Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

ШЕНКАРЕВ Захар Олегович

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ И МЕМБРАНОАКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ ПО ДАННЫМ ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

Специальность 03.01.02 – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Научный консультант:
доктор химических наук, профессор,
Арсеньев Александр Сергеевич

Москва 2014

Содержание

Список использованных сокращений **6**
Введение **8**
ГЛАВА 1 Обзор литературы. **14**
1.1 Взаимодействия, стабилизирующие пространственную структуру, и факторы, определяющие активность мембранных белков и мембраноактивных пептидов 14
1.2 ЯМР-спектроскопия высокого разрешения в исследовании пространственной структуры и внутримолекулярной динамики белков и пептидов 17
1.2.1 Химический сдвиг 18
1.2.2 Спин-спиновое и диполь-дипольное взаимодействие. Многомерная ЯМР-спектроскопия 20
1.2.3 Исследование пространственной структуры белков по данным ЯМР. Диапазон применимости метода 21
1.2.4 Дополнительные области применения ЯМР-спектроскопии 26
1.3 Исследование мембранных белков методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения 27
1.3.1 Способы рекомбинантной продукции МБ в функционально активной форме 29
1.3.2 Мембраномоделирующие среды для ЯМР-исследований МБ и МП 32
1.3.3 ЯМР-исследования МБ в детергент-содержащих мембраномоделирующих средах 39
1.4 Липид-белковые нанодиски (ЛБН) – альтернативная мембраномоделирующая среда 41
1.4.1 Липопротеины плазмы крови млекопитающих 42
1.4.2 Аполипопротеин А1 человека и обратный транспорт холестерина 43
1.4.3 Реконструированные частицы липопротеинов высокой плотности или нанодиски 45
1.4.4 Использование нанодисков для солюбилизации и исследования мембранных биомолекул 47
1.4.5 ЛБН в ЯМР-спектроскопии высокого разрешения 50
1.5 Антимикробные мембраноактивные пептиды (АП) 52
1.5.1 Спектр активности и специфичность действия АП 53
1.5.2 Структура АП и модели их мембранной активности 57
1.5.3 Структурно-функциональные зависимости на примере спиральных АП 63
1.5.4 Перспективы использования АП 68
1.6 Структурная организация и молекулярные механизмы работы потенциалозависимых K^+-каналов 69
1.6.1 Катионные каналы суперсемейства P-loop 69
1.6.2 Пространственная структура ПЧД катионных каналов 75
1.6.3 Исследование структуры ПЧД-KvAP методами ЭПР- и ЯМР-спектроскопии 82
1.6.4 Модели потенциалозависимой активации 85
ГЛАВА 2 Липид-белковые нанодиски – альтернативная среда для стабилизации «нативной» структуры и ЯМР-исследований мембранных белков и мембраноактивных пептидов **90**
2.7 Возможность применения ЛБН для ЯМР-исследований интегральных МБ 92
2.7.1 Теоретические предпосылки возможности применения нанодисков в качестве мембранного миметика для структурных исследований методами ЯМР 92
2.7.2 Практические аспекты приготовления ЛБН/белковых комплексов для ЯМР-спектроскопии. 93
2.7.3 Приготовление «пустых» ЛБН. Зависимость диаметра нанодисков от липидного состава. 94
2.7.4 ^{31}P-ЯМР-спектроскопия фосфолипидных мембран нанодисков 96
2.7.5 Реконструкция комплексов KcsA/ЛБН 97
2.7.6 ЯМР-спектроскопия ^{15}N-KcsA в составе нанодисков. 98
2.7.7 Возможность прямых структурных ЯМР-исследований комплексов МБ/ЛБН, полученных в результате бесклеточного синтеза. 99
2.7.8 Резюме 100
2.8 Фолдинг интегральных МБ *in vitro* в средах на основе нанодисков 102
2.1.1 Ренатурация KcsA с использованием ЛБН различного липидного состава. 102

2.1.2 Ренатурация бактериородопсина ESR 106
2.1.3 Резюме 107
2.9 Возможность использования ЛБН для структурных и биофизических исследований водорастворимых МП. 108
2.9.1 Взаимодействие АП ареницина-2 с нанодисками. 109
2.9.2 Взаимодействие нейротоксина NTII с нанодисками 112
2.9.3 Резюме 116
ГЛАВА 3 Исследование антибиотических пептидов, содержащих внутримолекулярные циклы 117
3.1 Химическая и пространственная структура нового двухкомпонентного лантибиотика лихеницидина (Lchα/Lchβ) 117
3.1.1 Определение первичной структуры лихеницидинов Lchα и Lchβ 117
3.1.2 Пространственная структура и динамика Lchα и Lchβ в метаноле 122
3.1.3 Модель антимикробного действия лихеницидина Lchα/Lchβ 125
3.1.4 Резюме 127
3.2 Пространственная структура, механизм взаимодействия с мицеллами DPC и двухвалентными катионами Mn^{2+} циклотидов Kalata B1 и Kalata B7 128
3.2.1 Энергетика взаимодействия циклотидов KB1 и KB7 с поверхностью мицеллы DPC 131
3.2.2 Топология системы дисульфидных связей в молекулах циклотидов 132
3.2.3 Пространственные структуры циклотидов KB1 и KB7 в комплексе с мицеллами DPC 134
3.2.4 Положение молекул KB1 и KB7 относительно поверхности мицеллы 136
3.2.5 Сайт связывания двухвалентных катионов в молекулах KB1 и KB7 139
3.2.6 Возможная роль взаимодействий пептид/мембрана и пептид/двухвалентный катион в антимикробной активности различных семейств циклотидов 141
3.2.7 Резюме 144
3.3 Пространственная структура, динамика, олигомеризация в мембраномоделирующем окружении и возможный механизм действия Ареницина-2 146
3.3.1 Пространственная структура и динамика ареницина-2 в воде 147
3.3.2 Пространственная структура и динамика димера ареницина-2 в комплексе с мицеллой DPC 151
3.3.3 Стехиометрия и топология комплекса ареницин-2/мицелла DPC 156
3.3.4 Олигомеризация ареницина-2 в средах, содержащих анионные липиды/детергенты 158
3.3.5 Сравнительный анализ структуры ареницина-2 в мембраномоделирующих средах методом КД-спектроскопии 161
3.3.6 Свойства пор, образованных ареницином, в плоских бислойных липидных системах и модель мембранной активности пептида 163
3.3.7 Резюме 165
3.4 Аурелин: пространственная структура, взаимодействие с мицеллами DPC и липидными везикулами, возможная роль в качестве ингибитора K^+-каналов 167
3.4.1 Пространственная структура и динамика аурелина в воде 170
3.4.2 Взаимодействие аурелина с липидными везикулами и мицеллами DPC 173
3.4.3 Сравнение пространственной структуры аурелина с другими белками, содержащими ShKT домены 176
3.4.4 Компьютерное моделирование комплекса аурелина с поровым доменом канала Kv1.1 177
3.4.5 Резюме 180
ГЛАВА 4 Исследование линейных каналообразующих антибиотиков Aam-I и Zrv-IIB 182
4.1 Пространственная структура и динамика Zrv-IIB в органических растворителях и мицеллах DPC 189
4.1.1 Качественный анализ структуры Aam-I и Zrv-IIB в воде и мембраномоделирующих средах по данным ЯМР- и КД-спектроскопии. Выбор сред для исследования 189
4.1.2 Пространственная структура Zrv-IIB в органических растворителях с низкой полярностью 191
4.1.3 Исследование ^{13}C,^{15}N-меченого Zrv-IIB в метаноле 194
4.1.4 Исследование спин-меченых аналогов зервамицина в метаноле 202

4.1.5 Пространственная структура Zrv-IIB в окружении мицелл DPC.....205
4.2 Пространственная структура и динамика Aam-I в метаноле, бицеллах, мицеллах и нанодисках.....208
4.2.1 Структура и динамика Aam-I в метаноле, сравнение с Zrv-IIB.....208
4.2.2 Структура и динамика Aam-I в окружении бицелл DMPC/DHPC, сравнение с Zrv-IIB в мицеллах DPC.....221
4.2.3 Структура, динамика и топология взаимодействия Aam-I/мембрана в средах на основе липид-белковых нанодисков.....231
4.3 Модель действия Zrv-IIB и Aam-I.....236
4.3.1 Модифицированная модель «связки спиралей» для описания порообразующей активности Zrv-IIB.....237
4.3.2 Структура и динамика Aam-I в контексте модифицированной модели «связки спиралей».....241
4.3.3 Резюме.....244
ГЛАВА 5.Исследование потенциалочувствительного домена канала KvAP.....247
5.1 ЛБН как «среда сравнения» для скрининга детергент-содержащих мембраномоделирующих сред при ЯМР-исследованиях МБ.....249
5.1.1 ЯМР-спектроскопия ^{15}N-ПЧД-KvAP в составе нанодисков.....250
5.1.2 Скрининг мембраномоделирующих сред для исследования ПЧД-KvAP.....251
5.1.3 Резюме.....254
5.2 Структура и динамика «нативного» состояния ПЧД-KvAP.....254
5.2.1 Отнесение ЯМР-сигналов и вторичная структура ПЧД-KvAP в мицеллах DPC/LDAO.....254
5.2.2 Изгиб ТМ спиралей и межспиральные контакты в молекуле ПЧД-KvAP.....259
5.2.3 Динамика основной цепи ПЧД-KvAP в мицеллах DPC/LDAO.....261
5.2.4 Гидродинамические свойства и топология комплекса ПЧД-KvAP/мицелла DPC/LDAO.....264
5.2.5 Качественный анализ динамики ПЧД-KvAP в нанодисках различного липидного состава.....266
5.2.6 Резюме.....266
5.3 Структура и динамика «расплавленного» состояния ПЧД.....268
5.3.1 Вторичная структура и изгиб спиралей в молекуле ПЧД-KvAP в мицеллах LPPG.....268
5.3.2 Динамика основной цепи ПЧД-KvAP в мицеллах LPPG и гидродинамические свойства комплекса домен/мицелла.....270
5.3.3 Сравнение межспиральных расстояний ПЧД-KvAP в мицеллах DPC/LDAO и LPPG.272
5.3.4 Резюме.....273
5.4 Формирование «нативной» пространственной структуры ПЧД-KvAP из «расплавленного» состояния (фолдинг *in vitro*).....275
5.5 Взаимодействие токсина VSTx1 с ПЧД-KvAP в мицеллах и нанодисках.....277
2.1.1 Взаимодействие токсина VSTx1 с нанодисками и мицеллами.....278
5.5.1 Взаимодействие ПЧД-KvAP с токсином VSTx1 в мицеллах DPC/LDAO.....281
5.5.2 Взаимодействие ПЧД-KvAP с токсином VSTx1 в мицеллах LPPG.....284
5.5.3 Взаимодействие токсина VSTx1 с ПЧД-KvAP в составе мембраны ЛБН.....284
5.5.4 Резюме.....286
ГЛАВА 6.Заключение. Обсуждение результатов.....289
ГЛАВА 7.Экспериментальная часть (Материалы и методы исследований).....294
7.1 Объекты исследования и материалы.....294
7.1.1 Реактивы.....294
7.1.2 Препараты белков, использованные в работе.....294
7.1.3 Препараты пептидов, использованные в работе.....295
7.1.4 Измерение концентрации препаратов МП и МБ методом спектрофотометрии.....296
7.2 Получение и анализ ЛБН и комплексов МБ/ЛБН и МП/ЛБН.....297
7.2.1 Реконструкция ЛБН и комплексов МБ/ЛБН и МП/ЛБН.....297
7.2.2 Физико-химический анализ ЛБН и комплексов МБ/ЛБН и МП/ЛБН.....300
7.3 Исследование МП в липосомах и КД-спектроскопия.....301
7.3.1 Исследование МП в липосомах.....301
7.3.2 Спектроскопия кругового дихроизма.....301

7.4 Структурные исследования МБ и МП методами ЯМР-спектроскопии 301
7.4.1 Приготовление образцов МП и МБ в классических мембраномоделирующих средах 301
7.4.2 Измерение ЯМР спектров и отнесение сигналов 303
7.4.3 Измерение КССВ, стереоспецифическое отнесение прохиральных протонов и ограничения на торсионные углы. 304
7.4.4 Анализ системы водородных связей 306
7.4.5 Расчет пространственной структуры 308
7.5 Исследование динамических характеристик МБ и МП методами ЯМР-спектроскопии 309
7.5.1 Измерение и анализ данных ^{15}N релаксации 309
7.5.2 Измерение и анализ параметров диффузии и размера частиц методами ЯМР-спектроскопии 310
7.6 Измерение и анализ эффекта парамагнитного усиления релаксации и межмолекулярного ЯЭО 312
7.6.1 Определение топологии взаимодействия МБ и МП с частицами мембраномоделирующих сред на основании данных PRE 312
7.6.2 Определение топологии взаимодействия МБ и МП с частицами мембраномоделирующих сред на основании межмолекулярного ЯЭО 313
7.6.3 Исследование спин-меченых аналогов зервамицина в метаноле. 314
7.6.4 Определение структуры комплексов KB1/DPC и KB7/DPC с ионами Mn^{2+} 315
7.6.5 Исследование спин-меченых вариантов ПЧД и их комплексов с токсином VsTx1 317
7.7 Определение энергетических параметров процессов образования комплексов и фолдинга МБ *in vitro* 318
7.7.1 Анализ изотерм связывания МП с частицами мембраномоделирующих сред 318
7.7.2 Анализ специфических и неспецифических взаимодействий в комплексе ПЧД/VsTx1 319
7.7.3 Анализ свободной энергии процесса фолдига ПЧД-KvAP 320
7.8 Компьютерное моделирование 321
7.8.1 Aam-I и Zrv-IIB 321
7.8.2 Ареницин и аурелин 321
7.9 Подготовка рисунков, депонирование экспериментальных данных и полученных структур 322
Выводы 323
Список литературы 325

Список использованных сокращений

Общие обозначения, экспериментальные методики

АП, антимикробный пептид;

ББС, бесклеточная белоксинтезирующая система;

БЛМ (BLM), бислойная липидная мембрана;

КД, круговой дихроизм;

КССВ, константа спин-спинового взаимодействия;

ККМ; критическая концентрация мицеллообразования.

криоЭМ, криоэлектронная микроскопия

ЛБН, липид-белковый нанодиск;

МБ, мембранный белок

МД, метод молекулярной динамики;

МП, мембраноактивный пептид.

РСА, рентгеноструктурный анализ;

СКО (rmsd), среднеквадратичное отклонение;

ТМ, трансмембранный;

ТС, трансляционная смесь;

ЭПР, электронный парамагнитный резонанс;

ЯМР, ядерный магнитный резонанс;

ЯЭО (NOE), ядерный эффект Оверхаузера;

BS-модель, модель связки спиралей/мономеров (barrel stave model);

CRINEPT, cross-correlated relaxation-enhanced polarization;

CSI, индекс химического сдвига;

CSD, Кембриджская структурная база данных;

EC_{50}, концентрация необходимая для достижения 50% активности;

HDL, липопротеины высокой плотности;

HMQC, heteronuclear multiple quantum correlation;

HSQC, heteronuclear single quantum correlation;

INEPT, insensitive nuclei enhanced by polarization transfer;

Kp, коэффициент распределения между двумя средами;

MIC, минимальная концентрация ингибирования;

PDB, база данных структур белков;

PRE, парамагнитное усиление релаксации (paramagnetic relaxation enhancement;

R_1, скорость продольной релаксации ядерной намагниченности;

R_2, скорость поперечной релаксации ядерной намагниченности;

RDC, остаточные константы диполь-дипольного взаимодействия (residual dipolar couplings);

R_{EX} – вклад обменных процессов в R_2 для ядер ^{15}N,

R_H, гидродинамический радиус частицы, радиус Стокса;

S^2, параметр порядка движений в пикосекундном суб-наносекундном диапазоне;

SUV, маленькие моноламелярные везикулы;

TROSY, transverse relaxation optimized spectroscopy

$\Delta\delta^{13}C^{\beta}$, магнитная неэквивалентность $^{13}C^{\beta}$ ядер, разница между химическими сдвигами $^{13}C^{\beta}$ групп в остатках Aib и Iva

$\Delta\nu$, ширина линии ЯМР на полувысоте;

ε, PRE R_2 релаксации HN протонов

η_{XY},скорость процесса кросс-корреляции между диполь-дипольной релаксацией и релаксацией, возникающей благодаря анизотропии химического сдвига ядра ^{15}N;

τ_e, характерное время пс-нс движений;

τ_R, эффективное время корреляции вращательных движений.

P:L, отношение концентрации пептида к концентрации липида (моль/моль);

P:D или D:P, отношения суммарных молярных концентраций белка(пептида) и детергента;

Белки, пептиды, аминокислоты, объекты исследования

апоА-1, аполипопротеин А-1 человека;

ПЧД, потенциалочувствительный домен

ПЧД-KvAP, ПЧД K^+-канала KvAP из археи *Aeropyrum pernix*;

Aam-I, антиамебин I из *Emericellopsis minima*;

Ar2, ареницин-2 из морского пескожила *Arenicola marina*;

ESR, бактериородопсин психрофильной бактерии *Exiguobacterium sibiricum*;

GPCR, рецептор связанный с G-белком;

KB1 и KB7, циклотиды Kalata B1 и B7 из растения *Oldenlandia affinis*;

KcsA – K^+-канал из *Streptomyces lividans*;

Kv, потенциалозависимый K^+-канал;

Lchα/Lchβ, двухкомпонентный лантибиотик лихеницидин из бактерии *Bacillus licheniformis*;

MSP, фрагмент 44-243 аполипопротеина A1 человека (membrane scaffold protein);

NTII, нейротоксин II из яда кобры *Naja oxiana*;

TM-ErbB3, TM домен тирозинкиназы ErbB3 человека;

VSTx1, «вольт-сенсорный» токсин из яда паука *Grammostola spatulata*;

Zrv-IIB, зервамицин-IIB из *Emericellopsis salmosynnemata*;

Aib, α-аминоизомасляная кислота (U);

Hyp, L-4-транс-гидроксипролин (O);

Iva, D-изовалин (α-этил аланин) (J);

Phl, L-фенилаланинол;

Липиды, детергенты, растворители, реагенты

5-DSA, 5-доксил-стеариновая кислота;

16-DSA, 16-доксил-стеариновая кислота;

DC7PC (di-C7:0-PC), дигептаноил-PC;

DDM, β-додецилмальтозид (C12);

DHPC (DC6PC, di-C6:0-PC), дигексаноил-PC;

DLPC (di-C12:0-PC), дилауроил-PC;

DLPG (di-C12:0-PG), дилауроил-PG;

DMPC (di-C14:0-PC), димиристоил-PC;

DOPC (di-C18:1-PC), диолеоил-PC;

DOPE (di-C18:1-PE), диолеоил-PE;

DOPG (di-C18:1-PG), диолеоил-PG;

DOPS (di-C18:1-PS), диолеоил-PS;

DOTAP, 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан;

DPC (Fos-12), додецилфосфохолин (C12);

DPG, кардиолипин (di-PG);

DPhPC (di-C16:0[$(CH_3)_4$]-PC), дифитаноил-PC;

Fos-14, фосфохолин C14

LDAO, лаурил-диметил-аминоксид (dodecyldimethylamine oxide, C12)

LMPC, лизо-миристоил-PC;

LMPG, лизо-миристоил-PG;

LPPG, лизо-пальмитоил-PG;

LPS, липополисахарид;

MTS, метантиосульфонат, methanethiosulfonate

PC, фосфатидилхолин;

PE, фосфатидилэтаноламин;

PG, фосфатидилглицерол;

PS, фосфатидилсерин;

POPC (C16:0-18:1-PC), пальмитоилолеоил-PC;

POPE (C16:0-18:1-PE), пальмитоилолеоил-PE;

POPG (C16:0-18:1-PG), пальмитоилолеоил-PG;

TFE (ТФЕ), 2,2,2-трифторэтанол;

SDS, додецилсульфат натрия (C12);

Введение

Клеточная мембрана является одним из основных компонентов живой клетки. Мембраны, отделяя внутреннее содержимое от внешней среды, обеспечивают целостность клетки и ее органелл, а также участвуют во множестве жизненно важных процессов, включая, фотосинтез, дыхание, транспорт питательных веществ, передачу сигналов, проведение ферментативных реакций, генерацию и поддержание трансмембранного (ТМ) электрического потенциала и т.д. За большинство из этих функций ответственны специальные молекулы – интегральные и периферические мембранные белки (МБ) и мембраноактивные пептиды (МП) [1]. Гены интегральных МБ составляют до трети всех белковых последовательностей, закодированных в геномах прокариот и эукариот [2], и именно МБ (такие как рецепторы, транспортеры, ионные каналы и т.д.) являются мишенями для действия свыше половины известных в настоящее время лекарственных препаратов [3]. Несмотря на высокую научную и практическую значимость, структура и механизмы функционирования МБ и МП в настоящее время остаются малоизученными. Так, например, из более чем 90,000 известных к 2014 году белковых структур менее 2% относятся к интегральным МБ.

Как и в случае водорастворимых глобулярных белков основную роль в стабилизации пространственной структуры и функционировании мембранных биомолекул играют нековалентные взаимодействия: электростатические, ван-дер-ваальсовые и имеющие энтропийную природу гидрофобные взаимодействия. Однако, для стабилизации «нативной/активной» структуры МБ и МП требуется присутствие биологической мембраны или подходящей мембраномоделирующей среды (миметика мембраны) [4]. В мембранах пространственная структура и функция МБ и МП во многом определяются межмолекулярными взаимодействиями с компонентами липидного бислоя (фосфолипидами, стеринами и т.д.). Для описания механизмов работы МБ и МП на молекулярном уровне необходимо также учитывать внутримолекулярную динамику (конформационную подвижность), которая может играть большую роль во взаимодействии лигандов с рецепторными МБ, в работе ионных каналов и в антибиотическом действии МП [5]. При этом динамика и конформация молекул МБ и МП могут значительно зависеть от свойств мембранного окружения.

Исследование структуры и динамики МБ и МП, а также установление связи между структурой, динамикой и функцией этих молекул является актуальной задачей современной биофизики. Структурные исследования МБ и МП также важны для решения ряда прикладных задач биотехнологии, фармакологии и медицины, в том числе для разработки новых лекарственных препаратов. Одним из наиболее мощных методов

структурного анализа является ЯМР-спектроскопия высокого разрешения, которая позволяет изучать пространственную структуру и внутримолекулярную динамику МБ в мембраноподобном окружении [6,7]. В настоящее время ЯМР-спектроскопия является практически единственным методом, который позволяет определять пространственную структуру небольших гидрофобных или амфифильных пептидных молекул, которые не поддаются кристаллизации.

Основные трудности в изучении МБ и МП методами ЯМР-спектроскопии связаны с подбором оптимальной мембраномоделирующей среды, способной сохранять «нативную» пространственную структуру и агрегационное состояние мембранной биомолекулы, а также обеспечивать достаточное качество ЯМР-спектров, необходимое для структурных исследований [8]. Существующие среды, основанные на органических растворителях или мицеллах детергентов, во многих случаях не отвечают этим требованиям. Среды, содержащие бислойные мембраны, например, липидные везикулы, обладают слишком большими размерами и не могут напрямую использоваться в ЯМР-спектроскопии высокого разрешения [9]. Расширение арсенала мембраномоделирующих сред, а также решение проблемы рационального выбора оптимального миметика мембраны необходимо для проведения корректных структурно-функциональных исследований МБ и МП методами ЯМР-спектроскопии.

Целью работы являлось изучение принципов структурной организации и механизмов функционирования мембраноактивных пептидов и интегральных спиральных мембранных белков. В работе были поставлены следующие **задачи:**

1. Разработать новую мембраномоделирующую среду для ЯМР-исследований МБ и МП, содержащую стабилизированные в растворе фрагменты бислойной мембраны, – липид-белковые нанодиски (ЛБН).
2. Исследовать структуру и динамику ряда модельных МБ и МП в различных мембраномоделирующих средах. Изучить роль ковалентных взаимодействий (внутримолекулярная циклизация) и различных нековалентных взаимодействий (электростатические, гидрофобные), включая взаимодействия с липидной мембраной, в формировании «нативной/активной» пространственной структуры МБ и МП.
3. Изучить механизмы формирования пространственной структуры интегральных МБ в мембраномоделирующем окружении (процессы фолдинга *in vitro*).
4. Установить молекулярные механизмы мембранной активности ряда МП и роль динамики и специфических межмолекулярных взаимодействий (взаимодействий с участием конкретных функциональных групп) в их функционировании.

5. Изучить роль внутримолекулярной динамики в функционировании мембранных рецепторов. Изучить механизмы регуляции их работы мембраноактивными пептидными лигандами.

В качестве модельных объектов использовали МП трех групп: мембраноактивные антибиотики, мембраноактивные антимикробные пептиды и мембраноактивные нейротоксины. Исследованные молекулы отличались по основным структурно-функциональным параметрам: типу пространственной структуры (спиральные, β-структурные и т.д.), содержанию дисульфидных связей или других внутримолекулярных циклов, заряду (от нейтрального до +6), а также степенью гидрофобности (от практически нерастворимых гидрофобных антибиотиков до хорошо растворимых нейротоксинов). В качестве модельных интегральных мембранных белков использовали потенциалочувствительный домен K^+-канала KvAP (ПЧД, архея *Aeropyrum pernix*), а также ряд спиральных МБ, имеющих различную топологию и олигомеризационное состояние в мембране и содержащих от 2-х до 8-и ТМ спиралей.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Для структурно-динамических ЯМР-исследований МБ и МП разработана новая мембраномоделирующая среда, – липид-белковые нанодиски. Разработан новый метод ренатурации (фолдинга) рекомбинантных интегральных МБ, основанный на инкапсуляции денатурированных мембранных белков в нанодиски.
2. Определен относительный вклад гидрофобных и электростатических взаимодействий с липидным бислоем, а также конформационной подвижности молекул МП в образовании комплексов пептид-мембрана, и установлена их роль в молекулярных механизмах действия МП.
3. Предложены механизмы образования пептид-пептидных и пептид-липидных пор в мембране антибиотическими мембраноактивными пептидами с разным типом пространственной укладки (спиральные Aam-I/Zrv-IIB и β-структурный ареницин-2).
4. В молекуле потенциалочувствительного домена (ПЧД) обнаружены «медленные» (мкс-мс) межспиральные движения, – предшественники конформационных перестроек, происходящих при потенциалозависимой активации. Показано, что стабильность «нативной» конформации ПЧД зависит от внутримолекулярных электростатических взаимодействий и двумерной упаковки липидного бислоя, окружающего домен.
5. Обнаружено состояние МБ, сходное с состоянием «расплавленной глобулы» водорастворимых белков и являющееся одним из возможных интермедиатов процесса фолдинга МБ *in vitro*. Показано, что в отличие от водорастворимых белков фолдинг

МБ может сопровождаться одновременным увеличением энтальпии и энтропии системы.

6. Предложен молекулярный механизм действия нейротоксина VSTx1, согласно которому токсин связывается с интерфейсным регионом липидного бислоя и образует комплекс с участками ПЧД, погруженными в мембрану. Молекула токсина блокирует движения ПЧД, необходимые для потенциалозависимой активации K^+-канала.

Научная новизна. Показано, что в отличие от сред на основе детергентов липид-белковые нанодиски (ЛБН) хорошо моделируют гидрофобную и электростатическую компоненту взаимодействия МБ(МП)/мембрана. Предложен оригинальный метод «скрининга» мембраномоделирующих сред для ЯМР-исследований, основанный на использовании ЛБН в качестве среды сравнения. Разработан новый метод фолдинга политопных (состоящих из нескольких ТМ спиралей) и субъединичных интегральных МБ в средах на основе ЛБН, и выявлена зависимость эффективности процесса фолдинга от липидного состава нанодисков.

В работе впервые описано влияние конформационной подвижности на активность порообразующих пептидов различных структурных семейств и показано, что повышенная подвижность может ослаблять как начальное присоединение пептидов к мембране, так и последующие процессы порообразования. Установлено, что конформация и динамика β-структурных МП, стабилизированных дисульфидными связями, может значительно меняться при взаимодействии с липидной мембраной.

Результаты исследования МП, принадлежащих различным семействам, выявили структурные детерминанты, ответственные за биологическую активность пептидов, что позволило предложить новые молекулярные модели их действия на мембраны.

Исследование ПЧД-KvAP и его взаимодействия с токсином VSTx1 позволило впервые наблюдать функционально важные мкс-мс межспиральные движения в рецепторном МБ, а также предложить новую модель действия «вольт-сенсорных» токсинов, которая меняет существующую концепцию, предполагающую прямое взаимодействие токсина с «датчиком потенциала» спиралью S4 ПЧД.

Исследование ПЧД в различных средах позволило обнаружить новое «расплавленное» состояние МБ, которое характеризуется компактной упаковкой, небольшими изменениями вторичной структуры, частичным разрушением третичной структуры и увеличением подвижности основной цепи МБ в пс-нс временном диапазоне.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в работе данные дают новую информацию о принципах структурной организации молекул МБ и МП и о

структурных аспектах их взаимодействия с мембраной. Раскрыта роль внутримолекулярной циклизации, гидрофобных и электростатических взаимодействий с липидами, конформационной подвижности, специфических взаимодействий с липидными мишенями и двухвалентными катионами в следующих процессах: формирование комплекса пептид-мембрана, олигомеризация МП и образование пор в мембране. Показано, что для описания конформации МП в липидном бислое и механизмов их действия требуется учитывать совокупность структурно-динамических факторов. Показано, что в стабилизации молекул МБ в отличие от водорастворимых глобулярных белков большую роль играют внутримолекулярные электростатические взаимодействия, а также упаковка окружающего липидного бислоя. В отличие от водорастворимых белков процессы фолдинга МБ *in vitro* могут быть эндотермическим и сопровождаться увеличением энтальпии и энтропии системы.

Результаты структурно-динамических исследований антибиотических МП могут использоваться при разработке новых антибиотиков, – задаче, которая приобрела особую важность в последнее время в связи с распространением патогенных микроорганизмов, резистентных к “классическим” антибактериальным препаратам. Данные о механизмах функционирования потенциалозависимых ионных каналов и их регуляции природными лигандами, а также данные о механизмах процесса фолдинга интегральных МБ *in vitro*, полученные в работе, будут полезны при рациональном дизайне новых лекарственных препаратов, действующих на мембранные рецепторы и ионные каналы. Разработанные в рамках диссертации новые подходы применения мембраномоделирующих сред на основе ЛБН открывают перспективы получения стабильных препаратов МБ для биотехнологии и биомедицины, а также для структурно-функциональных исследований мембранных биомолекул в нативном окружении.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы представлены на 42 конференциях и симпозиумах, основными из которых являются: 33-й, 36-й и 38-й Конгрессы FEBS (Афины, Греция, 2008, Турин, Италия, 2011 и Санкт-Петербург, 2013); Международные конференции по магнитному резонансу “EUROMAR-2009” и “EUROMAR-2010” (Гётеборг, Швеция, 2009 и Флоренция, Италия, 2010); 4-ая конференции Европейского нейрохимического общества (ESN, Лейпциг, Германия, 2009); 23-й Конгресс Международного нейрохимического общества (Афины, Греция, 2011); 2-й и 3-й Российско-греческий симпозиум «Biomaterials and nanobiomaterials: recent problems and safety issues» (Ираклион, Греция, 2011, 2012); 2-й и 4-й Международные симпозиумы «Nuclear magnetic resonance in condensed matter. NMR in life sciences» (Санкт-Петербург, 2005, 2007); VIII международный семинар по магнитному резонансу «спектроскопия,

томография, и экология». (Ростов-на-Дону, 2006); II международная конференция «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, Беларусь, 2006); Международная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 75-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2009); IV, V и VI Российские Симпозиумы «Белки и пептиды». (Казань, 2009, Петрозаводск, 2011, Уфа, 2013); 42, 48, 50, 53, 54, 55 Научные конференции МФТИ (Долгопрудный, 1999, 2005, 2007, 2010, 2011, 2012); VIII и X чтения, посвященные памяти академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2006, 2011); XVI, XIX-XXVI зимние молодежные научные школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2004, 2007-2014 годы).

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность и благодарность руководителю и сотрудникам Лаборатории биомолекулярной ЯМР спектроскопии ИБХ РАН проф. А.С. Арсеньеву, Т.А. Балашовой, Э.В. Бочарову, М.А. Дубинному, К.С. Минееву, К.Д. Надеждину, А.Г. Соболю, А.С. Парамонову и В.В. Чупину; руководителю и сотрудникам Лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН проф. Р.Г. Ефремову, П.Е. Волынскому, Д.Е. Нольде и А.О.Чугунову; руководителю и сотрудникам Лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН проф. А.В Феофанову, О.В. Воронцовой, К.С. Кудрявцевой и О.В. Самсоновой; руководству и сотрудникам Отдела биоинженерии ИБХ РАН академику М.П. Кирпичникову, проф. Д.А. Долгих, Е.Н. Люкмановой, О.В. Некрасовой, Л.Е. Петровской и Л.Н. Шингаровой; руководителю и сотрудникам отдела учебно-научный центр ИБХ РАН проф. Т.В. Овчинниковой, Л.И. Барсукову, С.В. Баландину, П.В. Пантелееву, С.В. Суханову, А.А. Тагаеву, и З.А. Якименко; и сотруднику ГосНИИ «Генетика» Д.А. Складневу, оказавшим помощь и поддержку на разных этапах подготовки настоящей работы - от предоставления образцов для исследования, до помощи в измерении и обработке экспериментальных данных.

ГЛАВА 1 Обзор литературы.

За большинство функций, выполняемых биологическими мембранами ответственны специальные молекулы – интегральные и периферические мембранные белки (МБ), такие как рецепторы, транспортеры, ионные каналы, мембранные ферменты, компоненты фотосистем и электрон-транспортных цепей [1]. Кроме того, мембрана является мишенью для многих биологически активных пептидных молекул (мембраноактивных пептидов или МП). Например, некоторые пептидные медиаторы нервной и эндокринной систем организма и ряд токсинов, действующих на мембранные рецепторы, изначально связываются с клеточной мембраной и только потом происходит образование лиганд-рецепторного комплекса. Подобный механизм, получивший название «мембранного катализа», позволяет значительно увеличить эффективность взаимодействия лиганд-рецептор [10]. Пептиды, взаимодействующие с мембраной, могут оказывать значительное влияние на ее структуру и барьерную функцию. Например, большинство антимикробных пептидов (АП) селективно действуют на мембраны бактериальных клеток и формируют в них поры и ионные каналы, тем самым приводя к гибели клетки-мишени. АП являются одними из основных эффекторов в системе «врожденного иммунитета», древнейшей защитной системе эукариотических организмов [11].

1.1 Взаимодействия, стабилизирующие пространственную структуру, и факторы, определяющие активность мембранных белков и мембраноактивных пептидов

Так же как и в случае водорастворимых белков и пептидов в стабилизации пространственной структуры мембранных биомолекул участвуют ковалентные (дисульфидные связи и другие внутримолекулярные циклы) и нековалентные (электростатические, ван-дер-ваальсовые и гидрофобные), включая внутримолекулярные и межмолекулярные, взаимодействия. Межмолекулярные взаимодействия можно условно разделить на неспецифические, например, взаимодействия МБ(МП)/мембрана, и специфические, в которых задействованы конкретные функциональные группы. Кроме того, наряду со структурными факторами большую роль в функционировании МБ и МП может играть внутримолекулярная динамика или конформационная подвижность.

По структурной организации молекулы мембраноактивных пептидов подразделяют на две большие группы (см. п. 1.5, Рис 1.9). К первой группе относятся линейные пептиды, не содержащие внутримолекулярных ковалентных циклов, например, фузионные пептиды вирусов, пептиды, способные проникать в клетку (cell penetrating

peptides) и несколько семейств антимикробных пептидов [9]. Предполагается, что линейные МП обладают значительной конформационной подвижностью в водном растворе и приобретают «активную» структуру только при взаимодействии с мембраной (см. п. 1.5, Рис 1.10). В подавляющем большинстве случаев «активная» структура линейных пептидов представлена спиральной конформацией [12]. К другой группе относятся в основном β-структурные пептиды, стабилизированные дисульфидными связями, такие как, АП дефенсины, цитотоксины, нейротоксины, а также мембраноактивные антибиотики, содержащие неканонические внутримолекулярные циклы [13]. Считается, что пространственная структура подобных МП практически полностью определяется внутримолекулярными взаимодействиями и незначительно меняется при образовании комплекса с липидным бислоем.

Основной вклад в стабилизацию «активной» пространственной структуры линейных МП вносят различные неспецифические взаимодействия с биологической мембраной. Эти же факторы определяют топологию взаимодействия с бислоем и тип мембранной активности для циклических пептидов. Так, важную роль гидрофобных взаимодействий в функционировании МП иллюстрирует тот факт, что, несмотря на большое структурное разнообразие, все эти пептиды имеют одну общую особенность, а именно образуют амфифильные структуры в присутствии мембраны [14]. С другой стороны, селективность действия мембранолитических пептидов по отношению к клеткам различных организмов зависит от липидного состава мембран и определяется в основном электростатическими силами. Например, катионные АП направленно атакуют бактериальные клетки, внешняя мембрана которых содержит большую долю отрицательно заряженных липидов, в отличие от электрически нейтральных мембран клеток эукариот [15]. Значительное влияние на активность МП может также оказывать упаковка и физические свойства липидного бислоя, например, наличие в составе мембраны молекул стеринов или липидов, влияющих на спонтанную кривизну бислоя, таких как фосфатидилэтаноламин [16].

В настоящее время для описания мембранолитического действия АП в основном используют модели, учитывающие только неспецифические взаимодействия пептид/мембрана (см. п. 1.5, Рис 1.10). Однако, показано, что активность пептидов некоторых семейств, таких как антигрибковые дефенсины растений [17], лантибиотики [18] и д.р., в значительной степени зависит от специфических взаимодействий с молекулами-мишенями, например, гликосфинголипидами, липополисахаридами и компонентами клеточной стенки. Кроме того, определенную роль в действии МП может играть конформационная подвижность. В частности, изменение подвижности может

приводить к появлению значительного энтропийного вклада (-T×ΔS) в свободную энергию переходов МП между водным окружением и различными состояниями пептида в мембране.

За исключением небольшого семейства β-структурных белков, большинство интегральных мембранных белков имеют в своем составе одну (битопные МБ) или несколько (политопные МБ) трансмембранных спиралей [1]. Принципы структурной организации спиральных МБ кардинально отличаются от таковых у водорастворимых белков. Во-первых, несмотря на наличие остатков Cys, в ТМ доменах мембранных белков не формируются дисульфидные связи, и ковалентные взаимодействия не участвуют в стабилизации их пространственной структуры. (Тем не менее, дисульфидные связи могут участвовать в стабилизации пространственной структуры и олигомеризации внеклеточных доменов МБ). Во-вторых, в отличие от водорастворимых белков, обычно содержащих гидрофобное ядро, стабилизированное гидрофобными и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, внутренние регионы МБ, как правило, имеют бо́льшую полярность, чем внешняя поверхность, обращенная к липидной мембране [19,20]. Таким образом, особую роль в стабилизации «нативной» пространственной структуры МБ могут играть внутримолекулярные электростатические взаимодействия (водородные связи, солевые мостики), а также взаимодействия с анизотропным окружением, включающим как неполярный регион жирнокислотных цепей, так и полярные участки, содержащие головки фосфолипидов и молекулы воды. Значительное влияние на активность МБ также может оказывать взаимодействие со специфическими липидами и кофакторами [21].

Относительная слабость межспиральных взаимодействий обуславливает конформационную подвижность молекул МБ и сравнительно низкую стабильность их структуры в мембраномоделирующих средах. Повышенная внутримолекулярная динамика МБ часто имеет большое функциональное значение. Типы конформационных изменений, наблюдаемые в этих молекулах, имеют различную амплитуду: от простой подвижности боковых цепей и петлевых участков до полной перестройки третичной структуры молекулы в ответ на внешний сигнал, такой как изменение ТМ потенциала или связывание лиганда [5,22] (см. п. 1.3, Рис 1.2).

Резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что на сегодняшний день неспецифические взаимодействия с мембраной считаются определяющими в стабилизации пространственной структуры МБ и МП и лежат в основе их функционирования, при этом роль специфических взаимодействий и внутримолекулярной динамики в этих процессах остается мало изученной.

