

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.152.3+544.147+544.176+544.168

КАЛІКС[4]АРЕН С-107 ЯК ВИСОКОАФІННИЙ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНИЙ ІНГІБІТОР Na^+ , K^+ -АТРази ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ

О. В. БЕВЗА¹, Т. О. ВЕКЛІЧ¹, О. А. ШКРАБАК¹, Р. В. РОДІК²,
В. І. КАЛЬЧЕНКО², С. О. КОСТЕРІН¹

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

²Інститут органічної хімії НАН України, Київ;
e-mail: vik@ioch.kiev.ua

В експериментах, виконаних на суспензії плазматичних мембран клітин міометрія, досліджували інгібувальну дію 5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арену (калікс[4]арен С-107, наведено шифр) на Na^+ , K^+ -АТРази активність. Показано, що калікс[4]арен С-107 (10^{-8} – 10^{-4} М) ефективніше, ніж убаїн, пригнічує активність Na^+ , K^+ -АТРази, практично не впливаючи на активність базальної Mg^{2+} -АТРази. Величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ дорівнює 33 ± 4 нМ, а значення коефіцієнта Хілла $n_H - 0,38 \pm 0,06$. Модельні сполуки: незаміщений за верхнім вінцем 25,27-дипропоксикаліксарен (каліксарен С-150, суто каліксаренова «платформа») (10^{-8} – 10^{-4} М) та N-(4-гідроксифеніл)-2-піридил-амінофосфонова кислота (сполука М-3 – залишок, що модифікує верхній вінець каліксарену С-107 разом із фенольним фрагментом) (10^{-7} – $4 \cdot 10^{-3}$ М) практично не впливають на досліджувані ензиматичні системи.

Проведено комп'ютерне моделювання взаємодії калікс[4]арену С-107 і його модельних сполук з лігандзв'язувальними ділянками Na^+ , K^+ -АТРази плазматичної мембрани. З'ясовано структурні основи міжмолекулярної взаємодії калікс[4]арену С-107 з лігандзв'язувальними ділянками ензиму. Обговорюється участь водневих, гідروفобних, електростатичних і π - π (стекинг)-взаємодій між калікс[4]ареном і амінокислотними залишками Na^+ , K^+ -АТРази, і розташовані поруч з активним центром АТРази.

Ключові слова: Na^+ , K^+ -АТРаза, плазматична мембрана, гладеньком'язові клітини, міометрій, калікс[4]арен С-107, комп'ютерне моделювання, докінг.

Н a^+ , K^+ -АТРаза (натрієва помпа) (3.6.3), яка селективно інгібується убаїном – це електрогенна Ca^{2+} -незалежна Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -АТР-залежна транспортна система. Na^+ , K^+ -АТРаза швидко реагує на зміну внутрішньо- та позаклітинної концентрації Na^+ і K^+ і, тим самим, підтримує властивий цій клітині трансмембранний градієнт катіонів та потенціал спокою, необхідні для нормального функціонування клітини. Мова йде, в першу чергу, про забезпечення електричної збудливості нервових і м'язових клітин, секреторної діяльності, енергозабезпечення Na^+ -залежного вторинного активного транспорту іонів кальцію (обмін Na^+ - Ca^{2+}) та протонів (обмін Na^+ - H^+), регуляцію клітинного об'єму, транспортування амінокислот та вуглеводів тощо [1–6]. Від активності цього

ензиму залежить також перебіг багатьох інших біохімічних процесів. Так, Na^+ , K^+ -АТРаза шляхом протеїн-протеїнових взаємодій з месенджерними протеїнами передає сигнали до ядра клітини [7]. Таким чином, під час зв'язування убаїну і убаїноподібних гормонів здійснюється активація протоонкогенів, транскрипційних факторів, стимулюється синтез деяких протеїнів клітини. За цим механізмом у разі блокування ензиму убаїном індукується розвиток гіпертрофії м'язової тканини серця і судин. Вважають, що макроефектом гіпертрофії гладеньких м'язів судин є розвиток такого небезпечного патологічного стану як гіпертензія [7–9]. Також для клітин гладеньких м'язів судин є властивим зв'язок між апоптозом і активністю Na^+ - K^+ -АТРази: її активація стимулює розвиток апоптозу, а бло-

кування убаїном – пригнічує [10]. Іншими патологіями, які супроводжуються зміною у функціонуванні натрієвої помпи, є порушення вмісту тиреоїдних гормонів, гіпотиреоїдизм, тиреотоксикози та цукровий діабет [11]. Очевидно, що пошук ефективних інгібіторів та активаторів натрієвої помпи є важливим як із фундаментальної, так і з практичної точки зору.

Як своєрідні «молекулярні платформи», перспективні для дизайну сполук, що здатні модифікувати перебіг біохімічних реакцій, можуть слугувати циклічні олігомери фенолів, зокрема калікс[4]арени [12–14]. Ці сполуки мають внутрішньомолекулярні ліпофільні порожнини, які утворені ароматичними фрагментами та можуть бути функціоналізовані на верхньому та нижньому вінцях різними хімічними групами [15–20]. Деякі калікс[4]арени виявляють антибактеріальну, антивірусну, антикоагуляційну, антитромботичну і протипухлинну активність, вони здатні зв'язуватись з мембраною, формуючи в ній селективні до окремих іонів (а саме Na^+ і K^+) канали [21–23].

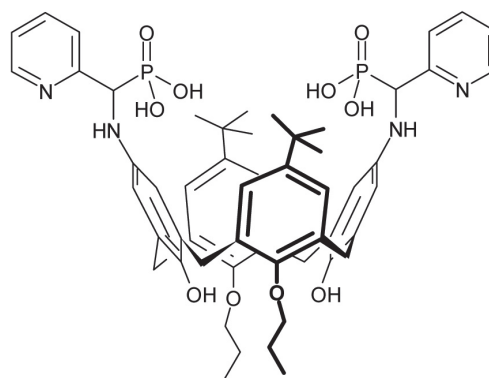
У попередніх дослідженнях, виконаних на фракції плазматичних мембран клітин міомерія, яку було оброблено розчином дигітоніну (0,1 мг/мл), ми показали, що калікс[4]арен С-107 (100 мкМ) пригнічує ензиматичну активність Na^+ - K^+ -АТРазу в плазматичних мембранах міоцитів матки до 2–3% відносно контролю. При цьому він практично не гальмує «базальну» Mg^{2+} -АТРазу активність (зменшення активності в середньому лише до 90% від контрольного значення) [24].

Сучасна наука йде шляхом розробки нових лікарських засобів на основі поліпептидів, причому прототипами таких лікарських засобів є природні субстрати й інгібітори. Ключовою проблемою в розробці таких потенційно важливих сполук є передбачення енергії зв'язування лігандів із цільовою молекулою. Тому визначення структури комплексу і точний розрахунок енергії взаємодії макромолекул є важливою проблемою в «контактній» біології і фармакології. В роботі планувалося, зокрема, із застосуванням сучасних методів комп'ютерного моделювання одержати нові дані, важливі для розуміння біохімічних та біофізичних закономірностей феномену електро- та фармакомеханічного спряження в гладеньких м'язах; мова йде про проведення комп'ютерного моделювання взаємодії калікс[4]арену С-107 з Na , K -АТРазою плазматичної мембрани міоцитів матки.

Метою роботи було вивчити закономірності та механізм інгібувальної дії калікс[4]арену С-107 на Na^+ - K^+ -АТРазу клітин міомерія.

Матеріали і методи

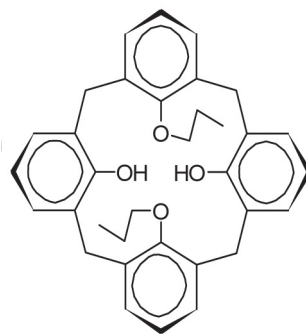
Калікс[4]арен С-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піридил-метил)аміно-11,23-ди-трет-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен) був синтезований та охарактеризований із використанням методів ЯМР та інфрачервоної спектроскопії у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України (зав. відділом – член-кор. НАНУ В. І. Кальченко). Методику синтезу зазначеного калікс[4]арену було описано раніше [25].



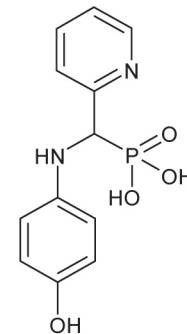
C-107

Молекула калікс[4]арену С-107 складається умовно із трьох частин: калікс[4]аренової «чаші» (макроциклічна основа з чотирьох бензольних кілець, зв'язаних метиленовими групами; еквівалент – сполука С-150), і двох амінофосфонових груп, зв'язаних із фенольними фрагментами (еквівалент – сполука М-3).

Структурні формули модельних сполук – незаміщеного дипропоксикалікс[4]арену С-150 та N-(4-гідроксифеніл)-2-піридил-амінофосфонові кислоти М-3 – наведено нижче.



C-150



M-3

Біохімічні дослідження було проведено у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України (зав. відділом – член-кор. НАНУ С. О. Костерін).

Фракцію плазматичних мембран гладеньком'язових клітин виділяли з міометрія свині, як було описано раніше [26, 27].

Вміст протеїну в мембранній фракції визначали методом М. Bredford [28] із використанням реакції з реактивом кумасі G250.

