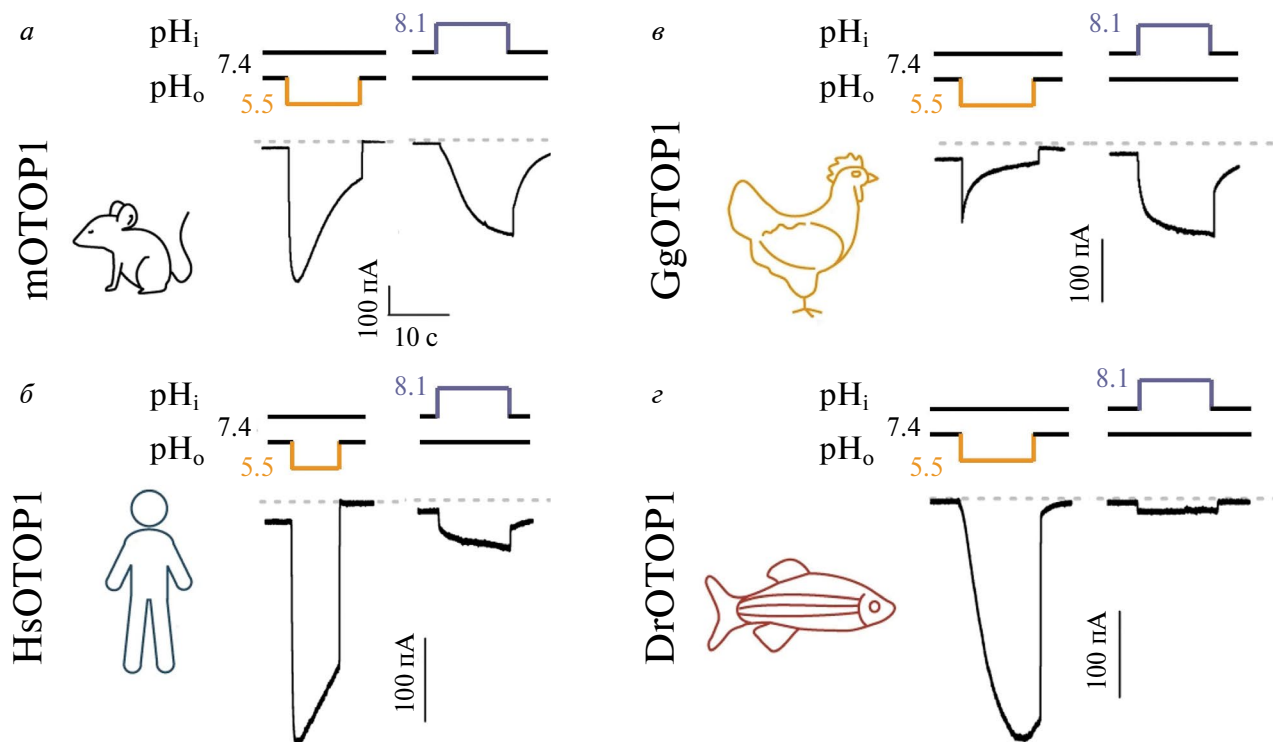


Рис. 1 Ответы клеток HEK-293, экспрессирующих ОТОР1 мыши (а), человека (б), цыпленка (в) или зебры-фиш (г) на аппликацию стимула с pH_o 5.5 или pH_i 8.1, как показано в (а) (модифицировано из [20] по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International License).

внешний кислый стимул снимается, протонный градиент падает и становится даже меньше такового в покое за счет закисления цитоплазмы, что приводит в некоторых случаях к существенному уменьшению протондвижущей силы и к падению протонного тока до уровня ниже тока в покое (рис. 1а-1г, левые панели). Эксперименты [27] подтвердили, что убывание тока действительно может быть предсказано по изменению электродвижущей силы.

В 2022 году впервые было показано, что ОТОР1-положительные клетки отвечают не только на кислые, но и на щелочные стимулы [27]. Более поздняя работа той же лаборатории [21] подтвердила, что повышение pH_o приводит к появлению протонного тока в клетках НЕК-293, экспрессирующих рекомбинантный ОТОР1.

Измеряя величину пикового протонного тока, инициированного стимулами разной интенсивности в эксперименте [21, 27], можно оценить величину протонной проводимости, зная потенциал на плазмалемме клетки и pH по обе стороны мембраны (уравнения (1) и (2)). В то время как pH_o — это контролируемый параметр внеклеточного раствора, величина pH_i , вообще говоря, неизвестна, хотя достаточно точную оценку pH_i можно получить, определив потенциал реверсии протонных токов [21]. В случае стимулов, защелачивающих цитозоль с помощью NH_4Cl , pH_i определялся при помощи pH -чувствительного флуоресцентного красителя [20]. На рис. 2 представлены оценки ОТОР1-индуцированной проводимости на основе измерения пикового протонного тока при различных pH_o , выполненных в работах [20, 21, 27]. Полученный график зависимости интегральной H^+ -проводимости от трансмембранной разности pH (рис. 2) позволяет сделать ряд заключений.

При нейтральном pH_o , достаточно близком к pH_i , протонная проводимость мембраны ОТОР1-положительных клеток была мала [21], указывая на незначительную активность ОТОР1. При подаче щелочного стимула возникал выходящий протонный ток, величина которого возрастала по мере усиления стимула (рис. 2). Вычисленная по уравнению (1) величина проводимости выходила на плато уже при $pH_o \sim 8$, что ожидаемо, поскольку выходящий протонный ток определялся pH_i (pH 7–7.3), который не должен был значительно меняться за счет внутриклеточного протонного буфера за время аппликации щелочного стимула. При понижении pH_o проводимость нелинейно росла с увеличением концентрации внеклеточного протона на 3 порядка (рис. 2) [27]. Это указывает, что внеклеточный протон является не только носителем тока, но и активатором ОТОР1. При

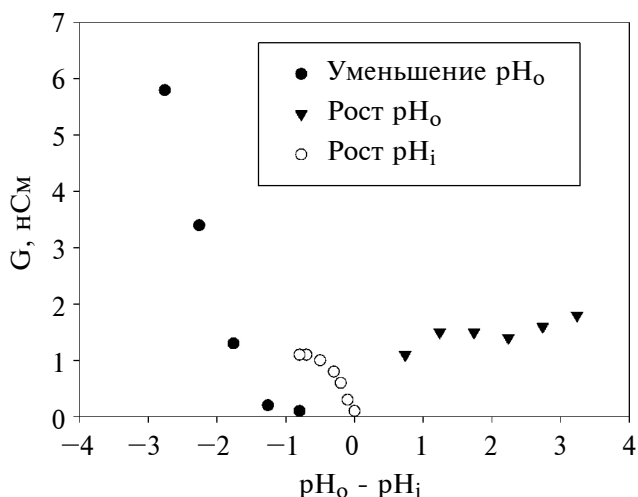


Рис. 2. Величина проводимости канала ОТОР1, экспрессированного в НЕК-293, при разных трансмембранных градиентах протона. Данные по кислым и щелочным стимулам [21] и NH_4^+ -стимулам [20] получены делением величины тока в пике на величину протондвижущей силы [21].

стимуляции клетки NH_4Cl ее протонная проводимость увеличивалась, хотя изменялся только pH_i [20]. Таким образом, активность ОТОР1 регулируется изменением концентрации протона по обе стороны мембраны.

СТРУКТУРА

Структура белков семейства отопетринов была расшифрована с использованием криоэлектронной микроскопии. В 2019 году Саотоме и др. изучали ОТОР1 зебры-фиш (*Danio rerio*) и ОТОР3 курицы (*Gallus gallus*) [30], а Чен и др. исследовали структуру ОТОР3 тропической лягушки (*Xenopus tropicalis*) XtОТОР3 [31]. Полученные структурные данные свидетельствуют, что четвертичная структура отопетринов представляет собой гомодимер из двух субъединиц [32]. Каждая субъединица включает 12 трансмембранных α -спиралей, образующих два структурно сходных домена по 6 спиралей, называемых N- и С-доменами (рис. 3а). Трансмембранные спирали обоих доменов расположены подобно доскам бочки. Таким образом, каждая субъединица ОТОР1 состоит из двух α -спиральных бочек (рис. 3б). Из-за высокой подвижности петель, соединяющих трансмембранные спирали, их структура разрешена слабо.

Внеклеточные и внутриклеточные петли отопетринов играют важную роль в функционировании белка. В каждой субъединице 12 трансмембранных спиралей соединяются 11 петлями, которые принято обозначать как $La-b$, где a и b — номера

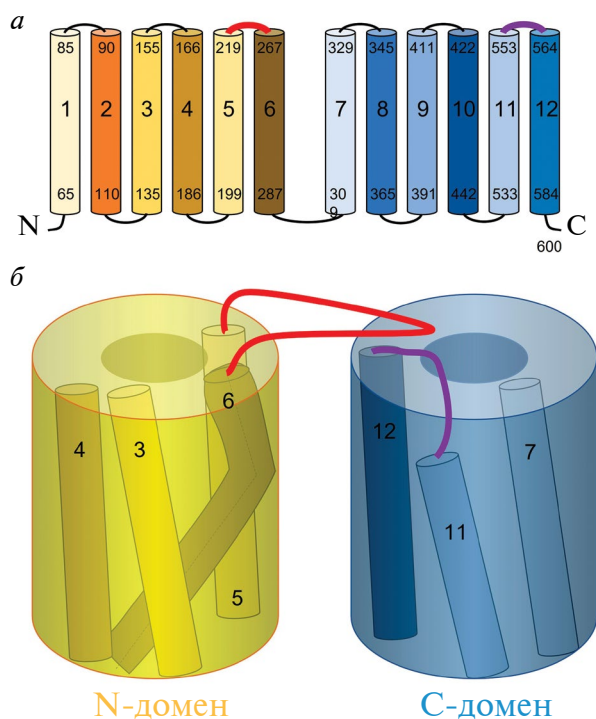


Рис. 3. *а* – ОТОР1 содержит 12 трансмембранных спиралей. *б* – Схематическое изображение образуемых спиралями α -бочек и петель, соединяющих трансмембранные спирали 5–6 (показано красным) и 11–12 (фиолетовым).

соединяемых петель. Аминокислотные замены гистидина H229 в петле L5–6 на глутамин, цистеин или глутаминовую кислоту приводили к существенному уменьшению величины протонной проводимости, индуцированной экспрессией ОТОР1 [15]. Аналогичное влияние оказывали мутации E568Q, D570N, E574Q, E575Q в петле L11–12 [15]. Роль этих петель прослеживается и в других отопетриках – в химерных каналах, полученных заменой L5–6 ОТОР3 на аналогичную петлю L5–6 ОТОР2, усиливается блокада протонного тока цинком [24]. Замена других петель не приводит к столь выраженным эффектам, что свидетельствует о ключевой роли L5–6 и L11–12 в модуляции тока через ОТОР1.

ТРАНСПОРТНЫЕ ПУТИ

Механизм переноса протона в протонных каналах до сих пор не вполне ясен. Согласно классическому механизму Гротгуса протон переносится по цепочке молекул воды по эстафетному механизму [33]. В некоторых транспортирующих протон белках водные цепочки прерываются аминокислотой, которая протонируется и депротонируется в процессе переноса протона [6]. Поскольку неизвестны протонные каналы, не имеющие водной

цепочки в транспортном пути протона, одним из способов идентификации потенциальных транспортных путей протона в канальном белке является поиск водных цепочек в его структуре. Такой поиск, опирающийся на моделирование методом молекулярной динамики, показал наличие водных цепочек внутри доменов субъединицы ОТОР1 и их отсутствие между субъединицами, где их образованию препятствуют липиды мембраны [30]. В каждой субъединице ОТОР1 идентифицировано три водные цепочки, которые теоретически могли бы формировать трансмембранные пути для транспорта протона через ОТОР1.

Увеличение активности в ответ на любое отклонение pH_0 от нейтрального – уникальная особенность ОТОР1. Из литературы известен лишь один пример подобной pH -зависимости – это двупоровый (two-pore domain) K^+ -канал, формируемый гетеродимеризацией субъединиц TREK1 и TREK2 и активирующийся в ответ на закисление и защелачивание внеклеточного раствора [34]. Гетеродимер TREK1/TREK2 увеличивает K^+ -проводимость мембраны при отклонении pH_0 в обе стороны от нейтрального. В структуре ОТОР1 также имеются два домена, которые могут формировать протонную пору между собой (пути 2 и 8 на рис. 4) и/или формировать транспортный путь протона внутри домена (пути 1 и 3, 7 и 9 на рис. 4). При нейтральных pH_0 внеклеточная поверхность N-домена заряжена в среднем положительно, а С-домена – отрицательно [15], что может определять особенности взаимодействия протонов с доменами. Если, подобно TREK1/TREK2, транспортный канал в ОТОР1 формируется в междоменном/субъединичном пространстве (пути 2 и 8/4–6 на рис. 4), его эффективность должна зависеть от кооперативного взаимодействия обоих доменов. Если транспортный путь протонов существует в каждом из доменов, то ОТОР1 мог бы функционировать как два независимых протонных канала, каждый из которых активируется при соответствующих отклонениях pH_0 от нейтрального. Экспрессия отдельных доменов ОТОР1 в гетерологичной системе могла бы проверить эту гипотезу.

Верификация потенциальных транспортных путей возможна с использованием блокаторов. Влияние мембранного потенциала на блокаду токов позволяет локализовать место связывания блокатора: если блокатор связывается внутри транспортной поры, ожидается, что блокада потенциал-зависима, отсутствие таковой говорит, что блокатор, скорее всего, связывается на внемембранных петлях канального белка. Как уже отмечалось, ток через ОТОР1 ингибируется внеклеточным цинком – специфическим блокатором протонных каналов.

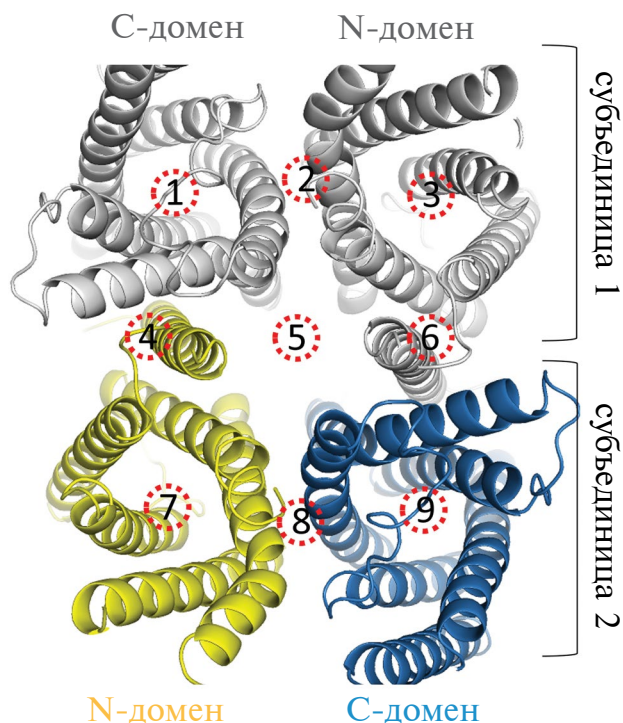


Рис. 4. Структура ОТОР1 (вид с наружной стороны мембраны). Возможные транспортные пути протона отмечены цифрами 1–9. Как показано в работе [30], пути 4–6 закрыты молекулами холестерина, остальные пути образуют водные цепочки.

При концентрации 1 мМ цинк снижает протонный ток на 80% [9]. Имеющаяся информация о потенциал-чувствительности цинковой блокады ОТОР1 противоречива. В более ранней работе [21] утверждается, что эффективность ингибирования протонных токов в ОТОР1-положительных клетках НЕК-293 ионами Zn^{2+} остается равным 70–80% при изменении потенциала с -40 до $+40$ мВ. Более поздняя работа констатирует, что ингибирование цинком протонного тока в клетках СНО, экспрессирующих рекомбинантный ОТОР1, наоборот, снижается с 75 до 55% при росте потенциала от -100 до -40 мВ [35].

Согласно работе [24], ионы двухвалентных металлов Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} также блокируют протонный ток в mOTOP3, при этом ни один из ионов не дает эффективности блокады выше 80% при концентрации вплоть до 1 мМ. Такая неспецифическая чувствительность к двухвалентным катионам и неполное ингибирование наводят на мысль, что имеет место аллостерическое ингибирование, при котором сайт связывания двухвалентных ионов лежит вне транспортного пути протона. Возможно также, что связывание сильно ослаблено конкуренцией с протоном. С другой стороны, краситель cibacron blue 3G-A ингибирует токи на 90% при

концентрации 100 мкМ с $IC_{50} = 5$ мкМ в широком диапазоне pH и потенциал-независимо [35]. Вероятно, краситель связывается на внеклеточной поверхности белка и перекрывает транспортные пути протона, являясь специфичным ингибитором ОТОР1. Нельзя исключить возможность существования нескольких путей транспорта протона через ОТОР1, которые в разной степени чувствительны к блокаторам.

Определить место связывания блокатора можно, сравнивая функциональные характеристики белка дикого типа и его мутантов. Известно, что реагент MTSET не связывается с остатком D558 у вершины С-домена ОТОР1, но связывается с цистеином в том же положении при мутации D558С. Оказалось, что предварительная обработка MTSET приводит к падению тока через ОТОР1 D558С, инициируемого кислыми стимулами, но не через ОТОР1 дикого типа. Это позволило авторам сделать вывод, что транспортный путь протона при аппликации кислого стимула должен быть локализован в положительно-заряженном С-доме [15]. Дальнейший мутагенез и анализ влияния точечных мутаций на активность ОТОР1 могут ответить на вопрос о связи структуры и функции этого белка, включая вопрос о пути переноса протона.

ТОЧЕЧНЫЕ МУТАЦИИ

Внесение точечных мутаций в первичную структуру белка позволяет идентифицировать аминокислоты, которые играют ключевую роль в формировании его пространственной топологии и функциональной активности. Таблица 1 суммирует описанные в литературе точечные мутации белков семейства отопетринов с указанием их положения в структуре и ассоциированных изменений функции мутированного белка. Указан в основном эффект точечных мутаций в ответах на кислые стимулы. Это связано с тем, что большая часть этих работ опубликована до 2022 года, когда появились первые сведения об активации ОТОР1 щелочными стимулами.

Предполагается, что ключевые для функционирования аминокислоты должны быть консервативны для разных отопетринов. Действительно, замена положительно заряженного аргинина R586Е в mOTOP1 и эквивалентных R667А в XhOTOP3 и R598Р в HsOTOP1 на отрицательно заряженные или незаряженные остатки приводит к нарушению функции канала во всех трех вариантах белка [11, 30, 31].

REY-триада, включающая аргинин, глутаминовую кислоту и тирозин, участвует в формировании протонного пути в Hv1, бактериородопсине и потенциал-чувствительном домоне Kv1 [37].

Таблица 1. Точечные мутации в ОТОР1*

Аналог в mOTOP1	Мутация	Положение	Влияние	Ссылка
A151E	A151E	N-домен, наружу TM3,	Смещает локализацию белка с апикальной ближе к базальной, tlt-мутация.	[36]
A151E	A151E	N-домен, наружу TM3,	Устраняет токи в ответ на кислые и щелочные стимулы, tlt-мутация.	[21]
E219K	E219K	N-домен, наружу TM5,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[30]
K221A	K221A	N-домен, наружу L5-6,	Приводит к исчезновению токов в ответ на щелочные стимулы, но сохраняет токи в ответ на кислые.	[21]
H222A	H222A	N-домен, наружу L5-6,	Не приводит к исчезновению токов в ответ на щелочные стимулы.	[21]
H222A	mOTOP3 H234A	N-домен, наружу L5-6,	Устраняет потенциацию цинком токов в ответ на кис-лый стимул.	[24]
E226A	mOTOP3 E238A	N-домен, наружу L5-6,	Устраняет потенциацию цинком токов в ответ на кис-лый стимул.	[24]
H227 Q/C/E	HsOTOP1 H229 Q/C/E	N-домен, наружу L5-6,	Приводит к падению чувствительности в ответ на кислый стимул.	[15]
H227 R/K	HsOTOP1 H229 R/K	N-домен, наружу L5-6,	Не приводит к падению чувствительности к кислым стимулам.	[15]
E274A	DrOTOP1 E267A	N-домен, посередине TM6,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[30]
E274Q	XtOTOP3 E321Q	N-домен, посередине TM6,	Устраняет токи в ответ на кислые стимулы.	[31]
E274D	XtOTOP3 E321D	N-домен, посередине TM6,	Не устраняет токи в ответ на кислые стимулы.	[31]
R292A	R292A	N-домен, в цитозоль L6-7,	Устраняет токи в ответ на NH ₄ -стимулы. Меняет скорость убывания тока в ответ на кислые стимулы.	[20]
Y330A	HsOTOP1 Y332A	C-домен, наружу L7-8,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[15]
Y349C	HsOTOP1 Y351C	C-домен, наружу TM8,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[15]
D388N	D388N	C-домен, в цитозоль L8-9,	Меняет скорость убывания тока в ответ на кислые стимулы.	[31]
L408Q	L408Q	C-домен, наружу TM9,	Устраняет токи в ответ на кислые и щелочные стимулы, mlh-мутация.	[21]
L408Q	L408Q	C-домен, наружу TM9,	Сдвигает локализацию белка с апикальной ближе к базальной, mlh-мутация.	[36]
E433R	E433R	C-домен, внутри TM10,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[30]
E433R+R586E	E433R+R586E	C-домен, внутри TM10,	Не меняет токи в ответ на кислые стимулы.	[30]
Q437 N/E	XtOTOP3 Q558 N/E	C-домен, внутри TM10,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[31]
R554A	R554A	C-домен, наружу L11-12,	Устраняет токи в ответ на щелочные стимулы, но сохраняет токи в ответ на кислые.	[21]
R554H	R554H	C-домен, наружу L11-12,	Усиливает потенциацию цинком токов в ответ на кислый стимул.	[24]
D558N	HsOTOP1 D570N	C-домен, наружу L11-12,	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[15]

Таблица 1. Окончание

D558C+MTSET	HsOTOP1 D570C+MTSET	С-домен, L11-12, наружу	Устраняет токи в ответ на кислые стимулы при обработке MTSET.	[15]
Y585 A/Q	XtOTOP3 Y666 A/Q	С-домен, TM12, внутри	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[31]
R586E	R586E	С-домен, TM12, внутри	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[30]
R586P	HsOTOP1 R598P	С-домен, TM12, внутри	Приводит к микроденитии боковых резцов.	[11]
R586A	XtOTOP3 R667A	С-домен, TM12, внутри	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[31]
H588A	DrOTOP1 H574A	С-домен, TM12, внутри	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[30]
H588A	HsOTOP1 H600A	С-домен, TM12, внутри	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[15]
H588 D/E/K/N/Q/R	HsOTOP1 H600 D/E/K/N/Q/R	С-домен, TM12, внутри	Не меняет токи в ответ на кислые стимулы.	[15]
H588 A/Q	XtOTOP3 H669 A/Q	С-домен, TM12, внутри	Устраняет токи, инициируемые кислыми стимулами.	[31]

*Имеющиеся данные получены при использовании различных изоформ OTOP1 (человеческий HsOTOP1, мышиный mOTOP1, зебра-фиш DrOTOP1) и даже для разных представителей семейства (OTOP1, OTOP2, OTOP3). Поэтому в таблице также приводятся аминокислоты, расположенные в положении, аналогичном ее положению в последовательности белка mOTOP1 (UniProt идентификатор Q80VM9). Аналогичное положение определялось выравниванием последовательностей веб-инструментом Align на сайте UniProt.

В структуре OTOP1 есть высококонсервативная пара аминокислот из этой триады, находящихся близко друг к другу внутри обоих N- и С-доменов [30]. В С-домене мутации аргинина и глутаминовой кислоты по отдельности приводили к потере токов в ответ на кислое, в то время как двойная мутация E433R+R586E не затрагивала транспортную функцию канала. Это указывает на участие REY-триады в формировании транспортного пути протона в С-домене. Аналогичные точечные замены в N-домене приводили к уменьшению токовых ответов на кислые стимулы, и этот функциональный эффект сохранялся и при двойной мутации [30]. С другой стороны, аминокислоты, мутации в которых приводят к исчезновению токов в ответ на щелочные стимулы, находятся и в N-, и в С-домене, но вблизи междоменной поверхности. Возможно, при повышении pH_0 открывается транспортный путь между доменами.

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ OTOP1

Анализ механизмов регуляции OTOP1 осложняется тем, что протон является носителем тока через отопетрины и одновременно их модулятором. Как уже отмечалось (рис. 1), при ступенчатом закислении внеклеточного раствора протонный ток сначала растет (активация тока), потом величина тока убывает до некоторой постоянной величины, и после прекращения стимуляции релаксирует

к первоначальному уровню. Активацию тока обычно связывают с увеличением протонной проводимости мембраны, а его убывание и релаксацию — с изменением протондвижущей силы.

Активация тока отражает переход протонного канала в открытое состояние под действием внеклеточного протона [27]. Первоначальная фаза роста тока удовлетворительно описывается одной экспоненциальной зависимостью, предполагая единственную лимитирующую стадию при переходе канала в открытое состояние. Ее характерное время зависит от pH_0 : чем кислее подаваемый внеклеточный раствор, тем быстрее активируется канал [27]. В случае щелочного стимула, включение тока также pH_0 -зависимо и происходит за сопоставимые времена порядка 100 мс [21] (рис. 4).

Последовательность внутримолекулярных событий, приводящих к активации отопетринов при отклонении pH_0 от нейтрального, пока неизвестна в деталях. Мало сомнения в том, что остатки гистидина во внеклеточных петлях белка важны для регуляции активности отопетринов, поскольку pK_a этой аминокислоты находится в области нейтральных pH. В статье Li предположено [15], что регуляцию OTOP1 обеспечивают петли L5–6 и L11–12. Сравнение аминокислотных последовательностей OTOP1 разных видов животных показало высокую консервативность гистидина H227, расположенного в петле L5–6. Точечные

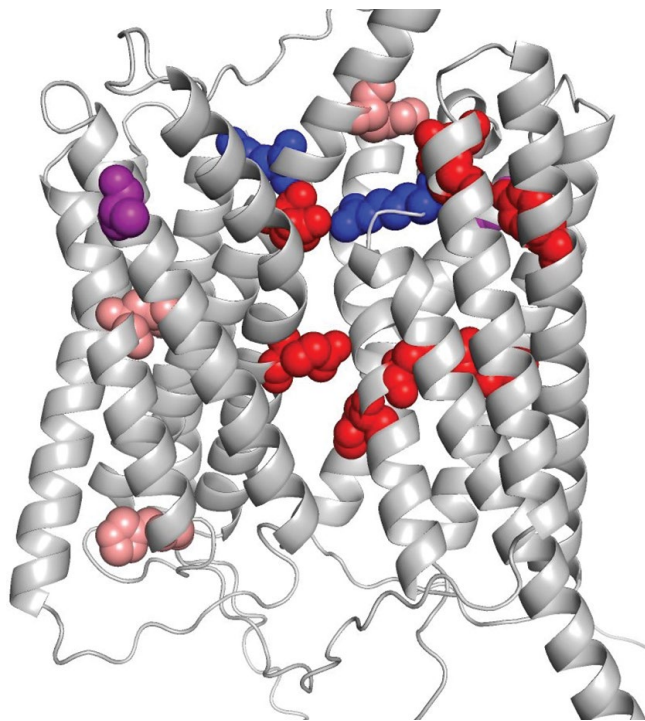


Рис. 5. Аминокислоты, точечные мутации в которых приводят к изменению функции канала ОТОР1, выделены цветом. Аминокислотные остатки, выделенные красным, приводят к исчезновению токов, инициированных кислыми стимулами, синим — щелочными. Выделенные розовым остатки модулируют ответы на кислые стимулы, а выделенные фиолетовым — меняют уровень экспрессии белка.

мутации H227Q/C/E с потерей положительного заряда приводят к исчезновению ответов ОТОР1 на кислые стимулы, в то время как сохранение заряда при заменах H227R/K сохраняет ответы. Протонирование гистидина, которое происходит при тех же кислотностях раствора, что и активация канала, меняет способность гистидина образовывать связи с E563 или F568 в петле L11–12, что, предположительно, влияет на положение внеклеточных петель, перекрывающих транспортные пути [15]. Экспериментально это трудно проверить, поскольку в криоэлектронных структурах ОТОР1 петли не разрешены в силу их высокой подвижности. Тем не менее подвижность петель и наличие в них консервативных аминокислот, изменяющих состояние при смене pH_o , являются необходимыми условиями для выполнения ими роли воротного механизма в транспортной системе ОТОР1.

Активность отопетринов модулируется ионами Zn^{2+} сложным образом, проявляющимся в форме ингибирования протонного канала, его потенциации или модуляции его активации [24]. Ингибирование подробно рассмотрено выше, потенциация заключается в увеличении величины тока после удаления внеклеточного цинка, а модуляция

проявляется как изменение времени достижения пикового тока в присутствии Zn^{2+} . Модуляция и потенциация предполагаются различными процессами, поскольку точечные мутации H222A и E226A расположенных в петле L5–6 остатков ОТОР3 снижают эффективность цинковой потенциации, но не меняют время достижения пикового тока [24].

Из ограниченных данных следует, что Zn^{2+} потенцирует ОТОР1 рН-зависимым образом — эффект наблюдается при pH_o 5.5 и отсутствует при pH_o 6.0. В то же время точечная мутация R554H в петле L11–12 приводит к тому, что Zn^{2+} потенцирует ОТОР1 и при pH_o 5.5. Это подтверждает роль петли L11–12 в модуляции токов через отопетрины. Некоторую роль в потенциации цинком играет и петля L5–6: соседний с H227 аминокислотный остаток глутаминовой кислоты E226 участвует в связывании ОТОР3 с Zn^{2+} , так как его мутация приводит к ослабеванию потенциации [24]. Возможно, потенциация связана с тем, что связывание Zn^{2+} инициирует такие конформационные перестройки молекулы отопетрина, которые открывают дополнительные транспортные пути, которые в норме недоступны для протона или менее эффективны.

Как уже отмечалось выше, убывание протонного тока в присутствии стимула (рис. 1) может быть объяснено качественно и количественно падением протондвижущей силы вследствие закисления цитозоля входящим потоком протонов, т.е. не требует изменения активности ОТОР1. Между тем замена аргинина-292 на аланин на внутриклеточной стороне ОТОР1 заметно замедляет убывание протонного тока [20], указывая на существование внутриклеточного механизма его регуляции. Представляется, что R292 является молекулярным сенсором pH_i , ответственным за уменьшение активности канала в ответ на закисление цитозоля.

Следует отметить, что при мутации R292A защелачивание цитозоля раствором NH_4Cl перестает инициировать ток через ОТОР1. Перенос NH_4^+ через мембрану связывается с его частичной диссоциацией во внеклеточном растворе до аммиака и диффузией газообразного NH_3 через мембрану в цитозоль, что приводит к росту pH_i [20]. Однако механизм такого переноса может быть несколько сложнее. В растворах NH_4^+ близок к K^+ по ряду свойств (ионный радиус, подвижность в воде, гидратируемость) и может заменять его в транспортных процессах, осуществляемых K^+ -каналами и переносчиками, например в Na^+ - K^+ -2Cl- котранспортере. NH_4^+ также может заменять H^+ при Na^+/H^+ -обмене [38]. Тем не менее изменение pH_i с помощью флуоресцентных зондов

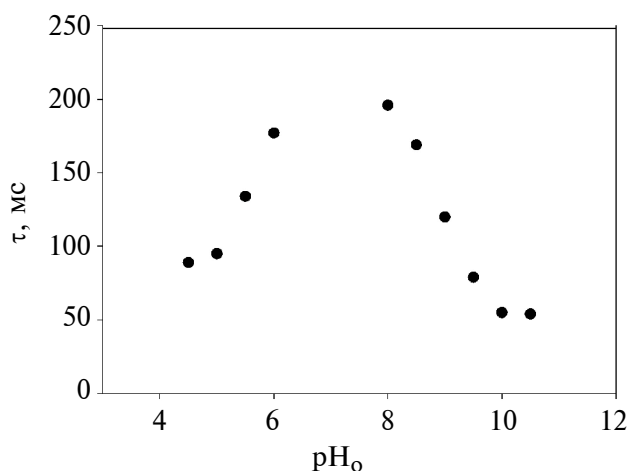


Рис. 6. Постоянные времени активации тока через ОТОР1, инициированного стимулами с различным pH_0 .

подтвердило, что внеклеточные NH_4^+ -стимулы защелачивают цитозоль [20]. Следовательно, неспособность R292A-мутантов ОТОР1 активироваться в ответ на NH_4Cl подтверждает идею, что R292 является молекулярным сенсором внутриклеточного протона, ответственным за снижение активности канала при понижении pH_i и его активацию при повышении pH_i . Влияние pH_i на проводимость ОТОР1 во вкусовых клетках может играть роль в известном с XIX века эффекте [39], что сильные и слабые кислоты, инициирующие разные изменения pH_i , воспринимаются на вкус как вещества с разной кислотностью при одинаковых pH_0 .

МОДЕЛИ

На сегодняшний день в литературе представлены две кинетические модели функционирования ОТОР1, предложенные в работе Тенга и соавторов [24] и в статье Сладкова [40]. Обе модели используют упрощающую аксиоматику, постулируя, что величина протонного тока определяется законом Ома, т.е. пропорциональна величине проводимости и протондвижущей силе (уравнение (1)). Разумеется, закон Ома является упрощением реального транспортного процесса, в то время как уравнение Гольдмана—Ходжкина—Катца точнее описывает ток через ионный канал в условиях заметного трансмембранного концентрационного градиента носителей. Хотя обе модели используют выражение для протондвижущей силы в виде разности мембранного потенциала и потенциала Нернста при данном протонном градиенте, модель Тенга предполагает величину потенциала реверсии постоянной. В противоположность этому, модель Сладкова предполагает, что потенциал реверсии

может меняться из-за закисления клетки. В связи с этим отличается объяснение убывания тока: модель Тенга предполагает, что убывание тока в ответ на кислый стимул обусловлено внутренней системой инактивации, связанной с освобождением активирующего сайта от цинка. В другой модели предполагается, что убывание тока связано с закислением цитозоля и убыванием электродвижущей силы. Обе модели постулируют, что разность потенциалов на мембране клетки влияет только на величину электродвижущей силы, но не на вероятность открытого состояния, т.е. пренебрегают потенциал-чувствительностью канала. Кроме того, в модели Тенга предполагается наличие одного места связывания протона и двух мест связывания цинка: связывание с одним приводит к мгновенной блокаде канала, связывание со вторым ускоряет переход в открытое состояние. Вторая модель — модель марковских переходов между состояниями, количество которых в ОТОР1 не верифицировано. Следует отметить, что обе модели неверно описывают активацию канала в ответ на щелочные стимулы. Требуется их модификация, чтобы адекватно описать феноменологию активности ОТОР1, имеющуюся на данный момент.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытое в 2018 г. свойство ОТОР1 переносить через мембрану протоны, возникающее при закислении внеклеточного раствора, было впоследствии дополнено обнаружением способности ОТОР1 активироваться в ответ на защелачивание раствора по обе стороны от мембраны. Полученные в 2019 г. структуры ОТОР1 обозначили структурные единицы, которые могут определять функционал белка, установленный в экспериментах. Полученные данные обогатили представление о том, как ОТОР1 преобразует информацию о трансмембранном протонном градиенте в величину протонной проводимости плазмалеммы клетки. Пока трансмембранный градиент близок к нулевому, канал закрыт. Изменение pH_0 или pH_i в любую сторону от нейтрального приводит к открыванию канала и переносу протона через мембрану. Когда pH по обе стороны плазмалеммы выравнивается, канал снова закрывается. Если рассмотреть регуляторную систему ОТОР1 как логический элемент, получающий на вход информацию о закислении раствора внутри и снаружи клетки и определяющий вероятность открытого состояния протонного канала, такой элемент выполняет операцию исключающего ИЛИ — логической бинарной операции, также известной как XOR [41]. Совершение регуляторной системой операции исключающего ИЛИ позволяет ОТОР1

активироваться только при наличии трансмембранного протонного градиента и деактивироваться при его исчезновении. Это свойство позволяет OTOPI выполнять на мембране вкусовых клеток не только функцию сенсора кислого, но и служить элементом системы адаптации к кислому.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при частичной поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00032).

Соответствие принципам этики. В работе не проводились эксперименты с животными и людьми.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Whitten S.T., García-Moreno E.B., Hilser V.J. 2005. Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **102** (12), 4282–4287.
- Baca J.M., Ortega A.O., Jiménez A.A., Principal S.G. 2022. Cells electric charge analyses define specific properties for cancer cells activity. *Bioelectrochem.* **144**, 108028.
- Soto E., Ortega-Ramírez A., Vega R. 2018. Protons as messengers of intercellular communication in the nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 342.
- Pattison L.A., Callejo G., St John Smith E. 2019. Evolution of acid nociception: ion channels and receptors for detecting acid. *Philos. Trans. R. Soc. B*. **374** (1785), 20190291.
- Ruffin V.A., Salameh A.I., Boron W.F., Parker M.D. 2014. Intracellular pH regulation by acid-base transporters in mammalian neurons. *Front. Physiol.* **5**, 74282.
- Decoursey T.E. 2003. Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways. *Physiol. Rev.* **83** (2), 475–579.
- DeCoursey T.E. 2018. Voltage and pH sensing by the voltage-gated proton channel, H_v1 . *J. R. Soc. Interface*. **15** (141), 20180108.
- Hurle B., Ignatova E., Massironi S.M., Mashimo T., Rios X., Thalmann I., Thalmann R., Ornitz D.M. 2003. Non-syndromic vestibular disorder with otoconial agenesis in tilted/mergulhador mice caused by mutations in otopenin 1. *Hum. Mol. Genet.* **12** (7), 777–789.
- Tu Y.H., Cooper A.J., Teng B., Chang R.B., Artiga D.J., Turner H.N., Mulhall E.M., Ye W., Smith A.D., Liman E.R. 2018. An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science*. **359**, 1047–1050.
- Hughes I., Saito M., Schlesinger P.H., Ornitz D.M. 2007. Otopenin 1 activation by purinergic nucleotides regulates intracellular calcium. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **104** (29), 12023–12028.
- Kim S., Ahn H., Kim D., Cho S.W., Kim S. 2024. OTOPI: A new candidate gene for non-syndromic peg lateralitis. *Research Square*. doi 10.21203/rs.3.rs-3811797/v1.
- Tu Y.H., Liu N., Xiao C., Gavrilova O., Reitman M.L. 2023. Loss of Otopenin 1 affects thermoregulation during fasting in mice. *Plos One*. **18** (10), e0292610.
- Chang W.W., Matt A.S., Schewe M., Musinszki M., Grüssel S., Brandenburg J., Garfield D., Bleich M., Baukowitz T., Hu M.Y. 2021. An otopenin family proton channel promotes cellular acid efflux critical for biomineralization in a marine calcifier. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **118** (30), e2101378118.
- Liman E.R., Kinnamon S.C. 2021. Sour taste: Receptors, cells and circuits. *Curr. Opin. Physiol.* **20**, 8–15.
- Li B., Wang Y., Castro A., Ng C., Wang Z., Chaudhry H., Agbaje Z., Ulloa G.A., Yu Y. 2022. The roles of two extracellular loops in proton sensing and permeation in human Otopenin 1 proton channel. *Commun. Biol.* **5**, 1110.
- Taruno A., Nomura K., Kusakizako T., Ma Z., Nureki O., Foksett J.K. 2021. Taste transduction and channel synapses in taste buds. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* **473**, 3–13.
- Yoshida R., Miyauchi A., Yasuo T., Jyotaki M., Murata Y., Yasumatsu K., Shigemura N., Yanagawa Y., Obata K., Ueno H., Margolske R.F. 2009. Discrimination of taste qualities among mouse fungiform taste bud cells. *J. Physiol.* **587** (18), 4425–4439.
- Chang R.B., Waters H., Liman E.R. 2010. A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **107**(51), 22320–22325.
- Teng B., Wilson C.E., Tu Y.H., Joshi N.R., Kinnamon S.C., Liman E.R. 2019. Cellular and neural responses to sour stimuli require the proton channel Otopenin 1. *Curr. Biol.* **29** (21), 3647–3656.
- Liang Z., Wilson C.E., Teng B., Kinnamon S.C., Liman E.R. 2023. The proton channel OTOPI is a sensor for the taste of ammonium chloride. *Nat. Comm.* **14** (1), 6194.
- Tian L., Zhang H., Yang S., Luo A., Kamau P.M., Hu J., Luo L., Lai R. 2023. Vertebrate OTOPI is also an alkali-activated channel. *Nat. Comm.* **14** (1), 26.
- Sakmann B., Neher E. (ed.). 2009. *Single-channel recording*. 2nd ed. New York etc.: Springer-Science and Business Media. 700 p.
- Machtens J.-Ph., Fahlke C., Kovermann P. 2011. Noise analysis to study unitary properties of transporter-associated ion channels. *Channels*. **5** (6), 468–474.
- Teng B., Kaplan J.P., Liang Z., Chyung K.S., Goldschen-Ohm M.P., Liman E.R. 2023. Zinc activation

- of OTOP proton channels identifies structural elements of the gating apparatus. *Elife*. **12**, e85317.
25. Bushman J.D., Ye W., Liman E.R. 2015. A proton current associated with sour taste: Distribution and functional properties. *FASEB J.* **29**, 3014–3026.
 26. Hughes M.P. 2024. The cellular zeta potential: cell electrophysiology beyond the membrane. *Integr. Biol.* **16**, 1–11.
 27. Teng B., Kaplan J.P., Liang Z., Krieger Z., Tu Y.H., Burendei B., Ward A.B., Liman E.R. 2022. Structural motifs for subtype-specific pH-sensitive gating of vertebrate otopetrin proton channels. *eLife*. **11**, 77946.
 28. Hille B. 1992. *Ionic channels of excitable membranes*. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 607 p.
 29. Ohtubo Y. 2021. Slow recovery from the inactivation of voltage-gated sodium channel Nav1.3 in mouse taste receptor cells. *Pflügers Archiv – Eur. J. Physiol.* **473** (6), 953–968.
 30. Saotome K., Teng B., Tsui C.C., Lee W.H., Tu Y.H., Kaplan J.P., Sansom M.S.P., Liman E.R., Ward A.B. 2019. Structures of the otopetrin proton channels Otop1 and Otop3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 518–525.
 31. Chen Q., Zeng W., She J., Bai X.C., Jiang Y. 2019. Structural and functional characterization of an otopetrin family proton channel. *Elife*. **8**, e46710.
 32. Delemotte L. 2019. Outlining the proton-conduction pathway in otopetrin channels. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26** (7), 528–530.
 33. Kratochvil H.T., Watkins L.C., Mravic M., Thomaston J.L., Nicoludis J.M., Somberg N.H., Liu L., Hong M., Voth G.A., DeGrado W.F. 2023. Transient water wires mediate selective proton transport in designed channel proteins. *Nat. Chem.* **15** (7), 1012–1021.
 34. Levitz J., Royal P., Comoglio Y., Wdziekonski B., Schaub S., Clemens D.M., Isacoff E.Y., Sandoz G. 2016. Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **113** (15), 4194–4199.
 35. Islam M.M., Sasaki O., Yano-Nashimoto S., Okamatsu-Ogura Y., Yamaguchi S. 2023. Cibacron blue 3G-A is a novel inhibitor of Otopetrin 1 (OTOP1), a proton channel. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **665**, 64–70.
 36. Kim E., Hyrc K.L., Speck J., Salles F.T., Lundberg Y.W., Goldberg M.P., Kachar B., Warchol M.E., Ornitz D.M. 2011. Missense mutations in Otopetrin 1 affect subcellular localization and inhibition of purinergic signaling in vestibular supporting cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **46** (3), 655–661.
 37. Kariev A.M., Green M.E. 2019. Quantum calculation of proton and other charge transfer steps in voltage sensing in the Kv1.2 channel. *The Journal of Physical Chemistry B*, **123** (38), 7984–7998.
 38. Weiner I.D., Verlander J.W. 2017. Ammonia transporters and their role in acid-base balance. *Physiol. Rev.* **97** (2), 465–494.
 39. Richards T.W. 2002. The relation of the taste of acids to their degree of dissociation. *J. Phys. Chem.* **4** (3), 207–211.
 40. Сладков К.Д., Колесников С.С. 2023. Модель молекулярного сенсора протона. *Биол. мембраны*. **40** (3), 188–193.
 41. Graham I., Duke T. 2005. The logical repertoire of ligand-binding proteins. *Phys. Biol.* **2** (3), 159.

Structure and Function of the Proton Channel OTOPI

© 2024 г. К. Д. Сладков¹, *, С. С. Колесников¹

¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

*e-mail: klimitrich@ya.ru

OTOP1 belongs to the otopetrin family of membrane proteins that form proton channels in cells of diverse types. In mammals, OTOPI is involved in sour transduction in taste cells and contributes to otoconia formation in the inner ear. From the structural point of view, otopetrins, including OTOPI, represent a quasi-tetramer consisting of four α -barrels. The exact transport pathways mediating proton flux through the OTOPI channel and gating units modulating its activity are still a matter of debate. This review discusses current data on structural and functional features of OTOPI. Suggested proton transport pathways, regulatory mechanisms, and key amino acid residues determining functionality of the otopetrins are considered. The existing kinetic models of OTOPI are discussed as well. Based on revealed functional properties, OTOPI is suggested to operate as a logical XOR element that allows for proton flux only if transmembrane pH gradient exists.

Keywords: OTOPI, otopetrins, proton channel, taste cells

РОЛЬ МЕМБРАННОГО ТРАНСПОРТА ПРОТОНОВ И ВОЗБУДИМОСТИ ПЛАЗМАЛЕММЫ В ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУРАХ, ДАЛЬНЕМ ТРАНСПОРТЕ И ФОТОСИНТЕЗЕ ХАРОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

© 2024 г. А. А. Булычев^{а,*}, Н. А. Крупенина^а

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: bulychev@biophys.msu.ru

Поступила в редакцию 03.04.2024

После доработки 25.04.2024

Принята к печати 26.04.2024

Плазмалемма освещенных клеток Characeae содержит чередующиеся участки с активностью H^+ -насоса и области с высокой проводимостью для H^+/OH^- , которые пропускают встречно направленные потоки H^+ между средой и цитоплазмой. В зонах оттока H^+ из среды в клетку, рН на поверхности (pH_o) возрастает, а рН цитоплазмы (pH_{in}), напротив, снижается. Нехватка проникающего субстрата фотосинтеза (CO_2) и кислый сдвиг pH_{in} в области наружных щелочных зон способствуют переключению переноса электронов в хлоропластах с CO_2 -зависимого пути на восстановление O_2 , что сопряжено с повышением ΔpH в тилакоидах и усилением нефотохимического тушения (NPQ) возбужденных состояний хлорофилла. Влияние рН на пути переноса электронов лежит в основе согласованного неоднородного распределения pH_o и активности фотосинтеза у клеток в покое. При генерации потенциала действия (ПД) продольный профиль pH_o временно сглаживается, а распределение NPQ и активности ФСII становится резко неоднородным. Спрямление профиля pH_o обусловлено подавлением H^+ -насоса и пассивной H^+/OH^- -проводимости плазмалеммы под влиянием почти 100-кратного возрастания уровня Ca^{2+} в цитоплазме ($[Ca^{2+}]_{in}$) во время ПД. Повышение $[Ca^{2+}]_{in}$ стимулирует фотовосстановление O_2 в хлоропластах под внешними щелочными зонами и в то же время останавливает течение цитоплазмы, что вызывает накопление избытка H_2O_2 в цитоплазме в участках интенсивной продукции этого метаболита при слабом влиянии на зоны ассимиляции CO_2 . Эти изменения усиливают неоднородное распределение фотосинтеза и вызывают длительные колебания флуоресценции хлорофилла F_m' и квантовой эффективности линейного потока электронов на микроучастках клетки после генерации ПД.

Ключевые слова: Characeae, потенциал действия, транспорт протонов, осцилляции флуоресценции хлорофилла, течение цитоплазмы, дальний транспорт

DOI: 10.31857/S0233475524050056, EDN: cbuvjr

ВВЕДЕНИЕ

В 2024 г. исполняется 40 лет журналу «Биологические мембраны». В тематике журнала заметное место занимают мембраны растительной клетки и хлоропластов. В его выпусках нашли освещение такие темы, как влияние электрического потенциала тилакоидов на флуоресценцию хлорофилла [1], повреждение хлоропластов электрическим полем [2], светозависимый мембранный транспорт редокс-активных катионов [3], фототоки тилакоидных мембран [4], триггерное проникновение в клетки катионного прооксиданта [5], влияние

возбудимости и течения цитоплазмы на транспорт H^+ и фотосинтез [6, 7]. Водоросли *Chara*, близкие родственники высших растений, представляют удобный и интересный объект для изучения путей внутриклеточной регуляции.

Клетки междоузлий харовых водорослей достигают длины ≥ 10 см и сочетают такие неординарные свойства, как возбудимость, возникновение пространственных структур, быстрое ротационное течение цитоплазмы, а также изменения проводимости клеточной мембраны при гиперполяризации. Возбудимость проявляется в короткой (2–5 с) деполяризации

плазмалеммы в ответ на механические, химические и другие стимулы. На практике потенциал действия (ПД) вызывают пропусканием деполяризующего импульса тока (200 мс, 10 мкА/см²). Скорость распространения ПД составляет ~1 см/с, что обеспечивает наиболее быструю передачу сигналов в гигантских клетках Characeae.

В большинстве растительных клеток с размерами до 100 мкм смешивание реагентов и сигнальные взаимодействия происходят за счет диффузии. Однако диффузионный транспорт крайне неэффективен на больших расстояниях. В случае одномерной диффузии среднеквадратичное смещение молекул (x) от начальной координаты связано со временем переноса t соотношением $x^2 = 2Dt$, где D — коэффициент диффузии. Это означает, что диффузия низкомолекулярных веществ ($D \approx 10^{-5}$ см²/с) на расстояние 5 см в пределах клетки потребует около двух недель. Электрическое возбуждение преодолет такое же расстояние всего за 5 с, вызывая экстренную реакцию на стрессовое воздействие.

У харовых водорослей в покое основную роль в интеграции метаболизма и дальнейшей сигнализации играет круговое течение цитоплазмы (циклоз) со скоростью до 100 мкм/с при 25°C [8, 9]. Поток цитоплазмы проходит внутриклеточное расстояние длиной в 5 см за время ~10 мин, что вероятно достаточно для своевременной реакции клетки на медленно меняющееся окружение. Течение омывает слой плотно упакованных хлоропластов (Хп) с его внутренней стороны, где к хлоропластам крепятся актиновые филаменты [10, 11]. По этим тязам за счет гидролиза АТФ движутся молекулы миозина, нагруженные везикулами. Движение органелл вместе с примыкающими слоями воды создает поток, который облегчает обмен метаболитов между Хп и цитозолем. Скорость течения максимальна в месте приложения движущей силы, т.е. на границе с неподвижными хлоропластами, и снижается в направлении к оси клетки.

Активное течение цитоплазмы является необходимым условием возникновения пространственных структур. Находясь на свету, клетки междоузлий формируют на поверхности чередующиеся зоны с низкими и высокими значениями рН (~6.5 и 10) [12, 13]. Эти лабильные структуры связаны с протеканием круговых электрических токов. Роль генератора тока выполняет АТФ-зависимый H^+ -насос плазмалеммы, локализованный в кислых зонах, а нагрузкой служат участки мембраны в щелочных зонах, обладающие высокой пассивной проводимостью для H^+ или их эквивалентов — анионов OH^- [14]. Плотность круговых токов в области щелочных зон достигает 60 мкА/см²; в кислых

зонах она заметно меньше, что связано с большей площадью этих зон [12]. Отток протонов из среды вызывает щелочной сдвиг рН на поверхности клетки (pH_0); при этом поступление H^+ в клетку смещает рН цитоплазмы (pH_c) в кислую сторону [15, 16]. Аналогично этому, выведение H^+ из цитоплазмы создает кислые зоны в прилегающих слоях наружной среды (в апопласте), но сдвигает pH_c в сторону щелочных значений. Чередующиеся сдвиги рН на поверхности клетки и в цитоплазме лежат в основе неоднородного распределения активности фотосинтеза по длине клетки.

Неравномерное распределение рН и фотосинтеза, а также возбудимость и течение цитоплазмы тесно связаны между собой и оказывают существенное влияние на другие клеточные процессы, включая дальний транспорт, защиту от избыточного освещения и ответные реакции на механические повреждения. В данном обзоре на примере клеток харовых водорослей рассмотрено сопряженное влияние электрических, ионных и метаболических сигналов на неравномерное распределение рН и фотосинтеза в клетках зеленых растений и предложена рабочая гипотеза для объяснения этих связей.

ЗОНАЛЬНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ pH_0 И ЕГО ОБРАТИМОЕ СГЛАЖИВАНИЕ ПОСЛЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ КЛЕТКИ

Профили рН, измеряемые сканирующим рН-микроэлектродом на освещенном междоузлии длиной 50 мм (рис. 1а, кривые 1, 4), содержат до шести щелочных полос со значениями pH_0 около 10.0, которые чередуются с кислыми зонами (pH_0 6.2–6.5). В молодых междоузлиях зоны с низкими и высокими pH_0 не имеют видимых отличий. Однако зрелые и стареющие клетки часто выглядят полосатыми. В этих клетках зеленые некальцинированные области чередуются с зонами осаждения кристаллов, главным образом $CaCO_3$, которые придают щелочным зонам белесую окраску. Неоднородный профиль pH_0 формируется только на свету, исчезает за время ~20 мин после переноса клеток в темноту, а также спрямляется на свету при подавлении фотосинтеза диуроном. Брефелдин А (БФА) — ингибитор внутриклеточного везикулярного транспорта — оказывает сильное подавляющее действие на щелочные зоны освещенных клеток [17]: величина pH_0 снижается от 9.5–10.0 на 2–2.5 ед. в течение 10 мин после добавления этого агента (рис. 1б). На нынешний день БФА является наиболее сильным известным ингибитором, действие которого не связано с подавлением фотосинтетического потока электронов. По-видимому, процессы

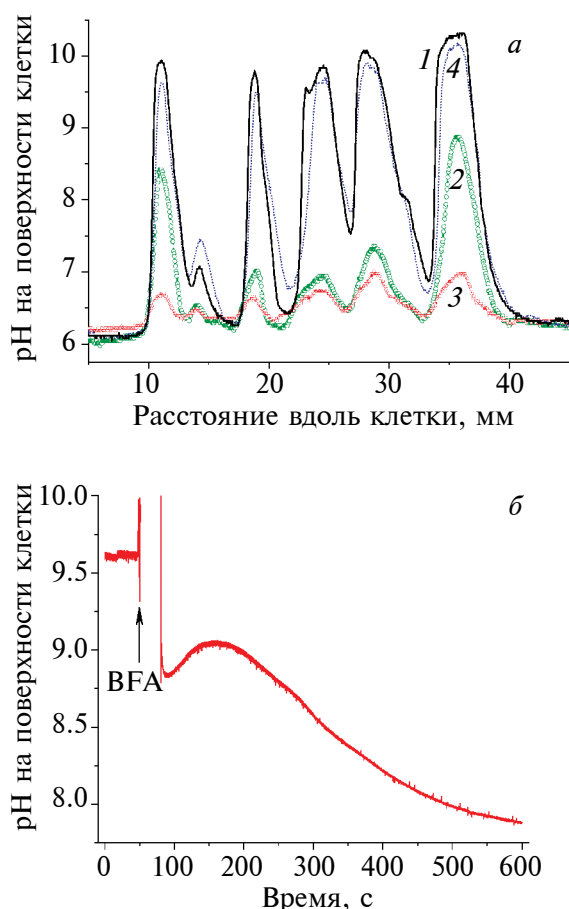


Рис. 1. Светозависимый профиль рН в примембранных слоях среды (pH_0) по длине интернодальной клетки *Chara* и чувствительность наружных щелочных зон к возбуждению плазмалеммы и ингибитору внутриклеточного везикулярного транспорта брефелдину А. *а* — Профили pH_0 в покое (сплошная кривая 1), а также через 2, 9 и 45 мин после генерации ПД (кривые 2–4 соответственно). *б* — Снижение pH_0 в щелочной зоне освещенной клетки после замены искусственной прудовой воды на аналогичный раствор с добавлением 70 мкМ брефелдина А (BFA); интенсивность света — 25 мкмоль/(м² с).

эндо- и экзоцитоза, подавляемые брефелдином А, необходимы для поддержания транспортных систем, участвующих в трансмембранном переносе протонов. Кроме того, неоднородный профиль рН временно исчезает после генерации одиночного электрического импульса на плазмалемме [18] (рис. 1а, кривые 1–3).

Потенциал действия (ПД) в клетках харовых водорослей и других зеленых растений был предметом многочисленных работ и обзоров [11, 19–22]. Более 40 лет назад методом фиксации напряжения на клетках междоузлий *Nitellopsis* было показано, что деполяризация мембраны на фронте ПД обусловлена поступлением Ca^{2+} по

потенциал-зависимым неселективным катионным каналам из среды в цитоплазму, которое может дополняться потоком Ca^{2+} из вакуоли в цитоплазму [23]. Установлено также, что повышение уровня Ca^{2+} в цитоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) активирует выход Cl^- из цитоплазмы в среду, что отвечает за пиковую деполяризацию плазмалеммы. Возвращение мембранного потенциала к исходному или более низкому значению связано с выходящим потоком K^+ по каналам, активируемым при деполяризации.

В литературе нередко выдвигали предположения, что изменения уровня $[\text{Ca}^{2+}]_c$ вызваны не поступлением Ca^{2+} из среды, а высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо под влиянием инозитол-3-фосфат-чувствительной системы [24, 25]. Однако многие авторы отстаивали точку зрения, что повышение $[\text{Ca}^{2+}]_c$ обусловлено входящим потоком Ca^{2+} по каналам плазмалеммы [26, 27]. К тому же анализ нуклеотидных последовательностей в геномах растений не выявил присутствия рецепторов инозитол-3-фосфата (цит. по [11]). Вместе с тем недавно показана возможность высвобождения Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума в устьицах *Arabidopsis* под влиянием потока H^+ из среды в цитоплазму по экспрессированному фоточувствительным H^+ -селективным каналам [28]. Помимо Ca^{2+} , Cl^- и K^+ , небольшой вклад в ионные токи, измеряемые в режиме фиксации напряжения, могут вносить токи, создаваемые транспортом H^+ в освещенных клетках *Chara* в покое. Токи H^+ (30–60 мкА/см²) имеют значительно меньшую величину, чем пиковые значения Cl^- тока (до 1 мА/см²) [27].

Возбуждение клетки вызывает временную остановку трансмембранных встречных потоков H^+ , что проявляется в противоположно направленных сдвигах рН у поверхности клетки в щелочных и кислых зонах [18, 29]. Хотя сдвиги pH_0 в разных зонах имеют разную направленность, они синхронно достигают экстремальных значений и согласованно восстанавливаются по завершении переходного периода. После генерации ПД величина рН в щелочных зонах снижается почти на 3 ед., а в кислых зонах возрастает на 0.2–0.4 ед. Неравномерный профиль pH_0 сглаживается в течение 5–10 мин после генерации ПД (рис. 1).

Щелочные пики восстанавливаются в течение 35–40 мин от момента ПД, причем их исходное положение сохраняется. Устойчивое положение щелочных полос объясняют тем, что выравнивание профиля рН происходит на фоне неравномерного распределения других параметров, таких как отложения кристаллов кальция на поверхности клетки в участках с высоким рН [30] или преимущественная локализация в кислых зонах органелл

харасом, которые представляют собой инвагинации плазмалеммы, обогащенные H^+ -АТР-азой [31]. Растворение кристаллов $CaCO_3$ после сглаживания щелочных зон сопровождается локальным повышением рН, т.е. способствует формированию новой щелочной зоны на прежнем месте. Распределение H^+ -насосов, определяемое стабильной локализацией харасом, также не претерпевает изменений после генерации ПД. Активность этих насосов, вероятно, восстанавливается по мере снижения уровня $[Ca^{2+}]_c$ в период перехода к покою после генерации ПД.

Особенно неожиданным оказался тот факт, что распределение характеристик фотосинтеза — квантового выхода переноса электронов УП и нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла NPQ — в отличие от профиля рН, не сглаживается, а становится более неоднородным после генерации ПД [29]. Эта особенность выглядит на первый взгляд удивительной, потому что в покое профили УП и NPQ строго согласованы с профилем рН. Причины согласования профилей рН и фотосинтеза в покое и нарушения такой координации после генерации ПД рассмотрены ниже, после обсуждения влияния ПД на H^+ -транспортирующие системы плазмалеммы.

Подавляющее влияние $[Ca^{2+}]_c$ на H^+ -насос плазмалеммы известно уже давно. Оно предположительно опосредовано Ca^{2+} -зависимым фосфорилированием H^+ -АТР-азы [32, 33]. Ионы Ca^{2+} связываются с 14–3–3-белками, нарушая их физиологическое взаимодействие с H^+ -АТР-азой, необходимое для активации H^+ -насоса [34]. Однако влияние ПД на рН у поверхности клетки *Chara* не сводится только к Ca^{2+} -зависимому подавлению H^+ -насоса плазмалеммы, о чем говорят результаты параллельных измерений сопротивления плазмалеммы (R_m), мембранного потенциала клетки и рН в апопласте. В участках с наружными кислыми зонами следовые изменения R_m после возбуждения были незначительными, а в щелочных участках изменения R_m оказались неожиданно большими. В состоянии покоя проводимость плазмалеммы G_m ($G_m = R_m^{-1}$) в области щелочных зон была высокой и составляла около 10 См/м^2 , что соответствует ранее опубликованным данным [35]. На пике ПД проводимость мембраны дополнительно возрастала в несколько раз в связи с активацией хлорных и калиевых каналов.

Однако после пика ПД проводимость плазмалеммы в щелочных зонах резко снижалась: в течение 30–60 с величина G_m уменьшалась почти на порядок по сравнению с исходными значениями в покое [36]. Параллельно с падением G_m происходило

снижение рН_o, отражающее остановку входящего потока H^+ -эквивалентов, и развивалась переходная гиперполяризация мембраны на 50–60 мВ [37]. Это свидетельствует об инактивации H^+ -проводимости плазмалеммы в щелочных зонах после развития ПД. Мембрана этих участков временно теряет высокую H^+ -проводимость, но сохраняет K^+ -проводимость, что сдвигает мембранный потенциал от значений, близких к равновесному H^+ -потенциалу (E_H), в сторону E_K . Исходные значения проводимости восстанавливаются за время ≥ 15 мин после однократной генерации ПД. Этот период, по-видимому, необходим для восстановления низкого уровня $[Ca^{2+}]_c$ после его возрастания на пике ПД. Примерно такой же период после возбуждения (~10 мин при 21°C) необходим для полного восстановления течения цитоплазмы [38], которое, как известно, крайне чувствительно к $[Ca^{2+}]_c$. Повышение светового потока в интервале 10–150 мкмоль квантов/(м² с) способствовало более быстрому восстановлению щелочных зон, что, предположительно, обусловлено ускоренным снижением $[Ca^{2+}]_c$ на ярком свете в связи с поглощением Ca^{2+} освещенными хлоропластами [39].

ПРОФИЛИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В ПОКОЕ И ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ

О скорости линейного фотосинтетического потока электронов на микроучастках интернодальной клетки можно судить по величине эффективного квантового выхода реакции фотосистемы II (УП). Флуориметры с импульсно-модулированным освещением позволяют рассчитать величину УП по формуле $YII = (F'_m - F') / F'_m$, где F' — выход флуоресценции хлорофилла на действующем свете без дополнительной подсветки, а F'_m — максимальный выход флуоресценции в тех же условиях при действии насыщающего светового импульса. В стационарном состоянии фотосистемы I и II (ФС I и ФС II) работают согласованно. Поэтому величина УП отражает эффективность линейного потока электронов по всей ЭТЦ, в которой последовательно участвуют ФС II и ФС I. Метод насыщающих вспышек дает также сведения о нефотохимическом тушении ($NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m$), показателем которого является максимальный выход флуоресценции F'_m на действующем свете в сравнении с максимальным выходом F_m в отсутствие тушения. Чем ниже F'_m по сравнению с F_m , тем выше значения NPQ.

У освещенных клеток в состоянии покоя профили рН_o, квантовой эффективности ФС II (УП) и NPQ по длине клетки четко скоординированы.

В основе координации лежит разная проницаемость плазмалеммы для заряженных и незаряженных форм неорганического углерода (C_i), количество которых варьирует по длине клетки в соответствии с профилем pH_0 [29, 40]. Относительное содержание анионов (HCO_3^- , CO_3^{2-}) и нейтральной формы (CO_2) зависит от локальных значений pH_0 и констант диссоциации (pK) угольной кислоты и бикарбоната ($pK_1 = 6.3$ и $pK_2 = 10.3$). Проницаемость бислойных липидных мембран для нейтральных молекул CO_2 в 10^7 – 10^8 раз выше, чем для аниона HCO_3^- [41]. В кислых зонах значительная часть C_i присутствует в виде CO_2 — нейтральной свободно проникающей через мембраны формы, что обеспечивает хлоропласты достаточным количеством этого субстрата фотосинтеза. Наружные щелочные зоны лишены CO_2 и содержат лишь непроникающие ионные формы C_i (HCO_3^- , CO_3^{2-}). Поэтому CO_2 -зависимый путь переноса электронов облегчен в Хп, лежащих под наружными кислыми зонами, и затруднен в Хп щелочных зон. Лимитированное поступление C_i из наружной среды в области щелочных зон частично компенсируется доставкой этого субстрата с потоком цитоплазмы из участков, где содержание C_i повышено вследствие достаточного притока CO_2 .

Не меньшую роль в координации профилей pH и фотосинтетического транспорта электронов играют различия pH цитоплазмы в зонах притока H^+ в клетку и в зонах активного выведения H^+ . Поток H^+ -эквивалентов внутрь клетки в области щелочных зон понижает pH цитоплазмы, а выведение H^+ в области кислых зон повышает $pH_{ц}$ [15, 42]. Из-за нехватки CO_2 в щелочных зонах и вследствие пониженного $pH_{ц}$ перенос электронов в этих участках частично переключается с CO_2 -зависимого пути на восстановление O_2 . Оптимум pH для фотовосстановления O_2 интактными изолированными хлоропластами лежит в кислой области ($pH\ 5.0$) [43]. Кислые значения pH облегчают протонирование супероксид-анион-радикала и способствуют восстановлению $O_2^{\cdot -}$ до H_2O_2 . В свою очередь, H_2O_2 выступает как акцептор в реакции Хилла [44]. Так как поток электронов на H_2O_2 не связан с потреблением АТФ, он повышает энергизацию тилакоидных мембран (градиент $\Delta\mu_H^+$) и усиливает нефотохимическое тушение (NPQ) флуоресценции хлорофилла. Возрастание тепловых потерь снижает эффективность фотохимической реакции (параметр YII), что соответствует замедлению линейного потока электронов. При той же освещенности уровень энергизации мембран в Хп, где преобладает ассимиляция CO_2 , остается сравнительно низким, а величина NPQ — незначительной. Таким образом, в пределах одной

и той же интернодальной клетки Хп проявляют не только разные значения YII, но и качественные различия в путях переноса электронов. Это находит подтверждение в зеркально симметричных продольных профилях pH и концентрации O_2 у поверхности клетки [40]. Концентрация O_2 в щелочных зонах заметно понижена, что вероятно обусловлено фотовосстановлением O_2 в этих зонах.

В отличие от профиля pH , который сглаживается после проведения ПД (рис. 1а), продольный профиль фотосинтеза становится более контрастным (рис. 2). Это проявляется в возрастании перепадов эффективного квантового выхода ФСII (YII) и уровней NPQ между различными участками по длине клетки [29]. На рис. 2 показан профиль NPQ, который при низкой интенсивности освещения был практически спрямлен у клетки в состоянии покоя. После генерации ПД в момент времени $t = 0$ величина NPQ в области щелочных зон возросла до значений 0.9–1.5 ед., тогда как в области кислых зон значения NPQ остались низкими (~0.05). Соответствующие изменения претерпевал и продольный профиль YII. После генерации ПД эффективный квантовый выход фотореакции ФСII снижался в зонах возрастания NPQ, но менялся незначительно в зонах с низкими значениями NPQ. Усиление пространственной неоднородности фотосинтетического потока электронов после возбуждения клетки обусловлено двумя факторами: влиянием повышения $[Ca^{2+}]_{ц}$ на пути фотосинтетического переноса электронов и влиянием $[Ca^{2+}]_{ц}$ на скорость течения цитоплазмы.

Повышение $[Ca^{2+}]_{ц}$, происходящее во время ПД, тормозит ассимиляцию CO_2 в реакциях цикла Кальвина [45–47] и в то же время оказывает

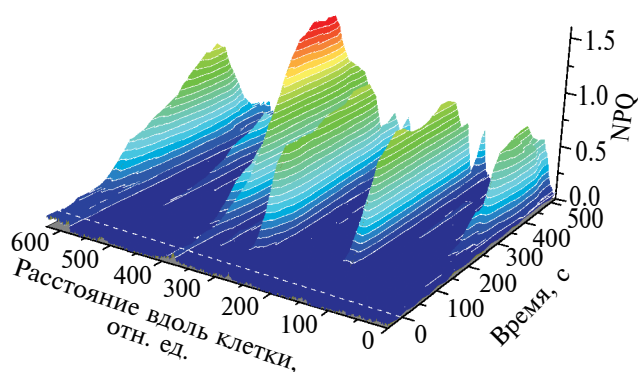


Рис. 2. Формирование неоднородного продольного профиля нефотохимического тушения (NPQ) в хлоропластах интернодальной клетки *Chara* после однократного возбуждения плазматической мембраны. В покое (при $t \leq 0$) профиль NPQ был однородным, но после генерации ПД он сменился профилем с множественными пиками NPQ. Момент генерации ПД при $t = 0$ отмечен на диаграмме штриховой линией.

стимулирующее влияние на фотовосстановление O_2 [48]. Наибольшая Ca^{2+} -зависимая стимуляция восстановления O_2 и продукции H_2O_2 ожидается в участках цитоплазмы под щелочными зонами, где кислые значения $pH_{\text{ц}}$ приближены к оптимуму pH для фотовосстановления O_2 . Так как перенос электронов на O_2 и H_2O_2 не связан с потреблением АТР, он повышает ΔpH в тилакоидах, что усиливает NPQ в области наружных щелочных полос. В цитоплазме под кислыми зонами, где величина $pH_{\text{ц}}$ оптимальна для фиксации CO_2 и потребления АТР, величина NPQ меняется сравнительно слабо.

Кроме того, остановка потока цитоплазмы в момент возбуждения и длительное (до 10 мин) восстановление скорости течения усиливают сами по себе неоднородность профилей YII и NPQ [49]. Это можно пояснить, используя аналогию между прерыванием течения цитоплазмы и остановкой работающего ленточного конвейера. Перебегающие участки клетки с разной фотосинтетической активностью отличаются по скорости экспорта метаболитов (H_2O_2 , NADPH) из хлоропластов в поток цитоплазмы. Движущаяся цитоплазма выступает как транспортное средство, аналогичное движущейся ленте производственного конвейера [50]. Под наружными кислыми зонами, где в хлоропластах преобладает поток электронов по ассимилирующему пути, побочная продукция H_2O_2 незначительна, а восстановительные эквиваленты (NADPH) используются в реакциях фиксации CO_2 . В хлоропластах под щелочными зонами, где часть электронов уходит на фотовосстановление O_2 , потребление восстановителей понижено, а продукция H_2O_2 — повышена. Хлоропласты этих участков служат источником поступления указанных метаболитов в цитоплазму.

Принято считать, что перенос веществ в потоке цитоплазмы сглаживает латеральные градиенты концентрации между областями с разным уровнем метаболитов [51, 52]. В таком случае внезапное прекращение потока цитоплазмы в момент генерации ПД, аналогичное остановке ленточного конвейера, должно переполнять цитоплазму экспортируемыми метаболитами в зонах их интенсивного производства. При этом в участках, где экспорт отсутствует или минимален, состав цитоплазмы изменится незначительно. Можно ожидать, что перепады концентраций H_2O_2 в цитоплазме между зонами с его интенсивной и слабой продукцией возрастают после остановки цикла. Это возрастание, вероятно, и отвечает за усиление перепадов между максимальными и минимальными показателями в профилях F_m' , NPQ и YII после генерации ПД.

КОЛЕБАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И ФОТОСИНТЕЗА ХЛОРОПЛАСТОВ ПОСЛЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ КЛЕТКИ

Возрастание пространственной неравномерности состава цитоплазмы вслед за генерацией ПД и временной остановкой течения цитоплазмы приводит к еще одному интересному последствию — длительным колебаниям флуоресценции F_m' и квантового выхода YII при измерениях на микроучастке клетки [49, 53]. Однократное возбуждение плазмалеммы вызывает колебания F_m' с амплитудой до 40–50% от величины F_m' в покое, которые продолжаются в течение 20–30 мин (рис. 3а). Об участии H_2O_2 в возникновении колебаний говорят опыты с возбуждением клетки в присутствии метилвиологена.

Метилвиологен (МВ) известен как эффективный акцептор электронов от ФСІ. Он катализирует восстановление O_2 до супероксид-анион-радикала, который в дальнейшем образует H_2O_2 в реакции дисмутации. Освещение изолированных хлоропластов в присутствии МВ приводит к быстрому образованию активных форм кислорода (АФК), включая H_2O_2 , причем оптимальные значения pH для фотовосстановления O_2 в норме и в присутствии МВ существенно различаются: pH 5 и pH 8, соответственно [43].

Плазматическая мембрана харовой водоросли в покое не пропускает двухвалентный катион МВ (MV^{2+}) [5, 54]. Так, инкубация клеток в течение 30 мин в присутствии 0.1–0.5 мМ МВ без электрической стимуляции не нарушала индукционные кривые фотоокисления хлорофилла реакционного центра ФСІ Р700 и квантовую эффективность (YII) в интактной клетке. Вместе с тем однократная генерация ПД вызывала быстрое проникновение МВ к участкам его связывания в Хп, что проявлялось в резком падении квантового выхода (YII) в области кислых зон, а также в замене характерной многофазной кинетики фотоокисления Р700 на простой ступенеобразный переход [5]. По-видимому, катион MV^{2+} попадает в клетку по неселективным катионным каналам, открываемым при деполяризации во время развития ПД. Известно, что эти каналы проводят ионы Ca^{2+} , гидратный радиус которых составляет 0.41 нм. Мгновенное появление каталитической активности МВ в хлоропластах после однократной генерации ПД говорит о том, что ионы MV^{2+} с радиусом 0.33 нм также проникают в клетку через эти каналы. Поскольку МВ действует как катализатор в циклах восстановления—окисления, поступление в клетку даже небольших количеств МВ за время ПД оказывается достаточным для переключения CO_2 -зависимого потока электронов на фотовосстановление O_2 с образованием АФК. В итоге генерация ПД

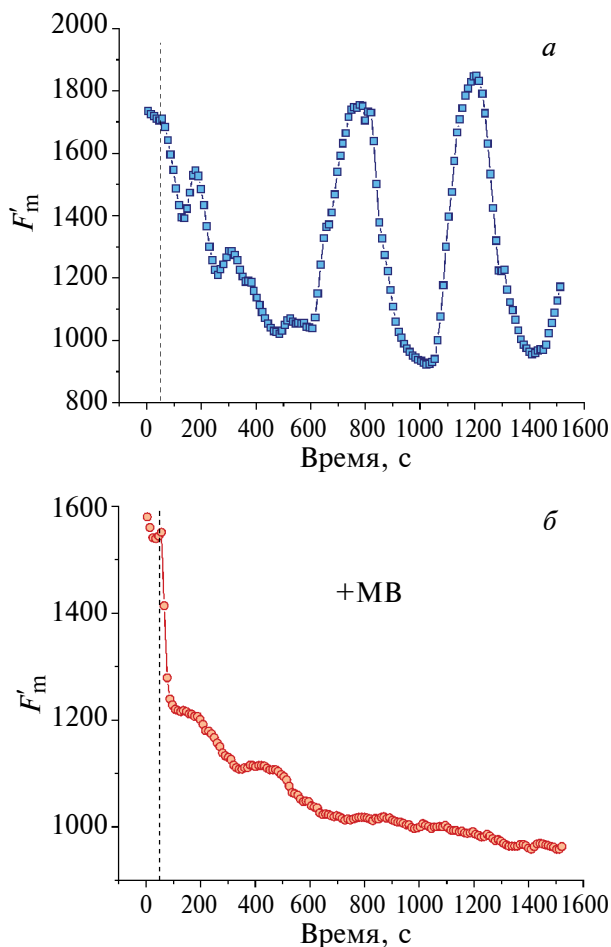


Рис. 3. Генерация ПД в стандартных условиях (интенсивность света $39 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \text{ с})$) индуцирует (а) длительные периодические колебания флуоресценции F_m' , но вызывает (б) устойчивое тушение F_m' при наличии в среде 0.5 мМ метилвиологена (МВ). Момент генерации ПД отмечен вертикальными штриховыми линиями при $t = 50 \text{ с}$.

служит триггером для быстрого переключения CO_2 -зависимого пути переноса электронов на фотовосстановление МВ и O_2 [55].

Внесение в среду метилвиологена устраняло колебания F_m' в ответ на возбуждение (рис. 3б). Генерация ПД в присутствии МВ вызывала необратимое смещение F_m' к низкому уровню [49]. По-видимому, устойчивое нефотохимическое тушение F_m' при генерации ПД в присутствии редокс-медиатора МВ отражает накопление АФК (H_2O_2), тогда как колебания F_m' после ПД в отсутствие МВ обусловлены пространственно-неравномерным образованием АФК.

При возбуждении в отсутствие МВ, перепады в содержании H_2O_2 (акцептор электронов в реакции Хилла [44]) возрастают между зонами ассимиляции CO_2 и областями, где происходит

фотовосстановление O_2 . В условиях стационарного потока жидкости состав цитоплазмы на любом участке клетки поддерживается постоянным независимо от времени наблюдения, хотя он может варьировать по длине клетки. Кардинальные изменения наступают после вызванной потенциалом действия остановки течения цитоплазмы и возрастания перепадов в продольных профилях содержания АФК. Известно, что мембраны оболочки хлоропласта проницаемы для H_2O_2 : в зоне яркого освещения пероксид выходит из хлоропластов и переносится вдоль клетки с потоком цитоплазмы [56]. Мембранный транспорт H_2O_2 , по-видимому, опосредован аквапоринами внутренней мембраны оболочки хлоропластов [57–59]. По мере перемещения порций цитоплазмы с высоким и низким содержанием H_2O_2 , неподвижные хлоропласты получают из потока то большие, то меньшие количества этой АФК, что вызывает колебания уровней F_m' и NPQ. Согласно предлагаемой гипотезе, осцилляции флуоресценции F_m' и УП отражают вызванное остановкой цикла усиление неравномерного продольного распределения H_2O_2 и других метаболитов, которое сохраняется длительное время после генерации ПД. Колебания флуоресценции продолжаются примерно 20 мин, что почти вдвое превышает период восстановления цикла. Следовательно, установление стационарного продольного распределения метаболитов (H_2O_2 , NADPH) требует большего времени, чем возобновление цикла.

Роль неравномерного состава движущейся цитоплазмы как причины осцилляций флуоресценции F_m' и квантового выхода УП после генерации ПД проверяли двумя путями. Оба основаны на ограничении притока метаболитов в анализируемый участок клетки из соседних областей междоузлия. В первом варианте сравнивали влияние ПД на флуоресценцию хлорофилла в условиях общего освещения объекта и при локальном освещении малого участка клетки по центру области измерения [49, 60]. Общее освещение обеспечивает фотоиндуцированный обмен метаболитов между неподвижными хлоропластами и цитоплазмой по всей клетке, а циклоз способствует распространению этих метаболитов на дальние расстояния. Режим локального освещения отсекает дальние взаимодействия, так как затемнение большинства Хп прекращает образование в них фотометаболитов и инактивирует светозависимые транспортеры оболочки (малатный клапан и транслокатор триозофосфатов). Поэтому переход от общего к локальному освещению препятствует микрофлюидной доставке метаболитов в область измерения из других частей клетки, а взаимодействия

плазмалеммы и Хп ограничиваются узкой зоной освещения.

Сужение освещаемого участка клетки до диаметра 1 мм приводило к исчезновению длительных осцилляций F_m' и YII после генерации ПД, причем флуоресценция F_m' оставалась на высоком уровне (ср. рис. 3 и 4). Очевидно, что протекание фотосинтеза в пределах локально освещенной области исключает возникновение колебаний F_m' и YII в ответ на возбуждение клетки. Следовательно, для появления осцилляций необходимы обмен метаболитов за пределами области измерения, а также микрофлюидная доставка этих метаболитов из дальних частей клетки в исследуемую область.

Во втором варианте опытов влияние потока цитоплазмы на передачу сигналов от плазмалеммы к хлоропластам проверяли с помощью ингибитора циклоза и полимеризации актина — цитохалазина D (CD). Связывание CD с актиновыми микрофиламентами препятствует взаимодействиям актина и миозина, и, скорее всего, нарушение этих взаимодействий, а не деполимеризация актина объясняет остановку течения цитоплазмы у *Chara* [61]. При умеренном освещении CD не оказывает ингибирующего действия на квантовый выход ФСП (YII) и линейный поток электронов [62]. Подавление течения цитоплазмы цитохалазином D сопровождалось полным устранением длительных колебаний F_m' и YII. Изменения F_m' и YII зачастую ослаблялись слишком сильно и не могли служить надежным показателем возбуждения клетки. Поэтому о генерации ПД судили по измерениям мембранного потенциала плазмалеммы с помощью внутриклеточных микроэлектродов. Оказалось, что возбудимость клетки сохраняется в присутствии CD, а колебания F_m' и YII полностью исчезают [49]. Более того, отмывание клетки от цитохалазина D приводило к восстановлению циклоза и возобновлению длительных осцилляций F_m' и YII.

Тот факт, что генерация ПД вызывает периодические изменения F_m' (NPQ) и YII при активном течении цитоплазмы, но не оказывает такого эффекта после остановки потока, говорит о важной роли дальних микрофлюидных коммуникаций в возникновении колебаний. Следовательно, цитоплазма, протекающая через область измерения в течение 100–800 с после возбуждения плазмалеммы, характеризуется неоднородным содержанием ряда компонентов (предположительно, H_2O_2 при повышенной освещенности и восстановительных эквивалентов на слабом свете). На рис. 5 приведена предполагаемая схема сопряжения потоков H^+ через плазмалемму с фотосинтетической активностью хлоропластов в покое и при возбуждении.

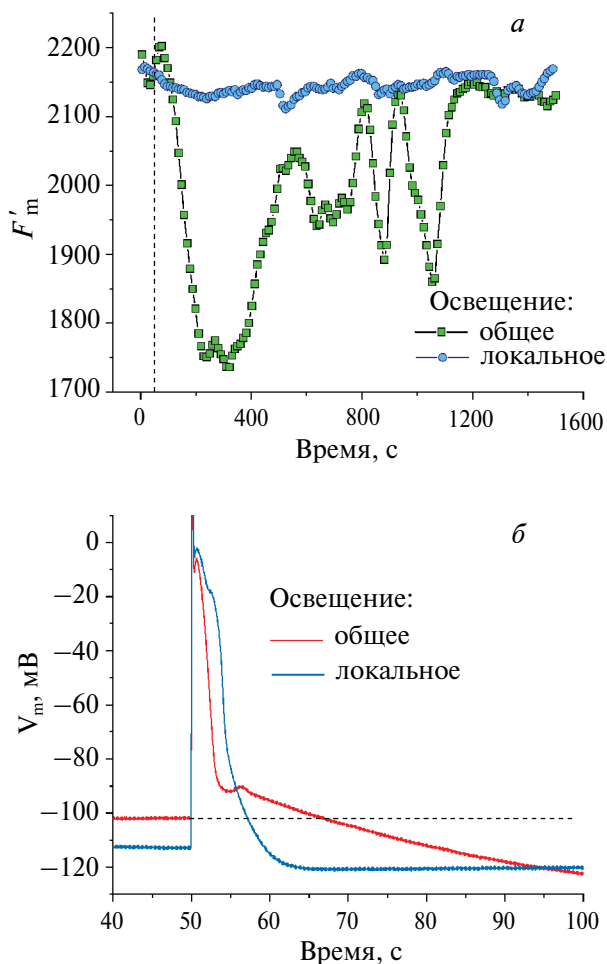


Рис. 4. Возбуждение плазматической мембраны (при $t = 50$ с) в интернодальной клетке *Chara* приводит к длительным колебаниям F_m' при общем освещении всей клетки, но не вызывает существенных осцилляций F_m' при локальном освещении участка диаметром 1 мм с центром в области измерения флуоресценции. *a* — Изменения флуоресценции хлорофилла F_m' в ответ на генерацию ПД при $t = 50$ с (момент возбуждения отмечен вертикальной штриховой линией) при общем и локальном освещении; *б* — изменения трансмембранного потенциала плазмалеммы, вызванные генерацией ПД при общем и локальном освещении.

Отмечено усиление неоднородности фотосинтетической активности и состава цитоплазмы при возбуждении как следствие остановки циклоза и стимуляции фотовосстановления O_2 при возрастании $[Ca^{2+}]_c$.

ПРОПУСКНАЯ СПОСОБНОСТЬ ПЛАЗМОДЕСМ В ПОКОЕ И ПОСЛЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ

Измерения флуоресценции на микроучастках клетки в сочетании с локальным освещением

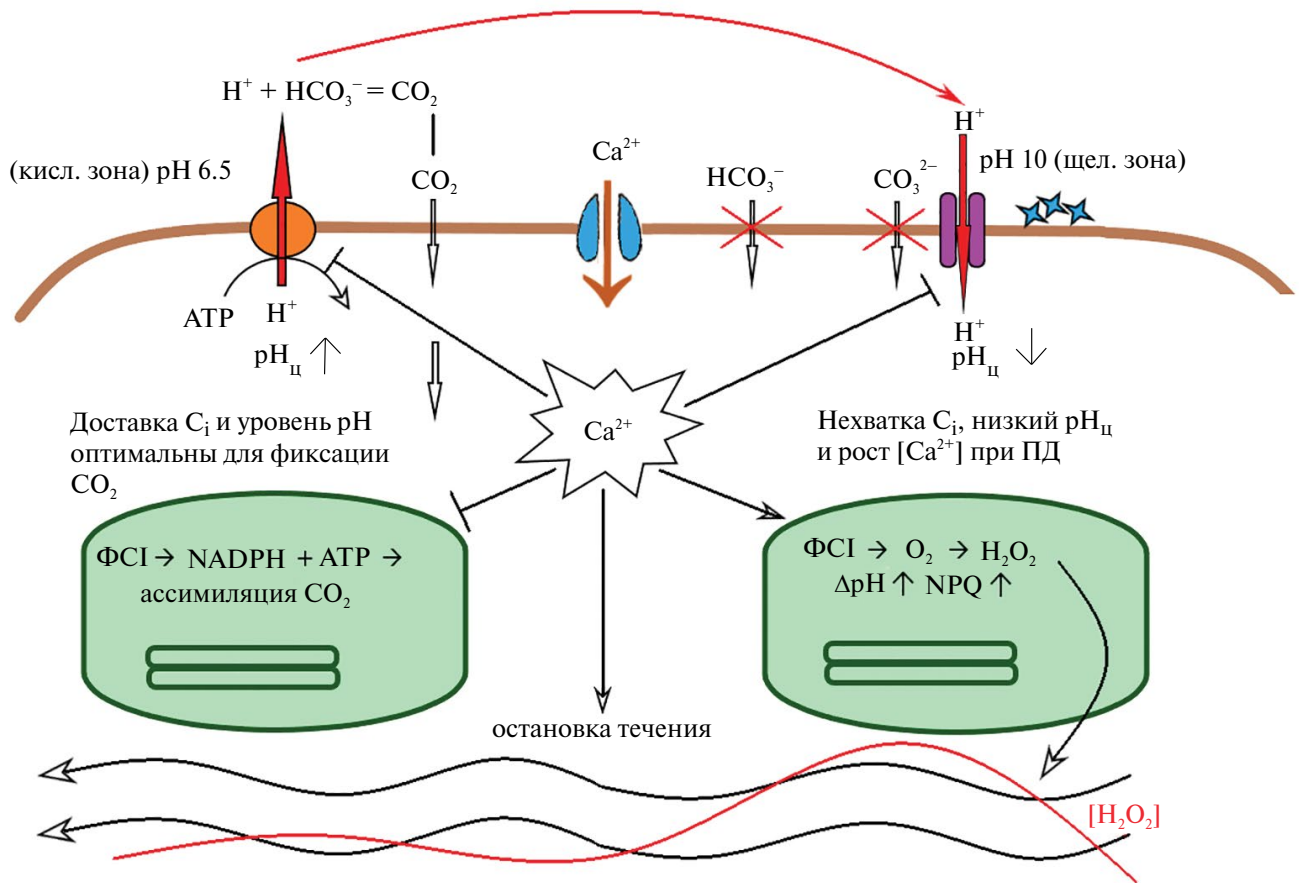


Рис. 5. Функциональные отличия «кислых» и «щелочных» зон интернодальных клеток *Chara* в покое и после генерации ПД на плазматической мембране. В кислых зонах на свету работает АТФ-зависимый H^+ -насос, что смещает pH_0 в слабокислую область и способствует преобразованию непроницающего аниона HCO_3^- в нейтральную проникающую форму CO_2 . Выведение протонов H^+ -насосом поддерживает слабощелочной $pH_{ц}$, способствующий фиксации CO_2 . Дуговая стрелка в периплазматическом пространстве изображает протекание электрического тока на внеклеточном сегменте круговой цепи. Для щелочных зон клетки характерны высокая H^+ -проводимость плазмалеммы, необходимая для поддержания суммарного баланса H^+ в цитоплазме, отсутствие проникающей формы углерода CO_2 , осаждение кристаллов $CaCO_3$ и сравнительно низкие значения $pH_{ц}$. Из-за нехватки CO_2 и пониженного $pH_{ц}$ фотосинтетический поток электронов частично переключен с ассимилирующего пути на восстановление O_2 с образованием H_2O_2 , который действует как акцептор реакции Хилла, вызывая нефотохимическое тушение (NPQ) флуоресценции хлорофилла. Накопление H_2O_2 в хлоропластах сопровождается его выведением в текущую цитоплазму и распространением H_2O_2 с потоком по длине клетки. Резкое возрастание $[Ca^{2+}]_{ц}$ при возбуждении вызывает подавление H^+ -насоса и H^+ -проводимости, что проявляется в сглаживании щелочных пиков, возрастании сопротивления мембраны в области щелочных зон и в переходной гиперполяризации клетки. Повышение $[Ca^{2+}]_{ц}$ во время ПД стимулирует фотовосстановление O_2 и образование H_2O_2 в участках с пониженным $pH_{ц}$, а также вызывает остановку течения цитоплазмы. Оба фактора усиливают неравномерное распределение АФК (H_2O_2) по длине клетки и отвечают за появление длительных осцилляций эффективного квантового выхода УП и максимальной флуоресценции F_m' как показателя нефотохимического тушения (NPQ) при наблюдении на микроучастках клетки.

участка в стороне от области измерения позволяют следить за передачей метаболического сигнала из ярко освещенных хлоропластов в пластиды, экспонированные на слабом или умеренном свете. Для этой цели подводят локальный фотостимул (диаметр луча 400 мкм, интенсивность ~ 500 мкмоль квантов/(m^2 с), длительность 30 с) к участку, который располагается в потоке цитоплазмы выше, чем область измерения флуоресценции (ОИФ). В зоне

локального освещения в текущую цитоплазму экспортируются фотометаболиты, которые с потоком достигают области измерения и вызывают переходные изменения фактической флуоресценции F' и максимальной флуоресценции F_m' [63, 64].

В опосредованных циклозом изменениях F' и F_m' участвуют метаболиты двух типов: вызванные ими изменения флуоресценции имеют разную направленность и отличаются по кинетическим

характеристикам [65]. Возрастание F' после освещения соседнего участка обусловлено экспортом и флюидным транспортом восстановленных соединений (предположительно, NADPH); оно выражено наиболее сильно при слабой фоновой подсветке (~ 10 мкмоль/(м² с)). Влияние локального освещения на F' проявляется независимо от того, направлен ли луч на участок с кислой или щелочной зоной. Однако изменения F' при локализации ОИФ в щелочной зоне были намного слабее, чем при расположении ОИФ в кислой зоне [64]. Ограниченное поступление восстановителя в хлоропласты под щелочными зонами, вероятно, обусловлено отсутствием соответствующего градиента концентрации на мембранах оболочки.

Тушение F_m' в ответ на удаленное локальное освещение проявляется при фоновом освещении повышенной интенсивности (~ 40 мкмоль/(м² с)), которая сама по себе недостаточна для снижения F_m' . Возможно, что дополнительное поступление АФК из области локального освещения на фоновом свете такой интенсивности повышает ΔpH до порогового уровня, при котором происходит сильное нефотохимическое тушение.

Метод приложения локальных световых импульсов в стороне от ОИФ полезен также для изучения межклеточного транспорта метаболитов [66]. Для этой цели важно обеспечить фиксированное расстояние между оптоволоком, по которому подводят локальный световой импульс, и областью измерения флуоресценции. При этом цепочку из двух интернодальных клеток поочередно смещают так, чтобы в одном случае оптоволоконно и ОИФ располагались напротив одной клетки, а в другом были обращены к соседним междоузлиям. Измерения на сдвоенных междоузлиях при слабой фоновой подсветке показали, что узловой комплекс пропускает до 30–45% восстановленных метаболитов, экспортированных из хлоропластов клетки-донора, причем для их проникновения через узловой комплекс необходимо время около 12 с. В отличие от этого, фотометаболиты, вызывающие сильное тушение F_m' при их микрофлюидном транспорте в пределах одного междоузлия, не обнаруживали даже слабого проникновения через узловой комплекс [67].

Кратчайший путь связи между соседними междоузлиями образован двумя плоскими клетками, расположенными в центральной части узлового комплекса (цит. по [68]). Результаты опытов говорят о селективности межклеточных коммуникаций, опосредованных участием плазмодесм, которые представляют собой наноразмерные тяжи цитоплазмы, пронизывающие толстые клеточные

стенки. Становится очевидным, что плазмодесмы пропускают восстановленные соединения, вызывающие возрастание F' , но непроницаемы для агентов, вызывающих тушение флуоресценции F_m' [67]. К таким агентам, предположительно, относятся АФК (H₂O₂).

Используя пары интернодальных клеток в сочетании с методом локальных световых импульсов, можно изучать влияние ПД на перенос восстановительных эквивалентов через плазмодесмы. Остановка течения цитоплазмы, вызванная генерацией ПД, задерживает доставку метаболитов в ОИФ, что искажает типичную ответную реакцию F' на локальное освещение отдаленного участка клетки [69]. Пик переходного возрастания F' снижается и достигается со значительным запозданием. Вместе с тем ответная реакция F' , измеряемая после прохождения сигнала через узловой комплекс, подвергалась еще более сильному непропорциональному подавлению после генерации ПД. Результаты говорят о том, что влияние ПД на пропускную способность плазмодесм нельзя объяснить только изменениями скорости течения цитоплазмы.

По-видимому, узловой комплекс ведет себя как пропускная система, в которой время прохождения метаболита определяется свойствами плазмодесм, а не скоростью течения жидкости в интернодальных клетках. Интересным качеством этой пропускной системы является то, что количество проникающих метаболитов значительно уменьшается после генерации ПД, тогда как время пересечения этого барьера подвергается небольшим изменениям. Закрытие плазмодесм для межклеточного прохождения природных метаболитов при генерации ПД в соседних междоузлиях может быть физиологически значимой реакцией, направленной на перераспределение восстановительных эквивалентов между соседними интернодальными клетками. В условиях покоя эти метаболиты транспортируются из мест их избыточной генерации в зоны яркого освещения к слабо освещенным соседним клеткам, нуждающимся в NADPH для ассимиляции CO₂. Генерация ПД может сигнализировать о повреждении клеточной стенки и необходимости восстановителей для устранения дефекта при участии плазмалеммной NADPH-оксидазы [70]. Переключение путей переноса восстановительных эквивалентов на внутренние нужды за счет ограниченного экспорта в соседние клетки может способствовать заживлению местных повреждений клеточной стенки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Булычев А.А., Ниязова М.М., Рубин А.Б. 1987. Изменения флуоресценции хлоропластов при сдвигах мембранного потенциала и их зависимость от окислительно-восстановительного состояния акцептора фотосистемы II. *Биол. мембраны*. **4**, 262–269.
2. Ремиш Д., Булычев А.А., Рубин А.Б. 1990. Электроиндуцируемое нарушение барьерных свойств мембранной оболочки изолированных хлоропластов. *Биол. мембраны*. **7**, 382–389.
3. Булычев А.А., Цымбалюк Е.С., Лукашев Е.П. 1993. Использование необратимой электропорации и осмотических эффектов для доказательства светоиндуцированного накопления метилфеназона во внутреннем объеме тилакоидов. *Биол. мембраны*. **10**, 587–597.
4. Черкашин А.А., Булычев А.А., Вреденберг В.Я. 2000. Выходящая компонента фотоиндуцированного тока в хлоропластах *Peperomia metallica*. *Биол. мембраны*. **17**, 377–386.
5. Булычев А.А., Крупенина Н.А. 2008. Облегченное проникновение метилвиологена в хлоропласты *in situ* при генерации электрического импульса на возбудимой мембране растительной клетки. *Биол. мембраны*. **25**, 343–351.
6. Булычев А.А., Комарова А.В. 2014. Латеральный транспорт фотосинтетически активного интермедиата в покое и при возбуждении клеток *Chara*. *Биол. мембраны*. **31**, 352–363.
7. Булычев А.А., Алова А.В. 2022. Изменения флуоресценции хлоропластов в связи с возбудимостью клеток *Chara* и переносом метаболитов в потоке цитоплазмы. *Биол. мембраны*. **39**, 195–204.
8. Shimmen T. 2007. The sliding theory of cytoplasmic streaming: Fifty years of progress. *J. Plant Res.* **120**, 31–43.
9. Bulychev A.A., Cherkashin A.A., Shapiguzov S.Y., Alova A.V. 2021. Effects of chloroplast–cytoplasm exchange and lateral mass transfer on slow induction of chlorophyll fluorescence in Characeae. *Physiol. Plant.* **173**, 1901–1913.
10. Foissner I., Wasteneys G.O. 2012. The characean internodal cell as a model system for studying wound healing. *J. Microsc.* **247**, 10–22.
11. Beilby M.J., Casanova M.T. 2014. *The physiology of characean cells*. Berlin-Heidelberg: Springer. 205 p.
12. Lucas W.J., Nuccitelli R. 1980. HCO_3^- and OH^- transport across the plasmalemma of *Chara*. *Planta*. **150**, 120–131.
13. Bulychev A.A., Polezhaev A.A., Zykov S.V., Pljusnina T.Y., Riznichenko G.Y., Rubin A.B., Jantsoff W., Zykov V.S., Müller S.C. 2001. Light-triggered pH banding profile in *Chara* cells revealed with a scanning pH microprobe and its relation to self-organization phenomena. *J. Theor. Biol.* **212**, 275–294.
14. Beilby M.J., Bisson M.A. 2012. pH banding in charophyte algae. In: *Plant Electrophysiology*. Ed Volkov A.G. Berlin-Heidelberg: Springer, p. 247–271.
15. Feijó J.A., Sainhas J., Hackett G.R., Kunkel J.G., Hepler P.K. 1999. Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *J. Cell Biol.* **144**, 483–496.
16. Bulychev A.A., Komarova A.V. 2014. Long-distance signal transmission and regulation of photosynthesis in characean cells. *Biochemistry (Moscow)*. **79**, 273–281.
17. Bulychev A.A., Foissner I. 2020. Inhibition of endosomal trafficking by brefeldin A interferes with long-distance interaction between chloroplasts and plasma membrane transporters. *Physiol. Plant.* **169**, 122–134.
18. Bulychev A.A., Kamzolkina N.A., Luengviriyi J., Rubin A.B., Müller S.C. 2004. Effect of a single excitation stimulus on photosynthetic activity and light-dependent pH banding in *Chara* cells. *J. Membr. Biol.* **202**, 11–19.
19. Wayne R. 1993. Excitability in plant cells. *Am. Sci.* **81**, 140–151.
20. Król E., Dziubinska H., Trebacz K. 2010. What do plants need action potentials for? In: *Action Potential*. Ed. DuBois M.L. New York: Nova Science, p. 1–26.
21. Hedrich R. 2012. Ion channels in plants. *Physiol. Rev.* **92**, 1777–1811.
22. Kisnieriene V., Trębacz K., Pupkis V., Koselski M., Lapeikaite I. 2022. Evolution of long-distance signalling upon plant terrestrialization: Comparison of action potentials in Characean algae and liverworts. *Ann. Bot.* **130**, 457–475.
23. Lunevsky V.Z., Zhereleva O.M., Vostrikov I.Y., Berestovsky G.N. 1983. Excitation of Characeae cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. *J. Membr. Biol.* **72**, 43–58.
24. Biskup B., Gradmann D., Thiel G. 1999. Calcium release from InsP_3 -sensitive internal stores initiates action potential in *Chara*. *FEBS Lett.* **453**, 72–76.
25. Wacke M., Thiel G., Hütt M.T. 2003. Ca^{2+} dynamics during membrane excitation of green alga *Chara*: Model simulations and experimental data. *J. Membr. Biol.* **191**, 179–192.
26. Tazawa M., Kikuyama M. 2003. Is Ca^{2+} release from internal stores involved in membrane excitation in characean cells? *Plant Cell Physiol.* **44**, 518–526.
27. Berestovsky G.N., Kataev A.A. 2005. Voltage-gated calcium and Ca^{2+} -activated chloride channels and

- Ca²⁺ transients: Voltage-clamp studies of perfused and intact cells of *Chara*. *Eur. Biophys. J.* **34**, 973–986.
28. Huang S., Shen L., Roelfsema R.M.G., Becker D., Hedrich R. 2023. Light-gated channelrhodopsin sparks proton-induced calcium release in guard cells. *Science*. **382**, 1314–1318.
 29. Krupenina N.A., Bulychev A.A., Roelfsema M.R.G., Schreiber U. 2008. Action potential in *Chara* cells intensifies spatial patterns of photosynthetic electron flow and non-photochemical quenching in parallel with inhibition of pH banding. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 681–688.
 30. Eremin A., Bulychev A., Krupenina N.A., Mair T., Hauser M.J.B., Stannarius R., Müller S.C., Rubin A.B. 2007. Excitation-induced dynamics of external pH pattern in *Chara corallina* cells and its dependence on external calcium concentration, *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**, 103–109.
 31. Foissner I., Sommer A., Hoefftberger M. 2015. Photosynthesis-dependent formation of convoluted plasma membrane domains in *Chara* internodal cells is independent of chloroplast position. *Protoplasma*. **252**, 1085–1096.
 32. Lino B., Baizabal-Aguirre V.M., De La Vara L.E.G. 1998. The plasma-membrane H⁺-ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Planta*. **204**, 352–359.
 33. De Nisi P., Dell'Orto M., Pirovano L., Zocchi G. 1999. Calcium-dependent phosphorylation regulates the plasma-membrane H⁺-ATPase activity of maize (*Zea mays* L.) roots. *Planta*. **209**, 187–194.
 34. Sehnke P.C., DeLille J.M., Ferl R.J. 2002. Consummating signal transduction: The role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity. *Plant Cell*. **14**, 339–354.
 35. Smith J.R., Walker N.A. 1985. Effects of pH and light on the membrane conductance measured in the acid and basic zones of *Chara*. *J. Membr. Biol.* **83**, 193–205.
 36. Bulychev A.A., Krupenina N.A. 2009. Transient removal of alkaline zones after excitation of *Chara* cells is associated with inactivation of high conductance in the plasmalemma. *Plant Signal. Behav.* **4**, 727–734.
 37. Bulychev A.A., Kamzolkina N.A. 2006. Differential effects of plasma membrane electric excitation on H⁺ fluxes and photosynthesis in characean cells. *Bioelectrochemistry*. **69**, 209–215.
 38. Tsuchiya Y., Yamazaki H., Aoki T. 1991. Steady and transient behaviors of protoplasmic streaming in *Nitella* internodal cell. *Biophys. J.* **59**, 249–251.
 39. Bulychev A.A., Kamzolkina N.A. 2006. Effect of action potential on photosynthesis and spatially distributed H⁺ fluxes in cells and chloroplasts of *Chara corallina*. *Russ. J. Plant Physiol.* **53**, 1–9.
 40. Bulychev A.A., Cherkashin A.A., Rubin A.B., Vredenberg W.J., Zykov V.S., Müller S.C. 2001. Comparative study on photosynthetic activity of chloroplasts in acid and alkaline zones of *Chara corallina*. *Bioelectrochemistry*. **53**, 225–232.
 41. Gutknecht J., Bisson M.A., Tosteson F.C. 1977. Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes. *J. Gen. Physiol.* **69**, 779–794.
 42. Bulychev A.A., Komarova A.V. 2017. Photoregulation of photosystem II activity mediated by cytoplasmic streaming in *Chara* and its relation to pH bands. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1858**, 386–395.
 43. Hormann H., Neubauer C., Asada K., Schreiber U. 1993. Intact chloroplasts display pH 5 optimum of O₂-reduction in the absence of methyl viologen: Indirect evidence for a regulatory role of superoxide protonation. *Photosynth. Res.* **37**, 69–80.
 44. Neubauer C., Schreiber U. 1989. Photochemical and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence induced by hydrogen peroxide. *Zeitschrift für Naturforsch. – Sect. C Biol.* **44c**, 262–270.
 45. Rocha A.G., Vothknecht U.C. 2012. The role of calcium in chloroplasts - an intriguing and unresolved puzzle. *Protoplasma*. **249**, 957–966.
 46. Stael S., Wurzing B., Mair A., Mehlmer N., Vothknecht U.C., Teige M. 2012. Plant organellar calcium signalling: An emerging field. *J. Exp. Bot.* **63**, 1525–1542.
 47. Hochmal A.K., Schulze S., Trompelt K., Hippler M. 2015. Calcium-dependent regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.* **1847**, 993–1003.
 48. Wang W.H., Yi X.Q., Han A.D., Liu T.W., Chen J., Wu F.H., Dong X.J., He J.X., Pei Z.M., Zheng H.L. 2012. Calcium-sensing receptor regulates stomatal closure through hydrogen peroxide and nitric oxide in response to extracellular calcium in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **63**, 177–190.
 49. Bulychev A.A., Strelets T.S. 2024. Oscillations of chlorophyll fluorescence after plasma membrane excitation in *Chara* originate from nonuniform composition of signaling metabolites in the streaming cytoplasm. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1865**, 149019.
 50. Bulychev A.A., Alova A.V., Krupenina N.A., Rubin A.B. 2020. Cytoplasmic streaming as an intracellular conveyor: Effect on photosynthesis and H⁺ fluxes in *Chara* cells. *Biophysics*. **65**, 250–258.
 51. Pickard W.F. 2003. The role of cytoplasmic streaming in symplastic transport. *Plant, Cell Environ.* **26**, 1–15.
 52. Lu W., Gelfand V.I. 2023. Go with the flow – bulk transport by molecular motors. *J. Cell Sci.* **136**, 260300.
 53. Krupenina N.A., Bulychev A.A. 2007. Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.* **1767**, 781–788.
 54. Bulychev A.A., Krupenina N.A. 2008. Action potential opens access for the charged cofactor to the

- chloroplasts of *Chara corallina* cells. *Russ. J. Plant Physiol.* **55**, 175–184.
55. Krupenina N.A., Bulychev A.A., Schreiber U. 2011. Chlorophyll fluorescence images demonstrate variable pathways in the effects of plasma membrane excitation on electron flow in chloroplasts of *Chara* cells. *Protoplasma*. **248**, 513–522.
 56. Eremin A., Bulychev A., Hauser M.J.B. 2013. Cyclosis-mediated transfer of H₂O₂ elicited by localized illumination of *Chara* cells and its relevance to the formation of pH bands. *Protoplasma*. **250**, 1339–1349.
 57. Bienert G.P., Schjoerring J.K., Jahn T.P. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **1758**, 994–1003.
 58. Mubarakshina M.M., Ivanov B.N., Naydov I.A., Hillier W., Badger M.R., Krieger-Liszkay A. 2010. Production and diffusion of chloroplastic H₂O₂ and its implication to signalling. *J. Exp. Bot.* **61**, 3577–3587.
 59. Smirnov N., Arnaud D. 2019. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytol.* **221**, 1197–1214.
 60. Bulychev A.A., Alova A.V. 2022. Microfluidic interactions involved in chloroplast responses to plasma membrane excitation in *Chara*. *Plant Physiol. Biochem.* **183**, 111–119.
 61. Foissner I., Wasteneys G.O. 2007. Wide-ranging effects of eight cytochalasins and latrunculin A and B on intracellular motility and actin filament reorganization in characean internodal cells. *Plant Cell Physiol.* **48**, 585–597.
 62. Sommer A., Hoefftberger M., Hoepflinger M.C., Schmalbrock S., Bulychev A., Foissner I. 2015. Convolute plasma membrane domains in the green alga *Chara* are depleted of microtubules and actin filaments. *Plant Cell Physiol.* **56**, 1981–1996.
 63. Bulychev A.A., Komarova A.V. 2015. Photoinduction of cyclosis-mediated interactions between distant chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.* **1847**, 379–389.
 64. Bulychev A.A., Rybina A.A. 2018. Long-range interactions of *Chara* chloroplasts are sensitive to plasma-membrane H⁺ flows and comprise separate photo- and dark-operated pathways. *Protoplasma*. **255**, 1621–1634.
 65. Bulychev A.A., Alova A.V., Rubin A.B. 2013. Propagation of photoinduced signals with the cytoplasmic flow along Characean internodes: Evidence from changes in chloroplast fluorescence and surface pH. *Eur. Biophys. J.* **42**, 441–453.
 66. Bulychev A.A. 2019. Cyclosis-mediated intercellular transmission of photosynthetic metabolites in *Chara* revealed with chlorophyll microfluorometry. *Protoplasma*. **256**, 815–826.
 67. Bulychev A.A. 2022. Detection of cell-to-cell transport with chlorophyll microfluorometry: Selectivity of metabolite passage and sensitivity to sodium and potassium ions. *Russ. J. Plant Physiol.* **69**, 5.
 68. Beilby M.J. 2016. Multi-scale characean experimental system: From electrophysiology of membrane transporters to cell-to-cell connectivity, cytoplasmic streaming and auxin metabolism. *Front. Plant Sci.* **7**, 1–20.
 69. Bulychev A.A., Eremin A., von Rüling F., Alova A.V. 2023. Effects of cell excitation on photosynthetic electron flow and intercellular transport in *Chara*. *Protoplasma*. **260**, 131–143.
 70. Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., Mittler R. 2011. Respiratory burst oxidases: The engines of ROS signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 691–699.

Role of Membrane H^+ Transport and Plasmalemma Excitability in Pattern Formation, Long-Distance Transport and Photosynthesis of Characean Algae

© 2024 г. А. А. Bulychev^{1, *}, N. A. Krupenina¹

¹*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: bulychev@biophys.msu.ru*

Illuminated giant cells of Characeae comprise alternating areas with H^+ pump activity and zones with high conductivity for H^+/OH^- , which create counter-directed H^+ flows between the medium and the cytoplasm. In areas where H^+ enters the cell, the pH on the surface (pH_o) increases to pH 10, while the cytoplasmic pH (pH_c) decreases. The lack of the permeant substrate of photosynthesis (CO_2) and the acidic pH_c shift in the region of external alkaline zones redirect electron transport in chloroplasts from CO_2 -dependent (assimilatory) pathway to O_2 reduction. This electron transport route is associated with an increase in thylakoid membrane ΔpH and an enhanced nonphotochemical quenching (NPQ) of chlorophyll excitations, which underlies strict coordination between nonuniform distributions of pH_o and photosynthetic activity in resting cells. When the action potential (AP) is generated, the longitudinal pH profile is temporarily smoothed out, while the heterogeneity of the distribution of NPQ and PSII photochemical activity (YII) sharply increases. The damping of the pH_o profile is due to the suppression of the H^+ pump and passive H^+ conductance under the influence of an almost 100-fold increase in the cytoplasmic of Ca^{2+} level ($[Ca^{2+}]_c$) during AP. The increase in $[Ca^{2+}]_c$ stimulates photoreduction of O_2 in chloroplasts under external alkaline zones and, at the same time, arrests the cytoplasmic streaming, which causes the accumulation of excess amounts of H_2O_2 in the cytoplasm in areas of intense production of this metabolite, with a weak effect on areas of CO_2 assimilation. These changes enhance the nonuniform distribution of cell photosynthesis and account for the long-term oscillations of chlorophyll fluorescence F_m' and the quantum efficiency of linear electron flow in microscopic cell areas after the AP generation.

Keywords: Characeae, action potential, proton transport, chlorophyll fluorescence oscillations, cytoplasmic streaming, long-distance transport

УДК 577.29

МЕМБРАННЫЕ РЕАКЦИИ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ: КЛАССИЧЕСКИЙ ВЗГЛЯД И СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ

© 2024 г. Т. А. Коваленко^{a, b, *}, М. А. Пантелеев^{a, b, c}

^aЦентр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, 109029 Россия

^bНациональный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Д. Рогачева, Москва, 117997 Россия

^cМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: after-ten@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.04.2024

После доработки 16.05.2024

Принята к печати 17.05.2024

Для остановки кровопотери при повреждении кровеносного сосуда в живых организмах существует сложный механизм, называемый гемостазом. В этом процессе условно выделяют два тесно взаимосвязанных звена — сосудисто-тромбоцитарный и плазменный гемостаз. Плазменный гемостаз представляет собой систему протеолитических реакций, в которых участвуют белки плазмы крови, называемые факторами свертывания. Ключевой особенностью этой системы является протекание большинства ферментативных реакций на поверхности фосфолипидных мембран, что увеличивает их скорость до 5 порядков. В данном обзоре описываются основные механизмы связывания факторов свертывания с фосфолипидными мембранами, пути сборки комплексов и реакций активации, обсуждается роль мембран в этом процессе, их состав и источники. Связывание факторов свертывания с прокоагулянтными мембранами приводит не только к ускорению процессов свертывания, но также к их избирательному протеканию в определенных областях и защите от смывания потоком. Эффективность реакций свертывания регулируется составом внешнего слоя мембраны, преимущественно через специальный механизм митохондриально-управляемой некротической смерти тромбоцитов.

Ключевые слова: факторы свертывания, липиды, теназа, протромбиназа

DOI: 10.31857/S0233475524050063, **EDN:** cbkzdd

1. ВВЕДЕНИЕ

Для остановки кровопотери при повреждении кровеносного сосуда в многоклеточных организмах существует сложный механизм, называемый гемостазом. В этом процессе у позвоночных условно выделяют два тесно взаимосвязанных звена — сосудисто-тромбоцитарный и плазменный гемостаз [1, 2]. В первом участвуют стенки кровеносного сосуда и специализированные клетки крови тромбоциты [3, 4]. Главные участники второго — белки плазмы крови, называемые факторами свертывания, а также их разнообразные ингибиторы [5, 6].

Факторы свертывания представляют собой сериновые протеазы или их аллостерические активаторы — кофакторы. Они циркулируют в кровотоке в форме неактивных предшественников-зимогенов

и переходят в активные формы в результате ограниченного протеолиза другими факторами свертывания. Исключением является фактор VII, 1% которого циркулирует в активной форме фактора VIIa (суффикс «a» используется для обозначения активной формы фактора) [7]. Последовательность актов активации одного фактора другим носит название процесса свертывания крови.

Свертывание крови инициируется, когда плазма крови входит в контакт с внесосудистыми тканями организма, клетки которых экспрессируют интегральный мембранный белок тканевый фактор (TF), который присутствует на внешней мембране этих клеток [8, 9]. При этом TF связывает фактор VII (FVII) и фактор VIIa (FVIIa) из плазмы крови. В результате на поверхности клеточной мембраны формируется комплекс VIIa/TF, называемый внешней теназой, в котором FVIIa является

активной протеазой, а TF — его кофактором [8, 10]. Этот комплекс активирует факторы X и IX с образованием активных факторов Ха и IXa [11, 12]. Сами по себе Ха и IXa являются протеазами и способны медленно активировать протромбин с образованием тромбина и фактор X с образованием фактора Ха соответственно. Однако эти реакции многократно ускоряются в присутствии кофакторов Va и VIIa, с которыми Ха и IXa образуют ферментативные комплексы протромбиназу (Ха/Va) и внутреннюю теназу (IXa/VIIa) [13–16]. Образованный под действием протромбиназы тромбин активирует белок фибриноген с образованием фибрина, а полимеризация фибрина приводит к переходу плазмы крови из жидкого состояния в состояние геля, что препятствует ее вытеканию из сосуда [17] (рис. 1).

Альтернативный путь активации свертывания крови происходит по так называемому контактному механизму, который начинается с активации фактора XII при контакте с отрицательно заряженными поверхностями, активации фактора XI фактором XIIa и фактора IX фактором XIa [18–20] (рис. 1).

Система свертывания крови включает в себя многочисленные обратные связи. Так, тромбин, белок, который формируется на поздних стадиях системы свертывания, способен активировать факторы V и VIII, а фактор Ха активирует комплекс VII/TF в VIIa/TF [21–23] (рис. 1).

Помимо системы активации свертывания крови в плазме существует набор белков, служащий для ее ингибирования. Одним из основных ингибиторов является антитромбин (АТ), ингибитор практически всех протеаз системы свертывания включая тромбин, FXa и FIXa [24]. Кроме того, существует путь белка C, который способен расщеплять кофакторы Va и VIIa, ингибируя протромбиназу и внутреннюю теназу. Кофактором для белка C является белок S, который усиливает его активность. Белок C активируется тромбином в комплексе с белком эндотелия тромбомодулином [25]. Ингибитор пути тканевого фактора (TFPI) действует как на фактор Ха, так и на внешнюю теназу, связываясь с тройным комплексом VIIa/TF/Ха. При этом для ингибирования фактора Ха TFPI требуется белок S, который усиливает аффинность TFPI к фактору Ха [26]. Ингибирование фактора Ха также происходит по пути белка Z. Белок Z является кофактором для Z-зависимого протеазного ингибитора (ZPI), комплекс из этих белков быстро ингибирует фактор Ха [27] (рис. 1).

Ключевой особенностью реакций свертывания крови как активации, так и ингибирования, является то, что эти реакции преимущественно

происходят на поверхности фосфолипидных мембран, источником которых могут быть как клетки (например, активированные тромбоциты), так и фосфолипидные микрочастицы — везикулы. В силу сложности процессов на мембранах и нестабильности промежуточных комплексов вплоть до настоящего времени мембранные реакции являются наиболее плохо понятой частью свертывания крови. В последние годы активно появляются работы, указывающие на необходимость радикального пересмотра этих важных процессов. В настоящем обзоре приведены современные представления о структуре, составе и основных источниках таких мембран, о механизмах связывания и, соответственно, локализации на мембранах факторов свертывания и ключевых принципах формирования и функционирования белковых ферментативных комплексов на фосфолипидных мембранах.

2. СТРУКТУРА И СОСТАВ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАН

Различные мембраны в составе клеток (плазматическая мембрана, мембраны органелл) отличаются по липидному составу. Для всех этих мембран основными структурными липидами являются фосфатидилхолин (PC) и фосфатидилэтаноламин (PE) [28, 29]. Однако мембрана митохондрий, в отличие от других мембран, содержит кардиолипин (CL) [30], а в плазматической мембране содержится самый высокий процент сфингомиелина (SM) и холестерина [29, 31].

Ключевой особенностью плазматической мембраны живых клеток является асимметричность состава и свойств двух липидных слоев в бислое [32, 33]. У эритроцита крови внешний слой мембраны состоит преимущественно из PC и SM [34, 35], хотя в нем также было обнаружено до 4% фосфатидилсерина (PS) [35]. Внутренний цитоплазматический слой состоит преимущественно из PC, PS, содержание которого доходит до 30% [35] и PE. Кроме того, фосфатидная кислота (PA), фосфатидилинозитол (PI) и фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат (PIP2) также находятся преимущественно во внутреннем слое [34, 35]. Аналогичный состав слоев мембраны был описан для неактивированного тромбоцита [34]. Внешний и внутренний слой мембраны эритроцита отличаются входящими в их состав жирными кислотами [35]. Около 35% внешнего слоя составляют липиды с ненасыщенными жирными кислотами в их составе, а большинство (> 80%) липидов имеют ноль, одну или две двойные связи на молекулу липида. С другой стороны, во внутреннем слое большая часть липидов имеет 2 и более двойных связей на молекулу липида с 35%

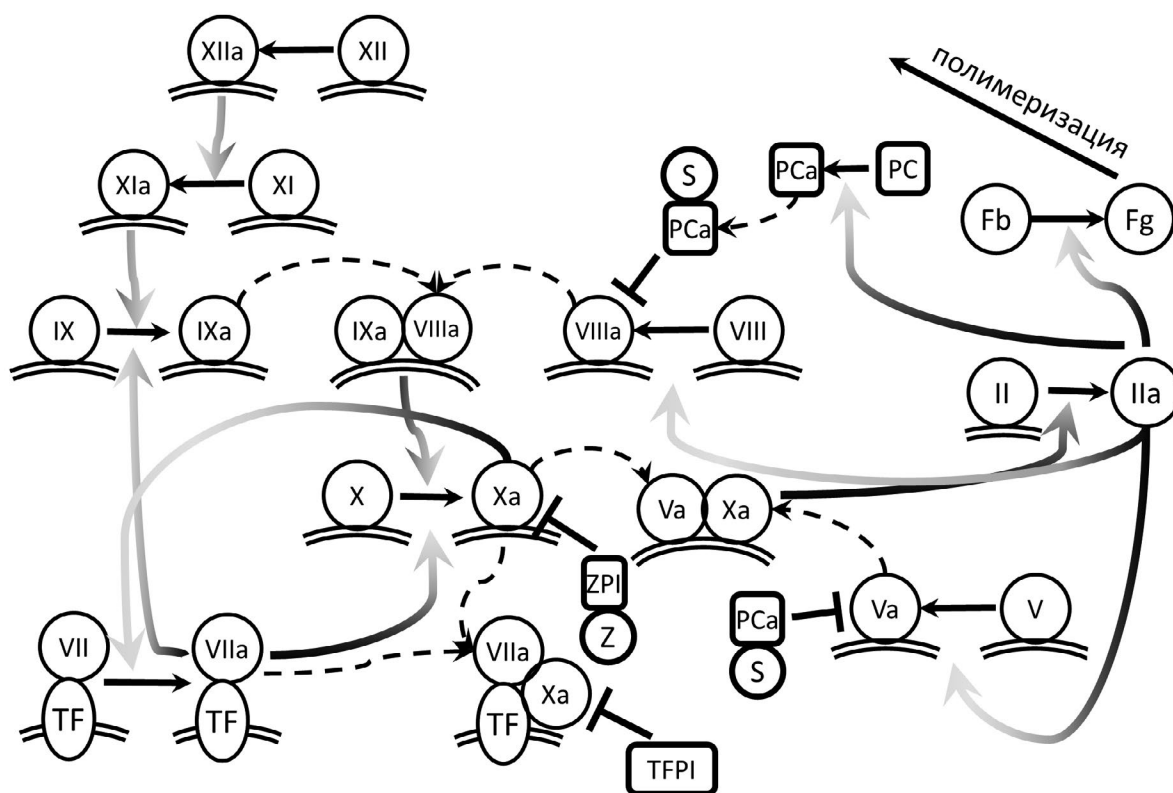


Рис. 1. Упрощенная схема реакций свертывания крови. Римскими цифрами обозначены факторы свертывания (V, VII, VIII, IX, X, XI, XII), суффикс «a» используется для обозначения активной формы. II — протромбин, Fb — фибриноген, Fg — фибрин, TFPI — ингибитор пути тканевого фактора, TF — тканевый фактор, S, Z — белки S и Z, PCa — активированный белок C. Двойная черная линия — схематическое изображение мембраны. Черные стрелки — каталитическая активация, черные пунктирные стрелки — формирование комплексов, серые градиентные стрелки — действие ферментативного комплекса или фермента на субстрат, — ингибирование. Во избежание перегруженности на схеме не указано ингибирование факторов свертывания антитромбином и медленные реакции активации факторов энзимами без кофакторов.

липидов, имеющими 4 двойные связи на молекулу [35]. Отличия в составе слоев ведут к различиям их физических свойств. Внешний слой является менее текучим, липиды в нем имеют меньший коэффициент диффузии и более плотно упакованы по сравнению с внутренним слоем [35].

Асимметрия плазматической мембраны имеет большое значение для правильного функционирования клетки. Высокое процентное содержание PS на внутреннем слое, а также присутствие PIP₂, позволяет ключевым внутриклеточным сигнальным молекулам связываться с мембраной с помощью разнообразных мембраносвязывающих доменов в их составе [36, 37]. Так, различные белки из группы протеинкиназ C (PKC) связываются с мембранами, содержащими PS, PA и PIP₂, и такое связывание необходимо для их активации [38, 39]. Кроме того, асимметрия распределения PS в мембране облегчает включение трансмембранных белков в мембрану [40].

Асимметрия липидного бислоя активно поддерживается в живой клетке АТФ-зависимыми флиппазами, которые переносят PS и PE с внешнего слоя на внутренний [41]. В тромбоците это, предположительно, флиппазы АТР11А и АТР11С [41, 42]. Флиппазы ингибируются, если в цитозоле повышается концентрация ионов Ca²⁺ в результате активации тромбоцитов различными агонистами. В этих условиях активируются скрамблазы (в тромбоците TMEM16F), которые перемешивают липиды в мембране, что приводит к появлению PS и PE на внешней стороне мембраны тромбоцита [42]. Такое нарушение асимметрии наблюдалось при активации тромбоцитов тромбином, когда PS/PI детектировались на внешней стороне мембраны, а также на поверхности липидных микровезикул тромбоцитарного происхождения [34].

Поверхность PS-содержащей мембраны служит платформой для формирования каталитически активных комплексов системы свертывания крови.

Такие поверхности являются эффективным «ускорителем» ферментативных реакций и критически необходимы для быстрого их срабатывания [43].