1.2 ЯМР-спектроскопия высокого разрешения в исследовании пространственной структуры и внутримолекулярной динамики белков и пептидов

В последнее двадцатилетие широкое распространение для исследования пространственной структуры и внутримолекулярной динамики белков в растворе получили методы ЯМР-спектроскопии высокого разрешения [23,24]. В отличие от методов рентгеноструктурного анализа (РСА), спектроскопические методы не требуют приготовления высококачественных трехмерных кристаллов белков и позволяют исследовать структуру белковых молекул в окружении, наиболее близком к нативному. Кроме того, методы ЯМР-спектроскопии позволяют исследовать динамическое поведение белков и пептидов в растворе на уровне отдельных остатков. К сожалению, применение методов ЯМР-спектроскопии высокого разрешения ограничено исследованием сравнительно небольших белковых молекул, обычно с массой не более 100 кДа [25]. Относительный вклад различных методов в исследование пространственной структуры полипептидных молекул можно оценить, используя статистику банка данных белковых структур (www.pdb.org). Так, на начало 2014 года из ~ 90,000 пространственных структур, представленных в этой базе данных, более 89% было установлено методами РСА, 10% приходится на результаты ЯМР-исследований и около 0.5% на криоэлектронную микроскопию и другие методы.

В основе метода ЯМР-спектроскопии лежат магнитные свойства ядер изотопов некоторых элементов. Такие ядра характеризуются собственным магнитным моментом, благодаря которому уровни энергии ядра расщепляются во внешнем магнитном поле. Для описания этого магнитного момента вводится дополнительное квантовое число – спин. Наблюдение переходов между расщепленными уровнями ядра в радиочастотном диапазоне и составляет суть метода ЯМР. Для исследования структуры биомолекул методом ЯМР в основном используют ядра изотопа ^{1}H водорода (протоны). Эти ядра, имеющие спин ½, наиболее сильно взаимодействуют с постоянным магнитным полем и присутствуют в большом количестве практически в любом органическом соединении (естественное содержание изотопа ^{1}H более 99.9%). Для ЯМР-спектрометра с постоянным магнитным полем напряженностью 14.1 Т (Тесла) частота электромагнитного излучения, поглощаемого ядрами ^{1}H (частота протонного резонанса), равна 600 МГц. Величина расщепления энергетических уровней ядра, частота поглощаемых электромагнитных волн и чувствительность метода ЯМР растет вместе с напряженностью приложенного постоянного магнитного поля [24]. Поэтому, в современных структурных исследованиях

используют ЯМР-спектрометры с такими большими полями, насколько это возможно. К настоящему времени коммерчески доступны спектрометры с магнитным полем напряженностью до 23.5 Тесла и частотой протонного резонанса до 1000 МГц [26]. Постоянное магнитное поле высокой однородности во время ЯМР-эксперимента поддерживается мощным сверхпроводящим электромагнитом, охлажденным до температуры жидкого гелия (4 K). Для ЯМР-исследований больших белковых молекул также используются стабильные изотопы углерода и азота, имеющие спин ½ (^{13}C и ^{15}N). Естественное содержание этих изотопов не велико: 1.1% и 0.37%, соответственно, что обуславливает необходимость искусственного обогащения, например, в результате гетерогенной продукции белков в бактериальных клетках в средах, содержащих ^{13}C-меченую глюкозу и $^{15}NH_4Cl$ как единственные источники углерода и азота [27].

В современных ЯМР-спектрометрах используют импульсный метод регистрации ЯМР-спектра [24]. Суть метода состоит в быстром возбуждении ядер при помощи короткого радиочастотного импульса и в регистрации последующего отклика системы ядерных спинов на данное воздействие. Отклик спиновой системы представляет собой суперпозицию постепенно затухающих колебаний, которая называется Спадом Свободной Индукции (ССИ), или Free Induction Decay (FID). Фурье-преобразование полученного спада свободной индукции дает реконструированный ЯМР-спектр. Фурье-ЯМР-спектроскопия позволяет получить значительный выигрыш во времени и в чувствительности регистрации ЯМР-спектров. ЯМР-эксперименты, состоящие из специально подобранных последовательностей импульсов, позволяют получать многомерные спектры (2D, 3D и т.д.), которые несут важную информацию о химической структуре и пространственном строении молекулы.

1.2.1 Химический сдвиг

С точки зрения ЯМР-спектроскопии практически каждое ядро в белковой молекуле имеет уникальное, отличное от других ядер, окружение. Электронные облака атомов частично экранируют внешнее магнитное поле, что приводит к появлению «химического» сдвига резонансной частоты ядра. Для сравнения резонансных частот различных ядер используют шкалу, независящую от напряженности магнитного поля и резонансной частоты спектрометра. Единица измерения химических сдвигов по этой шкале в отечественной литературе называется “миллионная доля” (м.д.), а в англоязычных источниках “part per million” (ppm). Характерные значения величин химических сдвигов охватывают диапазон от 10 миллионных долей (ядро ^{1}H) до 200 м.д. (ядра ^{31}P, ^{13}C) [24]. Использование шкалы химических сдвигов позволяет сравнивать спектры, полученные на различных ЯМР-спектрометрах, при этом химические сдвиги сигналов белка, измеренные

на спектрометрах с частотой протонного резонанса 600 МГц и, например, 800 МГц будут совпадать.

Химический сдвиг ядра зависит как от химического состояния атома, например, от гибридизации, числа ковалентных связей, заряда и типа соседних атомов, так и от пространственной сближенности атома с различными функциональными группами [28]. В ^{1}H-ЯМР-спектрах белковых молекул четко выделяют несколько характеристических регионов, которые содержат сигналы различных групп. Из-за пространственной сближенности с заряженными или ароматическими группами, отдельные сигналы белковой молекулы могут смещаться за пределы приведенных диапазонов, например, в область отрицательных значений по шкале химических сдвигов или в область со значительными положительными (> 11 м.д.) химическими сдвигами. В некоторых случаях простой анализ ^{1}H-ЯМР-спектра может дать качественную характеристику вторичной структуры белковой молекулы. Так, для неструктурированных и α-спиральных белков (включая спиральные мембранные белки и пептиды) характерна небольшая дисперсия сигналов ^{1}HN протонов, большинство из которых могут наблюдаться в узком спектральном диапазоне около 8 м.д., в то же время β-структурные белки обычно демонстрируют большую дисперсию ^{1}HN сигналов, которые наблюдаются во всем диапазоне частот от 10 до 7 м.д.

Несмотря на то, что химические сдвиги ЯМР-сигналов несут значительную информацию о первичной, вторичной и третичной структуре белковой молекулы, эта информация не может быть использована в структурных исследованиях напрямую [28]. Зависимость химического сдвига от большого числа различных структурных факторов делает интерпретацию этих данных неоднозначной и во многих случаях требует сложных квантово-механических расчетов. Поэтому в современных исследованиях значения химических сдвигов ядер используют только для качественного определения конформации основной цепи белковой молекулы. Для более детальных структурных исследований используют взаимодействия между магнитными моментами отдельных ядер, которые несут прямую структурную информацию. Следует отметить, что в последнее время все большее распространение получают комплексные методы, в которых конформационные данные, полученные из химических сдвигов, используются совместно с теоретическими методами молекулярного моделирования структуры белков. В некоторых случаях применение подобных подходов позволяет предсказать пространственную структуру основной цепи белка с удовлетворительной точностью (СКО от экспериментальной структуры в пределах 0.7 - 1.8 Å) [29].

1.2.2 Спин-спиновое и диполь-дипольное взаимодействие. Многомерная ЯМР-спектроскопия

Существует два основных типа межъядерных взаимодействий: *спин-спиновое* и *диполь-дипольное* [24]. Первое из них передается от ядра к ядру через электронные орбитали ковалентных связей, соединяющих атомы [30]. Спин-спиновое взаимодействие проявляется в ЯМР-спектре в виде дополнительного расщепления сигналов обоих ядер, его иногда называют тонкой структурой ЯМР-линий. Величина спин-спинового взаимодействия характеризуется константой спин-спинового взаимодействия (КССВ), которая обозначается латинским символом J и измеряется в герцах (Гц). Величина КССВ, выраженная в герцах, не зависит от напряженности магнитного поля (или частоты) спектрометра. Спин-спиновое взаимодействие быстро ослабевает с увеличением количества соединяющих атомы ковалентных химических связей, при этом прямые КССВ через одну ковалентную связь (^{1}J) имеют наибольшую величину ($^1J_{CH}$ ~ 140 Гц, $^1J_{NH}$ ~ 90 Гц, $^1J_{CC}$ ~ 40 Гц, $^1J_{CN}$ ~ 9-15 Гц). Геминальные (^{2}J) и вицинальные (^{3}J) КССВ (через 2 и 3 химические связи, соответственно) имеют величины до 20 Гц и сравнительно легко детектируются, а дальние КССВ через 4 и более ковалентных связей исчезающе малы (<1 Гц) [30]. В современных структурных исследованиях важную роль играют вицинальные КССВ (^{3}J), распространяющиеся через три ковалентные связи. Величина ^{3}J зависит от взаимной ориентации связей, соединяющих взаимодействующие атомы, и позволяет определять торсионные углы в белковой молекуле, необходимые для установления ее конформации [30]. Кроме того, спин-спиновые взаимодействия позволяют в ходе ЯМР-эксперимента передавать намагниченность от одного ядра к другому по цепочке ковалентных связей [31].

В отличие от спин-спинового взаимодействия *диполь-дипольное* взаимодействие магнитных моментов ядер передается напрямую через пространство. Из-за быстрого изотропного вращения биомолекул в растворе диполь-дипольные взаимодействия эффективно усредняются и не приводят к появлению дополнительного расщепления в ЯМР-спектрах [24]. Однако диполь-дипольные взаимодействия в ходе ЯМР-эксперимента позволяют передавать намагниченность от одного ядра к другому. Это явление получило название Ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО) или Nuclear Overhauser Effect (NOE). Сила взаимодействия и, соответственно, эффективность передачи намагниченности зависит от расстояния между взаимодействующими ядрами (~ $1/R^6$), что делает возможным измерение расстояний между протонами белковой молекулы. Максимальное измеримое расстояние не велико и не превышает 6 Å (Ангстрем) (0.6 нм), однако именно измерение

межпротонных расстояний лежит в основе большинства структурных ЯМР-исследований [7].

Уникальная способность спин-спиновых и диполь-дипольных взаимодействий передавать намагниченность от одного ядра к другому лежит в основе многомерной ЯМР-спектроскопии (2D, 3D и т.д.). В многомерных ЯМР-спектрах частоты (химические сдвиги) ядер откладываются на разных осях (направлениях) спектра, а взаимодействие между ядрами проявляется в виде кросс-пиков (отдельных сигналов в многомерном спектре), которые находятся на пересечении частот взаимодействующих ядер [32]. Интенсивность кросс-пика зависит в основном от эффективности передачи намагниченности между ядрами. Кроме того, в многомерных спектрах часто присутствуют «диагональные» пики, имеющие одинаковые частоты по разным спектральным направлениям и соответствующие намагниченности, оставшейся в ходе эксперимента на исходном ядре. В случае двумерной (2D) ^{1}H ЯМР-спектроскопии, эксперименты, использующие спин-спиновое взаимодействие COSY (корреляционная спектроскопия) и TOCSY (тотальная корреляционная спектроскопия), позволяют выделить *спиновые системы* отдельных аминокислотных остатков, иными словами соединить в цепочки все ЯМР-сигналы для каждого из остатков белка. В то же время 2D эксперименты, использующие диполь-дипольное взаимодействие, например, NOESY (спектроскопия Ядерного эффекта Оверхаузера), позволяют выявить пространственно сближенные пары протонов, в том числе и принадлежащие соседним остаткам. Таким образом, спектры NOESY позволяют не только одновременно измерить большой набор межпротонных расстояний, но и подтвердить, а в некоторых случаях и определить, первичную структуру полипептидной цепи [23].

1.2.3 Исследование пространственной структуры белков по данным ЯМР. Диапазон применимости метода

Исследование пространственной структуры белковой молекулы методами ЯМР-спектроскопии можно условно разделить на несколько этапов. На первом этапе проводится *отнесение* сигналов белка [23,24,31]. Суть этого этапа состоит в определении частоты резонанса (химического сдвига) для максимально возможного набора ядер белковой молекулы и идентификации конкретных ядер, участвующих в образовании каждого из кросс-пиков в многомерных ЯМР-спектрах. В свою очередь этап отнесения сигналов подразделяется на три подэтапа: (1) отнесение сигналов спиновых систем, (2) последовательное отнесение, то есть объединение спиновых систем в цепочки согласно первичной последовательности белка, и (3) отнесение сигналов в NOESY-спектрах с целью идентификации сближенных протонов. Используя полученное отнесение сигналов,

на следующих этапах исследования измеряют различные структурные параметры, такие как вицинальные (^{3}J) КССВ, интенсивности ЯЭО кросс-пиков, или с помощью специальных экспериментов определяют систему внутримолекулярных водородных связей, стабилизирующих белковую молекулу [33]. Эти данные конвертируются в пространственные ограничения, накладываемые на структуру молекулы. Например, на основе полученных значений ^{3}J рассчитывают ограничения на значения торсионных углов, а на основе интенсивностей ЯЭО кросс-пиков и данных о водородных связях получают ограничения на расстояния между атомами. Для расчета пространственной структуры белка по этим данным используют алгоритмы молекулярной динамики и энергетической минимизации, реализованные в специальных программах [34]. Для этого в уравнение, описывающее молекулярно-динамическое силовое поле, вводят дополнительные псевдо-энергетические члены, зависящие от полученных ограничений. В ходе процессов молекулярной динамики и/или энергетической минимизации пытаются найти такую структуру молекулы, которая приводит к наименьшим нарушениям ограничений, иными словами наиболее соответствует экспериментальным данным. В результате решения этой задачи обычно получают набор структур, одинаково хорошо удовлетворяющих входным данным (Рис. 1.1А).

Современные методы ЯМР-спектроскопии позволяют исследовать структуру белковых молекул с молекулярной массой вплоть до 100 кДа [35]. Ограничения в применении методов ЯМР-спектроскопии для исследования б*о*льших белковых молекул вызваны двумя основными факторами. Во-первых, при увеличении размера молекулы скорость ее броуновского вращательного движения в растворе замедляется, что в свою очередь приводит к ускорению процесса *поперечной* (или *спин-спиновой*) *релаксации* ядерной намагниченности (R_2). В ходе процесса поперечной релаксации возбужденная намагниченность ядерных спинов быстро спадает до нуля. Ускорение процессов релаксации уменьшает время жизни возбужденных ЯМР-состояний, что приводит к уширению резонансных линий и значительно понижает чувствительность ЯМР-экспериментов. Вторым важным фактором, ограничивающим применение ЯМР для исследования больших белковых молекул, является перекрывание сигналов в ЯМР-спектрах. Степень перекрывания резонансных линий напрямую зависит от типа изучаемой белковой молекулы. Эта проблема наиболее остро стоит при исследовании α-спиральных и неструктурированных белковых молекул, демонстрирующих небольшую дисперсию химических сдвигов ЯМР-сигналов.

Приведем диапазоны применимости различных методов ЯМР. Методы ^{1}H ЯМР-спектроскопии, не требующие искусственного обогащения изотопами, позволяют

исследовать пространственную структуру пептидов и небольших белков с молекулярной массой до ~9 кДа для β-структурных белков и до ~6 кДа для α-спиральных белков. В этом случае для отнесения сигналов и получения структурных данных используют 2D ^{1}H-спектры, такие как COSY, TOCSY, NOESY и т.д. Так, методами 2D ^{1}H ЯМР была определена пространственная структура нейротоксина II из яда кобры *Naja oxiana*, небольшого (61 аминокислотный остаток) β-структурного белка, имеющего характерную трехпетельную организацию (Рис. 1.1А) [36]. В случае белков большего размера, для уменьшения перекрывания сигналов в ЯМР-спектрах, в молекулу белка искусственно вводится изотоп ^{15}N. Введение этой изотопной метки позволяет добавить дополнительное ^{15}N измерение в 2D ЯМР-спектры, путем переноса намагниченности в ходе эксперимента от HN протона на ядро ковалентно присоединенного атома азота. Полученные таким образом 3D ^{1}H,^{15}N-спектры NOESY и TOCSY позволяют практически полностью решить проблему перекрывания в HN области ЯМР-спектра. Использование этих экспериментов позволяет определять пространственную структуру белков в диапазоне до 15-20 кДа.

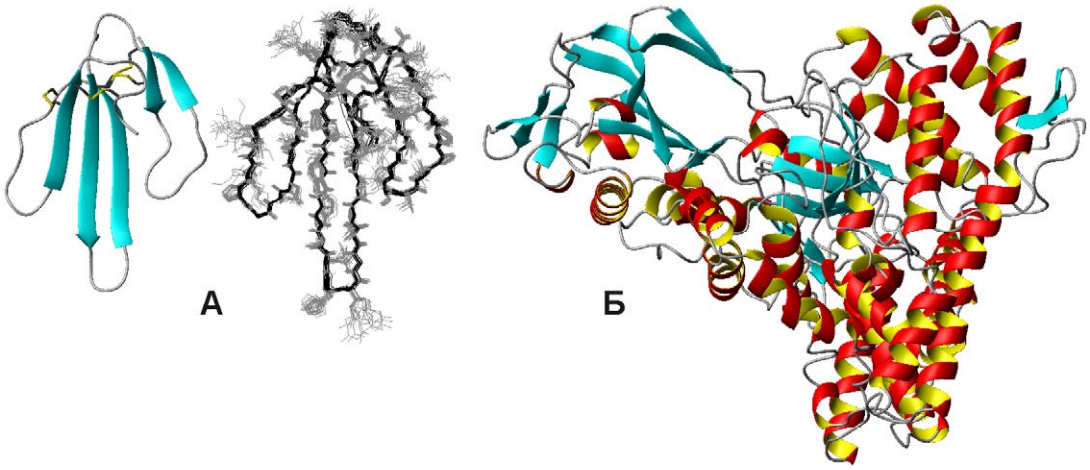


Рис. 1.1. Примеры водорастворимых белков, исследованных методами ЯМР. (А) Нейротоксин II из яда кобры *Naja oxiana* (6.8 кДа) [36]. (Б) Фермент малат-синтетаза G (*Escherichia coli*, 82 кДа) [37]. Структуры белков показаны в ленточном представлении. На панели А также показан полученный набор структур, совмещенный по атомам основной цепи.

При дальнейшем увеличении размера белковой молекулы остро встает проблема увеличения скорости поперечной релаксации. Дело в том, что в основе корреляционных ^{1}H экспериментов, таких как COSY и TOCSY, лежит передача намагниченности через сравнительно небольшие вицинальные (^{3}J) протон-протонные КССВ, и быстрая релаксация намагниченности делает эту передачу неэффективной. Одновременное введение в белковую молекулу изотопов ^{13}C и ^{15}N позволяет передавать намагниченность от ядра к ядру, используя только прямые (^{1}J) КССВ. Применение этой схемы изотопного обогащения расширяет предел применимости методов ЯМР к молекулам с молекулярной массой до 30 кДа [31].

Дальнейшее увеличение размера белковой молекулы делает неэффективной передачу намагниченности и через прямые КССВ. Для решения этой проблемы в молекулу белка дополнительно вводят изотоп дейтерия (^{2}H). Это ядро со спином, равным 1, очень слабо взаимодействует с внешним магнитным полем и другими ядрами, что при полной или частичной замене протонов боковых цепей на дейтерий приводит к значительному замедлению скорости поперечной релаксации других ядер (^{1}HN, ^{13}C и ^{15}N). Именно применение схем дейтерирования боковых цепей белковой молекулы [27] и проведение специальных ЯМР-экспериментов, оптимизированных для подавления поперечной релаксации (TROSY, CRINEPT) [35,38], позволяют определять пространственную структуру белков с молекулярной массой до 100 кДа [37] и исследовать белок-белковые комплексы с молекулярной массой до 1000 кДа [39–41].

Отрицательным эффектом от дейтерирования боковых цепей белковой молекулы является уменьшение плотности ядер ^{1}H (протонов) и, соответственно, значительное уменьшение количества наблюдаемых контактов ЯЭО и экспериментальных ограничений на расстояния. Для уменьшения этого негативного эффекта в современных исследованиях широко применяют специальные биотехнологические подходы, позволяющие в бактериальных системах экспрессии продуцировать тотально ^{2}H-меченые белки с селективно ^{1}H-мечеными метильными группами остатков Leu, Ile и Val [27], остатков Ala [42] или ароматических групп остатков Phe, Tyr и Trp [43]. Обратное селективное введение протонов (на фоне однородного дейтерирования боковых цепей) позволяет использовать классические данные ЯЭО для анализа конформации белка.

В последнее время все более широкое распространение получают бесклеточные белоксинтезирующие системы (ББС, системы сопряженной транскрипции-трансляции *in vitro*), которые используя селективно-меченые аминокислоты, позволяют получать белки с практически любым заданным шаблоном расположения изотопных меток (^{2}H, ^{13}C и ^{15}N) [44]. Одним из наиболее перспективных протоколов бесклеточного синтеза белков для ЯМР-исследований является SAIL (stereoarray isotope labeling) [45]. Этот метод основан на использовании стереоспецифически селективно меченых аминокислот, что позволяет синтезировать белки, содержащие только один протон в каждой метиленовой группе (^{13}C^{1}H^{2}H), а также стереоспецифически ^{13}C,^{1}H-меченые прохиральные метильные группы и чередующиеся ^{13}C,^{1}H/^{12}C,^{2}H группы в ароматических кольцах. Подобный шаблон введения изотопных меток значительно упрощает анализ спектров ЯМР, и особенно процедуру отнесения сигналов боковых цепей. Селективное введение ^{2}H меток позволяет добиться существенного замедления поперечной (R_2) релаксации оставшихся ядер ^{1}H и в тоже время обеспечивает плотность протонов, достаточную для измерения большого

количества ЯЭО контактов. Другим перспективным протоколом бесклеточного белкового синтеза для ЯМР-спектроскопии является комбинаторный метод, подразумевающий продукцию и совместный ЯМР-анализ нескольких образцов одного и того же белка, содержащих ^{15}NH, ^{13}CO и $^{13}C^{\alpha}$ меченые группы в основной цепи различных аминокислотных остатков [46]. Использование этого метода позволяет значительно упростить процедуру последовательного отнесения сигналов ЯМР основной цепи белка. Значительное упрощение гетероядерных спектров при селективном введении ^{15}N и ^{13}C меток дает огромные преимущества при анализе белков и супрамолекулярных комплексов большой массы, включая комплексы мембранных белков с частицами мембраномоделирующих сред (см. ниже).

Следует отметить, что существуют и другие ограничения, препятствующие изучению структуры больших белковых молекул методами ЯМР. Дело в том, что большинство измеряемых структурных параметров (^{3}J, интенсивности ЯЭО, система водородных связей) имеют локальную природу и не позволяют точно определить взаимное расположение пространственно удаленных участков белка. Эта проблема стоит наиболее остро в случае мультидоменных молекул, когда имеющиеся данные ЯЭО не позволяют достоверно определить взаимную ориентацию доменов. В современных ЯМР-исследованиях для решения этой проблемы используют дополнительные методы, позволяющие получать «дальние» структурные ограничения. Широкое применение получили методы измерения остаточных констант диполь-дипольного взаимодействия (Residual Dipolar Couplings, RDC), позволяющие определять взаимную ориентацию различных частей молекулы [47], и методы, основанные на парамагнитном усилении релаксации (Paramagnetic Relaxation Enhancement, PRE), позволяющие измерять расстояния вплоть до 20 Å (2 нм) [48]. Однако, все эти методы требуют дополнительных технологических затрат. Так, для измерения RDC необходимо использование специальных сред, позволяющих добиться частичного ориентирования белковых молекул в растворе по отношению к вектору магнитного поля спектрометра, а для измерения PRE необходимо искусственное введение парамагнитных зондов в изучаемую молекулу.

Совместное применение специальных схем изотопного обогащения, включающих введение изотопов ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N, и методов по измерению RDC позволило определить пространственную структуру фермента малат-синтетазы G из бактерии *Escherichia coli* с массой 82 кДа (Рис 1.1Б) [37]. Точность определения этой структуры (по атомам основной цепи) по отношению к кристаллической структуре фермента составила примерно 4.5 Å, однако, дальнейшее использование в расчете структуры данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей в растворе (SAXS) позволило улучшить точность до 3.3 Å [49]. На

сегодняшний момент малат-синтетаза G является одним из самых больших водорастворимых мономерных белков, структура которого была определена методами ЯМР-спектроскопии.

1.2.4 Дополнительные области применения ЯМР-спектроскопии

1.2.4.1 Исследование динамики белков в растворе

Явление релаксации ядерной намагниченности позволяет исследовать динамическое поведение белковых молекул в растворе [50]. Скорость различных релаксационных процессов зависит не только от общей скорости вращательного движения молекулы в растворе, но и от различных внутренних движений, присутствующих в молекуле белка. Для исследования динамического поведения основной цепи белка обычно используют ядра ^{15}N. Измерение скоростей различных релаксационных процессов, происходящих в спиновой паре ^{1}H-^{15}N, позволяет охарактеризовать внутренние движения в нескольких диапазонах времен. Это – быстрые движения, проистекающие с характерными временами в пико- и субнаносекундном диапазонах, и медленные движения, имеющие характерные времена микро- и миллисекунды. К сожалению, движения в наносекундном диапазоне обычно экранированы общим вращением молекулы в растворе и не могут быть исследованы методами ЯМР-релаксации [50]. Возможность изучения медленных внутренних движений белковой молекулы является уникальной чертой методов ЯМР-спектроскопии, так как в настоящее время этот диапазон времен недоступен для исследований вычислительными методами молекулярной динамики. В последнее десятилетие также активно развиваются методы исследования динамики боковых цепей белковых молекул, основанные на измерении релаксации ядер дейтерия в метильных группах [51].

1.2.4.2 Методы ЯМР твердого тела

В последнее десятилетие наблюдается бурное развитие методов ЯМР «твердого тела» для исследования пространственной структуры и динамики водорастворимых и мембранных белков. В отличие от ЯМР в растворе, эти методы позволяют изучать белковые молекулы в микрокристаллическом состоянии или в составе биологической мембраны (в виде липидных везикул, больших бицелл или плоских ориентированных фрагментов бислоя, зажатых между стеклянными пластинками). Из-за замедления вращательных движений белковой молекулы в этом случае не происходит усреднения диполь-дипольных взаимодействий и анизотропии химического сдвига, зависящих от ориентации молекулы по отношению к вектору магнитного поля спектрометра. Это приводит к значительному уширению спектральных линий и расщеплению их на сотни

компонент. Для искусственного усреднения этих взаимодействий применяют методы вращения под «магическим» углом (MAS, magic angle spinning) [52]. Быстрое (десятки кГц) вращение образца вокруг оси, наклоненной под углом 54.7° к направлению поля ЯМР-спектрометра, позволяет эффективно усреднить эти взаимодействия и значительно обузить линии в спектре. Использование специальных многоимпульсных экспериментов позволяет селективно восстановить некоторые из усредненных взаимодействий и тем самым получить дополнительную структурную информацию. Следует отметить, что существуют и другие методы ЯМР «твердого тела», не требующие дополнительного вращения образца. Для мембранных белков широкое распространение получили методы, использующие фрагменты мембран, ориентированные параллельно или перпендикулярно магнитному полю спектрометра [53]. В этом случае усреднение ориентации белковой молекулы, возникающее из-за латеральной диффузии в мембране, оказывается достаточным для наблюдения узких сигналов белка. Применение методов ЯМР «твердого тела» для структурных исследований мембранных белков имеет ряд преимуществ по сравнению с методами высокого разрешения таких как: возможность точного определения ориентации спиралей белка относительно плоскости мембраны и точного измерения расстояний в диапазоне до 15 Å [54,55]. Так, в 2012 году методами ЯМР твердого тела в протеолипосомах впервые была определена пространственная структура рецептора семейства GPCR (CXCR1, рецептор хемокина интерлекина-8) [56]. Рецепторы этого семейства включают в себя 7 трансмембранных (TM) спиралей (топология 7TM). В настоящее время методами ЯМР высокого разрешения (в растворе) определены пространственные структуры только двух 7TM белков бактериального происхождения: сенсорного родопсина II (SRII) из *Natronomonas pharaonis* [57] и протеородопсина (PR) из морской γ-протеобактерии [58].

1.3 Исследование мембранных белков методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения

Как было отмечено выше, ЯМР-спектроскопия высокого разрешения является одним из широко применяемых методов исследования структуры белковых молекул в растворе. Разработанные в последнее время экспериментальные методы и усовершенствованные подходы получения изотопно-меченых белковых молекул значительно расширили границы применимости ЯМР-спектроскопии, и сделали возможными структурные исследования интегральных мембранных белков (МБ), имеющих как α-спиральную организацию, так и структуру β-бочонка (см. обзоры [6–8,46].

Молекулы интегральных МБ нерастворимы в воде и требуют присутствия биологической липидной мембраны для поддержания функциональной структуры. Для исследования мембранных белков в ЯМР-исследованиях используют мембраномоделирующие среды, в качестве которых обычно выступают мицеллы детергентов или небольшие бицеллы, состоящие из смеси липидов и детергентов. Многочисленные исследования показывают, что в некоторых случаях мембранные белки сохраняют свою пространственную структуру и активность в составе детергент-липидных комплексов. Применение методов ЯМР-спектроскопии позволяет не только определить пространственную структуру белка в комплексе с мицеллой, но и исследовать топологию этого комплекса [9]. Однако, как и в случае с водорастворимыми глобулярными белками диапазон исследований ограничен сравнительно небольшими молекулами. α-Спиральная организация большинства мембранных белков и эффективное “утяжеление” белковой молекулы, вызванное присоединением большого количества молекул детергента, значительно сужает диапазон применимости ЯМР-спектроскопии для мембранных белков [7].

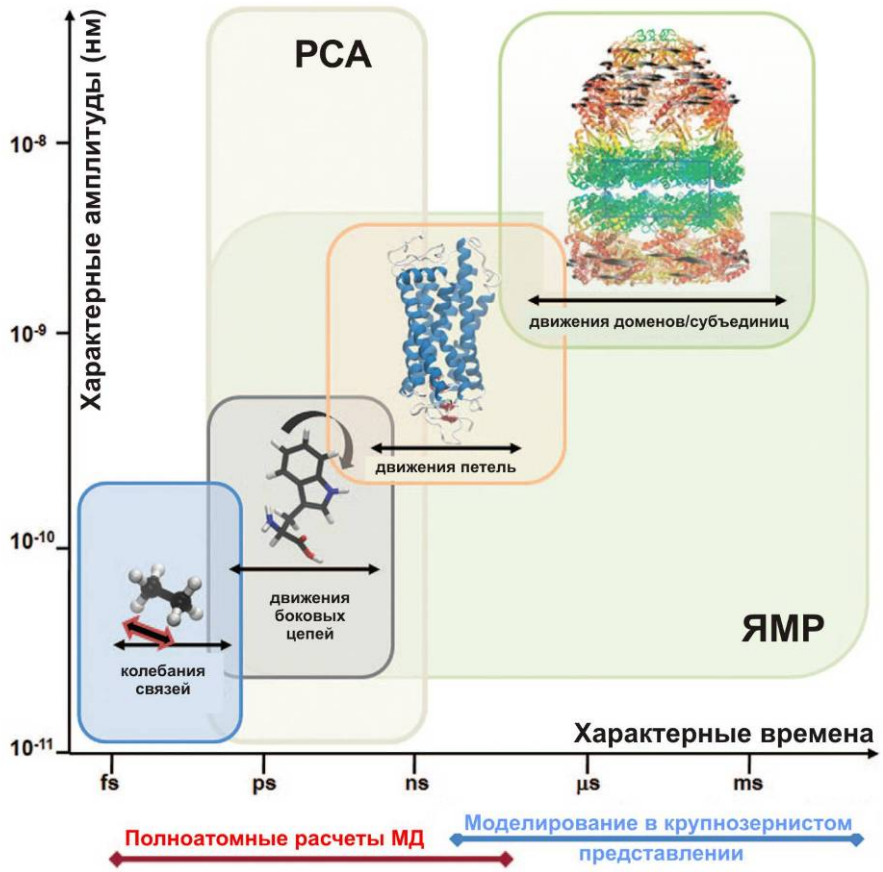


Рис. 1.2. Характерные временные диапазоны и амплитуды внутримолекулярных движений в молекулах интегральных МБ. Показаны типы движений, доступные для анализа различными экспериментальными методами, включая ЯМР-спектроскопию, а также методами молекулярной динамики (МД). Рисунок адаптирован из работы [5].

Относительно слабое межспиральное взаимодействие обуславливает большую конформационную подвижность α-спиральных МБ и низкую стабильность их структуры в мембраномоделирующих средах, что значительно затрудняет, как кристаллизацию, так и ЯМР исследования мембранных белков [22]. Повышенная динамическая подвижность МБ часто имеет функциональное значение. Типы конформационных изменений, наблюдаемых в этих молекулах, имеют различные временные характеристики и амплитуду: от простой подвижности боковых цепей и петлевых участков в пикосекундном и наносекундном диапазонах до полной перестройки третичной структуры молекулы в ответ на внешний сигнал, такой как изменение ТМ потенциала или связывание лиганда. Эти процессы могут идти с характерными временами в микросекундном, миллисекундном или даже секундном диапазонах (Рис. 1.2) [5,22]. Методы ЯМР-спектроскопии дополняют методы рентгеновской кристаллографии и позволяют не только определять пространственную структуру белков, но и дают дополнительную информацию о внутримолекулярной динамике биомолекул.

Несмотря на достигнутый прогресс, ЯМР-исследования МБ все еще чрезвычайно затруднены и представляют собой непростую задачу. Существуют три основные проблемы, которые приходится решать при исследовании мембранных биомолекул, включая молекулы мембраноактивных пептидов. (1) Получение сравнительно больших количеств изотопно-меченых белковых/пептидных препаратов, обладающих природной пространственной структурой. (2) Подбор оптимальной мембраномоделирующей среды для ЯМР-исследования. (3) Измерение экспериментальных данных достаточного качества, необходимых для определения пространственной структуры или изучения динамики МБ. Эти проблемы взаимосвязаны и их решение во многом зависит от свойств используемых мембраномоделирующих сред (см. обзоры [6–8,46]).

1.3.1 Способы рекомбинантной продукции МБ в функционально активной форме

Для структурных исследований МБ требуются большие количества (миллиграммы) белкового препарата, которые не могут быть получены из природных источников [1]. Это обуславливает применение различных подходов рекомбинантной продукции изотопно-меченых белков, каждый из которых обладает как преимуществами, так и определенными недостатками, например, низкой эффективностью [59]. Для структурно-функциональных исследований, а также для прикладного применения в области биотехнологии и фармакологии, рекомбинантные препараты МБ должны обладать нативной пространственной структурой, активностью и иметь достаточную временную и температурную стабильность [60].

Одним из популярных методов продукции МБ, является гетерологическая экспрессия, в ходе которой целевой белок накапливается в мембране клеток бактерий, дрожжей, насекомых или млекопитающих. Этот метод часто позволяет получить МБ в функционально-активной форме. Так, именно экспрессия в клеточных мембранах *E. coli* позволила получить для структурных ЯМР-исследований изотопномеченые образцы многих МБ бактериального происхождения, например K^+-канала KcsA [61,62], сенсорного родопсина SRII из *Natronomonas pharaonis* [57] и др. (см. Табл. 1.2). Количество белкового препарата, получаемого подобными методами, лимитировано емкостью мембран экспрессирующих клеток и зачастую является недостаточным как для структурных исследований, так и для прикладного использования МБ [59]. Фактически, применение этих подходов ограничено продукцией бактериальных белков в бактериальных же системах экспрессии на основе клеток *E. coli*, обладающих высокой эффективностью, а успешная гетерологическая экспрессия эукариотических МБ в составе мембран бактериальных клеток описана только для нескольких белков. Следует отметить, что продукция немеченых препаратов МБ в мембранах эукариотических клеток (клетки млекопитающих, насекомых, дрожжей) широко применяется в области рентгеновской кристаллографии. Так, именно этими методами были получены препараты МБ, которые позволили установить пространственную структуру ряда 7TM рецепторов семейства GPCR (см. обзор [63]), объектов, пока не доступных для структурных исследований методами ЯМР высокого разрешения.

За последние несколько лет значительное развитие получили альтернативные подходы продукции МБ, одним из которых является высокоэффективный бесклеточный синтез, на основе сопряженных систем транскрипции-трансляции *in vitro* [64]. По сравнению с методами, использующими клеточную экспрессию, бесклеточные белоксинтезирующие системы (ББС) обладают рядом преимуществ. ББС позволяют синтезировать токсичные белки, значительно упрощают получение селективно изотопно-меченых препаратов для структурных и биологических исследований [44–46], а также позволяют использовать различные добавки (лиганды, кофакторы) к трансляционной смеси (ТС), способствующие формированию нативной пространственной структуры и увеличивающие стабильность синтезируемого белка в растворе [64]. Для продукции препаратов МБ в растворимой и функционально-активной форме в ТС могут добавляться как компоненты классических мембраномоделирующих сред (мицеллы детергентов [65], липид/детергентные бицеллы [66], липосомы [67]), так и синтетические сурфактанты (например, амфифолы (amphipols) [68], фторированные сурфактанты [69], полимеры, включающие фруктозу (NVoy) [70] и т.д.). В ряде работ было описано применение липид-

белковых нанодисков (ЛБН) для бесклеточного синтеза МБ в растворимой форме [71–73]. Было предложено две методики, включающие либо добавление пресформированных ЛБН в ТС (ко-трансляционное встраивание МБ в ЛБН) [71,73], либо одновременный бесклеточный синтез MSP и целевого белка в присутствии фосфолипидов [72].

Миллиграммовые количества препаратов МБ также могут быть получены методами биотехнологии или биоорганической химии в функционально-неактивной форме. Например, эффективные бактериальные системы экспрессии МБ позволяют получить требуемые количества белкового препарата в составе нерастворимых телец включения, характеризующихся неправильной упаковкой полипептидной цепи целевого белка и/или его некорректным агрегационным состоянием [59,74]. Кроме того, большие количества нефункциональных препаратов МБ могут быть получены методами бесклеточного синтеза в виде осадка ТС, не содержащей мембранных миметиков [64], или методами химического синтеза [75].

Для перевода полученных препаратов МБ в активную форму необходим процесс ренатурации (рефолдинга) *in vitro* с использованием мембраномоделирующих сред [74]. К настоящему времени не существует универсальных приемов ренатурации МБ. Особую сложность представляет собой ренатурация олигомерных и политопных (состоящих из нескольких ТМ спиралей) мембранных белков, к которым относится большинство рецепторов и ионных каналов [76,77]. Следует отметить, что в живой клетке для фолдинга синтезированных МБ используется специальная АТФ-зависимая «молекулярная машина» – транслокон, представляющая собой комплекс из нескольких водорастворимых и интегральных мембранных белков [78]. При этом рибосома, синтезирующая МБ, присоединяется к этому комплексу, что обеспечивает фолдинг и встраивание в мембрану отдельных ТМ спиралей белка прямо в ходе процесса трансляции [78].

Известные методы рефолдинга МБ *in vitro* обычно включают в себя несколько этапов [74,79,80]. Изначально неструктурированный белок, часто находящийся в виде нерастворимых агрегатов, солюбилизируют в денатурирующих («жестких») детергентах или органических растворителях, иногда с добавлением хаотропных агентов. Этот этап приводит к формированию спиральных элементов вторичной структуры, однако третичные контакты спираль-спираль не формируются. Такое состояние МБ может быть описано как «денатурированное» [81]. Это состояние отличается от «предсвернутого» или «расплавленного» состояния МБ, описанного в п. 5.3 главы 5, которое характеризуется «пред-сформированными» третичными контактами между ТМ спиралями. Спонтанный фолдинг МБ инициируют на следующем этапе путем перевода белка в более «мягкое» мембраномоделирующее окружение, способное поддерживать корректную

пространственную структуру [74]. Для этих целей могут применяться: мицеллы мягких детергентов [82], липид/детергентные бицеллы [83], липидные везикулы [84] или синтетические сурфактанты (амфифолы) [79]. Например, образец белка CXCR1 (семейство GPCR), использованный для определения пространственной структуры рецептора методами ЯМР твердого тела, был получен путем продукции МБ в составе телец включения *E. coli* с последующим многостадийным рефолдингом, включающим перевод белка из жесткого детергента SDS в более мягкий детергент DPC и встраивание МБ в везикулы цвиттер-ионного липида DMPC [56]. Следует отметить, что возможность применения нанодисков и молекул аполипопротеинов для фолдинга МБ *in vitro*, описанная в п. 2.3 главы 2 представленной работы, ранее не исследовалась.