«Загальну» Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТРазну активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міометрія як описано раніше [26] при 37 °С у стандартному середовищі (об'єм – 0,4 мл), яке містило (мМ): 1 АТР, 3 $MgCl_2$, 125 NaCl, 25 KCl, 1 ЕГТА, 20 Нерес-трис-буфер (рН 7,4), 1 NaN_3 (інгібітор АТРази мітохондрій [29]), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази ендосарко)плазматичного ретикулаума [29]) і 0,1% дигітонін (фактор перфорації плазматичної мембрани [30]). Кількість протеїну мембранної фракції в пробі – 20–30 мкг. Час інкубації – 4 хв. Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (50 мкл) суспензії плазматичних мембран, а зупиняли – додаванням до інкубаційної суміші 1 мл «стоп-розчину» такого складу: 1,5 М натрій оцтовий, 3,7% – формальдегід, 14% – етанол, 5% – ТХУ, рН 4,3 (при 8 °С). Наявність Ca^{2+} -хелатору ЕГТА в середовищі інкубації забезпечувало зв'язування в ньому ендогенних іонів Са.

«Убаїнчутливу» Na^+, K^+ -АТРазну активність розраховували за різницею між величинами «загальної» Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТРазної у присутності та за відсутності 1 мМ убаїну (селективний інгібітор Na^+, K^+ -АТРази [31, 32]).

Кількість продукту реакції P_i визначали за методом W. Rathbun і V. Betlach [33].

У дослідях із вивчення впливу різних концентрацій убаїну ($1 \cdot 10^{-6}$ – $5 \cdot 10^{-3}$ М) на «загальну» Mg^{2+}, Na^+, K^+ -АТРазну активність використовували стандартне середовище інкубації, що було описане вище, до якого додавали аліквоту водного розчину убаїну у відповідній концентрації.

Під час вивчення впливу різних концентрацій калікс[4]аренів С-107 та С-150 (10^{-8} – 10^{-4} М) на питому ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази використовували стандартне середовище інкубації (склад якого наведено вище). До нього додавали аліквоту розчину калікс[4]арену у відповідній початковій концентрації.

У дослідях з вивчення впливу різних концентрацій модельної сполуки М-3 ($1 \cdot 10^{-7}$ –

$4 \cdot 10^{-4}$ М) на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази використовували стандартне середовище інкубації, до якого додавали аліквоту водного розчину модельної сполуки М-3 у відповідній концентрації.

В експериментах із вивчення впливу різних концентрацій убаїну (чи калікс[4]аренів) за 100% («нульова точка», контроль) приймали значення АТР-гідролазної активності, яке визначали за відсутності зазначених речовин у стандартному середовищі інкубації.

При вивченні концентраційної залежності дії убаїну та калікс[4]аренів на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази значення коефіцієнтів інгібування $I_{0,5}$ та коефіцієнтів Хілла n_H розраховували із використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до емпіричного рівняння Хілла

$$\lg[(A_0 - A)/A] = -n_H \lg I_{0,5} + n_H \lg [I],$$

де A_0 та A – питома ензиматична активність за відсутності («нульова точка», контроль) та у присутності в середовищі інкубації інгібітора в концентрації I . У разі таких графіків типове значення середньоквадратичного відхилення коефіцієнта апроксимації дорівнювало 0,9–0,99.

Комп'ютерне моделювання взаємодії лігандів (калікс[4]арену С-107 та модельних сполук) із рецептором (Na^+, K^+ -АТРаза) виконано за допомогою програми AutoDock, версія 4.1 [34].

У дослідженнях використовували просторову структуру Na^+, K^+ -АТРази з ідентифікатором 3A3Y в RSCB PDB [35], яка відповідає структурі ензиму в трансмембранному положенні в конформації P-E₂.

Для попередньої «підготовки» молекул застосовували також AutoDockTools. Проводили по 100 запусків ламарківського генетичного алгоритму за розміром покоління 100 і максимальної кількості оцінок енергії 1 000 000. Для аналізу результатів та підготовки рисунків із результатами докінгу використовували програми «Chimera» [36] та «Yasara» [37].

Для з'ясування можливих механізмів дії інгібіторів (калікс[4]арену С-107 та модельних сполук) було проведено комп'ютерне моделювання їх взаємодії з лігандзв'язувальними ділянками (ЛЗД) Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани. Процедура докінгу в ЛЗД ензиму було виконано для лігандів із повністю іонізованими фосфонатними залишками. Конформації каліксаренів зберігалися у вигляді конуса. Параметри іонів металів оцінювали за стандартними характеристика-

ми силового поля AMBER. За моделювання взаємодії між лігандами (калікс[4]арен С-107 і модельні залишки) та рецептором (Na^+ , K^+ -АТРаза) здійснювали т.з. «напівгнучкий докінг», тобто програма докінгу враховувала рухливість молекули ліганду, а не рецептора.

Під час розрахунку мінімальної енергії зв'язування враховувалися ван-дер-ваальсові та електростатичні взаємодії, водневі зв'язки, гідрофобні взаємодії, а також внесок енергії десольватації. Відбір оптимальних результатів проводили за визначенням положення ліганду в комплексі «рецептор—ліганд», та за енергетичними показниками, використовуючи вбудовані в програмі докінгу функції розрахунку енергії зв'язування в комплексі «рецептор—ліганд». Внаслідок цього було відібрано ряд комплексів з найменшою загальною енергією і далі розраховано оптимальну геометрію утворених комплексів. При цьому визначали енергетично найвигідніше розташування лігандів (інгібіторів) у просторі ЛЗД макромолекули Na^+ , K^+ -АТРази.

Статистичний аналіз одержаних даних проводили із залученням загальновідомих стандартних методів. Кінетичні та статистичні розрахунки здійснювали в режимі програмного забезпечення MS Excel.

У роботі застосовували такі реактиви: АТФ, Нерес, убаїн, тапсигаргін (Sigma, США), трис-гідроксиметил-амінометан (Reanal, Угорщина), дигітонін (Merck, Німеччина), ЕГТА (Fluka, Швейцарія). Інші реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

Результати та обговорення

Згідно з даними літератури слід було очікувати, що деякі каліксарени можуть транспортувати катіони металів крізь біомембрани за механізмом переносників [18] завдяки утворенню міцних комплексів катіонів із залишками α -аміно- та метиленбісфосфонових кислот [19] та вбудовуватися в ліпідні біомембрани, утворюючи канали для транспортування катіонів завдяки амфифільному характеру, обумовленому просторовим розділенням гідрофільних кислотних угруповань та ліпофільного макроциклічного кістяка із алкільними залишками [20–22]. Завдяки гідрофільним залишкам калікс[4]арен С-107 також може зв'язуватися з амінокислотними фрагментами іонтранспортувальних протеїнів [23]. Тобто калікс[4]арен С-107, інгібуючи функціонування натрієвої помпи, може впливати на транссарколемний іонний обмін в клітинах ГМК.

Раніше нами було показано, що у разі застосування сарколеми міометрія свині питома ензиматична активність Na^+ , K^+ -АТРази і Mg^{2+} -АТРази дорівнює $10,2 \pm 0,7$ та $18,1 \pm 1,2$ мкмоль $\text{P}_i/\text{год} \cdot \text{мг}$ протеїну відповідно ($M \pm m$; $n = 7$) [30]. Як відомо, кардіоактивні стероїди убаїн і строфантин є практично абсолютними селективними інгібіторами Na^+ , K^+ -АТРази [38, 39, 42]. Нами досліджено концентраційну залежність впливу калікс[4]арену С-107 (10^{-8} – 10^{-4} М) та убаїну (10^{-6} – $5 \cdot 10^{-3}$ М) на ензиматичну активність Na^+ , K^+ -АТРази (рис. 1). Виявилось, що калікс[4]арен С-107 дозозалежно та значно ефективніше, ніж убаїн, пригнічує ензиматичну активність натрієвої помпи в діапазоні концентрації 0–10 мкМ. Не виключено, що інгібіторний ефект калікс[4]арену С-107 на Na^+ , K^+ -АТРази базується на зменшенні спорідненості іонів Na до натрієвої помпи [23].

Калікс[4]арен С-107 вже в концентрації 10^{-5} М повністю гальмує активність Na^+ , K^+ -АТРази (залишкова активність – до 2% відносно контрольного значення). Величина коефіцієнта інгібування $I_{0,5}$ для калікс[4]арену С-107 становить 54 ± 6 нМ ($M \pm m$; $n = 5$), значення коефіцієнта Хілла n_H дорівнює $0,40 \pm 0,08$ ($M \pm m$; $n = 5$). А за дії убаїну повне інгібування активності Na^+ , K^+ -АТРази спостерігається при концентрації 1 мМ, у цьому разі $I_{0,5} = 21 \pm 5$ мкМ, $n_H = 0,54 \pm 0,07$.

Отже, для інгібувальної дії як калікс[4]арену С-107, так і убаїну, притаманним є явище від'ємної кооперативності: в обох випадках величина коефіцієнта Хілла $n_H < 1$. Це може вказувати на те, що інгібіторний вплив однієї молекули калікс[4]арену С-107 або убаїну опосередковується взаємодією з декількома молекулярними комплексами Na^+ , K^+ -АТРази.