3. СТРУКТУРА ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ И МЕХАНИЗМЫ ИХ СВЯЗЫВАНИЯ С МЕМБРАНОЙ

3.1. Витамин К-зависимые белки

Семь факторов свертывания и факторов, участвующих в ингибировании, являются витамин К-зависимыми белками, названными так по причине необходимости витамина К для их правильного биосинтеза и функционирования [44]. В число таких факторов входят VII, IX, X, протромбин (PT), а также белки C, S и Z (рис. 2а).

Факторы VII, IX, X и белок C имеют одинаковое доменное строение (рис. 2а) [8, 45]. За N-концевым Gla-доменом в их составе следуют два EGF-подобных домена и C-концевой протеазный домен. Белок Z отличается тем, что вместо протеазного домена в его состав входит псевдо-каталитический домен, в котором отсутствует каталитическая триада (гистидин и серин заменены на аланин и треонин соответственно) [27]. В состав белка S входят Gla-домен, тромбин-чувствительная область (TSR), четыре EGF-подобных домена и два ламинин G-подобных домена [46]. Протромбин состоит из Gla-домена, двух крингл-доменов и протеазного домена (рис. 2а) [47]. Активные формы перечисленных факторов имеют схожее с неактивными доменное строение, за исключением тромбина [8, 48, 49]. При активации от протромбина отрезается фрагмент-1,2, который содержит Gla-домен и два крингл-домена [49]. Таким образом, тромбин теряет способность связываться с мембраной.

В растворе витамин К-зависимые белки имеют достаточно вытянутую конформацию (рис. 2б). Так, расстояние от Gla-домена до каталитической триады фактора X составляет 95Å, а фактора Ха — 83Å [50].

Молекулярно-динамические исследования показали, что отдельные домены факторов VIIa, X и Ха являются жесткими структурами [50, 51]. Однако Gla-, EGF1- и EGF2-домены демонстрируют высокую подвижность друг относительно друга [50, 51], что делает структуру факторов VIIa, X и Ха гибкой в растворе.

Протромбин в растворе существует в двух конформациях, находящихся в состоянии равновесия. Первая конформация — «закрытая» (70% молекул), в которой протеазный домен взаимодействует с крингл-1-доменом с помощью аминокислотных

остатков Tyr93 и Trp547, не подвержена автоактивации. Вторая конформация — «открытая», в которой протеазный и крингл-1-домены не взаимодействуют и которая подвержена автоактивации [47].

Витамин К-зависимые белки обладают способностью обратимо и зависимо от ионов Ca^{2+} связываться с фосфолипидными мембранами при помощи Gla-доменов, входящих в их состав. Gla-домены разных белков схожи как по аминокислотной последовательности, так и по третичной структуре [52–54], причем высокая степень гомологичности наблюдается не только для различных витамин К-зависимых белков человека, но и между белками различных видов. Так, аминокислотные последовательности Gla-доменов фактора IX человека, мыши, быка и крысы идентичны более чем на 90% [54]. Такая высокая консервативность Gla-доменов свидетельствует о критической значимости этой структуры для функционирования белков. Структуры Gla-доменов фактора VII человека и протромбина быка приведены на рис. 2в. Несмотря на то что белки принадлежат организмам разных видов, структуры очень близки ($\text{RMSD} = 3.31 \text{ Å}$).

В состав Gla-доменов витамин К-зависимых белков входит от 9 до 13 нестандартных аминокислотных остатков, γ -карбоксиглутаматов, которые обладают способностью связывать ионы Ca^{2+} (рис. 2в) [52]. Связывание Ca^{2+} критически важно для поддержания структуры белка и его функционирования, так как в отсутствие ионов Ca^{2+} Gla-домен становится разупорядоченным, теряя сложную третичную структуру и способность к связыванию с мембраной [55–57]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, с Gla-доменом ассоциированы 7–8 ионов Ca^{2+} (рис. 2в) [58–60]. У фактора IX и белка C в присутствии ионов магния три (для фактора IX) или два (для белка C) сайта связывания Ca^{2+} на поверхности Gla-домена заняты Mg^{2+} . Пять сайтов при этом заняты Ca^{2+} [61, 62]. Аналогично в Gla-доме фактора VIIa 3 сайта заняты Mg^{2+} и 4 сайта — Ca^{2+} , причем при высоких концентрациях Ca^{2+} один из сайтов магния оказывается занят кальцием [62].

Согласно молекулярно-динамическим исследованиям, Gla-домены достаточно глубоко встраиваются в фосфолипидный бислой. Гидрофобные аминокислотные остатки, расположенные в нижней части Gla-домена (для фактора VII это Phe4, Leu5, Leu8), проникают ниже уровня фосфатов в полярных головках фосфолипидов [53]. При этом между белком и липидами формируются несколько типов взаимодействий. С ионами Ca^{2+} белка взаимодействуют группы COO^- и фосфаты липидов; положительно-заряженные аминокислотные

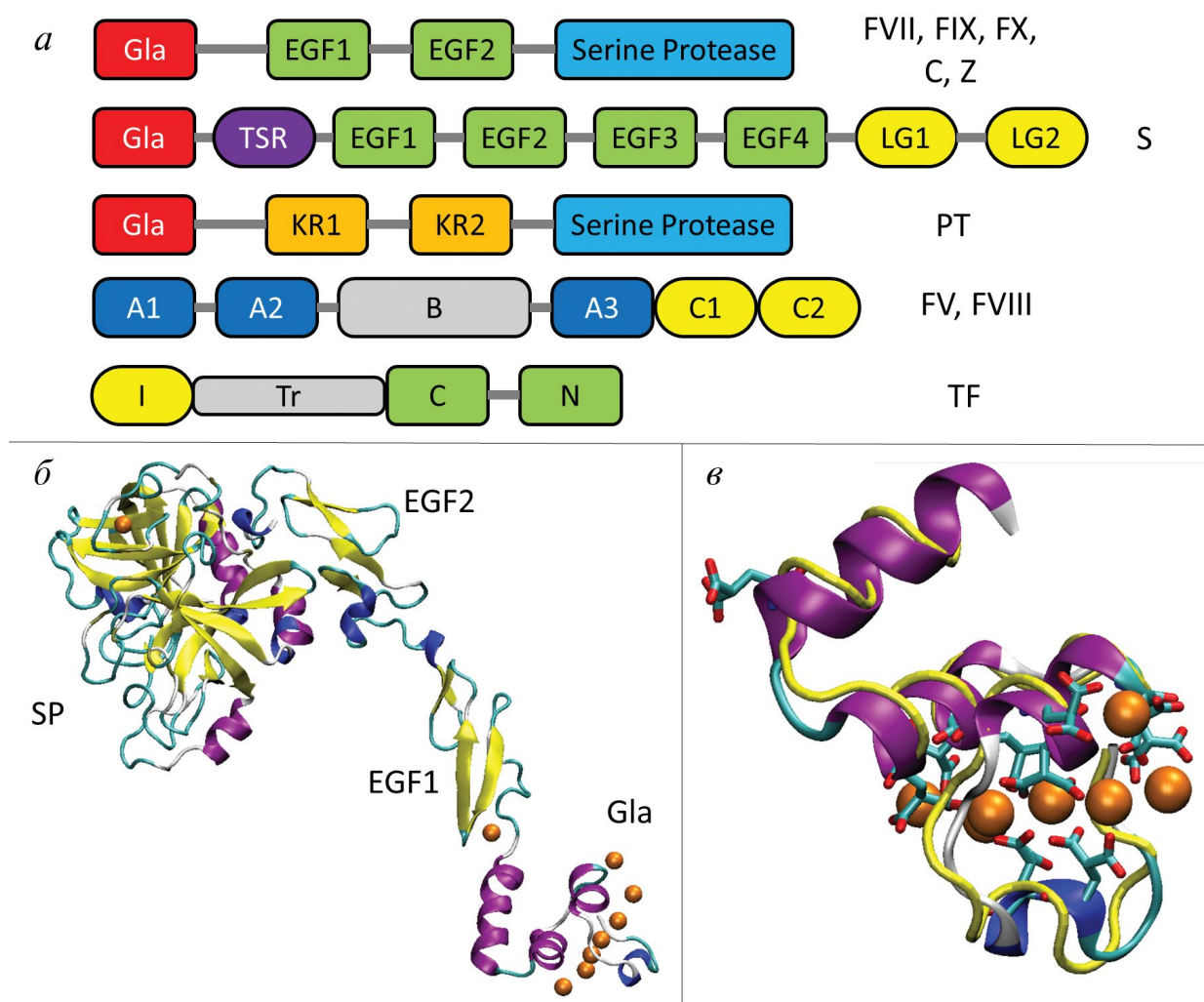


Рис. 2. Структура белков системы свертывания крови.

a – Схема доменного состава отдельных белков. Gla – Gla-домен; EGF1-4 – EGF1-4-домен; Serine Protease – протеазный домен; TSR – тромбин-чувствительная область; LG – ламинин G-подобные домены; KR – крингл-домены; A1-3 – A1-3-домен; C1,2 – C1,2-домен; B – B-домен; I – внутриклеточный домен; Tr – трансмембранный домен; N, C – N- и C-концевые внеклеточные домены.

б – Структура фактора VIIa. Визуализирована в VMD, PDB 1dan [59]. Цвета в соответствии с вторичной структурой белка. Голубой – поворот; желтый – β -лист; фиолетовый – α -спираль; синий – 3_{10} -спираль; белый – нерегулярная структура; рыжий – ионы Ca^{2+} .

в – Gla-домены фактора VIIa человека (цвета в соответствии с вторичной структурой как на панели б, PDB 1dan) и протромбина быка (желтый, PDB 1n12 [58]). Структуры выровнены в VMD, RMSD (среднеквадратичное отклонение между соответствующими атомами основных цепей) = 3.31 Å. У фактора VIIa визуализированы остатки γ -карбоксиглутамата, связанные с ионами Ca^{2+} .

остатки Gla-домена взаимодействуют с группами COO^- и фосфатами липидов [53, 63, 64].

3.2. Факторы V и VIII

Факторы V и VIII после активации тромбином и перехода в формы факторов Va и VIIa являются аллостерическими активаторами (кофакторами) для сериновых протеаз, факторов Xa и IXa соответственно. Эти факторы имеют схожую доменную структуру (рис. 2а): состоят из доменов A1, A2, B, A3, C1 и C2 [65–67].

В плазме крови фактор VIII присутствует в виде гетеродимера из тяжелой (A1-A2-B) и легкой (A3-C1-C2) цепей [67, 68]. Гетеродимер циркулирует в связанном с фактором фон Виллебранда (vWF) состоянии, что удлиняет время его жизни в плазме и предохраняет от протеолитической деградации, причем каждый мономер vWF способен связывать 1 молекулу фактора VIII [66, 69]. В связывании с vWF участвуют C1, C2 и A3 домены фактора VIII [69]. При активации тромбином протеолиз осуществляется в сайтах Arg372, Arg740

и Arg1689, что приводит к вырезанию В домена фактора VIII и диссоциации от vWF [67]. Активная форма фактора VIII, фактор VIIa, является гетеротримером из цепей A1, A2 и A3-C1-C2.

Фактор VIIa является нестабильной молекулой из-за слабых взаимодействий домена A2 с другими доменами и подвержен спонтанной диссоциации с потерей кофакторной активности [70].

Факторы VIII/VIIa связываются с мембраной независимым от Ca^{2+} образом [71] с помощью C1- и C2-доменов [72]. C2-домен является достаточно подвижным относительно остальной структуры фактора VIII. Так, при помощи рентгеноструктурного анализа были обнаружены две конфигурации C2-домена, одна из которых была повернута на $35\text{--}45^\circ$ вокруг центральной оси относительно другой [73]. Предполагается, что переход C2-домена из одной конформации в другую играет роль при связывании с мембраной [73]. В молекулярно-динамическом исследовании было, напротив, показано, что C2-домен встраивается в мембрану, сохраняя примерно один и тот же угол наклона к ней, в то время как C1-домен демонстрирует большой разброс углов наклона к мембране и менее упорядоченную структуру [71]. Такие структурные перестройки доменов C1 и C2 могут быть причиной тех двухступенчатых связывания и диссоциации фактора VIII с наличием быстрой и медленной стадий, которые наблюдаются в эксперименте [74].

Фактор V является одноцепочечным гликопротеином, из которого при активации тромбином в сайтах Arg709, Arg1018 и Arg1545 вырезается В-домен. Образующийся при этом фактор Va является двухцепочечным белком [75]. В плазме фактор V циркулирует в концентрации 20 нМ, а также примерно 20% фактора V содержится в α -гранулах тромбоцита частично в комплексе с белком мультемером [76].

В связывании с мембраной, как и в случае фактора VIII, участвуют домены C1 и C2 фактора V/Va [77, 78]. При этом в мембраносвязанных доменах происходят структурные перестройки [79].

3.3. Трансмембранный белок – тканевый фактор

Тканевый фактор (TF) является интегральным мембранным белком, состоящим из четырех доменов: внутриклеточного (остатки 243–263), трансмембранного (220–242) и двух N-концевых внеклеточных иммуноглобулин-подобных доменов (1–219) [80]. Согласно классическим представлениям, TF экспрессируется клетками организма вне кровеносного сосуда, например, фибробластами адвентициальной оболочки артерий, при

этом формируя так называемую «гемостатическую оболочку» вокруг сосудов [81]. При повреждении эндотелия кровь входит в контакт с этой оболочкой, что запускает процесс свертывания.

Однако согласно более новым данным, молекулы TF всегда присутствуют в кровотоке. Так, в плазме TF существует в виде его растворимой формы, продукта альтернативного сплайсинга asTF, состоящей из 206 аминокислот, из которых 166 те же, что и у полноразмерного белка, но за которыми следует уникальная C-концевая последовательность (остатки 167–206) [82]. AsTF имеет ненулевую прокоагулянтную активность в присутствии фосфолипидов, детектируется в растущих тромбах [82, 83], хотя, по всей видимости, не играет существенной роли в нормальном гемостазе [84, 85]. Повышенные концентрации asTF экспрессируются в клетках опухолей при онкологических заболеваниях, и в этих клетках asTF участвует в путях внутриклеточной сигнализации, связанных с пролиферацией и выживанием (для подробной информации см. [85]).

Полноразмерный трансмембранный TF присутствует на поверхности различных клеток крови. TF экспрессируется активированными нейтрофилами [86–88], активированными моноцитами [89], тромбоцитами, активированными ADP, тромбоксаном A2, коллагеном и тромбином [90–92]. В неактивированных тромбоцитах TF присутствует в альфа-гранулах и в открытой каникулярной системе [92], небольшие концентрации TF, вероятно, присутствуют на их поверхности [91]. TF также присутствует на поверхности фосфолипидных микровезикул в плазме крови, хотя TF-зависимая прокоагулянтная активность таких микровезикул у здоровых доноров была поставлена под сомнение [93].

Поскольку TF постоянно присутствует в крови, интересным кажется вопрос, каким образом кровь сохраняет жидкое состояние, находясь в постоянном контакте с активатором свертывания. Среди возможных причин можно отметить то, что TF на поверхности клеток присутствует в неактивном («encrypted») состоянии, и активация («decryption») необходима для появления прокоагулянтной активности. В активации TF участвуют как мембранные процессы (например, присутствие SM на внешнем слое мембраны приводит к неактивному состоянию TF, а гидролиз SM вызывает его активацию [94]), так и структурные изменения TF [95].

3.4. Кинетика и механизмы связывания факторов свертывания с мембраной

Согласно классическим представлениям, факторы свертывания обладают способностью обратимо связываться с PS-содержащими фосфолипидными мембранами, причем аффинность связывания возрастает с процентным содержанием PS. Подобные данные были получены как с использованием фосфолипидных везикул [96–99], так и липидных нанодисков [100] – бислойных мембранных дисков контролируемого диаметра порядка 10 нм [101, 102]. Несмотря на то что Gla-домены различных витамин К-зависимых белков очень консервативны, их аффинность к мембранам одного состава отличается на порядки [52].

Исследования мембран, содержащих PE, фосфатидилглицерол (PG), PI, PA и CL, показали, что эти липиды также играют роль в связывании витамин К-зависимых белков с мембраной. Так, при увеличении процентного содержания PS в мембране от 20 до 70% (остальные липиды – PC) равновесная константа диссоциации (K_d) фактора X с мембраной монотонно падает. Однако при добавлении в состав мембраны PG, K_d для мембраны состава 20% PS/40% PG/40% PC достигала тех же значений, что и для мембраны состава 50% PS/50% PC [103], то есть PG способствовал лучшему связыванию фактора X с мембраной. Аналогично для всех витамин К-зависимых факторов наблюдалось усиление их связывания при добавлении PE в состав нанодиска, причем усиление было тем заметнее, чем ниже процентное содержание PS [100]. Наличие PE значительно улучшало связывание фактора VIII с мембраной, содержащей 4% PS, и уменьшало до 1% количество PS в мембране, необходимое для детектируемого связывания с ней фактора VIII (в отсутствие PE для связывания с мембраной было необходимо не меньше 8% PS) [104]. Исходя из таких данных, была сформулирована гипотеза ABC (с английского «Anything But Choline», или «что угодно, кроме холина»), согласно которой при связывании факторов с мембраной Gla-домены взаимодействуют не только специфично с полярными группами PS, но и с фосфатами, предоставляемыми всеми типами фосфолипидов. Такой тип связывания наблюдался в молекулярно-динамических исследованиях (см. предыдущие секции). PC, в отличие от PE и других липидов, имеет очень объемную головную группу, которая затрудняет доступ к фосфатам, поэтому связывание с мембранами из 100% PC не наблюдается [103].

Фактор VIIa и белок C имеют достаточно низкую аффинность к PS-содержащим мембранам, однако

значительно лучше связываются с мембранами, содержащими PA [105]. Причиной этого может быть более глубокое погружение Gla-домена фактора VII в мембрану PA/PC по сравнению с PS/PC и большее количество контактов белка с фосфатами в PA/PC [53]. Кроме того, в специфичности к PA, по всей видимости, играет роль положительно-заряженный Lys32, на месте которого у факторов X, IX и протромбина находится γ -карбоксиглутамат [53].

Аффинность некоторых из факторов свертывания к фосфолипидным микровезикулам зависит от размера везикулы. Так, легкая цепь фактора V связывается с везикулами меньшего радиуса с более чем на порядок меньшей K_d по сравнению с везикулами большего радиуса [106]. Одной из причин является более быстрая кинетика связывания с маленькими везикулами из-за диффузионных эффектов [107]. Для протромбина было показано, что K_d связывания растет в 8 раз при росте диаметра везикулы от 27.5 до 330 нм [108]. При этом кинетическая константа связывания уменьшается, но для всех радиусов везикул остается в пределах 25% от значения константы скорости столкновений между частицами, рассчитанной по формуле Смолуховского [108], то есть в этом случае изменение аффинности к мембранам происходит не по причине диффузионных эффектов, а из-за отличий в структуре мембран. Аналогичная зависимость параметров связывания от радиуса кривизны мембраны была предсказана теоретически для факторов X/Xa [109]. В последних исследованиях по связыванию факторов свертывания с мембраной факторы Va и Xa селективно связывались с выпуклыми мембранами радиуса кривизны порядка 10 нм и формировали на них протромбиназу [110].

Интересно, что селективное связывание с мембранами различной топологии демонстрируют не только факторы свертывания. Так, лактадгерин и аннексин A5, белки, часто используемые как маркеры для детекции PS на поверхности клеток [111], обладают такой селективностью. Лактадгерин, присутствующий в молоке и выполняющий ряд функций, среди которых участие в фагоцитозе апоптотических PS-экспрессирующих клеток [112], преимущественно связывается с выпуклыми мембранами большей кривизны [110, 112]. С другой стороны, аннексин A5, который участвует в процессах восстановления мембраны при ее повреждении, лучше связывается с плоскими липидными слоями [110, 113]. Зависимость аффинности к мембране от радиуса кривизны демонстрирует комплекс C5b-7 системы комплемента [114].

Для факторов свертывания характерно неравномерное связывание с поверхностью клеток. На

поверхности активированных эндотелиальных клеток протромбиназа из факторов Va и Xa в основном локализуется на филоподиях, вероятно, из-за большей кривизны их поверхности [110]. На поверхности сильно активированных прокоагулянтных тромбоцитов факторы IXa, X, Va, VIII и протромбин, а также фактор XIII, фибрин/фибриноген и плазминоген концентрируются в так называемых «шапках» — сложных выпуклых структурах, состоящих из мембранных везикул, оргanelл и складок, диаметром в 2 мкм на поверхности тромбоцита (рис. 3) [115–118]. Такое концентрирование факторов на небольшой площади способно привести к значительному ускорению реакций свертывания — до двух порядков [115].

Кинетика связывания факторов свертывания с поверхностью мембраны может быть гораздо сложнее, чем простой одноступенчатый процесс. Так, фактор VIII и фактор IX могут формировать димеры на поверхности мембраны [99, 119]. Димеры фактора Xa формируются как в присутствии растворимой формы PS, C6PS [120], так и на поверхности мембраны [121], причем димеризация фактора Xa происходит одинаково на больших и маленьких везикулах и конкурирует с формированием протромбиназы [122]. Димеризация (или даже мультимеризация) фактора Xa приводит к «гистерезис-подобному» связыванию с мембраной с формированием более плотно связанной фракции белка, которая диссоциирует гораздо медленнее [123]. Предполагается, что такой механизм предохраняет факторы от вымывания потоком из тромба [123]. При связывании с поверхностью нанодисков, изотермы связывания факторов S и Z имели форму сигмoиды, что также может

свидетельствовать о более сложном механизме связывания [105].

Таким образом, связывание факторов свертывания с мембраной является строго регулируемым процессом. В его результате факторы локализуются на мембранах подходящего состава и концентрируются в некоторых их областях, что приводит к значительному ускорению ферментативных реакций системы свертывания крови.

4. ФОРМИРОВАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ НА МЕМБРАНЕ И ВОПРОСЫ ИХ РЕГУЛЯЦИИ

Три основных ферментативных комплекса, принимающих участие в свертывании крови — внешняя теназа, внутренняя теназа и протромбиназа, очень похожи по основным принципам своего формирования и функционирования. Все эти комплексы состоят из двух субъединиц — фермента и его аллостерического активатора кофактора. При этом изолированный фермент, фактор VIIa, IXa или Xa, демонстрирует пренебрежимо малую активность в растворе и в отсутствие кофактора [124, 125]. Комплексы локализуются на поверхности фосфолипидных мембран, которые существенно ускоряют процесс каталитической активации их субстратов.

4.1. Внешняя теназа: комплекс из фактора VIIa и TF

В комплексе внешней теназы фактор VIIa является активным ферментом, а TF — его кофактором (рис. 4a). Кристаллическая структура комплекса из внеклеточного домена тканевого фактора

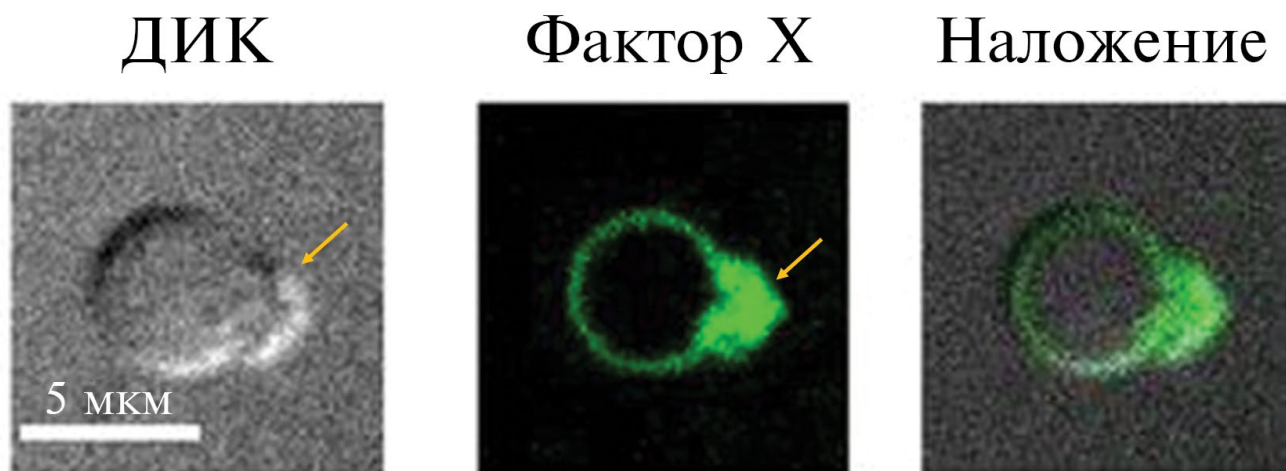


Рис. 3. Концентрирование факторов свертывания в «шапке» тромбоцита. ДИК — изображение, полученное методом дифференциально-интерференционного контраста; в центре (Фактор X) — эпифлуоресцентное изображение в канале фактора X, справа (Наложение) — наложение первых двух изображений. Желтая стрелка отмечает «шапку» [115].

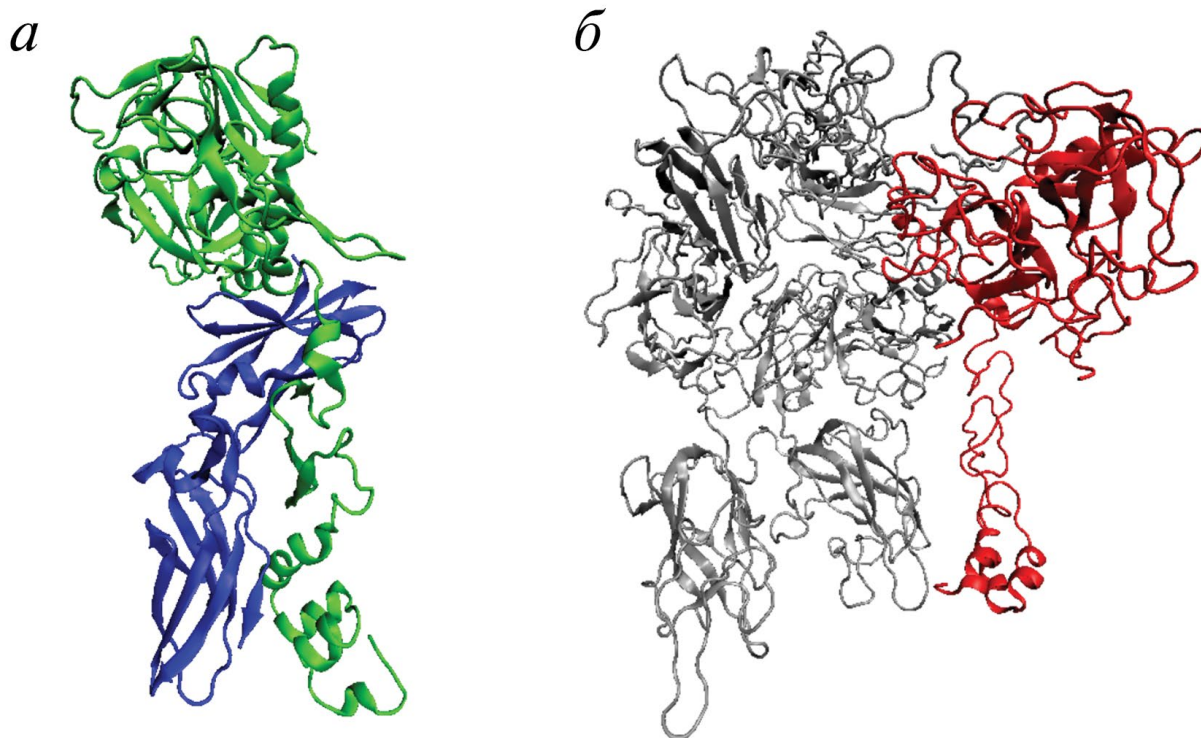


Рис. 4. Структуры ферментативных комплексов. *а* – Внешняя теназа. Зеленый – фактор VIIa; синий – TF. Визуализирована в VMD, PDB 1dan [59]. *б* – Протромбиназа. Серый – фактор Va; красный – фактор Ха. Визуализирована в VMD, PDB 7tpq [13].

и фактора VIIa была получена методом рентгено-структурного анализа [59], а тройного комплекса с фактором X – методом молекулярного докинга [126].

Внешняя теназа образуется при связывании фактора VIIa с TF. TF, являющийся достаточно жесткой молекулой, существенно ограничивает подвижность фактора VIIa, локализуя его активный сайт над мембраной [51]. Оценки K_d для связывания VIIa с мембраносвязанным TF варьируются в пределах 7–56 пМ [101, 127–129], и связывание практически не зависит от состава мембраны [127]. Однако K_d для связывания VIIa с изолированным внеклеточным доменом TF (аминокислоты 1–219) в отсутствие мембраны достигает приблизительно 10 нМ [127, 128, 130], что на 2 порядка превышает K_d для мембраносвязанного TF. Это подчеркивает критическую важность белок-липидных взаимодействий для эффективного формирования ферментативных комплексов свертывания крови.

Механизм формирования внешней теназы может быть сложнее, чем простой одноступенчатый процесс. Так, было предложено, что внешняя теназа формируется по сложному пути, когда фактор VIIa сначала связывается с мембраной, а потом мембраносвязанный VIIa связывается с TF [131]. Более поздние исследования с использованием математического моделирования показали, что

данные [127] по независимости формирования комплекса от состава мембраны можно описать только если исходить из предположения, что TF связывает VIIa напрямую из раствора [109].

На эффективность функционирования внешней теназы большое влияние оказывает состав фосфолипидной мембраны. Скорость активации фактора Ха растет с процентным содержанием PS в двухкомпонентных мембранах (PS/PC) [101, 132]. PE, PI, PA и PG в составе мембраны повышают эффективность активации фактора X и понижают процентное содержание PS, необходимое для максимальной эффективности внешней теназы. Так, добавление в состав мембраны 40% PE понижает до 6% содержание PS, необходимое для максимальной эффективности активации (без PE максимальная эффективность достигалась при 15% PS) [132]. Такой же эффект наблюдался при добавлении PI, PG и CL [132]. С другой стороны, присутствие сфингомиелина (SM) оказывает ингибирующее действие на внешнюю теназу, при этом не влияя на связывание фактора VIIa с TF [94, 132, 133]. В ингибирующем действии SM ключевую роль играют его ОН-группы и более плотная упаковка такой мембраны по сравнению с PS/PC мембранами [133].

Активность внешней теназы зависит от концентрации фосфолипидов в системе. Наблюдаемая каталитическая константа ($k_{кат}$) росла, а константа Михаэлиса (K_m) падала при росте концентрации фосфолипидов, приходящихся на 1 молекулу TF [134, 135]. Предполагается, что причиной такого изменения эффективности является то, что внешняя теназа преимущественно связывает и активирует фактор X, который предварительно связался с мембраной [134]. Похожие данные с таким же выводом относительно предпочтительного пути доставки субстрата были получены ранее [136]. Однако, согласно другим данным, основным путем формирования тройного комплекса является связывание фактора X напрямую из раствора [137], и этот путь доставки способен поддерживать значительные скорости активации фактора X [101]. В нашем исследовании при помощи математического моделирования было показано, что путь доставки фактора X к внешней теназе может зависеть от условий протекания реакции. Так, при поверхностных плотностях TF $< 2.8 \times 10^{-3}$ нмол/см² фактор X связывается с внешней теназой преимущественно с поверхности мембраны, однако при больших поверхностных плотностях TF начинает преобладать доставка из раствора, причем, в соответствии с экспериментальными данными [101], этот путь способен поддерживать сравнимые с мембранным путем скорости активации [138]. Наличие в системе белков, которые способны конкурировать с фактором X за сайты связывания на мембране, «переключает» внешнюю теназу на активацию фактора X из раствора, причем эффект тем сильнее, чем ниже концентрация фактора X и выше аффинность молекулы-конкурента к мембране [138].

4.2. Внутренняя теназа: комплекс из факторов IXa и VIIa

В комплексе внутренней теназы фактор IXa является активным ферментом, а VIIa — его кофактором. В отсутствие фактора VIIa фактор IXa демонстрирует очень низкую каталитическую активность даже относительно простых синтетических субстратов. Вероятная причина этого — наличие в его структуре автоингибирующей части, 99-петли, которая стерически блокирует доступ к его активному сайту [139, 140]. Связывание с фактором VIIa и X приводит к реорганизации 99-петли и значительному увеличению протеолитической активности [141].

Структура внутренней теназы на поверхности мембраны была получена методом малоуглового рентгеновского рассеяния в сочетании

с компьютерным моделированием [16], а также методом молекулярного докинга [142]. Все домены факторов IXa и VIIa участвуют в формировании этого комплекса, кроме, вероятно, одного из C-доменов.

Скорость активации фактора X внутренней теназой имеет колоколообразную зависимость от концентрации фосфолипидов — реакция ингибируется большой площадью мембраны [15]. Аналогичная форма зависимости была предсказана в модели внешней теназы по причине значительного сокращения поверхностных плотностей фермента и субстрата при больших концентрациях фосфолипидов [138].

Для внутренней теназы, как и для внешней, предпочтительные пути формирования комплекса и доставки к нему субстрата зависят от условий протекания реакции. При малых концентрациях фосфолипидов играет роль связывание факторов IXa и X напрямую из раствора, а при избытке фосфолипидов комплексы формируются из мембраносвязанных факторов [143]. При этом большую роль играет формирование комплекса кофактор—субстрат (VIIa—X) [15, 143].

В случае внутренней теназы поверхность мембраны является эффективным «предохранителем» для фактора VIIa от спонтанной диссоциации. Так, при малых концентрациях липидов (0.5 мкМ) больше 80% фактора VIIa инактивировалось за первые несколько минут реакции, когда меньше 5% фактора X было активировано. С другой стороны, при больших концентрациях липидов (32 мкМ) быстрая инактивация фактора VIIa начинается тогда, когда практически весь доступный фактор X уже активирован [143].

4.3. Протромбиназа: комплекс из факторов Xa и Va

В комплексе протромбиназы фактор Xa является активным ферментом, а Va — его кофактором (рис. 4б). Структура этого комплекса была получена при помощи гомологичного моделирования на основе кристаллической структуры протромбиназы из змеиного яда [144] и при помощи криоэлектронной микроскопии в связанном с нанодиском состоянии [13]. Помимо этого, была получена структура тройного комплекса с субстратом протромбиназы протромбином [13].

При активации протромбина основная цепь белка должна расщепляться в двух местах: в Arg271 и Arg320, после чего образуется двухцепочечный тромбин. При расщеплении только Arg271 образуется неактивный предшественник претромбин-2, а при расщеплении только Arg320 — активный

предшественник мейзотромбин [145]. Открытая форма протромбина активируется преимущественно по пути Arg271 через претромбин-2, а закрытая — через Arg320 и мейзотромбин [146]. Интересно, что в различных условиях протекания реакции протромбин активируется разными способами. Так, в растворе и в отсутствие фактора Va [14, 145], а также на поверхности тромбоцитов [147] активация идет по пути претромбина-2 через разрезание Arg271. С другой стороны, на поверхности синтетических микровезикул [147] и эритроцитов [148] активация идет по пути мейзотромбина и разрезание Arg320. Такие данные позволяют предположить, что топология поверхности и ее липидный состав могут влиять на предпочтительные конформации белков и преобладающий путь активации.

Зависимость скорости активации протромбина от концентрации липидов имеет колоколообразную форму [149]. Для эффективной активации необходимо формирование липидного бислоя, так как мембрана в форме везикул поддерживает реакцию гораздо эффективнее, чем растворимые формы липидов [150, 151]. Увеличение скорости реакции с площадью фосфолипидной поверхности коррелирует с предположениями, что протромбиназа собирается из факторов Va и Ха, которые предварительно связались с мембраной [152], а также активирует мембраносвязанный протромбин [149, 153]. Однако данные результаты по молекулярным механизмам формирования комплексов были получены в условиях избытка фосфолипидной поверхности, поэтому вполне вероятно, что в других условиях протекания реакции пути сборки могут переключиться на факторы Ха и протромбин в растворе, как это было у внешней и внутренней теназы.

Интересно, что зависимость скорости активации протромбина от концентрации протромбиназы также имеет колоколообразную форму, то есть реакция ингибируется высокими концентрациями фермента [149].

Функционирование протромбиназы зависит от состава фосфолипидной поверхности. Так, скорость активации протромбина растет с ростом процентного содержания PS в везикулах из PS/PC [151, 154]. При этом добавление PE сокращает количество PS, нужное для достижения максимальной активности [151, 154, 155], а SM, наоборот, имеет ингибирующее действие [154, 156], причем эффект тем сильнее, чем больше процентное содержание этих липидов.

4.4. Общие вопросы регуляции ферментативных комплексов

Таким образом, у ферментативных комплексов внешней/внутренней теназы и протромбиназы схожие механизмы функционирования. Они имеют качественно идентичную зависимость скорости активации субстратов от концентрации и состава фосфолипидов, предпочтительно активируют мембраносвязанный субстрат в случаях, если нет большого дефицита мембранной поверхности. Однако в случае дефицита фосфолипидов, могут переключиться на субстрат из раствора.

Лактадгерин обладает способностью ингибировать внутреннюю теназу и протромбиназу более чем на 98% их активности [157]. Причиной такого сильного ингибирования может быть не столько нарушение мембранного пути доставки субстрата, сколько сопутствующее нарушение формирования ферментативного комплекса и вытеснение его с мембраны. Интересно, что эффект лактадгериина на внешнюю теназу (которую, по всей видимости, нельзя полностью вытеснить с мембраны, так как TF является интегральным мембранным белком) несколько слабее [157].

Важной особенностью факторов свертывания является зависимость их связывания с мембранами от радиуса кривизны мембран — связывание более сильное и более быстрое с везикулами меньшего радиуса (см. предыдущие секции). Такая зависимость связывания коррелирует с большей эффективностью меньших везикул в реакциях активации фактора X и протромбина внутренней теназой и протромбиназой соответственно [157], и в 50–100 раз большей прокоагулянтной активностью тромбоцитарных микровезикул по сравнению с тромбоцитами [158]. Однако в исследовании при помощи компьютерного моделирования было показано, что зависимость связывания факторов от радиуса фосфолипидных везикул приводит лишь к 25% изменению скорости активации фактора X внешней теназой [109], то есть эффект несколько слабее, чем наблюдается в эксперименте [157]. Таким образом, причины наблюдаемых различий больших и маленьких везикул могут состоять не только в разном связывании факторов свертывания, но и во влиянии на структуру и каталитическую активность комплексов.

Еще одной важной особенностью ферментативных комплексов системы свертывания крови является их функционирование в присутствии потока. В закрытой системе (пробирке) с фиксированными концентрациями всех реагентов функционирование комплексов, по-видимому, не достигает стационарных состояний: скорость

активации субстратов непрерывно меняется с течением времени, в том числе из-за истощения субстрата [138, 143]. Однако в присутствии потока реакция достигает стационарного состояния и постоянной скорости активации субстрата, что было показано как теоретически, так и экспериментально [138, 159, 160]. В условиях потока активированные факторы свертывания аккумулируются на поверхности мембраны [138], и этот процесс может быть усилен за счет двухступенчатого связывания и димеризации.

5. ПРИРОДА, ИСТОЧНИКИ МЕМБРАН, ИХ ОТЛИЧИЯ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Фосфолипидные мембраны, на которых могут идти ферментативные реакции свертывания крови, предоставляются клетками организма и фосфолипидными микровезикулами, причем источники таких мембран отличаются в норме и разнообразных патологических состояниях.

В норме реакции системы свертывания идут на поверхности активированных тромбоцитов [3], причем не все тромбоциты ускоряют ферментативные реакции в равной степени. При активации тромбоцитов формируется две их субпопуляции [161–163]: (1) PS-отрицательные тромбоциты, способные агрегировать из-за наличия на их поверхности активных интегринов $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и способные к контракции; (2) PS-положительные или прокоагулянтные тромбоциты, на поверхности которых собираются комплексы системы свертывания. PS-положительные тромбоциты не могут агрегировать самостоятельно, но могут встраиваться в агрегат с PS-отрицательными тромбоцитами [164]. При этом в формирующемся тромбе прокоагулянтные тромбоциты вытесняются наружу, локализуя фибрин на поверхности тромба [165].

Реакции свертывания также идут на поверхности липидных микровезикул, которые испускаются различными типами клеток в ответ на активацию или апоптоз. В крови здоровых доноров такие везикулы имеют тромбоцитарную, эритроцитарную, гранулоцитарную или эндотелиальную природу и способны поддерживать формирование тромбина по TF-независимому пути, хотя часть этих микровезикул содержат TF на поверхности [166]. Однако везикулы из плазмы здоровых доноров плохо встраивались в растущий тромб и не влияли на его формирование при артериальных скоростях потока [167].

Мембрана для реакций свертывания может также предоставляться эритроцитами: в крови здоровых доноров циркулирует 0.4–0.5% эритроцитов, содержащих PS на внешней стороне мембраны [168].

Интересно, что эритроциты оказываются встроены в структуру растущего тромба [169]. Скорее всего, эритроциты могут вносить вклад в свертывание в патологических ситуациях (когда они повреждены, и доля прокоагулянтных эритроцитов большая); их вклад в норме является недоказанным.

При различных патологических состояниях, связанных с повышенным риском тромбоза, источники и количество любых прокоагулянтных поверхностей на самом деле существенно изменяются. Так, количество циркулирующих прокоагулянтных тромбоцитов значительно выше у пациентов с онкологическими заболеваниями, чем у здоровых доноров и растет с тяжестью заболевания [170, 171]. При этом опухолевые клетки, по-видимому, способны активировать тромбоциты [172]. Количество PS-положительных тромбоцитов также растет у пациентов с сепсисом по сравнению со здоровыми донорами [173], повышенное количество PS-положительных тромбоцитов коррелирует с риском ишемического инсульта [3].

Количество микровезикул, как TF-положительных, так и PS-положительных, растет при большом наборе патологических состояний, среди которых инфекционные заболевания [174], онкология [80], сепсис [173], сердечно-сосудистые заболевания [175]. При онкологических заболеваниях клетки различных опухолей экспрессируют TF, который способен запускать свертывание на их поверхности [176, 177].

6. ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ И ЗНАЧЕНИЕ МЕМБРАННЫХ РЕАКЦИЙ

В живом организме мембранные реакции системы свертывания крови являются не единственными реакциями на мембране. Так, как уже было сказано ранее, аннексин A5 и лактадгерин присоединяются к мембранам клеток для выполнения своих функций. Интересно, что мембраносвязывающий домен лактадгерина (C2-домен) является C-доменом того же типа, что и в факторах свертывания V и VIII [178], что дополнительно подчеркивает универсальность таких мембраносвязывающих структур. Помимо этого, реакции внутриклеточной сигнализации [179] и системы комплемента [180] происходят на поверхности мембран.

Как было показано выше, мембраносвязывающие Gla-домены факторов свертывания разных видов организмов обладают высокой степенью идентичности как их аминокислотной последовательности, так и вторичной/третичной структур (см. раздел 3). Эволюционные исследования показали, что, по-видимому, консервативность этих структур еще выше. Так, Gla-домены были

обнаружены в геноме асцидий, у которых, по всей видимости, еще не сформировалась белковая система свертывания крови [181, 182]. При этом в геноме иглобрюхих рыб были обнаружены факторы свертывания, в состав которых уже входили Gla-домены и которые были более чем на 40% идентичны факторам свертывания млекопитающих [181]. Таким образом, мембраносвязывающие домены факторов свертывания эволюционно сформировались одновременно с этой системой, хотя способность связываться с мембраной этих структур остается под вопросом.

Значение мембранозависимых реакций для нормального формирования тромбов используется в клинической практике. Так, некоторые из используемых антикоагулянтов нацелены именно на ингибирование связывания факторов свертывания с мембраной. Например, варфарин является антагонистом витамина К, необходимого для посттрансляционной модификации витамин К-зависимых белков и образования γ -карбоксиглутаматов в их Gla-доменах [183]. Цитрат натрия, известный и часто используемый антикоагулянт, выполняет свои функции за счет связывания ионов Ca^{2+} , что приводит, в том числе, к нарушению укладки Gla-доменов и ингибированию мембранозависимых реакций [184].

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мембраны активированных клеток, липидных везикул выполняют ряд важных функций в системе свертывания крови. Они локализуют и концентрируют факторы свертывания в определенных участках мембран, а также, возможно, влияют на их подвижность и конформацию, что приводит к значительному ускорению ферментативных реакций. Скорость реакций строго регулируется составом мембраны, так как в ней есть как активирующие, так и ингибирующие компоненты. Нарушение такой строгой регуляции, повышенные количества PS или других прокоагулянтных липидов в кровотоке появляются при заболеваниях, связанных с повышенным риском тромбоза.

Исходно мембранные реакции рассматривались как способ увеличить скорости реакций свертывания. Эта роль может быть по-прежнему важна, и концентрирование белков в «шапках» тромбоцитов указывает на это. Однако две другие роли: управление протеканием процесса свертывания в различных регионах тромба и предотвращение размывания потоком, сейчас представляются не менее важными. Дальнейшее

прояснение этих механизмов может привести к существенному пересмотру наших представлений о работе системы свертывания и родственных систем (например, комплемента), а также стимулировать разработку новых подходов диагностики и терапии ее нарушений.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 23-74-00057.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Versteeg H.H., Heemskerk J.W.M., Levi M., Reitsma P.H. 2013. New fundamentals in hemostasis. *Physiol. Rev.* **93**, 327–358.
2. Бутылин А.А., Пантелеев М.А., Атауллаханов Ф.И. 2007. Пространственная динамика свертывания крови. *Росс. хим. журн.* **51**, 45–50.
3. Podoplelova N.A., Nechipurenko D.Y., Ignatova A.A., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. 2021. Procoagulant platelets: Mechanisms of generation and action. *Hemostaseologie*. **41**, 146–153. doi 10.1055/a-1401-2706
4. Свешникова А., Степанян М., Пантелеев М. 2022. Функциональные ответы тромбоцитов и внутриклеточная сигнализация: молекулярные связи. Часть 1: ответы. *Системная биология и физиология*. **1**, 14–23. doi 10.52455/sbpr.01.202101014
5. Podoplelova N.A., Sulimov V.B., Ilin I.S., Tashilova A.S., Panteleev M.A., Ledeneva I.V., Shikhaliyev K.S. 2020. Blood coagulation in the 21st century: Existing knowledge, current strategies for treatment and perspective. *Pediatr. Hematol. Immunopathol.* **19**, 139–157. doi 10.24287/1726-1708-2020-19-1-139-157
6. Protty M.B., Jenkins P.V., Collins P.W., O'Donnell V.B. 2022. The role of procoagulant phospholipids on the surface of circulating blood cells in thrombosis and haemostasis. *Open Biol.* **12**, 210318. doi 10.1098/rsob.210318
7. Morrissey J.H. 1996. Plasma factor VIIa: Measurement and potential clinical significance. *Haemostasis*. **26** Suppl 1, 66–71. doi 10.1159/000217243
8. Kovalenko T.A., Panteleev M.A., Sveshnikova A.N. 2017. The mechanisms and kinetics of initiation of blood coagulation by the extrinsic tenase complex. *Biophysics (Oxf)*. **62**, 291–300. doi 10.1134/S0006350917020105

9. Butenas S. 2012. Tissue factor structure and function. *Scientifica (Cairo)*. **2012**, 964862. doi 10.6064/2012/964862
10. Zelaya H., Rothmeier A.S., Ruf W. 2018. Tissue factor at the crossroad of coagulation and cell signaling. *J. Thromb. Haemost.* **16**, 1941–1952. doi 10.1111/jth.14246
11. Smith S.B., Gailani D. 2008. Update on the physiology and pathology of factor IX activation by factor XIa. *Expert Rev. Hematol.* **1**, 87–98. doi 10.1586/17474086.1.1.87
12. Lu G., Broze G.J.J., Krishnaswamy S. 2004. Formation of factors IXa and Xa by the extrinsic pathway: Differential regulation by tissue factor pathway inhibitor and antithrombin III. *J. Biol. Chem.* **279**, 17241–17249. doi 10.1074/jbc.M312827200
13. Ruben E.A., Summers B., Rau M.J., Fitzpatrick J.A.J., Di Cera E. 2022. Cryo-EM structure of the prothrombin-prothrombinase complex. *Blood*. **139**, 3463–3473. doi 10.1182/blood.2022015807
14. Brufatto N., Nesheim M.E. 2003. Analysis of the kinetics of prothrombin activation and evidence that two equilibrating forms of prothrombinase are involved in the process. *J. Biol. Chem.* **278**, 6755–6764. doi 10.1074/jbc.M206413200
15. Pantelev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J., Ataullakhanov F.I., Saenko E.L. 2006. Factor VIIIa regulates substrate delivery to the intrinsic factor X-activating complex. *FEBS J.* **273**, 374–387.
16. Childers K.C., Peters S.C., Lollar P., Spencer H.T., Doering C.B., Spiegel P.C. 2022. SAXS analysis of the intrinsic tenase complex bound to a lipid nanodisc highlights intermolecular contacts between factors VIIIa/IXa. *Blood Adv.* **6**, 3240–3254. doi 10.1182/bloodadvances.2021005874
17. Weisel J.W., Litvinov R.I. 2017. Fibrin formation, structure and properties. *Subcell. Biochem.* **82**, 405–456. doi 10.1007/978-3-319-49674-0_13
18. Chelushkin M.A., Pantelev M.A., Sveshnikova A.N. 2017. Activation of the contact pathway of blood coagulation on the circulating microparticles may explain blood plasma coagulation induced by dilution. *Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **11**, 130–143. doi 10.1134/S1990747817020040
19. Terent'eva V.A., Sveshnikova A.N., Pantelev M.A. 2017. Biophysical mechanisms of contact activation of blood-plasma clotting. *Biophysics (Oxf)*. **62**, 742–753. doi 10.1134/S0006350917050232
20. Wu Y. 2015. Contact pathway of coagulation and inflammation. *Thromb. J.* **13**, 17. doi 10.1186/s12959-015-0048-y
21. Balandina A.N., Shibeko A.M., Kireev D.A., Novikova A.A., Shmirev I.I., Pantelev M.A., Ataullakhanov F.I. 2011. Positive feedback loops for factor V and factor VII activation supply sensitivity to local surface tissue factor density during blood coagulation. *Biophys. J.* **101**, 1816–1824. doi 10.1016/j.bpj.2011.08.034
22. Lakshmanan H.H.S., Estonilo A., Reitsma S.E., Melrose A.R., Subramanian J., Zheng T.J., Maddala J., Tucker E.I., Gailani D., McCarty O.J.T., Journey P.L., Puy C. 2022. Revised model of the tissue factor pathway of thrombin generation: Role of the feedback activation of FXI. *J. Thromb. Haemost.* **20**, 1350–1363. doi 10.1111/jth.15716
23. Shibeko A.M., Lobanova E.S., Pantelev M.A., Ataullakhanov F.I. 2010. Blood flow controls coagulation onset via the positive feedback of factor VII activation by factor Xa. *BMC Syst. Biol.* **4**, 5. doi 10.1186/1752-0509-4-5
24. Amiral J., Seghatchian J. 2018. Revisiting antithrombin in health and disease, congenital deficiencies and genetic variants, and laboratory studies on α and β forms. *Transfus. Apher. Sci.* **57**, 291–297. doi 10.1016/j.transci.2018.04.010
25. Dahlbäck B., Villoutreix B.O. 2005. Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: Novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1311–1320. doi 10.1161/01.ATV.0000168421.13467.82
26. Adams M. 2012. Tissue factor pathway inhibitor: new insights into an old inhibitor. *Semin. Thromb. Hemost.* **38**, 129–134. doi 10.1055/s-0032-1301410
27. Almawi W.Y., Al-Shaikh F.S., Melemedjian O.K., Almawi A.W. 2013. Protein Z, an anticoagulant protein with expanding role in reproductive biology. *Reproduction*. **146**, R73–R80. doi 10.1530/REP-13-0072
28. Enkavi G., Javanainen M., Kulig W., Róg T., Vattulainen I. 2019. Multiscale simulations of biological membranes: The challenge to understand biological phenomena in a living substance. *Chem. Rev.* **119**, 5607–5774. doi 10.1021/acs.chemrev.8b00538
29. Vance J.E. 2015. Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic*. **16**, 1–18. doi https://doi.org/10.1111/tra.12230
30. Jiang Z., Shen T., Huynh H., Fang X., Han Z., Ouyang K. 2022. Cardiolipin regulates mitochondrial ultrastructure and function in mammalian cells. *Genes (Basel)*. **13**, 1889. doi 10.3390/genes13101889
31. Yang Y., Lee M., Fairn G.D. 2018. Phospholipid subcellular localization and dynamics. *J. Biol. Chem.* **293**, 6230–6240. doi 10.1074/jbc.R117.000582
32. Fujimoto T., Parmryd I. 2016. Interleaflet coupling, pinning, and leaflet asymmetry-major players in plasma membrane nanodomain formation. *Front. cell Dev. Biol.* **4**, 155. doi 10.3389/fcell.2016.00155
33. Gupta A., Korte T., Herrmann A., Wohland T. 2020. Plasma membrane asymmetry of lipid organization: Fluorescence lifetime microscopy and correlation spectroscopy analysis. *J. Lipid Res.* **61**, 252–266. doi 10.1194/jlr.D119000364

34. Murate M., Abe M., Kasahara K., Iwabuchi K., Umeda M., Kobayashi T. 2015. Transbilayer distribution of lipids at nano scale. *J. Cell Sci.* **128**, 1627–1638. doi 10.1242/jcs.163105
35. Lorent J.H., Levental K.R., Ganesan L., Rivera-Longworth G., Sezgin E., Doktorova M., Lyman E., Levental I. 2020. Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 644–652. doi 10.1038/s41589-020-0529-6
36. Cho W., Stahelin R. V. 2005. Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 119–151. doi 10.1146/annurev.biophys.33.110502.133337
37. Yu J., Boehr D.D. 2023. Regulatory mechanisms triggered by enzyme interactions with lipid membrane surfaces. *Front. Mol. Biosci.* **10**, 1306483. doi 10.3389/fmolb.2023.1306483
38. Igumenova T.I. 2015. Dynamics and membrane interactions of protein kinase C. *Biochemistry.* **54**, 4953–4968. doi 10.1021/acs.biochem.5b00565
39. Velnati S., Centonze S., Girivetto F., Capello D., Biondi R.M., Bertonni A., Cantello R., Ragnoli B., Malerba M., Graziani A., Baldanzi G. 2021. Identification of key phospholipids that bind and activate atypical PKCs. *Biomedicines.* **9**. doi 10.3390/biomedicines9010045
40. Scott H.L., Heberle F.A., Katsaras J., Barrera F.N. 2019. Phosphatidylserine asymmetry promotes the membrane insertion of a transmembrane helix. *Biophys. J.* **116**, 1495–1506. doi 10.1016/j.bpj.2019.03.003
41. Sakuragi T., Nagata S. 2023. Regulation of phospholipid distribution in the lipid bilayer by flippases and scramblases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **24**, 576–596. doi 10.1038/s41580-023-00604-z
42. Millington-Burgess S.L., Harper M.T. 2022. Maintaining flippase activity in procoagulant platelets is a novel approach to reducing thrombin generation. *J. Thromb. Haemost.* **20**, 989–995. doi 10.1111/jth.15641
43. Panteleev M.A., Shibeko A.M., Nechipurenko D.Y., Beresneva E.A., Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N. 2022. Haemostasis and thrombosis. Spatial organization of the biochemical processes at microscale. *Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* **16**, 107–114. doi 10.1134/S1990747822030084
44. Suttie J.W. 1993. Synthesis of vitamin K-dependent proteins. *FASEB J.* **7**, 445–452. doi 10.1096/fasebj.7.5.8462786
45. Wildhagen K.C.A.A., Lutgens E., Loubele S.T.G.B., ten Cate H., Nicolaes G.A.F. 2011. The structure-function relationship of activated protein C. Lessons from natural and engineered mutations. *Thromb. Haemost.* **106**, 1034–1045. doi 10.1160/TH11-08-0522
46. Gierula M., Ahnström J. 2020. Anticoagulant protein S – New insights on interactions and functions. *J. Thromb. Haemost.* **18**, 2801–2811. doi https://doi.org/10.1111/jth.15025
47. Pozzi N., Bystranowska D., Zuo X., Di Cera E. 2016. Structural architecture of prothrombin in solution revealed by single molecule spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **291**, 18107–18116. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.738310
48. Stojanovski B.M., Pelc L.A., Di Cera E. 2020. Role of the activation peptide in the mechanism of protein C activation. *Sci. Rep.* **10**, 11079. doi 10.1038/s41598-020-68078-z
49. Davie E.W., Kulman J.D. 2006. An overview of the structure and function of thrombin. *Semin. Thromb. Hemost.* **32** Suppl 1, 3–15. doi 10.1055/s-2006-939550
50. Venkateswarlu D., Perera L., Darden T., Pedersen L.G. 2002. Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X. *Biophys. J.* **82**, 1190–1206. doi 10.1016/S0006-3495(02)75476-3
51. Ohkubo Y.Z., Morrissey J.H., Tajkhorshid E. 2010. Dynamical view of membrane binding and complex formation of human factor VIIa and tissue factor. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 1044–1053. doi 10.1111/j.1538-7836.2010.03826.x
52. McDonald J.F., Shah A.M., Schwalbe R.A., Kisiel W., Dahlback B., Nelsestuen G.L. 1997. Comparison of naturally occurring vitamin K-dependent proteins: correlation of amino acid sequences and membrane binding properties suggests a membrane contact site. *Biochemistry.* **36**, 5120–5127. doi 10.1021/bi9626160
53. Muller M.P., Morrissey J.H., Tajkhorshid E. 2022. Molecular View into preferential binding of the factor VII Gla domain to phosphatidic acid. *Biochemistry.* **61**, 1694–1703. doi 10.1021/acs.biochem.2c00266
54. Huang M., Furie B.C., Furie B. 2004. Crystal structure of the calcium-stabilized human factor IX Gla domain bound to a conformation-specific anti-factor IX antibody. *J. Biol. Chem.* **279**, 14338–14346. doi 10.1074/jbc.M314011200
55. Brandstetter H., Bauer M., Huber R., Lollar P., Bode W. 1995. X-ray structure of clotting factor IXa: Active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 9796–9800. doi 10.1073/pnas.92.21.9796
56. Soriano-Garcia M., Padmanabhan K., de Vos A.M., Tulinsky A. 1992. The Ca²⁺ ion and membrane binding structure of the Gla domain of Ca-prothrombin fragment 1. *Biochemistry.* **31**, 2554–2566. doi 10.1021/bi00124a016
57. Sunnerhagen M., Forsén S., Hoffrén A.M., Drakenberg T., Teleman O., Stenflo J. 1995. Structure of the Ca²⁺-free Gla domain sheds light on membrane binding of blood coagulation proteins. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 504–509. doi 10.1038/nsb0695-504
58. Huang M., Rigby A.C., Morelli X., Grant M.A., Huang G., Furie B., Seaton B., Furie B.C. 2003. Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 751–756. doi 10.1038/nsb971

59. Banner D.W., D'Arcy A., Chene C., Winkler F.K., Guha A., Konigsberg W.H., Nemerson Y., Kirchhofer D. 1996. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature*. **380**, 41–46. doi 10.1038/380041a0
60. Mizuno H., Fujimoto Z., Atoda H., Morita T. 2001. Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 7230–7234. doi 10.1073/pnas.131179698
61. Shikamoto Y., Morita T., Fujimoto Z., Mizuno H. 2003. Crystal structure of Mg²⁺- and Ca²⁺-bound Gla domain of factor IX complexed with binding protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 24090–24094. doi 10.1074/jbc.M300650200
62. Vadivel K., Agah S., Messer A.S., Cascio D., Bajaj M.S., Krishnaswamy S., Esmen C.T., Padmanabhan K., Bajaj S.P. 2013. Structural and functional studies of gamma-carboxyglutamic acid domains of factor VIIa and activated protein C: Role of magnesium at physiological calcium. *J. Mol. Biol.* **425**, 1961–1981. doi 10.1016/j.jmb.2013.02.017
63. Ohkubo Y.Z., Tajkhorshid E. 2008. Distinct structural and adhesive roles of Ca²⁺ in membrane binding of blood coagulation factors. *Structure*. **16**, 72–81. doi 10.1016/j.str.2007.10.021
64. Muller M.P., Wang Y., Morrissey J.H., Tajkhorshid E. 2017. Lipid specificity of the membrane binding domain of coagulation factor X. *J. Thromb. Haemost.* **15**, 2005–2016. doi 10.1111/jth.13788
65. Mohammed B.M., Pelc L.A., Rau M.J., Di Cera E. 2023. Cryo-EM structure of coagulation factor V short. *Blood*. **141**, 3215–3225. doi 10.1182/blood.2022019486
66. Lenting P.J., van Mourik J.A., Mertens K. 1998. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*. **92**, 3983–3996. doi 10.1182/blood.V92.11.3983
67. Childers K.C., Peters S.C., Spiegel Jr. P.C. 2022. Structural insights into blood coagulation factor VIII: Procoagulant complexes, membrane binding, and antibody inhibition. *J. Thromb. Haemost.* **20**, 1957–1970. doi 10.1111/jth.15793
68. Ngo J.C.K., Huang M., Roth D.A., Furie B.C., Furie B. 2008. Crystal structure of human factor VIII: Implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. *Structure*. **16**, 597–606. doi 10.1016/j.str.2008.03.001
69. Fuller J.R., Knockenhauer K.E., Leksa N.C., Peters R.T., Batchelor J.D. 2021. Molecular determinants of the factor VIII/von Willebrand factor complex revealed by BIVV001 cryo-electron microscopy. *Blood*. **137**, 2970–2980. doi https://doi.org/10.1182/blood.2020009197
70. Wakabayashi H., Monaghan M., Fay P.J. 2014. Co-factor activity in factor VIIIa of the blood clotting pathway is stabilized by an interdomain bond between His281 and Ser524 formed in factor VIII. *J. Biol. Chem.* **289**, 14020–14029. doi 10.1074/jbc.M114.550566
71. Madsen J.J., Ohkubo Y.Z., Peters G.H., Faber J.H., Tajkhorshid E., Olsen O.H. 2015. Membrane interaction of the factor VIIIa discoidin domains in atomistic detail. *Biochemistry*. **54**, 6123–6131. doi 10.1021/acs.biochem.5b00417
72. Lü J., Pipe S.W., Miao H., Jacquemin M., Gilbert G.E. 2011. A membrane-interactive surface on the factor VIII C1 domain cooperates with the C2 domain for cofactor function. *Blood*. **117**, 3181–3189. doi 10.1182/blood-2010-08-301663
73. Smith I.W., d'Aquino A.E., Coyle C.W., Fedanov A., Parker E.T., Denning G., Spencer H.T., Lollar P., Doering C.B., Spiegel P.C. 2020. The 3.2 Å structure of a bioengineered variant of blood coagulation factor VIII indicates two conformations of the C2 domain. *J. Thromb. Haemost.* **18**, 57–69. https://doi.org/10.1111/jth.14621
74. Bardelle C., Furie B., Furie B.C., Gilbert G.E. 1993. Membrane binding kinetics of factor VIII indicate a complex binding process. *J. Biol. Chem.* **268**, 8815–8824.
75. Mann K.G., Kalafatis M. 2003. Factor V: A combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood*. **101**, 20–30. doi 10.1182/blood-2002-01-0290
76. Hayward C.P.M., Fuller N., Zheng S., Adam F., Jeimy S.B., Horsewood I., Quinn-Allen M.A., Kane W.H. 2004. Human platelets contain forms of factor V in disulfide-linkage with multimerin. *Thromb. Haemost.* **92**, 1349–1357. doi 10.1160/TH03-02-0123
77. Stoilova-McPhie S., Parmenter C.D.J., Segers K., Villoutreix B.O., Nicolaes G.A.F. 2008. Defining the structure of membrane-bound human blood coagulation factor Va. *J. Thromb. Haemost.* **6**, 76–82. doi 10.1111/j.1538-7836.2007.02810.x
78. Ohkubo Y.Z., Madsen J.J. 2021. Uncovering membrane-bound models of coagulation factors by combined experimental and computational approaches. *Thromb. Haemost.* **121**, 1122–1137. doi 10.1055/s-0040-1722187
79. Wu S., Lee C.J., Pedersen L.G. 2009. Conformational change path between closed and open forms of C2 domain of coagulation factor V on a two-dimensional free-energy surface. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **79**, 41909. doi 10.1103/PhysRevE.79.041909
80. Kovalenko T., Panteleev M., Sveshnikova A. 2019. The role of tissue factor in metastasising, neoangiogenesis and hemostasis in cancer. *Oncohematology*. **14**, 70–85. doi 10.17650/1818-8346-2019-14-2-70-85
81. Drake T.A., Morrissey J.H., Edgington T.S. 1989. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am. J. Pathol.* **134**, 1087–1097.
82. Bogdanov V.Y., Balasubramanian V., Hathcock J., Vele O., Lieb M., Nemerson Y. 2003. Alternatively spliced human tissue factor: A circulating, soluble,

