

**СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НУКЛЕОТИД- И РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ-РЕГУЛЯТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ.**

Леконцева Н.В., Немчинова М.С., Балобанов В.А., Мурина В.Н., Никулин А.Д.

Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пущино, 142290, РФ

e-mail: natalja-lekontseva@rambler.ru

**Аннотация.** При структурных исследованиях РНК-связывающих свойств белка Hfq было обнаружено, что связывание индивидуальных рибонуклеотидов с белком происходит аналогично связыванию соответствующих оснований нуклеотидов в составе комплексов белка с одноцепочечными РНК. На основании этого наблюдения мы предложили методику идентификации мест специфического узнавания оснований РНК на поверхности белка с помощью рентгеноструктурного анализа. Предложенный подход был протестирован на двух РНК-связывающих белках - CspB из *Bacillus subtilis* и Rop из *Escherichia coli*. Для оценки полученных результатов были рассчитаны константы диссоциации комплексов исследуемых белков с АМФ и ГМФ по изменению анизотропии флуоресценции меченых нуклеотидов АМФ-МАНТ и ГМФ-МАНТ.

**Ключевые слова:** РНК-белковое узнавание, рентгеноструктурный анализ, регуляция транскрипции и трансляции, флуоресцентно-меченые нуклеотиды

**STRUCTURAL STUDIES OF NUCLEOTIDE- AND RNA-BINDING PROPERTIES OF THE PROTEINS, WHICH ACT AS TRANSCRIPTIONAL REGULATORS.**

Lekontseva N.V., Nemchinova M.S., Balobanov V.A., Murina V.N., Nikulin A.D.

Institute of protein research RAS

Institutskaya Str., 4, Pushchino, 142290, Russia

e-mail: natalja-lekontseva@rambler.ru

**Abstract.** Earlier we have shown that positions of ribonucleotides in the nucleotide-Hfq complexes correlate with the available structural and biochemical data. Our results have demonstrated that it is possible to determine single-stranded RNA-binding sites on the protein surface using a soaking procedure followed by structure determination of the nucleotide-protein complexes. In order to test our approach, RNA-binding proteins CspB from *Bacillus subtilis* and Rop from *Escherichia coli* were chosen. AMP and GMP affinities to the proteins have been also estimated by measuring of fluorescence changes during titration of the AMP-MANT and GMP-MANT solution by appropriate proteins.

**Key words:** RNA binding, X-ray diffraction analysis, transcription regulation, translation regulation, fluorescent analogs of nucleotides

Регуляция транскрипции и трансляции являются важными клеточными процессами, в которых определяющую роль играет РНК-белковое узнавание. Исследование РНК-белковых взаимодействий позволяет понять механизмы реализации этих процессов на молекулярном уровне. Существующие биохимические методы изучения РНК-белковых взаимодействий, такие как футпринтинг и пробинг, ковалентные шивки, мутагенез, позволяют выявить контактирующие области на обеих макромолекулах. Однако принципы и детали РНК-белкового узнавания можно выявить только на основе экспериментально установленных структур РНК-белковых комплексов.

Ранее, при исследовании РНК-связывающих свойств белка Hfq из *Pseudomonas aeruginosa* нами была показана способность отдельных рибонуклеотидов взаимодействовать с белком в сайтах связывания одноцепочечных РНК, при этом ориентация оснований рибонуклеотидов и образуемые ими контакты с белком были идентичны тем, которые имеются в РНК-белковых комплексах [1]. Полученные данные позволили нам предложить метод идентификации мест специфического узнавания оснований одноцепочечных РНК на поверхности белка с помощью рентгеноструктурного анализа. Для этого кристаллы белка вымачиваются в растворе, содержащем рибонуклеотид, либо проводится совместная кристаллизация белка с нуклеотидом, с полученных кристаллов собираются данные по рассеянию рентгеновских лучей и определяется структура комплекса, анализ которой позволяет локализовать сайт связывания нуклеотида и промоделировать взаимодействие РНК с белком. Данная работа является частью этапа проверки применимости предложенного метода для определения сайтов связывания одноцепочечных участков РНК на поверхности белков на примере РНК-связывающих белков CspB из *Bacillus subtilis* и Rop из *Escherichia coli*.