Для визначення ролі хімічних груп у складі молекули калікс[4]арену С-107 в інгібуванні активності Na^+ , K^+ -АТРази було досліджено також дві модельні сполуки: калікс[4]арен С-150 та М-3. Як видно із структурної формули калікс[4]арен С-107 має амфифільну структуру, обумовлену просторовим розділенням гідрофільних кислотних залишків та ліпофільності макроциклічної структури, що містить алкільні залишки. Тобто молекула калікс[4]арену С-107 має складну структуру (гідрофобне макроциклічне кільце і полярні бічні залишки). Калікс[4]арен С-150 не містить жодних додаткових хімічних груп на верхньому вінці макроциклу і є суто калікс[4]ареновою «чашею». Сполука М-3 містить один фенольний фрагмент та амінофосфонову групу аналогічно до молекули калікс[4]арену С-107.

У порівняльних дослідах із каталітичного титрування Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин калікс[4]ареном С-107 та його структурними фрагментами С-150 (10^{-8} – 10^{-4} М) та М-3 (10^{-7} – $4 \cdot 10^{-3}$ М) показано (рис. 1), що ці структурні фрагменти в широкому діапазоні концентрацій (до 100 мкМ) практично не впливають на Na^+, K^+ -АТРази, при цьому вони також не впливають і на Mg^{2+} -АТРази активність (дані не наведено). Хоча треба відзначити, що сполука М-3 в концентрації $4 \cdot 10^{-3}$ М виявляє незначний (приблизно 15%) інгібувальний ефект на Na^+, K^+ -АТРази (але не на Mg^{2+} -АТРази) активність.

Слід очікувати, що біофізикохімічні ефекти в системі «калікс[4]арен – мембранні фрагменти» мають бути вельми складними. Як показують результати каталітичного титрування (рис. 1), інгібувальна дія калікс[4]арену С-107 на активність Na^+, K^+ -АТРази передусім може полягати саме в кооперативному впливі двох просторово орієнтованих на калікс[4]ареновій платформі амінофосфонових груп, а не з дією тетрафенольного макроциклу як такого, або дією окремого амінофосфонового залишку. Саме відносно розташування амінофосфонових груп на верхньому вінці макроциклу у положеннях 5,17, яке може бути комплементарним сайту взаємодії цього калікс[4]арену із залишками Na^+, K^+ -АТРази, може мати істотне

значення для інгібувальної дії калікс[4]арену С-107 на мембранозв'язану Na^+, K^+ -АТРази активність.

На сьогодні чітко, експериментально підтверджене уявлення про природу взаємодії між Na^+, K^+ -АТРазою плазматичної мембрани та її природними лігандами або синтетичними препаратами практично відсутнє. Це зумовлено, в першу чергу, значною складністю проведення рентгеноструктурного аналізу Na^+, K^+ -АТРази, оскільки під час кристалізації ензим втрачає свою нативну конформацію, стабілізовану в організмі клітинною мембраною. Відносно вірогідні експериментальні моделі цього ензиму почали з'являтися нещодавно із вдосконаленням методів аналізу структур мембранозв'язаних ензимів [35, 38, 39]. Необхідно зауважити, що доступні в базах даних кристалічні структури для Na^+, K^+ -АТРази належать конформації Р- E_2 . При цьому фосфорилування ензиму і перехід в конформацію Р- E_2 полегшує зв'язування убаїну. Вважають, що стероїди блокують ензим у стані Р- E_2 і, таким чином, гальмують перехід на рівні конформерів $\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_1$. Тому дослідження взаємодії каліксарену С-107 із Na^+, K^+ -АТРазою проводили з ензимом саме в цій конформації. Можливо, фосфорилування внутрішньомембранної частини Na^+, K^+ -АТРази спричинює конформаційні зміни

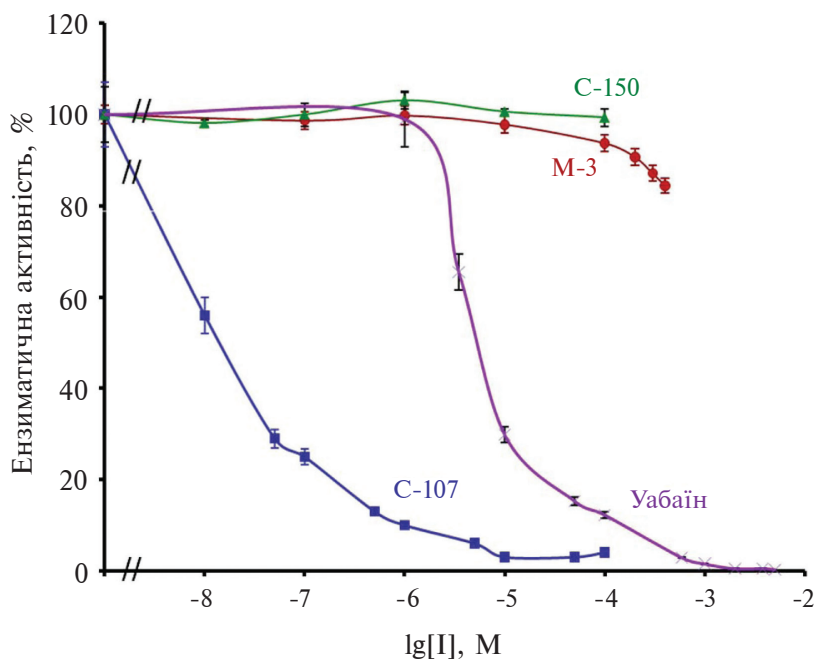


Рис. 1. Концентраційна залежність впливу убаїну, калікс[4]аренів С-107 і С-150 та модельної сполуки М-3 на активність Na^+, K^+ -АТРази у фракції плазматичних мембран міоцитів матки ($M \pm m$; $n = 6$)

ензиму, що сприяє інгібувальному впливу калікс[4]арену на активні внутрішньоклітинні ділянки ензиму.

Реагентами в Na^+, K^+ -залежній АТР-гідролазній реакції є іони Na , K , Mg та АТР. У цій реакції Mg^{2+} діє як кофактор, що зв'язується з регуляторним центром Na^+, K^+ -АТРрази та утворює з АТР⁺ хелатний комплекс MgATP^{2-} , який слугує істинним субстратом у реакції фосфорилування ензиму (рис. 2).

Раніше нами було показано [40], що калікс[4]арен С-107 може ефективно утворювати комплекси з АТР у розчинах. Важливо і те, що під час стехіометричного комплексоутворення калікс[4]арену С-107 з АТР γ -атом фосфору в молекулі нуклеозидтрифосфату набуває більшої електрофільності внаслідок утворення водневих зв'язків. Молекула калікс[4]арену С-107 є дицвітер-іоном із протонованими амініними атомами азоту та двома депротонованими гідроксилами фосфонових фрагментів, тому NH^{2+} -групи аміно-(2-піридил)метил-фосфонових фрагментів молекули калікс[4]арену С-107 можуть взаємодіяти з негативно зарядженими амінокислотними залишками ензиму. Відповідно Р-ОН-групи цих фрагментів можуть утворювати комплекс із позитивно зарядженими амінокислотними залишками.

Необхідно зауважити, що ми визначили потенційні сайти взаємодії ензиму з каліксареном С-107. Точна локалізація останнього в ЛЗД ензиму ускладнена в зв'язку з тим, що натрієвий насос є мембранозв'язаним ензимом. У літературі наведено дані стосовно досить значних переміщень цитоплазматичних доменів АТРаз Р-типу один відносно одного в ензиматичному циклі [41, 42]. Тому ми визначили найвірогідніші місця взаємодії каліксарену з ензимом, які підтверджуються значеннями мінімальної енергії зв'язування та амінокислотним оточенням лігандзв'язувальних ділянок (рис. 3).

Калікс[4]арен С-107 та убаїн виявляють різну спорідненість відносно до Na^+, K^+ -АТРрази [43]. Причиною цього може бути відмінність в організації оточення лігандзв'язувальних ділянок Na^+, K^+ -АТРрази для цих інгібіторів. У літературі є відомості про можливі місця зв'язування АТР [44] та убаїну [45, 46] на лігандзв'язувальних ділянках Na^+, K^+ -АТРрази. Отже, виходячи зі структурних особливостей калікс[4]арену С-107, для встановлення механізму дії досліджуваних сполук на роботу ензиму ми проаналізували одержані методом докінгу дані зв'язування його та його модель-

них сполук. При цьому було визначено можливі місця приєднання («впадини») досліджуваних лігандів до лігандзв'язувальних ділянок Na^+, K^+ -АТРрази (рис. 3, А), та досліджено взаємодію їх з рецептором, внаслідок чого було відібрано низку комплексів із найменшою загальною енергією.

Попереднє визначення найвірогідніших місць приєднання калікс[4]арену С-107 до Na^+, K^+ -АТРрази за одержаними значеннями мінімальної енергії зв'язування показало, що він може утворювати комплекс з ензимом в місцях 1 та 4 (рис. 3).