- thrombogenic protein. *Nat. Med.* **9**, 458–462. doi 10.1038/nm841
83. Bogdanov V.Y., Kirk R.I., Miller C., Hathcock J.J., Vele S., Gazdoui M., Nemerson Y., Taubman M.B. 2006. Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 158–167. doi 10.1111/j.1538-7836.2005.01680.x
 84. Sluka S.H.M., Akhmedov A., Vogel J., Unruh D., Bogdanov V.Y., Camici G.G., Lüscher T.F., Ruf W., Tanner F.C. 2014. Alternatively spliced tissue factor is not sufficient for embryonic development. *PLoS One*. **9**, e97793. doi 10.1371/journal.pone.0097793
 85. Matiash K., Lewis C.S., Bogdanov V.Y. 2021. Functional characteristics and regulated expression of alternatively spliced tissue factor: An update. *Cancers (Basel)*. **13**. doi 10.3390/cancers13184652
 86. Maugeri N., Manfredi A.A. 2015. Tissue factor expressed by neutrophils: Another piece in the vascular inflammation puzzle. *Semin. Thromb. Hemost.* **41**, 728–736. doi 10.1055/s-0035-1564043
 87. Maugeri N., Brambilla M., Camera M., Carbone A., Tremoli E., Donati M.B., de Gaetano G., Cerletti C. 2006. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 1323–1330. doi 10.1111/j.1538-7836.2006.01968.x
 88. Rafail S., Ritis K., Schaefer K., Kourtzelis I., Speletas M., Doumas M., Giaglis S., Kambas K., Konstantinides S., Kartalis G. 2008. Leptin induces the expression of functional tissue factor in human neutrophils and peripheral blood mononuclear cells through JAK2-dependent mechanisms and TNF α involvement. *Thromb. Res.* **122**, 366–375. doi 10.1016/j.thromres.2007.12.018
 89. Peshkova A.D., Le Minh G., Tutwiler V., Andrianova I.A., Weisel J.W., Litvinov R.I. 2017. Activated monocytes enhance platelet-driven contraction of blood clots via tissue factor expression. *Sci. Rep.* **7**, 5149. doi 10.1038/s41598-017-05601-9
 90. Brambilla M., Becchetti A., Rovati G.E., Cosentino N., Conti M., Canzano P., Giesen P.L.A., Loffreda A., Bonomi A., Cattaneo M., De Candia E., Podda G.M., Trabattoni D., Werba P.J., Campodonico J., Pinna C., Marenzi G., Tremoli E., Camera M. 2023. Cell surface platelet tissue factor expression: Regulation by P2Y(12) and link to residual platelet reactivity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **43**, 2042–2057. doi 10.1161/ATVBAHA.123.319099
 91. Camera M., Frigerio M., Toschi V., Brambilla M., Rossi F., Cottell D.C., Maderna P., Parolari A., Bonzi R., De Vincenti O., Tremoli E. 2003. Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1690–1696. doi 10.1161/01.ATV.0000085629.23209.AA
 92. Müller I., Klocke A., Alex M., Kotzsch M., Luther T., Morgenstern E., Zieseniss S., Zahler S., Preissner K., Engelmann B. 2003. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J.* **17**, 476–478. doi 10.1096/fj.02-0574fje
 93. Lechner D., Weltermann A. 2008. Circulating tissue factor-exposing microparticles. *Thromb. Res.* **122** Suppl, S47–54. doi 10.1016/S0049-3848(08)70019-7
 94. Wang J., Pendurthi U.R., Rao L.V.M. 2017. Sphingomyelin encrypts tissue factor: ATP-induced activation of A-SMase leads to tissue factor decryption and microvesicle shedding. *Blood Adv.* **1**, 849–862. doi 10.1182/bloodadvances.2016003947
 95. Chen V.M., Hogg P.J. 2013. Encryption and decryption of tissue factor. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 277–284. <https://doi.org/10.1111/jth.12228>
 96. van Dieijen G., Tans G., van Rijn J., Zwaal R.F., Rosling J. 1981. Simple and rapid method to determine the binding of blood clotting factor X to phospholipid vesicles. *Biochemistry*. **20**, 7096–7101.
 97. Harvey S.B., Stone M.D., Martinez M.B., Nelsestuen G.L. 2003. Mutagenesis of the gamma-carboxyglutamic acid domain of human factor VII to generate maximum enhancement of the membrane contact site. *J. Biol. Chem.* **278**, 8363–8369. doi 10.1074/jbc.M211629200
 98. Cutsforth G.A., Whitaker R.N., Hermans J., Lentz B.R. 1989. A new model to describe extrinsic protein binding to phospholipid membranes of varying composition: Application to human coagulation proteins. *Biochemistry*. **28**, 7453–7461.
 99. Soloveva P.A., Podoplelova N.A., Pantelev M.A. 2024. Binding of coagulation factor IXa to procoagulant platelets revisited: Low affinity and interactions with other factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **720**, 150099. doi 10.1016/j.bbrc.2024.150099
 100. Medfisch S.M., Muehl E.M., Morrissey J.H., Bailey R.C. 2020. Phosphatidylethanolamine-phosphatidylserine binding synergy of seven coagulation factors revealed using nanodisc arrays on silicon photonic sensors. *Sci. Rep.* **10**, 17407. doi 10.1038/s41598-020-73647-3
 101. Shaw A.W., Pureza V.S., Sligar S.G., Morrissey J.H. 2007. The local phospholipid environment modulates the activation of blood clotting. *J. Biol. Chem.* **282**, 6556–6563.
 102. Wang B., Tieleman D.P. 2024. The structure, self-assembly and dynamics of lipid nanodiscs revealed by computational approaches. *Biophys. Chem.* **309**, 107231. doi 10.1016/j.bpc.2024.107231
 103. Tavoosi N., Davis-Harrison R.L., Pogorelov T.V., Ohkubo Y.Z., Arcario M.J., Clay M.C., Rienstra C.M., Tajkhorshid E., Morrissey J.H. 2011. Molecular determinants of phospholipid synergy in blood clotting. *J. Biol. Chem.* **286**, 23247–23253. doi 10.1074/jbc.M111.251769
 104. Gilbert G.E., Arena A.A. 1995. Phosphatidylethanolamine induces high affinity binding sites for factor VIII

- on membranes containing phosphatidyl-L-serine. *J. Biol. Chem.* **270**, 18500–18505.
https://doi.org/10.1074/jbc.270.31.18500
105. Tavoosi N., Smith S.A., Davis-Harrison R.L., Morrissey J.H. 2013. Factor VII and protein C are phosphatidic acid-binding proteins. *Biochemistry*. **52**, 5545–5552. doi 10.1021/bi4006368
 106. Abbott A.J., Nelsestuen G.L. 1987. Association of a protein with membrane vesicles at the collisional limit: studies with blood coagulation factor Va light chain also suggest major differences between small and large unilamellar vesicles. *Biochemistry*. **26**, 7994–8003.
 107. Abbott A.J., Nelsestuen G.L. 1988. The collisional limit: An important consideration for membrane-associated enzymes and receptors. *FASEB J.* **2**, 2858–2866.
 108. Lu Y., Nelsestuen G.L. 1996. Dynamic features of prothrombin interaction with phospholipid vesicles of different size and composition: Implications for protein--membrane contact. *Biochemistry*. **35**, 8193–8200. doi 10.1021/bi960280o
 109. Kovalenko T.A., Pantelev M.A., Sveshnikova A.N. 2017. Substrate delivery mechanism and the role of membrane curvature in factor X activation by extrinsic tenase. *J. Theor. Biol.* **435**, 125–133. doi 10.1016/j.jtbi.2017.09.015
 110. Carman C.V., Nikova D.N., Sakurai Y., Shi J., Novakovic V.A., Rasmussen J.T., Lam W.A., Gilbert G.E. 2023. Membrane curvature and PS localize coagulation proteins to filopodia and retraction fibers of endothelial cells. *Blood Adv.* **7**, 60–72. doi 10.1182/bloodadvances.2021006870
 111. Обыденный С.И. 2023. Преимущество применения лактадгерина для оценки экспонирования фосфатидилсерина в тромбоцитах. *Системная биология и физиология*. **2**, 11–13. edn: MICQKA
 112. Shi J., Heegaard C.W., Rasmussen J.T., Gilbert G.E. 2004. Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochim. Biophys. Acta*. **1667**, 82–90. doi 10.1016/j.bbamem.2004.09.006
 113. Коваленко Т.А. 2022. Аннексин V: связывающийся с мембраной белок с широчайшим набором функций. *Системная биология и физиология*. **1**, 21–33. edn: KBSOPU
 114. Silversmith R.E., Nelsestuen G.L. 1986. Interaction of complement proteins C5b-6 and C5b-7 with phospholipid vesicles: Effects of phospholipid structural features. *Biochemistry*. **25**, 7717–7725. doi 10.1021/bi00371a065
 115. Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kotova Y.N., Eckly A., Receveur N., Nechipurenko D.Y., Obyden-nyi S.I., Kireev I.I., Gachet C., Ataulakhanov F.I., Mangin P.H., Pantelev M.A. 2016. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood*. **128**, 1745–1755. doi 10.1182/blood-2016-02-696898
 116. Mitchell J.L., Lionikiene A.S., Fraser S.R., Whyte C.S., Booth N.A., Mutch N.J. 2014. Functional factor XIII-A is exposed on the stimulated platelet surface. *Blood*. **124**, 3982–3990. doi 10.1182/blood-2014-06-583070
 117. Whyte C.S., Swieringa F., Mastenbroek T.G., Lionikiene A.S., Lancé M.D., van der Meijden P.E.J., Heemskerk J.W.M., Mutch N.J. 2015. Plasminogen associates with phosphatidylserine-exposing platelets and contributes to thrombus lysis under flow. *Blood*. **125**, 2568–2578. doi 10.1182/blood-2014-09-599480
 118. Abaeva A.A., Canault M., Kotova Y.N., Obyden-nyi S.I., Yakimenko A.O., Podoplelova N.A., Kolyadko V.N., Chambost H., Mazurov A. V, Ataulakhanov F.I., Nurden A.T., Alessi M.-C., Pantelev M.A. 2013. Procoagulant platelets form an α -granule protein-covered 'cap' on their surface that promotes their attachment to aggregates. *J. Biol. Chem.* **288**, 29621–29632. doi 10.1074/jbc.M113.474163
 119. Dalm D., Galaz-Montoya J.G., Miller J.L., Grushin K., Villalobos A., Koyfman A.Y., Schmid M.F., Stoilova-McPhie S. 2015. Dimeric organization of blood coagulation factor VIII bound to lipid nanotubes. *Sci. Rep.* **5**, 11212. doi 10.1038/srep11212
 120. Majumder R., Wang J., Lentz B.R. 2003. Effects of water soluble phosphatidylserine on bovine factor Xa: Functional and structural changes plus dimerization. *Biophys. J.* **84**, 1238–1251. doi 10.1016/S0006-3495(03)74939-X
 121. Koklic T., Majumder R., Weinreb G.E., Lentz B.R. 2009. Factor Xa binding to phosphatidylserine-containing membranes produces an inactive membrane-bound dimer. *Biophys. J.* **97**, 2232–2241. doi 10.1016/j.bpj.2009.07.043
 122. Koklic T., Chattopadhyay R., Majumder R., Lentz B.R. 2015. Factor Xa dimerization competes with prothrombinase complex formation on platelet-like membrane surfaces. *Biochem. J.* **467**, 37–46. doi 10.1042/BJ20141177
 123. Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kurasawa J.H., Sarafanov A.G., Chambost H., Vasil'ev S.A., Demina I.A., Ataulakhanov F.I., Alessi M.-C., Pantelev M.A. 2016. Hysteresis-like binding of coagulation factors X/Xa to procoagulant activated platelets and phospholipids results from multistep association and membrane-dependent multimerization. *Biochim. Biophys. Acta*. **1858**, 1216–1227. doi 10.1016/j.bbamem.2016.02.008
 124. Mann K.G., Nesheim M.E., Church W.R., Haley P., Krishnaswamy S. 1990. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood*. **76**, 1–16.
 125. Bom V.J., Bertina R.M. 1990. The contributions of Ca^{2+} , phospholipids and tissue-factor apoprotein to the activation of human blood-coagulation factor X by activated factor VII. *Biochem. J.* **265**, 327–336.

126. Norledge B.V., Petrovan R.J., Ruf W., Olson A.J. 2003. The tissue factor/factor VIIa/factor Xa complex: A model built by docking and site-directed mutagenesis. *Proteins*. **53**, 640–648. doi 10.1002/prot.10445
127. Sen P., Neuenschwander P.F., Pendurthi U.R., Rao L.V.M. 2010. Analysis of factor VIIa binding to relipidated tissue factor by surface plasmon resonance. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. **21**, 376–379.
128. Waters E.K., Morrissey J.H. 2006. Restoring full biological activity to the isolated ectodomain of an integral membrane protein. *Biochemistry*. **45**, 3769–3774. doi 10.1021/bi052600m
129. Waxman E., Ross J.B., Laue T.M., Guha A., Thiruvikraman S.V., Lin T.C., Konigsberg W.H., Nemerson Y. 1992. Tissue factor and its extracellular soluble domain: The relationship between intermolecular association with factor VIIa and enzymatic activity of the complex. *Biochemistry*. **31**, 3998–4003.
130. Ke K., Yuan J., Morrissey J.H. 2014. Tissue factor residues that putatively interact with membrane phospholipids. *PLoS One*. **9**, e88675. doi 10.1371/journal.pone.0088675
131. Stone M.D., Harvey S.B., Martinez M.B., Bach R.R., Nelsestuen G.L. 2005. Large enhancement of functional activity of active site-inhibited factor VIIa due to protein dimerization: Insights into mechanism of assembly/disassembly from tissue factor. *Biochemistry*. **44**, 6321–6330. doi 10.1021/bi050007z
132. Neuenschwander P.F., Bianco-Fisher E., Rezaie A.R., Morrissey J.H. 1995. Phosphatidylethanolamine augments factor VIIa-tissue factor activity: Enhancement of sensitivity to phosphatidylserine. *Biochemistry*. **34**, 13988–13993. doi 10.1021/bi00043a004
133. Mallik S., Prasad R., Das K., Sen P. 2021. Alcohol functionality in the fatty acid backbone of sphingomyelin guides the inhibition of blood coagulation. *RSC Adv*. **11**, 3390–3398. doi 10.1039/d0ra09218e
134. Hathcock J.J., Rusinova E., Andree H., Nemerson Y. 2006. Phospholipid surfaces regulate the delivery of substrate to tissue factor: VIIa and the removal of product. *Blood Cells. Mol. Dis*. **36**, 194–198.
135. Hathcock J.J., Rusinova E., Gentry R.D., Andree H., Nemerson Y. 2005. Phospholipid regulates the activation of factor X by tissue factor/factor VIIa (TF/VIIa) via substrate and product interactions. *Biochemistry*. **44**, 8187–8197.
136. Krishnaswamy S., Field K.A., Edgington T.S., Morrissey J.H., Mann K.G. 1992. Role of the membrane surface in the activation of human coagulation factor X. *J. Biol. Chem*. **267**, 26110–26120.
137. Forman S.D., Nemerson Y. 1986. Membrane-dependent coagulation reaction is independent of the concentration of phospholipid-bound substrate: Fluid phase factor X regulates the extrinsic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**, 4675–4679.
138. Kovalenko T.A., Pantelev M.A., Sveshnikova A.N. 2023. Different modeling approaches in the simulation of extrinsic coagulation factor X activation: Limitations and areas of applicability. *Int. J. Numer. Method. Biomed. Eng.* **39**, e3689. doi 10.1002/cnm.3689
139. Hopfner K.P., Lang A., Karcher A., Sichler K., Kopetzki E., Brandstetter H., Huber R., Bode W., Engh R.A. 1999. Coagulation factor IXa: The relaxed conformation of Tyr99 blocks substrate binding. *Structure*. **7**, 989–996. doi 10.1016/s0969-2126(99)80125-7
140. Kolkman J.A., Mertens K. 2000. Insertion loop 256–268 in coagulation factor IX restricts enzymatic activity in the absence but not in the presence of factor VIII. *Biochemistry*. **39**, 7398–7405. doi 10.1021/bi992735q
141. Zögg T., Brandstetter H. 2009. Structural basis of the cofactor- and substrate-assisted activation of human coagulation factor IXa. *Structure*. **17**, 1669–1678. doi 10.1016/j.str.2009.10.011
142. Venkateswarlu D. 2014. Structural insights into the interaction of blood coagulation co-factor VIIIa with factor IXa: A computational protein-protein docking and molecular dynamics refinement study. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **452**, 408–414. doi 10.1016/j.bbrc.2014.08.078
143. Sveshnikova A.N., Shibeko A.M., Kovalenko T.A., Pantelev M.A. 2024. Kinetics and regulation of coagulation factor X activation by intrinsic tenase on phospholipid membranes. *J. Theor. Biol.* **582**, 111757. doi 10.1016/j.jtbi.2024.111757
144. Pomowski A., Ustok F.I., Huntington J.A. 2014. Homology model of human prothrombinase based on the crystal structure of Pseutarin C. *Biol. Chem.* **395**, 1233–1241. doi 10.1515/hsz-2014-0165
145. Krishnaswamy S. 2013. The transition of prothrombin to thrombin. *J. Thromb. Haemost.* **11** Suppl 1, 265–276. doi 10.1111/jth.12217
146. Chinnaraj M., Chen Z., Pelc L.A., Grese Z., Bystranowska D., Di Cera E., Pozzi N. 2018. Structure of prothrombin in the closed form reveals new details on the mechanism of activation. *Sci. Rep.* **8**, 2945. doi 10.1038/s41598-018-21304-1
147. Haynes L.M., Bouchard B.A., Tracy P.B., Mann K.G. 2012. Prothrombin activation by platelet-associated prothrombinase proceeds through the prethrombin-2 pathway via a concerted mechanism. *J. Biol. Chem.* **287**, 38647–38655. doi 10.1074/jbc.M112.407791
148. Whelihan M.F., Zachary V., Orfeo T., Mann K.G. 2012. Prothrombin activation in blood coagulation: The erythrocyte contribution to thrombin generation. *Blood*. **120**, 3837–3845. doi 10.1182/blood-2012-05-427856
149. Nesheim M.E., Tracy R.P., Mann K.G. 1984. “Clotspeed”, a mathematical simulation of the functional properties of prothrombinase. *J. Biol. Chem.* **259**, 1447–1453.

150. Stone M.D., Nelsestuen G.L. 2005. Efficacy of soluble phospholipids in the prothrombinase reaction. *Biochemistry*. **44**, 4037–4041. doi 10.1021/bi047655n
151. Smirnov M.D., Ford D.A., Esmon C.T., Esmon N.L. 1999. The effect of membrane composition on the hemostatic balance. *Biochemistry*. **38**, 3591–3598. doi 10.1021/bi982538b
152. Krishnaswamy S., Jones K.C., Mann K.G. 1988. Prothrombinase complex assembly. Kinetic mechanism of enzyme assembly on phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* **263**, 3823–3834.
153. Giesen P.L., Willems G.M., Hermens W.T. 1991. Production of thrombin by the prothrombinase complex is regulated by membrane-mediated transport of prothrombin. *J. Biol. Chem.* **266**, 1379–1382.
154. Smeets E.F., Comfurius P., Bevers E.M., Zwaal R.F.A. 1996. Contribution of different phospholipid classes to the prothrombin converting capacity of sonicated lipid vesicles. *Thromb. Res.* **81**, 419–426. doi [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(96\)00014-X](https://doi.org/10.1016/0049-3848(96)00014-X)
155. Majumder R., Liang X., Quinn-Allen M.A., Kane W.H., Lentz B.R. 2011. Modulation of prothrombinase assembly and activity by phosphatidylethanolamine. *J. Biol. Chem.* **286**, 35535–35542. doi 10.1074/jbc.M111.260141
156. Deguchi H., Yegneswaran S., Griffin J.H. 2004. Sphingolipids as bioactive regulators of thrombin generation. *J. Biol. Chem.* **279**, 12036–12042. doi 10.1074/jbc.M302531200
157. Shi J., Gilbert G.E. 2003. Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites. *Blood*. **101**, 2628–2636. doi 10.1182/blood-2002-07-1951
158. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y., Pichugin A.V., Pantelev M.A., Krymskaya O.V., Ataulakhov F.I. 2007. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb. Haemost.* **97**, 425–434.
159. Haynes L.M., Dubief Y.C., Mann K.G. 2012. Membrane binding events in the initiation and propagation phases of tissue factor-initiated zymogen activation under flow. *J. Biol. Chem.* **287**, 5225–5234. doi 10.1074/jbc.M111.302075
160. Gemmell C.H., Turitto V.T., Nemerson Y. 1988. Flow as a regulator of the activation of factor X by tissue factor. *Blood*. **72**, 1404–1406.
161. Agbani E.O., Poole A.W. 2017. Procoagulant platelets: Generation, function, and therapeutic targeting in thrombosis. *Blood*. **130**, 2171–2179. doi 10.1182/blood-2017-05-787259
162. Heemskerk J.W.M., Mattheij N.J.A., Cosemans J.M.E.M. 2013. Platelet-based coagulation: Different populations, different functions. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 2–16. doi 10.1111/jth.12045
163. Pantelev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J., Ataulakhov F.I., Saenko E.L. 2005. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. *J. Thromb. Haemost.* **3**, 2545–2553. doi 10.1111/j.1538-7836.2005.01616.x
164. Yakimenko A.O., Verholomova F.Y., Kotova Y.N., Ataulakhov F.I., Pantelev M.A. 2012. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. *Biophys. J.* **102**, 2261–2269. doi 10.1016/j.bpj.2012.04.004
165. Nechipurenko D.Y., Receveur N., Yakimenko A.O., Shepelyuk T.O., Yakusheva A.A., Kerimov R.R., Obydennyi S.I., Eckly A., Léon C., Gachet C., Grishchuk E.L., Ataulakhov F.I., Mangin P.H., Pantelev M.A. 2019. Clot contraction drives the translocation of procoagulant platelets to thrombus surface. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 37–47. doi 10.1161/ATVBAHA.118.311390
166. Berckmans R.J., Nieuwland R., Böing A.N., Romijn F.P., Hack C.E., Sturk A. 2001. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb. Haemost.* **85**, 639–646.
167. Artemenko E.O., Obydennyi S.I., Troyanova K.S., Novichkova G.A., Nechipurenko D.Y., Pantelev M.A. 2024. Adhesive properties of plasma-circulating and platelet-derived microvesicles from healthy individuals. *Thromb. Res.* **233**, 119–126. doi 10.1016/j.thromres.2023.11.018
168. Chabin I.A., Podoplelova N.A., Pantelev M.A. 2022. Red blood cells contribution in blood coagulation. *Pediatr. Hematol. Immunopathol.* **21**, 136–141. doi 10.24287/1726-1708-2022-21-3-136-141
169. Tutwiler V., Mukhitov A.R., Peshkova A.D., Le Minh G., Khismatullin R.R., Vicksman J., Nagaswami C., Litvinov R.I., Weisel J.W. 2018. Shape changes of erythrocytes during blood clot contraction and the structure of polyhedrocytes. *Sci. Rep.* **8**, 17907. doi 10.1038/s41598-018-35849-8
170. Zhao L., Bi Y., Kou J., Shi J., Piao D. 2016. Phosphatidylserine exposing-platelets and microparticles promote procoagulant activity in colon cancer patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **35**, 54. doi 10.1186/s13046-016-0328-9
171. Yang C., Ma R., Jiang T., Cao M., Zhao L., Bi Y., Kou J., Shi J., Zou X. 2016. Contributions of phosphatidylserine-positive platelets and leukocytes and microparticles to hypercoagulable state in gastric cancer patients. *Tumour Biol.* **37**, 7881–7891. doi 10.1007/s13277-015-4667-5
172. Bekendam R.H., Ravid K. 2023. Mechanisms of platelet activation in cancer-associated thrombosis: A focus on myeloproliferative neoplasms. *Front. Cell Dev. Biol.* **11**, 1207395. doi 10.3389/fcell.2023.1207395
173. Zhang Y., Meng H., Ma R., He Z., Wu X., Cao M., Yao Z., Zhao L., Li T., Deng R., Dong Z., Tian Y., Bi Y., Kou J., Thatté H.S., Zhou J., Shi J. 2016. Circulating microparticles, blood cells, and endothelium induce procoagulant activity in sepsis through

- phosphatidylserine exposure. *Shock*. **45**, 299–307. doi 10.1097/SHK.0000000000000509
174. Nieuwland R., Berckmans R.J., McGregor S., Böing A.N., Romijn F.P., Westendorp R.G., Hack C.E., Sturk A. 2000. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*. **95**, 930–935.
175. Nomura S., Shimizu M. 2015. Clinical significance of procoagulant microparticles. *J. Intensive Care*. **3**, 2. doi 10.1186/s40560-014-0066-z
176. Ettelaie C., Collier M.E., Featherby S., Benelhaj N.E., Greenman J., Maraveyas A. 2016. Analysis of the potential of cancer cell lines to release tissue factor-containing microvesicles: Correlation with tissue factor and PAR2 expression. *Thromb. J.* **14**, 2. doi 10.1186/s12959-016-0075-3
177. Berny-Lang M.A., Aslan J.E., Tormoen G.W., Patel I.A., Bock P.E., Gruber A., McCarty O.J.T. 2011. Promotion of experimental thrombus formation by the procoagulant activity of breast cancer cells. *Phys. Biol.* **8**, 15014. doi 10.1088/1478-3975/8/1/015014
178. Lin L., Huai Q., Huang M., Furie B., Furie B.C. 2007. Crystal structure of the bovine lactadherin C2 domain, a membrane binding motif, shows similarity to the C2 domains of factor V and factor VIII. *J. Mol. Biol.* **371**, 717–724. doi 10.1016/j.jmb.2007.05.054
179. Sveshnikova A.N., Balatskiy A.V., Demianova A.S., Shepelyuk T.O., Shakhidzhanov S.S., Balatskaya M.N., Pichugin A. V., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A. 2016. Systems biology insights into the meaning of the platelet's dual-receptor thrombin signaling. *J. Thromb. Haemost.* **14**, 2045–2057. doi 10.1111/jth.13442
180. Avdonin P.P., Blinova M.S., Generalova G.A., Emirova K.M., Avdonin P.V. 2024. The role of the complement system in the pathogenesis of infectious forms of hemolytic uremic syndrome. *Biomolecules*. **14**. doi 10.3390/biom14010039
181. Jiang Y., Doolittle R.F. 2003. The evolution of vertebrate blood coagulation as viewed from a comparison of puffer fish and sea squirt genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 7527–7532. doi 10.1073/pnas.0932632100
182. Doolittle R.F. 2009. Step-by-step evolution of vertebrate blood coagulation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **74**, 35–40. doi 10.1101/sqb.2009.74.001
183. Hirsh J., Fuster V., Ansell J., Halperin J.L. 2003. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 1633–1652. doi 10.1016/s0735-1097(03)00416-9
184. Mann K.G., Whelihan M.F., Butenas S., Orfeo T. 2007. Citrate anticoagulation and the dynamics of thrombin generation. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 2055–2061. doi 10.1111/j.1538-7836.2007.02710.

Membrane-Dependent Reactions of Blood Coagulation: Classical View and State-of-the-Art Concepts

© 2024 г. Т. А. Kovalenko^{1, 2, *}, М. А. Panteleev^{1, 2, 3}

¹Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 109029 Russia

²Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, 119991, Russia

³Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: after-ten@yandex.ru

The complex mechanism called hemostasis evolved in living organisms to prevent blood loss when a blood vessel is damaged. In this process, two closely interconnected systems are distinguished: platelet-vascular and plasmatic hemostasis. Plasmatic hemostasis is a system of proteolytic reactions, in which blood plasma proteins called coagulation factors are involved. A key feature of this system is the localization of enzymatic reactions on the surface of phospholipid membranes, which increases their rate by up to 5 orders of magnitude. This review describes the basic mechanisms of coagulation factors binding to phospholipid membranes, pathways for complex assembly and activation reactions, and discusses the role of membranes in this process, their composition and sources. The binding of coagulation factors to procoagulant membranes leads not only to the acceleration of coagulation reactions, but also to their selective localization in restricted areas and protection from being washed away by the flow. The efficiency of coagulation reactions is regulated by the composition of the outer layer of the membrane, primarily through a special mechanism of mitochondria-dependent necrotic platelet death.

Keywords: coagulation factors, lipids, tenase, prothrombinase

УДК 577.352

ЭВОЛЮЦИОННЫЙ ВЫБОР МЕЖДУ ХОЛЕСТЕРИНОМ И ЭРГОСТЕРИНОМ

© 2024 г. С. С. Соколов^а, С. А. Акимов^б, Ф. Ф. Северин^{а, *}

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия

^бИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: severin@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 27.04.2024

После доработки 08.05.2024

Принята к печати 14.05.2024

Биосинтез стерина появился на ранних этапах эволюции эукариот. У большинства животных, а также у примитивных грибов, основным стеринном является холестерин. В процессе эволюции грибы приобрели способность синтезировать эргостерин. Путь его биосинтеза более сложен, чем путь биосинтеза холестерина. Тем не менее эволюционный выбор большинства грибов остался именно за эргостерином, и причина этого выбора до сих пор обсуждается. В большинстве работ на эту тему выбор большинства грибов связывают с переходом к жизни на суше и, следовательно, с опасностью обезвоживания клеток. В нашем обзоре мы не соглашаемся с этой точкой зрения. Вероятно, по сравнению с холестерином, эргостерин обладает более выраженными антиоксидантными свойствами. Действительно, наличие трех, а не одной, как у холестерина, двойных связей в структуре молекулы увеличивает вероятность взаимодействия с активными формами кислорода. Возможно, переход к жизни на суше потребовал дополнительной антиоксидантной защиты. Вследствие вышеупомянутых структурных различий молекула холестерина, очевидно, является более гибкой, чем молекула эргостерина. Экспериментальные данные указывают, что это качество обеспечивает более высокую, чем у грибов, гибкость мембран, а также более высокую способность компенсировать нарушения упаковки фосфолипидов мембраны. Возможно, эти качества холестерина для клеток животных оказались важнее, чем антиоксидантные, что и предопределило их эволюционный выбор стерина.

Ключевые слова: холестерин, эргостерин, 7-дегидрохолестерин, эволюция, грибы, животные, трипаносома

DOI: 10.31857/S0233475524050071, **EDN:** cbizib

ВВЕДЕНИЕ

Основная функция стерина — поддержание барьерных свойств плазматической мембраны клетки в различных химических, механических и термических условиях. В то время как основным стеринном большинства животных является холестерин, эволюционным выбором большинства грибов является эргостерин. Причина разницы эволюционного выбора понятна неполностью. Большинство работ, посвященных этому вопросу, называют причиной тонкие физико-химические и биофизические особенности взаимодействия различных стерина с липидами плазматической мембраны, такие как формирование липидных рафтов и способность влиять на текучесть фосфолипидов

мембран [1–3]. Путь биосинтеза холестерина является эволюционно более ранним и менее сложным, чем путь биосинтеза эргостерина. Почему же грибы «выбрали» эргостерин? Считается, что выбор грибов произошел при переходе к жизни на суше и каким-то образом связан с устойчивостью к высушиванию и окислительному стрессу [4]. Мы предполагаем, что причину эволюционного выбора можно объяснить базовыми различиями в свойствах этих двух молекул. Молекула эргостерина содержит три двойных связи, молекула холестерина — всего одну (рис. 1). Следовательно, молекула эргостерина является более жесткой и более способной к взаимодействию с активными формами кислорода (АФК). Рассмотрим, к каким



Рис. 1. Химические структуры стерина: а – эргостерин; б – холестерин; в – 7-дегидрохолестерин.

физиологическим последствиям могут привести эти различия химической структуры стерина.

ЗАЩИТА ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Стерины являются самыми гидрофобными липидами биологических мембран. Из общих соображений понятно, что взаимодействие с АФК приводит к появлению гидрофильных групп в структурах молекул стерина. Это подтверждается экспериментальными данными. Так, например, при обработке клеток дрожжей синглетным кислородом в их плазматических мембранах накапливаются окисленные, полярные производные эргостерина [5]. Насколько такие модификации могут повлиять на барьерные свойства мембран? На языке теории упругости мембран увеличение гидрофильности мембранного компонента при сохранении или уменьшении объема его гидрофобной части эквивалентно увеличению его спонтанной кривизны [6, 7]. При прочих равных условиях мембраны, монослои которых имеют большую спонтанную кривизну (более положительную или менее отрицательную), менее стабильны по отношению к образованию в них сквозных пор [8–10]. Увеличение гидрофильности молекулы стерина, очевидно, также приведет к ее релокации из глубины фосфолипидного бислоя к поверхности. Такое перемещение может нарушить упаковку фосфолипидов и повысить вероятность образования в мембране проводящих дефектов. Тем не менее, в случае наличия достаточного количества неокисленных молекул стерина, такое нарушение будет скомпенсировано. Методами молекулярной динамики это было подтверждено для холестерин-содержащих мембран [11]. Подобная компенсация экспериментально наблюдалась для модельных мембран, сформированных из смеси диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ), холестерина и лизолипидов. В мембранах, сформированных из ДОФХ и лизолипидов, обычно интенсивно образуются сквозные поры при концентрации

лизолипидов 5 мол. %. Это связано с положительной спонтанной кривизной лизолипидов [6, 7], способствующей образованию пор [8–10]. Однако, если в мембране имеется холестерин с большой по абсолютной величине отрицательной спонтанной кривизной, то образование пор в присутствии лизолипидов существенно подавляется за счет компенсации положительной спонтанной кривизны лизолипидов отрицательной спонтанной кривизной холестерина. Так, относительно стабильные мембраны могут быть сформированы из смеси холестерин–лизолипид 1:1 [12]. Таким образом, вероятнее всего, окисление небольшой доли общего стерина мембраны не сильно отразится на ее проницаемости для гидрофильных молекул. В то же время взаимодействие стерина с АФК может приводить к нейтрализации АФК. Это указывает на то, что стерины плазматических мембран могут защищать мембраны от АФК, и у эргостерина это свойство, вероятно, более выражено, чем у холестерина.

Эти общие соображения подтверждаются экспериментальными наблюдениями. Было показано, что эргостерин исключительно эффективно защищает клетки дрожжей и искусственные липосомы от *трет*-бутилгидропероксида [13]. Авторы работы на основании данных молекулярного моделирования предполагают, что эта эффективность объясняется уникальной особенностью молекулы эргостерина осуществлять электронный и протонный транспорт. Это достаточно сложное объяснение не исключает и более простого: три двойные связи в молекуле эргостерина более эффективно реагируют с АФК, чем одна в молекуле холестерина. Косвенное подтверждение этому следует из недавней работы, где показано, что 7-дегидрохолестерин защищает клетки млекопитающих от ферроптоза [14]. Ферроптоз – форма запрограммированной клеточной смерти, причиной которой является окислительное повреждение липидов плазматической мембраны. 7-Дегидрохолестерин – промежуточное вещество в биосинтезе холестерина, в результате некоторых мутаций клетки млекопитающих накапливают его вместо холестерина

(синдром Смита—Лемли—Опитца [15]). Молекула 7-дегидрохолестерина содержит две двойных связи, а не одну, как молекула холестерина (рис. 1). Вероятно, эта разница и определяет его более сильные антиоксидантные свойства.

Еще один довод в пользу того, что эргостерин — более сильный антиоксидант, чем холестерин, представлен в работе [16], в которой авторы сконструировали штаммы дрожжей, производящих холестерин вместо эргостерина. Оказалось, что такие штаммы чувствительны к широкому спектру природных стрессов.

Наконец, на модельных мембранах, липосомах, был произведен сравнительный анализ антиоксидантных свойств трех стеринов, структуры которых представлены на рис. 1. Было показано, что эргостерин лучше защищает липиды от индуцированного железом и аскорбатом окисления, чем 7-дегидрохолестерин. Также было показано, что из трех стеринов холестерин является наименее эффективным антиоксидантом в этой экспериментальной системе [17]. Независимо было показано, что эргостерин лучше, чем холестерин, защищает фосфолипиды липосом от окислительного повреждения, индуцированного добавкой железа и аскорбата [18].

ГИБКОСТЬ МЕМБРАН

Простое сравнение структурных формул холестерина и эргостерина (рис. 1) указывает на то, что молекула эргостерина является более жесткой и эргостерин должен сильнее упорядочивать окружающие липиды, поскольку дополнительные двойные связи ограничивают его молекулярную подвижность, в то время как молекула является практически плоской. То, что молекула эргостерина является более жесткой, подтверждается методами молекулярной динамики [19, 20]. Можно предположить, что молекулярная жесткость не является эволюционным преимуществом эргостерина. Механическая устойчивость оболочки клетки, как правило, обеспечивается клеточной стенкой либо цитоскелетом, прилегающим к плазматической мембране. В то же время из общих соображений следует, что повышение жесткости и упорядоченности липидного бислоя может приводить к увеличению его хрупкости. Это подтверждено экспериментально: методом атомной силовой микроскопии было показано, что в некоторых условиях модельные холестерин-содержащие мембраны более устойчивы к механической нагрузке, чем эргостерин-содержащие [21]. Также было показано, что холестерин-содержащие

мембраны являются более гибкими, чем мембраны, содержащие эргостерин [22].

Можно предположить, что гибкость плазматической мембраны важна при фибробластоподобном движении клеток — в этой ситуации на переднем крае клетки образуются динамичные выросты (ruffles). Кроме того, гибкость мембраны, очевидно, важна при отпочковывании везикул. Косвенное подтверждение этому следует из анализа физиологии простейшего животного *Trypanosoma brucei*. Это одноклеточный организм, ведущий паразитический образ жизни. В отличие от большинства животных, его основным стеринном является эргостерин. Возможно, в процессе сложного жизненного цикла трипаносом — переходы из мухи це-це в млекопитающих и обратно — клетки испытывают окислительный стресс, защитой от которого является эргостерин плазматической мембраны. В то же время клетки этого животного очень жесткие, движение осуществляется за счет жгутика. Считается, что жесткость обеспечивается тубулиновым цитоскелетом, прилегающим к плазматической мембране [23]. Интересно, что основным путем эндоцитоза трипаносом является не классический, основанный на простой инвагинации мембраны, а клатрин-зависимый [24]. Палочкоподобные молекулы белка клатрина образуют конструкцию, способную деформировать жесткий участок плазматической мембраны и придать ему сферическую форму везикулы [25, 26]. Отметим, что для дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* клатрин-зависимый путь также является жизненно важным: дрожжи являются классическим экспериментальным организмом для изучения этого пути.

ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН ДЛЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Известно, что холестерин обладает уникальной способностью поддерживать порядок упаковки фосфолипидов мембраны, при этом лишь незначительно затрудняя их диффузию [1]. Это свойство, видимо, объясняет его более высокую, чем у эргостерина, способность препятствовать проникновению амфифильных органических веществ через мембрану [27]. Мы предполагаем, что эту разницу проницаемости холестерин- и эргостерин-содержащих мембран можно по крайней мере частично объяснить разницей в жесткости молекул стеринов, обусловленной различным количеством двойных связей в этих молекулах. В молекуле 7-дегидрохолестерина имеется две двойных связи, и в этом смысле 7-дегидрохолестерин занимает промежуточное положение между холестерином и эргостерином. Для 7-дегидрохолестерина было показано,

что двойная связь, дополнительная к единственной двойной связи холестерина, ограничивает относительную подвижность стериновых колец по сравнению с холестерином. В модельных мембранах, в которых образуются жидкоупорядоченные домены, замена холестерина на 7-дегидрохолестерин приводила к качественному изменению характера латерального взаимодействия доменов. В мембранах, содержащих холестерин, домены сливались практически при каждом столкновении, а в мембранах, содержащих 7-дегидрохолестерин, домены практически никогда не сливались, но слипались, образуя протяженные агрегаты сцепленных доменов круглой формы [3]. В работе [28] такое изменение динамики ансамбля доменов объяснялось различием спонтанной кривизны холестерина и 7-дегидрохолестерина. Предполагалось, что ограничение относительной подвижности стериновых колец в 7-дегидрохолестерине за счет дополнительной двойной связи приводит к уменьшению эффективного объема гидрофобной части молекулы 7-дегидрохолестерина по сравнению с холестерином, что эквивалентно большей спонтанной кривизне 7-дегидрохолестерина. В молекуле эргостерина наличие еще одной двойной связи в «хвосте», очевидно, должно приводить к дополнительному снижению молекулярной подвижности и эффективного объема гидрофобной части молекулы. Как следствие, спонтанная кривизна эргостерина должна быть еще выше, чем 7-дегидрохолестерина и, тем более, холестерина. В липидных мембранах с большей спонтанной кривизной липидных монослоев легче и чаще образуются сквозные поры и дефекты, что позволяет объяснить более высокую проницаемость мембран, содержащих эргостерин.

УСТОЙЧИВОСТЬ К ВЫСЫХАНИЮ

Известно, что эволюционный переход грибов от холестерина к эргостерину произошел при их переходе к жизни на суше [4]. На основании этого можно сделать предположение, что клетки с эргостерин-содержащими мембранами особо устойчивы к высыханию. Действительно, мутации в пути биосинтеза эргостерина вызывают чувствительность к высыханию у клеток дрожжей *S. cerevisiae* [4]. Такие мутанты вместо эргостерина накапливают различные интермедиаты его биосинтеза, ни один из которых не может сравниться с эргостерином в плане защиты от высыхания. В то же время показано, что снижение проницаемости фосфолипидного бислоя для воды снижается эргостерином и холестерином в одинаковой степени [27]. То, что эволюционный выбор не был

продиктован устойчивостью к высыханию, также подтверждается опытами по устойчивости дрожжей к гиперосмотическому стрессу. Этот вид стресса по своей природе близок к стрессу от высыхания: в обоих случаях происходит обезвоживание клеток. Показано, что при гиперосмотическом стрессе дрожжи снижают содержание стерина в плазматической мембране. Если же различные мутации не позволяют осуществить снижение, то клетки дрожжей становятся чувствительными к этому стрессу [29]. Наши данные указывают на то, что, в одинаковой степени для холестерина и эргостерина, увеличенная стеринном жесткость плазматической мембраны может привести к ее повреждению, если после гиперосмотической среды клетка окажется в среде с низким содержанием осмолита [30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно предположить, что эволюционный выбор наземных грибов в пользу эргостерина не продиктован устойчивостью к высыханию. Резюмируя, вышеприведенные соображения указывают на то, что отказ грибов от холестерина в пользу эргостерина основан на более выраженных антиоксидантных свойствах последнего. Действительно, переход к жизни на суше подразумевает увеличение контакта с АФК. Выбор же большинства животных в пользу холестерина, видимо, связан с тем, что, по сравнению с эргостерином, холестерин сильнее снижает проницаемость мембран для органических молекул, а также — в меньшей степени — увеличивает механическую жесткость мембран.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-14-00172).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mouritsen O.G., Zuckermann M.J. 2004. What's so special about cholesterol? *Lipids*. **39**, 1101–1113.
2. Miao L., Nielsen M., Thewalt J., Ipsen J.H., Bloom M., Zuckermann M.J., Mouritsen O.G. 2002. From lanosterol to cholesterol: Structural evolution and differential effects on lipid bilayers. *Biophys. J.* **82**, 1429–1444.

3. Staneva G., Chachaty C., Wolf C., Quinn P.J. 2010. Comparison of the liquid-ordered bilayer phases containing cholesterol or 7-dehydrocholesterol in modeling Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J. Lip. Res.* **51**, 1810–1822.
4. Dupont S., Lemetais G., Ferreira T., Cayot P., Gervais P., Beney L. 2012. Ergosterol biosynthesis: A fungal pathway for life on land? *Evolution*. **66**, 2961–2968.
5. Böcking T., Barrow K.D., Netting A.G., Chilcott T.C., Coster H.G., Höfer M. 2000. Effects of singlet oxygen on membrane sterols in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1607–1618.
6. Fuller N., Rand R.P. 2001. The influence of lysolipids on the spontaneous curvature and bending elasticity of phospholipid membranes. *Biophys. J.* **81**, 243–254.
7. Kollmitzer B., Heftberger P., Rappolt M., Pabst G. 2013. Monolayer spontaneous curvature of raft-forming membrane lipids. *Soft Matter*. **9**, 10877–10884.
8. Tazawa K., Yamazaki M. 2023. Effect of monolayer spontaneous curvature on constant tension-induced pore formation in lipid bilayers. *J. Chem. Phys.* **158**, 081101.
9. Chernomordik L.V., Melikyan G.B., Dubrovina N.I., Abidor I.G., Chizmadzhev Y.A. 1984. Solvent-free bilayers from squalene solutions of phospholipids. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **12**, 155–166.
10. Rice A., Zimmerberg J., Pastor R.W. 2023. Initiation and evolution of pores formed by influenza fusion peptides probed by lysolipid inclusion. *Biophys. J.* **122**, 1018–1032.
11. Neto A.J., Cordeiro R.M. 2016. Molecular simulations of the effects of phospholipid and cholesterol peroxidation on lipid membrane properties. *Biochim. Biophys. Acta.* **1858**, 2191–2198.
12. Карпунин Д.В., Акимов С.А., Фролов В.А. 2005. Формирование пор в плоских липидных мембранах, содержащих лизолипиды и холестерин. *Биол. мембраны*. **22**, 429–432.
13. Dupont S., Fleurat-Lessard P., Cruz R.G., Lafarge C., Grangeteau C., Yahou F., Gerbeau-Pissot P., Abrahão Júnior O., Gervais P., Simon-Plas F., Cayot P., Beney L. 2021. Antioxidant properties of ergosterol and its role in yeast resistance to oxidation. *Antioxidants*. **10**, 1024.
14. Li Y., Ran Q., Duan Q., Jin J., Wang Y., Yu L., Wang C., Zhu Z., Chen X., Weng X., Li Z., Wang J., Wu Q., Wang H., Tian H., Song S., Shan Z., Zhai Z., Qin H., Chen S., Fang L., Yin H., Zhou H., Jiang X., Wang P. 2024. 7-Dehydrocholesterol dictates ferroptosis sensitivity. *Nature*. **626**, 411–418.
15. Porter F.D. 2008. Smith–Lemli–Opitz syndrome: Pathogenesis, diagnosis and management. *Eur. J. Human Genetics*. **16**, 535–541.
16. Kono Y., Ishibashi Y., Fukuda S., Higuchi T., Tani M. 2023. Simultaneous structural replacement of the sphingoid long-chain base and sterol in budding yeast. *FEBS J.* **290**, 5605–5627.
17. Wiseman H. 1993. Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Lett.* **326**, 285–288.
18. Wiseman H., Cannon M., Arnstein H.R., Halliwell B. 1990. Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen introduced into liposomes: Similarity to cholesterol and ergosterol. *FEBS Lett.* **274**, 107–110.
19. Bagiński M., Tempczyk A., Borowski E. 1989. Comparative conformational analysis of cholesterol and ergosterol by molecular mechanics. *Eur. Biophys. J.* **17**, 159–166.
20. Melo M.N., Ingólfsson H.I., Marrink S.J. 2015. Parameters for Martini sterols and hopanoids based on a virtual-site description. *J. Chem. Phys.* **143**, 243152.
21. Galván-Hernández A., Kobayashi N., Hernández-Cobos J., Antillón A., Nakabayashi S., Ortega-Blake I. 2020. Morphology and dynamics of domains in ergosterol or cholesterol containing membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1862**, 183101.
22. Henriksen J., Rowat A.C., Ipsen J.H. 2004. Vesicle fluctuation analysis of the effects of sterols on membrane bending rigidity. *Eur. Biophys. J.* **33**, 732–741.
23. Kohl L., Gull K. 1998. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.* **93**, 1–9.
24. Allen C.L., Goulding D., Field M.C. 2003. Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* **22**, 4991–5002.
25. Johannes L., Lamaze C. 2002. Clathrin-dependent or not: Is it still the question? *Traffic*. **3**, 443–451.
26. Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. **387**, 569–572.
27. Frallicciardi J., Melcer J., Siginou P., Marrink S.J., Poolman B. 2022. Membrane thickness, lipid phase and sterol type are determining factors in the permeability of membranes to small solutes. *Nat. Commun.* **13**, 1605.
28. Staneva G., Osipenko D.S., Galimzyanov T.R., Pavlov K.V., Akimov S.A. 2016. Metabolic precursor of cholesterol causes formation of chained aggregates of liquid-ordered domains. *Langmuir*. **32**, 1591–1600.
29. Montañés F.M., Pascual-Ahuir A., Proft M. 2011. Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. *Mol. Microbiol.* **79**, 1008–1023.
30. Sokolov S.S., Popova M.M., Pohl P., Horner A., Akimov S.A., Kireeva N.A., Knorre D.A., Batishchev O.V., Severin F.F. 2022. Structural role of plasma membrane sterols in osmotic stress tolerance of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Membranes*. **12**, 1278.

Evolutionary Choice between Cholesterol and Ergosterol

© 2024 г. S. S. Sokolov¹, S. A. Akimov², F. F. Severin², *

¹*Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, 119991 Russia*

²*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: severin@belozersky.msu.ru

Sterol biosynthesis has evolved early in the history of eukaryotes. In most animals, as well as in primitive fungi, the main sterol is cholesterol. During the process of evolution, fungi acquired the ability to synthesize ergosterol. The pathway of its biosynthesis is more complex than the one of cholesterol biosynthesis. However, the evolutionary choice of most fungi was ergosterol, and the reason for this choice is still debated. In the majority of the works on this issue, the choice of most fungi is associated with the transition to life on land, and, consequently, the danger of cell dehydration. In our review we oppose this point of view. Probably, compared to cholesterol, ergosterol has more pronounced antioxidant properties. Indeed, the presence of three double bonds in the structure of the ergosterol molecule, as compared to one in cholesterol, relatively increases the likelihood of interaction with reactive oxygen species. Perhaps, the transition to life on land required additional antioxidant protection. Due to the aforementioned structural differences, the molecule of cholesterol is apparently more flexible than that of ergosterol. Experimental data indicate that this feature provides greater membrane flexibility as compared to fungal membranes, as well as a greater ability to compensate for disturbances in the packing of membrane phospholipids. Presumably, for animal cells these qualities turned out to be relatively more important than antioxidant ones, which predetermined their evolutionary choice of sterol.

Keywords: cholesterol, ergosterol, 7-dehydrocholesterol, evolution, fungi, animals, trypanosome

УДК 576.3

ХОЛЕСТЕРИН КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН И РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ: НОВОЕ И ХОРОШО ЗАБЫТОЕ СТАРОЕ

© 2024 г. А. Я. Дунина-Барковская^{а, *}

^аИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

*e-mail: dunina.aya@gmail.com

Поступила в редакцию 03.06.2024

После доработки 25.06.2024

Принята к печати 26.06.2024

Мембраны живых клеток, или биологические мембраны, — это уникальные молекулярные системы, в которых функционирование всех молекул взаимосвязано и скоординировано, и нарушение этой координации может быть фатально для клетки. Одним из примеров такой координации и взаимной регуляции является функционирование мембранных белков, активность которых зависит от их взаимодействия с мембранными липидами. Данный обзор суммирует факты о значении холестерина компонента клеточных мембран для нормального функционирования мембранных белков и клетки в целом. Этот липидный компонент обеспечивает тонкую регуляцию разнообразных клеточных функций и дает ключ к пониманию изменения активности ряда белков в различных физиологических и патологических условиях. В обзоре приводятся примеры холестерин-зависимых мембранных белков и клеточных процессов, а также рассматривается их роль при некоторых патологиях. Понимание механизмов холестерин-белковых взаимодействий может быть полезно для разработки лекарственных средств, влияющих на эти взаимодействия.

Ключевые слова: холестерин, клеточная мембрана, холестерин-зависимые белки, холестерин-связывающие мотивы

DOI: 10.31857/S0233475524050082, **EDN:** cbiqob

ВВЕДЕНИЕ

Значительный прогресс в геномной инженерии и биоинформатике в последние десятилетия продвинул биологическую науку в понимании молекулярной основы хранения, передачи и эволюции генетической информации, содержащейся в нуклеиновых кислотах. Эти знания, несомненно, очень важны, однако они не являются достаточными для понимания механизмов существования, функционирования и дифференцировки живых клеток, имеющих в пределах одного многоклеточного организма один и тот же геном. Работа белков — исполнителей генетических инструкций — зависит от их взаимодействия с другими молекулами, которые обеспечивают функционирование живой клетки, включая регуляцию активности белков. К таким молекулам, в частности, относятся мембранные липиды.

Биологические мембраны, которым посвящен наш журнал, окружают каждую живую клетку — как прокариотическую, так и эукариотическую — и одновременно обеспечивают диффузионный барьер

и регуляцию входящих и выходящих потоков молекул через клеточную границу. Клеточные мембраны также играют решающую роль в модуляции межклеточных коммуникаций и участвуют в огромном количестве сложных клеточных процессов, таких как пролиферация, дифференциация, секреция, миграция, внутриклеточная сигнализация, эндо- и фагоцитоз и др. Биологические мембраны представляют собой гетерогенные, асимметричные бислои, состоящие в основном из липидов, разнообразие и организация которых играют важнейшую роль в поддержании структурной целостности, клеточного гомеостаза и функциональной активности клеток, и изменения в составе мембранных липидов сопровождаются изменениями активности сигнальных путей и регуляторных каскадов [1–5].

Основным компонентом (около 50% в молярном отношении) окружающих клетку плазматических мембран являются фосфолипиды, представляющие собой сложные эфиры многоатомных спиртов и высших жирных кислот. Важными

фосфолипидами являются фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерин, сфингомиелин и кардиолипин. Следующими за фосфолипидами по распространенности являются терпенопроизводные липоидов, стерины. В плазматической мембране позвоночных животных это холестерин, содержание которого составляет около 40%. Согласно классикам мембранологии Максфилду и ван Мееру [1], по своему значению холестерин является «центральной липидом клеток млекопитающих». Хотя в этом обзоре речь пойдет в основном о клеточных мембранах позвоночных, следует отметить, что в клетках беспозвоночных, растений и микроорганизмов также содержится либо холестерин, либо родственные ему стерины, например brassinosteroids, эргостерин, β -ситостерин, стигмастерин, гопаноиды [6–12]. Насекомые, хотя и не способны синтезировать стерины, без них не могут обойтись. Например, для дрозофил лишняя стерина диета смертельна, для выживания достаточно стерина, содержащихся в дрожжах; мутация гена, нарушающего холестериновый гомеостаз, снижает эффективность ольфакторного обучения (olfactory learning) у мутантных мушек *w¹¹¹⁸* [13]. Более того, многие патогенные микроорганизмы используют в своем жизненном цикле холестерин клетки-хозяина, что может быть одним из основных факторов патогенеза и клинических проявлений болезни ([14]; см. ниже).

Широко распространенное представление о холестерине как о «плохом» веществе, закупоривающем артерии и вызывающем сердечные заболевания, является ошибочным и несправедливым по отношению к этой во многом незаменимой молекуле. Для млекопитающих холестерин не только является жизненно важным компонентом клеточных мембран, без которого клетка не может функционировать, но и предшественником всех стероидных гормонов, желчных кислот и оксистеролов, которые сами по себе являются важными регуляторными молекулами во многих метаболических путях [15]. Борьбе с «высоким уровнем холестерина» обычно придается большое значение, в то время как разрушительные последствия дефицита холестерина, возникающего при различных метаболических, инфекционных и возраст-зависимых заболеваниях, могут быть недооценены. Активность многих белков зависит от холестерина, и нарушения в холестериновом гомеостазе на клеточном уровне и на уровне всего организма может быть важным фактором в патогенезе многих заболеваний, связанных с вирусными и бактериальными инфекциями, а также диабета II типа, сердечно-сосудистых нарушений,

нейродегенеративных и возрастных заболеваний [14, 16]. Показательным примером в связи с этим являются работы, в которых было продемонстрировано, что при старении в синаптической фракции гиппокампальных нейронов у мышей происходит постепенная потеря холестерина, а также снижение синаптической пластичности, связанной с активацией глутаматных рецепторов [16, 17]. Доставка холестерина и повышение его содержания в мембране устраняло эти нарушения, а удаление холестерина из нейронов гиппокампа взрослых мышей имитировало нарушения, наблюдаемые у старых животных. Как предполагают авторы, изменения в липидном составе мембран нейронов в процессе старения могут являться причиной связанных с возрастом патологий мозга [16, 17].

Многие обширные обзоры посвящены холестерин-зависимым белкам и клеточным процессам (см., например, [18–24]). В данном обзоре роль «холестеринового» компонента клеточных мембран в функционировании клетки иллюстрируется на примерах некоторых холестерин-зависимых мембранных белков и соответствующих холестерин-зависимых клеточных процессов. Рассматривается участие холестерина и холестерин-зависимых процессов в патогенезе некоторых инфекционных и неинфекционных заболеваний; обсуждаются холестерин-связывающие мотивы в белках как возможный механизм белок-липидных взаимодействий. Главный вывод заключается в том, что без понимания механизмов холестерин-белковых взаимодействий и анализа роли холестерина в патогенезе некоторых заболеваний человека вряд ли возможно успешное лечение этих заболеваний. Эффективным направлением борьбы с холестерин-зависимыми патологиями может оказаться разработка новых лекарств, мишенью которых является белок-холестериновый интерфейс.

ХОЛЕСТЕРИН КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Холестерин в фосфолипидном бислое

Мембраны представляют собой асимметричные липидные бислои: в наружном листке плазматической мембраны преобладают незаряженные (цивиттер-ионные) фосфолипиды — фосфатидилхолин и сфингомиелин с небольшим количеством нейтральных и анионных гликофосфолипидов, а внутренний монослой сильно заряжен отрицательно из-за присутствия фосфатидилсерина, фосфатидной кислоты, фосфатидилинозита и его фосфорилированных производных. Как уже отмечалось, в эукариотических клетках второй по распространенности после фосфолипидов группой

липидов являются стеринны; у млекопитающих и большинства позвоночных это холестерин [1, 2, 4, 5, 20, 23–26]. Молекула холестерина содержит жесткую часть, состоящую из одного пятичленного и трех шестичленных колец, конформационно гибкую 8-углеродную цепь в положении С-17 и гидроксильную группу в положении 3β. Эта гидроксильная группа преимущественно располагается вблизи поверхности раздела липид–вода, а остальная часть молекулы холестерина находится между гидрофобными цепями липидов (рис. 1); хотя расположение молекул холестерина в плоскости

между монослоями липидного бислоя также возможно [25, 26].

Внутри фосфолипидного бислоя распределение холестерина между липидными монослоями разнообразно и часто асимметрично, что может объясняться разным сродством холестерина к разным фосфолипидам. Наиболее сильное взаимодействие стерина происходит со сфинголипидами (гликосфинголипидами и сфингомиелинами). Связи холестерина со сфингомиелином и фосфатидилхолином, обогащенными насыщенными цепями, способствуют его накоплению в наружном

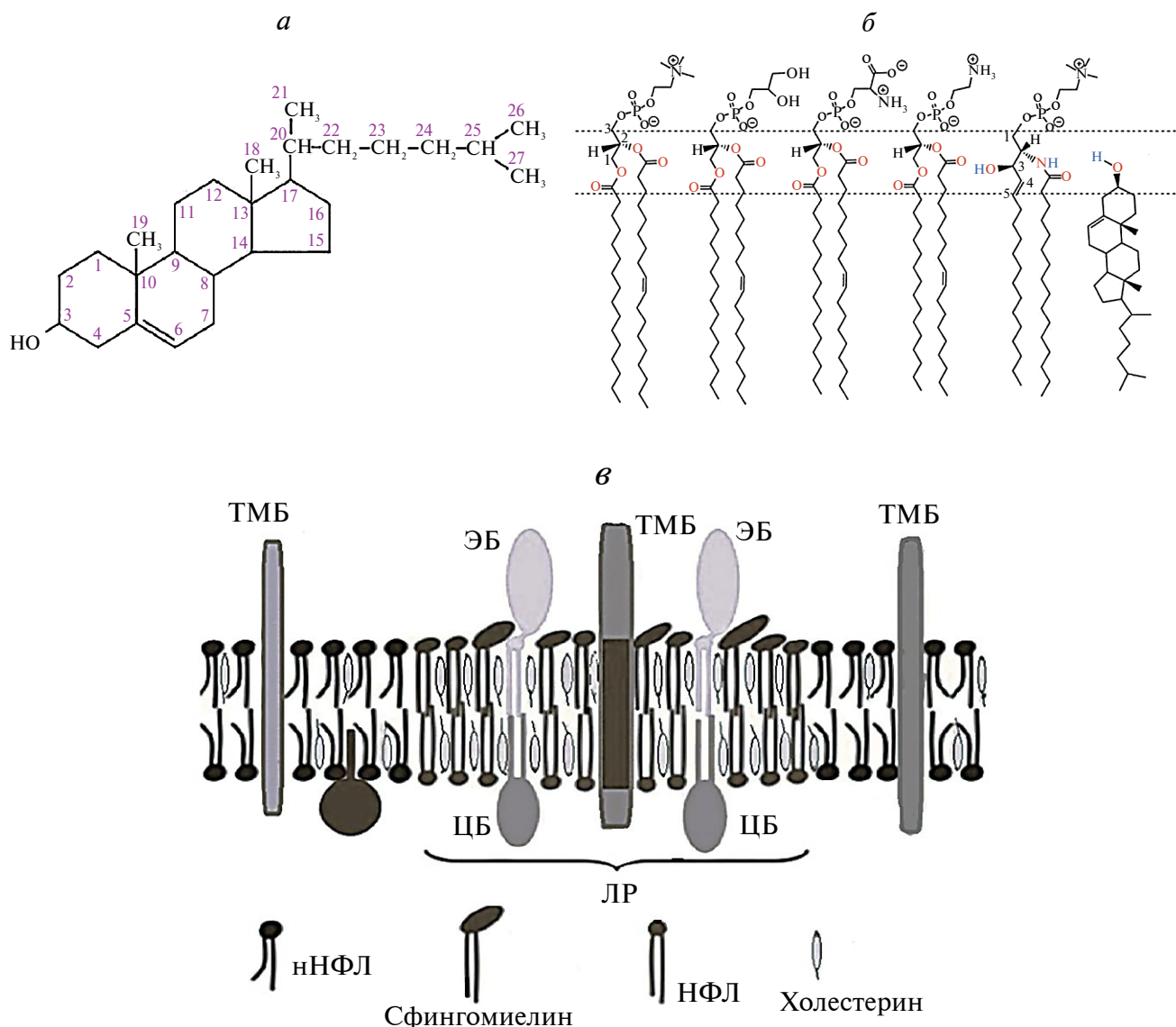


Рис. 1. Молекула холестерина (а) (PubChem CID5997) и его предполагаемое расположение в монослое мембранных фосфолипидов (б) и в бислойной липидной мембране, представляющей основу клеточной мембраны (в). На упрощенной схеме мембраны (в) липидный бислой содержит глицерофосфолипиды с ненасыщенными и насыщенными жирнокислотными остатками (нНФЛ и НФЛ соответственно), сфинголипиды и холестерин. В бислое встроены ассоциированные с мембраной цитоплазматические (ЦБ) и экстраклеточные (ЭБ) белки, а также трансмембранные белки (ТМБ). Бислой содержит липидные рафты (ЛР) — микродомены, обогащенные сфингомиелином и холестерином.