Мажорный белок холодового шока CspB из *Bacillus subtilis* принадлежит к семейству белков, связывающих одноцепочечные нуклеиновые кислоты посредством ОВ-фолда. Он активизирует транскрипцию белков, индуцируемых клеткой при понижении температуры окружающей среды [2]. Кроме того, белок способствует инициации трансляции, расплетая возникшие при низких температурах шпильки в матричных РНК [3]. В 5'-нетранслируемой области мРНК *cspB* и *cspC B. subtilis* были обнаружены аналогичные шпильки с пиримидин-богатymi последовательностями [2]. Высокое содержание уридина в них позволяет предположить, что они могут специфически связываться с белком CspB [4]. Молекулярная масса белка равна 7,3 кДа [5]. Он содержит одиночный домен холодового шока, состоящий из 5 сильно изогнутых  $\beta$ -тяжей, образующих замкнутый  $\beta$ -бочонок – ОВ-фолд [6]. В банке данных пространственных структур имеются кристаллические структуры комплексов белка из *Bacillus subtilis* с dT6-ДНК [7], rU6 и 5'-GUCUUUA-3' РНК [4].

Repressor of primer (Rop) регулирует репликацию плазмиды ColE1. В отсутствие антисмысловой РНК I, 3' конец некодирующей РНК II образует стабильный комплекс с ДНК, который является праймером для

репликации плазмиды. Когда транскрибируется РНК I, она образует с РНК II комплекс по типу *kissing complex*, тем самым ингибируя репликацию [8]. Предыдущие исследования показывают, что индивидуальные шпильки, образуемые РНК I и РНК II обладают высокой стабильностью с константой диссоциации  $10^{-10}$ М [9]. Rop в виде димера связывает и стабилизирует данный комплекс, защищая его от деградации и увеличивая его время жизни [10]. Rop состоит из 63 аминокислотных остатков и представляет собой гомодимерный цилиндрически упакованный пучок из 4  $\alpha$ -спиралей [11]. На сегодняшний день комплексов Rop с РНК получить не удалось, рассчитаны лишь модели взаимодействия белка с со своей РНК-мишенью.

#### Методы исследования.

##### *Клонирование гена белка CspB из Bacillus subtilis и выделение белка.*

Ген белка BsuCspB был амплифицирован с помощью метода ПЦР. В качестве матрицы использовали хромосомную ДНК *Bacillus subtilis*. Ген встроен в плазмиду pET22b в правильной ориентации, спонтанных мутаций не обнаружено. Выделение белка производилось из клеток штаммов-суперпродуцентов *E. coli* BL21(DE3) трансформированными плазмидой pET22b, содержащей ген *cspB*. После разрушения клеток ультразвуком клеточный дебрис и рибосомы осаждали последовательным центрифугированием. К супернатанту добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1,7 М и наносили на колонку со смолой Butyl, уравновешенную буфером 1,7 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 М NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0. Для элюции белка использовали линейный градиент хлорида натрия и сульфата аммония от стартового буфера до 100 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0. Препарат белка после хроматографии на носителе Butyl-Sepharose концентрировали до 1 мл, затем наносили на колонку со смолой Superdex G75 (объем колонки 120 мл), уравновешенную буфером 100 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0.

##### *Клонирование гена белка Rop из Escherichia coli и выделение белка.*

Ген белка Rop из *E. coli* был клонирован в экспрессионный вектор pET22b. Матрицей для ПЦР была плазмидная ДНК pBR322. Ген встроен в плазмиду pET22b в правильной ориентации, спонтанных мутаций не обнаружено. Выделение белка производилось из клеток штаммов-суперпродуцентов *E. coli* BL21(DE3) трансформированных полученной плазмидой. Клетки осаждали центрифугированием и разрушали ультразвуком в буфере 0,2 М  $\text{CaCl}_2$ , 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0. Полученный лизат обрабатывали микрококковой нуклеазой в расчете 50 нг на 1 г клеток в течение ночи при 4°C. Клеточные стенки и рибосомы осаждали последовательным центрифугированием в течение 20 мин. при 14000g и 50 мин. при 90000g, соответственно. Надосадочную жидкость наносили на колонку с Q-Sepharose, уравновешенную буфером 0,1 М NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0 и смывали в градиенте 0,1-0,6 М NaCl с 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0. Фракции, содержащие белок, концентрировали до 1 мл, затем наносили на колонку со смолой Superdex G75 (объем колонки 120 мл), уравновешенную буфером 200 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0. Белок Rop был сконцентрирован до 30 мг/мл в растворе с 0,2 М NaCl и 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0.