До суттєвих структурних особливостей Na^+, K^+ -АТРрази можна віднести організацію додаткової ділянки зв'язування субстрату, віддаленої від активного центру [47, 48]. Дані літератури свідчать також про наявність поруч з активним центром Na^+, K^+ -АТРрази залишків амінокислот, що безпосередньо не беруть участь у механізмах каталізу, але просторово закривають доступ до центру зв'язування субстрату [49]. У молекулі Na^+, K^+ -АТРрази N-домен, на відміну від SERCA, менше ($\sim 20^\circ$) повернутий до А-області, і між ними є тільки один зв'язок: сольовий місток між Arg551 в N-ділянці і Glu223 в А-доміні [50]. Залишок Arg551, як очікується, взаємодіє з β -фосфатом АТР, і для прискорення відкриття реакційної голівки ензиму необхідно розірвати зв'язок із АТР/ADP. Цей процес може бути ключовою подією, необхідною для переходу в стан E_1 . Враховуючи здатність калікс[4]арену С-107 проникати крізь мембрану, не виключена можливість його взаємодії з цитоплазматичними фрагментами ензиму.

Так, нами встановлено, що калікс[4]арен С-107 із великою вірогідністю може утворювати комплекс з ензимом в ділянці 1 (між N- та А-доменами Na^+, K^+ -АТРрази), близько до сольового містка між Arg551 в N-ділянці і Glu223 в А-доміні (рис. 4). Таким чином, взаємодія С-107 з амінокислотними залишками в цих ділянках може впливати на розташування субстрату і гідроліз ковалентного ензим-субстратного інтермедиату. При цьому встановлено, що у взаємодії із фосфонатними групами каліксарену можуть бути задіяні залишки Lys212.A, Arg240.A і Arg551.A. NH^{2+} -групи амінофосфонових фрагментів молекули калікс[4]арену С-107 взаємодіють із залишками Glu223.A і Glu550.A (А, у позначеннях амінокислотних залишків означає α -домен, а Б – відповідно β -домен ензиму) (рис. 4). Калікс[4]аренові фрагменти улаштовуються у просторі, утвореному залишками Pro224.A, Gln225.A, Gly449.A, Asp450.A,

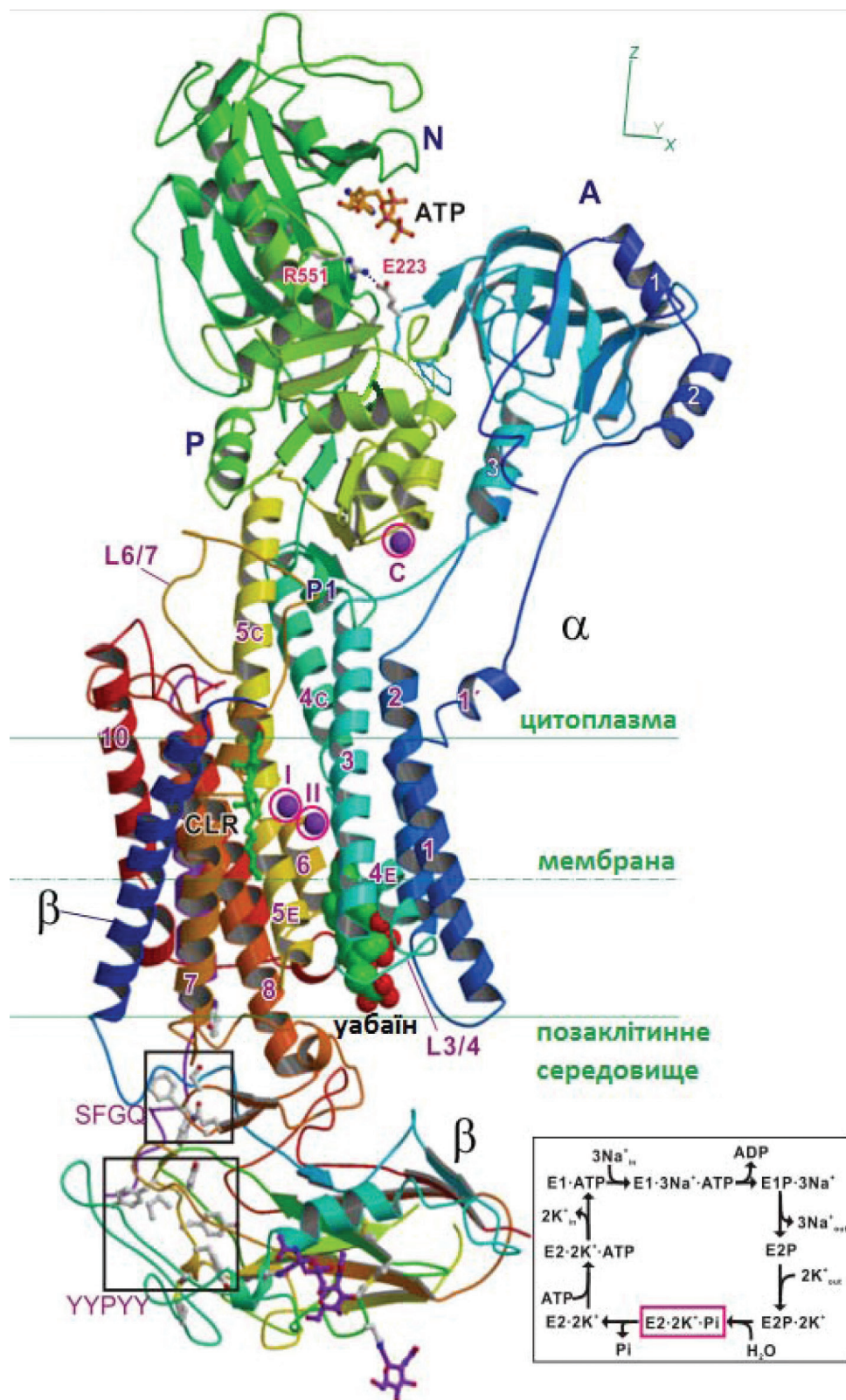


Рис. 2. Схема структурної організації Na⁺,K⁺-АТРази в комплексі з уабаїном та АТР (PDB ID: 3A3Y) [39, 47]. Колір поступово змінюється від N-кінця (синій) до С-кінця (червоний). Зв'язані іони K⁺ відмічено символами – I, II та С і обведено колом. А – активаторний домен; N – нуклеотидзв'язувальний домен; P – домен, що фосфорилується; α-, β-субодиниці Na⁺,K⁺-АТРази; L – петлі між спіралями α-субодиниці, які позначено цифрами. У вставці показано спрощену схему Поста–Альбертса

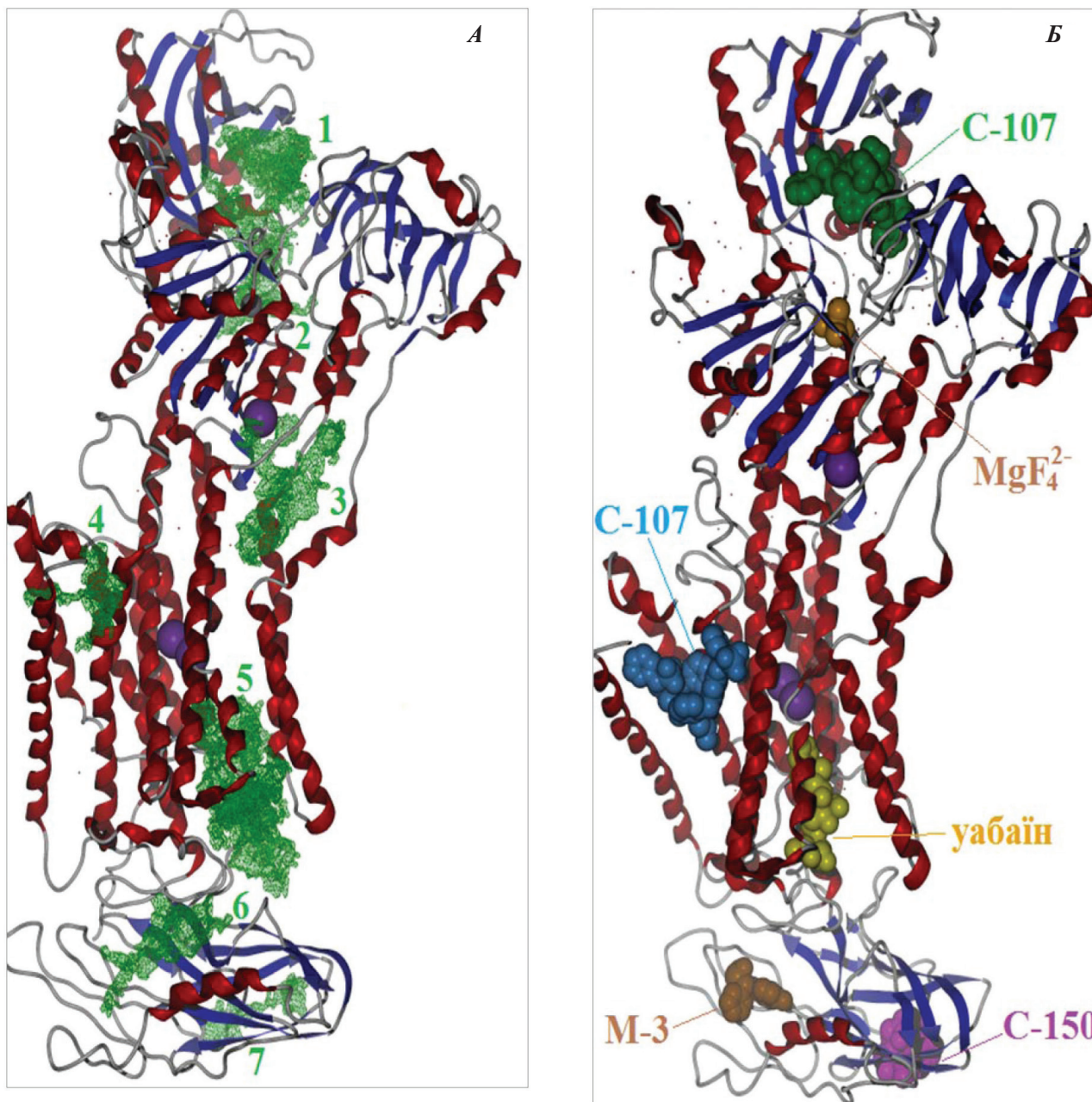


Рис. 3. Аналіз димеру (α - та β -субодиниця) Na^+, K^+ -АТРази на наявність впадін (cavities) – функціонально активних ділянок, які виділено зеленим кольором: А – западини; Б – найвірогідніші місця зв'язування різних лігандів функціональними ділянками Na^+, K^+ -АТРази, що одержано методом докінгу (для С-107, С-150 та М-3)