монослой. С другой стороны, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин могут обуславливать накопление холестерина во внутреннем (цитоплазматическом) липидном монослое. В целом, распределение холестерина зависит от фосфолипидов с анионными группами и насыщенными цепями. На это распределение и его стабильность также существенно влияют ненасыщенные жирные кислоты, повышенное содержание которых в биомембранах увеличивает вероятность перехода холестерина из одного монослоя в другой (флип-флоп) [4]. Согласно теоретическим расчетам, примерно 40% молекул холестерина плазматической мембраны находится в наружном монослое и 60% — во внутреннем [25–27].

Холестерин играет важную роль в определении физических свойств клеточных мембран млекопитающих [1–3, 5, 18, 19, 21, 23, 24, 28–31]. Заполняя промежутки между фосфолипидами в бислой мембраны, холестерин оказывает значительное влияние на такие параметры мембраны, как толщина, жесткость, термочувствительность (температура фазового перехода), и в значительной степени определяет ее латеральную организацию. Одним из параметров, используемых для оценки жесткости мембран, является соотношение фосфолипид/холестерин. Распределение липидов в монослой неравномерно: липиды организованы в рафты — микродомены, богатые холестерином и сфингомиелином [3, 32–36]. Размеры, стабильность и распределение рафтов, как и в случае трансбислойного распределения холестерина, регулируются другими компонентами мембраны, в частности ненасыщенными жирными кислотами, имеющими меньшее сродство к холестерину по сравнению с их насыщенными аналогами [4, 35, 36]. О многочисленных функциях рафтов, в которых кластеризуются определенные мембранные белки, написано много работ [3, 32–36]. Эти микродомены ограничивают латеральную подвижность мембраны и активно участвуют в различных клеточных событиях. Рафты играют сложную роль в транспортировке холестерина для поддержания клеточного гомеостаза, а также являются компонентами рецепторных и сигнальных систем клеток [15, 32, 33, 37].

Холестерин внутриклеточных мембран: распределение и источники

Эукариотические клетки, помимо наружной — плазматической мембраны (ПМ), имеют внутриклеточные мембраны в различных клеточных органеллах (эндоплазматический ретикулум (ЭР), эндо- и фагосомы, лизосомы, митохондрии, ядро и др.), где биомембраны обеспечивают согласованность

различных функций внутри клетки и органелл, контролируют перемещение макро- и микромолекул, а также создают поверхности, на которых происходят важные биологические события. Распределение холестерина внутри клеток между разными клеточными мембранами очень неравномерно. Как уже отмечалось, содержание холестерина в плазматической мембране составляет 30–50% от общего количества липидов, и это самая высокая концентрация холестерина по сравнению с другими клеточными мембранами. ЭР беден холестерином и содержит менее 1% от общего количества холестерина в клетке (3–6% от общего количества липидов мембраны ЭР) [38–41]. Мембранные пути, сообщающиеся с ПМ, такие как сеть транс-Гольджи, и рециркулирующие эндосомальные компартменты, содержат промежуточные количества холестерина. В направлении к цис-Гольджи и ядру содержание холестерина еще снижается, хотя и в ядерной оболочке имеются «рафтовые» липиды сфингомиелин и холестерин, а также микродомены, обогащенные этими липидами [42–46]. Следует, кстати, отметить, что липиды ядра и сигнальные функции ядерных липидов, в частности холестерина, привлекают все большее внимание, поскольку исследования свидетельствуют о том, что холестерин и другие липиды, входящие в состав ядерной оболочки и хроматина, являются активными участниками внутриядерных процессов и играют активную роль в осуществлении и регуляции процессов деления и дифференцировки клеток и при апоптозе [42].

Низкое содержание холестерина во внутриклеточных мембранах делает их очень чувствительными к изменениям уровня холестерина. Благодаря поддержанию очень низкого исходного уровня холестерина в ЭР, даже небольшие изменения уровня холестерина в ПМ приводят к значительному (на порядок) скачку содержания холестерина в ЭР [26, 39]. Хотя в биосинтезе большинства классов мембранных липидов (включая холестерин, глицерофосфолипиды и сфинголипиды), кроме ЭР, участвуют митохондрии и аппарат Гольджи, большинство ферментов синтеза холестерина, а также основная часть молекулярного механизма, регулирующего его клеточный гомеостаз (система sterol regulatory element binding protein/SREBP cleavage activating protein, SREBP/SCAP), находится именно в мембране ЭР [4, 47–53]. Оттуда холестерин быстро переносится в другие клеточные мембраны.

Холестерин не только синтезируется в ЭР, но также поступает дополнительно из внеклеточной среды, где холестерин транспортируется в виде липопротеиновых частиц — липопротеидов низкой плотности (ЛПНП). ЛПНП связываются

с рецепторами ЛПНП на поверхности ПМ и попадают внутрь клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Затем ЛПНП доставляются в лизосомы, где холестерин высвобождается из ЛПНП и транспортируется в ПМ. После обогащения ПМ холестерином он экспортируется в ЭР. Когда содержание холестерина в ЭР превышает ~5% от общей массы липидов ЭР, синтез холестерина и продукция рецепторов ЛПНП в ЭР подавляется (down-regulated). Кроме того, избыток холестерина в ЭР этерифицируется до эфиров холестерина для хранения в жировых каплях. Такая строгая регуляция гомеостаза холестерина существенна для нормальной жизнеспособности и роста клеток [53].

Межмембранный перенос холестерина

Механизмы межмембранного переноса холестерина (например, между ЭР и ПМ или между органеллами) еще недостаточно изучены. Холестерин в клетке редко транспортируется в одиночку и обычно сочетается с транспортом и метаболизмом других липидов, в частности фосфоинозитидов, фосфатидилсерина и сфинголипидов. В обзоре Ikonen и Zhou [38] описаны основные пути транспорта холестерина и основные точки их пересечения. Помимо экзо- и эндоцитозных механизмов, для переноса холестерина используются белки-переносчики липидов, гидрофобные полости которых защищают липид от воды и могут катализировать перенос липидов между органеллами. В работах [54–56] показано, что для транспорта холестерина из ПМ в ЭР у млекопитающих требуется анионный фосфолипид фосфатидилсерин, а также ЭР- и ПМ-связанные белки Aster. В процессах переноса холестерина участвуют внутриклеточные мембранные контакты (membrane contact sites, MCS) – области, где расстояние между мембранами составляет порядка 10 нм [57, 58]. Молекулярное устройство и роль таких контактов в клеточных процессах и метаболических перестройках клеток вызывает большой интерес и становится важной темой клеточной биологии. Хотя это сравнительно молодая область исследований, уже понятно, что MCS участвуют в переносе липидов и липидной сигнализации, а также играют важную роль в кальциевой сигнализации и в адаптации клеток к стрессу. Новые инструменты для визуализации и изучения MCS показали, что MCS повсеместно распространены и функционируют в качестве сигнальных, метаболических и логистических центров, координирующих работу органелл как в нормальных физиологических, так и в стрессовых условиях (см. обзор [57]). Межмембранный перенос холестерина,

осуществляемый при участии MCS, по-видимому, является одним из существенных факторов этой координации.

Оперативные пулы холестерина

В зависимости от мобильности и доступности различным молекулярным зондам, различают три оперативных пула холестерина плазматических мембран [25, 33, 59]. Самым высокомобильным является пул холестерина («активный холестерин»), распознаваемый доменом D4 перфринголизина O (PFO) и антролизина O (ALOD4); он составляет примерно 10 моль% липидов ПМ и становится недоступным, когда холестерина в ПМ становится меньше 30 моль%; этот пул быстро перемещается в ЭР, где сигнал об избытке холестерина воспринимается механизмом SREBP2 [60, 61]. Второй пул холестерина, распознаваемый остеолизином A (OlyA) [62, 63], входит в состав комплексов сфингомиelin/холестерин. Этот пул составляет около 15 моль% липидов ПМ и формирует основу рафтов. Остальная часть холестерина (около 15 моль% липидов ПМ) секвестрируется другими мембранными факторами, является критической для жизнеспособности клеток; в настоящее время для этого пула холестерина зондов нет. Такое разделение холестерина на пулы обусловлено его сродством к фосфолипидам и другим компонентам мембраны.

В целом, распределение и поддержание физиологического уровня холестерина в клетках обеспечивается с помощью многообразных механизмов, что указывает на то, что для клетки это жизненно важная задача. Холестерин необходим клеткам животных, и его недостаток или избыток разрушителен для клеток. Поэтому для поддержания оптимального количества этого стерина развились сложные молекулярные механизмы, контролирующие и регулирующие уровень холестерина и других родственных стероидов, таких как оксистероиды или промежуточные продукты синтеза холестерина, и реагирующие на изменение их уровня с помощью различных регуляторных механизмов обратной связи. Эта регуляция включает как прямое связывание стероидов компонентами гомеостатической системы, расположенной в ЭР, так и косвенные эффекты, вызванные холестерин-зависимыми изменениями физических свойств мембран [64].

ХОЛЕСТЕРИН-ЗАВИСИМЫЕ МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ И КЛЕТОЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ

В липидную мембрану клетки встроено множество различных мембранных белков, занимающих

до 30% площади мембраны, и эти мембранные компоненты постоянно взаимодействуют друг с другом: липиды влияют на встроенные белки, а белки влияют на распределение и поведение липидов [18, 19, 21–24]. Каждый встроенный в мембрану белок уникальным образом модулирует локальное липидное окружение, увеличивая или уменьшая количество определенных липидных компонентов, что создает градиенты толщины и кривизны. С другой стороны, липиды не просто служат матрицей, в которую встраиваются белки, но могут активно участвовать в регуляции активности белков, их перемещении и локализации. Белки могут либо специфически связывать липиды, когда можно выделить четкий сайт связывания для данного липида, либо неспецифически, когда липиды выступают в качестве среды, а физические свойства, такие как толщина, текучесть или кривизна, регулируют функцию белка.

Давно известно, что функционирование мембранных белков зависит от состава липидной мембраны в микроокружении этих белков. Такая липидная регуляция расширяет функциональный диапазон активности данного белка, которая существенно зависит от липидного состава мембраны [65–73]. Например, активность Na^+ , K^+ -АТФ-азы модулируется незтерифицированными жирными кислотами и лизофосфолипидами [66], на функционирование рецептора инсулина влияют диацилглицерины [67], а мембранные фосфоинозитиды регулируют многие ионные каналы [65]. Как пишет В. Hille в своем обзоре [65], такая липидная регуляция обеспечивает соответствующую активность канала и электрическую возбудимость в зависимости от липидного состава мембраны, окружающей канал-формирующий белок (the channel-forming protein). Такой механизм регуляции безусловно относится не только к ионным каналам, но и к другим белкам, а также и к другим липидам.

Холестерин-зависимые мембранные белки образуют отдельную большую группу липид-зависимых белков. К мембранным белкам, функции которых регулируются холестерином, относятся многие ионные каналы [72–75], в том числе каналы щелевых контактов, обеспечивающих межклеточную коммуникацию [76–79]. Мембранные рецепторы, участвующие в трансдукции гормональных сигналов и нейротрансмиссии, также регулируются холестерином, например, пуриnergические P2X-рецепторы [80, 81], ГАМК-рецепторы [82, 83], рецепторы, сопряженные с G-белками, включая бета2-адренергические и серотониновые рецепторы [84–88], а также ацетилхолиновые рецепторы [89–91], NMDA-рецепторы [92], глициновые рецепторы [93]. Среди холестерин-зависимых

рецепторов также имеются фагоцитозные рецепторы FcγRIIA41 [94], рецептор CD36 (scavenger receptor) [95–97], а также рецептор ЛПНП, отвечающий за транспорт холестерина и регуляцию уровня холестерина в крови [51]. Это далеко не полный список холестерин-зависимых мембранных белков (см. обзоры [1, 2, 14, 18, 85, 98]).

Клеточные процессы, в которых участвуют такие белки, также являются холестерин-зависимыми. Среди таких процессов — клеточная адгезия [99] и локомоция [100], эндоцитоз [101, 102] и многие другие. Холестином регулируется синаптогенез — формирование синаптических микровезикул из плазматической мембраны: ограниченное снижение содержания холестерина в мембранах, слабо влияющее на общую эндоцитозную активность, блокирует биогенез синаптических микровезикул [103]. Частичное удаление холестерина из мембран макрофагов снижает их фагоцитозную активность [104–107]. Для холестерин-зависимых процессов характерна колоколообразная дозо-зависимость [106, 107]. Это означает, что холестерин-зависимые белки (а значит, и соответствующие процессы) требуют оптимальной концентрации холестерина для нормального функционирования, и поэтому вредным и разрушительным может быть как избыток, так и недостаток холестерина. Далее будет приведено несколько примеров холестерин-зависимых мембранных белков и связанных с ними процессов.

Холестерин-зависимые ионные каналы

Ионные каналы играют важнейшую роль в функционировании клеток, обеспечивая трансмембранный транспорт ионов и его регуляцию в ответ на химические или механические стимулы. Представители всех основных семейств ионных каналов регулируются изменением уровня мембранного холестерина; многие каналы локализованы в богатых холестерином мембранных микродоменах (рафтах) [72]. Описаны разные эффекты холестерина. Активность некоторых типов каналов (K^+ -каналов входящего выпрямления (inwardly-rectifying K^+ channels), потенциал-зависимых K^+ -каналов, Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, потенциал-зависимых Na^+ -каналов, Ca^{2+} -каналов N-типа и некоторых анионных каналов) подавляется при повышении содержания холестерина в мембране. Напротив, у таких каналов, как эпителиальные амилорид-чувствительные Na^+ - и TRP- (transient receptor potential) каналы, а также у некоторых типов потенциал-зависимых K^+ -каналов снижение содержания холестерина вызывает угнетение активности. Также показано, что холестерин изменяет кинетические свойства и вольт-амперные

характеристики некоторых потенциал-зависимых каналов. Поддержание определенного уровня холестерина в мембране необходимо не только для прямого воздействия на каналобразующий белок (путем специфических взаимодействий между холестерином и белком канала или изменения физических свойств мембранного бислоя), но и для обеспечения связи ионных каналов с сигнальными каскадами, в частности, за счет белок-белковых взаимодействий в рафтах.

Депо-управляемые Ca^{2+} -каналы

Одним из интригующих примеров холестерин-зависимых мембранных белков является депо-управляемый Ca^{2+} -канал (store-operated Ca^{2+} channel, SOC-канал), или Ca^{2+} -канал, активируемый высвобождением Ca^{2+} (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel, CRAC-канал). SOC-/CRAC-каналы — один из основных путей входа Ca^{2+} в клетку и важнейший участник в процессах кальциевой сигнализации [108]. Вход Ca^{2+} через эти каналы вносит существенный вклад в Ca^{2+} -сигналы, инициированные агонистами различных клеточных рецепторов. Активность SOC-CRAC-каналов преимущественно обеспечивается двумя трансмембранными белками — STIM1 и Orai1. STIM1 функционирует в мембране ЭР и является молекулярным сенсором Ca^{2+} в люминальной части ЭР. Orai1 — это каналный белок, формирующий Ca^{2+} -селективную пору SOC-канала и расположенный в плазматической мембране. Истощение запасов Ca^{2+} в ЭР (Ca^{2+} -депо) вызывает олигомеризацию белков STIM1, что приводит к изменению конформации их цитоплазматического домена и связыванию с каналами Orai1 в местах контакта ЭР и ПМ. Последнее приводит к активации каналов Orai1, входу внеклеточного Ca^{2+} и локальному увеличению уровня Ca^{2+} в цитозоле, что стимулирует активность Ca^{2+} -насоса в ЭР, и к восстановлению содержания Ca^{2+} в Ca^{2+} -депо.

Хотя STIM1 и Orai1 являются необходимыми и достаточными элементами для функционирования SOC-каналов, их эффективная активация и деактивация регулируется различными липидами и липид- и/или ЭР-/ПМ-зависимыми вспомогательными белками. В ряде работ было показано, что холестерин модулирует функцию как STIM1, так и Orai1 и что удаление холестерина из мембран уменьшает депо-зависимый вход кальция (store-operated calcium entry, SOCE) [109–112]. Такая зависимость STIM1 и/или Orai1 от холестерина может проявляться при некоторых патологиях: высказывается предположение о взаимосвязи между гипохолестеринемией и усиленной дегрануляцией

тучных клеток [108, 111]. Действительно, у пациентов, страдающих гипохолестеринемией, как правило, усиливается аллергическая реакция, что согласуется с данными о том, что истощение запасов холестерина в тучных клетках усиливает депо-управляемые токи Ca^{2+} и дегрануляцию [111].

В ходе исследований механизмов холестерин-зависимости CRAC-каналов было показано [112], что кальциевый сенсор в ЭР (STIM1) имеет холестерин-связывающую последовательность $\text{L/V-X}_{(1-5)}\text{-Y-X}_{(1-5)}\text{-R/K}$ (где X — любая аминокислота), расположенную внутри области SOAR (STIM1 Orai activating region, Orai-активирующая область STIM1), а также показана холестерин-зависимость STIM1 и SOAR и изменение взаимодействия SOAR с Orai при истощении холестерина. Холестерин-связывающая последовательность была предложена в работе Li и Papadopoulos в 1998 году [113]; эта последовательность, сначала названная авторами «холестерин-распознающая/взаимодействующая аминокислотная консенсусная последовательность» (cholesterol recognition/interaction amino acid consensus sequence, CRAC), в форме аббревиатуры оказавшаяся «тезкой» CRAC-каналов, в дальнейшем была обнаружена во многих холестерин-зависимых белках [14, 18, 19, 106, 113–117]. И хотя это не исключает возможности других вариантов холестерин-связывающих мотивов, в ряде случаев присутствие такого мотива в белке указывает на высокую вероятность его взаимодействия с холестерином.

Как было показано в [112], влияние холестерина на SOC-/CRAC-каналы опосредуется холестерин-связывающим мотивом $\text{L/V-X}_{(1-5)}\text{-Y-X}_{(1-5)}\text{-R/K}$ в С-конце белка STIM1. Мутация в этом мотиве связывания (I364A), расположенная в SOAR, приводила к усилению токов Orai1, сопоставимому с эффектом удаления холестерина, как в полноразмерном STIM1, так и в С-концевом фрагменте STIM1. Моделирование с помощью метода молекулярной динамики подтвердило, что холестерин влияет на сопряжение SOAR с мембраной. В целом, эти результаты свидетельствуют о том, что холестерин-связывающий домен в Orai1 и STIM1 опосредует взаимодействия этих белков с холестерином [112].

Холестерин-зависимость кальциевой сигнализации представляется естественной хотя бы потому, что в ней участвуют ионные каналы, встроенные в мембрану. Интригующим является вопрос: влияет ли (и если да, то как?) кальциевая сигнализация на процессы синтеза, внутриклеточного транспорта и клеточного гомеостаза холестерина? Вряд ли случайно сосуществование этих двух жизненно важных систем на мембранах ЭР.

Ионные каналы наружных волосковых клеток слухового органа

Другим интересным примером холестерин-зависимого процесса, опосредуемого холестерин-зависимыми ионными каналами, может служить процесс механоэлектрического сопряжения в наружных волосковых клетках органа Корти мыши и ушной улитки цыплят [118, 119]. Основными ионными каналами, которые участвуют в процессе трансформации механического сигнала в электрический на ранних стадиях обработки звука, являются кальций-зависимые калиевые каналы высокой проводимости (“big potassium” channels, BK), которые открываются в зависимости от напряжения и концентрации кальция, а также потенциал-управляемые кальциевые каналы (VGCC), которые отвечают за кальций-зависимый экзоцитоз и синаптическую передачу в слуховом нерве. Авторы обнаружили, что снижение содержания холестерина влияет на механоэлектрическое сопряжение у наружных волосковых клеток и калиевые токи. В опытах с использованием метил-бета-циклодекстрина (m β CD) [120, 121], извлекающего холестерин из клеточной мембраны, было показано, что снижение содержания холестерина в наружных волосковых клетках уменьшает пиковый стабильный кальций-чувствительный калиевый ток BK-типа на 50%. В то же время обработка m β CD увеличивала пиковый входящий кальциевый ток (на ~30%), что исключает подавление экспрессии или функции кальциевых каналов как причину снижения кальций-чувствительного калиевого тока. В работе также показано, что BK экспрессируются в обогащенных холестерином микродоменах. Авторы заключают, что холестерин является ключевой детерминантой в физиологии слуха и что эффекты холестерина могут быть обусловлены как прямым его воздействием на биофизические свойства каналов, так и локализацией каналов в рафтах. Холестерин-зависимые изменения в кальциевых и кальций-зависимых калиевых каналах могут изменить форму рецепторного потенциала, постоянную времени мембраны и временную обработку сигнала и в целом изменить функциональную настройку клеток.

Следует отметить, что в BK-каналах также показано присутствие холестерин-связывающих мотивов. В работе Singh и др. [122] исследовали структурные основы холестерин-зависимой регуляции (угнетения) Ca²⁺-зависимых калиевых каналов высокой проводимости (BK) с помощью комбинации методов молекулярной динамики, точечных мутаций в белке Cbv1 и электрофизиологии (регистрация активности одиночных каналов,

встроенных в искусственные бислойные липидные мембраны разного состава). Исследования показали, что эффект холестерина опосредуется цитоплазматическим C-концевым доменом белка Cbv1, содержащим семь CRAC-мотивов. С помощью метода молекулярной динамики выявлены взаимодействия между холестерином и ионным каналом. На основании результатов сделан вывод, что чувствительность канала к холестерину определяется мотивом CRAC4, ближе всех расположенным к мембране; однако удаление других CRAC-мотивов или замены мотивообразующих аминокислот также (кумулятивно) угнетает чувствительность к холестерину, что указывает на участие нескольких CRAC-мотивов во взаимодействиях BK-каналов с холестерином.

Холестерин-зависимость родопсина

И еще один пример участия холестерина в важнейшем биологическом процессе — фоторецепция и холестерин-зависимое поведение родопсина в мембранах зрительных палочек сетчатки [123–128]. Наружный сегмент палочки сетчатки (rod outer segment, ROS) содержит стопку мембранных дисков, физически отделенных от плазмалеммы. Именно в мембране диска локализован фотопигмент родопсин [129] и другие элементы каскада фототрансдукции. Мембрана диска содержит существенно меньше холестерина по сравнению с плазматической (не дисковой) мембраной палочки (соответственно, 8 моль% в дисках и 28 моль% в ПМ), причем в мембранах дисков существует свой градиент содержания холестерина: вновь образованные («молодые») мембраны дисков содержат в несколько раз больше холестерина, чем ранее образованные («старые») диски на апикальном конце ROS. Как показывают исследования, содержание холестерина в мембранах оказывает существенное влияние на состояние и активность родопсина: высокое содержание холестерина в мембране препятствует участию родопсина в каскаде зрительной трансдукции, но увеличивает стабильность родопсина [126–128]. В работе Niu и др. [126] уровень холестерина в мембранах дисков наружного сегмента палочек меняли с помощью метил-бета-циклодекстрина. Уменьшение количества холестерина в мембране диска приводило к тому, что большая доля фотоактивированного родопсина переходила в конформацию метародопсина II (MII), стимулирующую G-белки, в то время как обогащение холестерином снижало степень образования MII. Термическая стабильность родопсина увеличивалась с увеличением содержания холестерина в мембранах дисков. Таким образом, распределение и эффекты

холестерина обеспечивают условия, при которых зрелые (апикальные) мембраны дисков запускают каскад зрительных сигналов более эффективно, чем вновь образованные базальные диски с более высоким содержанием холестерина. Препятствуя активации родопсина в базальных дисках, холестерин в то же время оказывает протекторное действие, стабилизируя белок и препятствуя его денатурации [126–128]. Для эффективной и надежной фоторецепции мембрана диска должна иметь оптимальное содержание холестерина — не слишком высокое, чтобы не ограничивать активацию рецептора, но и не слишком низкое, чтобы обеспечить стабильность фоторецепции. Помимо неспецифического влияния на состояние липидного окружения родопсина, холестерин может и напрямую взаимодействовать с родопсином. Это создает дополнительные способы тонкой настройки активности мембранного белка без модуляции его синтеза, оборота или модификации.

ГОМЕОСТАЗ КЛЕТОЧНОГО ХОЛЕСТЕРИНА И БОЛЕЗНИ

Поскольку от холестерина зависит нормальное функционирование клеток, то нарушение гомеостаза холестерина приводит к различным патологиям. Здесь будут приведены примеры инфекционных и неинфекционных заболеваний, в патогенезе которых выявлено участие холестерина.

Инфекционные заболевания и холестерин

Известно, что многие бактериальные, вирусные и другие патогены используют холестерин и холестерин-зависимые процессы для инфицирования клеток, и это отражается на патогенезе, симптоматике и лечении соответствующих болезней (см. обзоры [14, 130, 131]). Вопросы, касающиеся важности холестерина в мембране клетки-хозяина на разных этапах жизненного цикла вируса, а также влияния вирусов на клеточные липиды и, в частности, на холестерин, рассматривались во многих работах [132–138]. Например, взаимодействия некоторых оболочечных вирусов с клеткой во время проникновения, сборки, почкования и выхода из клетки зависят от наличия холестерина и липидных рафтов в мембранах клеток-хозяев. Это было показано для вирусов иммунодефицита (HIV), гриппа, герпеса, гепатита С (HCV), ротавирусов, вируса желтой лихорадки, вируса Зика, вируса Денге, вируса Западного Нила и многих других (см. обзор [131]). Взаимодействие вируса с клеткой приводит к значительным изменениям в липидном составе клеточных мембран. Например, в случае

вируса гриппа формирование оболочки новых вирусных частиц происходит из плазматической мембраны инфицированной клетки, причем вирусная оболочка избирательно приобретает «рафтовые» липиды, холестерин и сфинголипиды. Это может сопровождаться значительными потерями этих липидов в мембране клетки-хозяина и привести к дисфункции и гибели инфицированной клетки. Эксперименты с пептидами вирусного происхождения, содержащими холестерин-связывающие мотивы, показали, что при определенной концентрации такие пептиды токсичны для клеток [106, 107]. Если считать (на основании экспериментов *in vitro* на клетках MDCK [139]), что один вирус может произвести в одной инфицированной клетке порядка 10^4 новых вирусных частиц диаметром 100 нм, то суммарная площадь оболочек этих частиц будет 3×10^8 нм², что составляет примерно 25% площади мембраны сферической клетки диаметром 20 мкм (12×10^8 нм²). Поскольку вирусная оболочка обогащена холестерином, то для мембраны инфицированной клетки такая потеря означает существенное изменение липидного состава и соответствующие нарушения функционирования холестерин-зависимых белков. Это подтверждается наблюдениями Frensing и др. [139]: после массивной продукции вирусных частиц клетки MDCK теряли адгезионные контакты, и жизнеспособность клеток снижалась.

В случае коронавируса SARS-CoV-2 формирование вирусной оболочки (также обогащенной холестерином) происходит не из плазматических мембран, как в случае вируса гриппа, а из мембран ЭР, где содержание холестерина существенно ниже, чем в плазматической мембране. Это может быть одним из факторов, объясняющих тяжелое течение болезни при Covid-19, поскольку количество холестерина, удаляемого из мембран ЭР вновь образовавшимися вирусами, может превышать компенсаторные ресурсы клетки [131]. При недостаточном поступлении холестерина в клетки неизбежна дерегуляция холестерин-зависимых процессов, что может привести к массовой гибели клеток; это проявляется в клиническом течении заболевания и плохом прогнозе. В связи с этим следует отметить, что у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, было зарегистрировано значительное снижение (в несколько раз) уровня общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) [140, 141]. Такое снижение уровня холестерина ЛПНП у пациентов с Covid-19 может отражать усиленное привлечение циркулирующего холестерина клетками, чтобы компенсировать его потерю, связанную с размножением вируса. Возможно, клинический прогноз

зависит от своевременной и успешной доставки холестерина, необходимого для восстановления клеточных мембран. Поэтому для пациентов, инфицированных SARS-CoV-2 или другими оболочечными вирусами, извлекающими холестерин из клеточных мембран, холестеринопонижающая терапия (например, статины) может быть нецелесообразной [140, 141]. В условиях пониженного уровня холестерина в клеточных мембранах любая инфекция оболочечным вирусом, поглощающим холестерин, может оказаться губительной, так как дальнейшее снижение уровня холестерина в клеточной мембране во время отпочковывания вируса может привести к повреждению клетки.

Для минимизации вероятности инфицирования клеток вирусом и последствий его массового размножения могут оказаться полезными такие подходы, как поиск и разработка агентов, которые бы селективно предотвращали взаимодействие вирусного белка с клеточным холестерином на уровне белок-липидных взаимодействий [14, 130, 131]. Показательным примером в этом отношении может быть антивирусный эффект пептида C5A, содержащего аминокислотные остатки 3–20 амфипатического α -спирального N-концевого домена белка вируса гепатита A NS5A [142, 143]. Интересно, что активный пептид C5A (SWLRDIWDWICEVLSDFK) явно содержит два варианта холестерин-связывающего мотива (RDIWDWI и/или RDIWDWICEV; шрифтом выделены мотивообразующие аминокислоты), хотя в работе Cheng и др. [143] тема холестерин-связывающих мотивов не затрагивается. Возможно, антивирусный эффект пептида C5A обусловлен тем, что благодаря наличию холестерин-связывающего мотива этот пептид конкурирует с вирусным белком за связывание холестерина клеточной мембраны и тем самым препятствует формированию оболочки вирусной частицы.

Помимо вирусных инфекций, с гомеостазом холестерина в клетке хозяина также связаны различные бактериальные инфекции. Например, грамотрицательная бактерия *Helicobacter pylori*, вызывающая хронический гастрит, не синтезирует холестерин самостоятельно, а извлекает его из плазматических мембран эпителиальных клеток желудка, что приводит к их разрушению и может быть важным компонентом патогенеза [144–146]. Микотические заболевания также часто связаны с изменениями в гомеостазе холестерина, поскольку патогенные грибы используют холестерин клеток хозяина [147, 148].

Еще одним классическим примером инфекции, связанной с истощением холестерина в клетках хозяина, является туберкулез. *Mycobacterium*

tuberculosis проникает в клетку путем фагоцитоза и остается в фагосоме, используя холестерин клетки в качестве источника углерода и перестраивая холестеринновый гомеостаз для своих нужд [149–153]. При хронической инфекции *M. tuberculosis* продолжает разрушать клетки, по крайней мере частично, из-за истощения запасов холестерина. Как и при вирусных инфекциях, своевременная и достаточная доставка холестерина необходима для поддержания целостности мембраны клетки-хозяина. Следует напомнить, что до появления антибиотиков туберкулез лечили главным образом с помощью диеты с высоким содержанием жиров и стерина.

Малярийный плазмодий, вызывающий малярию, также является холестерин-зависимым организмом, серьезно нарушающим холестеринновый гомеостаз в организме хозяина [154, 155]. Для инвазии и роста *Plasmodium falciparum* необходим холестерин из рафтов плазматической мембраны эритроцитов. *P. falciparum* не способен синтезировать de novo жирные кислоты и холестерин и получает их из инфицированных клеток. Метаболическая активность паразита приводит к изменению количества жирных кислот и холестерина в плазматической мембране эритроцитов и снижению соотношения холестерин/фосфолипиды, что приводит к изменениям проницаемости и хрупкости эритроцитов.

Как и в случае противовирусных препаратов, поиск антибактериальных, антимикотических и антималярийных лекарств, предотвращающих взаимодействие патогена с холестерином инфицированной клетки, может оказаться продуктивным и полезным. Помимо холестерин-связывающих пептидов, могут оказаться полезными другие вещества — такие, как например кверцетин, витамин Д, сапонин глицирризин и др., способные действовать на уровне холестерин-белкового интерфейса и обладающие антимикробной активностью [14, 131, 156, 157].

Холестерин и неинфекционные заболевания

Холестериновый компонент обнаруживается также во многих неинфекционных заболеваниях, таких как сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания [158], многие из которых связаны с возрастом, например болезни Альцгеймера [159, 160], Хантингтона [161] и Паркинсона [162], боковой амиотрофический склероз [163], диабет 2 типа [164] и многие другие. Эта тема заслуживает отдельного обзора и упоминается здесь лишь для того, чтобы проиллюстрировать повсеместную и многогранную роль холестерина в осуществлении нормальных клеточных функций. Роль холестерина при этих заболеваниях необязательно связана

с повышением содержания «плохого» ЛПНП-холестерина в крови хотя бы потому, что метаболизм холестерина в мозге — самом богатом холестерином органе млекопитающих — независим от других тканей благодаря наличию гематоэнцефалического барьера [165], а также потому, что «высокий» ЛПНП-холестерин не означает, что в мембранах клеток содержание холестерина выше оптимального. Хотя препараты, снижающие уровень холестерина в крови, рассматривались в качестве потенциальных средств для профилактики болезни Альцгеймера (БА), экспериментальные и расчетные исследования позволили предположить защитную роль холестерина в отношении формирования фибрилл Aβ161, поскольку было показано, что холестерин препятствует выходу Aβ из мембранной среды в раствор [166, 167]. Кроме того, одной из основных особенностей БА является нарушение функционирования холинергической системы, а ацетилхолиновые рецепторы являются холестерин- и рафтозависимыми [89–91, 168, 169], поэтому истощение запасов холестерина может нарушать функционирование холинергической системы. Значение холестерина и рафтов также было показано при болезни Хантингтона, характеризующейся нейродегенерацией стриатума и коры головного мозга. Исследования постсинаптических мембран показали, что маркер болезни белок хантингтин (htt) связывается с липидными доменами [170].

Значительные изменения в метаболизме холестерина были описаны при боковом амиотрофическом склерозе [163]. Особый интерес в этом контексте представляют эксперименты Fukui и др. [164], которые показали, что у клеток нейронального происхождения истощение холестерина, имитирующее снижение клеточного холестерина при диабете, приводит к нарушению сигнализации инсулина/IGF-1 и нейротрофинов (neurotrophin) и вызывает дефекты в передаче сигналов и функционировании клеток. Авторы пришли к выводу, что снижение уровня холестерина в мозге, подобное тому, что наблюдается в мозге диабетика, может способствовать развитию осложнений диабета, связанных с ЦНС, включая повышенный риск развития нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера.

Следует напомнить, что постоянное истощение холестерина, вызванное микробными инфекциями, также может стать причиной неврологических проблем (часто наблюдаемых после ковида) и запустить процессы нейродегенерации. Показательным примером нейродегенерации, связанной с дефицитом холестерина, может быть болезнь Нимана–Пика [171, 172], при которой нарушена доставка холестерина к мембранам клеток. Этот дефект связан с инактивирующими мутациями

в трансмембранном белке-транспортере холестерина NPC1, который расположен на лизосомальной мембране и экспортирует холестерин, высвобождающийся из ЛПНП, в акцепторные компартменты (эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, плазматическая мембрана). В клетках, лишенных функционального NPC1, холестерин накапливается в лизосомах и не транспортируется в эти компартменты, что приводит к дефициту холестерина в мембранах клетки и нарушению всех холестерин-зависимых функций клеток.

В целом, можно сказать, что в здоровом мозге содержание холестерина поддерживается на относительно постоянном уровне при строгой регуляции его синтеза, транспорта и оборота, а нейродегенеративные заболевания возникают при нарушении баланса между этими процессами и отклонении от оптимума содержания холестерина в клеточных мембранах. Простое угнетение синтеза холестерина с помощью статинов не всегда приводит к желаемым результатам, но часто сопровождается нежелательными явлениями (миастения, миотоническая дистрофия, когнитивные нарушения и др.) [165], и для решения этих проблем необходимы дальнейшие исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, холестерин является одним из важнейших липидов, входящих в состав клеточных мембран и участвующих в жизненно важных клеточных процессах, включая модуляцию экспрессии генов, передачу сигналов, коммуникацию между клетками и многое другое. Содержание холестерина в мембранах строго контролируется и поддерживается на оптимальном уровне. Нарушения метаболизма, логистики и гомеостаза холестерина, при которых его содержание отклоняется от этого оптимума, могут вызвать дисфункцию холестерин-зависимых и рафт-зависимых белков и стать причиной различных патологических процессов, в том числе нейродегенеративных. Холестериновый компонент присутствует также во многих инфекционных заболеваниях, и при некоторых из них снижение уровня холестерина ниже оптимального физиологического уровня может быть губительным для клеток и являться значимым фактором патогенеза, ухудшающим прогноз. В этом кроется сложность, и ее необходимо учитывать, чтобы борьба за снижение уровня «плохого холестерина» не обернулась ухудшением состояния. Одним из механизмов взаимодействия белка с холестерином является холестерин-связывающие аминокислотные мотивы, которые обнаружены во многих холестерин-зависимых белках. Пептиды,

содержащие такие мотивы, могут оказаться полезными терапевтическими средствами, действующими на уровне интерфейса холестерин–белок. Развитие технологий, позволяющих исследовать механизмы белок-холестериновых взаимодействий и при необходимости проводить физиологическую коррекцию этих взаимодействий, будет способствовать разработке новых средств для лечения заболеваний, в патогенезе которых участвуют холестерин-зависимые процессы.

Источники финансирования: отсутствуют.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие конфликта интересов.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Maxfield F.R., van Meer G. 2010. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22** (4), 422–429. doi 10.1016/j.ceb.2010.05.004
- Song Y., Kenworthy A.K., Sanders C.R. 2014. Cholesterol as a co-solvent and a ligand for membrane proteins. *Protein Science.* **23**, 1–22. doi 10.1002/pro.2385
- Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* **387**, 569–572.
- Ali O., Szabó A. 2023. Review of eukaryote cellular membrane lipid composition, with special attention to the fatty acids. *Int. J. Mol. Sci.* **24** (21), 15693. doi 10.3390/ijms242115693
- van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W. 2008. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124.
- Huang Z., London E. 2016. Cholesterol lipids and cholesterol-containing lipid rafts in bacteria. *Chem. Phys. Lipids.* **199**, 11–16.
- Guzmán-Flores J.E., Steinemann-Hernández L., González de la Vara L.E., Gavilanes-Ruiz M., Romeo T., Alvarez A.F., Georgellis D. 2019. Proteomic analysis of *Escherichia coli* detergent-resistant membranes (DRM). *PLoS One*, **14**, e0223794.
- Rohmer M., Bouvier-Nave P., Ourisson G. 1984. Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes. *Microbiology.* **130**, 1137–1150.
- Sáenz J.P., Grosser D., Bradley A.S., Lagny T.J., Lavrynenko O., Broda M., Simons K. 2015. Hopanoids as functional analogues of cholesterol in bacterial membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**, 11971–11976.
- Bi Y., Guo P., Liu L., Chen L., Zhang W. 2023. Elucidation of sterol biosynthesis pathway and its co-regulation with fatty acid biosynthesis in the oleaginous marine protist *Schizochytrium* sp. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **11**, 1188461. doi 10.3389/fbioe.2023.1188461
- Planas-Riverola A., Gupta A., Betegón-Putze I., Bosch N., Ibañez M., Caño-Delgado A.I. 2019. Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. *Development.* **146** (5), dev151894. doi 10.1242/dev.151894
- Manghwar H., Hussain A., Ali Q., Liu F. 2022. Brassinosteroids (BRs) role in plant development and coping with different stresses. *Int. J. Mol. Sci.* **23** (3), 1012. doi 10.3390/ijms23031012
- Myers J.L., Porter M., Narwold N., Bhat K., Daulwalder B., Roman G. 2021. Mutants of the white ABCG transporter in *Drosophila melanogaster* have deficient olfactory learning and cholesterol homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (23), 12967. doi 10.3390/ijms222312967
- Dunina-Barkovskaya A. 2022. Cholesterol-dependent cellular processes and peptides containing cholesterol-binding motifs: Possible implications for medicine. *Med. Res. Arch.* **11** (1). <https://doi.org/10.18103/mra.v11i1.3532>
- Weber L.W., Boll M., Stampfl A. 2004. Maintaining cholesterol homeostasis: Sterol regulatory element-binding proteins. *World J. Gastroenterol.* **10** (21), 3081–3087. doi 10.3748/wjg.v10.i21.3081
- Martín M.G., Pfrieger F., Dotti C.G. 2014. Cholesterol in brain disease: Sometimes determinant and frequently implicated. *EMBO Rep.* **15** (10), 1036–1053. doi 10.15252/embr.201439225
- Martín-Segura A., Ahmed T., Casadomé-Perales Á., Palomares-Perez I., Palomer E., Kerstens A., Munck S., Balschun D., Dotti C.G. 2019. Age-associated cholesterol reduction triggers brain insulin resistance by facilitating ligand-independent receptor activation and pathway desensitization. *Aging Cell.* **18** (3), e12932. doi 10.1111/acer.12932
- Corradi V., Mendez-Villuendas E., Ingólfsson H.I., Gu R.-X., Siuda I., Melo M.N., Moussatova A., DeGagné L.J., Sejdiu B.I., Singh G., Wassenaar T.A., Delgado Magner K., Marrink S.J., Tieleman D.P. 2018. Lipid–protein interactions are unique fingerprints for membrane proteins. *ACS Cent. Sci.* **4** (6), 709–717. doi 10.1021/acscentsci.8b00143
- Grouleff J., Irudayam S.J., Skeby K.K., Schiøtt B. 2015. The influence of cholesterol on membrane protein structure, function, and dynamics studied by molecular dynamics simulations. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes.* **1848** (9), 1783–1795. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.029>
- Mukherjee S., Zha X., Tabas I., Maxfield F.R. 1998. Cholesterol distribution in living cells: Fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophys. J.* **75**, 1915–1925. doi 10.1016/S0006-3495(98)77632-5

21. Nyholm T.K. 2015. Lipid-protein interplay and lateral organization in biomembranes. *Chem. Phys. Lipids*. **189**, 48–55.
22. Nyholm T.K., Ozdirekcan S., Killian J.A. 2007. How protein transmembrane segments sense the lipid environment. *Biochemistry*. **46**, 1457–1465.
23. Coskun U., Simons K. 2011. Cell membranes: The lipid perspective. *Structure*. **19** (11), 1543–1548. doi 10.1016/j.str.2011.10.010
24. Sezgin E., Levental I., Mayor S., Eggeling C. 2017. The mystery of membrane organization: Composition, regulation, and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 361–374.
25. Steck T.L., Ali Tabei S.M., Lange Y. 2024. Estimating the cholesterol affinity of integral membrane proteins from experimental data. *Biochemistry*, **63** (1), 19–26. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.3c00567>.
26. Steck T.L., Lange Y. 2018. Transverse distribution of plasma membrane bilayer cholesterol: Picking sides. *Traffic*. **19** (10), 750–760. doi 10.1111/tra.12586
27. Maekawa M., Fairn G.D. 2015. Complementary probes reveal that phosphatidylserine is required for the proper transbilayer distribution of cholesterol. *J. Cell Sci.* **128** (7), 1422–1433.
28. Ridsdale A., Denis M., Gougeon P.Y., Ngsee J.K., Presley J.F., Zha X. 2006. Cholesterol is required for efficient endoplasmic reticulum-to-Golgi transport of secretory membrane proteins. *Mol. Biol. Cell*. **17** (4), 1593–1605. doi 10.1091/mbc.e05-02-0100
29. Muller M.P., Jiang T., Sun C., Lihan M., Pant S., Mahinthichaichan P., Trifan A., Tajkhorshid E. 2019. Characterization of lipid-protein interactions and lipid-mediated modulation of membrane protein function through molecular simulation. *Chem. Rev.* **19**, 6086–6161. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00608>
30. Enkavi G., Javanainen M., Kulig W., Róg T., Vattulainen I. 2019. Multiscale simulations of biological membranes: The challenge to understand biological phenomena in a living substance. *Chem Rev.* **119**, 5607–5774. doi 10.1021/acs.chemrev.8b00538refs
31. Bogdanov M., Dowhan W. 2021. Functional roles of lipids in biological membranes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Eds. Ridgway N.D., McLeod R.S. 7th Edition. Elsevier, p. 1–51. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824048-9.00020-1>
32. Pike L.J. 2003. Lipid rafts: Bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **44** (4), 655–667. doi 10.1194/jlr.R200021-JLR200
33. Helms J.B., Zurzolo C. 2004. Lipids as targeting signals: Lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic*. **5** (4), 247–254. doi 10.1111/j.1600-0854.2004.0181.x
34. Pralle A., Keller P., Florin E.L., Simons K., Hörber J.K. 2000. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* **148** (5), 997–1008. doi 10.1083/jcb.148.5.997
35. Schumann J., Leichtle A., Thiery J., Fuhrmann H. 2011. Fatty acid and peptide profiles in plasma membrane and membrane rafts of PUFA supplemented RAW264.7 macrophages. *PLoS One*. **6** (8), e24066. doi 10.1371/journal.pone.0024066
36. Stillwell W. 2006. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft function. *Scand. J. Food Nutr.* **50**, 107–113. doi 10.1080/17482970601066165
37. Brown M.S., Goldstein J.L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. **232**, 34–47.
38. Ikonen E., Zhou X. 2021. Cholesterol transport between cellular membranes: A balancing act between interconnected lipid fluxes. *Dev. Cell*. **56** (10), 1430–1436. doi 10.1016/j.devcel.2021.04.025
39. Ikonen E., 2018. Mechanisms of cellular cholesterol compartmentalization: Recent insights. *Curr. Opin. Cell Biol.* **53**, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.06.002>
40. Steck T.L., Tabei S.M.A., Lange Y. 2021. A basic model for cell cholesterol homeostasis. *Traffic*. **22** (12), 471–481. doi 10.1111/tra.12816
41. Mesmin B., Maxfield F.R. 2009. Intracellular sterol dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*. **1791** (7), 636–645. doi 10.1016/j.bbalip.2009.03.002
42. Albi E., Viola Magni M.P. 2004. The role of intranuclear lipids. *Biol Cell*. **96** (8), 657–667. doi 10.1016/j.biolcel.2004.05.004
43. Silva I.T.G., Fernandes V., Souza C., Treptow W., Santos G.M. 2017. Biophysical studies of cholesterol effects on chromatin[S]. *J. Lipid Res.* **58** (5), 934–940. <https://doi.org/10.1194/jlr.M074997>
44. Rossi G., Magni M.V., Albi E. 2007. Sphingomyelin-cholesterol and double stranded RNA relationship in the intranuclear complex. *Arch. Biochem. Biophys.* **459** (1), 27–32. doi 10.1016/j.abb.2006.11.020
45. Cascianelli G., Villani M., Tosti M., Marini F., Bartoccini E., Magni M.V., Albi E. 2008. Lipid microdomains in cell nucleus. *Mol. Biol. Cell*. **19** (12), 5289–5295. doi 10.1091/mbc.e08-05-0517
46. Martelli A.M., Falà F., Faenza I., Billi A.M., Cappelletti A., Manzoli L., Cocco L. 2004. Metabolism and signaling activities of nuclear lipids. *Cell Mol. Life Sci.* **61** (10), 1143–1156. doi 10.1007/s00018-004-3414-7
47. Brown M.S., Goldstein J.L. 1990. Atherosclerosis. Scavenging for receptors. *Nature*. **343** (6258), 508–509. doi 10.1038/343508a0
48. Smith J.R., Osborne T.F., Goldstein J.L., Brown M.S. 1990. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.* **265** (4), 2306–2610.
49. Hua X., Yokoyama C., Wu J., Briggs M.R., Brown M.S., Goldstein J.L., Wang X. 1993. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol

- regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 11603–11607.
50. Shimomura I., Bashmakov Y., Shimano H., Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S. 1997. Cholesterol feeding reduces nuclear forms of sterol regulatory element binding proteins in hamster liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94** (23), 12354–12359. doi 10.1073/pnas.94.23.12354
51. Goldstein J.L., Brown M.S. 2009. The LDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29** (4), 431–438. doi 10.1161/ATVBAHA.108.179564
52. Briggs M.R., Yokoyama C., Wang X., Brown M.S., Goldstein J.L. 1993. Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low-density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the low-density delineation of its target nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.* **268** (19), 14490–14496.
53. Vance J.E. 2022. Cellular itinerary of LDL cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **119** (6), e2122584119. doi 10.1073/pnas.2122584119
54. Trinh M.N., Brown M.S., Goldstein J.L., Han J., Vale G., McDonald J.G., Seemann J., Mendell J.T., Lu F. 2020. Last step in the path of LDL cholesterol from lysosome to plasma membrane to ER is governed by phosphatidylserine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117** (31), 18521–18529. doi 10.1073/pnas.2010682117
55. Ercan B., Naito T., Koh D.H.Z., Dharmawan D., Saheki Y. 2021. Molecular basis of accessible plasma membrane cholesterol recognition by the GRAM domain of GRAMD1b. *EMBO J.* **40** (6), e106524. doi 10.15252/embj.2020106524
56. Sandhu J., Li S., Fairall L., Pfisterer S.G., Gurnett J.E., Xiao X., Weston T.A., Vashi D., Ferrari A., Orozco J.L., Hartman C.L., Strugatsky D., Lee S.D., He C., Hong C., Jiang H., Bentolila L.A., Gatta A.T., Levine T.P., Ferng A., Lee R., Ford D.A., Young S.G., Ikonen E., Schwabe J.W.R., Tontonoz P. 2018. Aster proteins facilitate nonvesicular plasma membrane to ER cholesterol transport in mammalian cells. *Cell*. **175** (2), 514–529, e20. doi 10.1016/j.cell.2018.08.033
57. Prin W.A., Toulmay A., Balla T. 2020. The functional universe of membrane contact sites. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21** (1), 7–24. doi 10.1038/s41580-019-0180-9
58. Bohnert M. 2020. Tether me, tether me not---dynamic organelle contact sites in metabolic rewiring. *Dev. Cell*. **54** (2), 212–225. doi 10.1016/j.devcel.2020.06.026
59. Steck T.L., Lange Y. 2010. Cell cholesterol homeostasis: Mediation by active cholesterol. *Trends Cell Biol.* **20** (11), 680–687. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.08.007>
60. Das A., Brown M.S., Anderson D.D., Goldstein J.L., Radhakrishnan A. 2014. Three pools of plasma membrane cholesterol and their relation to cholesterol homeostasis. *Elife*. **3**, e02882. doi 10.7554/eLife.02882
61. Infante R.E., Radhakrishnan A. 2017. Continuous transport of a small fraction of plasma membrane cholesterol to endoplasmic reticulum regulates total cellular cholesterol. *Elife*. **6**, e25466. doi 10.7554/eLife.25466
62. Endapally S., Frias D., Grzemska M., Gay A., Tomchick D.R., Radhakrishnan A. 2019. Molecular discrimination between two conformations of sphingomyelin in plasma membranes. *Cell*. **176** (5), 1040–1053.e17. doi 10.1016/j.cell.2018.12.042
63. Makino A., Abe M., Ishitsuka R., Murate M., Kishimoto T., Sakai S., Hullin-Matsuda F., Shimada Y., Inaba T., Miyatake H., Tanaka H., Kurahashi A., Pack C.G., Kasai R.S., Kubo S., Schieber N.L., Dohmae N., Tochio N., Hagiwara K., Sasaki Y., Aida Y., Fujimori F., Kigawa T., Nishibori K., Parton R.G., Kusumi A., Sako Y., Anderluh G., Yamashita M., Kobayashi T., Greimel P., Kobayashi T. 2017. A novel sphingomyelin/cholesterol domain-specific probe reveals the dynamics of the membrane domains during virus release and in Niemann–Pick type C. *FASEB J.* **31** (4), 1301–1322. doi 10.1096/fj.201500075R
64. Howe V., Sharpe L.J., Alexopoulos S.J., Kunze S.V., Chua N.K., Li D., Brown A.J. 2016. Cholesterol homeostasis: How do cells sense sterol excess? *Chem. Phys. Lipids*. **199**, 170–178.
65. Hille B., Dickson E.J., Kruse M., Vivas O., Suh B.-Ch. 2015. Phosphoinositides regulate ion channels. *Biochim Biophys Acta – Mol. Cell Biol. Lipids*. **1851** (6), 844–856. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014>
66. Kelly R.A., O'Hara D.S., Mitch W.E., Smith T.W. 1986. Identification of NaK-ATPase inhibitors in human plasma as nonesterified fatty acids and lysophospholipids. *J. Biol. Chem.* **261** (25), 11704–11711.
67. Erion D.M., Shulman G.I. 2010. Diacylglycerol mediated insulin resistance. *Nat. Med.* **16** (4), 400–402. doi 10.1038/nm0410-400
68. Claret M., Garay R., Giraud F. 1978. The effect of membrane cholesterol on the sodium pump in red blood cells. *J. Physiol.* **274**, 247–263. doi 10.1113/jphysiol.1978.sp012145
69. Yoda S., Yoda A. 1987. Phosphorylated intermediates of Na,K-ATPase proteoliposomes controlled by bilayer cholesterol. Interaction with cardiac steroid. *J. Biol. Chem.* **262** (1), 103–109.
70. Hossain K.R., Clarke R.J. 2019. General and specific interactions of the phospholipid bilayer with P-type ATPases. *Biophys Rev.* **11** (3), 353–364. doi 10.1007/s12551-019-00533-2
71. Garcia A., Lev B., Hossain K.R., Gorman A., Diaz D., Pham T.H.N., Cornelius F., Allen T.W., Clarke R.J. 2019. Cholesterol depletion inhibits Na⁺,K⁺-ATPase activity in a near-native membrane environment. *J. Biol. Chem.* **294** (15), 5956–5969. doi 10.1074/jbc.RA118.006223
72. Levitan I., Fang Y., Rosenhouse-Dantsker A., Romanenko V. 2010. Cholesterol and ion channels. *Subcell. Biochem.* **51**, 509–549. doi 10.1007/978-90-481-8622-8_19

73. Thompson M.J., Baenziger J.E. 2020. Ion channels as lipid sensors: From structures to mechanisms. *Nat. Chem. Biol.* **16** (12), 1331–1342. doi 10.1038/s41589-020-00693-3
74. Bukiya A.N., Durdagi S., Noskov S., Rosenhouse-Dantsker A. 2017. Cholesterol up-regulates neuronal G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channel activity in the hippocampus. *J. Biol. Chem.* **292** (15), 6135–6147. doi 10.1074/jbc.M116.753350
75. Poveda J.A., Giudici A.M., Renart M.L., Molina M.L., Montoya E., Fernández-Carvajal A., Fernández-Ballester G., Encinar J.A., González-Ros J.M. 2014. Lipid modulation of ion channels through specific binding sites. *Biochim. Biophys. Acta.* **1838** (6), 1560–1567. doi 10.1016/j.bbamem.2013.10.023
76. Zwijssen R.M., Oudenhoven I.M., de Haan L.H. 1992. Effects of cholesterol and oxysterols on gap junctional communication between human smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* **28** (2–3), 115–120. doi 10.1016/0926-6917(92)90020-d
77. Verrecchia F., Sarrouilhe D., Hervé J.C. 2001. Nongenomic steroid action: Inhibiting effects on cell-to-cell communication between rat ventricular myocytes. *Exp. Clin. Cardiol.* **6** (3), 124–131.
78. Dunina-Barkovskaya A.Y. 2005. Are gap junctions lipid–protein rafts? *Biologicheskie Membrany* (Rus.). **22** (1), 27–33.
79. Cibelli A., Scemes E., Spray D.C. 2022. Activity and stability of Panx1 channels in astrocytes and neuroblastoma cells are enhanced by cholesterol depletion. *Cells.* **11**, 3219. <https://doi.org/10.3390/cells11203219>
80. Coddou C., Yan Z., Obsil T., Huidobro-Toro J.P., Stojilkovic S.S. 2011. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol. Rev.* **63** (3), 641–683. doi 10.1124/pr.110.003129.5
81. Murrell-Lagnado R.D. 2017. Regulation of P2X purinergic receptor signaling by cholesterol. *Curr. Top. Membr.* **80**, 211–232. doi 10.1016/bs.ctm.2017.05.004
82. Bennett P.J., Simmonds M.A. 1996. The influence of membrane cholesterol on the GABAA receptor. *Br. J. Pharmacol.* **117** (1), 87–92. doi 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15158.x
83. Hénin J., Salari R., Murlidaran S., Brannigan G. 2014. A predicted binding site for cholesterol on the GABAA receptor. *Biophys. J.* **106** (9), 1938–1949. doi 10.1016/j.bpj.2014.03.024
84. Cherezov V., Rosenbaum D.M., Hanson M.A., Rasmussen S.G., Thian F.S., Kobilka T.S., Choi H.J., Kuhn P., Weis W.I., Kobilka B.K., Stevens R.C. 2007. High resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science.* **318** (5854), 1258–1265. doi 10.1126/science.1150577
85. Kiriakidi S., Kolocouris A., Liapakis G., Ikram S., Durdagi S., Mavromoustakos T. 2019. Effects of cholesterol on GPCR function: Insights from computational and experimental studies. In: *Direct mechanisms in cholesterol modulation of protein function, advances in experimental medicine and biology*. Eds. Rosenhouse-Dantsker A., Bukiya A.N. Springer Nature Switzerland AG, p. 1135. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14265-0_5
86. Genheden G., Essex J.W., Lee A.G. 2017. G protein coupled receptor interactions with cholesterol deep in the membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **1859**, 268–281.
87. Saxena R., Chattopadhyay A. 2012. Membrane cholesterol stabilizes the human serotonin(1A) receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* **1818** (12), 2936–2942. doi 10.1016/j.bbamem.2012.07.032
88. Sarkar P., Mozumder S., Bej A., Mukherjee S., Sengupta J., Chattopadhyay A. 2020. Structure, dynamics and lipid interactions of serotonin receptors: Excitements and challenges. *Biophys. Rev.* **13** (1), 101–122. doi 10.1007/s12551-020-00772-8
89. Santiago J., Guzmán G.R., Rojas L.V., Martí R., Asmar-Rovira G.A., Santana L.F., McNamee M., Lalsalde-Dominicci J.A. 2001. Probing the effects of membrane cholesterol in the *Torpedo californica* acetylcholine receptor and the novel lipid-exposed mutation alpha C418W in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **276**, 46523–46532. doi 10.1074/jbc.M104563200
90. Vallés A.S., Barrantes F.J. 2021. Dysregulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor cholesterol crosstalk in autism spectrum disorder. *Front. Mol. Neurosci.* **14**, 744597. doi 10.3389/fnmol.2021.744597
91. Borroni V., Baier C.J., Lang T., Bonini I., White M.M., Garbus I., Barrantes F.J. 2007. Cholesterol depletion activates rapid internalization of submicron-sized acetylcholine receptor domains at the cell membrane. *Mol. Membr. Biol.* **24** (1), 1–15. doi 10.1080/09687860600903387
92. Antonini A., Caioli S., Saba L., Vindigni G., Biocca S., Canu N., Zona C. 2018. Membrane cholesterol depletion in cortical neurons highlights altered NMDA receptor functionality in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* **1864** (2), 509–519. doi 10.1016/j.bbadis.2017.11.008
93. Yao L., Wells M., Wu X., Xu Y., Zhang L., Xiong W. 2020. Membrane cholesterol dependence of cannabinoid modulation of glycine receptor. *FASEB J.* **34** (8), 10920–10930. doi 10.1096/fj.201903093R
94. Kwiatkowska K., Frey J., Sobota A. 2003. Phosphorylation of FcγRIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: The role of membrane rafts. *J. Cell Sci.* **116**, 989–998.
95. Febbraio M., Hajjar D.P., Silverstein R.L. 2001. CD36: A class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* **108**, 785–791. doi 10.1172/JCI200114006
96. Han J., Hajjar D.P., Tauras J.M., Nicholson A.C. 1999. Cellular cholesterol regulates expression of the