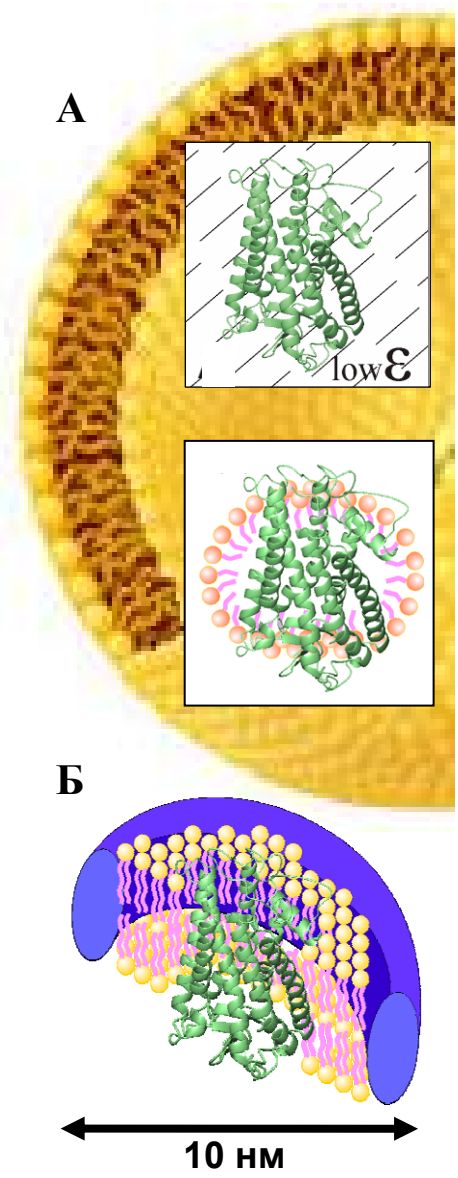


Рис. 1.3. Классические миметики мембраны (А) и липид-белковый нанодиск (Б). Две молекулы MSP, экранирующие в нанодиске фрагмент мембраны от растворителя, показаны в виде тора.

1.3.2 Мембраномоделирующие среды для ЯМР-исследований МБ и МП

Еще одним камнем преткновения в ЯМР-исследованиях МБ является поиск оптимальной солюбилизирующей среды (мембранного миметика) [85–87]. Оптимальный мембранный миметик должен обладать рядом свойств: способствовать формированию и стабилизации в растворе нативной структуры МБ; поддерживать заданное агрегационное состояние МБ, обеспечивать высокую временную и температурную стабильность препаратов МБ и в то же время обеспечивать «интерпретируемые» спектры ЯМР солюбилизированной молекулы [4]. Скорость поперечной релаксации ядер (R_2) и ширина ЯМР-сигналов значительно возрастает при увеличении размеров комплекса МБ/мембранный миметик. Это накладывает дополнительные ограничения на свойства мембраномоделирующей среды: ее частицы должны иметь характерный диаметр не более 10 нм и массу не боле 150 кДа [4,9].

Традиционно для ЯМР-исследований используются два типа мембранных миметиков (Рис. 1.3), каждый из которых обладает как преимуществами, так и определенными недостатками. Это – изотропные растворы органических растворителей с

низкой полярностью (например, метанол, TFE, смеси метанол/хлороформ, TFE/вода) и анизотропные миметики на основе детергентов (в форме мицелл или небольших смешанных бицелл с липидами) [8]. Несмотря на то, что мембраномоделирующие среды, содержащие липидный бислой, – везикулы (липосомы) или «большие» бицеллы, обладают «идеальными» мембраномоделирующими свойствами, размер этих частиц делает невозможным их применение в ЯМР-спектроскопии высокого разрешения [4,9]. Так, моноламелярные липосомы, полученные методом экструзии, имеют диаметр ~ 100 нм [88], а метастабильные липосомы, получаемые с использованием ультразвуковой обработки, имеют диаметр ~ 30 нм. В то же время диаметр бицелл DMPC/DHPC, имеющих свойства, близкие к липидному бислою (q>3, см. ниже), превышает 20 нм [89].

1.3.2.1 Изотропные среды – растворители с низкой полярностью или их смеси

Несмотря на то, что молекулы МБ в отсутствие фосфолипидов и детергентов, не растворяются в воде, во многих случаях они могут быть растворены в смесях органических растворителей таких как хлороформ/метанол/вода (4:4:1) или гексафторизопропанол/вода (8:2) [8]. Подобные среды обладают низкой вязкостью, что обеспечивает «удобные» релаксационные характеристики солюбилизированных молекул (быстрая реориентация в растворе, низкие скорости поперечной релаксации R_2, узкие линии в спектрах ЯМР, большая чувствительность). Эти свойства позволяют использовать методы ЯМР-спектроскопии на натуральном содержании изотопа ^{13}C, применение которых в анизотропных средах лимитировано чувствительностью экспериментов, что в свою очередь открывает возможности для структурного анализа пептидов, содержащих неканонические или модифицированные остатки. Как следствие органические растворители широко используются в ЯМР-исследованиях при установлении химической структуры гидрофобных природных соединений. С другой стороны, эти среды не позволяют «адекватно» моделировать мембрану, имеющую как полярные, так и гидрофобные регионы, и имеют весьма ограниченное применение в качестве модели биологической мембраны при изучении МБ [8].

Одной из негативных черт сред на основе органических растворителей является искусственная стабилизация спиральной конформации [90]. Так, солюбилизация даже β-структурных пептидов в TFE может приводить к формированию полностью спиральной конформации [91]. В случае спиральных МБ формирование стабильной вторичной структуры в средах на основе органических растворителей, например, наблюдаемое методом КД-спектроскопии, может не соответствовать формированию нативной пространственной структуры белка. Например, для мембранного фермента диацилглицеролкиназы *E. coli* (DAGK, гомотример 3×3TM спирали) в смеси

изопропанол/вода (1:1 кислые условия) наблюдалась спиральная вторичная структура (по данным КД) и ЯМР-спектры хорошего качества. Однако белок в этой среде диссоцировал до мономеров и не сохранял нативную третичную структуру [92].

В качестве примера удачного использования изотропных растворителей для изучения интегральных МБ можно привести исследование пространственной структуры субъединицы *c* из F_1F_0-АТФазы в смеси хлороформ/метанол/вода (4:4:1, 50 мМ NaCl) [93] и исследование фрагментов бактериородопсина в смеси хлороформ/метанол (1:1, 100 мМ HCO_2NH_4) [94].

1.3.2.2 Анизотропные мембранные миметики – мицеллы детергентов

Анизотропные среды хорошо моделируют участки мембраны, сформированные жирнокислотными цепями и полярными головками липидов, и во многих случаях способны поддерживать «нативную» пространственную структуру и активность МБ [6–8,46]. Мицеллы и бицеллы, имеющие диаметр до 6 нм, широко используются в ЯМР-исследованиях МБ и МП. В большинстве случаев для подобных исследований требуются изотопно-меченые (^{2}H,^{13}C,^{15}N) препараты. Исследование немеченых препаратов МБ и МП, например, выделенных из природных источников, обуславливает применение дейтерированных (^{2}H-меченых) детергентов и липидов.

В идеальном случае солюбилизация МБ в детергент-содержащей среде должна приводить к формированию монодисперсных комплексов МБ/детергент(липид), содержащих МБ в нативной конформации. Молекулы детергента, экранирующие гидрофобные области МБ от контакта с водой, значительно увеличивают общую массу комплекса, что в свою очередь приводит к уменьшению чувствительности и спектрального разрешения в ЯМР-экспериментах. В результате ЯМР-спектры МБ, имеющих массу ~ 30 кДа, в окружении мицелл или бицелл часто имеют характеристики, сходные со спектрами больших белков (75-100 кДа, см. Табл. 1.2), но содержат меньшее количество сигналов. Минимизация общей массы комплекса МБ/детергент является одной из важных задач, которую необходимо решать при подборе среды для ЯМР-исследования [7].

Учитывая большое количество различных детергентов, доступных для исследования (Рис. 1.4, Табл. 1.1). поиск оптимальной среды может представлять собой непростую и трудоемкую задачу [85–87]. При решении этой задачи необходимо учитывать общие свойства детергентов, такие как: заряд, длина жирнокислотной цепи(ей), критическая концентрация мицеллообразования (ККМ), агрегационное число и баланс гидрофильных-липофильных свойств (HLB). Так, ККМ определяет концентрацию детергента, выше которой в образце формируются мицеллы. ККМ уменьшается с

увеличением длины жирнокислотной цепи и увеличивается при введении в нее двойных связей и точек ветвления. Агрегационное число – число молекул детергента, формирующих мицеллу в отсутствие инкапсулированного белка, может дать общее представление о размере комплекса МБ/мицелла. Большее значение HLB соответствует более гидрофильным детергентам [95]. Детергенты, имеющие HLB в диапазоне от 12 до 20, предпочтительны для неденатурирующей солюбилизации МБ.

Примеры детергентов, которые успешно применялись для ЯМР-исследований МБ, включают в себя как синтетические молекулы DPC, LDAO, SDS, CYFOS-7, OG, а также короткоцепочечные липиды DC6PC (DHPC), DC7PC и лизо-фосфолипиды LMPG, LMPC, LOPG, LPPG (Рис. 1.4, Табл. 1.1).

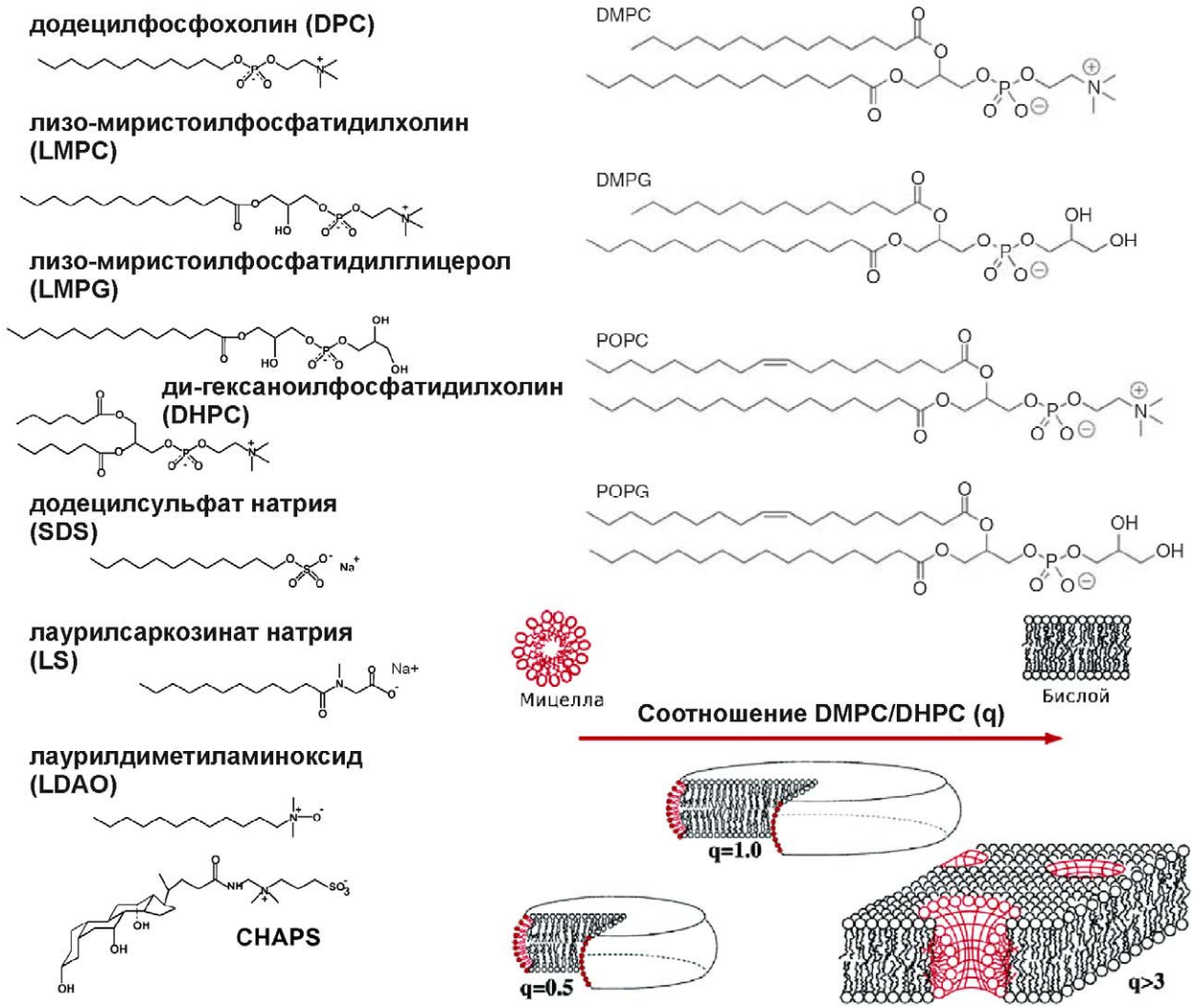


Рис. 1.4. (слева) Некоторые детергенты, используемые для исследований МБ и МП методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. (справа) Фосфолипиды, применяемые для формирования липосом, бицелл и нанодисков. (справа внизу) Форма бицелл в зависимости от соотношения концентраций липида (на примере DMPC) и детергента (на примере короткоцепочечного липида DHPC). Избыток DHPC ведет к формированию небольших сферических (эллиптических) смешанных липид/детергентных мицелл. Увеличение содержания липидной компоненты ведет к формированию структур большой массы, близких по свойствам к липидному бислою. Рисунок взят из работы [96].

Детергент	Молекулярный вес (Да)	ККМ (мМ)	Агрегационное число
Цвиттер-ионные			
CHAPS	615	6–10	4–14
CHAPSO	631	8	11
Dihexanoylphosphatidylcholine (DC6PC или DHPC)	454	15	19–35
Diheptanoylphosphatidylcholine (DC7PC)	482	1.5	25
Decylphosphocholine (FOS10)	323	11	ND
Dodecylphosphocholine (DPC, FOS12)	352	1.5	50–60
Tetradecylphosphocholine (FOS14)	380	0.12	ND
Lyso-lauroylphosphatidyl choline	440	0.5–0.7	70
Lyso-myristoylphosphatidylcholine (LMPC)	468	0.04–09	100
Lyso-palmitoylphosphatidylcholine (LPPC)	496	0.004–0.008	140-186
N-Dodecyl-*N*,*N*dimethylglycine (empigen BB)	272	2	ND
Цвиттер-ионные/Слабо катионные			
N-Lauroyldimethyl amineoxide (LDAO)[а]	229	2	70
Анионные			
Lyso-myristoylphosphatidylglycerol (LMPG)	478	0.2–3[б]	55
Lyso-palmitoylphosphatidylglycerol (LPPG)	507	0.02–0.6[б]	160
N-Lauroylsarcosine (LS)	293	~15	ND
Sodium dodecylsulfate (SDS)[в]	288	1–8[б]	65
Digitonin	1229	<0.30	60
Неионные			
β-Decylmaltoside (DM)	483	2	100
β-Dodecylmaltoside (DDM)	511	0.2	140
β-Octylglucoside (OG)	292	19–25	90

Таблица 1.1. Свойства некоторых детергентов, используемых для солюбилизации и ЯМР-исследований МБ и МП. Таблица адаптирована из работ [8,9]. (а) Молекула LDAO в растворе и в составе мицеллы имеет pK_a ~4.8 и ~6, соответственно [97]. Ниже этих значений молекулы детергента имеют преимущественно положительный заряд, а выше не имеют заряда. Мицелла LDAO полностью теряет свой заряд при pH раствора > 7.5. (б) Зависит от pH и ионной силы раствора; (в) образует осадок при температуре ниже 15°C.

Некоторые из синтетических детергентов, а также короткоцепочечные фосфолипиды доступны в дейтерированном виде. Наиболее часто по экономическим соображениям в ЯМР-исследованиях применяют d38-DPC (Fos-12, или додецилфосфохолин) и d25-SDS (додецилсульфат натрия). Однако, использование дейтерированных детергентов не всегда оправдано [7]. По-видимому, взаимодействие протонов белка с протонами детергента не приводит к значительному увеличению скорости R_2 релаксации для $^1H^{15}N$ групп. Как следствие, использование дейтерированных

детергентов не оказывает влияния на чувствительность и разрешение 2D $^{1}H,^{15}N$ корреляционных экспериментов, таких как HSQC и TROSY [98], а также не является необходимым для получения 3D экспериментов тройного резонанса ($^{1}H,^{13}C,^{15}N$), используемых при отнесении сигналов основной цепи белка. В тоже время использование дейтерированных детергентов при отнесении сигналов ($^{1}H,^{13}C$) боковых цепей позволяет значительно увеличить качество ЯМР-спектров, предотвращая появление полос t1-шума от протонов детергента. Следует отметить, что из-за молярного избытка детергента в образце сигналы от его $CH_{(1,2,3)}$ групп на натуральном содержании изотопа ^{13}C по интенсивности могут превосходить сигналы боковых цепей белка [7].

Существуют и другие параметры, которые необходимо оптимизировать при выборе среды для ЯМР-исследования МБ. Одним из важных параметров является общая концентрация детергента и, в особенности, молярное отношение детергент/белок (D:P). Так, агрегация МБ может наблюдаться в случаях, когда концентрация детергента недостаточна для экранирования гидрофобной поверхности белка от растворителя. С другой стороны, чрезмерное увеличение концентрации детергента (выше 5-7%) приводит к увеличению вязкости раствора и к замедлению реориентации МБ, вызывая значительное увеличение ширины сигналов в ЯМР-спектрах и уменьшение их чувствительности [99]. Оптимальное соотношение детергент/белок зависит от свойств изучаемого МБ. Так, например, для структурных ЯМР-исследований 7TM белков сенсорного родопсина II (SRII) [57] и протеородопсина (PR) [58], проведенных в детергенте DC7PC, оптимальные значения D:P оказались равны ~120 и ~85, соответственно. В то же время при исследовании фермента DAGK (гомотример 3TM) [100] и канала KcsA (гомотетрамер 2TM) [62] в детергенте DPC оптимальные значения D:P оказались равны ~112 и ~30, соответственно.

На способность детергента поддерживать в течение длительного времени нативную конформацию МБ в растворе могут также влиять и другие факторы, а именно чистота препаратов, присутствие различных добавок, например, небольших количеств органических растворителей, а также температура, pH и ионная сила раствора [7]. Фактически, при поиске условий для ЯМР-исследования МБ необходимо оптимизировать все те же параметры, которые варьируются при подборе оптимальных условий для исследования водорастворимых белков, а также состав и концентрацию мембраномоделирующей среды.

1.3.2.3 Анизотропные мембранные миметики – липид/детергентные бицеллы

Большинство пространственных структур МБ высокого разрешения, определенных методами рентгеновской кристаллографии и ЯМР-спектроскопии, были получены для

образцов белков, изначально солюбилизированных в мицеллах детергентов. В то же время мицеллы не способны полностью моделировать липидный бислой как из-за значительных различий в упаковке и общей организации, так и в результате способности детергента дестабилизировать пространственную структуру или изменять биохимические свойства и активность инкапсулированного МБ [7]. В некоторых случаях мембраномоделирующие свойства мицелл можно «улучшить», добавив в них небольшое количество фосфолипида. Частицы подобных липид/детергентных сред получили название «бицеллы» [96].

Бицеллы представляют собой промежуточный вариант между изотропными мицеллами детергентов и бислойными липидными везикулами, объединяя в себе свойства обеих этих сред [96]. Как и мицеллы, бицеллы не образуют внутренних полостей, формируя монодисперсные оптически прозрачные растворы. Бицеллы состоят из фосфолипидов одного или нескольких типов (например, DMPC) которые собираются в бислой, стабилизированный короткоцепочечным липидом или детергентом (например, DHPC, CHAPS) (Рис. 1.4). Получившиеся структуры дискообразной формы имеют размеры, позволяющие исследовать инкапсулированные в них МБ и МП методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. При этом, размеры и форму бицелл можно контролировать, изменяя отношение концентрации длинноцепочечного липида к концентрации короткоцепочечного (q) [101]. Для применения в спектроскопии ЯМР высокого разрешения подходят бицеллы с q от 0.1 до 1.0.

Мембраномоделирующие среды на основе бицелл также не лишены ряда недостатков. Величина q определяет форму бицеллы: чем выше ее значение, тем бицелла более сплюснута и ближе к реальному бислою. Однако, при повышении q неизбежно увеличивается масса бицеллы, что ведет к ухудшению чувствительности ЯМР-экспериментов и к значительному увеличению ширины линий исследуемых молекул МБ и МП. Следует отметить, что одна из важных биофизических характеристик липидного бислоя, – фазовый переход липидов из жидко-кристаллического в гелевое состояние, наблюдается в бицеллах только при $q > 3$ [89]. Соответствующие бицеллы имеют характерные размеры, превышающие 20 нм, и не могут быть использованы в ЯМР-исследованиях. Таким образом, липид/детергентные смеси, применяемые при исследованиях МБ, имеют свойства смешанных эллиптических мицелл.

В последнее время бицеллы все чаще применяются как среда для ЯМР-исследований МБ и МП. В основном, выбор соответствующих сред связан с невозможностью стабилизировать нативную (активную) структуру МБ в средах на основе мицелл детергентов. Так, например, исследование транспортера SMR, обуславливающего множественную лекарственную резистентность *S. aureus* (гомодимер 4TM), показало, что

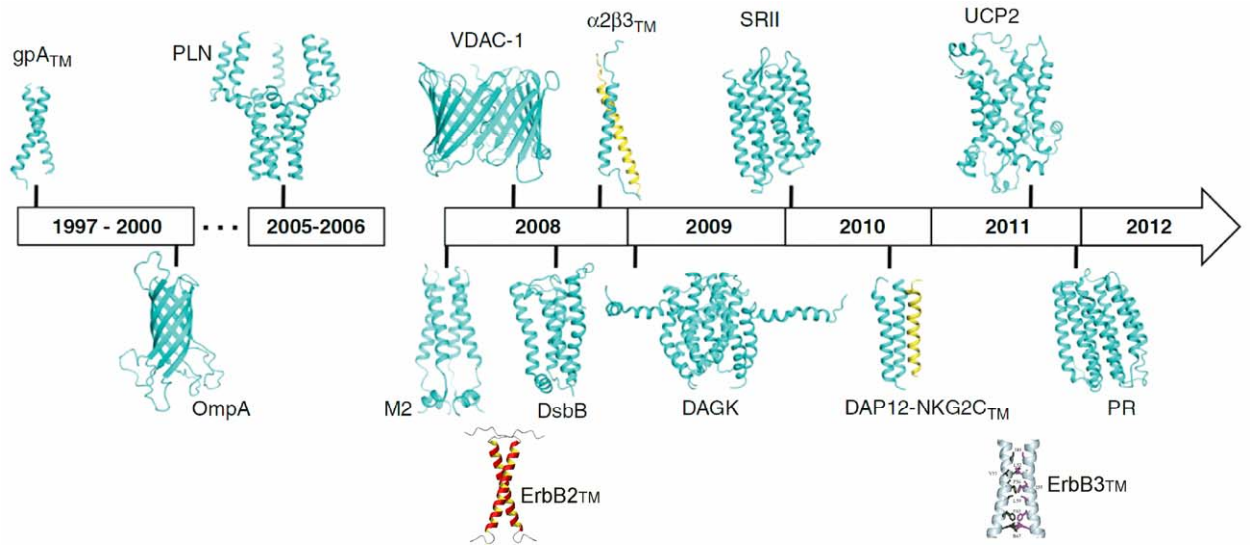
в мицеллах LPPG, несмотря на хорошее качество ЯМР-спектров, стабилизируется состояние МБ, не обладающее функциональной активностью [102]. В то же время применение бицелл DMPC/DHPC (q = 0.4) с добавлением DHPS позволило получить практически полное отнесение ЯМР-сигналов основной цепи белка в нативной конформации и охарактеризовать вторичную структуру МБ [103]. При этом масса комплекса МБ/бицелла составила ~150 кДа [102].

1.3.3 ЯМР-исследования МБ в детергент-содержащих мембраномоделирующих средах

В настоящее время методы ЯМР-спектроскопии высокого разрешения позволяют проводить структурные исследования МБ, имеющих в своем составе одну или несколько трансмембранных спиралей. Например, методами ЯМР была определена пространственные структуры димеров трансмембранных доменов рецепторных тирозинкиназ человека ErbB2 и ErbB3 (2×4.7 кДа) [104,105], состоящих из двух одинаковых спиралей, бактериального мембранного фермента DsbB (21 кДа), катализирующего формирование дисульфидных связей и имеющего в своем составе 4 ТМ спирали [106], а также двух белков, имеющих 7ТМ архитектуру SRII [57] и PR [58].

Кроме того, нельзя не отметить большие успехи ЯМР-спектроскопии в исследовании β-структурных мембранных каналов, имеющих пространственную организацию β-бочонка (поринов). Так, в 2008 году методами ЯМР была определена структура потенциалозависимого анион-селективного канала VDAC-1 из митохондрий человека, – белка, состоящего из 19-ти трансмембранных β-тяжей и имеющего массу 32 кДа [107]. Эта структура была опубликована раньше результатов кристаллографического исследования этого же белка [108]. Примеры пространственных структур МБ, определенных методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения показаны на Рис. 1.5. В таблице 1.2 для этих МБ указаны мембраномоделирующие среды, использованные для исследования, способ рекомбинантной продукции и тип введения изотопных меток, а также ЯМР-данные, на основании которых был проведен расчет пространственной структуры.

Существует также большое количество исследований, в которых с помощью ЯМР-спектроскопии были изучены внутримолекулярная динамика и механизмы работы мембранных белков с уже известными кристаллическими структурами. Например, использование ЯМР-спектроскопии позволило в окружении мицелл DPC детально охарактеризовать динамическое поведение бактериального pH-зависимого K^+-канала KcsA (*Streptomyces lividans*) в открытом и закрытом состоянии [62].



Белок/архитектура	Система продукции, изотопные метки[а]	Среда	Масса (кДа)[б]	Данные ЯМР[в]	PDB код, год
gpA$_{TM}$ – ТМ домен гликофорина А из мембран эритроцитов человека, 2×1ТМ	*E. coli,* u^{13}C^{15}N	DPC	2×4.5 /n.d.	NOE, J	1AFO [109] 1997
OmpA (β8) – ТМ белка А из внешней мембраны бактерии, *E. coli*	*E. coli,* refold, $_{u}^{2}$H^{13}C^{15}N, s^{15}N	DPC	19 /n.d.	NOE, φ/ψ	1G90 [110] 2001
PLN – фосфоламбан человека (не фосфорилированный), 5×1ТМ	*E. coli,* u^{2}H^{13}C^{15}N	DPC	5×6 /n.d.	NOE^{flt}, J φ/ψ, RDC	1ZLL [111] 2005
M2 – протонный канал М2 вируса гриппа А, 4×1ТМ	*E. coli,* u^{2}H^{13}C^{15}N	DHPC	4×5 /n.d.	NOE^{flt}, J φ/ψ, RDC	2RLF [112] 2008
VDAC1 (β19) – потенциалозависимый анионный канал митохондрий человека	*E. coli,* refold, s^{15}N $_{u}^{2}$H^{13}C^{15}N, s^{13}C/Met	LDAO	32 /75-90	NOE, φ/ψ	2K4T [107] 2008
ErbB2$_{TM}$ – ТМ домен рецептора фактора роста ErbB2 человека, 2×1ТМ	*E. coli,* u^{13}C^{15}N	DHPC/ DMPC 4:1	2×4.7 /44	NOE^{flt}, J φ/ψ,	2JWA [104] 2008
DsbB –фермент, катализирующий формирование дисульфидных связей в периплазме *E. coli,* 4ТМ	*E. coli,* $_{u}^{2}$H^{13}C^{15}N, s^{13}C/Met	DPC	21 /40	NOE, J φ/ψ, RDC PRE	2K74 [106] 2008
α2β3ТМ – ТМ домен α2b-β3 интегрина человека, 2×1ТМ	*E. coli,* $_{u}^{2}$H^{13}C^{15}N, s^{13}C/Met	DHPC/POPC/ POPS 9:2:1	2×4.7 /n.d.	NOE, φ/ψ, RDC	2K9J [113] 2009
DAGK [г] – диацилглицерол киназа *E. coli*, 3×3ТМ	*E. coli,* $_{u}^{2}$H^{13}C^{15}N	DPC	3×13 /100	NOE,φ/ψ, RDC,PRE	2KDC [100] 2009
SRII – сенсорный родопсин II из *Natronomonas pharaonis*, 7ТМ	*E. coli,* $_{u}^{2}$H^{13}C^{15}N, s^{13}C/Met	DC7PC	26/ 70	NOE, φ/ψ	2KSY [57] 2010
DAP12-NKG2CTM – комплекс ТМ домена имунорецептора II типа и гомодимера сигнальной молекулы DAP12 человека, 1ТМ+2ТМ	*E. coli,* $_{u}^{2}$H^{13}C^{15}N	Fos-14/SDS 10:1	3.2+6.5 /n.d.	NOE, φ/ψ	2L35 [114] 2010
UCP2 – разобщающий белок из митохондрий мыши, 6ТМ	*E. coli,* $_{u}^{2}$H^{13}C^{15}N	DPC/DMPC/ DPG 150:2:1	33 /n.d.	φ/ψ, RDC,PRE	2LCK [115] 2011
ErbB3$_{TM}$ – ТМ домен рецептора фактора роста ErbB3 человека, 2×1ТМ	ББС, u^{13}C^{15}N	DPC	2×4.7 /n.d.	NOE^{flt}, J φ/ψ,	2L9U [105] 2011
PR – протеородопсин из морской γ-протеобактерии, 7ТМ	ББС, u^{13}C^{15}N, s^{15}N, s^{13}C, SAIL	DC7PC	26/ 85	NOE,φ/ψ, RDC,PRE	2L6X [58] 2011

Рис. 1.5. Таблица 1.2. Прогресс в области ЯМР-исследований МБ, достигнутый за последние 20 лет. Рисунок адаптирован из работы [6]. В таблице приведены дополнительные данные, касающиеся системы продукции белка и ЯМР-экспериментов, использованных для определения пространственной структуры. (а) u – тотально меченый, s – селективно меченый (Met – метильные группы), refold – ренатурация. (б) Масса МБ и масса комплекса МБ+мицелла/бицелла (n.d. нет данных).(в) NOE^{flt} – межмономерные ЯЭО контакты, полученные с использованием изотопных фильтров, J – КССВ, φ/ψ – ограничения на углы из вторичных хим. сдвигов. (г) Согласно результатам более позднего кристаллографического исследования DAGK [116], опубликованная ЯМР-структура содержит значительные ошибки.

Канал KcsA представляет собой гомотетрамер, каждая из субъединиц которого содержит по две ТМ спирали, а также *N*- и *C*-концевые спиральные домены, доступные растворителю. Общая масса канала KcsA составляет 4 × 18.5 = 74 кДа, в то время как комплекс канал/мицелла DPC имел молекулярную массу, равную ~ 130 кДа [62]. Следует отметить, что ранее укороченный вариант канала KcsA также исследовали методом ЯМР в окружении мицелл SDS (общая масса комплекса ~ 100 кДа) [61]. На сегодняшний момент работы, посвященные исследованию гомотетрамера KcsA (4×2TM) в окружении мицелл DPC [62], и гомодимера транспортера SMR (2×4TM, 2×12 кДа, масса комплекса МБ/бицелла ~150 кДа) в бицеллах DMPC/DHPC/DHPS [103] очерчивают приделы применимости методов ЯМР-спектроскопии высокого разрешения с точки зрения размера изучаемого комплекса МБ/мембранный миметик.

1.4 Липид-белковые нанодиски (ЛБН) – альтернативная мембраномоделирующая среда

Как уже отмечалось, классические мембраномоделирующие среды на основе детергентов обладают рядом существенных недостатков. Так, значительная поверхностная кривизна, высокая динамическая подвижность и отсутствие латерального давления в детергент-содержащих комплексах может приводить к серьезным искажениям нативной структуры солюбилизированного белка [117], а также к диссоциации функционально-важных белковых комплексов, или к агрегации молекул МБ. Во многих случаях высокая концентрация детергента приводит к разбавлению субстратов и лигандов, что затрудняет исследование функциональной активности МБ [79]. Денатурирующее действие детергентов нарушает спираль-спиральные взаимодействия, стабилизирующие нативную структуру МБ, что приводит к усилению внутримолекулярной подвижности α-спиральных МБ и к значительному уширению и ослаблению сигналов ЯМР от ТМ доменов [8,86,87]. Кроме того, в детергент-содержащих средах часто невозможно поддержать характерную для данного МБ стехиометрию липидного окружения, а нестабильность мицеллярных комплексов, обусловленная необходимостью поддержания концентрации детергента, превышающей ККМ, затрудняет простые манипуляции с препаратами МБ такие как изменение концентрации белка или состава буфера. В свою очередь низкая стабильность липосом (склонность к слиянию) и доступность в таких средах только одной (внешней) стороны липидного бислоя и, соответственно, инкапсулированного МБ ограничивает структурно-функциональные исследования мембранных рецепторов, имеющих сайты связывания лигандов как на внеклеточной, так и на цитоплазматической сторонах мембраны.

Все эти факторы обуславливают необходимость поиска альтернативных мембраномоделирующих сред, позволяющих проводить структурно-функциональные исследования МБ и МП различными методами, включая методы ЯМР-спектроскопии высокого разрешения.

1.4.1 Липопротеины плазмы крови млекопитающих

У млекопитающих существуют четыре главных класса липопротеинов сыворотки крови, подразделяемых по относительной плотности [118]. Наиболее крупные из этих частиц хиломикроны (chylomicrons) и липопротеины очень низкой плотности (VLDL) ускоряют транспорт триглицеридов в организме. Частицы липопротеинов, имеющие меньшие размеры липопротеины низкой плотности (LDL) и липопротеины высокой плотности (HDL) участвуют в транспорте холестерина [118].

Частицы липопротеинов имеют почти сферическую форму и состоят из липидного ядра, окруженного белковыми молекулами аполипопротеинов. Липидное ядро обычно сформировано фосфолипидами, триглициридами и эфирами жирных кислот холестерина. Аполипопротеины в свою очередь подразделяются на шесть классов (A, B, C, D, E и F). Основная роль – это стабилизация липопротеиновых комплексов, однако некоторые из них могут выступать и в качестве кофакторов для ферментов, участвующих в липидном обмене. Взаимодействуя с клеточными рецепторами, молекулы аполипопротеинов обеспечивают адресную доставку липопротеиновых комплексов в различные ткани организма. Свойства и состав различных частиц липопротеинов млекопитающих представлены в таблице 1.3 [118].

Тип	HDL	LDL	VLDL	Хиломикроны
Плотность (г/см)	1.063–1.21	1.019–1.063	0.93–1.006	0.93–1.006
Размер частиц (нм)	4–10	18–25	30–80	75–120
Содержание белка (%)	50	20	10	1
Основные белки	A-I	B	B	C-III
Минорные белки	A-II, C-I, C-II, C-III, E		C-I, C-II, C-III, E	B, C-I, C-II, D, E
Содержание фосфолипидов (%)	30	24	19	4
Содержание холестерина (%)	18	45	19	6
Содержание триглицеридов (%)	5	10	50	90

Таблица 1.3. Липопротеины плазмы крови человека. Таблица адаптирована из [118].

Сердечнососудистые заболевания являются одной из основных причин смертности в развитых индустриальных странах. Основным фактором риска при этих болезнях выступает высокий уровень холестерина в крови. Быстрый рост отложений эфиров

жирных кислот холестерина на внутренних сторонах стенок артерий приводит к появлению жировых прожилок на стенках сосудов, что является одним из первых клинических проявлений 1-ой стадии атеросклероза. Повышенное содержание частиц липопротеинов низкой плотности (LDL), содержащих холестерин, увеличивает риск развития сердечнососудистых заболеваний. Благодаря этому LDL часто называют «плохим холестерином» или «плохим липопротеином» (bad lipoprotein). С другой стороны, повышенное содержание частиц липопротеинов высокой плотности (HDL, хороший холестерин) в плазме крови замедляет развитие сердечнососудистых заболеваний [119].

В настоящее время отношение количества холестерина, связанного с LDL, к количеству холестерина в составе HDL является основным клиническим тестом для выявления риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний. Согласно современным данным, понижение концентрации LDL в крови человека уменьшает частоту возникновения различных заболеваний сердца на 40%. При этом считается, что минимальная «безопасная» концентрация HDL в крови человека составляет 0.4 мг/мл [120]. В то же время последние данные указывают на ограниченную применимость этого простого подхода для оценки риска развития сердечнососудистых заболеваний. Так, частицы HDL могут содержать окисленные формы аполипопротеина A1, которые не способны участвовать в транспорте холестерина, что значительно повышает риск развития заболеваний, несмотря на высокую концентрацию HDL в плазме крови [121].

1.4.2 Аполипопротеин A1 человека и обратный транспорт холестерина

Процесс, благодаря которому HDL понижают уровень холестерина в крови млекопитающих, был назван «обратный транспорт холестерина» [122]. В ходе этого процесса HDL транспортируют холестерин из периферических тканей организма, включая стенки сосудов, в печень для последующей переработки и выделения в виде желчи. Согласно современным данным, каждая частица липопротеина высокой плотности имеет форму сферы диаметром ~10 нм и включает в себя две или три молекулы белка, около 100 молекул фосфолипидов и 50 молекул эфира холестерина и жирной кислоты [123]. Белковый компонент этого комплекса – аполипопротеин A1 (апоA1, 243 аминокислотных остатка), представляет собой спиральный водорастворимый белок, который при контакте с фосфолипидной мембраной меняет конформацию и образует «незрелые» липопротеиновые частицы. «Незрелые» частицы липопротеинов высокой плотности не имеют в своем составе холестерина и обладают формой дисков диаметром ~10 нм и толщиной ~4 нм. Предполагается, что фосфолипиды в составе «незрелого» липопротеина образуют фрагмент плоской бислойной мембраны, боковая поверхность которого

экранирована от растворителя белковым компонентом комплекса [124–126]. Впоследствии в тканях млекопитающего частицы липопротеинов «созревают», нагружаются эфирами холестерина при участии специального фермента (лецитин-холестерин-ацил трансферазы, LCAT), превращаясь в сферические липопротеиновые частицы (Рис. 1.6А). Одним из важных этапов созревания HDL является их ремоделирование (lipoprotein remodeling), взаимное слияние, ведущее к укрупнению частиц и сопровождающееся высвобождением свободных (lipid-poor) молекул апоА1 [122,127]. Этот процесс происходит *in vivo* при взаимодействии липопротеиновых частиц с различными липофильными белками плазмы крови, включая LCAT.