##### *Кристаллизация белков и нуклеотид-белковых комплексов.*

Эксперименты по кристаллизации проводились при 23 °С, используя метод диффузии паров в висящей капле [12]. Препарат белка (1-2 мкл) в буфере для концентрирования помещали на покровное стекло, затем добавляли к белку равный объем осадителя. Кристаллы белка CspB были получены в условиях 0,2 М KSCN, 25% ММЕPEG 2000, 100 мМ Трис-HCl, pH 7,5 (набор для кристаллизации Molecular Dimensions Limited Clear Strategy Screen I Conditions). Кристаллы белка Rop были получены в условиях 0,2 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 30% ММЕPEG 2000, 100 мМ ацетата натрия, pH 4,6 (набор для кристаллизации JBScreen Nuc-Pro 1 Jena Bioscience). Кристаллы появлялись в течение 2-3 дней.

Получение предполагаемых комплексов белков с нуклеотидами получали двумя способами: кристаллы белков вымачивали в растворе с нуклеотидмонофосфатами, или их совместной кристаллизацией. В первом случае кристаллы белков помещали в каплю с раствором индивидуальных рибонуклеотидов объемом 2 мкл и инкубировали в течение определенного количества времени (3 ч., 4 ч., 12 ч.). В конечном растворе нуклеотиды присутствовали в 4-кратном избытке. Сокристаллизация белков с нуклеотидмонофосфатами проводилась в условиях кристаллизации нативных белков при смешении 1,5 мкл белка с 0,3 мкл нуклеотидмонофосфата и 1,2 мкл осадителя. Конечная концентрация нуклеотидмонофосфата составляла 5 мМ.

##### *Сбор и обработка дифракционных данных*

Наборы дифракционных данных для белков CspB и Rop и их комплексов были собраны на системе X8 Proteum (Bruker AXS) в Институте белка РАН и линии BL14.1 синхротрона ESRF (Гренобль, Франция).

##### *Анализ связывания нуклеотидов по изменению анизотропии флуоресценции*

Измерение анизотропии флуоресценции проводили на флуоресцентном спектрометре Cary Eclipse (Varian, USA) с использованием кюветы 300x300 мкм и при поддержании постоянной температуры (22 °С), длина волны возбуждения – 280 нм, измерение - при длине волны 430 нм. В работе использовали нуклеотиды АМФ-МАНТ и ГМФ-МАНТ фирмы Jena Bioscience, растворенные в буфере 0,2 М NaCl, 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0. Концентрация нуклеотидов была постоянной в течение измерений, концентрация белка повышалась титрованием до  $10^{-4}$ М. Средние значения анизотропии рассчитаны по 5 сериям эксперимента. Значения равновесной константы диссоциации (таблица 1) вычислялись из графика зависимости логарифма связанного нуклеотида от концентрации белка, перестроенного из гиперболической кривой насыщения в соответствии с методом, описанном Edward C. Hulme и Mike A. Trevethick [13].