Ser484.A, Gly509.A, Leu553.A та Pro511.A. При цьому фенольні кільця каліксаренової чаші знаходяться в гідрофобній та стекінг-взаємодії із залишками ароматичних амінокислот – Phe482.A, Tyr488.A та Tyr542.A.

За комп'ютерного моделювання було отримано значення вільної енергії зв'язування та різних типів взаємодій, які характеризу-

ють взаємодію калікс[4]арену С-107 з Na^+, K^+ -АТРазою в ділянці зв'язування 1 (табл. 1).

Також нас цікавило, які саме взаємодії беруть участь в утворенні комплексу калікс[4]арену С-107 із лігандзв'язувальною зоною Na^+, K^+ -АТРази в ділянці зв'язування 1. На рис. 5 ідентифіковано гідрофобні (рис. 5, А) та електростатичні взаємодії (рис. 5, Б).

Ділянка 4 знаходиться в тій частині молекули Na^+, K^+ -АТРази, де присутній сегмент, зв'язаний із трансмембранною спіраллю М5 і петлею L6/7 (рис. 3), що зв'язує спіралі М6 і М7 (L6/7), який може рухатися під час реакційного циклу і впливати на спорідненість до іонів, які беруть участь у реакції [51, 52]. При цьому в конформації бічного ланцюга Asn783 фіксується водневим зв'язком з Tyr854 на вигнутій частині спіралі М7. Спіраль М5 α -субодиниці також частково розкручена і вигнута. Цей вигін, причиною якого є Pro785, має вирішальне значення для створення простору та забезпечення здатності карбоксилу Thr799 основного ланцюга для координування K^+ [53]. Спіраль М7 α -субодиниці стабілізується водневим зв'язком між Tyr44 на β -субодиниці з карбоксилем Gly855 α -субодиниці.

Встановлено, що у взаємодії із фосфатними групами каліксарену можуть бути задіяні залишки Arg28.B і Arg848.A. NH_2^+ -групи амінофосфонових фрагментів молекули калікс[4]арену С-107 взаємодіють із залишками Glu847.A і Glu1020.A. Ці фрагменти улаштовуються у просторі, утвореному залишками

Tyr40.B, Phe43.B, Tyr44.B, Val298.A, Phe301.A, Leu302.A, Ser851.A, Tyr854.A, Gly855.A та Gln856. А. При цьому каліксаренова чаша розміщується у гідрофобному кластері, утвореному залишками ароматичних амінокислот – Phe33.B, Phe37.B, Tyr40.B, Phe43.B, Tyr44.B, Phe301.A та Tyr854.A. Ці залишки можуть утворювати гідрофобні та стекінг-взаємодії із фенольними кільцями каліксаренової чаші (рис. 6).

Необхідно зазначити, що в ділянці 4 молекула каліксарену формує стекінг-зв'язки із залишками ароматичних амінокислот α - та β -субодиниці одночасно. Зокрема, калікс[4]арен С-107 взаємодіє з Tyr44.B бічного ланцюга β -субодиниці.

Очевидно, що зв'язування молекули каліксарену С-107 у зоні, наближеній до цього сегмента, може спричинювати порушення його конформаційної рухливості, і, таким чином, впливати на реакційний цикл ензиму та спорідненість до іонів, які беруть участь у реакції, що підтверджується нашими експериментальними даними [40]. Утворення комплексу калікс[4]арену С-107 з ензимом у

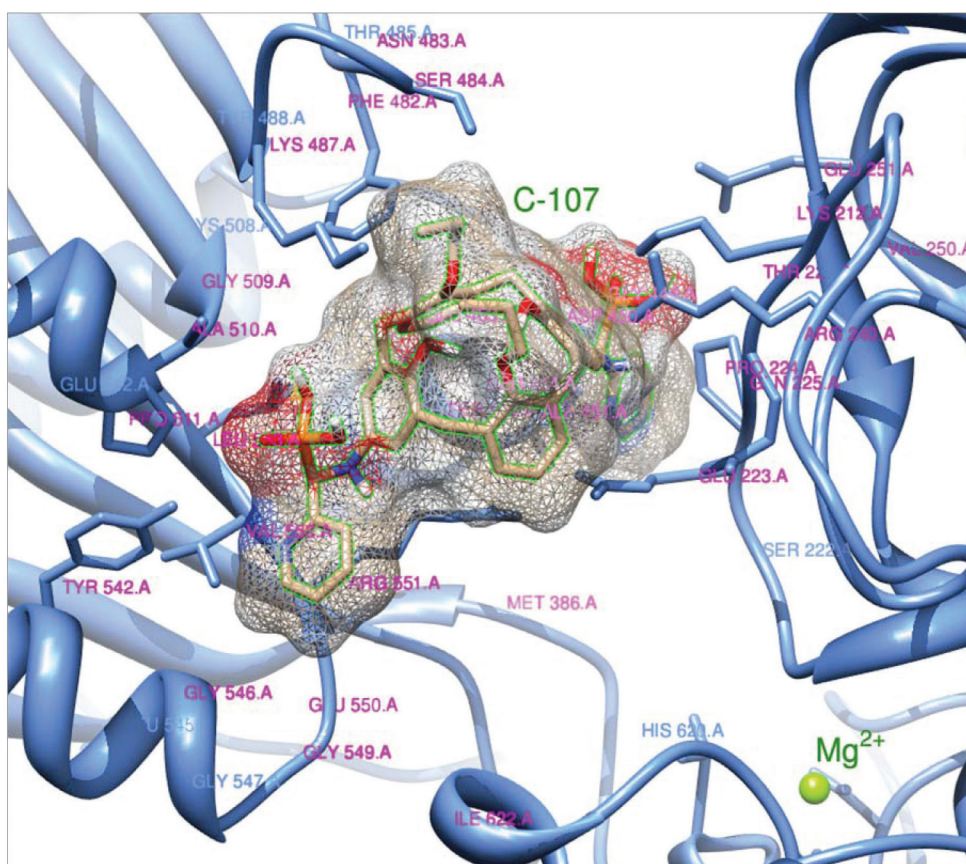


Рис. 4. Амінокислотне оточення комплексу каліксарен «С-107 – Na^+, K^+ -АТРази» в ділянці зв'язування I

Таблиця 1. Величини загальної вільної енергії зв'язування (відносні одиниці $O\Phi$, E_{score}) за різних типів взаємодій калікс[4]арену C-107 із Na^+, K^+ -АТРазою в ділянці зв'язування 1

Калікс[4]арен C-107	Значення	MolDock Score, E_{score}
Загальна енергія	—	-109,776
Взаємодія із зовнішнім лігандом	—	-154,824
Взаємодія протеїн–ліганд	—	-154,367
Стерична взаємодія (за PLP)	-145,417	-145,417
Стерична взаємодія (за LJ12-6)	-0,376	—
Водневі зв'язки	-7,088	-7,088
Водневі зв'язки (непрямі)	-8,949	—

цій зоні може спричинювати конформаційні зміни структури ензиму, що, в свою чергу, може також пояснити вплив каліксарену на вірогідність підвищення спорідненості убаїну до ензиму, оскільки сайт зв'язування убаїну з помпою знаходиться неподалік (рис. 3, Б), кільце лактону убаїну знаходиться близько до частково розкрученої М4 спіралі α -субодиниці, а залишок рамнози взаємодіє з L7/8 петлею α -субодиниці [54, 55].

Під час комп'ютерного моделювання було отримано значення загальної вільної енергії зв'язування та різних типів взаємодій, які характеризують взаємодію калікс[4]арену C-107

із Na^+, K^+ -АТРазою в ділянці зв'язування 4 (табл. 2).

Для порівняння із дослідженням ділянки 1 ми також провели визначення взаємодій, які беруть участь в утворенні комплексу калікс[4]-арену C-107 із Na^+, K^+ -АТРазою в ділянці зв'язування 4. На рис. 7, ідентифіковані гідروفобні (рис. 7, А) та електростатичні (рис. 7, Б) взаємодії.