- macrophage type B scavenger receptor, CD36. *J. Lipid Res.* **40**, 830–838.
97. McGilvray I.D., Serghides L., Kapus A., Rotstein O.D., Kain K.C. 2000. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: A role for CD36 in malarial clearance. *Blood*. **96**, 3231–3240.
 98. Grouleff J., Irudayam S.J., Skeby K.K., Schiøtt B. 2015. The influence of cholesterol on membrane protein structure, function, and dynamics studied by molecular dynamics simulations. *Biochim. Biophys. Acta — Biomembranes*. **1848** (9), 1783–1795. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.03.029>
 99. Oh H., Mohler E.R. III, Tian A., Baumgart T., Diamond S.L. 2009. Membrane cholesterol is a biomechanical regulator of neutrophil adhesion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1290–1297.
 100. Sitrin R.G., Sassanella T.M., Landers J.J., Petty H.R. 2010. Migrating human neutrophils exhibit dynamic spatiotemporal variation in membrane lipid organization. *Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **43**, 498–506.
 101. Lajoie P., Nabi I.R. 2007. Regulation of raft dependent endocytosis. *J. Cell Mol. Med.* **11** (4), 644–653.
 102. Cho Y.Y., Kwon O.H., Chung S. 2020. Preferred endocytosis of amyloid precursor protein from cholesterol-enriched lipid raft microdomains. *Molecules*. **25** (23), 5490. doi 10.3390/molecules25235490
 103. Thiele C., Hannah M.J., Fahrenholz F., Huttner W.B. 2000. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell Biol.* **2**, 42–49. doi 10.1038/71366
 104. Bryan A.M., Farnoud A.M., Mor V., Del Poeta M. 2014. Macrophage cholesterol depletion and its effect on the phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *J. Vis. Exp.* **94**, 52432. doi 10.3791/52432
 105. Baranova I.N., Kurlander R., Bocharov A.V., Vishnyakova T.G., Chen Z., Remaley A.T., Csako G., Patterson A.P., Eggerman T.L. 2008. Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling. *J. Immunol.* **181**, 7147–7156.
 106. Дунина-Барковская А.Я., Вишнякова Х.С., Баратова Л.А., Радюхин В.А. 2019. Модуляция холестерина-зависимой активности макрофагов IC-21 пептидом, содержащим два CRAC-мотива из белка M1 вируса гриппа. *Биол. мембраны*. **36** (4), 271–280.
 107. Дунина-Барковская А.Я., Вишнякова Х.С. 2020. Модуляция холестерина-зависимой активности макрофагов IC-21 CRAC-содержащими пептидами с заменами мотивообразующих аминокислот. *Биол. мембраны*. **37** (5), 381–395.
 108. Maltan L., Andova A.M., Derler I. 2022. The role of lipids in CRAC channel function. *Biomolecules*. **12** (3), 352. doi 10.3390/biom12030352
 109. Derler I., Jardin I., Stathopoulos P.B., Muik M., Fahrner M., Zayats V., Pandey S.K., Poteser M., Lackner B., Absolonova M., Schindl R., Groschner K., Ettrich R., Ikura M., Romanin C. 2016. Cholesterol modulates Orai1 channel function. *Sci. Signal.* **9**, ra10. doi 10.1126/scisignal.aad7808
 110. Bohórquez-Hernández A., Gratton E., Pacheco J., Asanov A., Vaca L. 2017. Cholesterol modulates the cellular localization of Orai1 channels and its disposition among membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta*. **1862**, 1481–1490. doi 10.1016/j.bbalip.2017.09.005
 111. Kovarova M., Wassif C., Odom S., Liao K., Porter F.D., Rivera J. 2006. Cholesterol deficiency in a mouse model of Smith–Lemli–Opitz syndrome reveals increased mast cell responsiveness. *J. Exp. Med.* **203**, 1161–1171. doi 10.1084/jem.20051701
 112. Pacheco J., Dominguez L., Hernandez A.B., Asanov A., Vaca L. 2016. A cholesterol-binding domain in STIM1 modulates STIM1–Orai1 physical and functional interactions. *Sci. Rep.* **6**, 29634. doi 10.1038/srep29634
 113. Li H., Papadopoulos V. 1998. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology*. **139**, 4991–4997. doi 10.1016/s0039-128x(96)00154-7
 114. Jamin N., Neumann J.M., Ostuni M.A., Vu T.K., Yao Z.X., Murail S., Robert J.C., Giatzakis C., Papadopoulos V., Lacapère J.J. 2005. Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol. Endocrinol.* **19** (3), 588–594. doi 10.1210/me.2004-0308
 115. Fantini J., Barrantes F.J. 2013. How cholesterol interacts with membrane proteins: An exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Front. Physiol.* **4**, 31. doi 10.3389/fphys.2013.00031
 116. Listowski M.A., Leluk J., Kraszewski S., Sikorski A.F. 2015. Cholesterol interaction with the MAGUK protein family member, MPP1, via CRAC and CRAC like motifs: An in silico docking analysis. *PLoS One*. **10** (7), e0133141. doi 10.1371/journal.Pone.0133141
 117. Fantini J., Epand R.M., Barrantes F.J. 2019. Cholesterol recognition motifs in membrane proteins. In: *Direct mechanisms in cholesterol modulation of protein function*. Eds. Rosenhouse-Dantsker A., Bukiya A. Series Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer. **1135**, 3–25. doi 10.1007/978-3-030-14265-0_1
 118. Rajagopalan L., Greeson J.N., Xia A., Liu H., Sturm A., Raphael R.M., Davidson A.L., Oghalai J.S., Pereira F.A., Brownell W.E. 2007. Tuning of the outer hair cell motor by membrane cholesterol. *J. Biol. Chem.* **282** (50), 36659–36670. doi 10.1074/jbc.M705078200
 119. Purcell E.K., Liu L., Thomas P.V., Duncan R.K. 2011. Cholesterol influences voltage-gated calcium channels

- and BK-type potassium channels in auditory hair cells. *PLoS One*. **6** (10), e26289. doi 10.1371/journal.pone.0026289
120. Zidovetzki R., Levitan I. 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta*. **1768**, 1311–1324. doi 10.1016/j.bbamem.2007.03.026
 121. Kurkov S.V., Loftsson T. 2013. Cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **453** (1), 167–180. doi 10.1016/j.ijpharm.2012.06.055
 122. Singh A.K., McMillan J., Bukiya A.N., Burton B., Parrill A.L., Dopico A.M. 2012. Multiple cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) motifs in cytosolic C tail of Slo1 subunit determine cholesterol sensitivity of Ca^{2+} - and voltage-gated K^+ (BK) channels. *J. Biol. Chem.* **287** (24), 20509–20521. doi 10.1074/jbc.M112.356261
 123. Albert A.D., Boesze-Battaglia K. 2005. The role of cholesterol in rod outer segment membranes. *Prog. Lipid Res.* **44** (2–3), 99–124. doi 10.1016/j.plipres.2005.02.001
 124. Boesze-Battaglia K., Fliesler S.J., Albert A.D. 1990. Relationship of cholesterol content to spatial distribution and age of disc membranes in retinal rod outer segments. *J. Biol. Chem.* **265**, 18867–18870.
 125. Andrews L.D., Cohen A.I. 1979. Freeze-fracture evidence for the presence of cholesterol in particle-free patches of basal disks and the plasma membrane of retinal rod outer segments of mice and frogs. *J. Cell Biol.* **81**, 215–228.
 126. Niu S.L., Mitchell D.C., Litman B.J. 2002. Manipulation of cholesterol levels in rod disk membranes by methyl-beta-cyclodextrin: Effects on receptor activation. *J. Biol. Chem.* **277**, 20139–20145. doi 10.1074/jbc.M200594200
 127. Park P.S. 2021. Supramolecular organization of rhodopsin in rod photoreceptor cell membranes. *Pflügers Arch.* **473** (9), 1361–1376. doi 10.1007/s00424-021-02522-5
 128. Albert A.D., Boesze-Battaglia K., Paw Z., Watts A., Epand R.M. 1996. Effect of cholesterol on rhodopsin stability in disk membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1297** (1), 77–82. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(96\)00102-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(96)00102-1)
 129. Островский М.А. 2024. Проект “Родопсин”. *Биол. мембраны*. **41** (3).
 130. Dunina-Barkovskaya A. 2023. Influenza virus and cholesterol: Touch points and potential consequences for the host cell. *Med. Res. Arch.* **11** (9). <https://doi.org/10.18103/mra.v11i9.4399>
 131. Dunina-Barkovskaya A. 2021. Cholesterol recognition motifs (CRAC) in the S protein of coronavirus: A possible target for antiviral therapy? In: *Management of Dyslipidemia*. Ed. Aronow W.S. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95977>
 132. Nayak D.P., Hui E.K.-W., Barman S. 2004. Assembly and budding of influenza virus. *Virus. Res.* **106**, 147–165. doi 10.1016/j.virusres.2004.08.012
 133. Chazal N., Gerlier D. 2003. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67** (2), 226–237. doi 10.1128/mmbr.67.2.226-237.2003
 134. Jones J.E., Le Sage V., Lakdawala S.S. 2020. Viral and host heterogeneity and their effects on the viral life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 1–11. doi 10.1038/s41579-020-00449-9
 135. Navaratnarajah C.K., Warriar R., Kuhn R.J. 2008. Assembly of viruses: Enveloped particles. *Encyclopedia of Virology*, 193–200. doi 10.1016/B978-012374410-4.00667-1
 136. Zhang J., Pekosz A., Lamb R.A. 2000. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: A role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J. Virol.* **74**, 4634–4644. doi 10.1128/jvi.74.10.4634-4644.2000
 137. Rawat S.S., Viard M., Gallo S.A., Rein A., Blumenthal R., Puri A. 2003. Modulation of entry of enveloped viruses by cholesterol and sphingolipids (Review). *Mol. Membr. Biol.* **20** (3), 243–254. doi 10.1080/0968768031000104944
 138. Nayak D.P., Hui E.K. 2004. The role of lipid microdomains in virus biology. *Subcell. Biochem.* **37**, 443–491. doi 10.1007/978-1-4757-5806-1_14
 139. Frensing T., Kupke S.Y., Bachmann M., Fritzsche S., Gallo-Ramirez L.E., Reichl U. 2016. Influenza virus intracellular replication dynamics, release kinetics, and particle morphology during propagation in MDCK cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100** (16), 7181–7192. doi 10.1007/s00253-016-7542-4
 140. Radenkovic D., Chawla S., Pirro M., Sahebkar A., Banach M. 2020. Cholesterol in relation to COVID-19: Should we care about it? *J. Clin. Med.* **9**, 1909. doi 10.3390/jcm9061909
 141. Hu X., Chen D., Wu L., He G., Ye W. 2020. Declined serum high density lipoprotein cholesterol is associated with the severity of COVID-19 infection. *Clin. Chim. Acta*. **510**, 105–110. doi 10.1016/j.cca.2020.07.015
 142. Hanson J.M., Gettel D.L., Tabaei S.R., Jackman J., Kim M.C., Sasaki D.Y., Groves J.T., Liedberg B., Cho N.-J., Parikh A.N. 2016. Cholesterol-enriched domain formation induced by viral encoded, membrane-active amphipathic peptide. *Biophys. J.* **110**, 176–187. doi 10.1016/j.bpj.2015.11.032
 143. Cheng G., Montero A., Gastaminza P., Whitten-Bauer C., Wieland S.F., Isogawa M., Fredericksen B., Selvarajah S., Gallay P.A., Ghadiri M.R., Chisari F.V. 2008. A virocidal amphipathic α -helical peptide that inhibits hepatitis C virus infection in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 3088–3093. doi 10.1073/pnas.0712380105
 144. Hildebrandt E., Mcgee D.J. 2009. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide modification, Lewis antigen expression, and gastric colonization are

- cholesterol-dependent. *BMC Microbiol.* **9**, 258. doi 10.1186/1471-2180-9-258
145. Morey P., Pfannkuch L., Pang E., Boccellato F., Sigal M., Imai-Matsushima A., Dyer V., Koch M., Mollenkopf H.J., Schlaermann P., Meyer T.F. 2018. *Helicobacter pylori* depletes cholesterol in gastric glands to prevent interferon gamma signaling and escape the inflammatory response. *Gastroenterology*. **154**, 1391–1404. doi 10.1053/j.gastro.2017.12.008
146. Baj J., Forma A., Sitarz M., Portincasa P., Garruti G., Krasowska D., Maciejewski R. 2020. *Helicobacter pylori* virulence factors mechanisms of bacterial pathogenicity in the gastric microenvironment. *Cells*. **10** (1), 27. doi 10.3390/cells10010027
147. Rella A., Farnoud A.M., Del Poeta M. 2016. Plasma membrane lipids and their role in fungal virulence. *Prog Lipid Res.* **61**, 63–72. doi 10.1016/j.plipres.2015.11.003
148. Joffrion T.M., Cushion M.T. 2010. Sterol biosynthesis and sterol uptake in the fungal pathogen *Pneumocystis carinii*. *FEMS Microbiol Lett.* **311** (1), 1–9. doi 10.1111/j.1574-6968.2010.02007.x
149. Griffin J.E., Pandey A.K., Gilmore S.A., Mizrahi V., McKinney J.D., Bertozzi C.R., Sasseti C.M. 2012. Cholesterol catabolism by *Mycobacterium tuberculosis* requires transcriptional and metabolic adaptations. *Chem. Biol.* **19** (2), 218–227. doi 10.1016/j.chembiol.2011.12.016
150. Bonds A.C., Sampson N.S. 2018. More than cholesterol catabolism: Regulatory vulnerabilities in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **44**, 39–46. doi 10.1016/j.cbpa.2018.05.012
151. Ouellet H., Johnston J.B., de Montellano P.R. 2011. Cholesterol catabolism as a therapeutic target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* **19** (11), 530–539. doi 10.1016/j.tim.2011.07.009
152. Maguire P.A., Sherman I.W. 1990. Phospholipid composition, cholesterol content and cholesterol exchange in *Plasmodium falciparum*-infected red cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**, 105–112. doi 10.1016/0166-6851(90)90210-d
153. Ahiya A.I., Bhatnagar S., Morrissey J.M., Beck J.R., Vaidya A.B. 2022. Dramatic consequences of reducing erythrocyte membrane cholesterol on *Plasmodium falciparum*. *Microbiol Spectr.* **10** (1), e0015822. doi 10.1128/spectrum.00158-22
154. Maier A.G., van Ooij C. 2022. The role of cholesterol in invasion and growth of malaria parasites. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 984049. doi 10.3389/fcimb.2022.984049
155. Samuel B.U., Mohandas N., Harrison T., McManus H., Rosse W., Reid M., Haldar K. 2001. The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *J. Biol. Chem.* **276**, 29319–29329. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101268200>
156. Glinsky G.V. 2020. Tripartite combination of candidate pandemic mitigation agents: Vitamin D, quercetin, and estradiol manifest properties of medicinal agents for targeted mitigation of the COVID-19 pandemic defined by genomics guided tracing of SARS-CoV-2 targets in human cells. *Biomedicines*. **8** (5), 129. doi 10.3390/biomedicines8050129
157. Cinatl J., Morgenstern B., Bauer G., Chandra P., Rabenau H., Doerr H.W. 2003. Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. *Lancet*. **361**, 2045–2046. doi 10.1016/s0140-6736(03)13615-x
158. Gao Y., Ye S., Tang Y., Tong W., Sun S. 2023. Brain cholesterol homeostasis and its association with neurodegenerative diseases. *Neurochem Int.* **171**, 105635. doi 10.1016/j.neuint.2023.105635
159. Auld D.S., Kornecook T.J., Bastianetto S., Quirion R. 2002. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: Relations to beta amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog. Neurobiol.* **68**, 209–245.
160. Schliebs R., Arendt T. 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm. (Vienna Austria)*. **113**, 1625–1644. doi 10.1007/s00702-006-0579-2
161. Valencia A., Reeves P.B., Sapp E., Li X., Alexander J., Kegel K.B., Chase K., Aronin N., DiFiglia M. 2010. Mutant huntingtin and glycogen synthase kinase 3-beta accumulate in neuronal lipid rafts of a presymptomatic knock-in mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci. Res.* **88**, 179–190.
162. Jin U., Park S.J., Park S.M. 2019. Cholesterol metabolism in the brain and its association with Parkinson's disease. *Exp. Neurobiol.* **28** (5), 554–567. doi 10.5607/en.2019.28.5.554
163. Hartmann H., Ho W.Y., Chang J.C., Ling S.C. 2022. Cholesterol dyshomeostasis in amyotrophic lateral sclerosis: Cause, consequence, or epiphenomenon? *FEBS J.* **289** (24), 7688–7709. doi 10.1111/febs.16175
164. Fukui K., Ferris H.A., Kahn C.R. 2015. Effect of cholesterol reduction on receptor signaling in neurons. *J. Biol. Chem.* **290** (44), 26383–26392. doi 10.1074/jbc.M115.664367
165. Andronie-Cioară F.L., Jurcău A., Jurcău M.C., Nistor-Cseppentő D.C., Simion A. 2022. Cholesterol management in neurology: Time for revised strategies? *J. Pers. Med.* **12**, 1981. <https://doi.org/10.3390/jpm12121981>
166. Shobab L.A., Hsiung G.Y.R., Feldman H.H. 2005. Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **4** (12), 841–852. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70248-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70248-9)
167. Ji S.R., Wu Y., Sui S.F. 2002. Cholesterol is an important factor affecting the membrane insertion of beta-amyloid peptide (Aβ1–40), which may potentially inhibit the fibril formation. *J. Biol. Chem.* **277** (8), 6273–6279. doi 10.1074/jbc.M104146200

168. Vallés A.S., Barrantes F.J. 2021. Dysregulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor cholesterol crosstalk in autism spectrum disorder. *Front. Mol. Neurosci.* **14**, 744597. doi 10.3389/fnmol.2021.744597
169. Borroni V., Baier C.J., Lang T., Bonini I., White M.M., Garbus I., Barrantes F.J. 2007. Cholesterol depletion activates rapid internalization of submicron-sized acetylcholine receptor domains at the cell membrane. *Mol. Membr. Biol.* **24** (1), 1–15. doi 10.1080/09687860600903387
170. Valencia A., Reeves P.B., Sapp E., Li X., Alexander J., Kegel K.B., Chase K., Aronin N., DiFiglia M. 2010. Mutant huntingtin and glycogen synthase kinase 3- β accumulate in neuronal lipid rafts of a presymptomatic knock-in mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci. Res.* **88**, 179–190.
171. Vanier M.T. 2010. Niemann–Pick disease type C. *Orphanet J. Rare Dis.* **5**, 16. doi 10.1186/1750-1172-5-16
172. Matsuo M., Togawa M., Hirabaru K., Mochinaga S., Narita A., Adachi M., Egashira M., Irie T., Ohno K. 2013. Effects of cyclodextrin in two patients with Niemann–Pick Type C disease. *Mol. Genet. Metab.* **108** (1), 76–81. doi 10.1016/j.ymgme.2012.11.005

Cell Membrane Cholesterol and Regulation of Cellular Processes: New and the Same Old Thing

© 2024 г. А. У. Дунина-Барковская^{1, *}

¹Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: dunina.aya@gmail.com

Membranes of living cells, or biological membranes, are unique molecular systems in which the functioning of all molecules is interdependent and coordinated, and disruption of this coordination can be fatal for the cell. One example of such coordination and mutual regulation is the functioning of membrane proteins, whose activity depends on their interaction with membrane lipids. This review summarizes the facts about the importance of the cholesterol component of cell membranes for the normal functioning of membrane proteins and the whole cell. This lipid component provides fine regulation of a variety of cellular functions and provides clues to understanding changes in the activity of a number of proteins under various physiologic and pathologic conditions. This review provides examples of cholesterol-dependent membrane proteins and cellular processes and discusses their role in several pathologies. Understanding the mechanisms of cholesterol-protein interactions represents a significant resource for the development of drugs that affect the cholesterol-protein interface.

Keywords: cholesterol, cell membrane, cholesterol-dependent proteins, cholesterol recognizing/interaction amino-acid consensus (CRAC), cholesterol-binding motifs

ЛИПИД-ОПОСРЕДОВАННАЯ АДАПТАЦИЯ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ В КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАНАХ

© 2024 г. А. А. Полянский^a, Р. Г. Ефремов^{a, b, c, *}

^aИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

^bНациональный исследовательский университет Высшая школа экономики, Москва, 101000 Россия

^cМосковский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный, 141701 Россия

*e-mail: r-efremov@yandex.ru

Поступила в редакцию 6.06.2024

После доработки 30.06.2024

Принята к публикации 02.07.2024

Представлены результаты исследований в компьютерном эксперименте молекулярных механизмов адаптации модельных клеточных мембран, реализующейся в ходе их взаимодействия с белками и пептидами. Речь идет об изменении структурно-динамических параметров водно-липидной среды, гидрофобной/гидрофильной организации поверхности липидного бислоя (так называемой «мозаичности») и пр. Взятые в совокупности, эти эффекты получили название «мембранного ответа» (МО) — важнейшей способности клеточных мембран специфично и устойчиво реагировать на встраивание и функционирование в них внешних агентов, в первую очередь — белков и пептидов. Описаны полученные в ходе многолетних исследований результаты авторов в области молекулярного моделирования процессов МО с различными пространственно-временными характеристиками — от эффектов связывания с белками отдельных молекул липидов до изменения интегральных макроскопических параметров мембран. Основная часть результатов получена с использованием разработанной авторами технологии «динамического молекулярного портрета». Обсуждаются биологическая роль наблюдаемых явлений и возможные пути рационального проектирования искусственных мембранных систем с заданными характеристиками МО. Это, в свою очередь, важно для направленного изменения профиля активности белков и пептидов, действующих на биомембраны, в том числе в качестве перспективных фармакологических агентов.

Ключевые слова: мембранные белки, молекулярно-биофизическая платформа, компьютерное моделирование, молекулярная динамика, «мембранный ответ», белок-липидные взаимодействия.

Сокращения: АМП — антимикробный пептид; гНК — гидрофобный нанокластер; ДМП — динамический молекулярный портрет; ДМФХ — димиристоилфосфатидилхолин; ДПФХ — дипальмитоилфосфатидилхолин; ДОФГ — диолеилфосфатидилглицерин; ДОФС — диолеилфосфатидилсерин; ДОФЭ — диолеилфосфатидилэтаноламин; ДЭФХ — диэйкозеноилфосфохолин; МАП — мембраноактивный пептид; МБ — мембранный белок; МГП — молекулярный гидрофобный потенциал; МД — молекулярная динамика; МО — мембранный ответ; НК — нанокластер; ПОФХ — пальмитоилолеилфосфатидилхолин; ПОФЭ — пальмитоилолеилфосфатидилэтаноламин; ТМ — трансмембранный; ТМД — трансмембранный домен; ФГ — фосфатидилглицерин; ФЭ — фосфатидилэтаноламин; D_{phob} — толщина гидрофобного слоя мембраны; Н-связь — водородная связь; EGFR — рецептор эпидермального фактора роста (Epidermal growth factor receptor); GpA — гликофорин-A (Glycophorin A); PDGFRb — рецептор тромбоцитарного фактора роста b (Platelet-derived growth factor receptor b).

DOI: 10.31857/S0233475524050093, EDN: cbfpad

1. ВВЕДЕНИЕ

В юбилейном выпуске журнала «Биологические мембраны», посвященном 40-летию его основания, а также 90-летней годовщине со дня рождения

учредителя издания академика Юрия Анатольевича Овчинникова, мы хотим затронуть одну из интереснейших и важнейших (на наш взгляд) тем биофизики клеточных мембран. Речь идет о молекулярных механизмах так называемого «мембранного

ответа» (МО), а именно о способности биомембран очень эффективно реагировать на разнообразные «внешние вызовы», такие как меняющиеся условия среды, встраивание сторонних молекул — белков, пептидов, низкомолекулярных соединений и т.д. Термином «эффективно» в данном случае мы обозначаем следующие характеристики: 1) скорость осуществления крупномасштабных (с линейными размерами > 1 нм) конформационных перестроек водно-липидных надмолекулярных систем — вплоть до времен $\sim$ нс; 2) устойчивость указанных процессов к помехам и флуктуациям (т.е. к ошибкам входных сигналов), неизменно присущих живым системам, и одновременно — высокую селективность реакции, достигаемую за счет способности тонкой регуляции структурно-динамических свойств мембранных систем; 3) стабильность — исключительную воспроизводимость МО в работе системы, наблюдаемую на протяжении всего жизненного цикла клетки.

Указанная выше способность мембран приспосабливаться (адаптироваться) к условиям клеточного окружения была ясна с самого начала изучения структуры и работы мембран на молекулярном уровне, хотя имевшаяся на тот момент необходимая информация была крайне ограниченной. В частности, мембранам уже изначально приписывали свойства эластичности, способности к деформации, текучести, способность к локальным (кривизна и пр.) и глобальным (слияние) перестройкам и т.д. При этом, в отсутствие экспериментальных и расчетных данных с атомарным разрешением, подобные характеристики стремились учитывать на уровне интегральных макроскопических свойств мембран, например, в континуальных моделях. Таким образом, не было возможности принять во внимание сложную мозаичную природу мембран, характеризующуюся наличием в них динамических гетерогенностей различного пространственно-временного масштаба — от 1 нм до 10^3 нм и от 0.1 нс до миллисекунд.

На этом этапе исследований наиболее важной задачей являлось получение сведений о мембранных белках (МБ) — основных фармакологически ценных мишенях действия лекарств: рецепторах, ионных каналах, ферментах и др. Кроме того, акцент делали и на анализе свойств мембраноактивных пептидов (МАП) и белков, в частности, антимикробных пептидов (АМП), пептидов-переносчиков, пептидов слияния, ряда полипептидных токсинов (например, кардиотоксинов) и др. Понимание молекулярных механизмов действия указанных агентов на мембраны живой клетки дает возможность создания новых лекарств, в основе действия которых лежит изменение как

характеристик липидной фазы, так и взаимодействующих с ней белков/пептидов. Данный подход имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием низкомолекулярных лекарственных соединений. При этом мембранное окружение часто рассматривали лишь как инертную матрицу, обладающую центральным гидрофобным слоем и более полярными интерфейсами на границе с водой. Кроме того, как правило, считали, что мембрана в основном нужна для корректной адаптации трансмембранных (ТМ) доменов (ТМД) белков, либо их примембранных участков, обеспечивая сохранение их нативной структуры, задавая правильную мембранную топологию белка и давая ему возможность необходимым образом взаимодействовать с партнерами в клетке — другими белками, лигандами и пр.

Однако по мере стремительного накопления знаний о МБ, включая экспериментальные структурные данные высокого разрешения, стало ясно, что, помимо указанных выше трудностей и ограничений экспериментальных методов, понимание важнейших деталей структурной организации и, следовательно, механизмов работы МБ невозможно без детальной расшифровки вклада самой мембранной среды, которая очень чутко реагирует на присутствие МБ, МАП и других внешних агентов, меняя как свои собственные физико-химические свойства, так и характеристики взаимодействующих с ней молекулярных систем. В этом и заключается липид-опосредованная адаптация белков и пептидов в клеточных мембранах. В этой связи в рамках настоящего мини-обзора будут рассмотрены следующие темы: «море липидов» или «мозаичная» мембрана; факторы неоднородности липидного бислоя и возможности их изучения; ключевые модальности регуляции функции белков и пептидов, опосредованные мембраной; рациональный дизайн мембранных систем и терапевтических агентов. Поскольку МО — это пример самоорганизации белок-липидных систем, то характеристики взаимодействующих партнеров — водно-липидной среды и белка/пептида — будут рассматриваться в совокупности, причем на различных масштабах — как интегральные эффекты, локальные (микроскопические) характеристики, одиночные молекулы липидов. Представленный материал не претендует на роль классического обзора, поскольку авторы не ставили своей задачей во всех необходимых в таких случаях деталях изложить состояние проблемы и дать исчерпывающую информацию из литературных источников. Скорее, это очерк, в котором изложено понимание авторами базовых принципов эффектов МО и его роли в функционировании клетки

на основании полученного опыта исследований указанных явлений.

2. «МОРЕ ЛИПИДОВ» ИЛИ «МОЗАИЧНАЯ» МЕМБРАНА

Кроме роли гидрофобного барьера, отделяющего содержимое клеток и/или клеточных оргanelл от внешней среды, липидный бислой биологических мембран активно участвует во многих биохимических процессах в живых организмах. До 80% массы клеточных мембран составляют белки, углеводы, стероиды и другие нелипидные компоненты, которые определяют специфичность и широкий спектр биологической активности мембран: молекулярный и ионный транспорт, клеточную сигнализацию и коммуникацию, деление и слияние мембран и т.д. [1]. Важно отметить, что для бесперебойной работы клетки требуется надежное функционирование в течение жизненного цикла клетки таких сложных супрамолекулярных ансамблей, какими являются биомембраны, — они должны быстро и адекватно отвечать на внешние/внутренние сигналы и патологические угрозы [2, 3]. Тонкие молекулярные детали этого удивительного по своей отлаженности и устойчивости к флуктуациям механизма работы клеточных мембран еще далеки от понимания, хотя уже ясно, что мембранные липиды представляют собой очень важный элемент «головоломки». В отличие от ранних представлений мембран в виде некой инертной среды с полярными поверхностями и гидрофобным ядром, в котором различные белки и другие молекулы могут осуществлять свои функции, многокомпонентные липидные бислои клеточных мембран представляют собой динамичную, четко организованную, высокоактивную и тонко настраиваемую среду [4].

Согласно современным представлениям, сформировавшимся на основании большого набора экспериментальных и расчетных данных, указанные аспекты функционирования клеточных мембран во многом обусловлены неоднородностью характеристик их липидного «остова», проявляющейся на различных пространственно-временных масштабах. Это фундаментальное свойство биомембран, которое требует тщательного изучения.

Установлено, что гетерогенные свойства липидных мембран определяются физической и химической природой составляющих их молекул, в первую очередь — амфифильных липидов, а также их многообразием — помимо белков, природные мембраны содержат сотни типов липидов и других соединений. Даже сравнительно небольшие отличия в полярных головках и/или ацильных

цепях молекул липидов приводят к неидеальному смешиванию липидов в бислоях за счет различий в картине межмолекулярных взаимодействий, реализующихся в системе [5, 6].

Под термином «гетерогенная природа клеточных мембран» часто понимают их «слоистую» структуру — чередующиеся вдоль направления нормали к плоскости липидного бислоя параллельные слои с сильно отличающимися физико-химическими свойствами (рис. 1а). Именно такая организация биомембран создает надежный барьер, защищающий содержимое клетки от внешней среды, обеспечивает правильное встраивание, сворачивание и работу многочисленных МБ, МАП и других молекул. Однако не менее важна и картина латерального распределения свойств липидных бислоев. Установлено, что они также неоднородны по ряду ключевых параметров: плотности компонентов мембраны (липидов, воды, малых молекул, ионов и др.), распределению гидрофобных и электрических свойств и т.д. Наиболее значимыми среди этих областей (слоев) являются границы раздела мембрана—вода. Особенности организации этих поверхностей критически важны для распознавания клеточных мембран и моделирующих их миметиков внешними агентами — белками, пептидами и их комплексами, включая вирусы и др.

Отметим, что паттерны латеральных неоднородностей меняются во времени, в том числе и в состояниях равновесия или квазиравновесия (насколько о них вообще можно говорить в живой клетке). При этом пространственно-временные масштабы неоднородностей (доменов, кластеров) варьируют в широком диапазоне — от 1 нм до 10^3 нм и от 0.1 нс до миллисекунд (см. ниже). Каковы свойства границы раздела мембрана—вода, которые проявляют неоднородность их латерального распределения? Наиболее важными являются: (1) структурные характеристики, выраженные в терминах плотности молекул и отдельных атомов, а также описывающие рельеф молекулярной поверхности липидного бислоя; (2) распределение гидрофобных/гидрофильных и/или электрических свойств на поверхности мембраны; (3) динамические параметры компонентов мембраны, обусловленные их конформационными изменениями и латеральной диффузией в различных пространственных масштабах — от интегральных макроскопических средних величин до траекторий отдельных молекул и входящих в них групп.

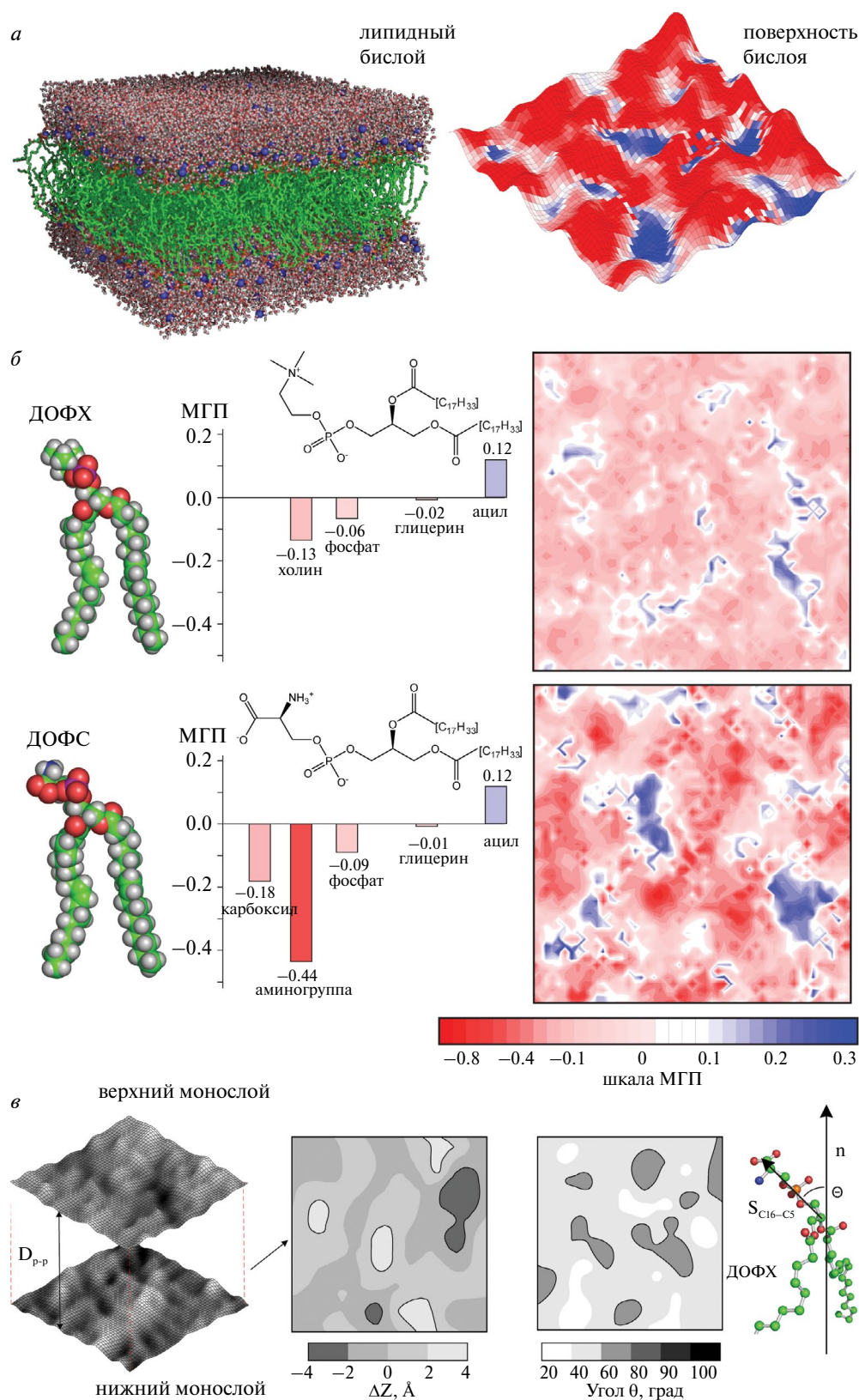


Рис. 1. Неоднородная организация липидного бислоя. *а* – Полноатомная структура липидного бислоя и поверхность бислоя, окрашенная по МГП (см. далее). *б* – Двумерные карты поверхности бислоев ДОФХ и ДОФС, окрашенные в соответствии со значениями МГП (красным и синим цветом показаны гидрофильные и гидрофобные участки поверхности). Полноатомные модели структур бислоев получены в расчетах МД. Подробнее см. [24]. *в* – Картирование ландшафта бислоя и угла наклона полярных головок по отношению к нормали к плоскости бислоя.

3. ФАКТОРЫ НЕОДНОРОДНОСТИ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИЗУЧЕНИЯ

Структурно-динамические параметры липидных молекул в области связывания периферических МАП с мембраной, а также в окрестности ТМД отличаются от невозмущенного бислоя. В данной работе отклонение от такого невозмущенного состояния определено как феномен МО. В частности, вследствие МО наблюдается изменение параметров липидного бислоя, которое приводит к возникновению различного характера неоднородностей как вдоль нормали к мембране, так и латеральных. Природа различных неоднородностей в липидной мембране, а также возможности их изучения в компьютерном эксперименте рассмотрены в данном разделе.

3.1. Липидный состав

Клеточные мембраны отличаются многообразием компонентов липидной фракции, при этом для каждого типа мембраны характерен определенный липидный состав, связанный с ее функцией. Например, многокомпонентные мембраны эукариотических клеток имеют в своем составе холестерин, что отличает их от мембран бактерий. В плазматической мембране клеток млекопитающих содержание холестерина достигает 30–40%, что превышает значения для других компонентов [7]. Такая высокая концентрация холестерина в мембране приводит к возможности формирования особой жидко-упорядоченной фазы в липидном бислое и возникновению липидных доменов — от нанокластеров (НК) до липидных «рафтов» [8]. Структурно-динамические свойства жидко-упорядоченной фазы (например, толщина гидрофобного слоя — D_{phob} , сравнимая с таковой для гелевой фазы, и высокая скорость диффузии как в жидко-неупорядоченной фазе) определяют предпочтительную локализацию различных МБ и формирование функционально обособленных «рафтовых» областей клеточной мембраны. Такие МБ могут иметь повышенное сродство к холестерину вследствие наличия специфических сайтов на поверхности [9]. Таким образом, локальная концентрация и изменение этого параметра в результате МО будут влиять на функцию и локализацию МБ.

В свою очередь, отличительной особенностью бактериальных мембран является повышенное содержание фосфатидилглицерина (ФГ). Например, во внутренней мембране *Escherichia coli* доля этого анионного липида достигает 20% [10]. Для многокомпонентных липидных бислоев наблюдается тенденция к кластеризации однотипных

липидов (см. далее). Таким образом, анионные кластеры ФГ являются отличительной особенностью бактериальных мембран, что определяет механизм селективного действия катионных АМП и, в частности, их предпочтительное связывание с ФГ кластерами и соответствующий этому МО, который заключается в изменении локальной концентрации ФГ и характера его распределения в мембране (см. далее).

3.2. Нанокластеры в липидных мембранах

Подробный анализ динамических неоднородностей на поверхности липидной мембраны можно эффективно осуществлять в рамках концепции так называемой «мозаичности» границы раздела мембрана–вода. Авторы называют подобный подход построением «динамического молекулярного портрета» (ДМП) поверхности мембраны, параметры которого уникальны для липидного бислоя заданного состава, находящегося в конкретных условиях (степень гидратации, фазовое состояние, наличие ионов и «внешних агентов», включая белки, пептиды и другие молекулы, взаимодействующие с клеточной мембраной). Учитывая специфику организации мембран, обе их поверхности могут быть достаточно точно аппроксимированы плоскостью (по крайней мере, в молекулярных масштабах). В результате соответствующие ДМП можно наглядно представить в виде двумерных (2D) карт распределения поверхностных свойств, которые эволюционируют с течением времени. В отличие от трехмерных (3D) объектов, ДМП в виде 2D-распределений лучше поддаются количественному анализу — их можно детально обработать с помощью численных методов: вычислить их средние характеристики и соответствующие стандартные отклонения; методами цифровой фильтрации выявить значимые паттерны и снизить уровень шума, наглядно графически представить; ДМП-карты различных состояний одной и той же системы или разных систем можно сравнивать между собой и т.д. (подробнее см. ниже, Раздел 5). Отметим, что аналогичные технологии работы с ДМП используют также и для анализа неплоских биологических молекулярных объектов, в частности глобулярных белков и/или их отдельных структурных элементов, например альфа-спиралей и т.д. [11]. В таких случаях ДМП создают путем проецирования свойств молекулярной поверхности на поверхность сферы [12] или цилиндра [13], соответственно.

Поскольку клеточные мембраны насыщены белками и другими молекулами [14], изучение эффектов латеральной гетерогенности сильно

затруднено из-за небольших площадей «свободного» липидного бислоя. Поэтому такой анализ, как правило, проводят на модельных системах, имитирующих клеточные мембраны, — гидратированных бислоях, состоящих из одного или нескольких типов липидов. Важной характеристикой ДМП биомембран является диапазон доступных для анализа их пространственно-временных характеристик. Наиболее изученными являются долгоживущие домены (кластеры) относительно больших размеров, превышающих 100 нм, — так называемые липидные «плоты» («рафты») и микродомены. В то же время более мелкие неоднородности — так называемые «нанодомены», или НК, гораздо менее изучены ввиду технических ограничений современных экспериментальных методов. НК имеют характерный размер < 10 нм, что соответствует группе лишь из несколькими плотно упакованных липидных молекул. Более того, время жизни НК часто не превышает нескольких наносекунд. Поэтому такие системы все еще находятся за пределами разрешения даже самых современных инструментальных средств, позволяющих напрямую регистрировать их в экспериментах. обстоятельные современные обзоры [15–18] дают полноценную картину текущего состояния исследований в предметной области.

Так как при рассмотрении НК речь идет о быстро меняющихся распределениях, может возникнуть ощущение, что из-за усреднения по большому числу состояний (например, полученных в результате расчетов молекулярной динамики (МД) или измеренных в эксперименте) связанные с этими нанообъектами явления существенно не влияют на макроскопические свойства липидного бислоя. Но это не так! В частности, роль микроскопических неоднородностей в мембранах обусловлена тем обстоятельством, что самоорганизация и функционирование наиболее важных классов мембранных белков — ионных каналов, рецепторов, ферментов и т.д. — могут критическим образом зависеть от свойств так называемых «кольцевых» (annular) липидов, образующих один-два ближайших молекулярных слоя (см., например, [16, 19, 20]). При этом характеристики последних могут сильно отличаться от параметров невозмущенного липидного бислоя. Еще один пример: известно, что локальные (~ 10 нм) дефекты кривизны поверхности мембраны могут служить сигналом к связыванию в этих областях ряда МАП [21], влияют на процессы слияния мембран [22] и др. Следовательно, необходимо понять атомистические детали механизмов формирования и эволюции ДМП клеточных мембран. Указанный подход основан на детальном анализе структурно-динамических параметров НК: их

идентификации, характеристике и определении соответствующих физических механизмов формирования/диссипации. Ряд важнейших аспектов данной проблемы обсуждается во всесторонних обзорах последних лет [15–18, 23].

3.3. Мозаичная гидрофобная поверхность бислоя

Нетривиальной (на первый взгляд) особенностью описанной выше «мозаичности» границы раздела мембрана–вода является наличие на ней динамических неполярных областей наноразмерного масштаба (рис. 1а). При этом указанная поверхность находится в контакте с водой, т.е. с полярной средой. Важно отметить, что такая картина характерна не только для каких-то одиночных конфигураций липидного бислоя, получаемых в ходе исследования фазового пространства методами МД, Монте-Карло и др. Она стабильно воспроизводится для всех изученных *in silico* модельных мембран, независимо от их липидного состава и параметров. Конечно, пространственно-временные характеристики таких гидрофобных «пятен» зависят от выбора конкретного бислоя и условий среды (температура, давление, степень гидратации и т.д.), но общий вывод об их присутствии на доступной воде поверхности мембраны остается неизменным. В дальнейшем мы будем их называть гидрофобными нанокластерами (гНК). Возникает вопрос, насколько реалистичным является подобное состояние системы?

Сразу заметим, что первые же сообщения о наблюдении наноразмерных гидрофобных «пятен» на поверхности гидратированных липидных бислоев [24] нашли живой отклик у экспериментаторов, которые независимо пришли к выводу о наличии в модельных мембранах подобных «гидрофобных дефектов», в частности, на основе данных спектроскопии ЯМР [25]. Дальнейшие экспериментальные и теоретические исследования полностью подтвердили реалистичность этой картины (см. [26, 27] и ссылки в обзоре [28]). Детальный вычислительный анализ большого набора модельных гидратированных мембран методами МД и картирования полярных свойств их поверхностей (см. [28]) позволил сделать следующие выводы:

- 1) гНК, как правило, имеют размеры, характерные для одной/нескольких молекул липидов, т.е. ~ 1 –10 нм, а времена их жизни составляют до ~ 1 нс.
- 2) Суммарная доля площади поверхности мембраны, относящейся к гНК, варьирует примерно от 20 до 50% в зависимости от системы.
- 3) гНК формируются в разреженных (с относительно низкой плотностью) областях интерфейса,

т.е. между группами плотно упакованных липидов (НК) — на этих участках ацильные цепи липидов могут приближаться к поверхности бислоя («всплывать»). В результате их неполярные группы создают в своей окрестности (в том числе на поверхности) зоны с высокими значениями молекулярного гидрофобного потенциала (МГП), т.е. гидрофобные участки.

4) В отличие от областей плотно упакованных липидов (НК), гНК в основном соответствуют «впадинам» на ландшафте границы раздела (рис. 1а, 1б).

5) Степень сольватации гНК значительно ниже по сравнению с НК — молекулам воды энергетически менее выгодно взаимодействовать с экспонированными на поверхности алифатическими группами ацильных цепей липидов, поскольку нет возможности эффективного формирования с ними Н-связей.

Таким образом, мозаичность поверхности любого гидратированного липидного бислоя обусловлена комбинацией реализующихся на границе раздела фаз в данный момент времени динамических наноразмерных объектов — НК (группы плотно упакованных и сильно сольватированных липидов с большим числом водородных связей (Н-связей) различного типа), гНК (разреженные и слабо сольватированные области, в которых неполярные цепи липидов располагаются близко к поверхности), а также остальными липидами, не входящими в состав НК и гНК (рис. 1б). Как было сказано выше, для описания этих явлений удобно использовать концепцию ДМП. Важно заметить, что именно такая природа интерфейса необходима для осуществления мембранами их функции в клетке. Дело в том, что небольшие по размеру и быстро меняющие свои свойства элементы «мозаики» способны эффективно реагировать на появление/присутствие внешних агентов — МБ, МАП и пр., также обладающих ДМП с часто сопоставимыми параметрами. Это обуславливает взаимную адаптацию белок—мембрана, жизненно необходимую для нормальной работы клетки. В случае же однородного по свойствам полярного (за счет контакта с водой) интерфейса подобные процессы МО были бы крайне затруднены, учитывая амфифильную природу белков и пептидов, которые призваны функционировать в мембранах клетки. Обладая высокой степенью инертности, мембрана просто не успевала бы реагировать на присутствие сторонних молекул. Можно предположить, что именно поэтому мембраны, не обладающие мозаичной поверхностью, не встречаются в живых системах.

3.4. Геометрия бислоя и упаковка липидных молекул

Ключевыми параметрами бислоя, изменяющимися в ходе МО, являются: площадь поверхности мембраны, приходящаяся на молекулу липида (A_L); толщина липидного бислоя (D_{pp}); величина и характеристики областей свободного объема в бислое; распределение молекул воды и ионов в мембране; параметр порядка ацильных цепей липидов (S_D); коэффициент диффузии (как правило, латеральной) липидов в бислое. Первые четыре величины описывают геометрические свойства мембраны, а две оставшиеся — ее динамическое поведение. Численные оценки этих параметров не представляют проблем — в современных пакетах программ молекулярного моделирования их рассчитывают с помощью стандартных утилит.

Как правило, оценивают макроскопические средние значения рассматриваемых параметров, полученных в результате анализа рассчитанных методами МД и/или Монте-Карло ансамблей состояний модельных липидных бислоев. Ценность этих данных заключается в возможности их прямого сопоставления с результатами экспериментов. Это позволяет оценить корректность применяемых при моделировании мембран параметров силового поля и вычислительных протоколов. Учитывая большое число приближений, допускаемых в методах молекулярного моделирования, основанных на использовании классических силовых полей, подобная проверка путем сравнения с прямыми экспериментальными данными является крайне важной. Часто анализ результатов моделирования мембран начинают именно с такой калибровки, например, проводя расчеты молекулярной динамики/Монте-Карло ряда модельных липидных бислоев с известными из эксперимента макроскопическими структурно-динамическими параметрами, а уже затем исследуют более тонкие эффекты, связанные с усложнением состава мембраны, добавлением молекул пептидов и белков и пр.

В отличие от данных, получаемых в большинстве экспериментальных подходов, методы компьютерного моделирования мембран позволяют количественно оценивать не только их интегральные средние параметры (см. выше), но и фокусироваться на таковых для отдельных подмножеств системы. Например, рассчитывая величины A_L , D_{pp} , S_D для молекул липидов, непосредственно взаимодействующих/не взаимодействующих с белком, формирующих кластеры в бислое и находящихся вне их, для липидов разного типа и т.д. В этом, безусловно, заключается преимущество методов *in silico*, конечно, при условии упомянутой выше

постоянной тщательной калибровки точности вычислительных подходов по экспериментальным данным.

Помимо стандартного подхода к расчету геометрических параметров липидных бислоев — макроскопических средних значений, вычисляемых для ансамбля равновесных конфигураций системы, — ценную информацию предоставляет расчет 3D-карт «ландшафта» поверхности мембраны, полученных с атомистическим разрешением (рис. 16). На этих картах локальные параметры толщины бислоя формируют рельеф поверхности, а плотность упаковки липидов можно изобразить цветом, контурными изолиниями и т.д.

Представленные выше характеристики мембран обусловлены реализацией большого числа внутри- и межмолекулярных взаимодействий в системе, описываемых в настоящем подходе в рамках концепции классического эмпирического силового поля. В первом случае речь идет об изменении конформации молекул липидов и белка (в отдельных случаях — воды), во втором — о всех возможных контактах компонентов системы (липиды, вода, белок/пептид, ионы и пр.) Рассчитываемые эффекты изменения внутримолекулярных взаимодействий выражаются в картине конформационной динамики липидов, которую характеризует конфигурация ацильных цепей, полярных головок и молекул липидов в целом. В первом случае анализируют следующие параметры: заселенности *cis/trans*-состояний; ориентация цепи по отношению к нормали к плоскости мембраны (ось Z), отражающая степень упорядоченности «хвостов» (в терминах S_D); эффекты взаимного проникновения цепей монослоев (*interdigitation*) и др. Для полярных головок липидов, как правило, рассчитывают их ориентацию в пространстве, например, в терминах угла наклона вектора дипольного момента головки относительно оси Z, пространственного расположения (глубина вдоль Z, ориентация доноров/акцепторов Н-связей и т.д.) и т.д. Переходы между указанными конформационными состояниями можно охарактеризовать в терминах изменения свободной энергии и, следовательно, оценить энтальпийный вклад подобных эффектов в ходе МО. Соответствующие расчеты можно выполнить и для молекул мембранных белков и пептидов, что даст достаточно полную картину с точки зрения энергии внутримолекулярных взаимодействий.

Важнейшую роль в структурно-динамической организации липидного бислоя играют межмолекулярные взаимодействия: электростатические и ван-дер-ваальсовы. К первым относятся и Н-связи, вносящие существенный вклад в энергию

системы благодаря многочисленным донорам/акцепторам Н-связей и большому выигрышу в энергии, достигаемому при их формировании (~3–5 ккал/моль на связь). При рассмотрении эффектов МО проводят анализ всех типов Н-связей между молекулами липидов, белка, воды, включая связи типа «мостиков», т.е. между тремя и более, последовательно расположенными молекулами. Например, с участием воды. При этом необходимо учитывать, что свободная энергия формирования Н-связи сильно зависит от степени полярности локального окружения, т.е. от значения диэлектрической проницаемости среды (ϵ) [29, 30]. В неполярном окружении она значительно ниже, т.е. наиболее сильные связи наблюдаются на уровне карбонильных и фосфатных групп липидов. Это можно использовать, например, в рациональном проектировании мембран с направленно измененными свойствами — путем добавления в бислой искусственных липидов/липидомиметиков с определенным образом расположенными донорными/акцепторными группами (см. Раздел 5). Характерный для каждого конкретного бислоя динамический паттерн Н-связей является одним из основных параметров его уникального ДМП, определяя паттерны мозаичности поверхности мембраны, свойства НК, гНК и т.д. Установлена четкая корреляция между плотностью Н-связей и картиной латеральной гетерогенности бислоя: в липидных кластерах значительно больше Н-связей по сравнению с более разреженными областями (например, [28]).

В ходе МО, при встраивании белков/пептидов необходимо учитывать распределение и параметры Н-связей белок-липиды (плотность, время жизни, участвующие группы и т.д.), а также сопоставлять эту картину с таковой в невозмущенном бислое. Подобная информация требуется для выявления ключевых взаимодействий, ответственных за реализацию МО в заданных условиях. Помимо Н-связей, такой вид анализа проводят и для других типов электростатических взаимодействий — контактов заряженных групп, а также для невалентных ван-дер-ваальсовых взаимодействий и координационных связей с ионами. В рамках концепции ДМП результаты подобного анализа можно наглядно представить в виде 3D-изображений и/или 2D-карт с нанесенными значениями соответствующих характеристик — числа контактов, плотности конкретного типа взаимодействий и т.д. Это существенно усиливает информационную составляющую ДМП, отображающих свойства гидрофобности, рельефа, подвижности и пр. Главное, это позволяет связать характеристики ДМП с распределением энергии взаимодействий в системе

и, следовательно, помогает понять физические механизмы МО.

4. КЛЮЧЕВЫЕ МОДАЛЬНОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ, ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕМБРАНОЙ

МО представляет пример самоорганизации белок-липидных систем, при которой обе составляющие претерпевают изменения вследствие взаимной адаптации. Понимание физико-химических основ такой адаптации в ходе МО является необходимым для расшифровки детальных механизмов действия МАП, а также принципов упаковки и модуляции работы ТМД и функции МБ в целом. В данном разделе будет рассмотрено взаимное влияние разных факторов структурно-динамической организации липидного бислоя, а также МАП и ТМД на характер наблюдаемого МО в контексте биологической функции этих мембранных агентов.

4.1. Липидный состав

Особенности липидного состава мембран разного типа клеток могут служить фактором селективности для ряда АМП. Так, катионные АМП обладают повышенным сродством к липидным бислоям с высоким содержанием анионных липидов и, в частности, мембранам бактериальных клеток, богатых ФГ (см. выше). Для изучения механизмов дестабилизации мембран, вызванной АМП, уникальную возможность предоставляет

атомистическое моделирование таких агентов в смешанных липидных бислоях, например, микросекундная МД с использованием «крупнозернистых» моделей (например, MARTINI [31]) бислоев диолеилфосфатидилэтаноламин (ДОФЭ) / диолеил-ФГ (ДОФГ) в соотношении 70/30% [32]. На этой модели было показано, что катионный АМП Ltc1 из яда паука *Lachesana tarabaevi* в ходе связывания индуцирует кластеризацию ФГ в мембране (рис. 2а) при соотношении пептид:липид 1:20, близком к критическому значению, при котором наблюдается дестабилизация ФЭ/ФГ-бислоев в эксперименте. В частности, результаты 4-мкс МД для систем разных размеров (самая большая из них содержала 96 АМП и 2048 липидов) показывают, что связывание АМП модулирует динамику модельного ФЭ/ФГ-бислоя и индуцирует дальний порядок в структуре доменов ФГ. Таким образом результатом МО является стабильное разделение между двумя типами липидов, при котором не наблюдается структурных дефектов, таких как поры. Сходные механизмы действия по типу «кластера зарядов» были также описаны для небольших природных пептидов и синтетических пептидомиметиков [33]. В приведенном примере применение МД в крупнозернистом представлении помогает понять начальные стадии дестабилизации цитоплазматической бактериальной мембраны. Так, кластеризация ФГ, индуцированная АМП (рис. 2а), может приводить к снижению стабильности мембраны, при которой растущие дефекты на границе фаз могут быть ответственны

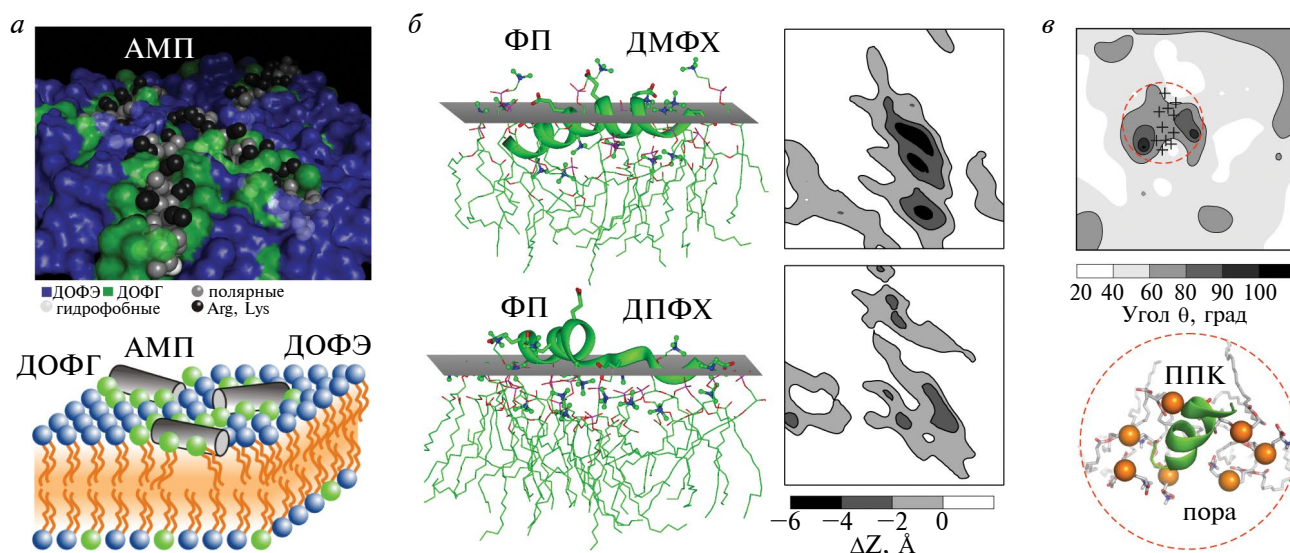


Рис. 2. Примеры МО в процессе взаимодействия МАП с модельными бислоями в ходе расчетов МД. а – Кластеризация анионных ФГ липидов (показано зеленым цветом) в «крупнозернистой» мембране ФЭ/ФГ при связывании АМП Ltc1. б – Модуляция ландшафта полноатомных бислоев ДМФХ и ДПФХ при взаимодействии с ними пептида слияния (ФП) из гемагглютинина вируса гриппа. в – Нарушение упаковки полярных головок ФС при связывании с пептидом-переносчиком (ППК) пенетратина.

за увеличение проницаемости бислоя. Интересно, что вызванная пептидами реорганизация липидов в бислоях может влиять и на функцию других компонентов мембраны, таких как мембранные белки, и приводить к нарушению метаболических процессов внутри клетки [34].

4.2. Текучесть и мозаичность поверхности

Селективное действие МАП может быть основано на их способности эффективно связываться с бислоями, обладающими определенной латеральной организацией и, в частности, динамическими характеристиками. Так, результаты сравнительного МД-анализа полноатомного моделирования ФП из вируса гриппа (Е5) в бислоях димиристоил-фосфатидхолин (ДМФХ) и дипальмитоил-ФХ (ДПФХ) показывают, что в обоих случаях присутствие мембраны существенно стабилизирует α -спиральную конформацию пептида в N-концевой области (2–11), тогда как С-концевой фрагмент оказывается менее структурированным. Пептид формирует стабильные комплексы с липидными бислоями, заякореваясь гидрофобными остатками в мембране. Гидрофильные остатки в основном экспонированы в водную фазу. Связывание и встраивание пептида приводит к дестабилизации липидных бислоев, однако МО имеет локальный характер — только для соседних липидов (10–15 молекул) наблюдаются существенные изменения структурно-динамических свойств. При этом ряд важных аспектов взаимодействия пептида с мембраной зависит от ее состава. Пептид глубже встраивается в более «рыхлый» бислой ДМФХ, чем в относительно плотный ДПФХ. Это также отражается в более заметном изменении локальной толщины мембраны, ширины контактной интерфейсной области и нарушении упаковки ацильных цепей липидов (рис. 2б). В процессе встраивания пептида бислой ДПФХ сохраняет свою целостность, за исключением заглубления нескольких липидов в область ацильных цепей. В то же время в мембране ДМФХ некоторые липидные молекулы в области связывания пептида оказываются вытесненными из плоскости бислоя в водную фазу, образуя при этом выгодные контакты с остатками глутаминовой кислоты ФП. Динамическое состояние мембраны (моделируемое в данном случае использованием липидов с разной длиной ацильных хвостов) может серьезно влиять на геометрию встраивания пептида. Так, угол наклона N-концевой α -спирали в бислой ДМФХ составляет $\sim 20^\circ$ в отличие от ее практически параллельной ориентации в мембране ДПФХ. В первом случае результаты МД воспроизводят экспериментально установленную моду связывания

фузионных пептидов [35], вторая мода связывания характерна для их неактивных аналогов [36, 37].

Для понимания детальных механизмов МО при связывании МАП необходимо исследование латеральных неоднородностей в липидном бислое. Например, использование алгоритмов картирования подвижности и ориентации полярных головок липидов (угол θ) в случае пептида-переносчика пенетратина в модельных бислоях диолеил-ФХ (ДОФХ) и диолеил-фосфатидилсерин (ДОФС) наглядно иллюстрируют принципы дестабилизации мембраны. В частности, 2D-карты для углов θ позволяют выявить локализацию дефектов в упаковке липидных головок относительно положения пептида (рис. 2в). Независимо от моды связывания, в бислой ДОФХ влияние пенетратина на геометрию липидных головок слабо выражено. Наиболее сильный эффект наблюдается в бислой ДОФС. Видно, что «в тени» пептида находится область, в которой полярные головки ориентируются практически параллельно бислою. Эта область сформирована наиболее выгодно взаимодействующими с пенетратинем молекулами ФС, в том числе участвующими в долгоживущих комплексах с остатками пептида. Структура наблюдаемого дефекта выглядит таким образом, что, меняя ориентацию головок, пептид в области контакта формирует разреженный участок интерфейса монослоя с доступной растворителю областью липидных хвостов (рис. 2г). Важно отметить, что липиды, образующие описанную структуру, обладают пониженной подвижностью — т.е. способность эффективно связывать заряженные липиды ФС позволяет пенетратину формировать «замороженные дефекты» на поверхности модельной мембраны. Наблюдаемый МО может быть связан с механизмом прямого переноса пептида через мембрану. Так, связывание пептидов на поверхности мембраны будет приводить к увеличению числа описанных дефектов, поэтому вновь связавшиеся пептиды получают возможность глубоко встраиваться внутрь мембраны. Это приводит к существенному изменению локальных электрических свойств мембраны, что при наличии отрицательного трансмембранного потенциала позволяет отдельным молекулам пенетратина преодолевать гидрофобную фазу бислоя. Основным условием возможности трансмембранного переноса по такому механизму является концентрационная зависимость, т.е. существование определенного порогового значения, при достижении которого возможно проникновение пептидов в клетку или модельную везикулу. Такой эффект описан в ряде работ [38, 39].

При этом методы картирования мозаичной мембраны показывают, что гидрофобная/гидрофильная организация бислоя может адаптироваться к динамическим свойствам взаимодействующего МАП в ходе МО. Например, в случае ФП гидрофобные/гидрофильные паттерны на поверхностях пептида и бислоя демонстрируют взаимное соответствие (комплементарность) в равновесном мембраносвязанном состоянии [40]. Аналогичная тенденция наблюдалась и при взаимодействии пенетратина с бислоями ДОФХ и ДОФС (см. выше) [41]. Детальный анализ поверхности мембраны выявил сложный «мозаичный» характер ее гидрофобных/гидрофильных свойств и образование временных гидрофобных кластеров [24]. Такая организация влияет на начальный этап взаимодействия пептида с мембраной. Соответствие гидрофобных свойств в области взаимодействия преимущественно наблюдается в случае анионных бислоев ДОФС, что способствует глубокому проникновению пептида в бислой такого состава.

4.3. Толщина гидрофобного слоя (D_{phob}) и фаза липидной мембраны

Для ТМД, которые встроены в бислой, его макроскопические параметры — такие как фаза и/или D_{phob} — являются ключевыми факторами, определяющими их структурную организацию и предпочтительную локализацию в клеточной мембране. Так, в исследованиях динамического поведения димеров спиральных ТМД в липидных бислоях с помощью МД и спектроскопии ЯМР выявили непосредственное влияние липидного окружения на соответствующую ему конфигурацию спиралей в димере [42–44]. В частности, соотношение между D_{phob} бислоя и длиной спирального ТМД может определять топологию димера и его наклон в мембране (рис. 3а), как в случае димера ТМД рецептора PDGFRb, чье динамическое поведение в бислоях ДМФХ, ПОФХ, ДЭФХ было исследовано с помощью метода полноатомной МД и твердотельной ЯМР-спектроскопии [42]. В данном случае длина и насыщенность липидных хвостов определяет D_{phob} бислоя, а также его динамические характеристики. В ходе МО угол наклона димера ТМД по отношению к нормали к плоскости мембраны увеличивается, и он становится менее устойчивым с уменьшением толщины модельной мембраны. Это указывает на то, что формирование такого димера ТМД и последующая активация рецептора в клетке могут быть связаны с локализацией в нанодоменах в жидко-упорядоченной фазе, для которых характерна большая величина D_{phob} (см. выше). В зависимости от параметров

бислоя, энергетически выгодными могут быть разные конфигурации димеров спиральных ТМД (например, с малым или большим значением угла скрещивания между спиральями), поэтому смена липидного окружения может менять конфигурацию такого димера [45] и, например, приводить к соответствующей активации рецептора [44], которая возможна только в определенном мембранном окружении [46–49]. ТМД, таким образом, является своеобразным сенсором свойств липидной среды, и в то же время липидное окружение выступает триггером разных состояний рецептора в процессе функционирования. Детальное понимание физического механизма МО, в результате которого бислой определяет конфигурацию димера ТМД, требует изучения специфического возмущения мембраны, вызванного присутствием ТМД [43, 44, 50]. Например, ТМД может вызывать упорядочивание («замораживание») липидного окружения (рис. 3б), что отражается в невыгодном энергетическом вкладе мембраны в энергию данной конфигурации. Напротив, в случае соответствия между конфигурацией димера ТМД и параметрами бислоя наблюдается обратный эффект [43].