#### Результаты и обсуждение.

Структура белка CspB определена методом молекулярного замещения (см. рис. 1A). В качестве исходной модели был использован мономер белка CspB из *Bacillus stearotherophilus* (PDB ID 3PF4). В асимметричной части ячейки кристалла находится димер белка, как и в ранее полученной структуре CspB в комплексе с r(GUCUUUA) [4]. Нуклеотиды не были обнаружены ни в случае кристаллов белка, инкубированных в растворах нуклеотидов, ни в кристаллах, полученных совместной кристаллизацией белка и нуклеотидов. Анализ ранее полученного комплекса CspB с фрагментами РНК (см. рис. 1B) показал, что взаимодействие между основаниями нуклеотидов РНК и белком происходит в основном за счет стэкинг-взаимодействий с образованием 1-2 водородных связей [4]. Этого достаточно для связывания последовательности нескольких нуклеотидов, но, по всей видимости, недостаточно для прочного удерживания одиночных нуклеотидов. Для проверки этого предположения был проведен расчет поиска оптимального положения нуклеотида относительно поверхности методом докинга в программе AutoDoc Vina [14]. Расчеты показали, что энергия связывания нуклеотидов с поверхностью белка мала, и все расчетные положения нуклеотидов не соответствуют экспериментальным данным для комплекса CspB-РНК.

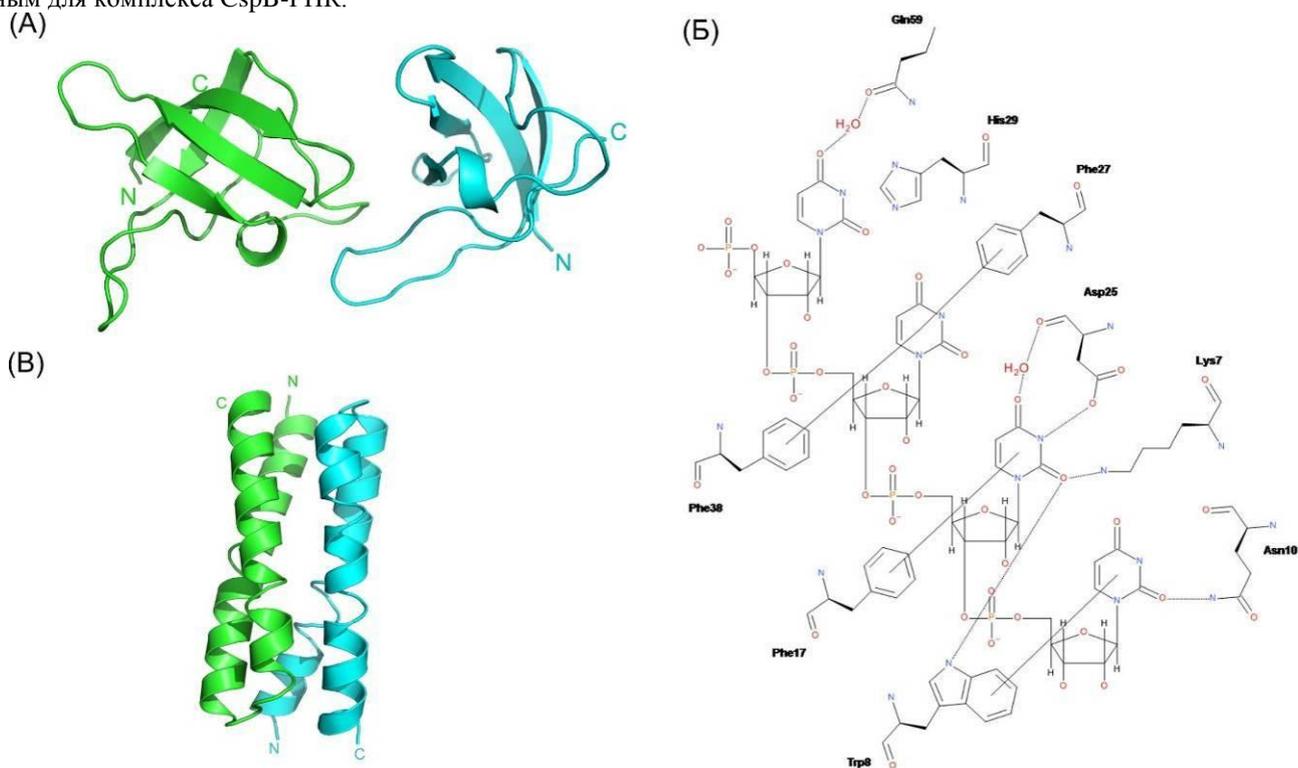


Рисунок 1 – (А) Схематическое представление структуры димера белка CspB. Зеленым и голубым цветом выделены две молекулы белка в асимметричной части ячейки кристалла. (Б) Схема контактов между атомами белка и РНК (PDB ID 3PF4). Стэкинг между основаниями РНК и аминокислотными остатками белка показаны сплошными линиями, водородные связи – пунктирными. (В) Схематическое представление полученной структуры белка Rop. Зеленым и голубым цветом выделены две молекулы белка в составе димера