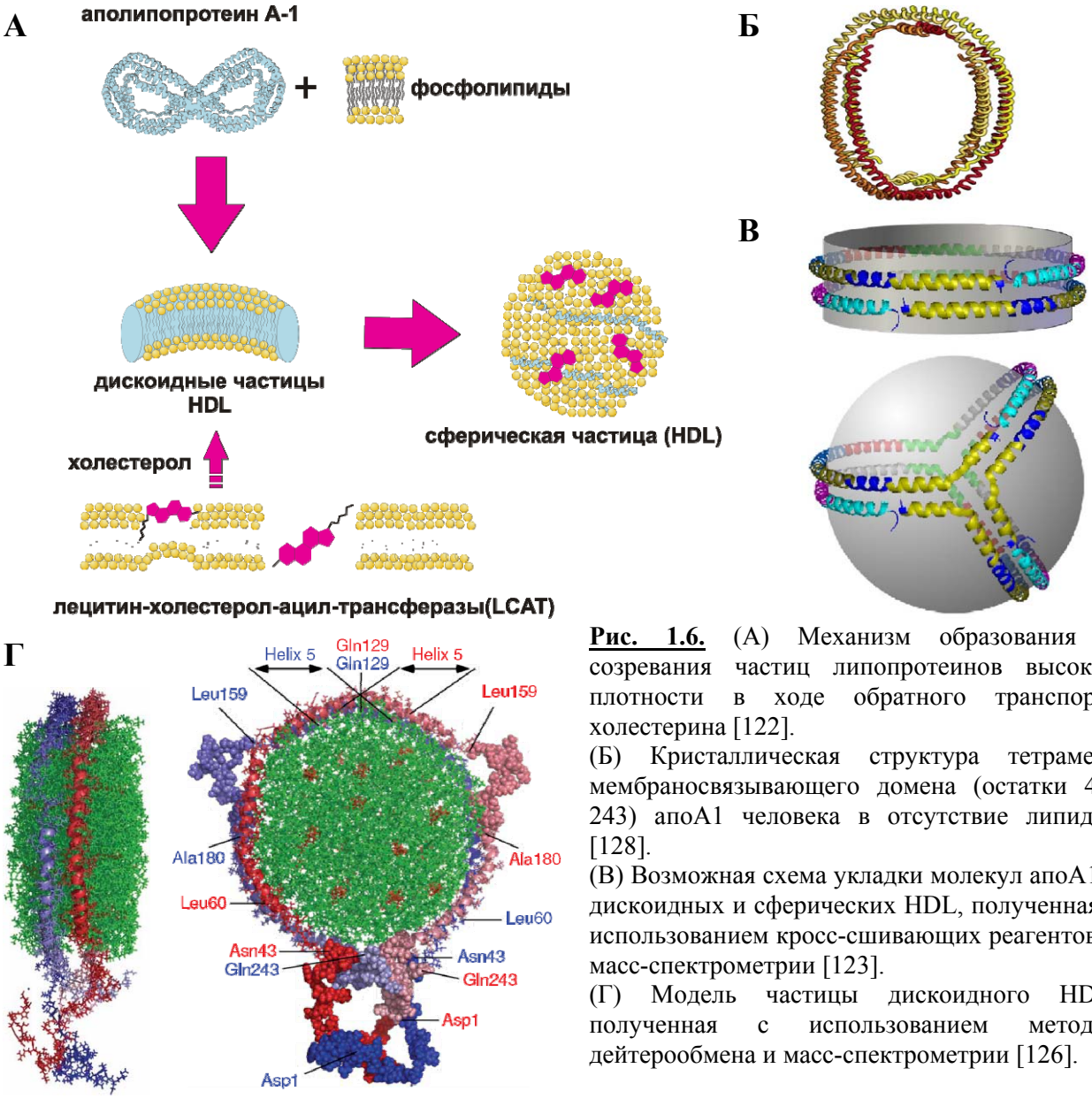


Рис. 1.6. (А) Механизм образования и созревания частиц липопротеинов высокой плотности в ходе обратного транспорта холестерина [122].
(Б) Кристаллическая структура тетрамера мембраносвязывающего домена (остатки 44-243) апоА1 человека в отсутствие липидов [128].
(В) Возможная схема укладки молекул апоА1 в дискоидных и сферических HDL, полученная с использованием кросс-сшивающих реагентов и масс-спектрометрии [123].
(Г) Модель частицы дискоидного HDL, полученная с использованием методов дейтерообмена и масс-спектрометрии [126].

Современные данные указывают на то, что апоА1 человека состоит из двух основных доменов. Первые 43 остатка молекулы образуют *N*-концевой регуляторный домен, а остатки 44-243 формируют мембраносвязывающий домен, который и

контактирует с молекулами липидов в составе липопротеинового комплекса [129]. Различные фрагменты молекулы аполипопротеина А1 играют важную роль в процессах формирования незрелых частиц липопротеина, в процессе их созревания и транспорта. Так, мутации или посттрансляционные химические модификации некоторых остатков этого белка (например, окисление Tyr166 или Trp72) препятствуют присоединению и активации фермента LCAT, что приводит к замедлению транспорта холестерина и развитию атеросклероза [121,126]. С другой стороны, мутации Arg173Cys и Arg151Cys («Миланская» и «Парижская» мутации, соответственно) приводят к стабилизации липопротеиновых частиц за счет формирования дополнительных дисульфидных связей, что значительно понижает риск развития сердечнососудистых заболеваний [130].

Аполипопротеин А-1 динамически подвижен в водном растворе в отсутствие липидов и может принимать несколько различных спиральных конформаций [131]. Структура мембраносвязывающего домена (остатки 44-243) апоА1 человека, полученная методом РСА, представляет собой тетрамер (связку) из четырех спиральных молекул белка, замкнутых в кольцо диаметром ~ 10 нм [128] (Рис. 1.6Б).

Структура липопротеиновых молекул в составе «незрелых» дискоидных и «зрелых» сферических HDL является объектом интенсивных исследований в течение последних 30 лет. На сегодняшний день в рамках доминирующих моделей предполагается, что фрагмент липидного бислоя в составе «незрелых» частиц опоясан двумя кольцами из спиральных молекул апоА1, каждая из которых взаимодействует с одним липидным монослоем [123,126,132] (Рис. 1.6ВГ). При этом спирали двух молекул белка ориентированы антипараллельно. Укладка молекул апоА1 в «зрелых» сферических HDL до сих пор является предметом дискуссии (Рис. 1.6В) [123].

1.4.3 Реконструированные частицы липопротеинов высокой плотности или нанодиски

Незрелые липопротеиновые частицы могут быть легко реконструированы *in vitro* из смеси липидов, детергента и апоА1 путем диализа или сорбции детергентов на специальную смолу. Впервые процесс реконструкции был описан более 20 лет назад [133], однако только в 2002 году группа американских ученых адаптировала эту методику для солюбилизации и стабилизации мембранных белков [134]. В своих работах этот коллектив авторов использовал фрагмент 44-243 аполипопротеина А1, взаимодействующий с мембраной. Полученная таким образом частица получила название «нанодиск» (NanoDisc), а использованный фрагмент аполипопротеина А1 получил название MSP (membrane scaffold protein, белок поддерживающий структуру мембраны) [134]. Техника получения липид-белковых нанодисков (ЛБН) основывается на добавлении

к MSP раствора липидов с детергентом и последующем постепенном удалении детергента с помощью диализа или специальной смолы Bio-Beads^{TM}, что приводит к самопроизвольному формированию нанодисков [135] (схема сборки ЛБН показана на Рис. 2.1, Глава 2). Кроме того, нанодиски могут быть получены из смесей, содержащих аполипопротеины, липиды и детергенты методом гель-фильтрации [136], а также при ко-инкубации фосфолипидных везикул и молекул аполипопротеинов [137].

Препараты HDL, реконструированные *in vitro* (или ЛБН), обладают определенной гетерогенностью и могут содержать дискретный набор частиц различного диаметра [138]. Степень гетерогенности этих препаратов зависит от использованного метода сборки нанодисков, а также от соотношения различных компонент в реакционной смеси. В то же время диаметр преобладающих частиц и их стабильность в основном определятся типом (последовательностью) молекулы аполипопротеина. Так, использование мембраносвязывающего домена (44-243) апоА1 человека (MSP) позволяет получать нанодиски, имеющие преимущественный диаметр ~10 нм и содержащие ~ 150 молекул фосфолипида [134]. На основе последовательности апоА1 человека были созданы несколько библиотек удлиненных или укороченных последовательностей MSP, которые позволяют формировать как более крупные частицы (диаметр 11-13 нм [139] и 16–17 нм [140]), так и нанодиски меньшего диаметра (~ 7 нм [141], 6-8 нм [142]). Кроме того, для сборки нанодисков описано применение других аполипопротеинов, например, аполипопротеина Е4 человека [143], аполипопротеина А1 рыбы *Danio rerio* [136], аполипофорина III тутового шелкопряда *B. Mori* [143]. Использование некоторых из этих молекул также позволяет формировать ЛБН диаметром > 10 нм.

В отличие от традиционно используемых мембранных миметиков, содержащих детергенты, фрагмент липидной мембраны в составе липид-белкового нанодиска (ЛБН) обладает повышенной стабильностью и сохраняет некоторые биофизические свойства, присущие настоящим мембранным системам. Например, в ЛБН наблюдается фазовый переход липидов из жидкокристаллического в гелевое состояние, который, однако, уширен и сдвинут в сторону больших температур [144]. Жирнокислотные цепи липидов в составе нанодиска, по-видимому, более плотно упакованы, чем в мембранах липидных везикул [145]. Возникающий вследствие этого энтропийный вклад в свободную энергию приводит к 20 кратному увеличению скорости выхода липидов в раствор из нанодисков, содержащих DMPC, по сравнению с липосомами того же липидного состава [145]. Исследование нанодисков, проведенное методом твердотельного ЯМР показало, что жирнокислотные цепи липидов в нанодисках более упорядочены [146]. Например, параметр порядка S^2 для $C2H_2$ группы DMPC при 27°C, характеризующий подвижность

этой группы в пс-нс диапазоне времен, был равен 0.3 в ЛБН и 0.2 в липосомах [146]. Следует отметить, что значения S^2 равные 0 и 1 соответствуют свободному движению и полностью фиксированной ориентации группы атомов.

1.4.4 Использование нанодисков для солюбилизации и исследования мембранных биомолекул

На сегодняшний день опубликованы результаты многочисленных работ по солюбилизации и исследованию мембранных белков и пептидов в составе нанодисков, содержащих как природные аполипопротеины, так и синтетические молекулы MSP (см. обзоры [135,147,148]). Опубликованные примеры включают в себя как интегральные мембранные белки (бактериородопсин, рецепторы семейства GPCR, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, бактериальный хеморецептор Tar и др.), так и периферические мембранные белки (Рис. 1.7). Эти исследования показали, что белковые молекулы, встроенные в нанодиски, обладают стабильной пространственной структурой и в полной мере сохраняют свою функциональность.

Поверхностно-связанные МБ:
- Цитохромы P450, NADPH-цитохром P450 редуктаза и их комплексы
- Комплекс факторов свертывания крови TF×FVIIa
- Комплекс ZipA-FtsZ отвечающий за деление клеток *E.coli*

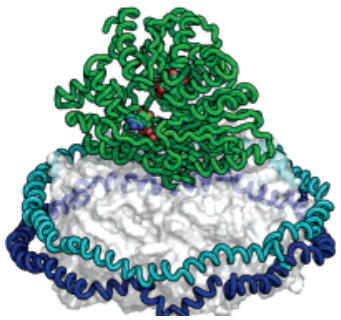
Каналы/Транспортеры:
- Комплекс - транслокон SecYEG
- ABC транспортеры
- Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR)
- K^+-канал KcsA
- Пора токсина сибирской язвы
- β-Бочонки: митохондриальный канал VDAC, OmpX

7TM белки/рецепторы:
- Бактериородопсин
- «зеленый» протеородопсин
- GPCRs (β2AR, родопсин, CCR5, NTS1, mGluR)

Рецепторы:
- Бактериальный хеморецептор Tar
- Рецепторные тирозин киназы EGFR

Мембранные ферменты:
- Моноамин оксидаза A (MAO-A)
- Мембраносвязаная гидрогеназа (MBH)

Другие МБ:
- Тример свето-собирающего комплекса LHCII
- Цитохром *c* оксидаза CytcO
- Гликопротеиновый комплекс тромбоцитов Ib-IX
- Интегрин αIIbβ3
- E. coli FoF1-ATP синтетаза
- Респираторный Комплекс II митохондрий



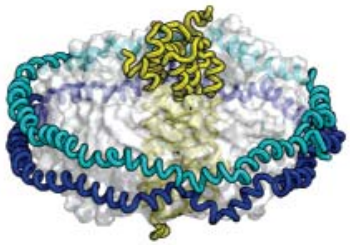


Рис. 1.7. Примеры мембранных белков, успешно встроенных в нанодиски.

Молекула или молекулы белка, встроенные в нанодиск, имеют фиксированное агрегационное состояние и не могут самопроизвольно покидать мембрану нанодиска, что эффективно подавляет нежелательную ассоциацию мембранных молекул и предотвращает распад функционально важных белковых комплексов. Именно это свойство нанодисков позволило на примере β-адренергического рецептора (семейство GPCR) показать, что для активации G-белка достаточно мономера рецептора, а не более крупных олигомеров (димеров, тримеров), присутствующих в природных мембранах [149]. В то же время исследование глутаматных рецепторов (семейство GPCR), инкапсулированных в ЛБН, позволило установить, что для активации рецептора в ответ на действие эндогенного лиганда глутамата требуется димер рецептора [150]. Использование нанодисков также позволило выявить минимальную функциональную единицу бактериального аспартатного хеморецептора (Tar), отвечающего за хемотаксис, который формирует в мембранах клеток мультиолигомерные комплексы. Как оказалось, для трансмембранной передачи сигнала требуется как минимум димер рецептора, однако, активация внутриклеточного каскада киназ, передающего сигнал к двигательному аппарату бактерии, происходит только при участии тримеров из гомодимеров рецептора (3×2×Tar) [151].

Полезной особенностью технологии нанодисков оказывается возможность контролировать микроокружение мембранного белка, и, таким образом, исследовать влияние липидного окружения на структуру и функционирование МБ [148]. Впервые эта возможность была использована при исследовании факторов свёртывания крови, активность которых зависит от фосфолипидного состава [152]. Образование комплекса между фактором свёртывания крови III (TF), который является мембранным белком, и растворимым фактором VIIa (FVIIa) запускает каскад реакций свёртывания крови. Для присоединения FVIIa требуется взаимодействие молекулы анионного фосфолипида и катиона кальция с γ-карбоксиглутаминовой кислотой (Gla) молекулы TF. Анионные фосфолипиды, такие как фосфатидилсерин (PS), образуют большие кластеры (рафты) в участках мембран, связываясь с двухвалентными катионами или положительно заряженными белками. Площадь фосфолипидного слоя в ЛБН в 100 раз меньше, чем площадь бислоя липосом с характерным диаметром 100 нм, что не позволяет молекулам PS образовывать большие кластеры. Использование нанодисков позволило изучить как локальное липидное окружение, содержащее фиксированное количество молекул PS, влияет на протеолитическую активность комплекса TF×FVIIa [152]. В этой же работе было исследован вопрос о том, сколько молекул белка TF, связанного с мембраной, необходимо для полной активации протеазы FVIIa [152].

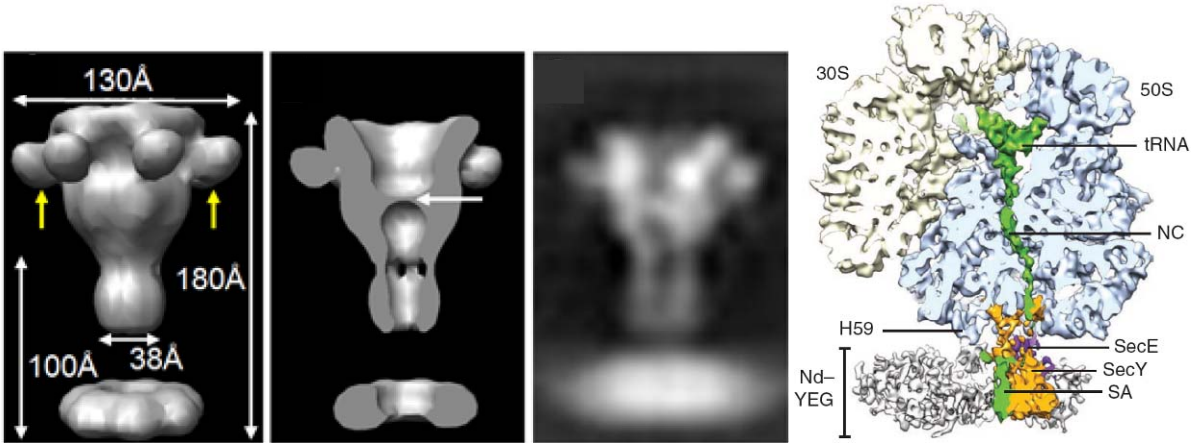


Рис. 1.8. (левая панель) Структура поры токсина сибирской язвы в комплексе с ЛБН по данным криоЭМ. Рисунок взят из работы [153]. (правая панель) Структура комплекса рибосома/SecYEG/ЛБН по данным криоЭМ. Рисунок взят из работы [78].

К настоящему времени (2014 год) в литературе не было описано ни одного примера успешной кристаллизации нанодисков, в том числе содержащих инкапсулированные МБ. По-видимому, кристаллизация подобных частиц невозможна из-за большой подвижности липопротеиновых комплексов. Несмотря на это, липид-белковые нанодиски находят все более широкое применение в области структурной биологии, а именно в исследованиях методами криоэлектронной микроскопии (криоЭМ). Так, в 2010 году этим методом была определена структура поры токсина сибирской язвы в комплексе с ЛБН [153]. На полученных электронных фотографиях и их реконструкции (Рис. 1.8, левая панель, разрешение 22 Å) хорошо видна область, соответствующая нанодиску, содержащему поровый дефект, пронизывающий липидный бислой. Также методом криоЭМ в 2010 году с разрешением 7 Å была установлена структура комплекса рибосомы и транслокона *E.coli* (SecYEG), инкапсулированного в ЛБН (Рис. 1.8, справа) [78]. В полученной структуре наблюдались не только субъединицы рибосомы, компоненты транслокона и нанодиск, но и молекула тРНК, растущая полипептидная цепь (NC) с лидерным пептидом (SA).

Возможные сферы применения технологии нанодисков не ограничиваются областью фундаментальных исследований. В настоящее время проводятся интенсивные исследования возможности применения ЛБН или реконструированных HDL в медицине в качестве носителей мембраносвязанных антигенов или агентов доставки гидрофобных лекарственных препаратов. Так, в 2010 году был опубликован пример возможного использования нанодисков, содержащих инкапсулированный никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR), для ослабления клинических проявлений аутоиммунного заболевания Миастения Гравис, обусловленного формированием антител против этого рецептора [154]. При внутривенном введении комплексов ЛБН/nAChR мышам с моделью Миастения Гравис наблюдалось понижение титра антител против nAChR [154]. Также в литературе описаны примеры использования нанодисков как

носителей для гемагглютинина (HA) вируса гриппа [155] и белка trE из оболочки вируса лихорадки западного Нила [156]. При вакцинации мышей полученными препаратами в первом случае наблюдался иммунный ответ и защита от инфекции, сравнимая с результатами коммерческих субъединичных вакцин против гриппа [155], а во втором случае наблюдался значительно б*о*льший иммунный ответ и б*о*льшая защита от инфицирования, чем при вакцинировании чистым рекомбинантным белком trE [156]. Кроме того, к настоящему времени опубликованы примеры использования незрелых частиц HDL для солюбилизации и доставки ряда гидрофобных лекарственных препаратов, включая антибиотики амфотерцин B и Nosiheptide, противоопухолевые препараты all-*trans*-ретиноевая кислота, Paclitaxel, Aclacinomycin A и др. (см. обзор [157]).

Примеры приведенные выше доказали, что нанодиски являются хорошей средой, имитирующей естественное мембранное окружение мембранных белков и пептидов, и пригодны для структурно-функциональных исследований широкого диапазона этих молекул.

1.4.5 ЛБН в ЯМР-спектроскопии высокого разрешения

К моменту публикации первых результатов по использованию ЛБН, полученных в рамках данной диссертации (2008-2010 годы), в литературе не было описано применение ЛБН для исследования структуры и динамики МБ и МП методами ЯМР высокого разрешения. Именно по результатам работ, проведенных автором, стало понятно, что ЛБН, имеющие размеры до 120 Å, являются перспективной средой для ЯМР-исследований, и инкапсулированные в них белковые/пептидные молекулы в принципе доступны для детальных структурно-динамических исследований методами ЯМР. Проведенные автором исследования (см. п. 2.1, 2.3, 4.3 и 5.1) нашли продолжение в многочисленных работах зарубежных исследователей (см. ниже).

Приведем только несколько примеров подобных работ. Так, в 2010 году среда на основе ЛБН была использована для исследования взаимодействия лиганда MIP-1α (Macrophage inflammatory protein-1α) с CC-хемокиновым рецептором 5 типа (CCR5, семейство GPCR) [158]. Этот рецептор вовлечен в развитие воспалительных реакций и является ко-рецептором для вируса ВИЧ. Лиганды CCR5 (MIP-1α, MIP-1β, и RANTES) ингибируют проникновение ВИЧ в лимфоциты. Структурные исследования CCR5 в мицеллах (например, DDM) были осложнены низкой временной стабильностью препаратов (< 1 ч). Однако, инкапсуляция рецептора в ЛБН позволила получить препараты CCR5 с временной стабильностью превышающей 24 ч. Методами ЯМР-спектроскопии, используя перенос насыщения с рецептора на метильные группы лиганда, был определен интерфейс взаимодействия MIP-1α с рецептором [158].

В 2009 году среды на основе ЛБН были использованы для качественного ЯМР-исследования анионного потенциалозависимого канала VDAC-1 человека (β-бочонок, состоящий из 19 тяжей), отвечающего за транспортировку небольших молекул и ионов через внешнюю мембрану митохондрий [159]. Белок VDAC-1 взаимодействует с анти-апоптозными белками семейства Bcl-2, ингибируя высвобождение апоптозных факторов. По данным электронной микроскопии комплексы VDAC-1/ЛБН состоят из мультимеров канала (в нативных мембранах митохондрий VDAC также формирует мультимеры от димеров до гексамеров). Полученные данные ЯМР показали, что VDAC-1 в комплексе с ЛБН сохраняет нативную пространственную структуру и способность взаимодействовать с NADH [159].

В 2013 году, используя специально сконструированную укороченную последовательность MSP, в нанодисках диаметром 8 нм, содержащих смесь фосфолипидов DMPC/DPMG (3:1), была определена пространственная структура белка OmpX из внешней мембраны *E.coli* (β-бочонок, состоящий из 7 тяжей) [142]. Наиболее удивительным оказалось то, что структура петлевых участков OmpX в ЛБН значительно отличалась от структур, наблюдаемых в мицеллах и кристалле [142]. Вероятно, эти отличия были вызваны денатурирующим действием детергента и силами упаковки в кристалле (crystal packing forces), соответственно. Несмотря на этот успех, использование 8 нм ЛБН не позволило получить спектры спирального МБ бактериородопсина (7TM) с качеством, достаточным для определения пространственной структуры [142]. К настоящему времени (2014 год) задача определения пространственной структуры политопного спирального (состоящего из нескольких ТМ спиралей) МБ в составе мембраны ЛБН так и остается нерешенной.

Следует отметить, что методы ЯМР высокого разрешения также могут применяться и для исследования поверхностносвязанных (неинтегральных) МБ. Так, в 2013 году были опубликованы результаты ЯМР-исследования ГТФазы Rheb (семейство Ras), закрепленной в липидном бислое с помощью остатка Cys, модифицированного жирной кислотой (пренилирование) [160]. В ходе исследования структуры комплекса Rheb/ЛБН с использованием хелатирующих липидов, содержащих связанные парамагнитные катионы Gd^{3+}, было установлено, что ГТФаза имеет две возможные ориентации относительно поверхности мембраны нанодиска. При этом заселенность этих двух состояний меняется в ходе процесса гидролиза ГТФ [160].

По сравнению с мицеллами ЛБН более стабильны в широком диапазоне температур и концентраций, а фрагмент плоской бислойной мембраны в их составе гораздо лучше моделирует биологическую мембрану, чем сферическая и динамически-

подвижная поверхность мицеллы. В отличие от липидных везикул, ЛБН обладают меньшими размерами, что значительно расширяет спектр экспериментальных методик, которые могут быть применены для исследования встроенного белка. При этом размер частиц ЛБН может быть изменен путем выбора другой последовательности MSP или аполипопротеина. Так, при необходимости инкапсуляции больших белковых комплексов, таких, например, как тримеры бактериородопсина [147]), можно воспользоваться удлиненными последовательностями MSP [139]. Напротив, для решения структурных задач методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения можно воспользоваться укороченными последовательностями MSP [142], позволяющими формировать диски диаметром 6-8 нм, что сравнимо с традиционно используемыми в ЯМР-спектроскопии липид/детергентными бицеллами (q<0.5). Возможность использования для формирования ЛБН различных липидов и их смесей открывает перспективы для исследования мембранных белков в практически нативном окружении.

1.5 Антимикробные мембраноактивные пептиды (АП)

Высшие эукариотические организмы живут, в общем, в гармонии с окружающим их множеством патогенных бактерий и микроорганизмов. Роговая оболочка глаза животных почти всегда инфекционно чиста, насекомые выживают без лимфоцитов и антител, а зерна растений прорастают в земле, богатой почвенными микробами. Все это происходит благодаря специальным агентам, – мембраноактивным антимикробным пептидам (АП), которые высшие организмы производят для защиты от патогенов [11]. АП обладают широким спектром действия и составляют основу так называемого врожденного иммунитета [161,162].

При выборе мишени действия для этих пептидов природа, видимо, руководствовалась следующими принципами: (i) для селективной токсичности и широкого спектра действия пептид должен действовать на молекулы, общие для клеток микроорганизмов и в то же время редко встречающиеся у высших эукариот; (ii) для быстрого действия необходимо, чтобы эти молекулы находились на поверхности клеток-мишеней, а не внутри клеток; (iii) для предотвращения возникновения резистентных штаммов-патогенов молекулы-мишени должны участвовать во многих жизненно важных и консервативных процессах у микроорганизмов [11,15]. Очевидно, что всем этим требованиям удовлетворяет липидная клеточная мембрана, она имеет фундаментально различное строение у прокариотической и эукариотической клетки, и эти различия тесно связаны с целым комплексом жизненно важных клеточных процессов таких как преобразование энергии, дыхание, передача сигналов и веществ наружу и внутрь клетки.

Действительно, современные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что антибиотическое действие большинства АП сопряжено не с какими-либо специфическими лиганд-рецепторными взаимодействиями, а связано с неспецифическим разрушающим действием на мембраны клеток-мишеней. Эти данные включают в себя усиление проводимости мембраны в присутствии АП, наблюдаемое на модельных плоских мембранах и в везикулярных системах [163,164], а также прямое наблюдение изменения морфологии клеток при действии на них микромолярных концентраций АП [165,166]. Но наиболее убедительно отсутствие специфических лиганд-рецепторных взаимодействий было продемонстрировано на примере синтетических аналогов натуральных АП. Так, диастереомеры α-спиральных АП, состоящие только из D-аминокислотных остатков, демонстрировали биологическую активность, аналогичную природным L-пептидам, но не подвергались протеолитической деградации [167]. Более того, используя простые представления об интегральных структурных показателях таких как амфифильность, гидрофобность и общий заряд молекулы, было создано *de novo* большое количество АП, обладающих свойствами природных пептидов, но часто содержащих нестандартные (β-, D-) аминокислотные остатки [168,169].

1.5.1 Спектр активности и специфичность действия АП

Выбор липидных мембран в качестве мишеней для АП обуславливает одновременно как сильные, так и слабые стороны их действия: широкий спектр активности и вместе с тем низкую специфичность. Многие АП демонстрируют одновременно антимикробную, фунгицидную, противовирусную, противоопухолевую, иммуномодулирующую и цитотоксическую активности [13]. Причем, если антимикробная активность наблюдается в микромолярном диапазоне концентраций, то цитотоксическая активность против здоровых клеток млекопитающих (например, эритроцитов) наблюдается в диапазоне сотни микромоль – миллимоли.

Приведем несколько примеров: магаинины (magainins), – α-спиральные пептиды из кожи африканской лягушки *Xenopus laevis*, ингибируют рост бактерий, грибов и простейших с MIC в диапазоне 4 – 40 мкМ, в то время как для лизиса эритроцитов млекопитающих необходима концентрация более 400 мкМ [15,167,170]. Циклические β-структурные пептиды из растений семейств *Violaceae* и *Rubiaceae*, – циклотиды (cyclotides), имеют MIC по отношению к некоторым бактериям в диапазоне 0.5 – 10 мкМ, а EC_{50} лизиса эритроцитов млекопитающих для циклотидов равна 400 мкМ [171]. Аналогично, β-структурные тахиплезины (Tachyplesins, изолированные из гемолимфы краба *Tachypleus tridentatus*) имеют MIC по отношению к бактериям и грибам в диапазоне 0.5 – 5 мкМ, а значительная гемолитическая активность наблюдается только при

концентрации 50 мкМ [15,170]. Пептаибол аламетицин-Rf30 (Alm-Rf30, спиральный пептид, выделенный из гриба *Trichoderma viride*) имеет MIC по отношению к патогенным микроорганизмам класса *Mollicutes* (включая микоплазмы и спироплазмы) в диапазоне 0.6 - 6.25 мкМ. В то время как EC_{50} гемолитической активности достигается при концентрации 30 мкМ, а для полного лизиса эритроцитов необходима концентрация 100 мкМ [166,172,173]. Наиболее активные из синтетических *de novo* пептидов имеют MIC по отношению к некоторым патогенным бактериям в диапазоне 1 – 10 мкМ, а гемолитическая активность наблюдается при концентрации 100 мкМ [12,168,169].

Во многих случаях, АП синтезируются организмами в виде смеси как гомологичных, так и структурно различных молекул [174–177], что позволяет обойти проблему низкой специфичности отдельных пептидов. Компоненты смеси, имея различные спектры активности и механизмы действия, синергически усиливают антимикробные свойства друг друга. Это было показано как в случае пептидов млекопитающих [174], так и для пептидов из кожи амфибий [177,178]. Подобное разнообразие пептидов приобретает особую актуальность в случае растений [179], у которых отсутствует система иммунитета, основанная на антителах [180]. Для них природа создала комбинаторное множество антибиотических агентов с невысокой активностью, и отличающейся друг от друга специфичностью. В смеси защитных пептидов обязательно найдется компонент, активный против атакующего в данный момент патогена, а остальные пептиды усилят его действие [180].

Так как же достигается различная специфичность действия АП на клетки микробов и высших организмов? Ключ к пониманию этого феномена кроется в различной организации мембран на молекулярном уровне [15,16]. Между мембранами эукариот и прокариот существуют большие различия. Внешняя поверхность мембраны клетки млекопитающего в основном состоит из электронейтральных, цвиттер-ионных фосфолипидов (фосфатидилхолин (PC), фосфатидилэтаноламин (PE) и сфингомиелин). В то время как цитоплазматические бактериальные мембраны содержат большое количество отрицательно заряженных липидов (фосфатидилглицерол (PG) и кардиолипин (DPG)). Внешняя мембрана грамотрицательных бактерий покрыта липополисахаридом (LPS), представляющим собой полианион. Наличие в мембранах клеток эукариот большого количества стероидных молекул (например, холестерина), стабилизирующих, утолщающих мембрану и меняющих распределение электрического потенциала в ней, вероятно, также защищает клетку от атак АП, являясь важным фактором, необходимым для их избирательного действия [15,16].

Дополнительными факторами, определяющими селективность действия АП, являются наличие большого трансмембранного потенциала (Δφ) и связь систем дыхания и синтеза белка с цитоплазматической мембраной в клетках бактерий [16]. В нормальной клетке млекопитающего Δφ составляет от -90 до -110 мВ, в то время как у бактериальной клетки в фазе логарифмического роста Δφ колеблется от -130 до -150 мВ (потенциал имеет *cis*-положительное направление, то есть внутренняя сторона мембраны заряжена отрицательно относительно наружной) [15,16]. Такое значение трансмембранного потенциала способствует проникновению в гидрофобную часть мембраны пептидов с ненулевым дипольным моментом [163] или несущих положительный заряд [181,182].

Возможно, дополнительными свойствами мембран, определяющими селективность действия на них АП, являются отрицательная или положительная спонтанная кривизна липидов, из которых сформирована мембрана [15,183,184], а также толщина гидрофобного слоя мембраны [184]. Добавление к модельным мембранам PE, PS, или DPG, вносит в них отрицательную кривизну и защищает от действия АП, индуцирующих положительную кривизну, таких как аламетицин и магаинин [15,183–186]. Добавление же к модельным мембранам LPS, наоборот, вносит положительную кривизну и усиливает действие этих пептидов [15,187]. С другой стороны, наличие в мембране, сформированной из PE или PS, отрицательной спонтанной кривизны способствует формированию больших пор в мембране пептаиболом аламетицином [188,189], что, вероятно, влияет и на его биологические свойства. Несовпадение толщины гидрофобного региона мембраны и гидрофобной длины пептида (эффект hydrophobic mismatch) контролирует как положение связанного пептида на мембране (поверхностносвязанное состояние, ТМ состояние, угол наклона) [190], так и определяет величину пор, формируемых пептидом в мембране [191,192].

Таким образом, строение клеточных стенок, состав и физико-химическое состояние мембран определяют селективность АП по отношению к клеткам различных организмов [15,16]. Поэтому, для исследования механизмов активности АП часто применяются модельные мембранные системы как плоские [163,181,182], так и везикулярные [15,164,193,194]. Моделирование бактериальной или животной клетки достигается путем варьирования состава искусственного бислоя. Обычно предполагается, что смесь PE/PG (7:3) хорошо моделирует состав мембраны бактерий, например *E. coli*, а смесь PC/холестерин (7:3) моделирует состав мембраны животной клетки, например эритроцита.

Большинство АП растений и животных представляют собой положительно заряженные молекулы, и поэтому они легко проникают через внешнюю мембрану

грамотрицательных бактерий, дестабилизируя ее путем замещения катионов, связанных с молекулами LPS [195]. В результате на мембране образуются поры и вздутия, что позволяет большому количеству пептидов проникать внутрь к цитоплазматической мембране грамотрицательных бактерий. Этот механизм получил название self-promoting uptake [195]. Положительный заряд пептидов также вызывает их присоединение к анионной цитоплазматической мембране как грамположительных, так и грамотрицательных организмов. Накапливаясь в большом количестве на поверхности бислоя, пептиды либо образуют поры, либо прямо разрушают мембрану, наподобие детергентов [15,165,196]. Дальнейшая деполяризация цитоплазматической мембраны ведет к остановке дыхания и осмотическому лизису бактериальной клетки [16].

Спектр активности АП определяется набором врагов организма-продуцента и средой его обитания [176]. Так, например, АП, синтезируемые грибами, не должны действовать на клетки хозяина, но должны быть активны по отношению к бактериям, простейшим, грибам других видов, а также, возможно, по отношению к клеткам растений и высших животных. Поэтому, АП грибов (например, пептаибол аламетицин) не несут положительного заряда [197], и в своем действии, вероятно, полагаются не на электростатическое узнавание мембран мишеней, а на гидрофобные взаимодействия пептид-мембрана. В то же время эти пептиды используют трансмембранный потенциал как один из факторов для увеличения активности [197].

Некоторые мембраноактивные АП все-таки используют селективные лиганд-рецепторные взаимодействия для повышения специфичности. Эти взаимодействия могут иметь место при начальном связывании с мембраной бактерии и после порообразования и проникновения пептидов в клетку в ходе атаки на внутриклеточные цели [198]. Например, лантибиотик низин (nisin), продуцируемый молочнокислым стрептококком *Streptococcus lactis*, специфически связывается с предшественником клеточной стенки грамположительных бактерий, – липидом-II, и в таком состоянии формирует поры в мембране [199]. Это специфическое связывание делает его активным по отношению к грамположительным бактериям в наномолярном диапазоне концентраций [200].

Отдельные группы АП используют мембранную активность только для проникновения внутрь клетки, а их антибиотическое действие обусловлено связыванием с внутриклеточными мишенями и блокированием клеточного метаболизма [198]. Пептиды могут (i) блокировать синтез клеточной стенки, (ii) связываться с молекулами нуклеиновых кислот (ДНК и РНК, несущими большой отрицательный заряд), останавливая репликацию, транскрипцию и трансляцию белка, а также (iii) выступать в качестве ингибиторов важных ферментативных реакций [13,198].

Система защиты высших позвоночных животных, основанная на АП не существует отдельно, а интегрирована в иммунную систему [161,162]. Отдельные пептиды выполняют в ней как эффекторные функции, так и отвечают за передачу сигналов. Например, β-структурные пептиды дефенсины (defensins) синтезируются в больших количествах в нейтрофилах иммунной системы, эпителиальных клетках и клетках кишечника, участвуя в уничтожении микробов в процессе фагоцитоза и при проникновении патогенов через кожные покровы внутрь организма. С другой стороны, как β-структурные так и α-спиральные АП обладают значительной активностью против различных эндотоксинов бактерий. Например, пептид LL-37 человека блокирует выделение цитокинов в ответ на присутствие компонентов бактериальных мембран, таких как LPS, существенно уменьшая вероятность возникновения сепсиса [195,201]. Интересно, что действие подобных пептидов обусловлено не прямыми взаимодействиями с LPS, а передается через комплекс клеточных рецепторов, позволяя АП иммунной системы выступать в качестве хемоаттрактантов для нейтрофилов, моноцитов, тучных клеток и Т-хелперов, и напрямую регулировать экспрессию различных белков этими клетками [201].

1.5.2 Структура АП и модели их мембранной активности

Простая классификация АП по типам структур невозможна, хотя их условно можно разделить на несколько структурных классов [13,14]. Структура типичных представителей этих классов показана на рисунке 1.9, а сами классы перечислены ниже.

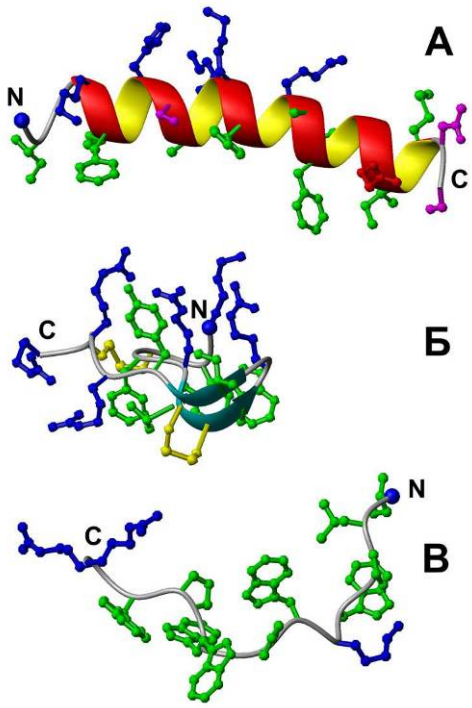


Рис. 1.9 Структуры представителей различных классов АП. А – α-спиральный магаинин [202]. Б – β-структурный тахиплезин [203]. В – вытянутый индолицидин [204].

Основная цепь пептидов показана в ленточном представлении. Положительно заряженные остатки показаны синим цветом, отрицательно заряженные – красным, полярные – фиолетовым, гидрофобные – зеленым, цистеины – желтым.

N- и *C*-концы пептидов подписаны. *C*-концы пептидов амидированы и не несут отрицательного заряда. Положительный заряд на *N*-концах пептидов показан синим шаром.

1. Линейные молекулы, принимающие конформацию амфифильной α-спирали в присутствии мембраны. Например: магаинины (magainins) и дермасептины (dermaseptins) из кожи амфибий, цекропины (cecropins) из гемолимфы насекомых и аналогичные им пептиды свиньи (цекропин-P1) и человека (LL-37), пептаиболы (peptaibols) грибов.
2. β-Структурные пептиды, стабилизированные дисульфидными связями, эти молекулы могут также включать в себя α-спиральные регионы. Например: дефенсины (defensins) растений, насекомых и млекопитающих (включая приматов и человека), тионины (thionins) и циклотиды (cyclotides) растений, тахиплезины (tachyplesins) ракообразных, протегрины (protegrins) из лейкоцитов свиньи.
3. Вытянутые пептиды, содержащие большое количество определенных аминокислотных остатков (Pro, Trp, Arg, His и т.д.) и не формирующие классических элементов вторичной структуры. Например, индолицидин (indolicidin) из нейтрофилов быка.

Все это многообразие пептидов имеет одну общую структурную особенность, (обусловленную выбором клеточной мембраны в качестве мишени для действия): все эти молекулы в активной конформации амфифильны. Это означает, что в присутствии мембраны АП образуют структуру, в которой заряженные (полярные) и гидрофобные группы пространственно разделены [13,14].