Отже, як показують результати докінг-аналізу взаємодії каліксарену C-107 із ЛЗД-ензимом переважно спостерігається гідروفобний контакт між ліпофільною макроциклічною структурою каліксарену і

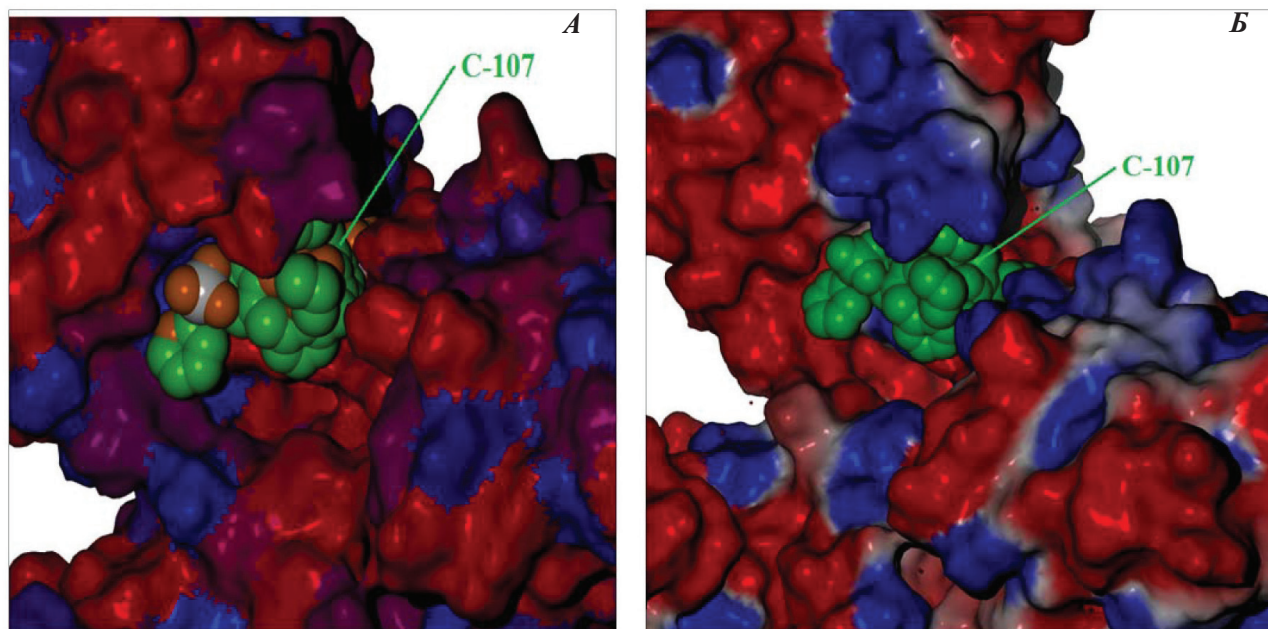


Рис. 5. Гідروفобні (А) та електростатичні (Б) взаємодії калікс[4]арену C-107 із Na^+, K^+ -АТРазою в ділянці зв'язування 1. Тут і на рис. 7: А – поверхня ензиму, що має гідروفобні властивості позначена червоним, гідрофільні – синім; Б – поверхня ензиму, що має позитивний заряд позначена червоним, негативний – синім

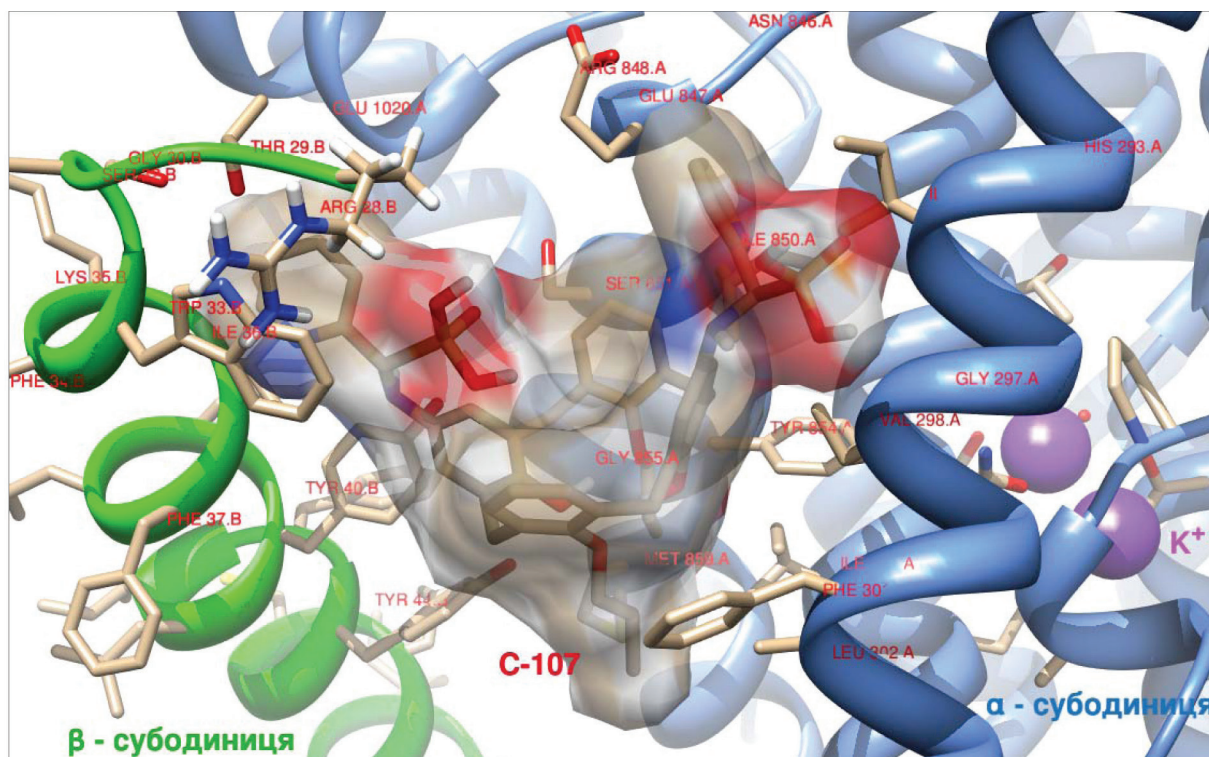


Рис. 6. Амінокислотне оточення комплексу каліксарен C-107 – ензим в ділянці зв'язування 4

Таблиця 2. Величини загальної вільної енергії зв'язування (відносні одиниці ОФ, E_{score}) за різних типів взаємодій калікс[4]арену C-107 із Na^+, K^+ -АТРазою в ділянці зв'язування 4

Калікс[4]арен C-107	Значення	MolDock Score, E_{score}
Загальна енергія	–	-152,537
Взаємодія із зовнішнім лігандом	–	-155,125
Взаємодія протеїн–ліганд	–	-155,227
Стерична взаємодія (за PLP)	-153,188	-153,188
Стерична взаємодія (за LJ12-6)	-10,890	–
Водневі зв'язки	-1,926	-1,926
Водневі зв'язки (непрямі)	-5,804	–

аліфатичними або ароматичними бічними ланцюгами амінокислотних залишків ензиму.

На противагу цьому, інша частина молекули калікс[4]арену C-107 – гідрофільні кислотні залишки, контактують із позитивно та негативно зарядженими R-групами амінокислот ензиму. При цьому також відмічено стекінг-взаємодію фенольних фрагментів макроциклічної структури калікс[4]арену C-107 з ароматичними бічними ланцюгами залишків. Завдяки цьому відбувається

стабілізація конформації каліксарену в лігандзв'язувальних кишнях ензиму.

Також було досліджено міжмолекулярні водневі зв'язки в системі «каліксарен – протеїн». Найхарактернішим є водневий зв'язок, в якому беруть участь фосфатна та аміногрупа бічних залишків каліксарену. Менш характерні водневі зв'язки, в яких беруть участь інші атоми бічних залишків каліксарену. Для каліксаренової чаші водневі зв'язки з атомами протеїну нехарактерні.

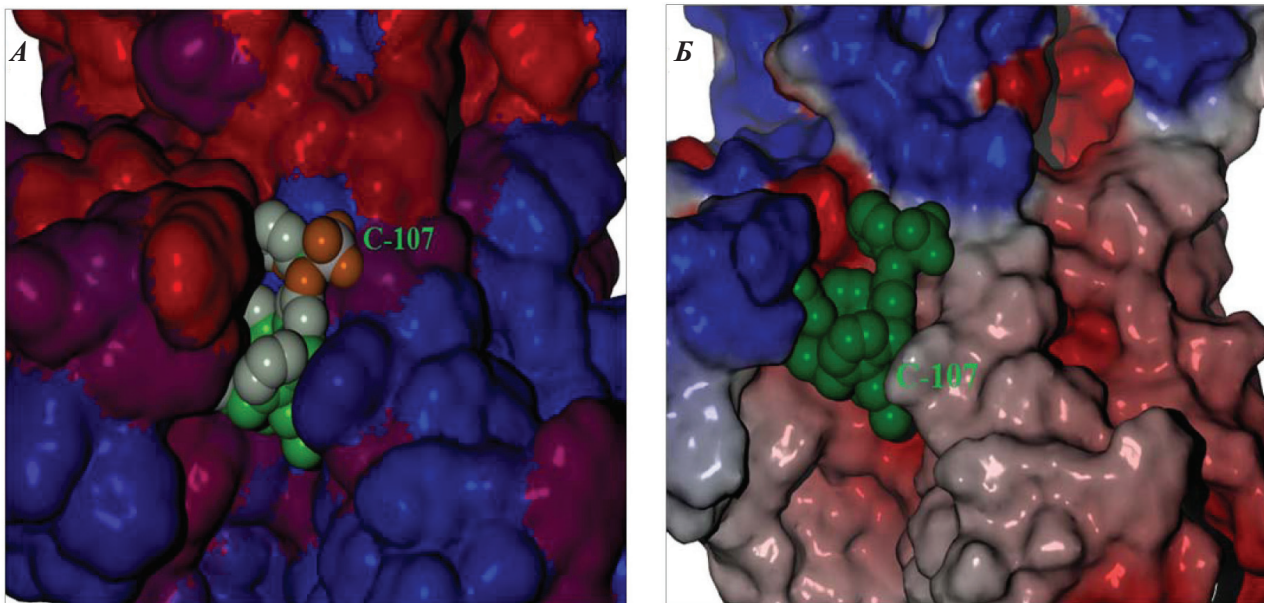


Рис. 7. Гідрофобні (А) та електростатичні (Б) взаємодії калікс[4]арену С-107 з Na^+, K^+ -АТРазою в ділянці зв'язування 4