Структура белка Rop была определена методом молекулярного замещения (см. рис. 1B) с использованием мономера белка Rop (PDB ID 2IJK) в качестве исходной модели. Анализ полученных рентгеноструктурных данных показал, что нуклеотиды с поверхностью белка также не связались ни при вымачивании, ни при совместной кристаллизации. Докинг, проведенный в программе AutoDoc Vina, не смог предложить какую-либо модель взаимодействия белка с нуклеотидами.

Для экспериментальной оценки сродства нуклеотидов с исследуемыми белками мы использовали регистрацию изменения анизотропии флуоресценции при взаимодействии нуклеотидов с белками. В ходе работы было выяснено, что немеченые нуклеотиды не позволяют оценить сродство из-за низкого уровня сигнала. Использование флуоресцентно меченых нуклеотидов АМФ-МАНТ и ГМФ-МАНТ, в которых флуорофор ковалентно прикреплен к гидроксилу сахара и не мешает взаимодействию белка с основанием нуклеотида, был получен хорошо различимый сигнал и измерено их сродство к исследуемым белкам. В качестве контроля был использован белок Hfq из *Escherichia coli* (EcoHfq). Из полученных графиков (см. рис. 2) и расчетных значений равновесных констант диссоциации  $K_d$  видно, что белок Rop обладает низким сродством как к АМФ, так и к ГМФ, белок CspB также плохо связывает АМФ, однако имеет сродство к ГМФ. Результаты подтвердили существующие данные по сродству белка Hfq к АМФ и низкому сродству к ГМФ [1].

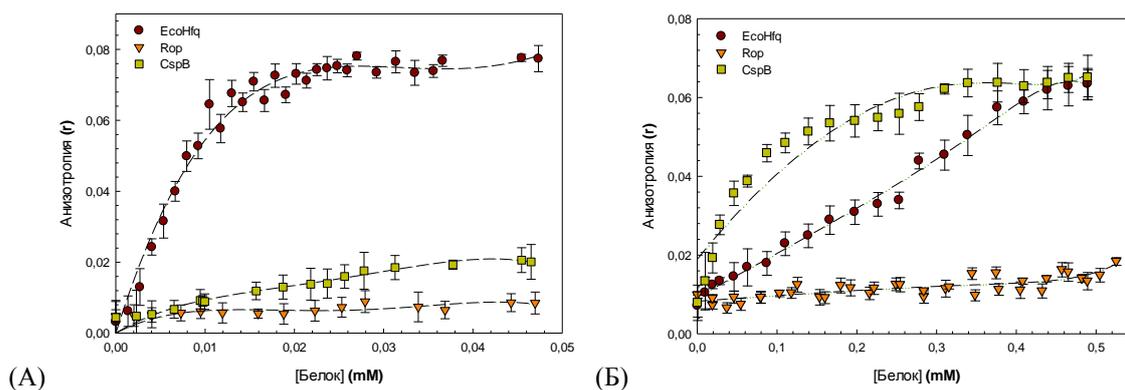


Рисунок 2 – Кривые титрования растворов нуклеотидов исследуемыми белками (А) для АМФ-МАНТ (Б) для ГМФ-МАНТ при связывании с Hfq (●), Rop (▼), CspB (■)

Таблица 1 – Значения равновесной константы диссоциации ( $K_d$ ), вычисленные для комплексов белков с нуклеотидами АМФ-МАНТ и ГМФ-МАНТ с помощью флуоресцентной анизотропии