В настоящее время существует две основных модели, объясняющие мембранное действие АП (Рис. 1.10). Первая модель, – образование пор из связки мономеров (barrel stave model (BS модель)), была выдвинута еще в 70-е годы для описания структур больших клеточных ионных каналов и каналов, образованных пептидами, например, аламетицином [205,206]. Вторая модель, – ковровая модель (carpet model) или модель тороидальных пор (toroidal-pore model), была предложена одновременно тремя коллективами авторов в конце 90-х годов для описания действия катионных АП, таких как магаинин, дермасептин и цекропин [15,183,207]. И хотя обе модели изначально выдвинуты для описания действия α-спиральных пептидов, они могут быть обобщены и на пептиды других структурных классов [15,183].

В рамках обеих моделей действие АП состоит из несколько этапов. На первом этапе (Рис. 1.10) пептиды, находясь в растворе, окружающем клетку, связываются с поверхностью ее мембраны под действием электростатических и гидрофобных взаимодействий. Часто (например, в случае α-спиральных пептидов) молекулы АП не имеют фиксированной конформации в растворе, и сближение с мембраной структурирует их, приводя к замыканию водородных связей и экспонированию гидрофобных регионов [12,15], что вносит дополнительный вклад в энтальпию связывания. β-Структурные

пептиды обычно стабилизированы дисульфидными связями и имеют жесткую структуру основной цепи, которая в большинстве случаев не меняется при связывании с мембраной [13,14]. Однако, некоторые β-структурные пептиды, например, тахиплезин [203], вероятно, претерпевают значительные изменения конформации как основной, так и боковых цепей в ходе этого процесса.

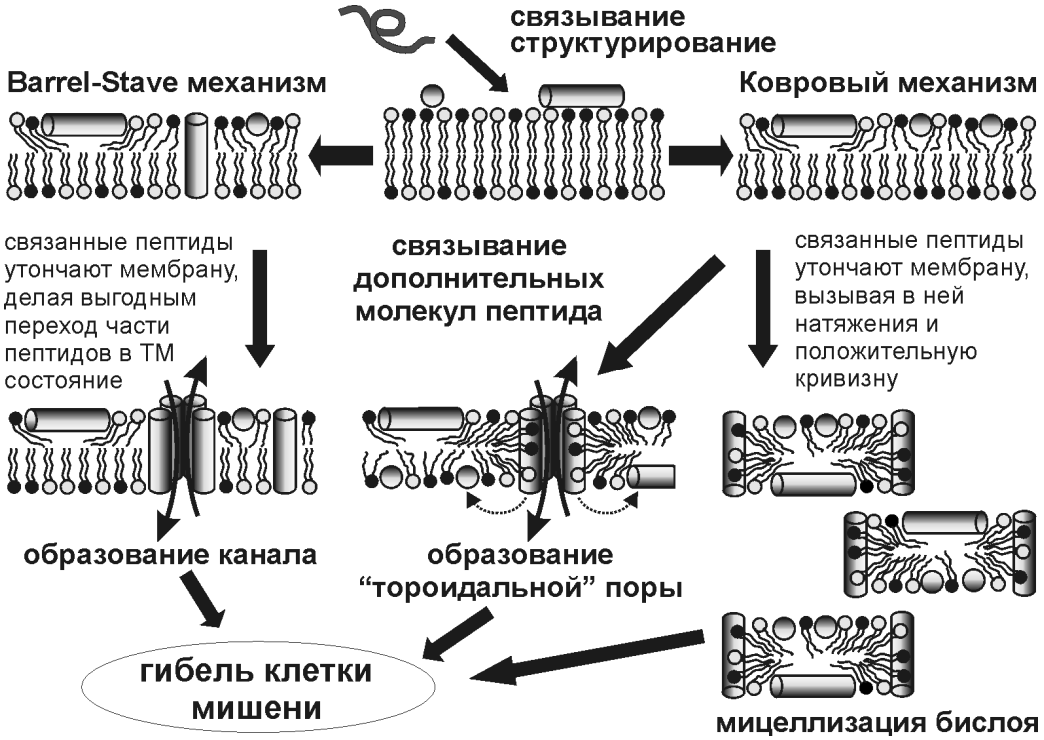


Рис. 1.10. Модели, описывающие мембранную активность АП на примере спирального пептида (показан в виде амфифильного цилиндра).

Далее, на втором этапе, в рамках обеих моделей происходит порообразование (Рис. 1.10). Пептиды, связанные на поверхности бислоя, расталкивают полярные головки липидов, что вносит в наружный монослой положительную спонтанную кривизну [15] и из-за сохранения общего объема липидных молекул и роста площади поверхности ведет к утончению мембраны [183,184,208].

Для пептидов, действующих по BS-механизму, утончение мембраны и другие факторы (наличие трансмембранного потенциала и дипольного момента у молекулы пептида, общая гидрофобность пептидной молекулы) приводит к переходу части пептидов в ТМ состояние. При присоединении все большего числа пептидов к поверхности толщина мембраны продолжает уменьшаться, и все больше пептидов оказываются погруженными в мембрану (Рис. 1.10) [209]. Процесс перехода пептидов в ТМ состояние носит кооперативный характер, он начинается при достижении критической концентрации связанных пептидов (P_B:L* ~ 1:400 – 1:40, для аламетицина в мембранах различного состава) и практически полностью завершается при увеличении концентрации (P_B:L ~ 1:20, в случае аламетицина). Это приводит к характерной

сигмоидальной зависимости активности пептидов от концентрации. Пептиды в ТМ состоянии также оказывают влияние на толщину мембраны (эффект hydrophobic matching), подгоняя ее под гидрофобную длину пептида [190], а сам переход при P_B:L* начинается при совпадении энергии поверхностносвязанного пептида и ТМ пептида при достижении определенной толщины мембраны [209]. Затем трансмембранные молекулы пептидов агрегируют и формируют каналы таким образом, что полярные стороны пептидов образуют пору, а гидрофобные стороны контактируют друг с другом и с молекулами липидов (Рис. 1.10), при этом возникают пептид-пептидные и пептид-липидные взаимодействия, стабилизирующие канал [163,205,206,210]. Для образования каналов достаточно небольшой доли ТМ пептидов [196], и активное порообразование начинается задолго до достижения критической концентрации P_B:L*. Образованные каналы могут в дальнейшем увеличиваться путем присоединения дополнительных мономеров к связке пептидов [163,205,206,210].

Согласно ковровой модели (Рис. 1.10) пептиды также связываются на поверхности мембраны, утончают ее и вносят положительную кривизну [15,183]. Однако пептиды из-за большого заряда не могут встраиваться в гидрофобную часть мембраны и принять ТМ ориентацию. И при достижении критической концентрации P_B:L* (для магаинина в мембранах из PG ~ 1:100 [15], в мембранах из PS или PC ~ 1:30 [196,211]) в мембране начинают образовываться тороидальные поры. Стенки этих пор образованы как молекулами пептида, так и полярными головками липидов, завернутыми из наружного и внутреннего монослоев мембраны (Рис. 1.10). Таким образом, пептиды практически не контактируют друг с другом и остаются всегда связанными с полярными головками липидов [15,183,196]. Такие поры имеют короткие времена жизни и позволяют липидам перетекать из одного монослоя мембраны в другой (lipid flip-flop) [15]. При распаде подобной поры часть пептидов оказывается на внутреннем монослое, что обуславливает перенос пептидов через мембрану. Эта модель получила название ковровой модели, так как для дестабилизации мембраны и начала порообразования необходима большая концентрация поверхностносвязанных пептидов, при этом пептиды покрывают поверхность мембраны своеобразным ковром [207].

Причиной гибели клетки-мишени (в обеих моделях) может быть как само порообразование, ведущее к осмотическому лизису, так и мицеллизация бислоя при присоединении большого количества пептидов [15,207]. Причем селективность действия пептидов может проявляться на разных этапах как при селективном присоединении к мембранам мишеням, так и при селективном порообразовании в определенных условиях. В случае некоторых пептидов описанные выше механизмы не ведут к гибели клетки, а

необходимы лишь только для проникновения молекул АП через мембрану. Смерть клетки наступает в ходе атаки на внутриклеточные цели [11,198].

Две приведенные модели не являются взаимоисключающими, некоторые пептиды действуют в рамках различных моделей в зависимости от состава мембраны. Например, меллитин (mellitin, литический пептид из яда пчел) в нейтральных мембранах, видимо, действует согласно BS-модели, а в анионных мембранах согласно ковровой модели [169,212]. Магаинин в мембранах, составленных из PG, образует тороидальные поры при P:L ~ 1:100, но мицеллизирует везикулы, составленные из PS, без порообразования при P:L ~ 1:30 [15]. Следует отметить, что мицеллизация бислоя – механизм, свойственный детергентам, например, Тритон X-100, или октилглюкозид также мицеллизируют мембраны при соотношении D:L ~ 1:30 [196].

Пептиды, действующие согласно двум приведенным моделям, имеют значительные структурные и функциональные отличия:

1. Для действия по BS-механизму пептид должен быть амфифильным, гидрофобным и иметь небольшой заряд (для предотвращения сильного отталкивания в связке), а длина молекулы должна быть достаточна для того, что бы пронизать гидрофобную часть мембраны (около 20 остатков – спираль, 8 остатков – β-структура). Напротив, для действия по ковровому механизму на структуру пептида не налагается практически никаких ограничений. Пептид может иметь большой заряд и маленькую гидрофобность, и не обладать классической вторичной структурой с выраженной амфифильностью. Длина пептида для образования тороидальных пор должна быть не меньше толщины гидрофобного региона мембраны, а для мицеллизации бислоя может быть и много меньше [165,196,207,213].
2. Гидрофобные пептиды, действующие по BS-механизму, обычно более активны (порообразование начинается за долго до достижения P_B:L*) и часто обладают меньшей специфичностью по отношению к различным клеткам и модельным мембранам. Они связываются с цвиттер-ионными мембранами (PC) с гораздо большей активностью, чем пептиды, действующие по ковровому механизму [15,169,214]. Например, меллитин связывается с мембранами из PC с константой $4.5*10^4$ M^{-1}, а магаинин с константой 55 M^{-1}. Исключением из этого правила являются, например, кератотоксины (ceratotoxins), обладающие явной специфичностью, но действующие по BS-механизму [215].
3. Пептиды, действующие по ковровому механизму, связываются с полярными головками липидов и не проникают в гидрофобный регион бислоя. Из-за того, что в порообразовании участвует лишь небольшая доля связанных пептидов, а при

повышении концентрации пептида наступает мицеллизация и разрушение бислоя, результаты структурных исследований обычно указывают на поверхностносвязанное состояние пептида, а TM состояние не детектируется [15,196]. Наоборот, в случае пептидов, действующих по BS механизму, структурные методы часто детектируют TM состояние пептидов и взаимодействие с гидрофобным регионом мембраны, например, для пептаиболов аламетицина и зервамицина [216].

4. Встраивание пептидов в гидрофобную часть мембраны и последующая олигомеризация – необходимые этапы в BS модели, и поэтому изотерма адсорбции для подобных пептидов имеет вид двух линейных участков. Первый участок (до P_B:L*) соответствует начальному связыванию пептидов, а второй – последующему кооперативному связыванию с большей константой, вызванной эффективным отводом мономеров из поверхностно-связанного состояния в TM состояние и последующей их олигомеризацией [196]. С другой стороны, для образования ковра на мембране олигомеризация не является необходимым условием, и для подобных АП изотерма связывания практически линейна [196], а структурные методы указывают на наличие небольших олигомеров, например, димеров в случае магаинина [217].
5. Различие в строении пор для АП, действующих по разным механизмам, можно наблюдать как прямыми методами, так и косвенно, анализируя проводимость, вызванную пептидом, через модельные мембраны. Пора аламетицина, наблюдаемая методом рассеяния нейтронов в ориентированных мембранах из DLPC (или DPhPC), имеет внутренний диаметр 18 Å (26 Å) и наружный диаметр 40 Å (50 Å), что соответствует толщине стенки поры ~ 11 Å и примерно совпадает с диаметром α-спирали [218]. В случае же магаинина пора имеет внутренний диаметр ~ 37 Å, при внешнем диаметре ~ 71 Å, что соответствует толщине стенки в 17 Å и значительно больше диаметра спирали пептида [219]. Эти данные согласуются с данными по проводимости в везикулярных и плоских мембранных системах [15,163,181]. В экспериментах на плоских мембранах тороидальные поры имеют короткое время жизни, очень зашумлены и не обладают четко выраженными уровнями проводимости (результаты экспериментов зачастую невоспроизводимы) [15,163,181]. В то же время, BS-каналы обладают четко выраженной многоуровневой структурой проводимости и долгим временем жизни, причем проводимость уровней возрастает в геометрической прогрессии, что соответствует последовательному присоединению мономеров к связке [163,220]. Ионная селективность тороидальных пор определяется как расположением зарядов на молекуле пептида, так и зарядами полярных групп

липидов, участвующих в образовании стенок поры [221]. В случае канала, составленного из связки мономеров, ионная селективность определяется только свойствами самих пептидов [222].

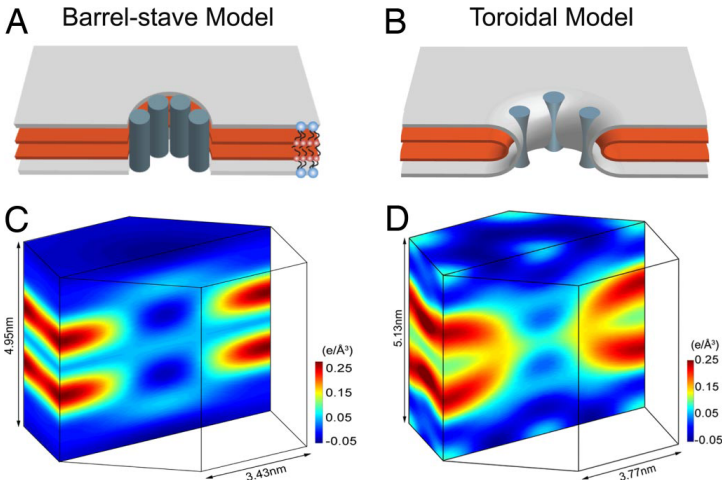
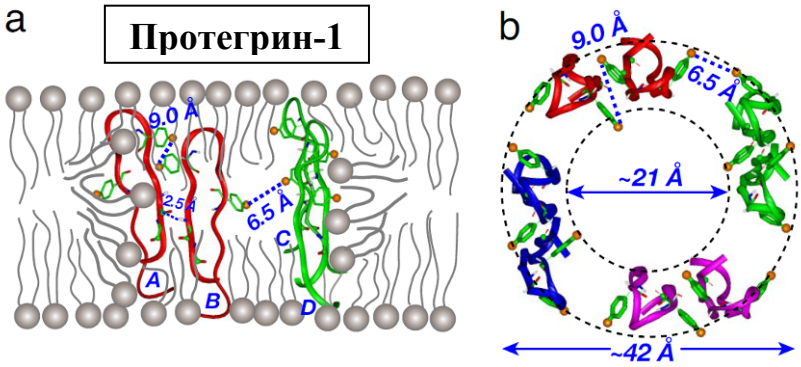


Рис. 1.11. Различие в строении пор сформированных пептидами, действующими по разным механизмам. Аламетицин – BS-модель. Фрагмент белка BAX – ковровый механизм (тороидальные поры). Данные получены методом дифракции рентгеновских лучей на мембранах, содержащих Br-меченые липиды.
Рисунок взят из [223].



Строение тороидальной поры протегрина-1 в липидном бислое по данным ЯМР твердого тела [224].

Различие в строении пор для пептидов, действующих по разным механизмам, было напрямую продемонстрировано с использованием метода дифракции рентгеновских лучей на мембранах, содержащих Br-меченые липиды (Рис. 1.11). Для пор образованных аламетицином (BS-модель) в экспериментах наблюдалось два монослоя липидов, окружающих круглый дефект в мембране диаметром ~ 4 нм [225]. В тоже время, вблизи от поры, образованной спиральным фрагментом белка BAX из внешней мембраны митохондрий, наблюдался плавный переход наружного и внутреннего монослоя липидов друг в друга, что напрямую указывало на формирование пептид-липидной (тороидальной) поры в мембране [223]. Кроме того, тороидальные поры сформированные димерами АП протегрина-1 из нейтрофилов свиньи, имеющего структуру β-шпильки, были охарактеризованы методом ЯМР твердого тела в липидном бислое [224] (Рис. 1.11).

1.5.3 Структурно-функциональные зависимости на примере спиральных АП

В настоящее время (2014 год) известны последовательности более 2000 антимикробных пептидов. Многие из них собраны в специальной базе данных (APD http://aps.unmc.edu/AP/main.php) [226]. Анализ этого множества пептидов с целью

выявления структурно-функциональных зависимостей чрезвычайно осложнен отсутствием структурных данных с атомным разрешением (в настоящее время известны структуры только около 300 АП). Однако, в случае α-спиральных пептидов из-за ограничений, накладываемых на структуру спиральной конформацией, можно оценить основные структурные параметры пептида, исходя только из первичной последовательности. Это позволило нескольким группам исследователей выявить структурно-функциональные зависимости в подобных АП на основании предположения об идеальной α-спиральной геометрии пептида. С этой целью были проведены исследования нескольких классов модельных пептидов: аналогов магаинина [227,228], модельных пептидов “KLA”, состоящих только из остатков Lys, Leu и Ala [221,227,229], а также группы пептидов, созданных *de novo* на основании анализа последовательностей природных АП [12,168,230]. В результате этих и других исследований, проведенных как в биологических тестах (антибактериальная, фунгицидная и гемолитическая активность), так и на модельных мембранах (везикулы, сформированные из цвиттер-ионных и отрицательно заряженных липидов), была выявлена зависимость активности и специфичности действия пептидов от интегральных структурных факторов таких как заряд, гидрофобность, амфифильность. Следует отметить, что эти факторы не являются независимыми величинами, и изменение одного из них ведет к изменению других [227]. Более того, эти факторы могут по-разному влиять на разные этапы действия АП. Так, начальное связывание катионных пептидов, действующих по ковровому механизму, с липидным бислоем определяется электростатическими взаимодействиями, и в 50 раз более эффективно в случае отрицательно заряженной мембраны [169,229]. Разрушение целостности бислоя этими поверхностносвязанными пептидами наоборот в основном определяется гидрофобными взаимодействиями, и происходит примерно в 10 раз эффективней в случае цвиттер-ионных мембран [229]. В результате, активность и специфичность действия АП определяется тонким балансом между ниже перечисленными факторами (Рис. 1.12) [168,227–229].

*Спиральность пептида (**α**).* Этот параметр, напрямую определяющий функциональные свойства молекулы, может быть экспериментально измерен в мембранном окружении, например, методом КД. Для оптимального связывания с мембраной (увеличения энтальпии этого процесса) пептид не должен обладать спиральной конформацией в водном окружении, но должен формировать спираль, разделяющую полярные и гидрофобные участки на его поверхности, в мембранном окружении [12]. Увеличение спиральности пептида (обычно увеличивающее его амфифильность) ведет к усилению его антибактериальных свойств и гемолитической

активности, а также к усилению его активности на модельных мембранах. Активность против незаряженных мембран (и мембран эритроцитов) растет сильнее, что приводит к понижению селективности [165,168,214,227,230]. Уменьшение спиральности с помощью введения остатков Pro или D-остатков уменьшает активность пептида и приводит к росту селективности [165,168,214,227,230]. Дальнейшее уменьшение спиральности путем одновременного введения двух остатков Pro ведет к полной потере активности [230]. Однако, в некоторых случаях изгибы и шарнирные регионы в спирали, образованные остатками Pro и Gly, необычайно важны для функционирования АП, например, в случае аламетицина и меллитина [163,173,231].

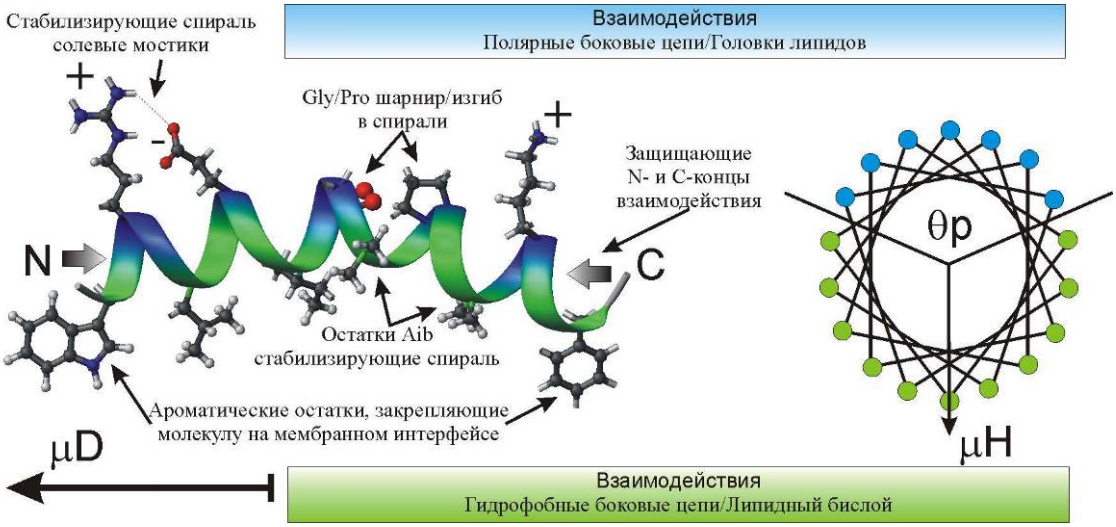


Рис. 1.12. Схематическое изображение факторов, ответственных за стабильность и активность спиральных АП.

*Длина пептида (**L**)* является важным параметром, определяющим его активность. Природные спиральные пептиды имеют длину от 18 остатков [12]. Для пептидов, образующих поры (BS или тороидальные), укорочение длины спирали до 16 остатков ведет к практически полной инактивации и зачастую к ускорению кинетики порообразования. Это было показано для пептаиболов [232], синтетических Aib-содержащих пептидов [233], магаининов [234] и дермасептинов [177]. В то же время пептиды, мицеллизирующие бислойную мембрану, активны и при длине спирали в 13-14 остатков [168].

*Заряд (**Q**)* пептида обуславливает силу взаимодействия пептида с заряженными бактериальными мембранами. В природных АП **Q** имеет распределение от –4 до +10 с максимумом при значении +3 (база данных APD). Исследование аналогов магаинина показало, что максимум антибактериальной активности и селективности достигается при **Q** = +5, а при дальнейшем росте заряда до +7 возрастает гемолитическая активность и пропадает специфичность. Однако уменьшение гидрофобности пептида позволило восстановить селективность действия АП с **Q** = +7 [228]. Исследования другой группы

авторов указывают на то, что максимум антибактериальной и гемолитической активности достигается при **Q** = +9, а незаряженные пептиды практически неактивны [168].

*Дипольный момент (**μD**)* определяет силу взаимодействия пептида с внешним электрическим полем, например, трансмембранным потенциалом. Этот параметр важен для действия потенциалозависимых пептидов, например, пептаиболов [163,197,235]. Для α-спирали, состоящей из 20 остатков, **μD ,** возникающий как сумма моментов отдельных пептидных связей, примерно равен 63 D (что соответствует зарядам в *+½e* и *-½e* на *N*- и *C*-конце спирали) [163].

*Гидрофобность (**H**)* и *гидрофобность неполярной стороны спирали (**Hd**)* качественные величины, характеризующие взаимодействие пептида с гидрофобным регионом мембраны. Природные АП обычно содержат от 30% до 70% гидрофобных остатков с максимумом в 50% [12]. Количественно эти величины могут быть рассчитаны, исходя из шкал гидрофобности для различных остатков [163,168,236]. С теоретической точки зрения АП должен обладать гидрофобностью для эффективного взаимодействия с липидными мембранами и одновременно с этим должен быть водорастворимым для хранения в клетке и быстрого переноса к поверхности бактерии-мишени [227]. Как показали исследования на модельных пептидах, увеличение гидрофобности в большей степени усиливает сродство пептида к цвиттер-ионным мембранам, тем самым, увеличивая гемолитическую активность и уменьшая специфичность [227]. Причем, рост активности против нейтральных мембран возникает преимущественно из-за увеличения эффективности начального связывания пептида, а эффективность разрушения мембраны связанными пептидами меняется мало [229]. В случае заряженных мембран увеличение **H** также вызывает усиление начального связывания, но в меньшей степени [229]. В то же время значительное уменьшение **H** приводит к инактивации пептида [168].

Амфифильность пептида для молекулы в конформации идеальной α-спирали может быть рассчитана в виде гидрофобного момента (**μH**), исходя из шкал гидрофобности [163,168,236]. При использовании шкалы, в которой полностью амфифильный пептид (18 остатков), состоящий только из Asp и Ile, имеет **μH** = 1, природные спиральные пептиды демонстрируют **μH** в диапазоне 0.2 – 0.6 с максимумом в значении 0.4 [168]. Исследования на модельных пептидах показали, что сильное уменьшение амфифильности пептида ведет к его инактивации, а сильное увеличение **μH** увеличивает сродство пептида к цвиттер-ионным мембранам и увеличивает гемолитическую активность, уменьшая специфичность аналогично параметру **H** [168,227,229].

*Полярный угол (**θp**)* – еще одна величина, характеризующая отношение между полярной и неполярной поверхностью пептида. Для спиральной молекулы **θp** определяет площадь полярной стороны спирали (Рис. 1.12). Природные АП демонстрируют различные значения этого параметра от 80^0 до 200^0 [12]. От **θp** зависит кривизна, вносимая пептидом в мембрану, и, соответственно, механизм дестабилизации бислоя. Исследование двух модельных пептидов, имеющих одинаковые значения **L**, **Q**, **H** и **μH**, но отличающихся по **θp** (100^0 и 180^0), показало, что пептид с меньшим **θp** хоть и обладает меньшим сродством к мембране, но демонстрирует большую активность как на модельных отрицательно заряженных мембранах, так и против бактерий [221]. Этот пептид формировал поры с более быстрой кинетикой, увеличивая тем самым скорость перемещения липидов и пептида между монослоями мембраны. Поры, образованные пептидом с **θp** = 100^0, имели меньший диаметр (20 – 30Å), и в их формировании участвовало большее количество липидов и меньшее количество пептидов, что обусловливало их катионную селективность, чем в порах, сформированных из пептида с **θp** = 180^0 (диаметр 30 – 40Å) [221]. Полученные данные находятся в полном соответствии с геометрической интерпретацией формирования тороидальных пор. Более позднее исследование [229] на пяти модельных пептидах (**θp** – 80^0, 100^0, 120^0, 140^0, 160^0, 180^0) подтвердило полученные выводы. Уменьшение **θp** вело к уменьшению сродства к цвиттер-ионным мембранам, но увеличивало эффективность разрушения мембраны, таким образом, не меняя общей активности. В случае же отрицательно заряженных мембран уменьшение **θp** не меняло эффективности связывания, но значительно увеличивало эффективность разрушения мембраны, таким образом, увеличивая специфичность [229]. Уменьшение **θp** < 80^0 может приводить к изменению механизма работы пептида, в этом случае катионные пептиды вносят отрицательную кривизну в мембрану (L-пептиды) и вызывают слияние липосом [227]. Пептиды с маленьким зарядом и маленьким **θp**, вероятно, действуют по BS механизму [213,227].

Суммируя все вышесказанное, можно сделать вывод, что наибольшая активность наблюдается у структурированных α-спиральных пептидов с большим зарядом и большой амфифильностью, однако, увеличение этих параметров ведет к росту гемолитической активности и падению специфичности.

В большинстве случаев пространственную структуру АП невозможно охарактеризовать, исходя из первичной последовательности. Например, полярные регионы в спиральных молекулах могут определяться не полярными боковыми цепями, а экспонированными группами основной цепи (CO или HN) [237,238] как, например, для Pro содержащих спиралей пептаиболов [163]. Поэтому для анализа структурных свойств

АП необходимо знание пространственной структуры. По известной структуре можно рассчитать электростатический потенциал [239] и потенциал молекулярной гидрофобности (МНР) [240] на поверхности пептида.[1] Ситуация еще более усложняется, если принять во внимание динамические свойства липидного бислоя и молекул пептидов. Во многих случаях очень важную роль в активности АП играют селективные пептид-пептидные и пептид-липидные взаимодействия, например, образование олигомеров или надмолекулярных структур [15,183] и внутренняя динамика пептидных молекул [231,241].

1.5.4 Перспективы использования АП

В последнее время интерес к АП возрос из-за возможности их использования в терапии заболеваний, вызванных патогенными микроорганизмами, резистентными к "классическим" антибиотикам, а также из-за их противовирусных и противоопухолевых свойств. Некоторые природные пептиды и их синтетические аналоги проходят циклы клинических испытаний в качестве местных антибиотиков и противовирусных агентов [242,243], а использование других представляется перспективным в противоопухолевой терапии [244]. Интерес к АП как к антибиотическим агентам подогревается еще и тем, что они в своем действии используют фундаментальное различие между клетками прокариот и эукариот, и возникновение к ним резистентности маловероятно [11].

Тем не менее существуют патогенные штаммы, выработавшие механизмы защиты против действия некоторых классов АП [16,245]. Эти механизмы включают в себя как изменение свойств цитоплазматической мембраны (заряд поверхности, текучесть, трансмембранный потенциал), так и отвод пептидов или их разрушение с помощью специальных молекулярных транспортеров или специфических протеаз [16,245]. Однако, эти механизмы не могут обеспечить защиту против всего комбинаторного множества АП, синтезируемых в природе, и синтетических пептидов, созданных человеком. Как показывают исследования, использование смеси АП в качестве антибиотических агентов значительно повышает антимикробную активность и специфичность действия пептидов [170], что может дать ключ к решению проблемы резистентности. Более того, АП (даже с пониженной активностью) демонстрируют значительный синергизм действия с обычными антибиотиками, помогая им проникать через мембраны бактериальных клеток [230]. АП млекопитающих, играющие роль иммуномодуляторов в "обычной" адаптивной иммунной системе, вероятно, могут быть использованы для усиления собственного иммунного ответа организма и как лекарства, противодействующие сепсису, вызванному

[1] Следует отметить, что МНР не является потенциалом в прямом смысле этого слова, а только качественно характеризует свойства поверхности молекулы.

бактериальными эндотоксинами, возникающему у человека при интенсивном лечении β-лактамными антибиотиками [195,201].

АП растений и животных являются продуктами посттрансляционной модификации белков-предшественников, в виде которых они накапливаются и хранятся. Накопление значительных количеств пептидов-предшественников позволяет в случае появления патогенных микробов очень быстро отразить инфекционную атаку [11]. Некоторые механизмы посттрансляционных модификаций уникальны и приводят, например, к образованию циклических пептидов, открытых сравнительно недавно в приматах (θ-defensin) [246] и растениях (группа пептидов циклотидов) [175]. Однако, в общем и целом, АП растений и животных – это продукты обычного рибосомального синтеза, что предполагает блестящие перспективы для их использования в защите сельскохозяйственных растений от вредителей и патогенов путем создания трансгенных культур, экспрессирующих АП, безопасные для человека [247].

В этом отношении мембраноактивные антибиотики, продуцируемые грибами и бактериями являются уникальными, многие из них – продукты нерибосомального синтеза, и продуцируются в организмах большими ферментативными комплексами – нерибосомальными пептидными синтетазами (NRPS) [248]. (Двум таким пептидам пептаиболам антиамебину I (Aam-I) и зервамицину IIB (Zrv-IIB), продуцируемым грибами рода *Emericellopsis* посвящена глава 4 данной диссертационной работы.) Тем не менее, несмотря на различные структурные подходы, использованные природой при создании антибиотических пептидов грибов, растений и животных (вероятно, обусловленные разным набором атакующих патогенов), все они имеют сходный механизм антибиотического действия, – неспецифическое разрушение мембран клеток-мишеней [197] (Рис. 1.10), и обладают специфичностью по отношению к различным типам клеток [197]. Это позволяет рассматривать пептиды грибов и бактерий в общем контексте АП. Достигнутые в последнее время успехи в клонировании генов и исследованиях NRPS [249], демонстрируют возможные перспективы использования этих молекул в биотехнологии и открывают возможности для создания новых антибиотиков методами генной инженерии.

1.6 Структурная организация и молекулярные механизмы работы потенциалозависимых K^+-каналов

1.6.1 Катионные каналы суперсемейства P-loop

Потенциалозависимые катионные (Na^+, Ca^{2+}, K^+) каналы (Kv, Nav, Cav каналы), а также Ca^{2+}- и цАМФ-активируемые катионные каналы формируют большое семейство

белков со схожим строением и функциями (суперсемейство P-loop каналов) [250]. Эти белки состоят из четырех субъединиц (или из четырех ковалентно связанных псевдосубъединиц в рамках одной слитной полипептидной цепи (α-субъединица Ca^{2+}- и Na^{+}-каналов), симметрично окружающих центральную ионопроводящую пору (Рис. 1.13, 1.14A и 5.1). Иногда для выполнения каналом его физиологической функции необходимы вспомогательные субъединицы (так называемые β-субъединицы), которые связываются с основным ионопроводящим комплексом (α-субъединицей) и модифицируют электрофизиологические свойства канала.

Каналы семейства P-loop участвуют во многих жизненно-необходимых клеточных процессах, включая регуляцию осмотического баланса, возбудимость мембран, передачу нервного импульса [250], и присутствуют в клетках различных организмов – от бактерий и архей до человека [251]. В геноме человека закодировано 143 белка этого семейства [252]. Наибольшее структурно-функциональное разнообразие характерно для K^{+}-каналов (по сравнению с Ca^{2+}- и Na^{+}-каналами), только у млекопитающих обнаружено более 80 генов, кодирующих различные субъединицы K^{+}-каналов [250]. K^{+}-каналы присутствуют в клетках практически всех типов и выполняют в каждом случае отдельную функцию. В то же время разнообразие Ca^{2+}- и Na^{+}-каналов не велико, так, в геноме человека были картированы только 9 генов, кодирующих различные типы потенциалозависимых Na^{+}-каналов (Nav1.1–Nav1.9) [250].

1.6.1.1 Модульное строение каналов суперсемейства P-loop

На основании анализа аминокислотных последовательностей был сделан вывод, что в большинстве каналов суперсемейства P-loop каждая из субъединиц (или псевдосубъединиц в составе α-субъединицы Ca^{2+}- и Na^{+}-каналов) состоит из шести ТМ спиральных сегментов (S1–S6). В свою очередь каждую субъединицу можно разделить на два домена – поровый домен, включающий спирали S5, S6 и последовательность селективного фильтра (P-петлю), и потенциалочувствительный или вольт-сенсорный домен (ПЧД или VSD), состоящий из четырех спиралей (S1-S4). Иногда внутриклеточные *N*- и *C*-концевые последовательности субъединиц выполняют важную функцию. Например, они могут отвечать за быструю инактивацию канала, играть вспомогательную роль при тетрамеризации субъединиц и стабилизации канала, выполнять регуляторную функцию в Ca^{2+}- и цАМФ-зависимых каналах. Строение отдельных субъединиц Nav, Cav, и Kv каналов и их пространственная организация в клеточной мембране показаны на Рис. 1.13, 1.14A и 5.1.

Отдельный поровый домен был впервые идентифицирован в гене K^{+}-канала с аномальной проводимостью (Kir) [253]. Строение этого канала соответствует

изолированной поре (без ПЧД) потенциалозависимых каналов (2TM архитектура). Интенсивное изучение структуры и функций ионопроводящей поры катионных каналов на протяжении последних десяти лет позволило получить обширную информацию о механизмах транспорта ионов и селективности. Первым каналом, для которого была определена кристаллическая структура с высоким разрешением, был бактериальный pH-зависимый K^+-канал KcsA из *Streptomyces lividans* [254], который также имеет 2TM архитектуру. Структурные особенности, характерные для KcsA, являются общими в строении поры всех катионных каналов. Гомо- или гетеро-тетрамеризация сегментов S5–S6 4-х субъединиц (или псевдосубъединиц в составе α-субъединицы, Рис. 5.1), приводит к формированию поры, при этом 4 петли, располагающиеся между спиралями S5-S6 (P-петли), сходятся вместе, образуя селективный фильтр. Спирали S6 образуют стенки поры, а параллельные им S5 располагаются на внешнем периметре канала. На внутриклеточной стороне связка спиралей S6 образует преддверие с узким входом, в закрытом состоянии канала предотвращающее доступ ионов.

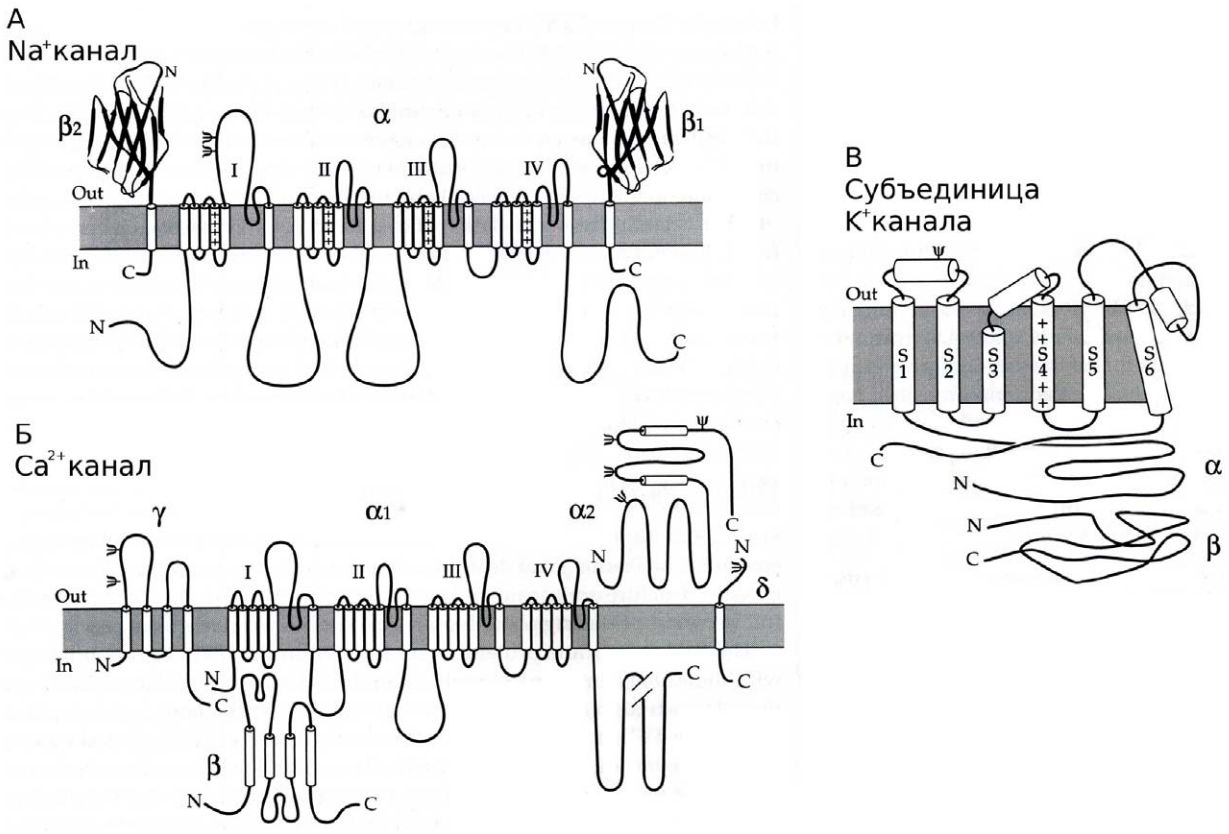


Рис. 1.13. Схема строения субъединиц катионных каналов семейства P-loop (по [250]). Показаны основные (α) и вспомогательные (β-δ) субъединицы.

Также существуют K^+-каналы, имеющие 4TM архитектуру [250]. Каждая субъединица 4TM-канала представляет собой две ковалентно связанные 2TM субъединицы, и, соответственно, содержит две P-петли. Согласно недавно определенным кристаллическим структурам K2P1 и TRAAK каналов человека, в этом случае

функциональный канал формируется путем димеризации двух 4TM субъединиц таким образом, что в формировании селективного фильтра все равно участвуют четыре P-петли [255,256].