4.4. Неоднородности упаковки и энтропийные эффекты

Другие аспекты МО в присутствии ТМД связаны с возмущением липидного окружения внутри бислоя (гомогенности упаковки гидрофобных цепей), вносимым экспонированной поверхностью ТМД в разных олигомерных состояниях. Например, заметное уменьшение степени гетерогенности упаковки липидов (число неоднородностей) в процессе димеризации за счет изменения свойств экспонированной поверхности ТМ спиралей связано с увеличением конфигурационной энтропии липидов и выгодным вкладом мембраны в свободную энергию ассоциации [50]. Так, результаты полноатомных МД расчетов показывают, что в случае одиночных ТМД МО связан с нарушением липидной упаковки, и, как следствие, наблюдается неравномерное распределение плотности липидов, как это видно на 2D-картах плотности, полученных для разных срезов бислоя вдоль нормали к плоскости мембраны (рис. 3в). Для «чистого» бислоя ПОФХ, в свою очередь, наблюдается более гомогенное распределение. Интересно, что наиболее заметный эффект наблюдается для срезов, соответствующих гидрофобному ядру бислоя. При этом для «чистого» бислоя распределение довольно размытое, что обеспечивает эффективное усреднение плотности за период наблюдения (200 нс), тогда как в присутствии ТМД можно наблюдать

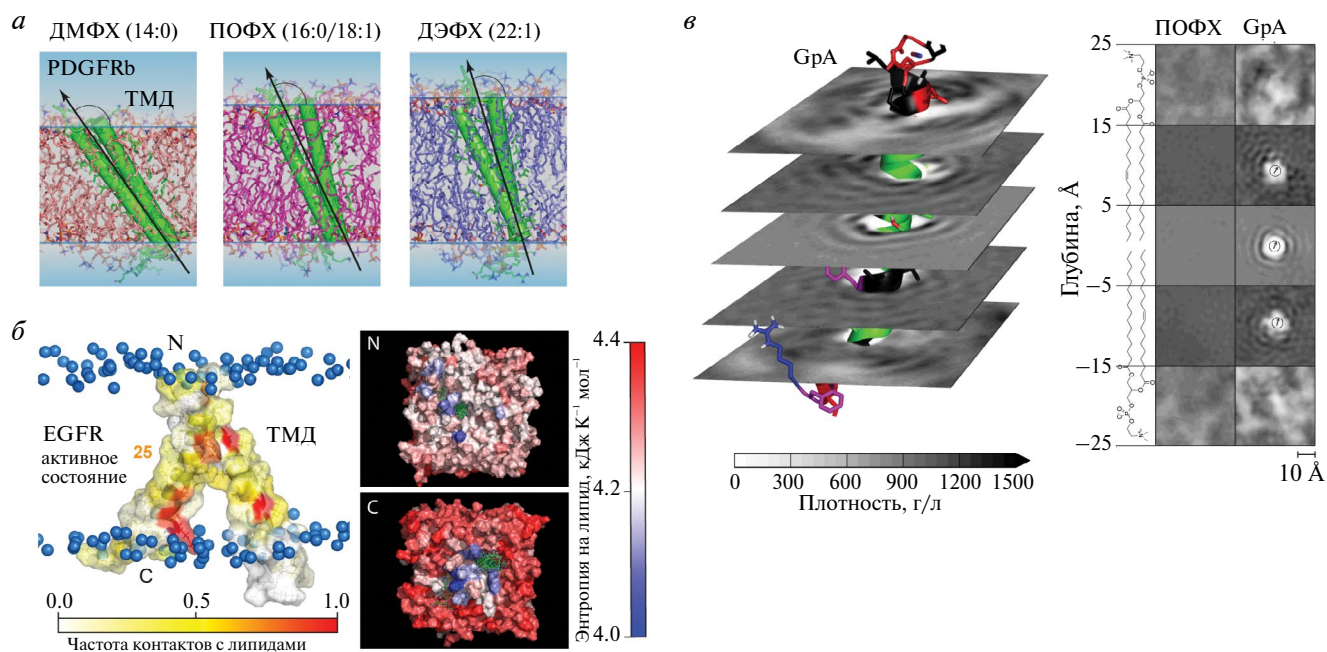


Рис. 3. Мембранный ответ в присутствии ТМД, наблюдаемый в ходе расчетов МД. *а* – Изменение угла наклона димера ТМД рецептора PDGFRb по отношению к нормали бислоя в зависимости от состава ацильных цепей (толщины гидрофобного слоя). *б* – Ограничение конфигурационной динамики липидных молекул POPC в результате взаимодействия с димером ТМД рецептора EGFR. Поверхность ТМД окрашена в соответствии со значениями частоты липидных контактов в процессе МД (около 25 связанных молекул). Поверхность бислоя раскрашена в соответствии со значениями конфигурационной энтропии липидных молекул. *в* – Картирование неоднородности плотности липидных молекул POPC вблизи мономерного ТМД гликофорина-А (GpA). Показаны двумерные карты плотности, полученные для срезов на разной глубине бислоя.

образование концентрических неоднородностей, где темные области отражают высокую среднюю плотность липидов, что соответствует «замороженным» липидным хвостам, прочно связанным с ТМД. Такие ограничения подвижности атомов ацильной цепи приводят к обеднению соседних областей и образованию «кольцеобразных» структур при усреднении по траектории МД. Наиболее заметные пики плотности, аналогичные первой сольватной оболочке в жидкостях, расположены в непосредственной близости от ТМД, при этом эффект постепенно затухает на больших расстояниях. Таким образом, наблюдаемые неоднородности липидной плотности в области ТМД связаны с ограничением подвижности липидных хвостов и имеют выраженную энтропийную природу. Адаптация к липидному окружению и соответствующий энтропийный эффект могут также лежать в основе переключения между неактивным и активным состояниями ТМД димера, что указывает на возможность непосредственного участия мембраны в работе рецептора [44]. В данном случае результаты полноатомной МД указывают на возможную активную роль ТМД рецептора EGFR в передаче сигнала через бислой, связанную с МО. Так, переключение между конфигурациями димера ТМД индуцирует

локальные липидные возмущения в N-концевой области (ближний к пептиду монослой) и понижение их энтропии (рис. 3б), где расположен более полярный тандемный GxxxG-подобный мотив. Это также вызывает изменение свойств липидного окружения внутреннего монослоя, что существенно для усиления сигнала рецептора в последующем каскаде и детерминированного ответа на связывание лиганда.

5. ЗНАНИЕ МЕХАНИЗМОВ МЕМБРАННОГО ОТВЕТА – КЛЮЧ К РАЦИОНАЛЬНОМУ ДИЗАЙНУ МЕМБРАННЫХ СИСТЕМ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

Понимание на молекулярном уровне физических механизмов МО создает предпосылки для рационального конструирования *in silico* систем с направленно измененными структурно-динамическими параметрами белок-мембранных взаимодействий. В качестве объектов такого дизайна используют как сами липидные бислои, так и связывающиеся с клеточными мембранами белки и пептиды. Рассмотрим соответствующие примеры, уже реализованные на практике.

5.1. Дизайн липидных бислоев с заданными свойствами

По-видимому, наиболее простым и эффективным способом модуляции характеристик МО является изменение состава липидного бислоя клеточной мембраны. Именно об этом подходе и пойдет речь ниже. Помимо него, воздействовать на процессы, связанные с МО, можно, меняя внешние условия, в частности, температуру, давление, степень гидратации липидов, ионную силу омывающего мембрану водного раствора и т.д. Однако эти подходы в настоящей работе не обсуждаются.

Как можно повлиять на параметры МО путем модификации липидного состава мембраны. Во-первых, зная в деталях ДМП модельных бислоев, состоящих из наиболее распространенных в природе липидов, а также соответствующие свойства (в терминах ДМП) заданного внешнего агента (белка и/или пептида), можно предложить вариант(ы) липидных бислоев, наилучшим образом подходящих для такого белок-мембранного взаимодействия. Имеется в виду, в частности, возможность достижения высокой степени комплементарности ДМП обоих участников при встраивании белка/пептида в липидную мембрану. Для решения этих задач необходимо иметь библиотеку ДМП модельных бислоев, а также вычислительные средства быстрой оценки ДМП белков и пептидов. Причем в каждом случае речь идет не об одном «портрете», а об их наборах, полученных для ансамбля равновесных состояний этих систем, например, методом МД. Как правило, подобные наборы данных создают для бислоев, содержащих один-два типа липидов и (часто) холестерин. Помимо прогнозирования МО путем использования природных липидов, большой интерес представляет проектирование на их основе искусственных соединений, способных нужным образом изменить параметры МО в липидном бислое, созданном путем добавления таких молекул к известным мембранным системам, либо целиком состоящих из предложенных модифицированных липидов. Ниже приведен пример подобного дизайна.

Поскольку МО во многом определяется свойствами мозаичности мембраны (см. Раздел 2), в частности, параметрами присутствующих в них динамических НК, разумно предположить, что модификация картины латеральной гетерогенности бислоя вызовет изменение МО. Известно, что одним из важнейших факторов, влияющих на данные эффекты, является распределение Н-связей липид-липид, входящих и не входящих в состав НК [28]. В последнее время были получены важные результаты о параметрах Н-связей в мембранах, включая

данные о роли холестерина [27, 51, 52], о зависимости свободной энергии образования Н-связи от значений локальной диэлектрической проницаемости среды (ϵ) [30] и т.д. В частности, было показано, что N- и O-метилирование сфингомиелина заметно влияет на его поведение в мембране и взаимодействие с холестерином. Так, указанная блокада донорных и акцепторных групп Н-связей в сфингомиелине нарушает образование упорядоченных доменов [53]. Это свидетельствует о важной роли аминокруппы сфингомиелина в процессе появления НК, специфичном для данного типа липидов. Эта идея получила дальнейшее развитие в осуществленной нами разработке искусственного липида на основе ДОФХ с измененным паттерном Н-связей. Предполагалось, что добавление этого соединения в бислой ДОФХ может потенциально повлиять на свойства мембраны. Цель – введение донора Н-связи (ОН-группу) в молекулу ДОФХ на глубине С=О групп немодифицированного липида (рис. 4а). Полученный липид (sn-1- β -гидрокси-диолеоил-ФХ) далее обозначается как ДОФХ-oh. Согласно результатам расчетов методом Монте-Карло в средах различной полярности (с различными значениями ϵ), именно в области расположения С=О групп ДОФХ, т.е. в неполярной среде ($\epsilon \sim 3$), наблюдается наиболее сильный эффект образования дополнительных Н-связей с участием молекул ДОФХ-oh [30]. МД-моделирование липидных бислоев, содержащих ДОФХ-oh, показало, что его добавление к мембране ДОФХ приводит к значительным изменениям ряда наиболее важных структурных и динамических свойств бислоя, определяющих его ДМП: сильное увеличение «контрастности» латерального распределения гидрофобных/гидрофильных свойств границы раздела мембрана/вода, изменение его доменной структуры (параметры НК), паттерны Н-связей и характеристики подвижности. Важно отметить, что такие «репортерные» молекулы искусственных липидов могут существенно изменять макроскопические средние свойства поверхности бислоя. Это хорошо видно на рис. 4а, где показаны усредненные карты распределения гидрофобных/гидрофильных свойств (выраженных в терминах МГП) на поверхности бислоя ДОФХ и бислоя, содержащего ДОФХ-oh. Такие эффекты описаны впервые, открывая новые возможности в рациональном проектировании искусственных мембран с заданными свойствами.

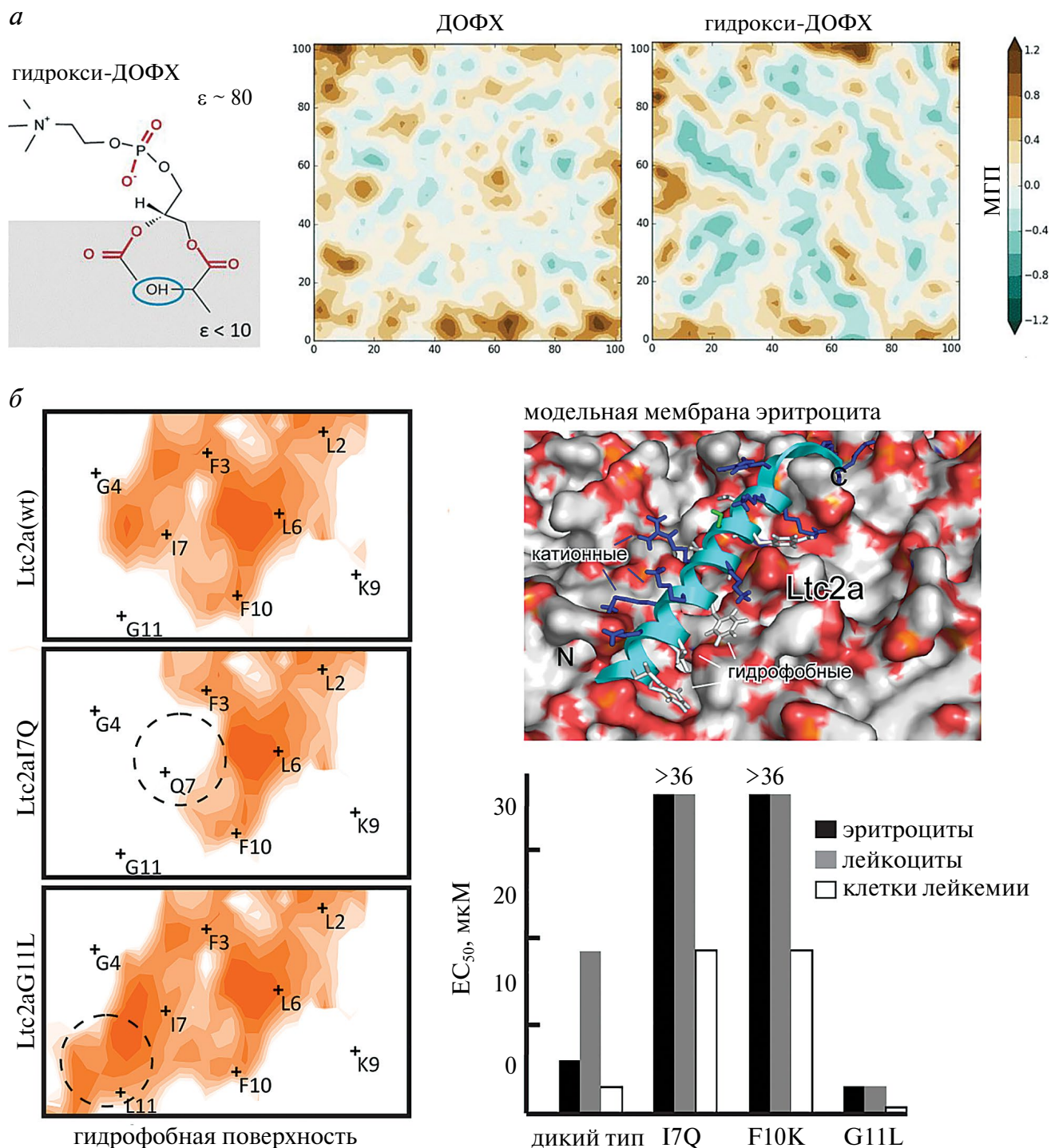


Рис. 4. Дизайн свойств бислоев и МАП. *а* – Схематичное изображение расположения молекулы sn-1-β-гидроксиди-олеилфосфатидилхолина (ДОФХ-oh) относительно мембраны, а также гидрофобная/гидрофильная организация поверхности бислоев ДОФХ и ДОФХ-oh (окраска по значениям МГП). Карты даны для одного липидного монослоя. Конфигурации системы взяты из МД-траекторий бислоев. Схема окраски для МГП показана справа. *б* – Двумерные карты гидрофобной поверхности в N-концевом участке для вариантов АМП Ltc2a с разной гемолитической активностью. Данные о цитотоксичности (в терминах полумаксимальной эффективной концентрации, EC₅₀) дикого типа и мутантных АМП показаны в виде диаграммы. Также показана МД-конфигурация Ltc2a дикого типа на поверхности модельной полноатомной мембраны эритроцитов (ПОФХ 40%, ПОФЭ 40%, холестерин 20%).

5.2. Дизайн селективного АМП на основании анализа мозаичности гидрофобной поверхности модельных мембран

Изучение гидрофобных/гидрофильных свойств N-концевых областей α -спиральных АМП с использованием подхода МГП выявило существенные различия между пептидами, обладающими гемолитической активностью и лишенными ее [54]. В частности, было показано, что гидрофобные паттерны в N-концевой области служат своеобразным триггером нежелательной цитотоксичности АМП. Например, в АМП Ltc2a N-концевая область является выражено амфифильной. Сравнение двумерных карт гидрофобной поверхности пептида и его МД-моды взаимодействия с модельным бислоем, имитирующим по составу мембрану эритроцитов (ПОФХ 40%, ПОФЭ 40%, холестерин 20%), позволяет выявить наиболее перспективные остатки для возможных мутаций — Ile7, Phe10, так как для них характерны низкая энергия взаимодействия с мембраной и локализация внутри обширных гидрофобных паттернов (рис. 4б). Кроме того, для используемой модельной цвиттер-ионной мембраны эритроцитов характерна более гидрофобная поверхность, чем для заряженной бактериальной мембраны (бислой ФЭ/ФГ). Таким образом, уменьшение площади гидрофобной поверхности Ltc2a должно приводить к понижению эффективности взаимодействий с цвиттер-ионными мембранами и его гемолитической активности. В частности, мутации Ile7 -> Gln, Phe10-Lys позволяют существенно уменьшить гемолитическую активность Ltc2a, сохраняя при этом антибактериальное действие практически на уровне пептида дикого типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важно отметить, что рассмотренные эффекты МО не являются лишь плодом компьютерного моделирования, а реально существуют как в модельных системах (гидратированных липидных бислоях, включая однокомпонентные), так и в мембранах живых клеток. Несмотря на атомистический характер описанных выше явлений, все еще труднодостижимых для анализа с помощью современных экспериментальных методов, целый ряд ключевых параметров МО был подтвержден прямыми наблюдениями. Во-первых, это касается «мозаичной» природы биомембран и наличия в них динамических нанокластеров, параметры которых хорошо согласуются с получаемыми в расчетах оценками (см. обзор [28] и соответствующие ссылки). Во-вторых, надежно установлены и детально

описаны ДМП «инициаторов» МО — мембранных и мембраноактивных белков и пептидов. Это сделано с использованием большого числа их расшифрованных пространственных структур и данных о конформационной динамике. Именно подобная склонность белков и мембран к взаимной адаптации создает фундаментальную основу их эффективной совместной работы в клетке. Можно сказать, что мы имеем дело с динамической парой «ключ—замок», в которой оба участника меняют свои параметры во времени в заданном диапазоне значений. При этом успешное решение (открытие замка) достигается в определенный момент времени при совпадении (комплементарности) формы ключа и замочной скважины. Аналогично, наиболее эффективное встраивание мембраноактивного белка/пептида («ключа») в клеточную мембрану («замок») происходит в случае, когда при сближении с поверхностью липидного бислоя физико-химические свойства контактирующей поверхности белка/пептида в некий момент времени наилучшим образом соответствуют (с высокой степенью комплементарности) таковым, реализующимся в соседних с ним зонах интерфейса мембрана—вода. Например, АМП с заданным гидрофобным/гидрофильным паттерном на поверхности наиболее сильно взаимодействуют с модельным бислоем, для которого параметры мозаичности интерфейса наилучшим образом отвечают указанному паттерну (см. Раздел 5). В работе такие эффекты мы характеризуем в терминах комплементарности ДМП партнеров. В случае же трансмембранных доменов белков подобное соответствие ДМП («ключ—замок») достигается путем структурно-динамической подстройки липидов (а также молекул воды и ионов на границе раздела фаз), окружающих ТМ фрагменты белка, под конкретные особенности его наружной поверхности. При этом свойства таких молекул среды могут кардинально отличаться от невозмущенных областей мембраны (см. примеры в Разделе 4).

Важно отметить, что понимание молекулярных аспектов и движущих сил рассмотренных тонких эффектов МО — липид-опосредованной адаптации белков/пептидов к мембранной среде — является мощным инструментом рационального дизайна обоих участников процесса. Соответствующие примеры даны в Разделе 5. Одним из высокоэффективных и уже неоднократно апробированных подходов к решению данной нетривиальной задачи является применение разрабатываемой авторами вычислительной технологии ДМП. При этом, конечно, надо иметь в виду, что для построения адекватных ДМП для заданной пары — мембраны и белка/пептида — необходимо использовать

тщательную калибровку применяемых компьютерных моделей по экспериментальным данным. С этой целью полезно использовать созданную в Отделе структурной биологии ИБХ РАН молекулярно-биофизическую платформу, включающую, помимо моделирования, спектроскопию ЯМР, оптическую спектроскопию и белковую инженерию [44]. Учитывая, что клеточные мембраны являются фармакологическими мишенями действия большинства современных лекарственных препаратов (в ряде случаев, например, при нейродегенеративных заболеваниях, их доля превышает 80%), решение рассматриваемой проблемы МО представляется чрезвычайно важным. В первую очередь, конечно, речь идет о понимании механизмов действия мембранных белков и пептидов, но, как авторы постарались показать в этом очерке, без корректного учета реакции водно-липидной среды подобную задачу не решить.

Каковы перспективы развития данного направления исследований? С точки зрения компьютерного моделирования эффектов МО, особый интерес представляют многомасштабные вычисления встроенных в мембрану сложных надмолекулярных белковых объектов, например, многосубъединичных ионных каналов, полноразмерных моделей рецепторов в олигомерном состоянии, мембраноактивных пептидов, агрегирующих на границе раздела фаз и т.д. Специальное внимание следует уделить идентификации и детальному описанию коллективных движений в мембранах, эффектам аллостерии и т.д. Работа в этом направлении представляется очень перспективной. Для валидации результатов таких расчетов необходимо привлекать новые структурно-динамические данные для белков и мембран, получаемые в экспериментах с высоким пространственно-временным разрешением. Здесь неопенимую пользу могут оказать активно разрабатываемые в настоящее время инструментальные методы регистрации одиночных молекул и их небольших групп, в частности, нанокластеров. Такие подходы реализуются в ЯМР-и ЭПР-спектроскопии, оптической спектроскопии, криоэлектронной микроскопии и пр.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 23-14-00313).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gennis R.B. 1989. *Biomembranes: Molecular structure and function*. Springer. 533 p.
2. Jørgensen K., Mouritsen O.G. 1995. Phase separation dynamics and lateral organization of two-component lipid membranes. *Biophys. J.* **69** (3), 942–954.
3. Brown D.A., London E. 1998. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* **164** (2), 103–114.
4. Lingwood D., Kaiser H.J., Levental I., Simons K. 2009. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem. Soc. Trans.* **37** (Pt 5), 955–960.
5. Freire E., Snyder B. 1980. Estimation of the lateral distribution of molecules in two-component lipid bilayers. *Biochemistry* **19** (1), 88–94.
6. Curatolo W., Sears B., Neuringer L.J. 1985. A calorimetry and deuterium NMR study of mixed model membranes of 1-palmitoyl-2-oleylphosphatidylcholine and saturated phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta* **817** (2), 261–270.
7. Pinkwart K., Schneider F., Lukoseviciute M., Sauka-Spengler T., Lyman E., Eggeling C., Sezgin E. 2019. Nanoscale dynamics of cholesterol in the cell membrane. *J. Biol. Chem.* **294** (34), 12599–12609.
8. Sezgin E., Levental I., Mayor S., Eggeling C. 2017. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18** (6), 361–374.
9. Fantini J., Barrantes F.J. 2013. How cholesterol interacts with membrane proteins: an exploration of cholesterol-binding sites including CRAC, CARC, and tilted domains. *Front. Physiol.* **4**, 31.
10. Sohlenkamp C., Geiger O. 2016. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* **40** (1), 133–159.
11. Efremov R.G., Chugunov A.O., Pyrkov T.V., Priestle J.P., Arseniev A.S., Jacoby E. 2007. Molecular lipophilicity in protein modeling and drug design. *Curr. Med. Chem.* **14** (4), 393–415.
12. Koromyslova A.D., Chugunov A.O., Efremov R.G. 2014. Deciphering fine molecular details of proteins' structure and function with a protein surface topography (PST) method. *J. Chem. Inf. Model.* **54** (4), 1189–1199.
13. Efremov R.G., Gulyaev D.I., Modyanov N.N. 1993. Application of three-dimensional molecular hydrophobicity potential to the analysis of spatial organization of membrane domains in proteins. III. Modeling of intramembrane moiety of Na⁺, K⁺-ATPase. *J. Protein. Chem.* **12** (2), 143–152.
14. Engelman D.M. 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438** (7068), 578–580.
15. Cebecauer M., Amaro M., Jurkiewicz P., Sarmiento M.J., Šachl R., Cwiklik L., Hof M. 2018. Membrane lipid nanodomains. *Chem. Rev.* **118** (23), 11259–11297.

16. Enkavi G., Javanainen M., Kulig W., Róg T., Vattulainen I. 2019. Multiscale simulations of biological membranes: The challenge to understand biological phenomena in a living substance. *Chem. Rev.* **119** (9), 5607–5774.
17. Kinnun J.J., Bolmatov D., Lavrentovich M.O., Katsaras J. 2020. Lateral heterogeneity and domain formation in cellular membranes. *Chem. Phys. Lipids.* **232** 104976.
18. Kure J.L., Andersen C.B., Mortensen K.I., Wiseman P.W., Arnsperg E.C. Revealing plasma membrane nano-domains with diffusion analysis methods. *Membranes.* **10** (2020).
19. Phillips R., Ursell T., Wiggins P., Sens P. 2009. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature.* **459** (7245), 379–385.
20. Bocharov E.V., Mineev K.S., Pavlov K.V., Akimov S.A., Kuznetsov A.S., Efremov R.G., Arseniev A.S. 2017. Helix-helix interactions in membrane domains of biotopic proteins: Specificity and role of lipid environment. *Biochim. Biophys. Acta* **1859** (4), 561–576.
21. Vanni S., Hirose H., Barelli H., Antonny B., Gautier R. 2014. A sub-nanometre view of how membrane curvature and composition modulate lipid packing and protein recruitment. *Nat. Commun.* **5** (1), 4916.
22. Sharma S., Lindau M. 2017. t-SNARE transmembrane domain clustering modulates lipid organization and membrane curvature. *J. Am. Chem. Soc.* **139** (51), 18440–18443.
23. Schmid F. 2017. Physical mechanisms of micro- and nanodomain formation in multicomponent lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1859** (4), 509–528.
24. Polyansky A.A., Volynsky P.E., Arseniev A.S., Efremov R.G. 2009. Adaptation of a membrane-active peptide to heterogeneous environment. II. The role of mosaic nature of the membrane surface. *J. Phys. Chem. B.* **113** (4), 1120–1126.
25. Agmo Hernández V., Karlsson G., Edwards K. 2011. Intrinsic heterogeneity in liposome suspensions caused by the dynamic spontaneous formation of hydrophobic active sites in lipid membranes. *Langmuir.* **27** (8), 4873–4883.
26. de Wit G., Danial J.S., Kukura P., Wallace M.I. 2015. Dynamic label-free imaging of lipid nanodomains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112** (40), 12299–12303.
27. Yano Y., Hanashima S., Tsuchikawa H., Yasuda T., Slotte J.P., London E., Murata M. 2020. Sphingomyelins and ent-sphingomyelins form homophilic nanodomains within liquid ordered domains. *Biophys. J.* **119** (3), 539–552.
28. Efremov R.G. Dynamic “molecular portraits” of biomembranes drawn by their lateral nanoscale inhomogeneities. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021).
29. Boggs J.M. 1980. Intermolecular hydrogen bonding between lipids: influence on organization and function of lipids in membranes. *Can. J. Biochem.* **58** (10), 755–770.
30. Efremov R.G. 2019. Dielectric-dependent strength of interlipid hydrogen bonding in biomembranes: Model case study. *J. Chem. Inf. Model.* **59** (6), 2765–2775.
31. Marrink S.J., Risselada H.J., Yefimov S., Tieleman D.P., de Vries A.H. 2007. The MARTINI force field: Coarse grained model for biomolecular simulations. *J. Phys. Chem. B* **111** (27), 7812–7824.
32. Polyansky A.A., Ramaswamy R., Volynsky P.E., Sbalzarini I.F., Marrink S.J., Efremov R.G. 2010. Antimicrobial peptides induce growth of phosphatidylglycerol domains in a model bacterial membrane. *J. Phys. Chem. Lett.* **1** (20), 3108–3111.
33. Epand R.F., Maloy W.L., Ramamoorthy A., Epand R.M. 2010. Probing the “charge cluster mechanism” in amphipathic helical cationic antimicrobial peptides. *Biochemistry* **49** (19), 4076–4084.
34. Pag U., Oedenkoven M., Sass V., Shai Y., Shamova O., Antcheva N., Tossi A., Sahl H.G. 2008. Analysis of in vitro activities and modes of action of synthetic antimicrobial peptides derived from an alpha-helical ‘sequence template’. *J. Antimicrob. Chemother.* **61** (2), 341–352.
35. Han X., Bushweller J.H., Cafiso D.S., Tamm L.K. 2001. Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat. Struct. Biol.* **8** (8), 715–720.
36. Efremov R.G., Nolde D.E., Volynsky P.E., Chernyavsky A.A., Dubovskii P.V., Arseniev A.S. 1999. Factors important for fusogenic activity of peptides: molecular modeling study of analogs of fusion peptide of influenza virus hemagglutinin. *FEBS Lett.* **462** (1), 205–210.
37. Vaccaro L., Cross K.J., Kleinjung J., Straus S.K., Thomas D.J., Wharton S.A., Skehel J.J., Fraternali F. 2005. Plasticity of influenza haemagglutinin fusion peptides and their interaction with lipid bilayers. *Biophys. J.* **88** (1), 25–36.
38. Magzoub M., Gräslund A. 2004. Cell-penetrating peptides: [corrected] from inception to application. *Q. Rev. Biophys.* **37** (2), 147–195.
39. Magzoub M., Pramanik A., Gräslund A. 2005. Modeling the endosomal escape of cell-penetrating peptides: Transmembrane pH gradient driven translocation across phospholipid bilayers. *Biochemistry* **44** (45), 14890–14897.
40. Volynsky P.E., Polyansky A.A., Simakov N.A., Arseniev A.S., Efremov R.G. 2005. Effect of lipid composition on the “membrane response” induced by a fusion peptide. *Biochemistry* **44** (44), 14626–14637.
41. Polyansky A.A., Volynsky P.E., Arseniev A.S., Efremov R.G. 2009. Adaptation of a membrane-active peptide to heterogeneous environment. I. Structural plasticity of the peptide. *J. Phys. Chem. B* **113** (4), 1107–1119.
42. Muhle-Goll C., Hoffmann S., Afonin S., Grage S.L., Polyansky A.A., Windisch D., Zeitler M., Bürck J., Ulrich A.S. 2012. Hydrophobic matching controls the tilt and stability of the dimeric platelet-derived growth

- factor receptor (PDGFR) β transmembrane segment. *J. Biol. Chem.* **287** (31), 26178–26186.
43. Polyansky A.A., Volynsky P.E., Efremov R.G. 2012. Multistate organization of transmembrane helical protein dimers governed by the host membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **134** (35), 14390–14400.
 44. Bocharov E.V., Bragin P.E., Pavlov K.V., Bocharova O.V., Mineev K.S., Polyansky A.A., Volynsky P.E., Efremov R.G., Arseniev A.S. 2017. The conformation of the epidermal growth factor receptor transmembrane domain dimer dynamically adapts to the local membrane environment. *Biochemistry* **56** (12), 1697–1705.
 45. Volynsky P.E., Polyansky A.A., Fakhrutdinova G.N., Bocharov E.V., Efremov R.G. 2013. Role of dimerization efficiency of transmembrane domains in activation of fibroblast growth factor receptor 3. *J. Am. Chem. Soc.* **135** (22), 8105–8108.
 46. Roepstorff K., Thomsen P., Sandvig K., van Deurs B. 2002. Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *J. Biol. Chem.* **277** (21), 18954–18960.
 47. Sottocornola E., Misasi R., Mattei V., Ciarlo L., Gradini R., Garofalo T., Berra B., Colombo I., Sorice M. 2006. Role of gangliosides in the association of ErbB2 with lipid rafts in mammary epithelial HC11 cells. *FEBS J.* **273** (8), 1821–1830.
 48. Rohwedder A., Knipp S., Roberts L.D., Ladbury J.E. 2021. Composition of receptor tyrosine kinase-mediated lipid micro-domains controlled by adaptor protein interaction. *Sci. Rep.* **11** (1), 6160.
 49. Roy A., Patra S.K. 2023. Lipid raft facilitated receptor organization and signaling: A functional rheostat in embryonic development, stem cell biology and cancer. *Stem Cell Rev. Rep.* **19** (1), 2–25.
 50. Kuznetsov A.S., Polyansky A.A., Fleck M., Volynsky P.E., Efremov R.G. 2015. Adaptable lipid matrix promotes protein–protein association in membranes. *J. Chem. Theory Comput.* **11** (9), 4415–4426.
 51. Matsumori N., Yamaguchi T., Maeta Y., Murata M. 2015. Orientation and order of the amide group of sphingomyelin in bilayers determined by solid-state NMR. *Biophys. J.* **108** (12), 2816–2824.
 52. Yasuda T., Kinoshita M., Murata M., Matsumori N. 2014. Detailed comparison of deuterium quadrupole profiles between sphingomyelin and phosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.* **106** (3), 631–638.
 53. Björkbohm A., Róg T., Kankaanpää P., Lindroos D., Kaszuba K., Kurita M., Yamaguchi S., Yamamoto T., Jaikishan S., Paavolainen L., Päivärinne J., Nyholm T.K.M., Katsumura S., Vattulainen I., Slotte J.P. 2011. N- and O-methylation of sphingomyelin markedly affects its membrane properties and interactions with cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta.* **1808** (4), 1179–1186.
 54. Polyansky A.A., Vassilevski A.A., Volynsky P.E., Vorontsova O.V., Samsonova O.V., Egorova N.S., Krylov N.A., Feofanov A.V., Arseniev A.S., Grishin E.V., Efremov R.G. 2009. N-terminal amphipathic helix as a trigger of hemolytic activity in antimicrobial peptides: A case study in laticins. *FEBS Lett.* **583** (14), 2425–2428.

Lipid-Mediated Adaptation of Proteins and Peptides in Cell Membranes

© 2024 г. А. А. Polyansky¹, R. G. Efremov^{1, 2, 3, *}

¹*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

²*National Research University Higher School of Economics, Moscow, 101000 Russia*

³*Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Moscow oblast, 141701 Russia*

**e-mail: r-efremov@yandex.ru*

The paper overviews the results of computational studies of the molecular mechanisms underlying the adaptation of model cell membranes taking place during their interaction with proteins and peptides. We discuss changes in the structural and dynamic parameters of the water–lipid environment, the hydrophobic/hydrophilic organization of the lipid bilayer surface (the so-called “mosaicity”), etc. Taken together, these effects are called the “membrane response” (MR) and constitute the most important ability of the cell membranes to respond specifically and consistently to the incorporation of extraneous agents, primarily proteins and peptides, and their subsequent functioning. The results of the authors’ long-term research in the field of molecular modeling of MR processes with various spatial and temporal characteristics are described, from the effects of binding of individual lipid molecules to proteins to changes in the integral macroscopic parameters of membranes. The bulk of the results were obtained using the “dynamic molecular portrait” approach developed by the authors. The biological role of the observed phenomena and potential ways of rationally designing artificial membrane systems with specified MR characteristics are discussed. This, in turn, is important for targeted changes in the activity profile of proteins and peptides exerting action on biomembranes, not least as promising pharmacological agents.

Keywords: membrane proteins, molecular biophysics platform, computer modeling, molecular dynamics, “membrane response”, protein-lipid interactions

ПЛОСКИЕ ЛИПИДНЫЕ БИСЛОИ В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ ЛИПИД-ОПОСРЕДОВАННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПОРООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ АГЕНТОВ

© 2024 г. С. С. Ефимова^а, *, О. С. Остроумова^а

^аИнститут цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

* e-mail: efimova@incras.ru

Поступила в редакцию 23.04.2024

После доработки 14.05.2024

Принята к печати 15.05.2024

Плоские липидные бислои являются уникальными инструментами, предназначенными для моделирования клеточных мембран и электрофизиологических исследований встроенных в них ионных каналов. Такие модельные системы призваны намеренно ограничить сложность и мультикомпонентность клеточных мембран для того, чтобы детально проанализировать протекающие там процессы в хорошо контролируемых экспериментальных условиях. Плоские липидные бислои позволяют регистрировать одиночные события проводимости с измеряемым током величиной более десятой доли пикоампера. Относительная простота метода, возможность наблюдения за единичными молекулярными событиями и высокая воспроизводимость получаемых результатов определяют беспрецедентную эффективность использования плоских липидных бислоев для выявления ключевых физических и химических факторов, отвечающих за регуляцию функционирования ионных каналов. Настоящий обзор представляет собой совокупность литературных данных об ассоциированных с липидным микроокружением механизмах регуляции ионных каналов, формируемых различными антимикробными агентами. Проведенный анализ позволяет рассматривать липиды как молекулярные шапероны, обеспечивающие образование антимикробными агентами пор в таргетных мембранах.

Ключевые слова: плоские липидные бислои, ионные каналы, антимикробные пептиды и липопептиды, полиеновые макролидные антибиотики

DOI: 10.31857/S0233475524050107, EDN: cbddvc

ВВЕДЕНИЕ

Создание модельных липидных мембран стало важным этапом в формировании представлений о структуре и функционировании клеточных мембран, а также в развитии понимания механизмов антимикробного и токсического действия множества экзогенных веществ. В настоящее время плоские липидные бислои являются одной из наиболее распространенных и удобных систем для моделирования клеточных мембран [1, 2]. С помощью таких моделей изучают влияние физико-химических свойств липидного матрикса, трансмембранного распределения электрического потенциала и различных химических веществ на ионный транспорт через мембраны.

1. Методы формирования плоских липидных мембран

Первые сведения о методах формирования искусственных мембран относятся к началу 1960-х годов, однако отправной точкой следует считать

разработку метода формирования плоских липидных мембран Мюллером и Рудиным [3, 4]. Метод достаточно прост и заключается в том, что на отверстие в тефлоновой перегородке, которая разделяет два отсека с водным раствором, пипеткой или кистью наносят каплю раствора липида в органическом растворителе (рис. 1а). Под действием сил поверхностного натяжения образованная липидная пленка самопроизвольно утончается до толщины, соответствующей двум молекулам липида, расположенным в противоположных монослоях. Одним из существенных недостатков подобной модели является наличие микролинз растворителя между липидными монослоями и большого тора из раствора липида на границе крепления мембраны к тефлоновой пленке. Существует несколько более поздних модификаций метода Мюллера и Рудина, предусматривающих использование различных органических растворителей с малой вероятностью образования микролинз [6], удаление линз растворителя при замораживании бислоя [7] или

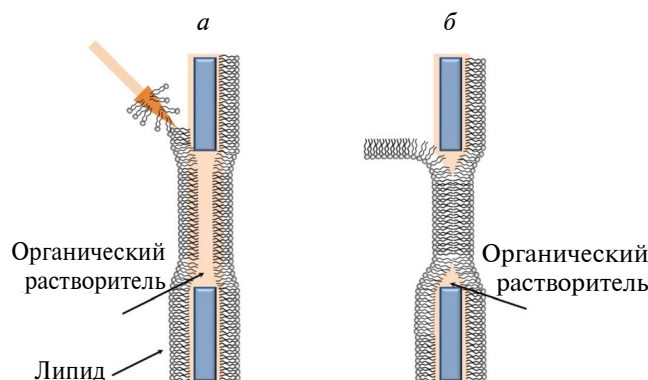


Рис. 1. Схематическое представление формирования плоских липидных мембран по методу Мюллера-Рудина (а) и Монтала-Мюллера (б) [5].

модификацию экспериментальной кюветы с целью получения не содержащих растворителя липидных бислоев [8], однако широкого распространения эти варианты не получили.

В 1972 году Монталом и Мюллером [9] был предложен принципиально отличный метод формирования плоских липидных бислоев. Получаемые таким способом бислои являются «сухими», т.е. не включают линз растворителя, но при этом сама методика более трудоемка. В начале эксперимента отверстие в тefлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру, обрабатывают гексадеканом или скваленом, на поверхность раствора в обоих отсеках камеры наносят раствор липида в гексане или пентане, и уже затем формируют искусственную мембрану путем сведения на отверстии в тefлоновой пленке предварительно сформированных на границе воздух-вода конденсированных липидных монослоев (рис. 1б). В результате углеводородные цепи липидов в противоположных монослоях оказываются обращенными друг к другу, а гидрофильные головы липидов экспонируются в водный раствор. К преимуществам описываемого метода, помимо уже упомянутого отсутствия микролинз растворителя между монослоями, также следует отнести возможность создания асимметричных искусственных мембран, химический состав монослоев которых различен. Последнее обстоятельство еще больше приближает подобные модели к клеточным мембранам.

Впоследствии было разработано еще несколько альтернативных методов формирования липидных бислоев для электрофизиологических исследований, в частности, путем сведения липидных монослоев, образованных на поверхности двух водных капель в растворе гексадекана [10, 11], или с помощью пипетки для «patch-clamp» [12].

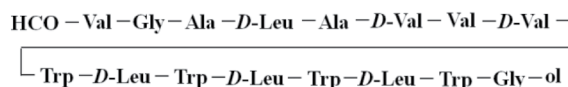
Полученные такими способами искусственные липидные мембраны оказались чрезвычайно эффективными для электрофизиологических измерений ионных каналов, поскольку позволяют варьировать химический состав мембран и окружающих их растворов в широком диапазоне, а также с высокой точностью контролировать ряд других важных параметров, включая трансмембранную разность потенциалов. По этой причине прогресс, достигнутый в изучении процессов функционирования ионных каналов, в значительной степени связан с применением методов формирования плоских липидных бислоев. Цель этого обзора заключалась в анализе литературных данных об ассоциированных с липидным микроокружением механизмах регуляции ионных каналов, формируемых различными антимикробными агентами.

2.1. Порообразующие антимикробные пептиды

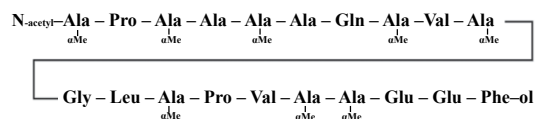
Антимикробными пептидами, как правило, считаются относительно короткие пептиды, продуцируемые врожденной системой защиты многоклеточных организмов для борьбы с инфекционными патогенами, в частности, с бактериями и грибами. Одноклеточные организмы также способны синтезировать соединения, обладающие выраженным антимикробным действием, многие из которых нашли свое применение в качестве антибиотиков. Практически все природные антимикробные соединения характеризуются мембранной активностью, и целый ряд агентов осуществляет свое цитотоксическое действие благодаря формированию в мембранах клеток целевых организмов ион-проницаемых пор или каналов. Большинство сведений о способности антимикробных агентов формировать поры в мембранах клеток-мишеней было получено с использованием модельных липидных мембран, и в частности, плоских липидных бислоев. Приведем наиболее яркие примеры.

Природный *грамицидин* является гетерогенной смесью нескольких пептидов, продуцируемых бактерией *Brevibacillus brevis*, включающей в зависимости от штамма такие компоненты как А, В, С_D, D и S [13, 14]. На рис. 2 показана химическая структура грамицидина А. Чередующиеся L- и D-аминокислоты в линейной последовательности грамицидина А позволяют молекуле образовывать спиральную структуру, в которой полярные группы выстилают внутреннюю полость, а неполярные боковые радикалы выступают с внешней стороны [15–17]. Такая конформация обуславливает встраивание молекул пептида в липидные бислои и формирование ими путей для транспорта ионов — каналов [18–21]. Так,

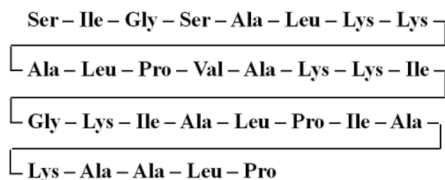
Грамицидин А



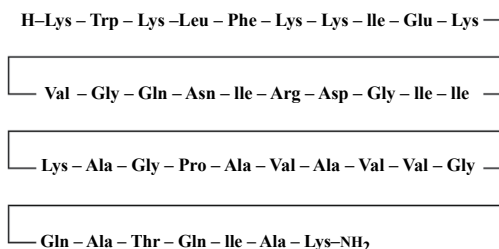
Аламетицин



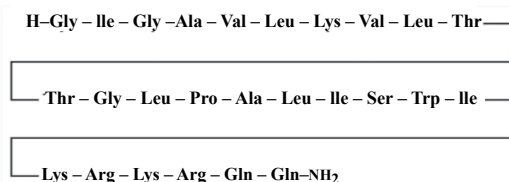
Цератотоксин



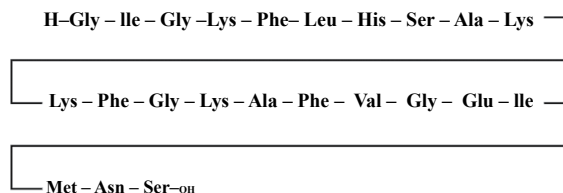
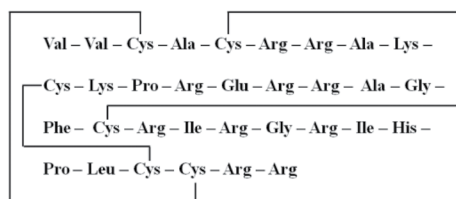
Цекропин А



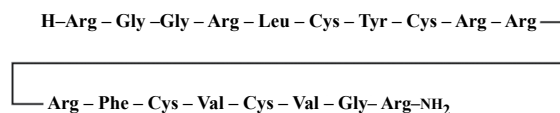
Мелиттин



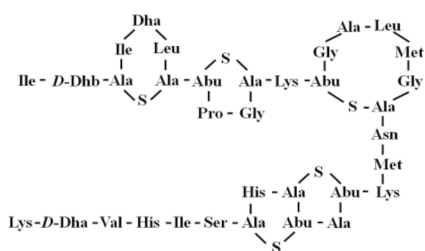
Магаинин II

 α -Дефензин (NP-1)

Протегрин-1



Низин



Циннамицин

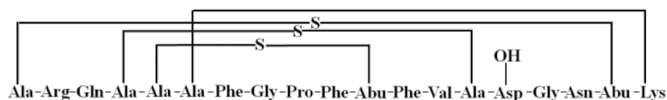


Рис. 2. Химические структуры порообразующих антимикробных пептидов: грамицидина А, аламетицина, цератотоксина, цекропина А, мелиттина, магаинина II, α -дефензина NP-1, протегрин-1, низина и циннамицина. Указаны только D-энантиомеры аминокислот. α -Me-Ala – α -метилаланил; Phe-ol – фенилаланинол; Dha – дегидроаланин; Dhb – дегидробутирин; Abu – α -аминомасляная кислота.

введение грамицидина А с двух сторон мембраны способствует образованию ионных каналов путем димеризации мономеров из противоположных липидных монослоев [22, 23]. Грамицидиновые каналы достаточно подробно охарактеризованы и считаются классическим объектом для моделирования ионного транспорта через мембраны [24,

25]. Первые работы, посвященные каналоформерным свойствам грамицидина А, и в частности, уже процитированная статья Хладки и Хейдона в журнале «Nature» [18], демонстрирующая записи индуцированных грамицидином А ступенчатых флуктуаций тока в плоском липидном бислое из глицеролмоноолеата, датированы 1970 г.

И несмотря на 50 лет исследований, этот объект по сей день не потерял своей актуальности.

Грамицидиновые каналы характеризуются практически идеальной катионной селективностью, они проницаемы для одновалентных катионов [26–28] и блокируются двухвалентными катионами и малыми иминиевыми ионами [29, 30]. Порообразующая активность грамицидина А зависит от длины углеводородных цепей мембранных липидов, а точнее от толщины гидрофобного кора [31, 32]. Показано, что ионный канал стабилен, если длина гидрофобной части его трансмембранного участка соответствует толщине углеводородного остова бислоя. В мембранах, толщина гидрофобного кора которых превышает длину гидрофобной части канала, ионный канал обычной геометрии нестабилен и может переходить из состояния двух одиночных спиралей, ассоциированных «голова к голове», в состояние более вытянутой двойной спирали [33, 34]. Действие множества амфифильных молекул на проводимость и время жизни грамицидинового канала можно объяснить их влиянием на толщину углеводородного остова мембраны [19, 32]. Эта же гипотеза позволяет объяснить особенности функционирования грамицидиновых каналов в липидных бислоях, претерпевающих фазовое разделение [35]. При этом лизолипиды потенцируют порообразующую активность грамицидина А за счет изменения энергии деформации мембраны, что связано с молекулярной «формой» мембранообразующих липидов, а не с толщиной мембраны [36]. Обратный эффект показан для случая замены мембранообразующего липида: ламеллярного фосфатидилхолина на конический фосфатидилэтаноламин [37]. Модификацией трансмембранного распределения латерального давления также было объяснено влияние тубулина на время жизни грамицидиновых каналов [38]. На основании данных о влиянии эластических свойств мембраны на активность грамицидина А была предложена модель образуемого пептидом канала, которая подразумевает наличие липидных устьев, характеризующихся некоторой положительной спонтанной кривизной (рис. 3а) [39]. Следует отметить, что полярные взаимодействия между пептидными молекулами и головками мембранных липидов могут доминировать над эффектом гидрофобного несоответствия в регуляции порообразующей функции грамицидина А [40]. Обнаружено, что грамицидиновые каналы также чувствительны к скачку электрического потенциала на границе раздела мембрана–водный раствор, в частности, к его неэкранируемой (дипольной) компоненте [32, 41–44]. Показано, что грамицидины В и С тоже способны формировать ионные

каналы в плоских липидных бислоях, более того, смесь трех грамицидинов (А, В и С) формирует гибридные каналы [45]. Природные ацилированные формы грамицидинов А и С также являются каналоформерами [46].

Другой часто используемой классической моделью для изучения трансмембранного транспорта являются ионные каналы, формируемые *аламетицином*. Этот антимикробный пептид относится к семейству пептаиболов (полипептидных антибиотиков, богатых α -аминоизомасляной кислотой) и продуцируется грибом *Trichoderma viride*. Структура аламетицина показана на рис. 2. Предположение, что аламетицин способен индуцировать в плоских липидных бислоях ионные каналы, впервые было высказано в работе Мюллера и Рудина 1968 г. [47]. Позже было показано, что в липидном микроокружении аламетицин принимает α -спиральную конформацию и образует потенциал-зависимые ионные каналы преимущественно катионной селективности и многоуровневой проводимости [48]. Модификация аминокислотного состава пептида позволила определить ключевые остатки в молекуле аламетицина, ответственные за проявление этим пептидом порообразующих свойств [49–52]. Потенциал-зависимость открывания аламетициновых каналов обусловлена высоким дипольным моментом пептидных спиралей [48, 53]. Более того, дипольный момент пептида определяет и чувствительность его порообразующей активности к дипольному потенциалу мембраны [54]. Проводимость каналов зависит от концентрации аламетицина, липидного состава мембраны и рН омывающего бислоя раствора [52, 55, 56]. Предполагается, что аламетициновый канал устроен по принципу «бочонка» (рис. 3б) [49, 57]. Согласно этой модели, формируемая олигомером пептида пора увеличивается в размере при встраивании дополнительных мономеров. Эта гипотеза объясняет многоуровневую проводимость аламетициновых каналов. Кроме того, считается, что проводящий кластер молекул аламетицина имеет форму песочных часов (рис. 3б). Такого уточнения модели потребовала обнаруженная в эксперименте стабилизация подсостояний с более высокой проводимостью при включении в мембрану неламеллярных липидов, увеличивающих давление в гидрофобной области [37]. Вероятно, вследствие несоответствия между длиной гидрофобного участка молекулы аламетицина и толщиной углеводородного остова бислоя трансмембранное внедрение пептида вызывает эластическую деформацию мембраны, а агрегация молекул аламетицина в проводящий кластер уменьшает пептид-липидные взаимодействия (причем, чем кластер больше, тем слабее

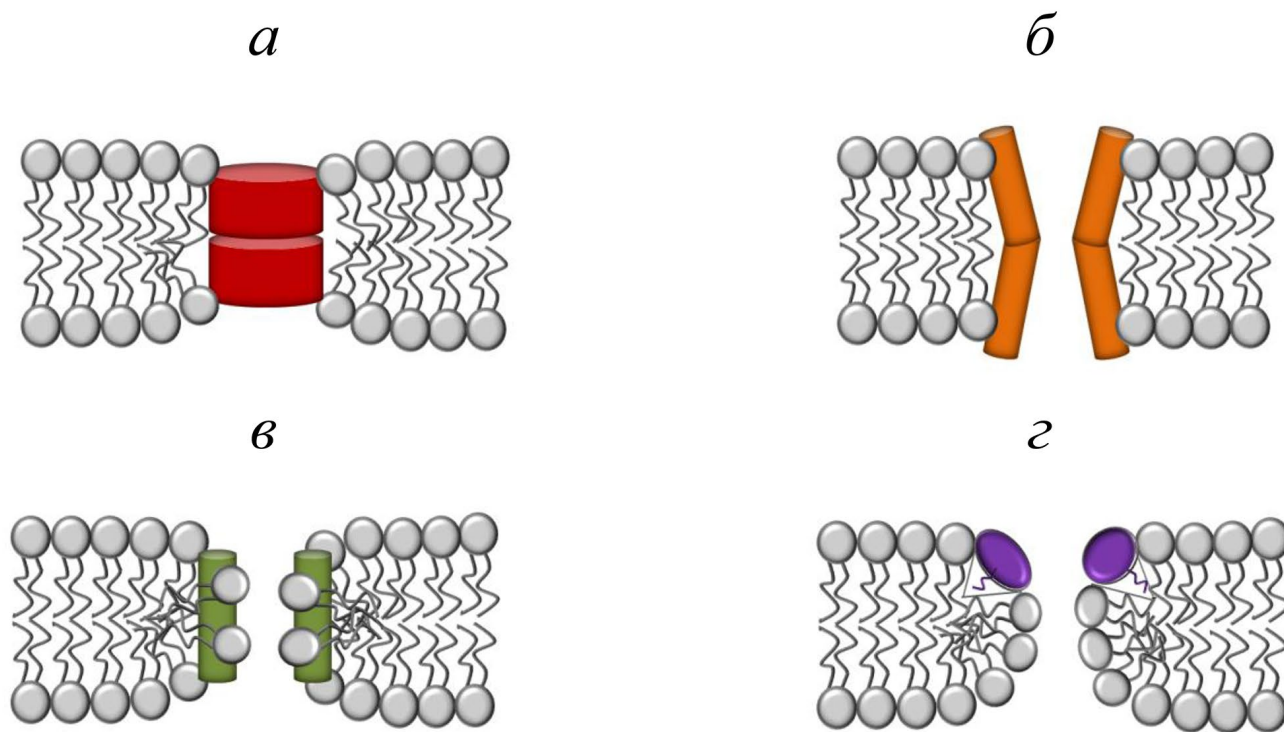


Рис. 3. Различные модели формирования ионных каналов антимикробными пептидами: путем димеризации спиралей грамицидина А (а); ассоциации α -спиралей аламетицина в пептидный «бочонок» (б); формирования пептид-липидной тороидальной поры мелиттином (в) и образования асимметричной липопептид-липидной поры синрингомицином Е (г).

взаимодействие пептид-липид). С этим предположением хорошо согласуются данные о влиянии соединений, модифицирующих спонтанную кривизну липидных монослоев, на порообразующую активность аламетицина [58].

Следует отметить, что семейство пептаиоболов включает более 50 пептидов, и для ряда пептидов показана порообразующая активность. В частности, *зервамицины*, *трихорзины* и *гипельцины*, продуцируемые *Emericellopsis satmosynnemata*, *Trichoderma harzianum* и *Hypocrea peltata* соответственно, также способны формировать потенциал-зависимые многоуровневые ионные каналы, подобные аламетициновым [59–62]. Модель пептидного «бочонка» в форме песочных часов, предложенная для аламетицина, была использована для описания строения зервамициновых каналов (рис. 3б) [63]. Пептаиоболы *гарзианин* и *сатурниспорин* из *Trichoderma saturnisporum* и *T. harzianum* соответственно в липидных бислоях, включающих неламеллярные липиды, формируют проводящие олигомеры меньшего, чем аламетицин, размера [64]. Показаны порообразующие свойства *трихотоксина* A50E из *T. viride* и *антиамебина*, выделенного из штаммов грибов *Emericellopsis* и *Cephalosporium*: эти пептаиоболы образуют ионные каналы с преимущественно одним подуровнем

проводимости, который организован гексамером и тетрамером соответствующего пептида, в то время как в состав аламетициновых каналов может входить 8–10 молекул пептида [65–67].

Сходными с аламетициновыми характеристиками обладают каналы, образованные антимикробными пептидами насекомых. Так, *цератотоксин*, альфа-спиральный катионный пептид, обнаруженный в секреторной жидкости добавочных желез плодовой мухи *Ceratitis capitata* проявляет выраженную антибактериальную активность, которая хорошо коррелирует со способностью пептида формировать ионные каналы [68]. На рис. 2 показана химическая структура цератотоксина А. В частности, в полном соответствии с ранее предложенной моделью (рис. 3б) этот пептид образует потенциал-зависимые многоуровневые каналы в бислоях из липидов, увеличивающих давление в области жирнокислотных хвостов [68, 69]. Другим примером являются *цекропины*, положительно заряженные антибактериальные пептиды из гемолимфы бабочки *Hyalophora cecropia*. Ключевую роль в их антибактериальном действии играют электростатические взаимодействия с отрицательно заряженной оболочкой бактерий. Так, цекропины А, В и D образуют потенциал-зависимые

ионные каналы в отрицательно заряженных плоских липидных бислоях [70]. Структура цекропина А представлена на рис. 2. Позднее показано, что, подобно аламетициновым и цератотоксиновым каналам, поры, формируемые цекропинами А и В, характеризуются многоуровневой проводимостью [71]. При этом оказалось, что, в отличие от аламетицина, наличие в составе мембраны неламентарных липидов, создающих избыточное давление в углеводородном коре, не является достаточным условием формирования каналов цекропинами, и применимость модели «бочонка» для цекропиновых каналов должна быть оценена в дальнейших работах. С использованием мембраноактивных соединений также выявлено, что одним из факторов, регулирующих цекропин-индуцированный макроскопический ток, является дипольный потенциал мембраны, что может быть связано с высоким дипольным моментом погружающихся в мембрану С-концевых доменов пептида [71].

Мелиттин — антимикробный катионный линейный полипептид, выделенный из пчелиного яда. Структура этого пептида показана на рис. 2. В липидном микроокружении пептид принимает конформацию α -спирали и вызывает потенциал-зависимое увеличение проводимости плоских липидных бислоев путем формирования проводящих тетрамеров [72]. Потенциал-зависимость образуемых мелиттином пор обусловлена заряд-дипольными и диполь-дипольными взаимодействиями между пептидными молекулами и липидным бислоем. Считается, что вместе с пептидными спиралями поверхность водной поры мелиттинового канала выстилают и несколько липидных головок, формируя пептид-липидную пору тороидальной геометрии (рис. 3в) [73–75]. С целью усиления антимикробного действия пептида были синтезированы его гибриды с цекропином, которые также как родительские молекулы, проявляют порообразующую способность в плоских липидных мембранах [76, 77].

Магаинины (I и II) представляют собой катионные пептиды, извлеченные из кожи шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. На рис. 2 показана химическая структура магаинина II. Эти пептиды обладают выраженным антимикробным действием, вызывая лизис бактериальных и грибковых клеток. Они проявляют цитолитическую активность путем формирования агрегатами из пептидных α -спиралей пор в мембранах, включающих анионные липиды [78, 79]. Данные, касающиеся катион-анионной специфичности магаининовых каналов, весьма противоречивы: в литературе можно найти сообщения как о преимущественно анионной, так

и катионной функции [78, 80]. Параметр, характеризующий кооперативность порообразующего действия магаинина II, определяемый из сигмоидальной зависимости пептид-индуцированного тока от его концентрации, равен 1.6 [80]. При этом элементарную единицу проводимости, размер которой оценивается по параметру кооперативности, может представлять не только мономер магаинина, но и димер или даже пептидный агрегат большего порядка. При исследовании липидной специфичности мембранного действия магаинина II установлено, что его каналоформерная активность зависит от вида отрицательно заряженного липида и наличия в составе бислоя стерина [79]. Многие исследователи сходятся во мнении, что подобно мелиттину магаинины формируют пептид-липидные тороидальные поры (рис. 3в) [75, 81–83]. Эта гипотеза объясняет рост порообразующей активности мелиттина и магаинина при увеличении положительной спонтанной кривизны с помощью модификаторов мембран и падение при включении в состав мембраны неламентарных липидов, увеличивающих давление в гидрофобной области бислоя [58, 84]. Однако существует мнение, что способ формирования пор магаинином (по принципу пептидного «бочонка» или пептид-липидной тороидальной поры) зависит от липидного состава мембраны; в частности, поры, индуцированные магаинином I в отрицательно заряженных мембранах, могут быть с успехом описаны и в рамках первой модели [85].

Несмотря на то что первичная последовательность *дермасептина* и *плеуроцидина*, альфа-спиральных катионных антимикробных пептидов, изолированных из кожи южноамериканской лягушки *Phyllomedusa bicolor* и зимней камбалы *Pseudopleuronectes americanus* соответственно, гомологична цератотоксину, модель пептидного «бочонка» не применима для описания их порообразующей активности, и, наиболее вероятно, эти пептиды формируют поры по тороидальному механизму (рис. 3в) [86, 87].