[Белок]	[Нуклеотид]	
	АМФ-МАНТ	ГМФ-МАНТ
EcoHfq	$4 \times 10^{-6}$ М	$7 \times 10^{-5}$ М
Rop	$< 1 \times 10^{-4}$ М	
CspB	$< 1 \times 10^{-4}$ М	$3 \times 10^{-5}$ М

Таким образом, мы показали, что определение равновесных констант диссоциации путем измерения анизотропии флуоресценции при титровании растворов нуклеотидов исследуемым белком, позволяет оценить возможность получения нуклеотид-белковых комплексов. При значениях  $K_d$  выше  $1 \times 10^{-4}$  М такие комплексы лабильные, что не позволяет их выделить, закристаллизовать и определить их структуру для выявления потенциальных участков взаимодействия оснований нуклеотидов одноцепочечных РНК на поверхности белка. В ходе выполнения работы показано, что белок Rop обладает очень низким сродством к пиридиновым основаниям и для получения комплексов белка с РНК в составе последней такие нуклеотиды должны отсутствовать. Было подтверждено, что белок CspB не связывает аденин, но обладает сродством к гуанину, что соответствует биохимическим данным по взаимодействию белка с РНК. Тем не менее, комплекс ГМФ-CspB лабильный и получить его кристаллы не удалось.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-14-00496)

#### Список литературы / References:

- Murina V.N., Lekontseva N.V., Nikulin A.D. Hfq binds ribonucleotides in three different RNA-binding sites. *Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr.*, 2013, vol. 69 (Pt8), pp.1504-13
- Graumann P., Wendrich T.M., Weber M.H., Schroder K., Marahiel M.A. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol. Microbiol.*, 1997, vol. 25, pp. 741-756.
- Jiang W., Hou Y., Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, pp. 196-202.
- Sachs R., Max K., Heinemann U., Balbach J. RNA single strands bind to a conserved surface of the major cold shock protein in crystals and solution. *RNA*, 2012, vol. 18, pp. 65-76.
- Schindelin H., Herrler M., Willimsky G., Marahiel M.A., Heinemann U. Overproduction, crystallization, and preliminary X-ray diffraction studies of the major cold shock protein from *Bacillus subtilis*, CspB. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, 1992, vol. 14, pp. 120-124.
- Agrawal V., Radha Kishan K.V. OB fold: growing bigger with functional consistency. *Curr. Protein Peptide Sci.*, 2003, vol. 4, pp.195-206.
- Max K.E., Zeeb M., Bienert R., Balbach J., Heinemann U. T-rich DNA single strands bind to a preformed site on the bacterial cold shock protein Bs-CspB. *J Mol Biol.*, 2006, vol. 360, pp. 702-714.
- Eguchi Y., Itoh T., Tomizawa J. Antisense RNA. *Ann Rev Biochem.*, 1991, vol. 60, pp. 631-652.
- Gregorian RS, Crothers DM. Determinants of RNA hairpin loop-loop complex stability. *J Mol Biol.*, 1995, vol. 248, pp. 968-984.
- Eguchi Y, Tomizawa J. Complexes formed by complementary RNA stem-loops—their formations, structures and interaction with ColE1 Rom protein. *J Mol Biol.*, 1991, vol. 220, pp. 831-842.
- Struble E.B., Ladner J.E., Brabazon D.M., Marino J.P. New crystal structures of ColE1 Rom and variants resulting from mutation of a surface exposed residue: Implications for RNA-recognition. *Proteins*, 2008, vol. 72, pp. 761-768.

12. Davies D., Segal D. Protein crystallization: microtechniques involving vapor diffusion. *Methods Enzymol.*, 1971, vol. 22, pp. 266-269.

13. Hulme E.C., Trevethick M.A. Ligand binding assays at equilibrium: Validation and interpretation, *Br. J. Pharmacol.*, 2010, vol. 161, pp. 1219-1237.