Из 143 представителей суперсемейства катионных P-loop каналов, закодированных в геноме человека, более двух третей имеют в своем составе кроме порового домена еще и потенциалочувствительный домен [252]. ПЧД состоит из четырех консервативных трансмембранных сегментов (S1–S4) и связан с поровым доменом через спираль-связку S45, находящуюся между S4 и S5 (6TM архитектура, Рис. 1.13, 1.14A и 5.1). ПЧД отвечают за потенциалозависимую активацию канала, реагируя на изменения трансмембранного потенциала конформационными перестройками [257,258]. Изменения в структуре ПЧД сопровождаются перемещением зарядов через гидрофобный регион мембраны. Это перемещение регистрируется методами электрофизиологии по нелинейным емкостным (воротным) токам, возникающим при активации каналов. Измерение воротных токов показало, что активация K^+-канала сопровождается перемещением ~13 элементарных зарядов, что соответствует перемещению 3-3.5 зарядов в одном ПЧД [259,260]. Основной вклад в эти токи дают положительно заряженные остатки Arg (или Lys) в спирали S4, также называемые R1, R2, R3 и R4 [261,262]. Следует отметить, что в спирали S4 некоторых каналов не все позиции, гомологичные R1, R2, R3 и R4, могут быть заняты положительно заряженными остатками, в то же время в структурах некоторых каналов присутствуют дополнительные заряженные остатки, называемые R0, K5 и R6 [263]. Тем не менее, во всех случаях именно спираль S4 ПЧД выполняет роль датчика потенциала.

Взаимодействие ПЧД и порового домена позволяет воротам, сформированным спиралями S6, открываться и закрываться при изменениях трансмембранного потенциала. Большинство потенциалозависимых каналов находятся в закрытом состоянии при отрицательных значениях ТМ потенциала (~ -100-70 мВ) и переходят в открытое состояние при близких к нулю или положительных значениях. Однако существуют каналы, активируемые при гиперполяризации мембраны, например, цАМФ-управляемые HCN каналы (Hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated channels). Как показывают результаты биохимических исследований, в этих каналах при потенциалозависимой активации также происходит перемещение спирали S4 [264].

Ряд экспериментальных наблюдений указывают на то, что ПЧД представляет собой функционально независимый домен, слабо связанный с порой: (1) существуют K^+-каналы (KcsA, Kir и др.), не содержащие ПЧД [253,254]; (2) при ковалентном соединении ПЧД Kv канала и порового домена канала KcsA, который слабо зависит от потенциала,

формируется канал с хорошо выраженными потенциалозависимыми свойствами [265,266];(3) бактериальные клетки способны синтезировать и встраивать в мембрану изолированные от поры ПЧД, которые имеют нативную конформацию [267,268]; (4) существование белков, имеющих мембранные домены, гомологичные изолированным ПЧД (Рис. 1.14БВ).

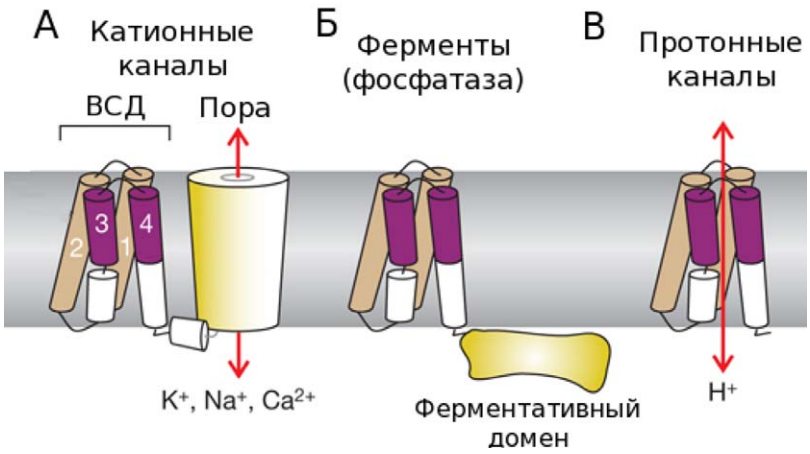


Рис. 1.14. Разнообразие мембранных белков, содержащих структуры, гомологичные ПЧД (по [258]).
(А) Потенциалозависимые K^+- Na^+- и Ca^{2+}-каналы. Показан один из четырех ПЧД и пора.
(Б) Потенциалозависимая фосфатаза Ci-Vsp.
(В) Потенциалозависимые H^+-каналы, организованные в виде димеров ПЧД. Показан один из двух ПЧД.

Например, домен, гомологичный ПЧД и содержащий 4 ТМ спирали был обнаружен в ферменте Ci-VSP из организма *Ciona interstinalis* (асцидия) [269]. Этот белок является потенциалозависимой фосфатазой, которая гидролизует мембранные фосфоинозитиды. Активация фермента происходит при деполяризации мембраны. Ci-VSP содержит цитоплазматический фосфатазный домен, который заякорен в мембране с помощью мембранного домена, – изолированного ПЧД (Рис. 1.14Б) [269].

Другие белки, имеющие структуру, схожую с ПЧД, – это обнаруженные у млекопитающих протонные каналы (Hv1) [270]. Эти каналы встречаются во многих клетках и отвечают за поддержание внутриклеточного уровня pH за счет вывода ионов H^+ в межклеточное пространство [271]. Hv каналы также играют важную роль в процессах фагоцитоза, компенсируя гиперполяризацию мембраны и осмотические эффекты в клетках нейтрофилов, тем самым увеличивая выработку реактивных форм кислорода NADPH-оксидазой, а также в процессах высвобождения гистамина базофилами. Протонные токи, вызываемые Hv каналами, ответственны за активацию сперматозоидов и за поддержание низкого уровня pH на поверхности клеток респираторного эпителия [271]. В канале Hv1 мембранный домен, гомологичный ПЧД, без каких-либо дополнительных структурных элементов сам по себе является проводником протонов (Рис. 1.14В). Эти каналы функционируют в виде димера субъединиц, гомологичных ПЧД [272].

1.6.1.2 Потенциалозависимые каналы как мишени лекарств

Потенциалозависимые K^+- и Na^+-каналы мембран нейронов играют основную роль в проведении нервных импульсов, обуславливая различные фазы потенциала действия. В то же время потенциалозависимые Ca^{2+}-каналы ответственны за сокращения мышц,

регуляцию экспрессии генов и высвобождение гормонов и нейромедиаторов [250]. Правильное функционирование Kv, Nav и Cav каналов необходимо для жизни большинства животных, и именно эти мембранные белки являются мишенями для многих токсинов из ядов кишечнополостных, моллюсков и членистоногих [273]. Нарушение работы потенциалозависимых каналов приводит к возникновению ряда расстройств нервной, сердечнососудистой и мышечной систем организма [274]. Так, например, мутации в генах, кодирующих субъединицы Kv каналов, могут приводить к эпизодической атаксии и глухоте. Мутации в генах Nav каналов вызывают заболевания, характеризующиеся гипервозбудимостью нервных и мышечных клеток или мышечной слабостью, такие как периодический паралич и миотония. Дисфункции Kv и Nav каналов нервных волокон лежат в основе различных судорожных расстройств (эпилепсия), а с дисфункциями K^+- и Na^+-каналов сердечной мышцы связан ряд заболеваний, объединенных общим названием «синдром длинного интервала QT» (Long QT syndrome, LQT). Эти заболевания, признаком которых является длинный интервал QT на кардиограмме, могут проявляться в виде сердечной аритмии и обмороков, а в некоторых случаях могут быть причиной внезапной смерти [275].

Потенциалозависимые каналы являются мишенями для действия ~ 7.5% современных лекарственных препаратов [5], а также рассматриваются в качестве перспективных мишеней для разработки новых соединений, необходимых для лечения заболеваний сердечнососудистой, нервной и иммунной систем человека [276]. Так, препараты, модулирующие работу Kv каналов KCNQ1 и hERG сердечной мышцы, могут быть использованы для лечения аритмий, связанных с синдромами LQT 1-го и 2-го типов (LQT1 и LQT2). Соединения, селективно блокирующие канал Kv1.3 Т-лимфоцитов человека (например, синтетические аналоги пептидного токсина морских анемон ShK), позиционируются как прототипы биомедицинских препаратов для лечения аутоиммунных заболеваний (рассеянного склероза, ревматоидного артрита и диабета 1-го типа) [277]. Kv каналы рассматриваются также в качестве одной из основных мишеней для новых противосудорожных препаратов. Например, противоэпилептический препарат ретигабин (retigabine) селективно взаимодействует с поровым доменом K^+-каналов, препятствуя их инактивации [278]. Недавние работы зарубежных исследователей показали, что взаимодействие ω-3 и ω-6 all-*cis* полиненасыщенных жирных кислот с ПЧД Kv каналов лежит в основе противоэпилептического, а также возможно, кардиопротективного и антиаритмического действия этих молекул [279]. В то же самое время, Nav каналы рассматриваются как основная мишень для создания препаратов, нацеленных на лечение хронической боли [276], а также новых инсектицидных препаратов. Следует отметить, что

многие современные терапевтические препараты, широко используемые в медицине, такие как местные анестетики, антиконвульсанты, антидепрессанты и т.п. взаимодействуют с поровыми доменами ионных каналов, включая Kv, Nav и Cav каналы [276].

1.6.2 Пространственная структура ПЧД катионных каналов

1.6.2.1 Пространственная структура ПЧД Kv каналов по данным РСА

На сегодняшний день методами РСА и криоЭМ с высоким разрешением определено 10 структур ПЧД и гомологичных им доменов. Первые две из них были получены в 2003 году [267] и представляли собой структуры изолированного ПЧД и полноразмерного канала KvAP термофильной архебактерии *Aeropyrum pernix* (Рис 1.15АБ). В обоих случаях белок удалось закристаллизовать только в комплексе с Fab фрагментом моноклонального антитела. Структура изолированного ПЧД-KvAP включала в себя пять спиралей (Рис 1.15Б). Три из них соответствовали трансмембранным сегментам S1, S2 и S4, а сегмент S3 был разделен на два коротких спиральных участка (S3a и S3b). Поскольку изолированный ПЧД был закристаллизован без порового домена, его ориентация относительно мембраны оставалась неясной. С другой стороны в структуре полноразмерного канала конформация ПЧД была сильно искажена (Рис 1.15А). Следующая структура полноразмерного канала KvAP, полученная в 2005 году путем кристаллизации с Fv фрагментом антитела (Рис 1.15В) [280], также содержала не корректно упакованный ПЧД. При этом, в обоих случаях структура гомотетрамера порового домена не содержала искажений.

Сравнение структур изолированного ПЧД-KvAP и полноразмерного канала позволило сделать ряд важных выводов. Во-первых, обе структуры имеют в своем составе характерный мотив “спираль-петля-спираль”, сформированный из участков S3b и S4. Этот мотив был назван “потенциалочувствительная лопасть”. Вероятно, этот элемент является ключевым для потенциалозависимой активации канала, так как спираль S4 содержит критически важные для активации положительно заряженные остатки Arg. Кроме того, эксперименты с токсинами из яда пауков, ингибирующими активацию K^+-каналов, выявили наличие сайта связывания токсинов именно в этом регионе ПЧД [281–284]. Во-вторых, факт значительного различия структур ПЧД в двух кристаллах свидетельствовал о конформационной гибкости домена и отсутствии жесткого прикрепления его к поре канала. Было сделано предположение, что такая конформационная подвижность ПЧД лежит в основе его функциональных свойств. На основе полученных данных авторы

сделали вывод, что при активации канала мотив S3b–S4 перемещается сквозь мембрану на липид-белковом интерфейсе в контакте с липидами [285].

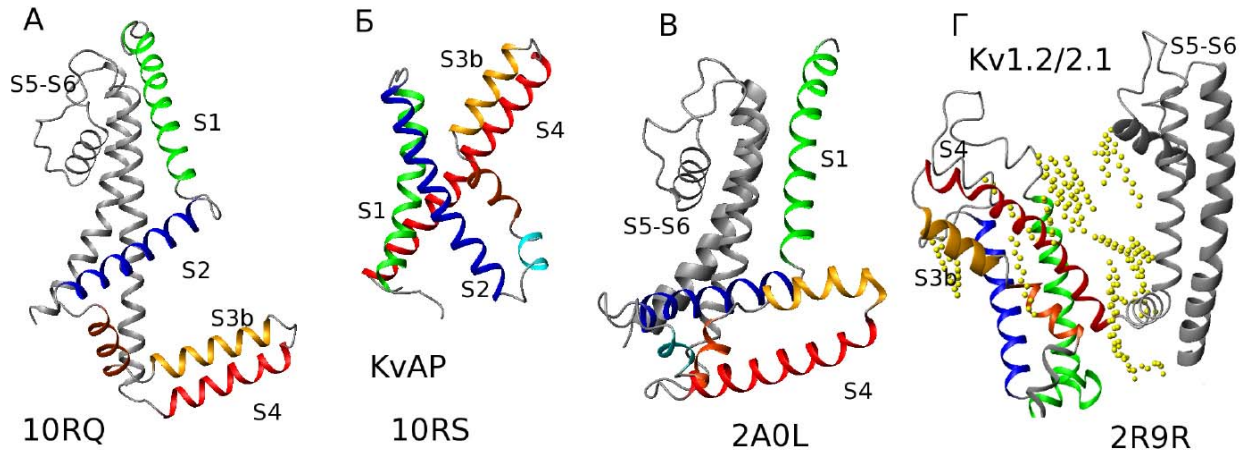


Рис. 1.15. Структуры потенциалозависимых K^+-каналов (Kv каналов), определенные методом РСА. (А,В) Структуры полноразмерной субъединицы KvAP, полученные при кристаллизации с Fab (А [267]) и Fv (В [280]) фрагментами антител. (Б) Структура изолированного ПЧД-KvAP, закристаллизованного с Fab [267]. (Г) Кристаллическая структура химерного канала Kv1.2/2.1 крысы, закристаллизованного в присутствии липидных молекул (показаны желтым) [263]. Коды в базе данных белковых структур (PDB) указаны на рисунке.

Последующая кристаллизация полноразмерного канала Kv1.2 крысы (2005 год) позволила определить ориентацию ПЧД относительно поры и мембраны [286,287]. Несмотря на достаточно низкое пространственное разрешение в области ПЧД, удалось установить, что спирали S1 и S4 находятся в трансмембранном положении и сближены с поровым доменом. В 2007 году с атомным разрешением была получена кристаллическая структура химерного канала Kv1.2 крысы, в котором мотив S3b-S4 был заменен на гомологичный мотив канала Kv2.1 (химера Kv1.2/2.1, Рис 1.15Г) [263]. На сегодняшний день данная структура дает наиболее четкое представление о структуре ПЧД K^+-канала в полноразмерном канале. Как и в структурах ПЧД-KvAP, спирали S3b–S4 формировали характерный мотив, – связку. В то же время, в структуре химерного канала спирали S1 и S4 находились на интерфейсе порового домена и ПЧД, а S2 и S3 – на периферии канала. Молекулы липидов, обнаруженные в кристалле между ПЧД и поровым доменом, подтверждали предположение о том, что ПЧД представляет собой функционально независимый домен, слабо связанный с порой, а также косвенно указывали на вовлечение липидных молекул в функционирование канала (Рис 1.15Г).

1.6.2.2 Роль электростатических взаимодействий в стабилизации структуры ПЧД

Сопоставление структуры химеры Kv1.2/2.1 и изолированного ПЧД-KvAP позволило выявить интересные структурные особенности. Конформации ПЧД каналов, имеющих разное происхождение (архебактерии и млекопитающие) были достаточно похожи друг на друга. За исключением некоторых отличий в спирали S3 общая упаковка

спиралей оказалась практически одинаковой. Это напрямую указывало на консервативность пространственной структуры ПЧД K^+-каналов в ходе эволюции. Кроме того, в обеих структурах наблюдалась система электростатических взаимодействий между положительно заряженными боковыми цепями остатков в спирали S4 и отрицательно заряженными остатками, находящимися в других спиралях (см. Рис. 1.20) [263].

Одной из важных функций отрицательно заряженных остатков, находящихся в спиралях S1-S3 ПЧД, является стабилизация положительных зарядов спирали S4 в окружении мембраны, имеющей низкую диэлектрическую проницаемость [263,288,289]. Согласно кристаллическим структурам ПЧД KvAP и химерного канала Kv1.2/2.1, остатки Arg в S4, находящиеся ближе к внеклеточной стороне мембраны (R1 и R2 для KvAP и R0, R2 для Kv1.2/2.1, положение R1 в химерном канала занимает остаток Gln), не взаимодействуют с другими зарядами и экспонированы в липидную фазу или в полость ПЧД, заполненную растворителем [263,267]. При этом остальные положительно заряженные остатки участвуют в формировании внутримолекулярных солевых мостиков. Присутствующие в ПЧД отрицательно заряженные остатки можно разделить на два кластера. Так называемый внешний кластер включает в себя остатки Glu в спиралях S1 и S2 и находится ближе к внеклеточной стороне мембраны. Боковые цепи этих остатков экспонированы в заполненную водой полость, сообщающуюся с внеклеточной водной фазой. Внутренний кластер сформирован остатками Glu из спирали S2 и Asp из S3. Обнаруженная в кристаллах ПЧД KvAP и канала Kv1.2/2.1 картина электростатических взаимодействий хорошо согласуется с результатами раннего исследования Kv канала *Shaker* (плодовая мушка *Drosophila melanogaster*) методом сайт-направленного мутагенеза, которые показали, что в активированном (соответствующем открытому каналу) состоянии ПЧД остатки из спиралей S2 и S3 формируют солевые мостики с одним из положительно заряженных остатков спирали S4 [288].

1.6.2.3 Концепция «сфокусированного» поля, роль полостей, заполненных растворителем, в функционировании ПЧД

Согласно электрофизиологическим данным, наблюдаемое в кристаллических структурах активированное состояние ПЧД должно соответствовать конформации домена в открытом или инактивированном состоянии канала. Следует отметить, что все пространственные структуры ПЧД Kv и Nav (см. ниже) каналов, определенные к настоящему времени, имеют общую организацию в форме «песочных часов» и содержат внеклеточную и внутриклеточную полости, заполненные растворителем. Именно в этих полостях и располагаются консервативные кластеры отрицательно заряженных групп ПЧД. Наличие этих полостей и тот факт, что положительно заряженные остатки Arg из

спирали S4 перемещаются в пределах водной фазы, было продемонстрировано при анализе доступности остатков Cys, искусственно введенных в различные положения канала, для водорастворимого реагента метантиосульфоната (MTS) [290]. Кроме того, было показано, что ПЧД может служить проводником ионов. Так, замена остатка Arg в положении R4 спирали S4 Kv канала *Shaker* на His приводила к возникновению протонной проводимости в активированном состоянии канала и ПЧД (при нулевом ТМ потенциале). Аналогичная замена остатков в положениях R2 или R3 приводила к переносу протонов, который имел максимальную скорость при значениях потенциала, соответствующих 50% вероятности открытия поры канала. В то же время замена остатка Arg в положении R1 приводила к формированию протонной поры, открывающейся при гиперполяризации мембраны (см. Рис. 1.20B) [291].

Результаты этих исследований позволили предположить, что одной из важных функций водных полостей ПЧД является фокусировка электрического поля. Из-за наличия полостей толщина “изолирующего” слоя в ПЧД оказывается значительно меньше толщины бислоя, поэтому градиент ТМ потенциала в этой области оказывается выше. Эти предположения были подтверждены экспериментально. Так, на Kv канале *Shaker* с использованием ковалентно присоединенных флуоресцентных зондов было показано, что внутри ПЧД напряженность электрического поля составляет ~ 10^6 В/см, в то время как в мембране толщиной ~40 Å напряженность поля равна ~$2 \cdot 10^5$ В/см [292]. Также с использованием ковалентно присоединенных зарядовых зондов на канале *Shaker* было показано, что электрическое поле в районе ПЧД полностью спадает на участке толщиной ~ 4 Å [293].

Кристаллические структуры Kv и Nav каналов (см. ниже) согласуются с концепцией «сфокусированного» поля. Внеклеточная и внутриклеточные полости в ПЧД разделяются тонкой гидрофобной «перемычкой», сформированной боковой группой ароматического или гидрофобного остатка спирали S2 (обычно Phe, Leu в случае канала KvAP). Этот остаток формирует основной барьер для переноса воротных зарядов в процессе активации (gating charge transfer center) [294]. Согласно известным на сегодня кристаллическим структурам, в активированном состоянии ПЧД заряды остатков Arg R1, R2 и R3 находятся выше этого гидрофобного барьера, а заряд R4 выше или ниже его (см. Рис. 1.17a).

Наличие «сфокусированного» поля позволяет зарядам ПЧД в ходе потенциалозависимой активации перемещаться на меньшие расстояния при сохранении величины воротных токов, соответствующих их перемещению сквозь полную толщину бислоя.

1.6.2.4 Взаимодействие ПЧД с липидами

Электрофизиологические исследования показали, что взаимодействие липидов с ПЧД оказывают значительное влияние на процессы потенциалозависимой активации. На искусственных мембранах было показано, что липиды, содержащие фосфатные группы, необходимы для функционирования канала KvAP и стабилизации его ПЧД в активированном состоянии [295]. Энзиматическая конвертация цвиттер-ионного фосфолипида сфингомиелина в анионный церамид-1-фосфат с помощью фермента сфингомиелиназы D приводила к сдвигу влево вольтамперной характеристики канала Kv2.1, экспрессированного в мембранах ооцитов, и значительно увеличивала вероятность открытия канала даже при потенциалах покоя (~ -70 мВ) [296]. В то же время обработка мембран ооцитов сфингомиелиназой C, сопровождаемая формированием неионного липида церамида, вела к иммобилизации ПЧД канала Kv2.1 в состоянии, близком к состоянию покоя, наблюдаемому в закрытом состоянии канала [297]. Стабилизация ПЧД в конформации, близкой к состоянию покоя, также была показана для канала KvAP в мембранах на основе искусственных липидов, не содержащих фосфатных групп [298].

Одно из возможных объяснений этих результатов заключается в прямом взаимодействии экспонированных в мембрану положительных зарядов Arg с отрицательными зарядами фосфатных групп липидов. Такое взаимодействие наблюдалось в кристаллической структуре химерного канала Kv1.2/2.1 [263]. Вероятно, остатки Arg взаимодействуют с анионными фосфолипидами гораздо сильнее, чем с цвиттер-ионными, что и приводит к стабилизации активированной конформации ПЧД. При этом отсутствие фосфатных групп в мембране препятствует переходу ПЧД в это состояние, стабилизируя ПЧД в конформации, близкой к состоянию покоя.

Взаимодействие потенциалочувствительной лопасти (S3b-S4) с фосфолипидами из окружающей мембраны было напрямую продемонстрировано при исследовании полноразмерного канала KvAP методом ЭПР-спектроскопии (см. ниже) [299]. В результате был сделан вывод, что при активации канала шпилька S3b-S4 перемещается на липид-белковом интерфейсе. Исследование Kv каналов с использованием «вольтсенсорных» токсинов из яда пауков (токсинов, взаимодействующих с ПЧД и влияющих на потенциалозависимую активацию), также подтвердило важность взаимодействий шпильки S3b-S4 с липидами для функционирования каналов [300]. Более того, на примере химеры Kv1.2/2.1 было показано, что функциональные свойства Kv каналов (скорость открытия, потенциалозависимость, максимальная вероятность открытия поры), а также их взаимодействие с «вольтсенсорными» токсинами, зависят не

только от липидного состава, но и от механического состояния мембраны (натяжения, приложенного к мембране) [301].

1.6.2.5 Пространственная структура Nav каналов по данным РСА

Большим прорывом в исследовании катионных каналов стало определение в 2011-2012 годах пространственных структур бактериальных Nav каналов, которые, в отличие от Nav эукариот (так же как и Kv каналы), организованы в виде гомотетрамера 6TM субъединиц. Методом РСА были определены две структуры канала NavAb (*Arcobacter butzleri*) [302,303] и структура канала NavRh из морской альфа-протеобактерии (*Rickettsiales sp*. HIMB114) [304]. Так же как и в структурах Kv каналов, ПЧД бактериальных каналов Nav находятся в активированном состоянии (ТМ потенциал отсутствует), при этом воротный заряд остатка Arg R1 расположен во внеклеточном пространстве, остатки R2 и R3 взаимодействуют с консервативным кластером отрицательно заряженных групп ПЧД с внеклеточной части белка, а остаток R4 взаимодействует с консервативным кластером отрицательно заряженных групп ПЧД, расположенным на внутриклеточной части белка. Кроме того, в отличие от ПЧД Kv каналов фрагмент S3 NavAb имеет конформацию одной прямой α-спирали.

Полученные кристаллические структуры Kv и Nav каналов позволили установить взаимную ориентацию порового и потенциалочувствительных доменов в открытом или инактивированном состоянии канала. Как оказалось, ПЧД ориентированы таким образом, что одна из сторон спиралей S1 и S4 контактирует с фрагментом S5 из соседней субъединицы, а спирали S2 и S3 не имеют контактов с поровым доменом (Рис 1.16). При этом, вероятно, все спиральные фрагменты ПЧД в той или иной степени контактируют с молекулами липидов. Эти структурные данные хорошо согласуются с результатами биохимических исследований. Так, введение цистеинов в спирали S4 и S5 канала *Shaker* приводило к формированию дисульфидных связей в открытом состоянии канала. Это говорило о пространственной сближенности спирали S4 ПЧД и порового домена [305].

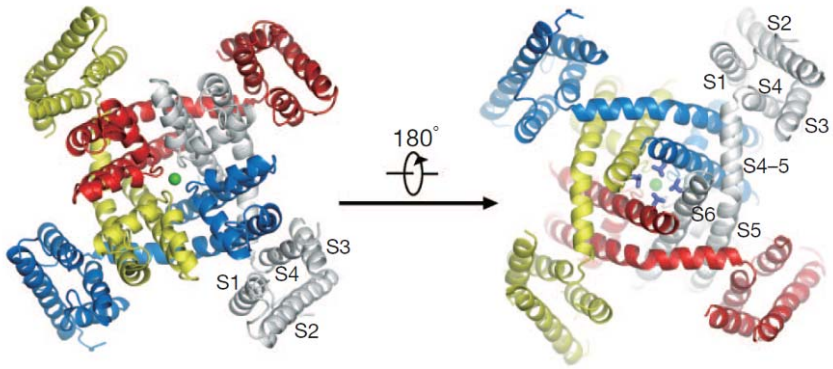


Рис. 1.16. Пространственная структура канала NavRh [304] (слева) вид со стороны периплазмы, (справа) – цитоплазмы. Отдельные субъединицы показаны разными цветами.

1.6.2.6 Пространственная структура Hv1 канала по данным РСА

В 2014 году были опубликованы результаты кристаллографического исследования протонного канала Hv1 мыши, состоящий только из одного ТМ домена, гомологичного ПЧД [306]. Для стабилизации и кристаллизации этого белка в его последовательность были внесены значительные изменения: (1) был удален *N*-концевой цитоплазматический домен; (2) *C*-концевой цитоплазматический спиральный пучок был заменен на мотив лейциновой застежки (leucine-zipper); (3) регион, включающий *C*-концевую половину спирали S2 и *N*-концевую половину спирали S3, был заменен гомологичным регионом из потенциалозависимой фосфатазы Ci-VSP. Полученный химерный белок (mHv1cc) был закристаллизован в виде тримера, хотя в мембранах он формирует димеры со свойствами, близкими к нативному каналу Hv1.

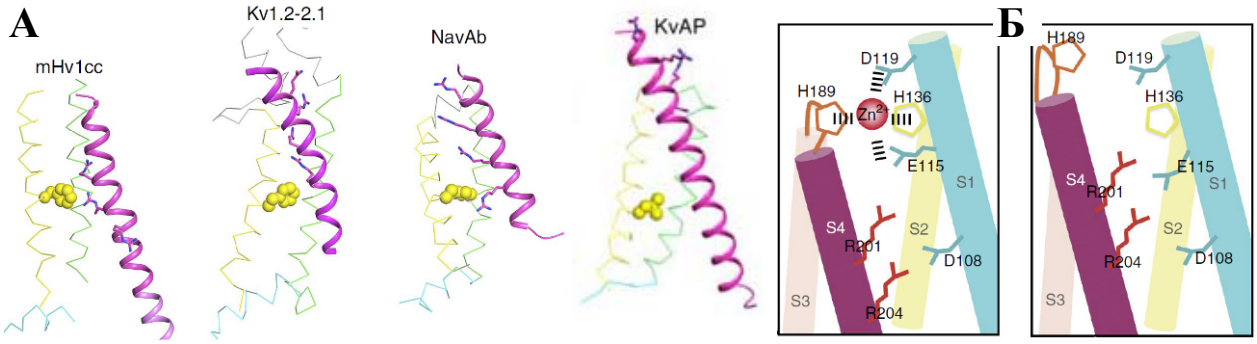


Рис. 1.17. (А) Структуры ПЧД из потенциалозависимых Hv, Kv и Nav каналов, определенные методом РСА. Спираль S4 и положительно заряженные остатки Arg, ответственные за потенциалозависимую активацию, показаны фиолетовым цветом. Консервативный гидрофобный остаток (Phe/Leu), образующий барьер для переноса зарядов, показан желтым. *N*-концевая спираль S0 показана голубым, ТМ спирали S1 и S2 показаны зеленым и желтым, соответственно. (Б) Возможный механизм активации ПЧД на примере канала Hv1. Ион Zn^{2+} стабилизирует инактивированное состояние домена (состояние покоя), при активации спираль S4 смещается вверх. Рисунок адаптирован из [306].

Использование ионов Zn^{2+} позволило при кристаллизации зафиксировать состояние ПЧД, близкое к инактивированному состоянию (состояние покоя, наблюдаемое в присутствии ТМ потенциала). В полученной структуре только один из остатков Arg R1 находился выше гидрофобного барьера (Рис. 1.17А) [306]. Полученные данные позволили предложить приблизительную модель конформационных перестроек, происходящих в структуре канала при потенциалозависимой активации (Рис. 1.17Б).

1.6.2.7 Пространственные структуры S1-S4 доменов других каналов

За последние годы были определены еще 2 структуры 6ТМ-каналов, содержащих домены, гомологичные ПЧД. Одна из этих структур (2008 год) представляет собой управляемый циклическими нуклеотидами бактериальный канал MlotiK1, не зависящий от потенциала [307]. Гомологичный ПЧД 4ТМ домен этого белка хотя и имеет пространственную структуру, близкую к структуре ПЧД каналов KvAP и Kv1.2, вероятно,

выполняет лишь регуляторную роль, ограничивая движение ворот канала при взаимодействии лигандов (циклических нуклеотидов) с цитоплазматическим доменом, ковалентно присоединенным к *C*-концу спирали S6. Еще одна структура представлена слабо-селективным катионным каналом TRPW1, который отвечает за восприятие болевых сигналов, высоких температур, а также ряда химических раздражителей, например, алкалоида капсаицина из перца. Структура TRPW1 была определена в 2013 году с рекордным для метода криоЭМ разрешением – 3.4Å [308]. Как оказалось, конформация основной цепи S1-S4 домена TRPW1 имеет большое сходство с конформацией ПЧД из Kv и Nav каналов. Несмотря на это сходство, домены демонстрируют разные принципы структурной организации. В отличие от ПЧД, спирали S3 и S4 TRPW1 практически не содержат заряженных остатков, внутренняя часть S1-S4 домена TRPW1 гидрофобна и не содержит больших полостей, заполненных растворителем, а в стабилизации структуры домена большую роль играют контакты между ароматическими остатками из различных спиралей [308]. Сравнение структуры канала TRPW1 в присутствии низкомолекулярных и пептидных антагонистов, в том числе взаимодействующих с внеклеточными и ТМ участками S1-S4 домена, не выявило изменений в структуре этого домена [309]. Вероятно, S1-S4 домен TRPW1 также выполняет лишь регуляторную функцию, обеспечивая взаимодействие *N*-концевых и *C*-концевых цитоплазматических доменов со спиралью-связкой S45, которая передает механический сигнал к воротам канала, располагающимся в поровом домене.

1.6.3 Исследование структуры ПЧД-KvAP методами ЭПР- и ЯМР-спектроскопии

Полноразмерный канал KvAP и его изолированный ПЧД также изучался с помощью ЭПР-спектроскопии в липидных везикулах в отсутствие трансмембранного потенциала. Для этого практически все остатки ПЧД поочередно заменяли на остатки Cys, которые затем модифицировали парамагнитными спиновыми метками [268,299]. Также методом двойного электрон-электронного резонанса измеряли расстояния между различными частями в полноразмерном канале KvAP [310]. Полученные данные показали, что изолированный ПЧД-KvAP в отсутствие потенциала имеет ту же структуру, что и домен в полноразмерном канале. Эта структура соответствует активированному состоянию ПЧД. Сопоставление полученных данных с кристаллической структурой ПЧД-KvAP позволило сделать вывод о том, что структура домена в кристалле также близка к нативной.

Как предполагают, реконструкция канала KvAP в мембраны, состоящие из липидов, не содержащих отрицательно заряженных фосфатных групп, приводит к

блокировке ПЧД в конформации, близкой к состоянию покоя [298] (см. п. 1.6.2.4). Следует отметить, что в обычных фосфолипидных мембранах для подержания Kv канала в состоянии покоя требуется наличие ТМ потенциала, что не позволяет исследовать это состояние методами структурной биологии. В 2014 году методами ЭПР-спектроскопии было проведено исследование структуры ПЧД канала KvAP в мембранах на основе искусственного липида DOTAP (1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан) [311]. Авторы этого исследования предполагают, что полученные данные характеризуют конформацию ПЧД в состоянии покоя (в закрытом канале).

В ходе исследования было установлено, что переходы ПЧД между активированным состоянием, наблюдаемым в окружении фосфолипидов POPC/POPG (3:1), и возможным состоянием покоя, наблюдаемом в мембранах на основе DOTAP, сопровождаются лишь небольшим изменением структуры домена. Данные по доступности отдельных остатков растворителю и измеренный набор межспиральных расстояний показал, что спираль S4 меняет свой наклон и в состоянии покоя смещается вниз на ~3 Å и вбок на ~2 Å. Это движение сопровождается изменением доступности растворителю во внеклеточной и внутриклеточной полостях домена. На основе полученных результатов авторы работы предложили альтернативную модель потенциалозависимой активации канала KvAP, в которой структурные перестройки ПЧД приводят к ремоделированию электрического поля в домене (Рис. 1.18) [311].

Следует отметить, что результаты этого ЭПР-исследования согласуются с результатами более раннего ЯМР-исследования ПЧД-KvAP, проведенного в рамках представленной работы. Так, методом ЯМР было показано, что структура домена в мицеллах частично катионного детергента LDAO, не содержащего фосфатных групп, схожа со структурой домена в мембранах, содержащих фосфолипиды.

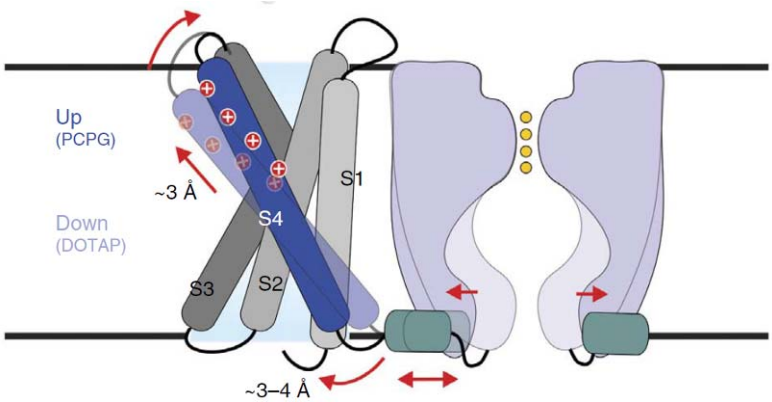


Рис. 1.18. Модель потенциалозависимой активации канала KvAP, предложенная в работе [311].

Используя, в том числе, и методы ЯМР-спектроскопии твердого тела, в ряде работ были проведены исследования взаимодействия изолированного ПЧД-KvAP с молекулами воды и окружающими липидами. Было установлено, что молекулы воды проникают внутрь ПЧД, имеющего ТМ ориентацию. Встроенная молекула ПЧД приводит к

изменению формы мембраны, окружающей домен, а полости заполненные водой, вероятно, значительно изменяют профиль ТМ электрического потенциала в районе ПЧД [312]. Исследование изолированного ПЧД-KvAP в мембранах, состоящих из POPC/POPG (1:1), показало, что домен взаимодействует с липидами и молекулами воды [313]. Преимущественно наблюдалось взаимодействие с молекулами анионного липида (POPG), при этом время жизни комплекса домен/липид составляло ~ 10^{-3} с. Было установлено, что остатки Arg в ПЧД одновременно гидратированы и имеют контакты с полярными головками и ацильными цепями липидов. Исследование ПЧД-KvAP в мембранах DOTAP не выявило значительных изменений в структуре домена [313], что согласуется с данными, полученными методом ЭПР-спектроскопии [311] (см. выше).

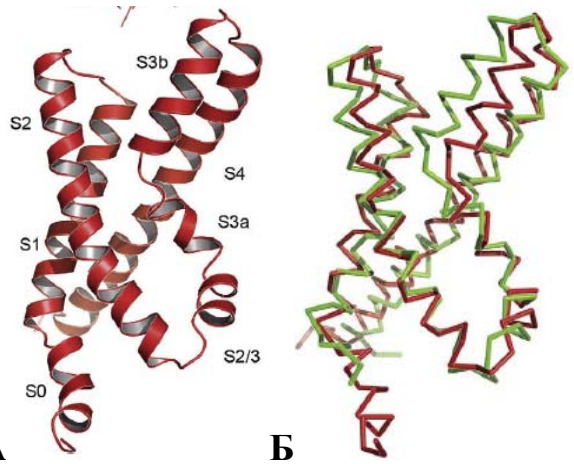


Рис. 1.19. (А) Пространственная структура ПЧД-KvAP по данным ЯМР. (Б) Суперпозиция кристаллической (зеленый) и ЯМР (красный) структур, выравнивание по C^{α} атомам остатков H24-E25 в спирали S1 и Y59-Y78 в спирали S2. Рисунок адаптирован из [314].

В 2010 году после публикации основных результатов по исследованию ПЧД-KvAP, полученных в представленной работе, были опубликованы результаты ЯМР-исследования пространственной структуры ПЧД-KvAP [314]. В качестве среды для исследования были использованы мицеллы цвиттер-ионного детергента DC7PC, в которых образец ПЧД-KvAP оставался стабильным в течение примерно одной недели при 45ºC. В ходе этой работы были использованы как образцы тотально дейтерированного (^{2}H,^{13}C,^{15}N-меченого) домена, так и образцы, содержащие дейтерированный белок с селективно протонированными метильными группами остатков Ile, Leu и Val. В результате было получено полное отнесение для 107 из 147 остатков ПЧД, сигналы 38 остатков были отнесены частично. Основываясь только на данных ЯЭО и ограничениях на двугранные углы, была рассчитана пространственная структура ПЧД-KvAP (значение СКО для атомов C^{α} остатков P25-K147 составило 1.22 Å) (Рис. 1.19) [314]. Полученная структура домена в мицеллах DC7PC была близка к структуре ПЧД-KvAP, наблюдаемой в кристалле изолированного домена [267]. В то же время наблюдалось значительное различие в положении потенциалочувствительной лопасти (шпилька S3b-S4) относительно спиральной шпильки S1-S2 (Рис. 1.19). В структуре ЯМР по сравнению с кристаллической

структурой шпилька S3b-S4 была повернута на ~ 23º относительно S1-S2. При этом общая структура лопасти осталась почти неизменной (СКО 0.8 Å для остатков A100-R126). Полученные данные позволили сделать вывод, что «потенциалочувствительная лопасть» S3b-S4 может двигаться относительно спиралей S1-S2, не меняя своей конформации. При этом положение остатков R133, K136 и гидрофобного остатка Leu69 из региона межспиральных контактов в центре домена в ЯМР и РСА структурах были идентичны [314].

В ЯМР-структуре ПЧД-KvAP на *N*-конце домена наблюдалась дополнительная амфифильная α-спираль (S0), состоящая из ~10 остатков, которая располагалась примерно перпендикулярно четырем трансмембранным спиралям. С использованием аналогов липида пальмитоил-стериоил-фосфатидилхолина (PSPC), содержащих парамагнитные метки, было показано, что в окружении мицелл DC7PC молекулы липидов более сильно взаимодействуют со спиралями S3 и S4, чем со спиралями S1 и S2 ПЧД [314]. Структура ПЧД-KvAP в мицеллах DC7PC согласуется с результатами более раннего ЯМР-исследования домена в мицеллах DPC/LDAO, проведенного в рамках представленной работы.