Антимикробные пептиды млекопитающих имеют широкий спектр действия, распространяющийся как на грамположительные и грамотрицательные бактерии, так и на некоторые патогенные грибы и даже вирусы, при этом многие представители также проявляют гемолитическую активность. Среди антимикробных пептидов млекопитающих следует упомянуть *дефензины*, *протегрины* и *кателицидины*. Рисунок 2 включает структуру кроличьего α -дефензина NP-1 и протегина-1, выделенного из лейкоцитов свиньи. Для всех названных групп продемонстрирована способность индуцировать каналоподобные токи в плоских

липидных бислоях [88–90]. Так, в искусственных мембранах, включающих отрицательно заряженные фосфолипиды, дефензины формируют потенциал-зависимые слабо анион-селективные поры путем ассоциации β -листов в олигомеры [88, 89]. Подобно дефензинам, протегрины образуют ионные каналы за счет олигомеризации β -листов [91]. Вероятность формирования каналов протегринами тоже зависит от липидного состава мембраны. Эти пептиды характеризуются более высокой специфичностью в отношении мембран, включающих отрицательно заряженные липиды (в том числе бактериальные липополисахариды) и неламеллярные липиды [91, 92]. Протегрины, по-видимому, индуцируют трансмембранные каналы, соответствующие тороидальной модели, в которых водные поры, имеющие положительную спонтанную кривизну, выстланы как пептидами, так и головками мембранных липидов (рис. 3в) [75]. Показано, что в отрицательно заряженных липидных мембранах независимо от знака трансмембранного напряжения кателицидин тритриптицин формирует катион-селективные каналы, для описания свойств которых также применима тороидальная модель (рис. 3в) [90].

Синтезируемый бактериями *Streptococcus lactis* катионный полициклический пептид *низин* относится к группе антибиотиков и имеет широкий спектр антимикробного действия, включающий множество грамположительных бактерий. В состав его молекулы входят остатки трех нестандартных аминокислот, дегидроаланина (Dha), дегидробутирина (Dhb) и аминomásляной кислоты (Abu), а также пять колец, образованных одним лантioniновым и четырьмя β -метиллантioniновыми мостиками (рис. 2) [93]. Считается, что в результате взаимодействия антибиотика с липидом II, молекулой, участвующей в траслокации пептидогликановых блоков через бактериальную мембрану [94], в ней образуются поры и, как следствие, нарушается жизнедеятельность клетки [95–98]. С использованием плоских липидных мембран показано, что наличие в мембране липида II не является обязательным условием для проявления низином способности индуцировать ионные каналы, достаточно присутствия отрицательно заряженных фосфолипидов, причем наибольшее сродство антибиотик проявляет в отношении кардиолипид-содержащих мембран [99–101].

Продуцируемые *Streptomyces* sp. антибиотики *циннамицин* и *дурамицин* демонстрируют порообразующую активность в липидных бислоях, включающих липиды, увеличивающие давление в области гидрофобного кора [102]. Структура циннамицина представлена на рис. 2. Следует

отметить, что выяснение механизмов, лежащих в основе порообразующей способности лантибиотиков, требует более детальных исследований, в том числе с использованием искусственных липидных мембран.

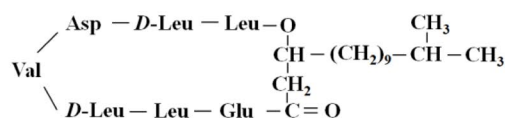
2.2. Порообразующие липопептиды

Ряд микроорганизмов синтезируют биоактивные молекулы, принадлежащие к классу циклических липопептидов. Одновременное наличие замкнутой в кольцо пептидной «головки», в состав которой входят заряженные и (или) полярные аминокислотные остатки, и гидрофобного углеводородного «хвоста» придает молекулам липопептидов амфифильность, а следовательно, обеспечивает их высокое сродство к мембранам. Установлено, что ряд мембраноактивных циклических липопептидов способны формировать ион-проницаемые поры в липидных бислоях. Химические структуры некоторых соединений представлены на рис. 4.

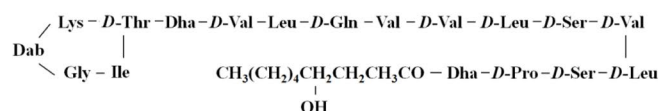
Бациллы продуцируют циклические липопептиды, относящиеся к трем различным группам: *итурины*, *сурфактины* и *фенгицины* [103]. Итурин A и C, *бацилломицины* D, F, L и LC и *микосубтилин* являются основными представителями семейства итуринов и обнаружены в *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens* [104, 105]. Сурфактин или его близкородственные варианты, такие как лихенизин, эсперин и пумиладин, выделены из *B. coagulans*, *B. pumilus* и *B. licheniformis* соответственно [106], а группа фенгицинов, синтезируемых *B. subtilis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis*, включает фенгицины A и B [107, 108]. Установлено, что характеризующиеся выраженной противогрибковой активностью итурин A, микосубтилин, *бацилломицины* L и D, сурфактин и фенгицин образуют в модельных липидных мембранах ионные каналы [109–114]. Однако следует отметить, что детальная характеристика образуемых липопептидами ионных каналов до сих пор не проведена, в литературе можно обнаружить лишь отрывочные сведения. Так, считается, что процесс формирования пор подразумевает самоассоциацию липопептидных молекул, однако кооперативность действия показана только для сурфактина и фенгицина [112, 114]. Выявлено, что итуриновые каналы характеризуются слабой анионной, а сурфактиновые и фенгициновые — преимущественно катионной функцией [110, 112]. Обнаружено, что порообразующая активность сурфактина зависит от дипольного потенциала мембраны [113], а включение в состав бислоя холестерина потенцирует порообразующую способность итурина A и микосубтилина [110, 111].

Псевдомонады тоже синтезируют циклические липопептиды различной химической структуры,

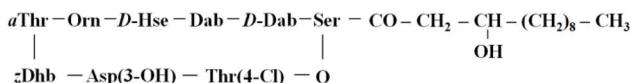
Сурфактин



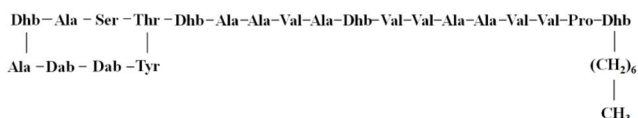
Толаазин



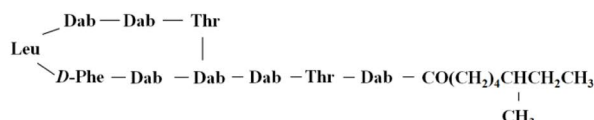
Сирингостатин А



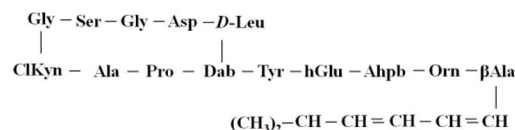
Сирингопептин 22А



Полимиксин В



Гауземицин А



Указаны только *D*-энантиомеры аминокислот. Orn – орнитин; Dab – 2,4-диаминомасляная кислота; Dhb – 2,3-дигидроаминомасляная кислота; Thr(4-Cl) – 4-хлортреонин; MeOGlu – 3-метилглутаминовая кислота; Kyn – кинуренин; Ahpb – 2-амино-4-гидрокси-4-фенилмасляная кислота.

Pseudomonas syringae синтезируют несколько видов фитотоксинов липопептидной природы: *сирингомицины*, *сирингостатины*, *сиринготоксины* и *сирингопептины* [116]. С точки зрения способности формировать поры наиболее охарактеризованным представителем является сирингомицин Е. Показано, что этот липопептид индуцирует стабильные потенциал-зависимые ионные каналы

многоуровневой проводимости с преимущественно анионной селективностью [117–119]. Установлено, что сирингомициновые каналы большей проводимости являются кластерами из нескольких элементарных субъединиц проводимости с общим воротным механизмом [119, 120]. Зависимость от липидного состава мембраны и разница в размере устьев поры указывают на то, что сирингомициновые каналы устроены по принципу липопептид-липидной тороидальной поры, меньшее устье которой образовано липопептидными молекулами, а большее — молекулами мембранных липидов (рис. 3г) [121, 122]. Также обнаружено, что на каналоформерную активность сирингомицина Е влияет дипольный потенциал мембраны [123, 124], а поры блокируются местными анестетиками аминоамидного ряда [125]. Аналогично сирингомицину Е ионные каналы образуют сирингостатин А, сиринготоксин В и сирингопептины 22А и 25А [126–130].

Способность формировать ион-проницаемые поры в липидных бислоях также показана для противогрибкового липопептида из *Nocardia asteroides*, пептидолипидина NA [109].

Наиболее изученными антибактериальными циклическими липопептидами являются полимиксины В и Е (также известный как колистин), полученные из бактерии *Paenibacillus polymyxa*. Полимиксины были открыты в 1974 г. и в настоящее время используются в качестве антибиотиков последней надежды для лечения инфекций, вызванных полирезистентными грамотрицательными бактериями, включая синегнойную палочку. Считается, что бактерицидное действие полимиксинов обусловлено их связыванием с липополисахаридами грамотрицательных бактерий и формированием в бактериальных мембранах ион-проницаемых пор [131–133]. Следует отметить высокую токсичность этих антибиотиков, которая тоже связана со способностью индуцировать поры в мембранах клеток-мишеней [134]. Данные, полученные с использованием плоских липидных бислоев, показывают, что полимиксин В преимущественно взаимодействует с отрицательно заряженными мембранами, причем, вероятно, димер и гексамер липопептида участвует в образовании пор в фосфолипидных и липополисахарид-обогащенных бислоях соответственно [135, 136]. Порообразующая способность полимиксина В существенно зависит от формы мембранных липидов, что свидетельствует о том, что антибиотик образует тороидальные липопептид-липидные поры (рис. 3г) [136]. Было показано, что модификаторы, уменьшающие дипольный потенциал мембраны, потенцируют образование пор полимиксином В [136].

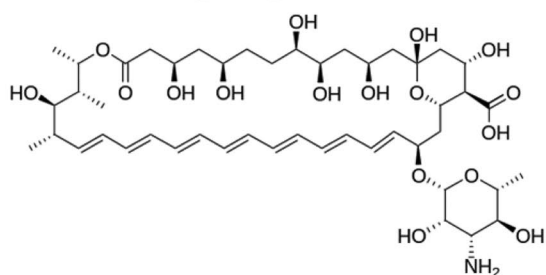
Малацидины относятся к семейству отрицательно заряженных липопептидных антибиотиков, которые действуют на бактерии кальций-зависимым образом. Даптомицин, самый известный представитель этого семейства, является одним из препаратов последней инстанции для лечения инфекций, вызванных грамположительными бактериями. В 1985 г. этот антибиотик был впервые выделен из *Streptomyces roseosporus*, и только в 2003 г. одобрен FDA для использования. Несмотря на то что порообразующая активность даптомицина широко обсуждается в литературе, большинство сведений получено в ходе экспериментов по изучению проницаемости липосом для флуоресцентных красителей и калия, а реальные каналоподобные флуктуации тока, индуцированные этим липопептидом, продемонстрированы только в нескольких исследованиях с использованием плоских липидных бислоев. Установлено, что в присутствии кальция даптомицин образует потенциал-чувствительные олигомерные поры различной проводимости [137]. Наименьшей единицей проводимости, вероятно, является димер; однако чаще всего в мембране функционируют проводящие олигомеры большего порядка (тетрамеры и пентамеры). Увеличение толерантности к порообразующему действию даптомицина с ростом содержания кардиолипина в модельных и клеточных мембранах [138] может указывать на то, что этот циклический липопептид формирует тороидальные липопептид-липидные поры (рис. 3г).

Недавно обнаружено, что циклические липопептиды из стрептомицет *гауземицины* А и В, проявляющие многообещающую активность в отношении резистентных штаммов грамположительных бактерий, также реализуют свое антибактериальное действие посредством образования ион-проницаемых пор, причем их способность формировать каналы зависит от вида мембранообразующих липидов и присутствия ионов кальция [139, 140].

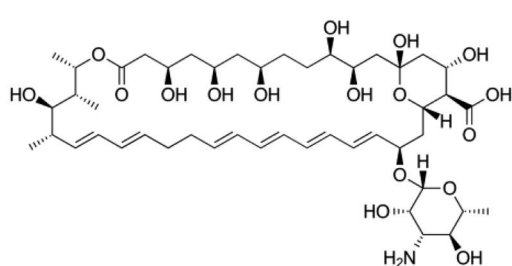
3. Порообразующие агенты непептидной природы

Полиеновые макролидные антибиотики — это большой класс продуцируемых актиномицетами соединений непептидной природы. Химическая структура некоторых представителей показана на рис. 5. Основу молекул этих антибиотиков составляет макролидное кольцо, содержащее жесткую гидрофобную полиеновую цепь (как правило, состоящую из нескольких сопряженных двойных связей, число которых является основным критерием при классификации соединений) и гидрофильную цепь, богатую гидроксильными радикалами.

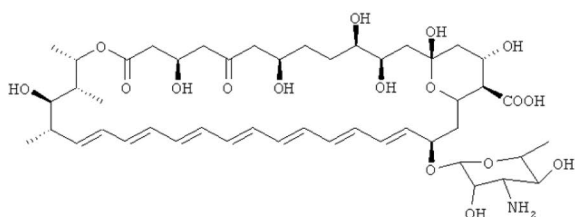
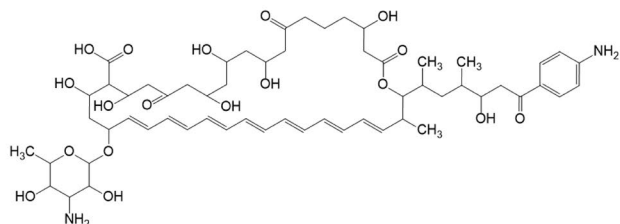
Амфотерицин В



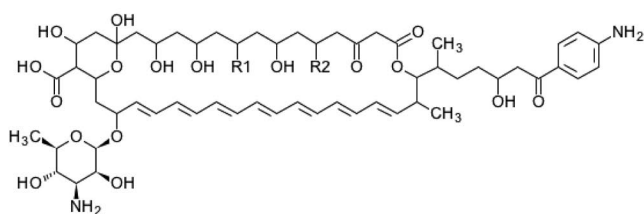
Нистатин



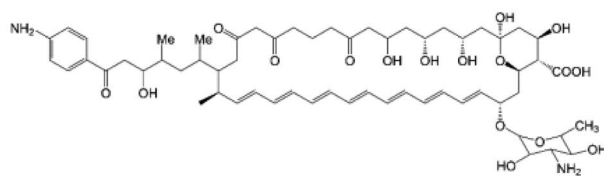
Микогептин

Леворин А₂

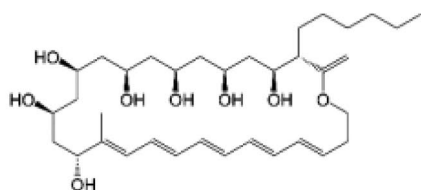
Трихомицин



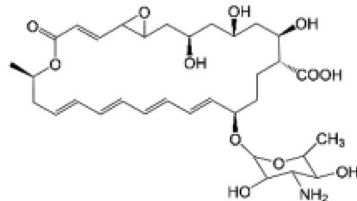
Кандицидин



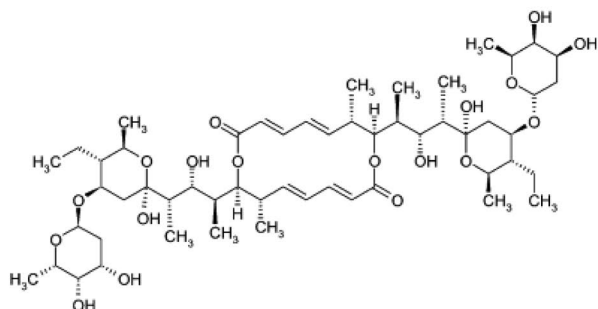
Филипин



Ауреофусцин



Элайофилин



Бетиколин 3

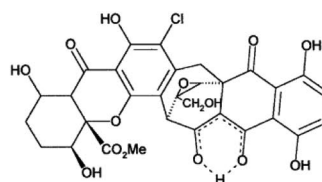


Рис. 5. Химическая структура порообразующих антимикробных агентов непептидной природы: амфотерицина В, нистатина, микогептина, леворина А₂, трихомицина, кандицидина, филипина, ауреофусцина, элайофилина и бетиколина 3.

Полиеновые макролиды являются самыми эффективными противогрибковыми препаратами, которые используются для лечения системных микозов уже несколько десятилетий. Использование полиеновых антибиотиков в терапевтических целях сопряжено с повышенным риском развития большого числа серьезных побочных эффектов, таких как нефропатия, анемия, тромбофлебит и аритмия [141, 142].

Все исследователи сходятся во мнении, что противогрибковое действие полиеновых антибиотиков определяется их мембранной активностью, а ключевым фактором является присутствие стерина в мембранах клеток-мишеней. Так, наличие эргостерина в мембранах патогенных грибов определяет антифунгальную, а присутствие холестерина в мембранах клеток млекопитающих — токсическую активность препаратов. Причем сродство полиеновых антибиотиков к эргостерину выше, чем к холестерину, но терапевтическое окно, обусловленное этой разницей, не так велико, что определяет высокую токсичность этих препаратов и возможность их использования только в качестве антибиотиков «последней надежды». Главные расхождения во взглядах исследователей в основном касаются молекулярных механизмов мембранного действия полиеновых макролидов. Доминирующая концепция основана на нарушении водно-электролитного баланса при формировании этими агентами трансмембранных пор [143], а альтернативная гипотеза связывает нарушение жизнедеятельности клеток-мишеней с экстракцией полиенами мембранных стерина [144, 145].

Дискретные каналоподобные флуктуации тока, протекающего через плоские липидные бислои, обработанные наиболее часто используемыми в клинической практике полиеновыми антибиотиками амфотерицином В и нистатином, впервые продемонстрированы в работе Ермишкина с коллегами в 1976 г. [146]. Впоследствии способность формировать поры также выявлена у микогептина, леворина А₂, трихомицина, кандицидина, филипина, ауреофуцина и элайофилина [147–149].

Точная архитектура образуемых полиеновыми антибиотиками пор до сих пор остается предметом для научных дискуссий. Принято думать, что после адсорбции на мембране молекулы полиенов связываются со стеринами, а затем образовавшиеся полиен-стериновые комплексы (по разным оценкам от 6 до 8) за счет электростатических взаимодействий между молекулами антибиотика формируют цилиндрическую «полупору» по принципу «бочонка». В этом случае остатки микозаминов и карбоксильные группы

амфотерицина В и нистатина, ориентированных перпендикулярно плоскости мембраны, оказываются обращенными в водную фазу, гидроксильные группы гидрофильной цепи выстилают водную пору, а полиеновые фрагменты взаимодействуют с молекулами стерина [147]. В случае введения антибиотика только с одной стороны мембраны полупора формирует асимметричный канал с липидным устьем с противоположной стороны бислоя [150–152]. Для описания структуры асимметричного полиенового канала можно использовать модель, предложенную для сирингомицина Е (рис. 3г). При введении амфотерицина В или нистатина с обеих сторон липидного бислоя две полупоры в противоположных липидных моно слоях ассоциируют путем образования водородных связей между гидроксильными группами, образуя симметричный канал подобно тому, как происходит димеризация грамицидина А (рис. 3а) [143, 151, 153, 154]. Пороговые концентрации антибиотика, необходимые для наблюдения асимметричных и симметричных полиеновых каналов, а также их анион-катионная специфичность различны [151, 154, 155]. Проводимость одиночных анион-селективных симметричных амфотерициновых каналов является функцией дипольного потенциала мембраны [156, 157], а асимметричные катион-специфичные амфотерициновые и нистатиновые каналы, благодаря наличию липидного устья с положительной спонтанной кривизной, чувствительны к изменению эластических свойств мембраны при введении модификаторов [158–160].

Бетиколины представляют собой группу из продуцируемых грибом *Cercospora beticola* непептидных фитотоксинов периленихиноновой природы, которые также проявляют антимикробную активность. На рис. 5 представлена химическая структура бетиколина 3. Показано, что бетиколины формируют в плоских липидных бислоях Mg^{2+} -зависимые слабоселективные ионные каналы с множественными уровнями проводимости [161, 162]. Многоуровневая проводимость бетиколиновых каналов обусловлена кластерной организацией элементарных проводящих субъединиц. В литературе нет точных сведений об устройстве бетиколиновых каналов; выдвинуто предположение о том, что трансмембранные поры образуются при ассоциации нескольких димеров бетиколина в проводящую трубчатую структуру [161].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка методов создания искусственных моделей клеточных мембран во многом определила прогресс в изучении механизмов антимикробного

действия экзогенных соединений. Рассмотренные в настоящем обзоре исследования, посвященные порообразующей активности различных антимикробных соединений природного происхождения, указывают на ключевую роль липидного состава мембран клеток-мишеней. Так, наличие отрицательно заряженных липидов в составе бактериальных мембран способствует адсорбции, как правило, положительно заряженных антимикробных пептидов на поверхности и обеспечивает их функционально значимый фолдинг (в частности, приобретение α -спиральной конформации). Другими важными факторами являются толщина таргетной мембраны, которая определяет разницу между толщиной углеводородного кора липидного бислоя и длиной гидрофобного участка порообразующей структуры в открытом состоянии, а также присутствие неламеллярных липидов, способных уменьшить энергетическую стоимость деформации мембраны в случае несоответствия. Это дает основание рассматривать липиды мембран клеток-мишеней как молекулярные шапероны, обеспечивающие процесс формирования пор антимикробными агентами. Кроме того, благодаря наличию заряда и (или) достаточно высокого дипольного момента у большинства антимикробных соединений, их каналообразующая активность может регулироваться дипольным потенциалом мембраны. Таким образом, модификаторы мембран, способные существенным образом изменять эластические свойства липидного матрикса и дипольный потенциал мембраны, могут быть агонистами порообразующей активности антимикробных агентов, т.е. могут быть использованы в комбинированной терапии для увеличения терапевтического индекса лекарственного препарата, что чрезвычайно важно как с точки зрения поиска путей решения проблемы высокой токсичности порообразующих антибиотиков, так и борьбы с устойчивыми штаммами патогенных микроорганизмов. Дальнейшие изыскания в этой области, в том числе с использованием плоских липидных бислоев, могут способствовать лучшему пониманию закономерностей, лежащих в основе формирования ионных каналов экзогенными соединениями, и выяснению особенностей молекулярного ландшафта, характеризующего эти процессы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-10023).

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит описания каких-либо

исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andreoli T.E. 1974. Planar lipid bilayer membranes. *Methods Enzymol.* **32**, 513–539.
2. Hanke W., Schlue W.-R. 1993. Biochemical preparations for planar lipid bilayer experiments. In: *Planar Lipid Bilayers*. Hanke W., Schlue W.-R. Elsevier: Academic press limited, p. 24–59.
3. Mueller P., Rudin D.O., Tien H.Ti., Wescott W.C. 1962. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature*. **194**, 979–980. doi 10.1038/194979a0
4. Mueller P., Rudin D.O. 1986. Induced excitability in reconstituted cell membrane structure. *J. Theoret. Biol.* **4**, 268–280.
5. Tosaka T., Kamiya K. 2023. Function Investigations and Applications of membrane proteins on artificial lipid membranes. *Int. J. Mol. Sci.* **24** (8), 7231. doi 10.3390/ijms24087231
6. White S.H. 1978. Formation of “solvent-free” black lipid bilayer membranes from glyceryl monooleate dispersed in squalene. *Biophys. J.* **23** (3), 337–347. doi 10.1016/S0006-3495(78)85453-8
7. White S.H. 1974. Temperature-dependent structural changes in planar bilayer membranes: solvent “freeze-out”. *Biochim. Biophys. Acta.* **356** (1), 8–16. doi 10.1016/0005-2736(74)90289-2
8. Vodyanoy V., Murphy R.B. 1982. Solvent-free lipid bimolecular membranes of large surface area. *Biochim. Biophys. Acta.* **687** (2), 189–194. doi 10.1016/0005-2736(82)90545-4
9. Montal M., Mueller P. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69** (12), 3561–3566. doi 10.1073/pnas.69.12.3561
10. Funakoshi K., Suzuki H., Takeuchi S. 2006. Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis. *Anal. Chem.* **78** (24), 8169–8174. doi 10.1021/ac0613479
11. Oiki S., Iwamoto M. 2018. Lipid bilayers manipulated through monolayer technologies for studies of channel-membrane interplay. *Biol. Pharm. Bull.* **41** (3), 303–311. doi 10.1248/bpb.b17-00708
12. Coronado R., Latorre R. 1983. Phospholipid bilayers made from monolayers on patch-clamp pipettes. *Biophys. J.* **43** (2), 231–236. doi 10.1016/S0006-3495(83)84343-4
13. Sarges R., Witkop B. Gramicidin A. 1965. V. The structure of valine- and isoleucine-gramicidin A. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 2011–2020. doi 10.1021/ja01087a027
14. Sarges R., Witkop B. Gramicidin A. 1965. VII. The structure of valine- and isoleucine-gramicidin B. *J.*

- Am. Chem. Soc.* **87**, 2027–2030.
doi 10.1021/ja01087a029
15. Urry D.W. 1971. The gramicidin A transmembrane channel: a proposed pi(L,D) helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **68** (3), 672–676. doi 10.1073/pnas.68.3.672
 16. Urry D.W., Long M.M., Jacobs M., Harris R.D. 1975. Conformation and molecular mechanisms of carriers and channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **264**, 203–220. doi 10.1111/j.1749-6632.1975.tb31484.x
 17. Veatch W.R., Fossel E.T., Blout E.R. 1974. The conformation of gramicidin A. *Biochemistry*. **13** (26), 5249–5256. doi 10.1021/bi00723a001
 18. Hladky S.B., Haydon D.A. 1970. Discreteness of conductance change in bimolecular lipid membranes in the presence of certain antibiotics. *Nature*. **225** (5231), 451–453. doi 10.1038/225451a0
 19. Antonov V.F., Petrov V.V., Molnar A.A., Predvoditelev D.A., Ivanov A.S. 1980. The appearance of single-ion channels in unmodified lipid bilayer membranes at the phase transition temperature. *Nature*. **283** (5747), 585–586. doi 10.1038/283585a0
 20. Elliott J.R., Needham D., Dilger J.P., Brandt O., Haydon D.A. 1985. A quantitative explanation of the effects of some alcohols on gramicidin single-channel lifetime. *Biochim. Biophys. Acta*. **814** (2), 401–404. doi 10.1016/0005-2736(85)90462-6
 21. Krasne S., Eisenman G., Szabo G. 1971. Freezing and melting of lipid bilayers and the mode of action of nonactin, valinomycin, and gramicidin. *Science*. **174** (4007), 412–415. doi 10.1126/science.174.4007.412
 22. Roeske R.W., Hrinio-Pavlina T.P., Pottorf R.S., Bridal T., Jin X.Z., Busath D. 1989. Synthesis and channel properties of [Tau 16]gramicidin A. *Biochim. Biophys. Acta*. **982** (2), 223–227. doi 10.1016/0005-2736(89)90058-8
 23. O'Connell A.M., Koeppe R.E.2nd, Andersen O.S. 1990. Kinetics of gramicidin channel formation in lipid bilayers: Transmembrane monomer association. *Science*. **250** (4985), 1256–1259. doi 10.1126/science.1700867
 24. Kelkar D.A., Chattopadhyay A. 2007. The gramicidin ion channel: a model membrane protein. *Biochim. Biophys. Acta*. **1768** (9), 2011–2025. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.05.011.
 25. Sun Z., Barboiu M. 2019. Artificial Gramicidins. *Front. Chem.* **7**, 611. doi 10.3389/fchem.2019.00611.
 26. Myers V.B., Haydon D.A. 1972. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. II. The ion selectivity. *Biochim. Biophys. Acta*. **274** (2), 313–322. doi 10.1016/0005-2736(72)90179-4
 27. Urban B.W., Hladky S.B., Haydon D.A. 1980. Ion movements in gramicidin pores. An example of single-file transport. *Biochim. Biophys. Acta*. **602** (2), 331–354. doi 10.1016/0005-2736(80)90316-8
 28. Seoh S.A., Busath D. 1993. The permeation properties of small organic cations in gramicidin A channels. *Biophys. J.* **64** (4), 1017–1028. doi 10.1016/S0006-3495(93)81467-X
 29. Bamberg E., Läuger P. 1977. Blocking of the gramicidin channel by divalent cations. *J. Membr. Biol.* **35**, 351–375. doi 10.1007/BF01869959
 30. Hemsley G., Busath D. 1991. Small iminium ions block gramicidin channels in lipid bilayers. *Biophys. J.* **59** (4), 901–907. doi 10.1016/S0006-3495(91)82303-7
 31. Rudnev V.S., Ermishkin L.N., Rovin Iu.G. 1980. Effect of bilayer lipid membrane thickness, composition, and tension on gramicidin channel parameters. *Biofizika*. **25** (5), 857–858.
 32. Hwang T.C., Koeppe R.E.2nd, Andersen O.S. 2003. Genistein can modulate channel function by a phosphorylation-independent mechanism: Importance of hydrophobic mismatch and bilayer mechanics. *Biochemistry*. **42** (46), 13646–13658. doi 10.1021/bi034887y
 33. Kolb H.A., Bamberg E. 1977. Influence of membrane thickness and ion concentration on the properties of the gramicidin a channel. Autocorrelation, spectral power density, relaxation and single-channel studies. *Biochim. Biophys. Acta*. **464** (1), 127–141. doi 10.1016/0005-2736(77)90376-5
 34. de Groot B.L., Tieleman D.P., Pohl P., Grubmüller H. 2002. Water permeation through gramicidin A: Desformylation and the double helix: A molecular dynamics study. *Biophys. J.* **82** (6), 2934–2942. doi 10.1016/S0006-3495(02)75634-8
 35. Weinrich M., Worcester D.L., Bezrukov S.M. 2017. Lipid nanodomains change ion channel function. *Nanoscale*. **9** (35), 13291–13297. doi 10.1039/c7nr03926c
 36. Lundbaek J.A., Andersen O.S. 1994. Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers. *J. Gen. Physiol.* **104** (4), 645–673. doi 10.1085/jgp.104.4.645
 37. Bezrukov S.M. 2000. Functional consequences of lipid packing stress *Cur. Opin. Colloid Inter. Sci.* **5** (3–4), 237–243. doi 10.1016/S1359-0294(00)00061-3
 38. Rostovtseva T.K., Weinrich M., Jacobs D., Rosencrans W.M., Bezrukov S.M. 2024. Dimeric tubulin modifies mechanical properties of lipid bilayer, as probed using gramicidin A channel. *Int. J. Mol. Sci.* **25** (4), 2204. doi 10.3390/ijms25042204
 39. Rostovtseva T.K., Aguilera V.M., Vodyanoy I., Bezrukov S.M., Parsegian V.A. 1998. Membrane surface-charge titration probed by gramicidin A channel conductance. *Biophys. J.* **75** (4), 1783–1792. doi 10.1016/S0006-3495(98)77620-9
 40. Rostovtseva T.K., Petrache H.I., Kazemi N., Hassan-zadeh E., Bezrukov S.M. 2008. Interfacial polar interactions affect gramicidin channel kinetics. *Biophys. J.* **94** (4), L23–25. doi 10.1529/biophysj.107.120261
 41. Rokitskaya T.I., Antonenko Y.N., Kotova E.A. 1997. Effect of the dipole potential of a bilayer lipid membrane on gramicidin channel dissociation kinetics.

- Biophys. J.* **73** (2), 850–854.
doi 10.1016/S0006-3495(97)78117-7
42. Duffin R.L., Garrett M.P., Flake K.B., Durrant J.D., Busath D.D. 2003. Modulation of lipid bilayer interfacial dipole potential by phloretin, RH421, and 6-ketocholestanol as probed by gramicidin channel conductance. *Langmuir*. **19**, 1439–1442.
doi 10.1021/la025892q
 43. Efimova S.S., Zakharova A.A., Ostroumova O.S. 2020. Alkaloids modulate the functioning of ion channels produced by antimicrobial agents via an influence on the lipid host. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 537.
doi 10.3389/fcell.2020.00537
 44. Efimova S.S., Ostroumova O.S. 2021. Is the membrane lipid matrix a key target for action of pharmacologically active plant saponins? *Int. J. Mol. Sci.* **22** (6), 3167. doi 10.3390/ijms22063167
 45. Sawyer D.B., Williams L.P., Whaley W.L., Koeppe R.E.2nd, Andersen O.S. 1990. Gramicidins A, B, and C form structurally equivalent ion channels. *Biophys. J.* **58** (5), 1207–1212.
doi 10.1016/S0006-3495(90)82461-9
 46. Williams L.P., Narcessian E.J., Andersen O.S., Waller G.R., Taylor M.J., Lazenby J.P., Hinton J.F., Koeppe R.E.2nd. 1992. Molecular and channel-forming characteristics of gramicidin K's: A family of naturally occurring acylated gramicidins. *Biochemistry*. **31** (32), 7311–7319. doi 10.1021/bi00147a015
 47. Mueller P., Rudin D. 1968. Action potentials induced in biomolecular lipid membranes. *Nature*. **217**, 713–719. doi 10.1038/217713a0
 48. Menestrina G., Voges K.P., Jung G., Boheim G. 1986. Voltage-dependent channel formation by rods of helical polypeptides. *J. Membr. Biol.* **93** (2), 111–132.
doi 10.1007/BF01870804
 49. Duclohier H., Molle G., Dugast J.Y., Spach G. 1992. Prolines are not essential residues in the “barrel-stave” model for ion channels induced by alamethicin analogues. *Biophys. J.* **63** (3), 868–873.
doi 10.1016/S0006-3495(92)81637-5
 50. Rink T., Bartel H., Jung G., Bannwarth W., Boheim G. 1994. Effects of polycations on ion channels formed by neutral and negatively charged alamethicins. *Eur. Biophys. J.* **23** (3), 155–165.
doi 10.1007/BF01007607
 51. Molle G., Dugast J.Y., Spach G., Duclohier H. 1996. Ion channel stabilization of synthetic alamethicin analogs by rings of inter-helix H-bonds. *Biophys. J.* **70** (4), 1669–1675. doi 10.1016/S0006-3495(96)79729-1
 52. Asami K., Okazaki T., Nagai Y., Nagaoka Y. 2002. Modifications of alamethicin ion channels by substitution of Glu-7 for Gln-7. *Biophys. J.* **83** (1), 219–228.
doi 10.1016/S0006-3495(02)75163-1
 53. Boheim G., Hanke W., Jung G. 1983. Alamethicin pore formation: Voltage-dependent flip-flop of α -helix dipoles. *Biophys. Struct. Mechan.* **9**, 181–191.
 54. Luchian T., Mereuta L. 2006. Phlorizin- and 6-ketocholestanol-mediated antagonistic modulation of alamethicin activity in phospholipid planar membranes. *Langmuir*. **22** (20), 8452–8457. doi 10.1021/la0613777
 55. Stankowski S., Schwarz U.D., Schwarz G. 1988. Voltage-dependent pore activity of the peptide alamethicin correlated with incorporation in the membrane: Salt and cholesterol effects. *Biochim. Biophys. Acta*. **941** (1), 11–18. doi 10.1016/0005-2736(88)90208-8
 56. Aguilera V.M., Bezrukov S.M. 2001. Alamethicin channel conductance modified by lipid charge. *Eur. Biophys. J.* **30** (4), 233–241.
doi 10.1007/s002490100145
 57. Duclohier H., Alder G., Kociolk K., Leplawy M.T. 2003. Channel properties of template assembled alamethicin tetramers. *J. Pept. Sci.* **9** (11–12), 776–783.
doi 10.1002/psc.523
 58. Apetrei A., Mereuta L., Luchian T. 2009. The RH 421 styryl dye induced, pore model-dependent modulation of antimicrobial peptides activity in reconstituted planar membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1790** (8), 809–816. doi 10.1016/j.bbagen.2009.04.002
 59. Balaram P., Krishna K., Sukumar M., Mellor I.R., Sansom M.S. 1992. The properties of ion channels formed by zervamicins. *Eur. Biophys. J.* **21** (2), 117–128. doi 10.1007/BF00185426
 60. Molle G., Duclohier H., Spach G. 1987. Voltage-dependent and multi-state ionic channels induced by trichorzianines, anti-fungal peptides related to alamethicin. *FEBS Lett.* **224** (1), 208–212.
doi 10.1016/0014-5793(87)80449-0
 61. Duval D., Cosette P., Rebuffat S., Duclohier H., Bodo B., Molle G. 1998. Alamethicin-like behaviour of new 18-residue peptaibols, trichorzins PA. Role of the C-terminal amino-alcohol in the ion channel forming activity. *Biochim. Biophys. Acta*. **1369** (2), 309–319. doi 10.1016/S0005-2736(97)00235-6
 62. Koide N., Asami K., Fujita T. 1997. Ion-channels formed by hypelcins, antibiotic peptides, in planar bilayer lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1326** (1), 47–53. doi 10.1016/S0005-2736(97)00005-9
 63. Shinkarev Z.O., Balashova T.A., Efremov R.G., Yakimenko Z.A., Ovchinnikova T.V., Raap J., Arseniev A.S. 2002. Spatial structure of zervamicin IIB bound to DPC micelles: Implications for voltage-gating. *Biophys. J.* **82** (2), 762–771.
doi 10.1016/S0006-3495(02)75438-6
 64. Rebuffat S., Duclohier H., Auvin-Guette C., Molle G., Spach G., Bodo B. 1992. Membrane-modifying properties of the pore-forming peptaibols saturnisporin SA IV and harzianin HA V. *FEMS Microbiol. Immunol.* **5** (1–3), 151–160.
doi 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05886.x
 65. Duclohier H., Alder G.M., Bashford C.L., Brückner H., Chugh J.K., Wallace B.A. 2004. Conductance studies on trichotoxin_A50E and implications

- for channel structure. *Biophys. J.* **87** (3), 1705–1710. doi 10.1529/biophysj.104.040659
66. Duclohier H., Snook C.F., Wallace B.A. 1998. Anti-amoebein can function as a carrier or as a pore-forming peptaibol. *Biochim. Biophys. Acta.* **1415** (1), 255–260. doi 10.1016/S0005-2736(98)00184-9
 67. Duclohier H. 2004. Helical kink and channel behaviour: A comparative study with the peptaibols alamethicin, trichotoxin and anti-amoebein. *Eur. Biophys. J.* **33** (3), 169–174. doi 10.1007/s00249-003-0383-y
 68. Bessin Y., Saint N., Marri L., Marchini D., Molle G. 2004. Antibacterial activity and pore-forming properties of ceratotoxins: A mechanism of action based on the barrel stave model. *Biochim. Biophys. Acta.* **1667** (2), 148–156. doi 10.1016/j.bbame.2004.09.011
 69. Saint N., Marri L., Marchini D., Molle G. 2003. The antibacterial peptide ceratotoxin A displays alamethicin-like behavior in lipid bilayers. *Peptides.* **24** (11), 1779–1784. doi 10.1016/j.peptides.2003.09.015
 70. Christensen B., Fink J., Merrifield R.B., Mauzerall D. 1988. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85** (14), 5072–5076. doi 10.1073/pnas.85.14.5072
 71. Efimova S.S., Schagina L.V., Ostroumova O.S. 2014. Channel-forming activity of cecropins in lipid bilayers: Effect of agents modifying the membrane dipole potential. *Langmuir.* **30** (26), 7884–7892. doi 10.1021/la501549v
 72. Tosteson M.T., Alvarez O., Hubbell W., Bieganski R.M., Attenbach C., Caporales L.H., Levy J.J., Nutt R.F., Rosenblatt M., Tosteson D.C. 1990. Primary structure of peptides and ion channels. Role of amino acid side chains in voltage gating of melittin channels. *Biophys. J.* **58** (6), 1367–1375. doi 10.1016/S0006-3495(90)82483-8
 73. Manna M., Mukhopadhyay C. 2009. Cause and effect of melittin-induced pore formation: a computational approach. *Langmuir.* **25** (20), 12235–12242. doi 10.1021/la902660q
 74. Leveritt J.M.3rd, Pino-Angeles A., Lazaridis T. 2015. The structure of a melittin-stabilized pore. *Biophys. J.* **108** (10), 2424–2426. doi 10.1016/j.bpj.2015.04.006
 75. Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* **81** (3), 1475–1485. doi 10.1016/S0006-3495(01)75802-X
 76. Wade D., Boman A., Wählin B., Drain C.M., Andreu D., Boman H.G., Merrifield R.B. 1990. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87** (12), 4761–4765. doi 10.1073/pnas.87.12.4761
 77. Juvvadi P., Vunnam S., Merrifield E.L., Boman H.G., Merrifield R.B. 1996. Hydrophobic effects on antibacterial and channel-forming properties of cecropin A-melittin hybrids. *J. Pept. Sci.* **2** (4), 223–232. doi 10.1002/psc.63
 78. Duclohier H., Molle G., Spach G. 1989. Antimicrobial peptide magainin I from *Xenopus* skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers. *Biophys. J.* **56** (5), 1017–1021. doi 10.1016/S0006-3495(89)82746-8
 79. Gallucci E., Meleleo D., Micelli S., Picciarelli V. 2003. Magainin 2 channel formation in planar lipid membranes: The role of lipid polar groups and ergosterol. *Eur. Biophys. J.* **32** (1), 22–32. doi 10.1007/s00249-002-0262-y
 80. Cruciani R.A., Barker J.L., Durell S.R., Raghunathan G., Guy H.R., Zasloff M., Stanley E.F. 1992. Magainin 2, a natural antibiotic from frog skin, forms ion channels in lipid bilayer membranes. *Eur. J. Pharmacol.* **226** (4), 287–296. doi 10.1016/0922-4106(92)90045-w
 81. Ludtke S.J., He K., Heller W.T., Harroun T.A., Yang L., Huang H.W. 1996. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry.* **35** (43), 13723–13728. doi 10.1021/bi9620621
 82. Matsuzaki K., Nakamura A., Murase O., Sugishita K., Fujii N., Miyajima K. 1997. Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge. *Biochemistry.* **36** (8), 2104–2111. doi 10.1021/bi961870p
 83. Allende D., Simon S.A., McIntosh T.J. 2005. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores. *Biophys. J.* **88**, 1828–1837. doi 10.1529/biophysj.104.049817
 84. Matsuzaki K., Sugishita K., Ishibe N., Ueha M., Nakata S., Miyajima K., Epand R.M. 1998. Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry.* **37** (34), 11856–11863. doi 10.1021/bi980539y
 85. Watanabe H., Kawano R. 2016. Channel current analysis for pore-forming properties of an antimicrobial peptide, magainin 1, using the droplet contact method. *Anal. Sci.* **32** (1), 57–60. doi 10.2116/analsci.32.57
 86. Duclohier H. 2006. Bilayer lipid composition modulates the activity of dermaseptins, polycationic antimicrobial peptides. *Eur. Biophys. J.* **35** (5), 401–409. doi 10.1007/s00249-006-0047-9
 87. Saint N., Cadiou H., Bessin Y., Molle G. 2002. Antibacterial peptide pleurocidin forms ion channels in planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1564** (2), 359–364. doi 10.1016/S0005-2736(02)00470-4
 88. Kagan B.L., Selsted M.E., Ganz T., Lehrer R.I. 1990. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87** (1), 210–214. doi 10.1073/pnas.87.1.210
 89. Kagan B.L., Ganz T., Lehrer R.I. 1994. Defensins: A family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology.* **87** (1–3), 131–149. doi 10.1016/0300-483x(94)90158-9
 90. Salay L.C., Procopio J., Oliveira E., Nakaie C.R., Schreier S. 2004. Ion channel-like activity of the antimicrobial peptide tritriptin in planar lipid bilayers.

- FEBS Lett.* **565** (1–3), 171–175.
doi 10.1016/j.febslet.2004.03.093
91. Capone R., Mustata M., Jang H., Arce F.T., Nussinov R., Lal R. 2010. Antimicrobial protegrin-1 forms ion channels: Molecular dynamic simulation, atomic force microscopy, and electrical conductance studies. *Biophys. J.* **98** (11), 2644–2652.
doi 10.1016/j.bpj.2010.02.024
 92. Sokolov Y., Mirzabekov T., Martin D.W., Lehrer R.I., Kagan B.L. 1999. Membrane channel formation by antimicrobial protegrins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1420** (1–2), 23–29. doi 10.1016/s0005-2736(99)00086-3
 93. Gross E., Morell J.L. 1971. The structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.* **93** (18), 4634–4635.
doi 10.1021/ja00747a073
 94. Scherer K.M., Spille J.H., Sahl H.G., Grein F., Kubitschek U. 2015. The lantibiotic nisin induces lipid II aggregation, causing membrane instability and vesicle budding. *Biophys. J.* **108** (5), 1114–1124.
doi 10.1016/j.bpj.2015.01.020
 95. Wiedemann I., Breukink E., van Kraaij C., Kuipers O.P., Bierbaum G., de Kruijff B., Sahl H.G. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.* **276** (3), 1772–1779.
doi 10.1074/jbc.M006770200
 96. Brötz H., Josten M., Wiedemann I., Schneider U., Götz F., Bierbaum G., Sahl H.G. 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.* **30** (2), 317–327.
doi 10.1046/j.1365-2958.1998.01065.x
 97. Breukink E., Wiedemann I., van Kraaij C., Kuipers O.P., Sahl H.G., de Kruijff B. 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science.* **286** (5448), 2361–2364.
doi 10.1126/science.286.5448.2361
 98. Wiedemann I., Benz R., Sahl H.G. 2004. Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: a black lipid membrane study. *J. Bacteriol.* **186** (10), 3259–3261. doi 10.1128/JB.186.10.3259-3261.2004
 99. Sahl H.G., Kordel M., Benz R. 1987. Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. *Arch. Microbiol.* **149** (2), 120–124.
doi 10.1007/BF00425076
 100. Giffard C.J., Dodd H.M., Horn N., Ladha S., Mackie A.R., Parr A., Gasson M.J., Sanders D. 1997. Structure-function relations of variant and fragment nisins studied with model membrane systems. *Biochemistry.* **36** (13), 3802–3810. doi 10.1021/bi962506t
 101. Chernyshova D.N., Tyulin A.A., Ostroumova O.S., Efimova S.S. 2022. Discovery of the potentiator of the pore-forming ability of lantibiotic nisin: Perspectives for anticancer therapy. *Membranes.* **12** (11), 1166.
doi 10.3390/membranes12111166
 102. Efimova S.S., Shekunov E.V., Chernyshova D.N., Zakharova A.A., Ostroumova O.S. 2022. The dependence of the channel-forming ability of lantibiotics on the lipid composition of the membranes. *Biochem. (Moscow), Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol.* **16**, 144–150. doi 10.1134/s1990747822020039
 103. Maget-Dana R., Peypoux F. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology.* **87** (1–3), 151–174. doi 10.1016/0300-483x(94)90159-7
 104. Bonmatin J.M., Laprévotte O., Peypoux F. 2003. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: Iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **6** (6), 541–556.
doi 10.2174/138620703106298716
 105. Koumoutsis A., Chen X.H., Henne A., Liesegang H., Hitzeroth G., Franke P., Vater J., Borriss R. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* **186** (4), 1084–1096.
doi 10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004
 106. Huszcza E., Burczyk B. 2006. Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* **61** (9–10), 727–733. doi 10.1515/znc-2006-9-1020
 107. Kim P.I., Bai H., Bai D., Chae H., Chung S., Kim Y., Park R., Chi Y.T. 2004. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J. Appl. Microbiol.* **97** (5), 942–949.
doi 10.1111/j.1365-2672.2004.02356.x
 108. Tsuge K., Ano T., Hirai M., Nakamura Y., Shoda M. 1999. The genes degQ, pps, and lpa-8 (sfp) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43** (9), 2183–2192. doi 10.1128/AAC.43.9.2183
 109. Maget-Dana R., Heitz F., Ptak M., Peypoux F., Guinand M. 1985. Bacterial lipopeptides induce ion-conducting pores in planar bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129** (3), 965–971.
doi 10.1016/0006-291x(85)91985-0
 110. Maget-Dana R., Ptak M., Peypoux F., Michel G. 1985. Pore-forming properties of iturin A, a lipopeptide antibiotic. *Biochim. Biophys. Acta.* **815** (3), 405–409. doi 10.1016/0005-2736(85)90367-0
 111. Maget-Dana R., Ptak M. 1990. Iturin lipopeptides: Interactions of mycosubtilin with lipids in planar membranes and mixed monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1023** (1), 34–40. doi 10.1016/0005-2736(90)90006-a
 112. Sheppard J.D., Jumarie C., Cooper D.G., Laprade R. 1991. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1064** (1), 13–23. doi 10.1016/0005-2736(91)90406-x
 113. Ostroumova O.S., Malev V.V., Ilin M.G., Schagina L.V. 2010. Surfactin activity depends on the membrane dipole potential. *Langmuir.* **26** (19), 15092–15097. doi 10.1021/la102691y

114. Zakharova A.A., Efimova S.S., Malev V.V., Ostroumova O.S. 2019. Fengycin induces ion channels in lipid bilayers mimicking target fungal cell membranes. *Sci. Rep.* **9** (1), 16034. doi 10.1038/s41598-019-52551-5
115. Cho K.H., Kim Y.K. 2003. Two types of ion channel formation of tolaasin, a *Pseudomonas* peptide toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **221** (2), 221–226. doi 10.1016/S0378-1097(03)00182-4
116. Takemoto J.Y. 1992. Bacterial phytotoxin syringomycin and its interaction with host membranes. In: *Molecular signals in plant-microbe communication*. Verma D.P.S. Boca Raton, Fla: CRC Press, p. 247–260.
117. Feigin A.M., Takemoto J.Y., Wangspa R., Teeter J.H., Brand J.G. 1996. Properties of voltage-gated ion channels formed by syringomycin E in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* **149** (1), 41–47. doi 10.1007/s002329900005
118. Schagina L.V., Kaulin Y.A., Feigin A.M., Takemoto J.Y., Brand J.G., Malev V.V. 1998. Properties of ionic channels formed by the antibiotic syringomycin E in lipid bilayers: Dependence on the electrolyte concentration in the bathing solution. *Membr. Cell Biol.* **12** (4), 537–555.
119. Kaulin Y.A., Schagina L.V., Bezrukov S.M., Malev V.V., Feigin A.M., Takemoto J.Y., Teeter J.H., Brand J.G. 1998. Cluster organization of ion channels formed by the antibiotic syringomycin E in bilayer lipid membranes. *Biophys. J.* **74** (6), 2918–2925. doi 10.1016/S0006-3495(98)77999-8
120. Ostroumova O.S., Malev V.V., Kaulin Y.A., Gurnev P.A., Takemoto J.Y., Schagina L.V. 2005. Voltage-dependent synchronization of gating of syringomycin E ion channels. *FEBS Lett.* **579** (25), 5675–5679. doi 10.1016/j.febslet.2005.08.087
121. Malev V.V., Schagina L.V., Gurnev P.A., Takemoto J.Y., Nestorovich E.M., Bezrukov S.M. 2002. Syringomycin E channel: A lipidic pore stabilized by lipopeptide? *Biophys. J.* **82** (4), 1985–1994. doi 10.1016/S0006-3495(02)75547-1
122. Ostroumova O.S., Gurnev P.A., Schagina L.V., Bezrukov S.M. 2007. Asymmetry of syringomycin E channel studied by polymer partitioning. *FEBS Lett.* **581** (5), 804–808. doi 10.1016/j.febslet.2007.01.063
123. Schagina L.V., Gurnev P.A., Takemoto J.Y., Malev V.V. 2003. Effective gating charge of ion channels induced by toxin syringomycin E in lipid bilayers. *Bioelectrochemistry*. **60** (1–2), 21–27. doi 10.1016/S1567-5394(03)00041-0
124. Ostroumova O.S., Kaulin Y.A., Gurnev P.A., Schagina L.V. 2007. Effect of agents modifying the membrane dipole potential on properties of syringomycin E channels. *Langmuir*. **23** (13), 6889–6892. doi 10.1021/la7005452
125. Zakharova A.A., Efimova S.S., Schagina L.V., Malev V.V., Ostroumova O.S. 2018. Blocking ion channels induced by antifungal lipopeptide syringomycin E with amide-linked local anesthetics. *Sci. Rep.* **8** (1), 11543. doi 10.1038/s41598-018-30077-6
126. Agner G., Kaulin Y.A., Gurnev P.A., Szabo Z., Schagina L.V., Takemoto J.Y., Blasko K. 2000. Membrane-permeabilizing activities of cyclic lipodepsipeptides, syringopeptin 22A and syringomycin E from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in human red blood cells and in bilayer lipid membranes. *Bioelectrochemistry*. **52** (2), 161–167. doi 10.1016/S0302-4598(00)00098-2
127. Dalla Serra M., Bernhart I., Nordera P., Di Giorgio D., Ballio A., Menestrina G. 1999. Conductive properties and gating of channels formed by syringopeptin 25A, a bioactive lipodepsipeptide from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, in planar lipid membranes. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **12** (5), 401–409. doi 10.1094/MPMI.1999.12.5.401
128. Carpaneto A., Dalla Serra M., Menestrina G., Fogliano V., Gambale F. 2002. The phytotoxic lipodepsipeptide syringopeptin 25A from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* forms ion channels in sugar beet vacuoles. *J. Membr. Biol.* **188** (3), 237–248. doi 10.1007/s00232-001-0187-x
129. Gur'nev F.A., Kaulin Iu.A., Tikhomirova A.V., Wangspa R., Takemoto D., Malev V.V., Shchagina L.V. 2002. Activity of toxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in model and cell membranes. *Tsitologiya*. **44** (3), 296–304.
130. Bensaci M.F., Gurnev P.A., Bezrukov S.M., Takemoto J.Y. 2011. Fungicidal activities and mechanisms of action of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* lipodepsipeptide syringopeptins 22A and 25A. *Front. Microbiol.* **2**, 216. doi 10.3389/fmicb.2011.00216
131. David S.A., Balasubramanian K.A., Mathan V.I., Balaram P. 1992. Analysis of the binding of polymyxin B to endotoxic lipid A and core glycolipid using a fluorescent displacement probe. *Biochim. Biophys. Acta*. **1165** (2), 147–152. doi 10.1016/0005-2760(92)90180-4
132. Mares J., Kumaran S., Gobbo M., Zerbo O. 2009. Interactions of lipopolysaccharide and polymyxin studied by NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **284** (17), 11498–11506. doi 10.1074/jbc.M806587200
133. Moore R.A., Bates N.C., Hancock R.E. 1986. Interaction of polycationic antibiotics with *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29** (3), 496–500. doi 10.1128/AAC.29.3.496
134. Kendig J.J., Erickson N., Galla H.J. 1980. Interaction of polymyxin with vertebrate peripheral nerve axons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97** (1), 75–80. doi 10.1016/S0006-291X(80)80136-7
135. Schröder G., Brandenburg K., Seydel U. 1992. Polymyxin B induces transient permeability fluctuations in asymmetric planar lipopolysaccharide/phospholipid bilayers. *Biochemistry*. **31** (3), 631–638. doi 10.1021/bi00118a001
136. Zakharova A.A., Efimova S.S., Ostroumova O.S. 2022. Lipid Microenvironment modulates the pore-forming

- ability of polymyxin B. *Antibiotics*. **11** (10), 1445. doi 10.3390/antibiotics11101445
137. Seydlová G., Sokol A., Lišková P., Konopásek I., Fišer R. 2018. Daptomycin pore formation and stoichiometry depend on membrane potential of target membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63** (1), e01589-18. doi 10.1128/AAC.01589-18
 138. Zhang T., Muraih J.K., Tishbi N., Herskowitz J., Victor R.L., Silverman J., Uwumarenogie S., Taylor S.D., Palmer M., Mintzer E. 2014. Cardiolipin prevents membrane translocation and permeabilization by daptomycin. *J. Biol. Chem.* **289** (17), 11584–11591. doi 10.1074/jbc.M114.554444
 139. Tyurin A.P., Alferova V.A., Paramonov A.S., Shuvalov M.V., Kudryakova G.K., Rogozhin E.A., Zhrebker A.Y., Brylev V.A., Chistov A.A., Baranova A.A., Biryukov M.V., Ivanov I.A., Prokhorenko I.A., Grammatikova N.E., Kravchenko T.V., Isakova E.B., Mirchink E.P., Gladkikh E.G., Svirshchevskaya E.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Kocharovskaya M.V., Kulyaeva V.V., Shashkov A.S., Tsvetkov D.E., Nifantiev N.E., Apt A.S., Majorov K.B., Efimova S.S., Ravin N.V., Nikolaev E.N., Ostroumova O.S., Katrukha G.S., Lapchinskaya O.A., Dontsova O.A., Terekhov S.S., Osterman I.A., Shenkarev Z.O., Korshun V.A. 2021. Gausemycins A,B: Cyclic lipoglycopeptides from *Streptomyces* sp.*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **60** (34), 18694–18703. doi 10.1002/anie.202104528
 140. Kravchenko T.V., Paramonov A.S., Kudzhaev A.M., Efimova S.S., Khorev A.S., Kudryakova G.K., Ivanov I.A., Chistov A.A., Baranova A.A., Krasilnikov M.S., Lapchinskaya O.A., Tyurin A.P., Ostroumova O.S., Smirnov I.V., Terekhov S.S., Dontsova O.A., Shenkarev Z.O., Alferova V.A., Korshun V.A. 2024. Gausemycin antibiotic family acts via Ca^{2+} -dependent membrane targeting. *J. Nat. Prod.* **87** (4), 664–674. doi 10.1021/acs.jnatprod.3c00612
 141. Craven P.C., Gremillion D.H. 1985. Risk factors of ventricular fibrillation during rapid amphotericin B infusion. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27** (5), 868–871. doi 10.1128/AAC.27.5.868
 142. Shigemi R., Fukuda M., Suzuki Y., Morimoto T., Ishii E. 2011. L-arginine is effective in stroke-like episodes of MELAS associated with the G13513A mutation. *Brain Dev.* **33** (6), 518–520. doi 10.1016/j.braindev.2010.07.013
 143. Andreoli T.E. 1974. The structure and function of amphotericin B-cholesterol pores in lipid bilayer membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **235**, 448–468. doi 10.1111/j.1749-6632.1974.tb43283.x
 144. Anderson T.M., Clay M.C., Cioffi A.G., Diaz K.A., Hisao G.S., Tuttle M.D., Nieuwkoop A.J., Comellas G., Maryum N., Wang S., Uno B.E., Wildeman E.L., Gonen T., Rienstra C.M., Burke M.D. 2014. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat. Chem. Biol.* **10** (5), 400–406. doi 10.1038/nchembio.1496
 145. Gray K.C., Palacios D.S., Dailey I., Endo M.M., Uno B.E., Wilcock B.C., Burke M.D. 2012. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109** (7), 2234–2239. doi 10.1073/pnas.1117280109
 146. Ermishkin L.N., Kasumov K.M., Potzeluyev V.M. 1976. Single ionic channels induced in lipid bilayers by polyene antibiotics amphotericin B and nystatine. *Nature*. **262** (5570), 698–699. doi 10.1038/262698a0
 147. Касумов Х.М. 2009. Структура и мембранная функция полиеновых макролидных антибиотиков. М.: Наука. 512 с.
 148. Shi Y.L., Wang W.P., Zou Y.C. Ionic channels formed in the lipid bilayer membranes by aureofuscin, a polyene antibiotics. *Sheng Li Xue Bao*. 1991. **43** (2), 128–133.
 149. Grigoriev P.A., Schlegel R., Gräfe U. 2001. Cation selective ion channels formed by macrodiolide antibiotic elaiophyllin in lipid bilayer membranes. *Bioelectrochemistry*. **54** (1), 11–15. doi 10.1016/s0302-4598(01)00102-7
 150. Kasumov Kh.M., Karakozov S.D. 1985. Effect of amphotericin B added to one side of a membrane. *Biofizika (Rus.)*. **30** (2), 281–284.
 151. Kleinberg M.E., Finkelstein A. 1984. Single-length and double-length channels formed by nystatin in lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* **80** (3), 257–269. doi 10.1007/BF01868444
 152. Umegawa Y., Yamamoto T., Dixit M., Funahashi K., Seo S., Nakagawa Y., Suzuki T., Matsuoka S., Tsuchikawa H., Hanashima S., Oishi T., Matsumori N., Shinoda W., Murata M. 2022. Amphotericin B assembles into seven-molecule ion channels: An NMR and molecular dynamics study. *Sci. Adv.* **8** (24), eabo2658. doi 10.1126/sciadv.abo2658
 153. Borisova M.P., Brutyan R.A., Ermishkin L.N. 1986. Mechanism of anion-cation selectivity of amphotericin B channels. *J. Membr. Biol.* **90** (1), 13–20. doi 10.1007/BF01869681
 154. Marty A., Finkelstein A. 1975. Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin, differences in its one-sided and two-sided action. *J. Gen. Physiol.* **65** (4), 515–526. doi 10.1085/jgp.65.4.515
 155. Brutyan R.A., McPhie P. 1996. On the one-sided action of amphotericin B on lipid bilayer membranes. *J. Gen. Physiol.* **107** (1), 69–78. doi 10.1085/jgp.107.1.69
 156. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Schagina L.V. 2012. Probing amphotericin B single channel activity by membrane dipole modifiers. *PLoS One*. **7** (1), e30261. doi 10.1371/journal.pone.0030261
 157. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Chulkov E.G., Schagina L.V. 2012. The interaction of dipole modifiers with polyene-sterol complexes. *PLoS One*. **7** (9), e45135. doi 10.1371/journal.pone.0045135
 158. Bolard J. 1986. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. Biophys. Acta*. **864** (3–4), 257–304. doi 10.1016/0304-4157(86)90002-x

159. Chulkov E.G., Schagina L.V., Ostroumova O.S. 2015. Membrane dipole modifiers modulate single-length nystatin channels via reducing elastic stress in the vicinity of the lipid mouth of a pore. *Biochim. Biophys. Acta*. **1848** (1 Pt A), 192–199. doi 10.1016/j.bbamem.2014.09.004
160. Chulkov E.G., Ostroumova O.S. 2016. Phloretin modulates the rate of channel formation by polyenes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1858** (2), 289–294. doi 10.1016/j.bbamem.2015.12.004
161. Goudet C., Benitah J.P., Milat M.L., Sentenac H., Thibaud J.B. 1999. Cluster organization and pore structure of ion channels formed by beticolin 3, a non-peptidic fungal toxin. *Biophys. J.* **77** (6), 3052–3059. doi 10.1016/S0006-3495(99)77136-5
162. Goudet C., Milat M.L., Sentenac H., Thibaud J.B. 2000. Beticolins, nonpeptidic, polycyclic molecules produced by the phytopathogenic fungus *Cercospora beticola*, as a new family of ion channel-forming toxins. *Mol. Plant Microbe Interact.* **3** (2), 203–209. doi 10.1094/MPMI.2000.13.2.203

Mechanisms of Lipid-Mediated Regulation of the Pore-Forming Activity of Antimicrobial Agents: Studies on Planar Lipid Bilayers

© 2024 г. S. S. Efimova¹, *, O. S. Ostroumova¹

¹*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia*

*e-mail: efimova@incras.ru

Planar lipid bilayers are unique tools designed for modeling cell membranes and electrophysiological studies of incorporated ion channels. Such model systems are designed to limit the number of components taking part in the functioning of biological membranes in order to characterize in detail the occurring processes under well-controlled experimental conditions. Planar lipid bilayers make it possible to record single events with a measured current of more than a tenth of a picoampere. The relative simplicity of the method, the ability to observe single molecular events, and the high reproducibility of the results obtained determines the unprecedented effectiveness of using planar lipid bilayers to identify key physical and chemical factors responsible for regulating the functioning of ion channels. This review represents an analysis of literature data concerning the mechanisms of lipid-associated regulation of ion channels formed by various antimicrobial agents. The examination allows us to consider the lipids as molecular chaperones that ensure the formation of pores in target membranes by antimicrobials.

Keywords: planar lipid bilayers, ion channels, antimicrobial peptides and lipopeptides, polyene macrolide antibiotics