Таким чином, одержані нами результати комп'ютерного моделювання відповідають експериментальним даним стосовно здатності каліксарену впливати на ензиматичну активність Na^+, K^+ -АТРази.

Також нами було проведено комп'ютерне моделювання взаємодії модельних фрагментів каліксарену С-107 (С-150 та М-3) із лігандзв'язувальними ділянками Na^+, K^+ -АТРази (рис. 2).

Встановлено, що калікс[4]арен С-150 найвірогідніше може взаємодіяти з ензимом в зоні скупчення ароматичних залишків β -субодиниці (ділянка 7), яка знаходиться в позаклітинному просторі, що добре корелює з особливістю структури калікс[4]арену С-150, яка являє собою гідрофобну тетрафенольну «корзину» (рис. 3, А). Місце зв'язування цього модельного фрагмента істотно відрізняється від ділянки зв'язування калікс[4]арену С-107, і фактично знаходиться в ділянці протеїну, яка не містить функціонально важливих амінокислотних залишків. Це добре підтверджується одержаними експериментальними результатами про практичну відсутність впливу калікс[4]арену С-150 на роботу ензиму.

Модельний фрагмент М-3, як показують результати комп'ютерного моделювання, також може зв'язуватися з амінокислотними залишками ензиму в позаклітинному просторі мембрани (область б) у зоні між α - та β -субодиницями (рис. 3, А). Експери-

ментально показано незначний вплив фрагмента М-3 при концентрації $4 \cdot 10^{-4}$ М (~15% інгібувальний ефект) (рис. 1) може пояснюватися зв'язуванням цього фрагмента у невеликій западині із амінокислотними залишками протеїну в ділянці зв'язування 6 (рис. 3, Б), неподалік від зони, де спіраль β -субодиниці утворює численні зв'язки з петлею, яка зв'язує спіралі М7 і М8 (L7/8) α -субодиниці (рис. 2). Для цієї зони характерна комплексна взаємодія α - і β -субодиниць. При цьому β -субодиниця модулює функціональні властивості Na^+, K^+ -АТРази, в тому числі спорідненість до катіонів і захоплення K^+ [46].

Отже, результати докінгу калікс[4]арену С-107 в ЛЗД Na^+, K^+ -АТРази свідчать про те, що цей каліксарен може зв'язуватися з декількома лігандзв'язувальними ділянками ензиму (рис. 3). При цьому встановлено деякі особливості у взаємодії ліганду з ензимом. Зокрема, важливу участь у взаємодії каліксаренової чаші С-107 з ензимом відіграють гідрофобні (стеричні) взаємодії. Тобто залишки ароматичних амінокислот «фіксують» каліксарен в ділянці зв'язування з протеїном. У той самий час залишки негативно та позитивно заряджених амінокислот формують водневі зв'язки із NH_2^+ -групами амінофосфонових фрагментів і атомами кисню метиленбісфосфонатних фрагментів каліксарену С-107. Таким чином, гідрофільні фрагменти каліксарену задають «вектор напрямку», у якому фіксується моле-

кула калікс[4]арену С-107 у ділянці взаємодії з ензимом.

Результати нашого дослідження демонструють особливості застосування макроциклічної платформи для цілеспрямованого конструювання інгібіторів активності Na^+, K^+ -АТРази. Перевагою таких макроциклічних інгібіторів може бути можливість введення в їхню структуру біоізостеричних груп, певним чином орієнтованих у просторі і здатних в окремих випадках істотно підвищувати спорідненість інгібітора до ензиму. Вірогідно, наявність гідрофобної платформи функціоналізованих калікс[4]аренів може сприяти закріпленню їх на гідрофобних ділянках у центрі зв'язування субстрату. Калікс[4]арен С-107 є ефективним інгібітором Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани міометрія, що можна пояснити додатковою фіксацією фосфонатних залишків та гідрофобним контактом макроциклічної платформи. Очевидно, що у взаємодії калікс[4]арену С-107 із лігандзв'язувальними ділянками Na^+, K^+ -АТРази важливу роль відіграють гідрофобні зв'язки.

Таким чином, механізм дії калікс[4]арену С-107 на Na^+, K^+ -АТРази відрізняється від дії убаїну. Враховуючи складну структуру АТРази, яка в біологічній мембрані складається із двох спарених α - і β -субодиниць, калікс[4]арен С-107, найімовірніше, може не тільки зменшувати спорідненість іонів Na до натрієвої помпи, а також безпосередньо впливати на макроструктуру Na^+, K^+ -АТРази, на відміну від дії убаїну, що фактично підтверджується підвищенням інгібувальної дії калікс[4]арену С-107 порівняно з убаїном [43].

Отже, в цій роботі з використанням методів докінг-аналізу проведено комп'ютерне моделювання міжмолекулярних взаємодій, характерних для комплексів «ліганд (калікс[4]арен С-107 та модельні сполуки) – рецептор (лігандзв'язувальні ділянки Na^+, K^+ -АТРази)» і, спираючись на одержані результати проаналізовано амінокислотні залишки, які взаємодіють з лігандами, і досліджено тип їх взаємодій.

Робота фінансувалась цільовою комплексною міждисциплінарною програмою наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» (№ держреєстрації 0110U005971), програмою фундаментальних досліджень НАН України та національним науковим центром Франції «Супрамолекулярні системи в хімії та біології»

Каліксарени як модулятори активності ензиматичних та транспортних білків гладеньких м'язів» (№ держреєстрації 0110U000988), державною цільовою науково-технічною програмою «Нанотехнології та наноматеріали» (№ держреєстрації 0110U005970) та грантом НАН України на підтримку досліджень молодих вчених «Каліксарени як ефектори АТР-гідролаз плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин» (№ держреєстрації 0111U007135).

КАЛИКС[4]АРЕН С-107 КАК ВИСОКОАФФИННЫЙ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИНГИБИТОР Na^+, K^+ -АТРази ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

*А. В. Бевза¹, Т. А. Веклич¹, А. А. Шкрабак¹,
Р. В. Родик², В. И. Кальченко²,
С. А. Костерин¹*

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

²Институт органической химии
НАН Украины, Киев;
e-mail: vik@ioch.kiev.ua

В экспериментах, выполненных на суспензии плазматических мембран клеток миомеретрия, исследовали ингибиторное действие 5,17-ди(фосфоно-2-пиридилметил)амино-11,23-ди-трет-бутил-26,28-ди-гидрокси-25,27-дипропоксикаликс[4]арена (каликс[4]арен С-107, указан шифр) на Na^+, K^+ -АТРази активностью. Показано, что калікс[4]арен С-107 (10^{-8} – 10^{-4} М) эффективнее, чем убаин, угнетает активность Na^+, K^+ -АТРази, практически не влияя на активность базальной Mg^{2+} -АТРази. Величина коэффициента ингибирования $I_{0,5}$ равна 33 ± 4 нМ, значение коэффициента Хилла $n_n = 0,38 \pm 0,06$. Модельные соединения – незамещенный по верхнему венцу 25,27-дипропоксикаликсарен С-150 – каліксареновая «платформа» (10^{-8} – 10^{-4} М) и N-(4-гидроксибензил)-2-пиридил-аминофосфоновая кислота – соединение М-3 (аминофосфоновая группа, аналогичная остаткам, модифицирующей верхний венец каліксарена С-107, вместе с фенольным фрагментом) (10^{-7} – $4 \cdot 10^{-3}$ М) практически не влияют на исследованные энзиматические системы.

Проведено компьютерное моделирование взаимодействия калікс[4]арена С-107 и его модельных соединений с лигандсвязывающими участками Na^+, K^+ -АТРази плазматической мембраны. Выяснены структурные

основы межмолекулярного взаимодействия каликс[4]арена C-107 с лигандсвязывающими участками энзима. Обсуждается участие водородных, гидрофобных, электростатических и π - π (стекинг)-взаимодействий между каликса-реном и аминокислотными остатками Na^+ , K^+ -АТРазы, которые расположены рядом с активным центром АТРазы.