1.6.4 Модели потенциалозависимой активации

Согласно современным данным при потенциалозависимой активации катионных каналов происходят значительные конформационные перестройки в молекуле ПЧД, которые включают в себя перемещение спирали S4 или связки спиралей S3-S4 относительно спиральной шпильки S1-S2 и порового домена, зафиксированных в мембране. В свою очередь перемещение спирали S4 за счет связи с порой приводит к открытию внутренних ворот канала, сформированных спиралями S6. Детальные молекулярные механизмы структурных перестроек в ПЧД до последнего времени оставались неясными. Существовало несколько различных моделей этого процесса, а вопрос, какая из них соответствует действительности, был предметом жарких дискуссий [257]. Основные проблемы в этой области были связаны с тем, что в известных пространственных структурах Kv и Nav каналов ПЧД находятся в активированном состоянии (ТМ потенциал отсутствует), а структура ПЧД в состоянии покоя (ТМ потенциал ~ -70 мВ) была охарактеризована лишь качественно (см. обзоры [257,258]). Только в 2012 году появилось несколько работ, в которых с использованием вычислительных методов (компьютерного моделирования и молекулярной динамики) были построены детальные модели структурных перестроек ПЧД при активации, согласующиеся с большинством из накопленных биофизических и биохимических данных [315,316].

Одними из самых важных вопросов, которые пытались решить в экспериментальных исследованиях, были вопросы, связанные с амплитудой перемещения и конформационными изменениями в спирали S4 при потенциалозависимой активации ПЧД.

1.6.4.1 Экспериментальные данные, описывающие амплитуду перемещения потенциалочувствительной лопасти S3b-S4 при активации

В известных структурах ПЧД большая часть мотива S3b-S4 экспонирована в мембрану, поэтому для перемещения потенциалочувствительной лопасти не создается значительных ограничений со стороны других фрагментов канала. При отрицательном ТМ потенциале связка S3b-S4 или спираль S4 должна перемещаться ближе к внутриклеточной стороне мембраны. Совокупность данных по доступности остатков Cys, искусственно введенных в ПЧД Kv канала *Shaker,* для тиол-реактивного реагента метантиосульфоната (MTS) (Рис. 1.20АБ) [317], данных по протонной проводимости ПЧД канала *Shaker* при замене остатков Arg из S4 на His (Рис. 1.20В) [291] и данных по доступности биотинилированных остатков ПЧД канала KvAP для водорастворимого авидина (Рис. 1.20В) [318] позволяет заключить, что при активации Kv каналов различного происхождения остатки Arg из спирали S4 перемещаются на расстояние ~ 10-15 Å перпендикулярно поверхности мембраны. Схожие данные были получены при исследовании доступности различным тиол-реактивным реагентам остатков Cys, искусственно введенных в ПЧД IV субъединицы эукариотического канала Nav [319].

В ходе процесса активации вероятно происходит перераспределение электростатических взаимодействий между заряженными остатками ПЧД. Так, остатки Arg, которые располагаются ближе к внеклеточной стороне, в активированном состоянии взаимодействуют с фосфатными группами липидов, а в закрытом состоянии канала взаимодействуют с отрицательно заряженными остатками из внешнего кластера. При этом остатки Arg из середины спирали S4 “переключаются” с внешнего на внутренний кластер кислотных остатков, а остатки из *C*-концевого фрагмента S4 могут переключаться на взаимодействие с фосфолипидами из внутриклеточного монослоя мембраны.

Перемещение спирали S4 было также подтверждено при изучении цистеиновых сшивок между спиралями ПЧД в канале *Shaker* [320]. Было показано, что в состоянии покоя в ПЧД могут замыкаться S–S-связи между цистеинами, введенными в спирали S4 и S1/S2, расстояние между которыми в активированном состоянии (согласно кристаллической структуре Kv1.2/2.1) составляет 18-19 Å. Помимо трансляционных движений, полученные данные указывали на возможный поворот спирали S4 вокруг ее оси. Так, сравнение с кристаллической структурой Kv1.2/2.1 показало, что для замыкания

дисульфидной связи между остатками Cys в спиралях S4 и S1, спираль S4 должна поворачиваться на угол до 90°. Однако эти данные также могут объясняться и конформационными перестройками в спирали S4 в ходе активации ПЧД, например, переходом отдельных ее фрагментов из α-спиральной конформации в конформацию 3_{10}-спирали. Косвенно на возможность таких переходов указывают имеющиеся кристаллические структуры ПЧД. Так, в структуре химерного канала Kv1.2/2.1 *C*-концевая часть спирали S4 (за остатком R3) имеет конформацию 3_{10}-спирали [263]. В структуре канала NavAb конформация 3_{10}-спирали наблюдается на участке от R1 до R4 [302], что позволяет воротным зарядам остатков Arg располагаться на одной стороне спирали S4. Однако, в ПЧД канала NavRh регион 3_{10}-спирали наблюдается только на участке от R3 до R4 [304], а в структуре цАМФ-активируемого K^+-канала MlotiK1 такую конформацию имеет *N*-концевой участок S4 до положения, соответствующего остатку R4 [307]. В тоже время сегмент S4 в кристаллической структуре изолированного ПЧД канала KvAP имеет полностью α-спиральную конформацию [267].

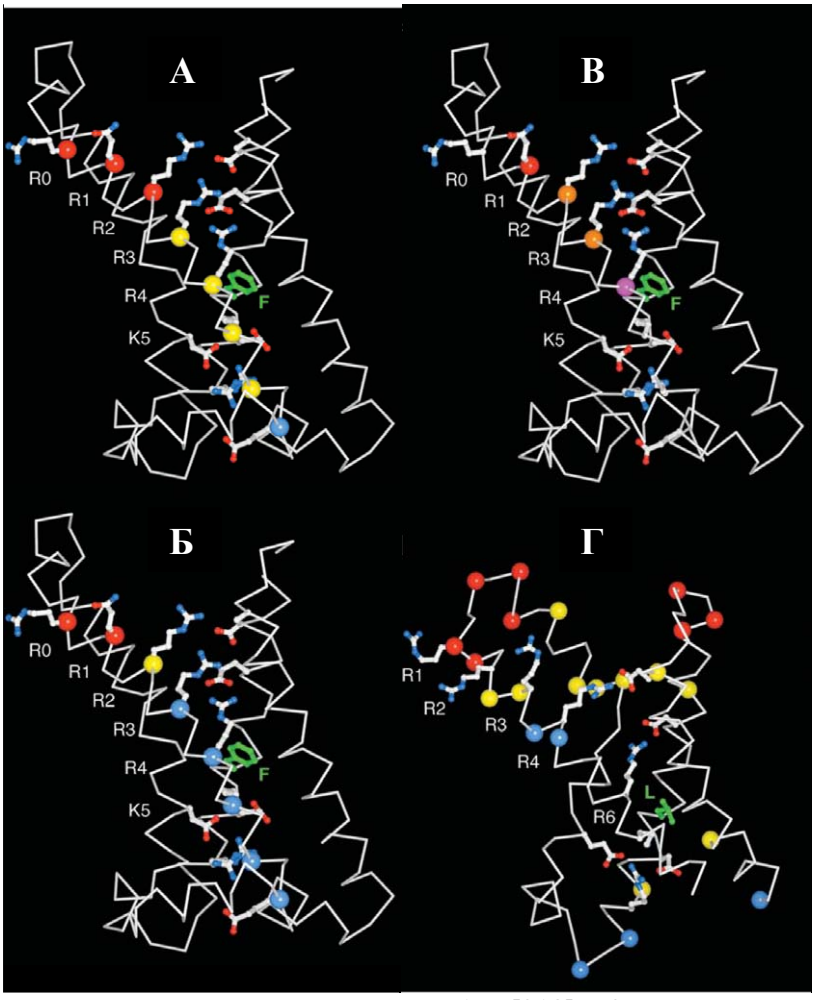


Рис. 1.20. Биохимические данные о движении спирали S4 в ходе потенциалозависимых перестроек показаны на ПЧД каналов Kv1.2/2.1 (АБВ) и KvAP (Г).
(А) Остатки, недоступные MTS (желтые сферы) и доступные из внеклеточного (красные) и внутриклеточного (синие) пространства в открытом состоянии канала *Shaker*. (Б) То же что и в (А), но для канала в закрытом состоянии [317].
(В) Фиолетовая, красная и оранжевые сферы обозначают остатки Arg (канал *Shaker*), замена которых на His приводит к возникновению протонной проводимости, в покое, в активированном состоянии канала/ПЧД и при промежуточных значениях ТМ потенциала. [291].
(Г) Остатки, не доступные для водорастворимого авидина (желтые сферы) и доступные из внеклеточного (красные) и внутриклеточного (синие) пространства в открытом и закрытом состоянии канала KvAP [318]. Консервативный гидрофобный остаток (Phe/Leu), образующий барьер для переноса зарядов, показан зеленым. Рисунок адаптирован из [263].

Несмотря на сравнительно большие перемещения спирали S4 в ходе процесса потенциалозависимой активации, глубина погружения спирали S3b Kv канала *Shaker* в

мембране практически не меняется в ходе цикла активации ПЧД [321]. В пользу этого также свидетельствует тот факт, что «вольтсенсорные» токсины пауков, вероятно, взаимодействующие с S3b и частично проникающие в мембрану при добавлении с внеклеточной стороны, способны связываются с ПЧД как в открытом, так и в закрытом состоянии канала [322,323]. Кроме того, биохимические данные, полученные на Kv канале *Shaker*, указывают на то, что потенциалочувствительная лопасть присутствует только в активированном состоянии ПЧД, а при перемещении S4 в состояние покоя интерфейс взаимодействия спиралей S3b-S4 нарушается [324].

1.6.4.2 Модели активации, полученные с использованием вычислительных методов

В 2012 году методами электрофизиологии и сайт-направленного мутагенеза с использованием ионов Cd^{2+}, способных стабилизировать взаимодействие между двумя остатками Cys без формирования дисульфидного мостика, был получен набор из 20-ти ограничений, описывающих взаимное расположение спиралей ПЧД канала *Shaker* в открытом и четырех закрытых состояниях канала, соответствующих переносу отдельных зарядов остатков Arg спирали S4 через гидрофобный барьер, создаваемый консервативным остатком Phe290 спирали S2 [315]. Полученные ограничения позволили, используя метод компьютерного моделирования Rosetta, построить молекулярные модели ПЧД, соответствующие этим состояниям. Полученные модели показали, что в ходе процесса активации спираль S4 перемещается как минимум на 12 Å вдоль своей оси (по направлению, перпендикулярному поверхности мембраны). Это движение сопровождается перемещением 3_{10}-спирального региона вдоль оси S4 так, что этот регион постоянно находится на уровне остатка Phe290 [315]. Благодаря перемещению 3_{10}-спирального региона, *C*-концевой участок фрагмента S4 в ходе процесса активации не вращается вдоль оси спирали. В то же время *N*-концевой фрагмент совершает поворот так, чтобы заряженные остатки Arg были направлены в сторону полостей ПЧД. В состоянии покоя ПЧД, которое соответствует максимальному перемещению воротных зарядов по направлению к внутриклеточной стороне мембраны, фрагмент S4 имеет полностью α-спиральную конформацию.

Схожие результаты были получены в исследовании механизма активации химерного канала Kv1.2/2.1 методами молекулярной динамики (МД) в присутствии ТМ потенциала [316]. Использование специализированной компьютерной техники, созданной специально для проведения МД расчетов, позволило для полноразмерного канала в мембране рассчитать несколько длительных (0.1-0.3 мс) МД траекторий. Эти траектории зафиксировали скачкообразные переходы ПЧД между набором состояний, которые сопровождались переносом отдельных воротных зарядов через гидрофобный барьер,

создаваемый остатком Phe233 из спирали S2 (Рис. 1.21). В ходе этого процесса глубина расположения в мембране остатка Arg в положении R2 спирали S4 менялась примерно на 15 Å. В отличие от результатов, полученных при моделировании методом Rosetta, в ходе МД исследования наблюдался поворот всей спирали S4 на 120º вдоль ее оси. Несмотря на эти различия, модели ПЧД в покое, полученные этими двумя методами, демонстрировали значительное сходство во взаимном расположении всех спиралей ПЧД [325].

В описанных выше молекулярных моделях глубина и расположение спирали S3b в мембране практически не меняется в ходе процесса потенциалозависимой активации. Большое перемещение спирали S4 при переходе из активированного состояния в состояние покоя становится возможным, благодаря погружению участка внеклеточной петли S3-S4 в мембрану (Рис. 1.21). Косвенно, важность петлевого участка S3-S4 для потенциалозависимой активации была подтверждена в недавнем исследовании канала *Shaker* методами сайт-направленного мутагенеза [324] (2013 год). Однако, не во всех Kv каналах эта петля имеет достаточную длину для такого рода структурных перестроек. Так, в канале KvAP, который являлся объектом исследования представленной работы, спирали S3b и S4 упакованы в плотную спиральную шпильку, которая не содержит протяженного петлевого участка (Рис. 1.20Г). Вероятно, предложенные молекулярные модели не пригодны для описания процесса потенциалозависимой активации канала KvAP и других Kv каналов, имеющих короткую петлю S3-S4.

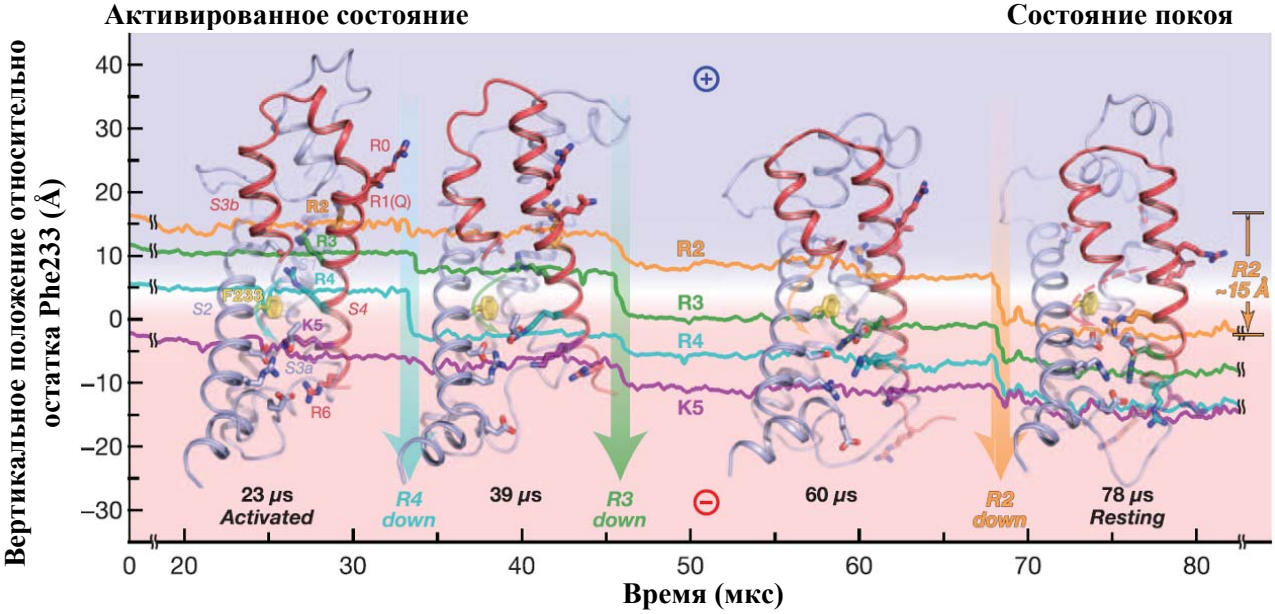


Рис. 1.21. Движения ПЧД химерного канала Kv1.2/2.1 при потенциалозависимом переходе из активированного в инактивированное состояние, наблюдаемые в длительной (0.1 мс) МД траектории. Цветные линии показывают вертикальное положение C^{α} атомов заряженных остатков R2, R3, R4, K5 из спирали S4. Вертикальные координаты рассчитаны относительно положения консервативного остатка Phe233 из спирали S2, создающего гидрофобный барьер. Вертикальное смешение остатка R2 составляет ~15 Å, что соответствует биохимическим данным, полученным для каналов *Shaker* и KvAP (см. Рис 1.20). Рисунок адаптирован из [316].

ГЛАВА 2 Липид-белковые нанодиски – альтернативная среда для стабилизации «нативной» структуры и ЯМР-исследований мембранных белков и мембраноактивных пептидов

Как было отмечено в главе 1 (п. 1.3.1), мембраномоделирующие среды необходимы для продукции и стабилизации препаратов МБ в функционально-активной форме как для их последующего исследования различными физико-химическими методами, так и для практического применения в области биотехнологии и фармакологии [60]. Поиск оптимального мембранного миметика является наиболее важным и обязательным шагом в любом ЯМР-исследовании МБ и МП [4]. Идеальный мембранный миметик должен сохранять нативную (функциональную) структуру белка и в то же время обеспечивать «интерпретируемые» спектры ЯМР солюбилизированной молекулы. При этом на начальных этапах исследований качество спектров оценивается в терминах дисперсии сигналов и ширины спектральных линий. Однако ширина ЯМР-сигналов значительно возрастает при увеличении размеров комплекса (исследуемый белок/мембранный миметик). Как следствие, мембраномоделирующие среды на основе реальных бислойных мембран в виде везикул или больших бицелл, имеющие характерные размеры > 20 нм, не могут быть использованы в спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

Традиционно используемые в ЯМР-исследованиях мембраномоделирующие среды обладают рядом недостатков. Так, органические растворители с низкой полярностью (метанол, TFE, или смеси метанол/хлороформ, TFE/вода) по своей природе изотропны и имеют весьма ограниченное применение в качестве модели биологической мембраны [8]. В то же время анизотропные мембранные миметики (мицеллы детергентов и небольшие сферические липид/детергентные бицеллы, имеющие размер ≤ 6 нм) обладают значительной поверхностной кривизной [8,86,87], что может приводить к серьезным искажениям нативной структуры солюбилизированного белка [117]. Кроме того, большая мобильность детергент-содержащих комплексов иногда усиливает внутримолекулярную подвижность, присущую α-спиральным МБ, что ведет к значительному уширению и ослаблению сигналов ТМ доменов [8,86,87]. Нестабильность мицеллярных комплексов, обусловленная необходимостью поддержания высокой концентрации детергента, превышающей критическую концентрацию мицеллообразования, также затрудняет простые манипуляции с препаратами, такие как изменение концентрации белка или состава буфера.

В поисках альтернативной среды для ЯМР-исследований мембранных белков и мембраноактивных пептидов (МП) мы обратили внимание на реконструированные незрелые частицы липопротеинов высокой плотности или липид-белковые нанодиски (ЛБН). Эти частицы состоят из фрагмента бислойной мембраны, окруженного димером аполипопротеина или специального белка MSP (membrane scaffold protein), – синтетического аналога аполипопротеина. Согласно последним моделям [124,126,326], ЛБН имеют форму диска толщиной ~ 4 нм (Рис. 2.1), совпадающей с толщиной биологической мембраны. Различные аполипопротеины и белки MSP позволяют формировать нанодиски диаметром от 6 до 20 нм [139–143]. Фрагмент липидной мембраны ЛБН сохраняет многие биофизические свойства настоящих бислойных систем (например, в нанодисках наблюдается хорошо выраженный фазовый переход липидов из гелевого в жидкокристаллическое состояние [144]). ЛБН обладают превосходными мембраномоделирующими свойствами и повышенной стабильностью по сравнению с традиционными мембранными миметиками и, таким образом, являются привлекательной средой для ЯМР-исследований МБ.

Также в работе была рассмотрена еще одна возможная сфера применения мембраномоделирующих сред на основе ЛБН, а именно ренатурация (фолдинг *in vitro*) препаратов МБ. Следует отметить, что наиболее эффективные методы рекомбинантной продукции МБ такие как бактериальная экспрессия в составе нерастворимых телец включения или синтез в виде осадка ББС позволяют получать миллиграммовые количества белковых препаратов в функционально-неактивной форме, характеризующихся неправильной упаковкой полипептидной цепи целевого белка и/или его некорректным агрегационным состоянием. Универсальные протоколы фолдинга МБ необходимы во всех областях возможного практического применения МБ, а также для фундаментальных исследований [74]. Возможность применения нанодисков и молекул аполипопротеинов, включая синтетические последовательности MSP, для фолдинга МБ *in vitro* ранее не исследовалась.

Цели и задачи исследования. В рамках работы при исследовании возможности применения ЛБН в качестве среды для структурных ЯМР-исследований МБ и МП, а также в качестве среды для фолдинга МБ были поставлены следующие задачи:

1. Провести теоретический анализ возможности исследования МБ и МП в комплексе с ЛБН методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. Оптимизировать протокол получения ЛБН и комплексов МБ/ЛБН для ЯМР-исследований. Получить ЯМР-спектры высокого разрешения для интегральных МБ в комплексе с ЛБН. Изучить

возможность прямых структурных исследований методами ЯМР-спектроскопии комплексов МБ/ЛБН, полученных в ходе бесклеточного синтеза.

2. Исследовать возможность применения ЛБН для ренатурации (фолдинга *in vitro*) МБ, полученных в результате рекомбинантной продукции в бактериальных клетках или бесклеточных системах синтеза в денатурированном виде, например, в виде осадка ТС. Изучить зависимость эффективности процесса рефолдинга от липидного состава нанодисков.
3. Изучить возможность применения мембраномоделирующих сред на основе ЛБН для исследования водорастворимых мембраноактивных пептидов.

В работе в качестве белка MSP использовали рекомбинантный фрагмент 44–243 аполипопротеина А-1 человека, позволяющий формировать нанодиски, имеющие размер ~ 10 нм и содержащие ~150 молекул фосфолипида. Образцы MSP получены в бактериальной системе экспрессии (*E. coli*) к.б.н. Люкмановой Е.Н. (лаборатория биоинженерии белка, отдел биоинженерии ИБХ РАН, Руководители академик Кирпичников М.П. и проф. Долгих Д.А.). Все эксперименты по реконструкции «пустых» ЛБН и комплексов МБ/ЛБН, а также последующий биохимический анализ полученных образцов проведены совместно с Люкмановой Е.Н.

2.7 Возможность применения ЛБН для ЯМР-исследований интегральных МБ

2.7.1 Теоретические предпосылки возможности применения нанодисков в качестве мембранного миметика для структурных исследований методами ЯМР

Теоретические расчеты вращательного тензора диффузии для дискоидальной частицы размером 10 × 4 нм (Рис. 2.1) были проведены с использованием опубликованных аналитических формул [327]. Полученные времена корреляции вращательных движений τ_A, τ_B и τ_C при 45° равны 56, 57 и 61 нс, соответственно, что соответствует изотропному вращению глобулярного белка с R_H ~ 4.7 нм и молекулярной массой 150–200 кДа. Вероятно, комплекс, образованный мембранным белком и нанодиском, должен демонстрировать схожие динамические и релаксационные свойства и, следовательно, сравнимую ширину линий в ЯМР-спектрах ($\Delta\nu^1H^N$ = 90–100 Гц). Сравнение полученных оценок с результатами современных ЯМР-исследований глобулярных белков свидетельствует о теоретической возможности получения ЯМР-спектров МБ, встроенных в мембрану ЛБН, при условии использования методов TROSY и современных высокопольных (800–900 МГц) ЯМР-спектрометров.

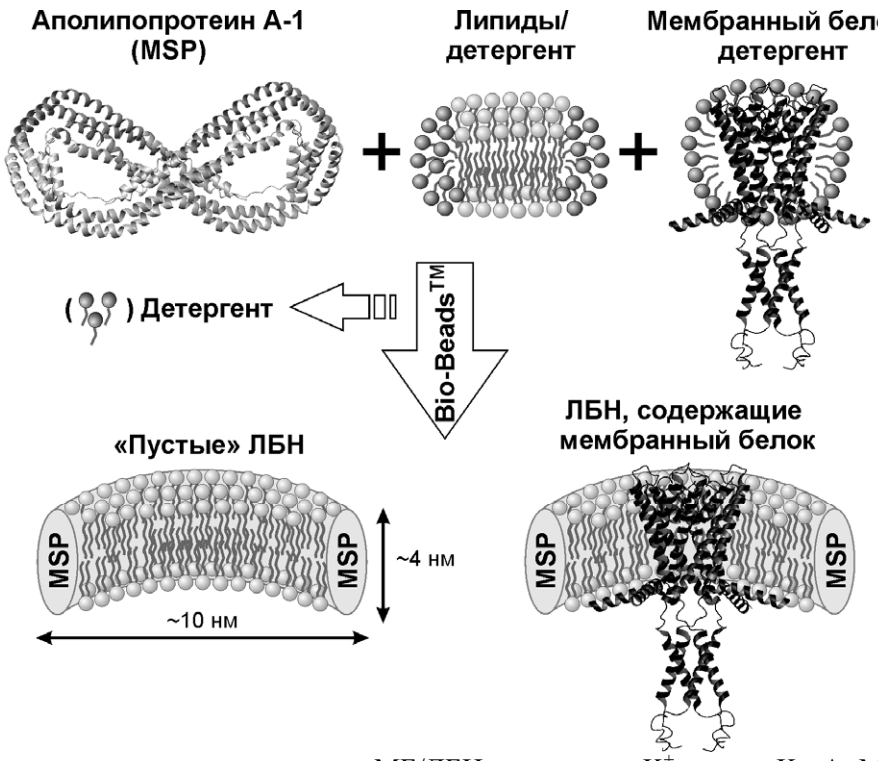


Рис. 2.1. Схема реконструкции комплекса МБ/ЛБН на примере K^+-канала KcsA. Молекулы MSP и KcsA показаны в ленточном представлении на основе структур 1AV1 и 1F6G (база данных PDB). Молекулы липидов изображены светло-серым цветом, а молекулы детергентов – темно-серым. Две молекулы MSP, экранирующие в нанодиске фрагмент мембраны от растворителя, показаны в виде тора.

2.7.2 Практические аспекты приготовления ЛБН/белковых комплексов для ЯМР-спектроскопии.

Описанные в литературе методы реконструкции незрелых частиц липопротеинов высокой плотности или ЛБН *in vitro* основаны на добавлении к MSP раствора липидов в детергенте и последующем постепенном удалении детергента с помощью диализа [124,133,134,139], гель-фильтрации [136] или специализированного сорбента Bio-Beads™ [135,147,149]. В результате удаления детергента из реакционной смеси происходит самопроизвольное формирование нанодисков (Рис. 2.1). При необходимости включения какого-либо МБ в состав нанодиска в реакционную смесь наряду с MSP, липидами и детергентом добавляют мицеллярный раствор целевого белка. Реакционная смесь после отмывания от детергента представляет собой гетерогенную смесь липидных везикул, свободного MSP (в виде растворимых агрегатов различной стехиометрии), «пустых» нанодисков и нанодисков, содержащих МБ. Отметим, что относительное содержание этих компонентов зависит от начального состава реакционной смеси. Так, содержание везикул и свободного MSP можно уменьшить, понизив начальную концентрацию липидов и MSP. Однако низкое содержание липидов и MSP в процессе образования нанодисков может привести либо к необратимой преципитации целевого МБ, либо к встраиванию нескольких молекул МБ в мембрану одного нанодиска. В то же время, высокое

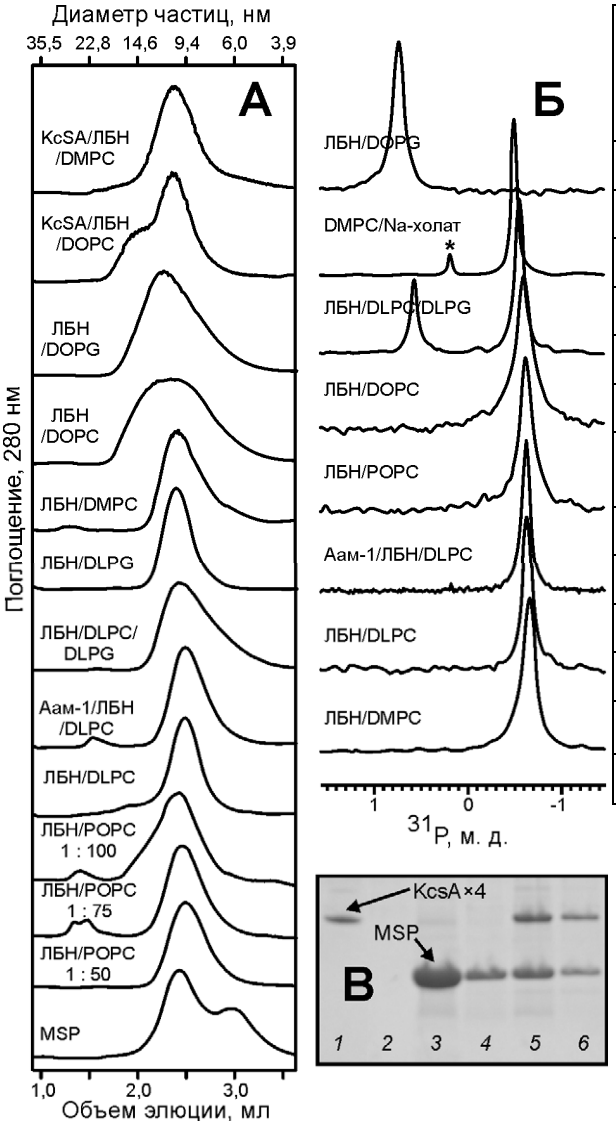
содержание липидов и MSP в реакционной смеси снижает эффективность встраивания МБ в мембрану нанодисков, способствуя образованию побочных комплексов МБ/липидная везикула и МБ/MSP.

Образование гетерогенной смеси компонентов в процессе формирования нанодисков требует использования дополнительных хроматографических этапов очистки. Полученные нами результаты показывают, что гель-фильтрация не позволяет отделить ЛБН от агрегатов свободного MSP, имеющих близкий размер (~ 10.1 нм, Рис. 2.2А, Табл. 2.1). Поэтому мы использовали последовательность MSP, содержащую шесть остатков гистидина в *N*-концевой части молекулы. Это позволило с помощью Ni^{2+}-аффинной хроматографии фракционировать липидные везикулы (элюция с колонки буфером А), «пустые» ЛБН (элюция со смолы 100 мМ имидазолом) и агрегаты MSP (сходят с колонки в присутствии 500 мМ имидазола). Следует отметить, что для фракционирования «пустых» ЛБН и ЛБН, содержащих МБ, в большинстве случаев требуется введение в МБ дополнительных последовательностей, например FLAG, STREP или His_6 (с предварительным отщеплением гистидиновой последовательности от молекулы MSP) [135,136,147,149].

2.7.3 Приготовление «пустых» ЛБН. Зависимость диаметра нанодисков от липидного состава.

Как уже отмечалось, ширина спектральных линий и чувствительность ЯМР-экспериментов сильно зависят от скорости вращательной диффузии белковой молекулы в растворе и, соответственно, от ее размера. При этом следует ожидать, что для мембранного белка в составе ЛБН эффективный размер будет в основном определяться диаметром нанодиска. Таким образом, для использования в ЯМР-спектроскопии наиболее предпочтительны ЛБН наименьшего размера, но, в то же время, сохраняющие свои мембраномоделирующие свойства. Результаты многочисленных исследований показывают, что как полноразмерный апоА-1, так и его фрагмент 44–243 (MSP) способны формировать дискретный ряд липопротеиновых частиц различного диаметра [124,139]. В целях получения стабильных ЛБН наименьшего размера была проведена оптимизация количества липидов, добавляемых в реакцию реконструкции нанодисков. Были исследованы следующие молярные соотношения MSP/липид: 1:50, 1:75 и 1:100. В качестве липида использовали POPC. Полученные ЛБН были очищены на Ni^{2+}-аффинной смоле и проанализированы методом гель-фильтрации (Рис. 2.2А, Табл. 2.1). Как видно на рисунке, при соотношениях MSP/липид 1:50 и 1:75 формируются ЛБН с диаметром 9.5 ± 0.5 нм. При увеличении концентрации липидов до 1:100 наряду с небольшими ЛБН начинают образовываться частицы большего диаметра (~ 12 нм), что приводит к

заметному уменьшению гомогенности образца (Рис. 2.2А). Конечный же выход в реакции реконструкции нанодисков, измеренный по концентрации MSP в составе ЛБН, при соотношении 1:75 был в 2 раза выше, чем при соотношении 1:50, а избыточный свободный MSP в последнем случае находился в виде агрегатов. Таким образом, соотношение MSP/липид 1:75 является оптимальным для формирования «пустых» ЛБН на основе POPC с диаметром ~ 9.5 нм.



Состав комплекса	Молярное отношение MSP/липид	Диаметр комплекса, нм (±0,5 нм)
MSP	–	6.0, 10.1
ЛБН/POPC	1 : 50	9.4
–//–	1 : 75	9.5
–//–	1 : 100	10.1
ЛБН/DLPC	1 : 75	9.5
Aam-1/ЛБН/DLPC	1 : 75	9.6
ЛБН/DLPC/DLPG (4:1)	1 : 75	9.8
ЛБН/DLPG	1 : 75	10.5
ЛБН/DMPC	1 : 75	10.0
ЛБН/DOPC	1 : 75	10.9
ЛБН/DOPG	1 : 75	11.6
KcsA/ЛБН/DMPC	1 : 40	10.9
KcsA/ЛБН/DOPC	1 : 40	10.9, 16.6

Табл. 2.1. Зависимость размера комплексов (по данным гель-фильтрации) с MSP и ЛБН от липидного состава и молярного соотношения MSP/липид

Рис. 2.2. Биохимический и спектральный анализ препаратов ЛБН. (А) Гель-фильтрационные профили агрегатов свободного MSP, «пустых» ЛБН и комплексов KcsA/ЛБН и Aam-I/ЛБН. (Результаты исследования Aam-I в комплексе с ЛБН приведены в главе 4). (Б) Спектры ^{31}P-ЯМР фосфолипидных мембран ЛБН и липида DMPC, солюбилизированного в холате натрия (25°). Сигнал примеси LMPC показан звездочкой. (В) Электрофоретический анализ очистки комплексов KcsA/ЛБН/DMPC на хелат-аффинной смоле. *1* – тетрамер KcsA в DDM; *2* – промывка колонки буфером А; *3,4* – элюция буфером А, содержащим 100 мМ имидазол; *5,6* – элюция буфером А, содержащим 500 мМ имидазол.

Полученные результаты хорошо согласуются с современными представлениями об устройстве ЛБН (Рис. 2.1). Так, в случае нанодиска, состоящего из двух молекул MSP и липидного бислоя из 150 молекул POPC, площадь фрагмента бислоя (~ 49 нм^2) будет соответствовать диаметру ~ 8 нм, что с учетом удвоенной толщины молекулы MSP,

имеющей спиральную конформацию, дает общий диаметр ЛБН ~ 10 нм и согласуется с результатами гель-фильтрации. С учетом близкого значения площади поверхности (0.6–0.7 нм^2/молекула) для всех использованных липидов, для всех последующих экспериментов по реконструкции «пустых» ЛБН применяли соотношение MSP/липид 1:75. Результаты гель-фильтрации для «пустых» ЛБН, содержащих DLPC, DLPG, DMPC, DOPC, DOPG, а также смесь DLPC/DLPG (4:1), приведены на Рис. 2.2А и в Табл. 2.1. Как видно из таблицы, диаметр ЛБН, сформированных из цвиттер-ионных насыщенных липидов (DLPC, DMPC), ~ 10 нм, что близко к ожидаемому значению. В то же время использование цвиттер-ионного липида с двумя ненасыщенными жирнокислотными цепями (DOPC) вело к увеличению диаметра нанодисков. Аналогичный эффект увеличения диаметра ЛБН наблюдался и при использовании заряженных липидов. При этом добавление даже 20% заряженного липида (DLPG) приводило к заметному увеличению диаметра нанодиска (Рис. 2.2А, Табл. 2.1). Наблюдаемый эффект, вероятно, связан с более рыхлой упаковкой мембран нанодисков, вызываемой наличием отрицательного заряда либо присутствием двойных связей в обеих цепях липидной молекулы. Интересно, что наибольший диаметр ЛБН (11.6 нм) был получен в случае DOPG, липида, сочетающего оба этих свойства.

Все полученные препараты «пустых» ЛБН, за исключением нанодисков на основе DLPG, были стабильны не менее трех месяцев при комнатной температуре и не менее недели при температуре 45°C. ЛБН, сформированные из DLPG, были нестабильны и распадались с преципитацией липидов в течение нескольких дней. Этот эффект по-видимому, связан со сравнительно высокой растворимостью молекул DLPG, обусловленной как короткими жирнокислотными цепями, так и зарядом полярной головы липида.

2.7.4 ^{31}P-ЯМР-спектроскопия фосфолипидных мембран нанодисков.

Для проверки теоретических предсказаний об изотропной реориентации ЛБН в растворе была использована ^{31}P-ЯМР-спектроскопия (Рис. 2.2Б). Спектры фосфолипидных мембран нанодисков на основе фосфатидилхолина имели вид одного узкого изотропного сигнала в районе -0.6…-0.7 м.д., а для мембран на основе фосфатидилглицерина наблюдался сигнал в районе 0.7–0.8 м.д. Полученные значения хорошо согласуются со значениями изотропных химических сдвигов липидов в составе липосом, наблюдаемых методами ЯМР твердого тела при вращении под магическим углом [328]. Это свидетельствует об изотропном вращении ЛБН в растворе и об отсутствии преимущественной ориентации этих частиц в магнитном поле ЯМР-спектрометра. Следует отметить, что в ЛБН на основе смеси DLPC/DLPG (4:1)

наблюдается сдвиг сигналов фосфатных групп фосфатидилхолина и фосфатидилглицерина в сторону значений, наблюдаемых для липидов, солюбилизированных холатом натрия (-0.5 и +0.5 м.д., соответственно [329]) (Рис. 2.2Б).

2.7.5 Реконструкция комплексов KcsA/ЛБН.

Возможность применения ЯМР-спектроскопии для исследования мембранных белков, интегрированных в мембрану ЛБН, была изучена на примере ^{15}N-меченого аналога бактериального калиевого канала KcsA (*Streptomyces lividans*). Согласно данным рентгеноструктурного анализа [254,330], ЯМР-спектроскопии [61,62] и ЭПР-спектроскопии [331], KcsA состоит из четырех одинаковых субъединиц, окружающих пору канала (Рис. 2.1). Каждая субъединица, в свою очередь, имеет в своем составе экспонированные в растворитель *N*- и *C*-концевые спиральные домены, а также ТМ-домен, состоящий из двух ТМ-спиралей и находящихся между ними Р-спирали и селективного фильтра.

Для реконструкции KcsA/ЛБН использовали рекомбинантный KcsA, выделенный из бактериальной мембраны *E. coli* в виде тетрамера и солюбилизованный в DDM.[1] Для формирования ЛБН были опробованы различные липидные составы: цвиттер-ионные липиды (DOPC, DMPC и POPC) и частично анионная смесь (DOPG/DOPE 7:3). Полученные нанодиски были проанализированы с помощью SDS-электрофореза (Рис. 2.2В) и гель-фильтрации (Рис. 2.2А, Табл. 2.1). Было обнаружено, что во всех случаях, за исключением смеси DOPG/DOPE, происходит формирование комплексов, содержащих тетрамер KcsA. Анализ полученных комплексов с помощью гель-фильтрации показал, что наиболее гомогенны нанодиски, полученные на основе POPC и DMPC (диаметр частиц ~ 10.9 нм). Препарат ЛБН на основе DOPC (Рис. 2.2А) содержал примесь частиц большего размера (диаметр > 16 нм), что, возможно, было обусловлено эффектом слияния нанодисков, также известном как ремоделирование липопротеиновых частиц высокой плотности (lipoprotein remodeling) [332,333]. В случае формирования нанодисков на основе смеси DOPG/DOPE происходила диссоциация тетрамеров KcsA на мономеры и преципитация МБ. Это наблюдение противоречит опубликованным данным, в соответствии с которыми смесь DOPG/DOPE была признана оптимальной для ренатурации KcsA *in vitro* [334]. Неэффективность образования нанодисков данного состава, возможно, связана с неспособностью молекулы MSP стабилизировать липидный бислой с большой отрицательной спонтанной кривизной, обусловленной молекулами фосфатидилэтаноламина.