14. Trott O., Olson A.J. Auto Dock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 2010, vol. 31, pp. 455-461.

### ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СРЕДЫ НА ДИМЕРИЗАЦИЮ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ ГЛИКОФОРИНА А В КОМПЬЮТЕРНОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Кузнецов А.С.<sup>1</sup>, Ефремов Р.Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, ГСП-7, 117997, РФ

<sup>2</sup> Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики  
ул. Мясницкая, 20, г. Москва, 101000, РФ.  
e-mail: andrej.kuznecov@phystech.edu

**Аннотация.** Разработан комплексный подход к изучению взаимного влияния белка и мембранной среды в процессе димеризации трансмембранных (ТМ)  $\alpha$ -спиральных пептидов. В основе подхода – численное разложение профилей свободной энергии взаимодействия ТМ-спиралей на компоненты, соответствующие различным типам взаимодействий, и картирование пространственного распределения средней плотности липидов. Метод апробирован для ТМ-сегментов гликофорина А человека (GrA) и нескольких модельных пептидов. Показано, что липиды вносят значительный выгодный вклад в свободную энергию димеризации, в то время как образующиеся на интерфейсе мономеров контакты аминокислотных остатков могут, наоборот, быть невыгодными. Также на боковой поверхности ТМ-доменов GrA показано наличие сайтов связывания ацильных цепей молекул липидов. Таким образом, аминокислотная последовательность белка определяет и белок-белковые взаимодействия, и связывание липидов, что влияет на детальное распределение энергетических вкладов. При этом липидная мембрана может выступать в качестве непосредственного участника спонтанной ассоциации ТМ  $\alpha$ -спиралей. Результаты данной работы могут быть использованы для рационального конструирования перспективных пептидных модуляторов, направленных на корректировку работы битопных мембранных белков, включая рецепторные тирозинкиназы.

**Ключевые слова:** трансмембранные домены, энергия ассоциации, мембранные белки, гликофорин А

### IN SILICO ESTIMATION OF THE MEMBRANE EFFECT ON THE DIMERIZATION OF TRANSMEMBRANE DOMAINS OF GLYCOPHORIN A

Kuznetsov A.S.<sup>1</sup>, Efremov R.G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences  
Miklukho-Maklaya Str., 16/10, Moscow, GSP-7, 117997, Russia,

<sup>2</sup> National Research University Higher School of Economics  
Myasnitskaya Str., 20, Moscow, 101000, Russia  
e-mail: andrej.kuznecov@phystech.edu

**Abstract.** Here we present a combined method to study mutual effects of a protein and a membrane upon the dimerization of transmembrane (TM)  $\alpha$ -helical peptides. The approach is based on the numerical decomposition of dimerization free energy profiles for TM helices into components corresponding to different interaction types and on the mapping of the distribution of the average lipid density around the protein. The method was tested on the TM domains of human glycoporphin A (GrA) and several model peptides. It is shown that lipids contribute significantly to a total free energy of dimerization, and the direct protein-protein contacts may be unfavorable. Also, we found some lipid acyl chains binding sides on the surface of TM domains of GrA. Thus, the amino acid sequence determines not only the protein-protein contacts during dimerization, but also the interactions with lipids, and that can determine the detailed balance between the free energy contributions. Lipid membrane can act as an active driving force in the process of TM helices association. The look rather promising for further rational design of peptide modulators aimed to interact with bitopic membrane proteins, including receptor tyrosine kinases.

**Key words:** transmembrane domains, dimerization energy, membrane proteins, glycoporphin A

Мембрана живой клетки имеет сложную структуру и включает в себя не только липиды, но и множество различных белков, олигосахариды и связанные молекулы воды и ионы. Все эти компоненты работают как единый сложный механизм, внутри которого существует множество связей. Одна из ключевых его функций – передача поступающих извне сигналов внутрь клетки. Некоторые сигналы (например, свет или гидрофобные молекулы) способны преодолеть этот барьер самостоятельно, тогда как для других мембрана непроницаема [1]. Для них на поверхности клетки существует большой набор мембранных белков (МБ), выполняющих роль проводников информации или вещества сквозь эту границу. Около четверти всех производимых живой клеткой белков являются мембранными [2]. МБ ответственны за поток веществ и информации через клеточную мембрану, поэтому нарушения в их функционировании приводят к паталогическим состояниям, и все они являются потенциальными мишенями для фармакологических средств [3, 4]. Наиболее важную роль в работе МБ, как