Ключевые слова: Na^+ , K^+ -АТРазы, плазматическая мембрана, гладкомышечные клетки, миоциты, каликса-рен C-107, компьютерное моделирование, докинг.

THE CALIX[4]ARENE C-107 IS HIGHLY EFFECTIVE SUPRAMOLECULAR INHIBITOR OF THE Na^+ , K^+ -ATPase OF PLASMATIC MEMBRANE

O. V. Bevza¹, T. O. Veklich¹, O. A. Shkrabak¹, R. V. Rodik², V. I. Kalchenko², S. O. Kosterin¹

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

²Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: vik@bpci.kiev.ua

The inhibition of the Na^+ , K^+ -ATPase activity of the myometrium cell plasma membranes with calixarene C-107 (5,17-diamino(2-pyridyl)methylphosphono-11,23-di-tert-butyl-26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene) was investigated. It has been shown that calixarene C-107 reduced the Na^+ , K^+ -ATPase activity more efficiently than ouabain did, while it did not practically influence the «basal» Mg^{2+} -ATPase activity of the same membrane. The magnitude of the coefficient of inhibition $I_{0.5}$ was 33 ± 4 nM, Hill coefficient was 0.38 ± 0.06 . The model calixarene C-150 – the calixarene «scaffold» (26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene), and the model compound M-3 (4-hydroxyaniline(2-pyridine)methylphosphonic acid) – a fragment of the calixarene C-107, had practically no influence on the enzymatic activity of Na^+ , K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase.

We carried out the computer simulation of interaction of calixarenes C-107 and the mentioned model compound with ligand binding sites of the Na^+ , K^+ -ATPase of plasma membrane and structure foundation of their intermolecular interaction was found out. The participation of hydrogen, hydrophobic, electrostatic and π - π (stacking) interaction between calixarene and enzyme aminoacid residues, some of which are located near the active center of Na^+ , K^+ -ATPase, was discussed.

Key words: Na^+ , K^+ -ATPase, plasma membrane, smooth muscle cells, myometrium, calix[4]arene C-107, computer simulation, docking.

1. *Кривой И. И., Дрabbкина Т. М., Добрецов М. Г. и др.* // Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2004. – **90**, № 1. – С. 59–72.
2. *Лопина О. Д.* // Биохимия. – 2001. – **66**, вып. 6. – С. 1389–1400.
3. *Boldyrev A. A.* // Membr. Cell. Biol. – 2000. – **13**, N 6. – P. 715–719.
4. *Avkiran M., Snabaitis A. K.* // J. Tromb. Trombolysis. – 1999. – **8**. – P. 25–32.
5. *Greger R.* // Am. J. Med. – 2000. – **319**. – P. 51–62.
6. *Якубцова И. В., Проценко Т. Л., Хилько Т. Д., Остапченко Л. И.* // Фізика живого. – 2006. – **14**, № 1. – P. 73–80.
7. *Xie Z., Askari A.* // Eur. J. Biochem. – 2002. – **269**. – P. 2434–2439.
8. *Aydemir-Koksoy A., Abramowitz J., Allen J. C.* // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**. – P. 46605–46611.
9. *Krug L. M., Berk B. C.* // Hypertension. – 1992. – **20**(2). – P. 144 – 150.
10. *Orlov S. N., Pchejetski D., Taurin S. et al.* // Apoptosis – 2004. – **9**, N 1. – P. 55–66.
11. *Blaustein M. P.* // Am. J. Physiol. – 1993. – **264**, N 6 (Pt 1). – P. C1367–C1387.
12. *Kopaczynska M., Wang T., Schulz A. et al.* // Langmuir. – 2005. – **21**, N 18. – P. 8460–8465.
13. *Zhao B. T., Blesa M. J., Mercier N. et al.* // J. Org. Chem. – 2005. – **70**, N 16. – P. 6254–6257.
14. *Gutsche C. D.* Calixarenes Revisited, The Royal Society of Chemistry: Cambridge (1998).
15. *Lumetta G. J., Rogers R. D., Gopalan A. S.* Calixarenes for Separations., American Chemical Society: Washington (2000).
16. *Namor A. F., Pugliese A., Casal A. R. et al.* // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2000. – P. 4355–4360.
17. *Talanova G. G., Hwang H.-S., Talanov V. S., Bartsch R. A.* // Chem. Commun. – 1998. – **9**. – P. 419–420.
18. *Pelizzi N., Casnati A., Friggeri A., Ungaro R.* // J. Chem. Soc., Perkin Trans. – 1998. – N 6. – P. 1307–1312.
19. *Budka J., Lhotak P., Michlova V., Stibor I.* // Tetrahedron Lett. – 2001. – **42**. – P. 1583–1586.
20. *Arena G., Contino A., Gulino F. G. et al.* // Ibid. – 2000. – **41**. – P. 9327–9330.
21. *Perret F., Lazar A., Coleman A.* // Chem. Commun. – 2006. – P. 2435–2438.

22. Кальченко В. І., Родік Р. В., Бойко В. І. // Журн. орг. та фарм. хімії. – 2005. – 3. – С. 13–29.
23. Da Silva E., Lazar A., Coleman A. // Drug. Sci. tech. – 2004. – 14, N 1. – P. 3–20.
24. Векліч Т. О., Шкрабак О. А., Костерін С. О. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2006. – 78, № 6. – С. 53–63.
25. Векліч Т. О., Костерін С. О., Родік Р. В. та ін. // Там само. – 2006. – 78, № 1. – С. 70–86.
26. Векліч Т. О., Костерін С. О. // Там само. – 2005. – 77, № 2. – С. 66–75.
27. Кондратюк Т. П., Быченко С. Ф., Прищепна Л. А. и др. // Там же. – 1986. – 58, № 4. – С. 50–56.
28. Bradford M. M. // Anal. Biochem. – 1976. – 72. – P. 248–282.
29. Flynn E. R. M., Bradley K. N., Muir T. C., McCarron J. G. // J. Biol. Chem. – 2001. – 276, N 39. – P. 36411–36418.
30. Векліч Т. О., Костерін С. О., Шинлова О. П. // Укр. біохім. журн. – 2002. – 74, № 1. – С. 42–48.
31. Valente R. C., Capella L. S., Monteiro R. Q. et al. // FASEB J. – 2003. – 17, N 12. – P. 1700–1702.
32. Wang H., Haas M., Liang M. et al. // J. Biol. Chem. – 2004. – 279, N 17. – P. 17250–17259.
33. Rathbun W., Betlach V. // Anal. Biochem. – 1969. – 28, N 1–3. – P. 436–445.
34. Cassidy C. E., Setzer W. N. // J. Mol. Model. – 2010. – 16. – P. 311–326.
35. Shinoda T., Ogawa H., Cornelius F., Toyoshima C. // Nature. – 2009. – 459. – P. 446–450.
36. Li L., Jose J., Xiang Y. et al. // Ibid. – 2010. – 468, N 7324. – P. 645–646.
37. Krieger E., Koraimann G., Vriend G. // Proteins. – 2002. – 47(3). – P. 393–402.
38. Morth J. P., Pedersen B. P., Toustrup-Jensen M. et al. // Nature. – 2007. – 450. – P. 1043–1049.
39. Ogawa H., Shinoda T., Cornelius F., Toyoshima C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – 106. – P. 13742–13747.
40. Шкрабак О. А., Кальченко О. І., Родік Р. В. та ін. // Укр. біохім. журн. – 2008. – 80, № 2. – С. 90–100.
41. Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H. // Nature. – 2000. – 405. – P. 647–655.
42. Xu C., Rice W. J., He W., Stokes D. L. // J. Mol. Biol. – 2002. – 316. – P. 201–211.
43. Цимбалюк О. В., Онуфрійчук О. В., Векліч Т. О. та ін. // Фізика живого. – 2006. – 14, № 1. – С. 53–72.
44. Geering K. // Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. – 2008. – 17. – P. 526–532.
45. Lingre J. B. // Annu. Rev. Physiol. – 2010. – 72. – P. 395–412.
46. Yatime L., Laursen M., Morth J. P. et al. // J. Struct. Biol. – 2011. – 174. – P. 296–306.
47. Toyoshima C., Kanai R., Cornelius F. // Structure. Elsevier. – 2011. – 19. – P. 1732–1738.
48. Adamian L., Naveed H., Liang J. // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – 1808. – P. 1092–1102.
49. Cornelius F., Mahmmoud Y. A., Toyoshima C. // J. Biol. Chem. – 2011. – 286. – P. 29882–29892.
50. Bab-Dinitz E., Albeck S., Peleg Y. et al. // Biochemistry. – 2009. – 48. – P. 8684–8691.
51. Hasler U., Crambert G., Horisberger J. D., Geering K. // J. Biol. Chem. – 2001. – 276. – P. 16356–16364.
52. Lifshitz Y., Petrovich E., Haviv H. et al. // Biochemistry. – 2007. – 46. – P. 14937–14950.
53. Mishra N. K., Peleg Y., Cirri E. et al. // J. Biol. Chem. – 2011. – 286. – P. 9699–9712.
54. Yatime L., Buch-Pedersen M. J., Musgaard M. et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – 1787. – P. 207–220.
55. De Pont J. J., Swarts H. G., Karawajczyk A. et al. // Pflugers Arch. – 2009. – 457. – P. 623–634.

Отримано 24.09.2012