[1] Образец KcsA был любезно предоставлен к.б.н. Некрасовой О.В. (группа нанобиоинженерии, отдел биоинженерии ИБХ РАН, руководитель академик Кирпичников М.П.).

Исходя из предположения, что более плотная упаковка, свойственная насыщенным липидам, может уменьшить внутримолекулярную динамику МБ, ухудшающую качество ЯМР-спектров, было принято решение использовать DMPC для реконструкции ЛБН, содержащих ^{15}N-меченый вариант KcsA. При этом все этапы реконструкции, очистки и диализа проводили при температуре не ниже температуры фазового перехода DMPC (24ºC). Для подбора оптимальных условий реконструкции были опробованы различные соотношения KcsA/MSP (1:10, 1:20) и MSP/DMPC (1:20, 1:40, 1:75, 1:100). Наибольшая эффективность встраивания (~ 70 %) наблюдалась при соотношениях KcsA/MSP 1:20 и MSP/DMPC 1:40. Именно эти соотношения и были использованы для приготовления образца, содержащего ^{15}N-меченый аналог KcsA.

2.7.6 ЯМР-спектроскопия ^{15}N-KcsA в составе нанодисков.

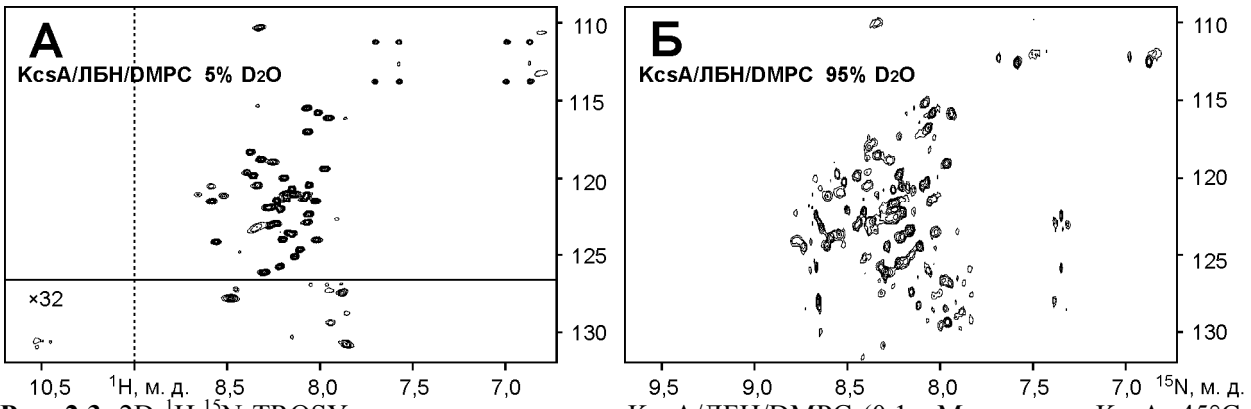


Рис. 2.3. 2D ^{1}H,^{15}N-TROSY-спектры комплексов KcsA/ЛБН/DMPC (0.1 мМ тетрамер KcsA, 45°C, pH 3.8). (А) Раствор H_2O (5% D_2O), амплитуды сигналов на врезке увеличены в 32 раза. (Б) Раствор D_2O (< 5% H_2O). Обмен амидных протонов KcsA на дейтерий растворителя происходил в течение 60 дней при комнатной температуре.

В 2D ^{1}H,^{15}N-HSQC спектре комплекса ^{15}N-KcsA/ЛБН/DMPC наблюдалось 40–50 интенсивных сигналов с $\Delta\nu^{1}H^{N}$ = 20–30 Гц. Сравнение этого спектра с опубликованными спектрами ^{2}H,^{15}N-меченого KcsA в мицеллах DPC и SDS [61,62] показывает, что наблюдаемые сигналы принадлежат *N*- и *C*-концевым спиральным доменам канала, экспонированным в растворитель. Применение методики TROSY привело к незначительному уменьшению полуширины «узких» сигналов (в среднем на 3–5 Гц), однако стали видны и более широкие и слабые сигналы ($\Delta\nu^{1}H^{N}$ = 50–80 Гц), по-видимому, принадлежащие трансмембранной части канала (Рис. 2.3А). Идентификация этих «широких» сигналов была сильно затруднена из-за фона «узких» сигналов. Для ослабления интенсивности ЯМР-сигналов от экспонированных в растворитель доменов KcsA в препарате KcsA/ЛБН/DMPC содержание D_2O было увеличено с 5 до 95% путем последовательного разведения и концентрирования. Согласно литературным данным [61], предполагалось, что в течение двух месяцев при комнатной температуре в растворе 95%-

ного D_2O все HN-протоны экспонированных доменов будут заменены на дейтерий растворителя, в то время как HN-протоны ТМ-доменов, экранированные от растворителя мембраной ЛБН, практически не претерпят обмена. Измеренный через 60 дней 2D $^{1}H,^{15}N$-TROSY-спектр подтвердил сделанное предположение (интенсивность «узких» сигналов значительно уменьшилась, обнаружив большое количество «широких» сигналов (Рис. 2.3Б)). ^{31}P-ЯМР-анализ комплексов KcsA/ЛБН/DMPC подтвердил изотропный характер вращения этих частиц в растворе. Полученные препараты KcsA/ЛБН оставались стабильны в течение восьми месяцев.

Следует отметить, что возможность проведения структурных ЯМР-исследований гидрофобных (нерастворимых в воде) пептидов, ассоциированных с мембраной ЛБН, была показана на примере каналообразующего антибиотика антиамебина I. Результаты этого исследования приведены в п. 4.2, Глава 4.

2.7.7 Возможность прямых структурных ЯМР-исследований комплексов МБ/ЛБН, полученных в результате бесклеточного синтеза.

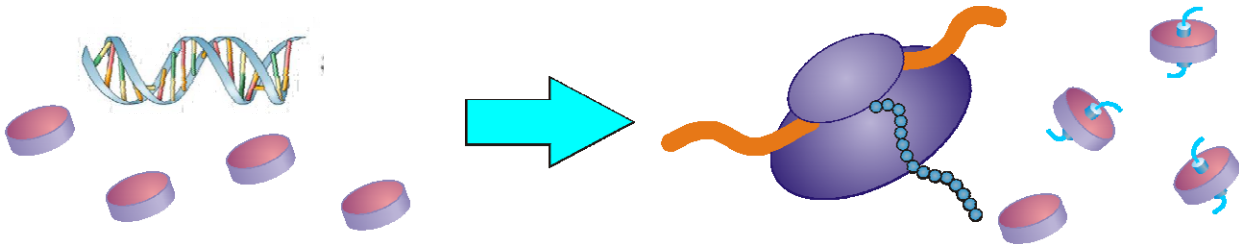


Рис. 2.4. Схема «ко-трансляционной» инкапсуляции молекул МБ в нанодиски в бесклеточной белоксинтезирующей системе.

Альтернативным способом встраивания МБ в нанодиски является бесклеточный синтез белка в присутствии предварительно сформированных «пустых» ЛБН [71,73] (Рис. 2.4). В этом случае происходит «ко-трансляционное» встраивание синтезируемого МБ в ЛБН, и белок накапливается в растворимой фракции трансляционной среды. Для анализа возможности прямых ЯМР-исследований комплексов МБ/ЛБН, полученных в ББС, в качестве объекта исследования использовали ТМ домен рецепторной тирозинкиназы ErbB3 человека (TM-ErbB3). Этот рецептор, содержащий одну ТМ спираль, образует гомодимеры в липидной мембране и в качестве гетеродимера с другими представителями тирозинкиназ семейства ErbB участвует в механизмах межклеточной сигнализации (клеточное узнавание, пролиферация, дифференцировка). В работе использовали вариант TM-ErbB3 (остатки 639-670), содержащий *C*-концевую His_6 последовательность[1].

Были получены тотально ^{15}N-^{13}C-меченый вариант и несколько селективно ^{15}N-меченых вариантов TM-ErbB3 в комплексе с ЛБН/DMPG. Анализ 3D HNCO спектра

[1] Бесклеточная продукция TM-ErbB3 выполнена к.б.н. Люкмановой Е.Н. и Хабибуллиной Н.Ф. (лаборатория биоинженерии белка, отдел биоинженерии ИБХ РАН).

^{15}N-^{13}C-меченого варианта показал наличие сигналов для всех 34 аминокислотных остатков домена. В 3D HNCA спектре были идентифицированы сигналы C^{α} атомов практически для всех спиновых систем, однако большая ширина линий позволила провести последовательное отнесение сигналов только для *N*-концевого участка домена (Met1-Thr4, Рис. 2.5Б). Сравнение ЯМР-спектров различных селективно ^{15}N-меченых вариантов TM-ErbB3 позволило определить положения сигналов остатков Ala, Gly, Ile, Leu, Val, Met, Phe, Tyr, Trp (Рис. 2.5Г). Сравнение со спектрами гомодимера TM-ErbB3, полученными ранее в окружении мицелл DPC [105], позволило получить «предполагаемое» отнесение ^{1}H^{15}N сигналов амидных групп для 27 (из 34+6His) остатков домена. Таким образом, была показана принципиальная возможность прямых структурных исследований препаратов МБ, синтезированных в присутствии ЛБН.

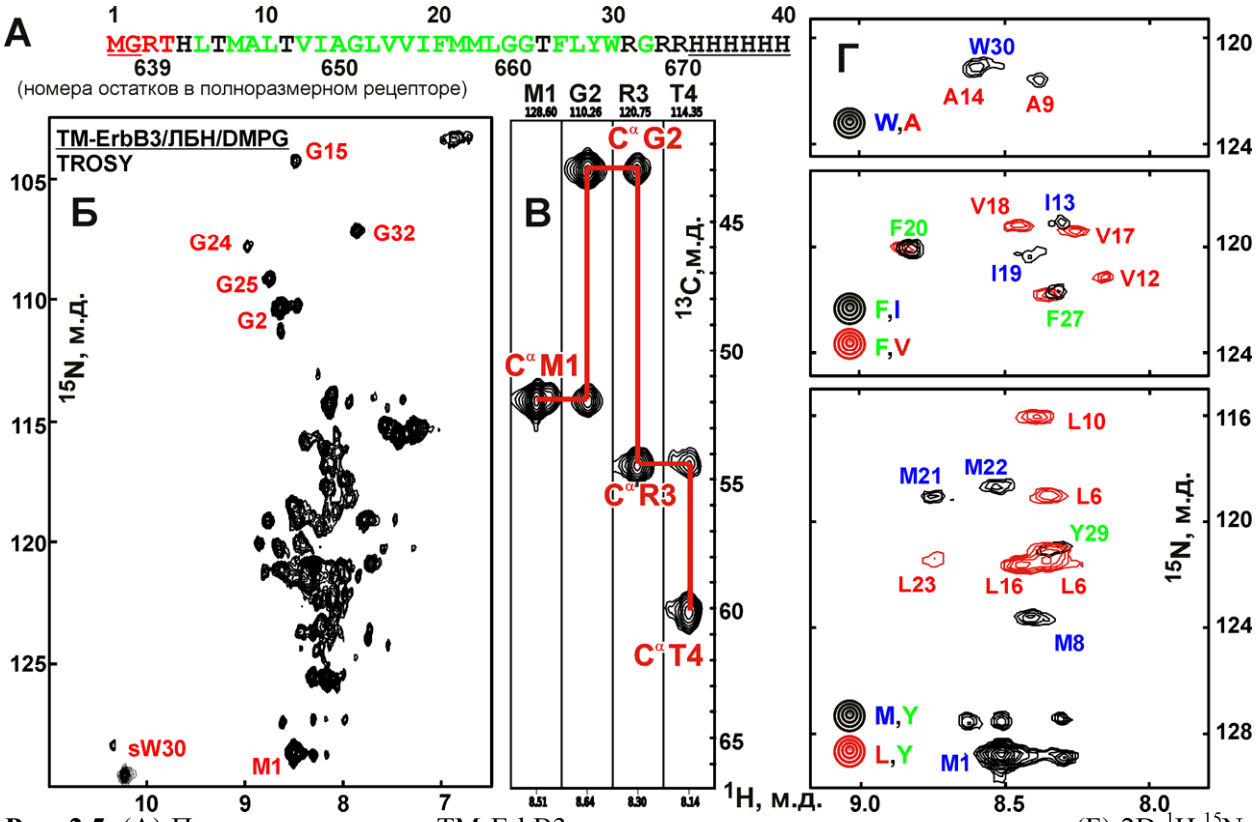


Рис. 2.5. (А) Последовательность TM-ErbB3, отнесенные остатки показаны цветом. (Б) 2D ^{1}H,^{15}N-TROSY и (В) фрагменты 3D HNCA спектра тотально ^{15}N-^{13}C-меченого домена в комплексе с ЛБН/DMPG. Показано последовательное отнесение сигналов $^{13}C^{\alpha}$ 4-х *N*-концевых остатков домена, а также отнесение остатков Gly. (Г) Сравнение 2D ^{1}H,^{15}N-TROSY спектров селективно ^{15}N-меченых вариантов TM-ErbB3 в комплексе с ЛБН/DMPG. Показано отнесение сигналов остатков Ala, Ile, Leu, Val, Met, Phe, Tyr и Trp.

2.7.8 Резюме

Результаты, изложенные в этом разделе (получены в 2008-2013 годах), впервые теоретически и экспериментально показали возможность применения ЛБН для ЯМР-исследований интегральных МБ. По сравнению с классическими мембранными миметиками, мицеллами и небольшими сферическими бицеллами, традиционно применяемыми в ЯМР-спектроскопии, нанодиски характеризуются рядом уникальных

свойств. Нанодиски более стабильны, а фрагмент плоской бислойной мембраны в их составе гораздо лучше моделирует биологическую мембрану, чем сферическая динамически подвижная поверхность бицеллы/мицеллы. ЛБН в отличие от липидных везикул характеризуются меньшими размерами, что значительно расширяет спектр экспериментальных методик, которые могут быть применены для исследования встроенных белков. Препараты, основанные на нанодисках, легко поддаются смене буфера посредством диализа и могут быть сконцентрированы или разбавлены до необходимой концентрации. Кроме того, интегральные мембранные белки, встроенные в нанодиски, оказываются защищенными от нежелательных межмолекулярных взаимодействий [149], что обеспечивает стабильность белковых препаратов в течение длительного времени. Возможность использования для формирования нанодисков различных липидов и их смесей открывает интересные перспективы для исследования мембранных белков в практически природном окружении.

Основным недостатком предлагаемой среды являются сравнительно большие размеры мембраномоделирующих комплексов, что ведет к значительному увеличению скорости поперечной релаксации ядерной намагниченности, увеличению ширины сигналов и, соответственно, к снижению чувствительности ЯМР-экспериментов. В работе в окружении ЛБН получены интерпретируемые ЯМР-спектры мобильных, экспонированных в растворитель доменов калиевого канала KcsA и ТМ домена рецепторной тирозинкиназы ErbB3 человека. Ширина сигналов ЯМР ($\Delta\nu^1H^N$) для ТМ участков белков составила 50–60 Гц и более.

Одним из возможных способов решения этой проблемы является создание методами биоинженерии новых белков MSP, позволяющих формировать нанодиски меньшего диаметра. В 2013 году две независимые группы исследователей из США опубликовали результаты подобных исследований. В одной из этих работ из молекулы MSP1, которую условно можно разбить на 10 спиральных участков H1-H10, удаляли *C*-концевые фрагменты, соответствующие спиралям H8-H10, что позволило получить ЛБН диаметром от ~ 7 нм [141]. В другой работе из середины молекулы MSP1 удаляли фрагменты, соответствующие спиралям H4, H5 и H6, что позволило получить ЛБН диаметром от 8 до 6 нм [142]. В наиболее стабильных нанодисках диаметром 8 нм (MSP1D1ΔH5, DMPC/DPMG 3:1) была определена пространственная структура белка OmpX из внешней мембраны *E. coli*, имеющего структуру β-бочонка [142]. В то же время, использование 8 нм ЛБН не позволило получить спектры спирального МБ бактериородопсина (7ТМ) с качеством, достаточным для определения пространственной структуры.

2.8 Фолдинг интегральных МБ *in vitro* в средах на основе нанодисков

В работе предложен новый метод ренатурации (фолдинга *in vitro*) рекомбинантных МБ, полученных в результате гетерологической экспрессии в бактериальных клетках или бесклеточных системах синтеза в функционально неактивной форме. Предложенный метод основан на использовании аполипопротеинов или их синтетических аналогов (MSP), основной белковой компоненты липид-белковых нанодисков, и включает в себя несколько этапов (Рис. 2.6).

1. Рекомбинантный белок, полученный в функционально неактивной форме, солюбилизируют в жестком денатурирующем детергенте (смеси детергентов, возможно, с добавлением хаотропных агентов), способном поддерживать белок в растворимой мономерной форме, но не способном поддерживать нативную конформацию белка.
2. К препарату денатурированного белка добавляют все компоненты, необходимые для сборки нанодисков: липиды, молекулы аполипопротеинов (MSP), а также дополнительные детергенты.
3. Фолдинг белка инициируют удалением детергентов из раствора. При этом фолдинг белка происходит одновременно с образованием нанодисков. В результате получают нанодиски, содержащие ренатурированный (функционально-активный) МБ.
4. Очистка полученных комплексов может осуществляться с использованием аффинной хроматографии или гель-фильтрации.

Применимость предложенного подхода была протестирована на примере двух политопных (имеющих в своем составе несколько ТМ спиралей) МБ: бактериородопсина грамположительной психрофильной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (ESR, 7TM) и K^+-канала KcsA (2TM, гомотетрамер)[1].

2.1.1 Ренатурация KcsA с использованием ЛБН различного липидного состава.

Как было указано в п. 2.1.5, канал KcsA состоит из 4-х одинаковых субъединиц, которые окружают ионопроводящую пору (см. Рис. 2.6). Тот факт, что гомотетрамер канала в нативной конформации стабилен в окружении жесткого детергента SDS, позволяет использовать метод SDS-электрофореза для анализа олигомерного состояния

[1] Белковые препараты были получены в отделе биоинженерии ИБХ РАН. Рекомбинантный аналог ESR, содержащий *C*-концевую His_6 последовательность, получен либо в бактериальной системе (*E. coli*) к.х.н. Петровской Л.Е., либо методом бесклеточного синтеза к.б.н. Люкмановой Е.Н. и Копеиной Л.С. Рекомбинантный аналог KcsA, содержащий *C*-концевую His_6 последовательность, получен к.б.н. Некрасовой О.В. в бактериальной системе (*E. coli*).

KcsA [335]. KcsA, имеющий нативную тетрамерную организацию (tKcsA), выделенный в мягких условиях (1% DDM) из мембран *E. coli*, был денатурирован до мономера (mKcsA) путем осаждения с помощью трихлоруксусной кислоты и последующего растворения в жестком детергенте SDS. Согласно данным, полученным методом ЯМР-спектроскопии, mKcsA в окружении SDS имеет состояние частично денатурированного МБ, которое характеризуется нарушениями вторичной и третичной структуры [336]. Более того, мономер mKcsA, солюбилизированный в SDS, не может спонтанно образовывать гомотетрамер tKcsA.



Рис. 2.6. Метод ренатурации (фолдинга) МБ *in vitro* с использованием ЛБН, предложенный в работе. Фолдинг МБ происходит одновременно со сборкой ЛБН.

Для рефолдинга денатурированный образец mKcsA/SDS смешивали с компонентами ЛБН (MSP, липиды различного состава), растворенными в детергенте холат-натрия. Затем из этой смеси удаляли детергенты с помощью специфического сорбента (Biobeads^{TM}), в результате чего происходило самообразование нанодисков с одновременным включением тетрамерной формы tKcsA в мембраны ЛБН (Рис. 2.7).

Для исследования зависимости эффективности процесса ренатурации KcsA от состава мембраны нанодисков использовали следующие липиды и их смеси: ненасыщенные липиды (DOPG/DOPE 1:1, POPC и POPC/DOPG 4:1) и насыщенные (DMPG, DMPC). Полученные комплексы ЛБН/KcsA очищали на Ni^{2+}-аффинной смоле и анализировали с помощью гель-фильтрации и SDS-электрофореза (Рис. 2.7). Согласно данным электрофореза во всех случаях происходило формирование комплексов, содержащих тетрамер tKcsA. Однако эффективность образования тетрамера значительно зависела от липидного состава ЛБН (Табл. 2.2). Как оказалось, наибольшая эффективность встраивания KcsA в ЛБН (~90%) и наибольшая эффективность образования тетрамера в составе ЛБН (~ 100%) наблюдалась при использовании цвиттер-ионных ненасыщенных липидов (POPC, общая эффективность реакции ренатурации ~90%). При использовании частично анионной смеси POPC/DOPG, общая эффективность ренатурации была ниже

(~50%), а в присутствии анионных насыщенных липидов (DMPG) наблюдалась значительная фракция нанодисков, содержащих мономер канала mKcsA. С другой стороны, использование цвиттер-ионных насыщенных липидов (DMPC) для ренатурации оказалось крайне неэффективным (~10%).

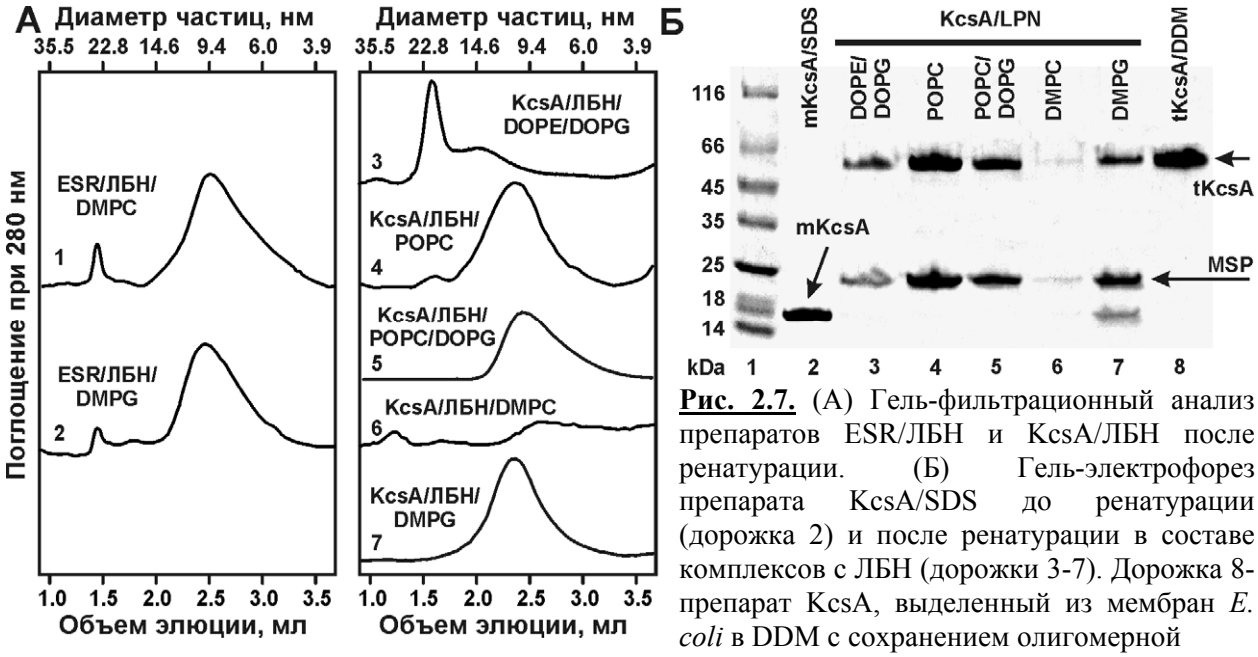


Рис. 2.7. (А) Гель-фильтрационный анализ препаратов ESR/ЛБН и KcsA/ЛБН после ренатурации. (Б) Гель-электрофорез препарата KcsA/SDS до ренатурации (дорожка 2) и после ренатурации в составе комплексов с ЛБН (дорожки 3-7). Дорожка 8-препарат KcsA, выделенный из мембран *E. coli* в DDM с сохранением олигомерной организации. Стрелками показаны полосы, соответствующие MSP, мономеру mKcsA и тетрамеру tKcsA.

Анализ полученных комплексов с помощью гель-фильтрации подтвердил формирование нанодисков ожидаемого размера (диаметр ~ 10 нм) при использовании POPC, DMPG и POPC/DOPG. В случае DOPG/DOPE формировались большие частицы (диаметр ~ 20 нм), что, вероятно, было связано с неспособностью молекулы MSP стабилизировать липидный бислой с большой отрицательной спонтанной кривизной, обусловленной молекулами фосфатидилэтаноламина. Этот результат согласуется с данными, полученными ранее (п. 2.1.5) при формировании комплексов KcsA/ЛБН из тетрамера белка, солюбилизированного в мягком детергенте DDM.

Липидный состав ЛБН	DOPE/DOPG (7:3)	POPC	POPC/DOPG (7:3)	DMPC	DMPG
Заряд полярных головок	±/-	±	±/–	±	–
Насыщенность цепей	–	–	–	+	+
Формирование 10 нм ЛБН	–	+	+	–	+
Общий выход инкапсуляции KcsA в ЛБН, %	**31**	**90**	**49**	**7**	**55**
Содержание tKcsA, %	**100**	**100**	**100**	**100**	**64**

Табл. 2.2. Зависимость эффективности ренатурации KcsA от липидного состава ЛБН. Количество tKcsA и mKcsA в комплексе с ЛБН после очистки препаратов на Ni^{2+}-аффинной смоле оценивали методом денситометрии, используя гель-электрофорограммы, окрашенные Кумасси G-250. Приведенные значения рассчитаны относительно начального количества tKcsA, использованного для цикла денатурации/фолдинга. Ошибка измерения не превышала 15%.

В п. 2.1.5 было показано, что гомотетрамер tKcsA, солюбилизированный в DDM, встраивается в нанодиски, содержащие DMPC, с практически количественными выходами

(~ 70%). Для установления возможной причины низкой эффективности формирования комплексов tKcsA/ЛБН/DMPC из денатурированного состояния mKcsA/SDS, был проведен ряд дополнительных экспериментов по сборке «пустых» нанодисков (не включающих целевой МБ) различного липидного состава. Используя метод ^{1}H,^{13}C-ЯМР-спектроскопии на натуральном содержании изотопа ^{13}C, анализировали скорость и полноту удаления детергентов (SDS, холат натрия) в процессе сборки нанодисков (Рис. 2.8). Как оказалось, при сборке нанодисков из насыщенного липида DMPC (по сравнению с ненасыщенным липидом POPC) происходит неполное удаление обоих детергентов (Табл. 2.3). При этом, согласно данным гель-фильтрации, остаточные количества детергентов (1-2 молекулы на нанодиск) не препятствуют формированию ЛБН (Рис. 2.8А). В то же время замедленное удаление жесткого детергента SDS может приводить к преципитации KcsA в ходе процесса сборки нанодисков.

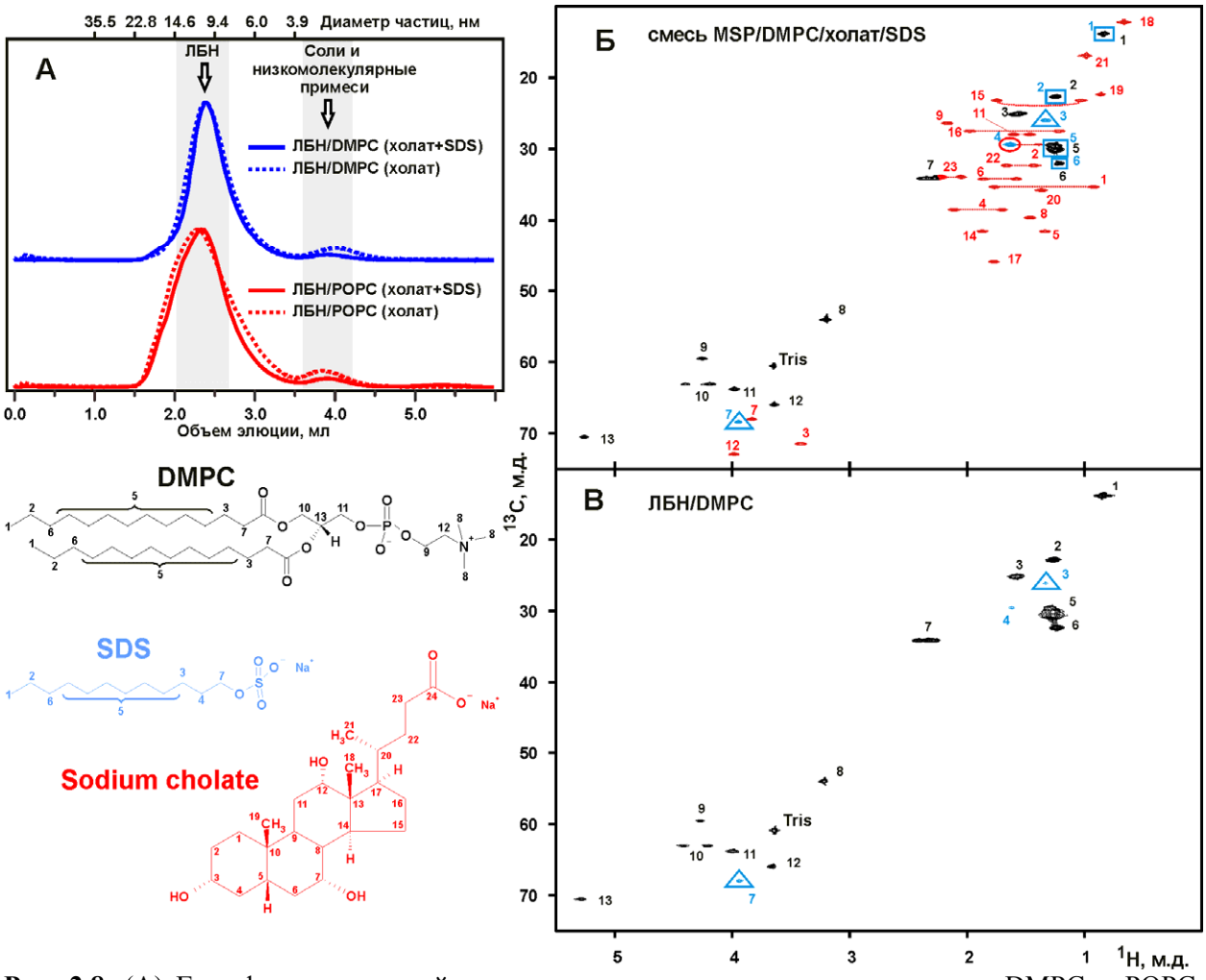


Рис. 2.8. (А) Гель-фильтрационный анализ «пустых» нанодисков, содержащих DMPC и POPC, собранных с использованием обычного протокола и с добавлением жесткого детергента SDS. Образцы анализировали сразу после инкубации со специфическим сорбентом (Biobeads^{TM}). (Б, В) 2D ^{1}H,^{13}C-HSQC ЯМР-спектр (натуральное содержание ^{13}C) смеси MSP/DMPC/SDS/холат натрия перед (Б) и после (В) инкубации с Biobeads^{TM}. Сигналы, принадлежащие DMPC, холату и SDS показаны черным, красным и синим, соответственно. Перекрытые сигналы обозначены прямоугольниками и эллипсами. Сигналы, использованные для измерения концентрации SDS, обозначены треугольниками. Слева показаны структуры DMPC, холата натрия и SDS.

Концентрация детергента, мМ	ЛБН/DMPC		ЛБН/POPC	
	SDS	холат натрия	SDS	холат натрия
Начальная	11.5	37.5	11.5	37.5
После инкубации с Biobeads^{TM}	0.7	0.19	0.35	0.08
После очистки ЛБН на Ni^{2+}-смоле	0.04	0.004	< 0.03	< 0.002

Табл. 2.3. Зависимость эффективности удаления детергентов в ходе «сборки» нанодисков от липидного состава.

2.1.2 Ренатурация бактериородопсина ESR

ESR получали либо с помощью бесклеточной системы синтеза в виде осадка трансляционной смеси, либо в ходе экспрессии в мембране *E. coli* с последующей экстракцией мягким детергентом DDM (1%) и осаждением в трихлоруксусной кислоте. В обоих случаях полученные осадки солюбилизировали в жестком детергенте SDS, что приводило к частичной денатурации белка. Формирование частично денатурированного состояния ESR в окружении SDS было подтверждено следующими экспериментальными данными.

1. Титрование образца ESR/SDS кофактором all-*trans*-ретиналем не выявило специфического поглощения на длине волны 534 нм.
2. Избыток SDS, добавленный к спектроскопически активному образцу ESR/DDM, приводил к быстрому (характерное время < 60 с) разрушению ретиналь-связывающего кармана МБ, что отражалось на сдвиге полосы поглощения хромофора из 534 в 440 нм (Рис. 2.9АБ). За этим процессом следовала более медленная (характерное время ~ 2.2×103 с) реакция диссоциации ретиналя, сопровождаемая появлением полосы поглощения при 390 нм, характерной для свободного хромофора (Рис. 2.9Б).
3. Сравнение КД-спектров ESR в окружении DDM и SDS выявило небольшие изменения во вторичной структуре белка (Рис. 2.9Е), а именно уменьшение содержания α-спиральных элементов. В нативном белке в мицеллах DDM содержание α-спиралей, β-тяжей, β-поворотов и неупорядоченной структуры составляло 66%, 5%, 10%, и 19%, соответственно. В то время как значения этих же параметров в SDS были равны 52%, 7%, 15%, и 25%.

Для фолдинга ESR была использована модифицированная процедура сборки нанодисков: формирование ЛБН проводили из смеси, содержащей только один детергент SDS, то есть из реакции сборки нанодисков был исключен дополнительный детергент, – холат-натрия. (Холат-натрия по строению схож с детергентом CHAPS который, в смеси с липидами, способен вызывать спонтанную ренатурацию бактериородопсина, денатурированного с помощью SDS [337]). Сборку нанодисков проводили в присутствии кофактора all-*trans*-ретиналя. В результате были получены комплексы ЛБН/ESR с

насыщенными липидами DMPC или DMPG, содержащие активный бактериородопсин (Рис. 2.9Г). Общая эффективность ренатурации ESR с использованием нанодисков не зависела от способа продукции целевого белка (клеточная или бесклеточная продукция) и составила около 30% в случае DMPC и 60% в случае DMPG[1]. При этом разница в выходах была обусловлена в основном эффективностью встраивания МБ в нанодиски различного липидного состава (~ 40% и 75% для DMPC и DMPG, соответственно). Доля активного родопсина по отношению к количеству встроенного белка была примерно одинакова в обоих случаях (~ 80%) (Рис. 2.9Г). Таким образом, было показано, что общая эффективность процесса ренатурации в основном определяется эффективностью встраивания МБ в ЛБН и зависит от состава мембраны нанодисков.

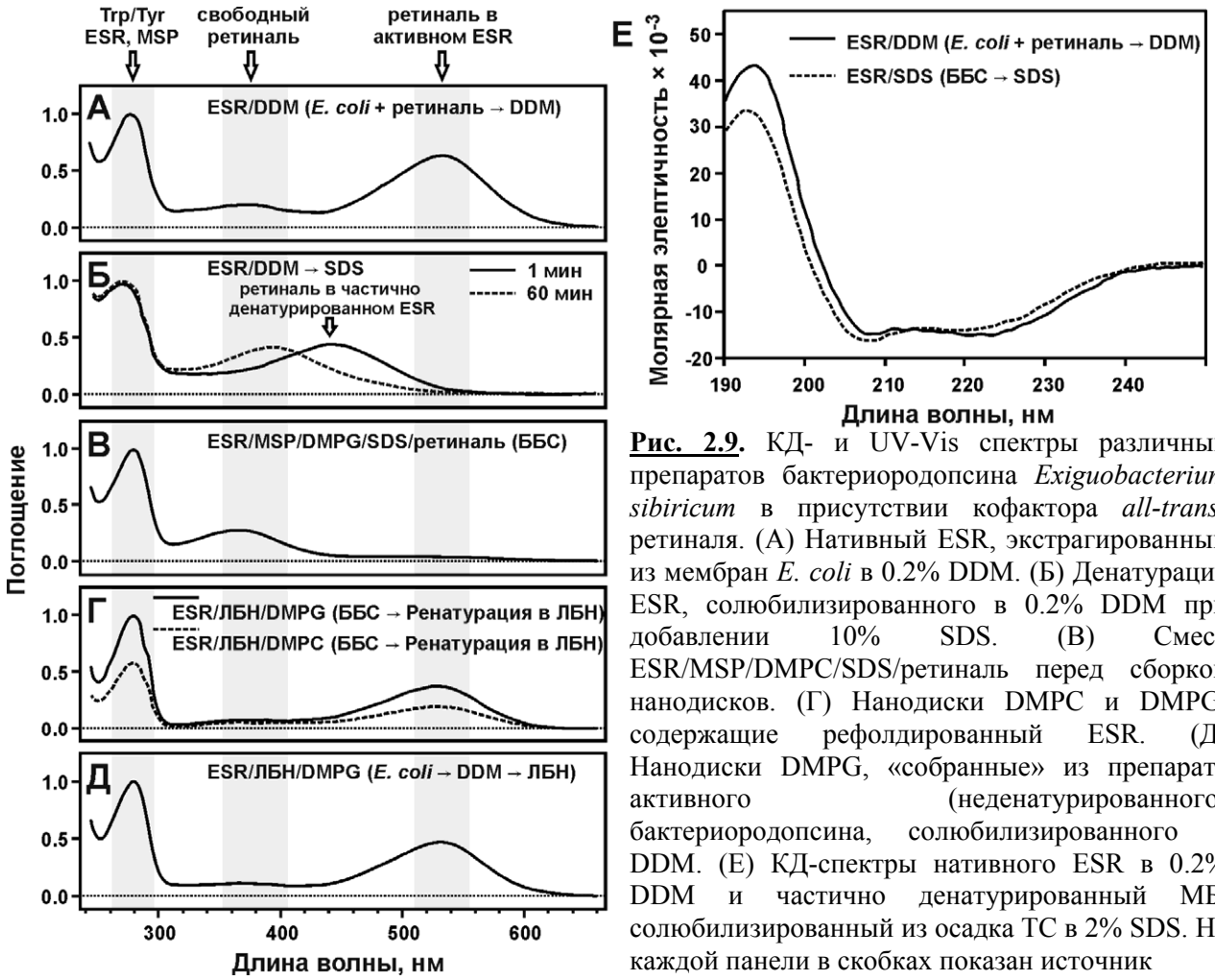


Рис. 2.9. КД- и UV-Vis спектры различных препаратов бактериородопсина *Exiguobacterium sibiricum* в присутствии кофактора *all-trans*-ретиналя. (А) Нативный ESR, экстрагированный из мембран *E. coli* в 0.2% DDM. (Б) Денатурация ESR, солюбилизированного в 0.2% DDM при добавлении 10% SDS. (В) Смесь ESR/MSP/DMPC/SDS/ретиналь перед сборкой нанодисков. (Г) Нанодиски DMPC и DMPG, содержащие рефолдированный ESR. (Д) Нанодиски DMPG, «собранные» из препарата активного (неденатурированного) бактериородопсина, солюбилизированного в DDM. (Е) КД-спектры нативного ESR в 0.2% DDM и частично денатурированный МБ, солюбилизированный из осадка ТС в 2% SDS. На каждой панели в скобках показан источник получения рекомбинантного белка (*E. coli* или ББС).

2.1.3 Резюме

Резюмируя полученные результаты, можно сделать несколько выводов:

1. Предложен новый метод ренатурации (фолдинга *in vitro*) политопных и субъединичных спиральных МБ, основанный на сборке комплексов МБ/ЛБН

[1] Для оценки выхода реакции фолдинга концентрацию активного бактериородопсина ESR оценивали по поглощению при 534 нм. Общую концентрацию ESR измеряли, используя моноклональные антитела против His_6 последовательности.

напрямую из денатурированного состояния МБ (из раствора жесткого(оих) детергента). Применимость подхода протестирована для двух МБ. В обоих случаях была осуществлена успешная ренатурация белковых препаратов с количественными выходами до 60-90%.

2. Выявлена значительная зависимость эффективности процесса ренатурации от свойств липидных молекул, используемых для формирования нанодисков (заряд полярных головок, степень насыщенности жирнокислотных цепей). Общий выход рефолдинга в основном определяется эффективностью встраивания МБ в ЛБН.
3. Показано, что низкая эффективность формирования комплексов МБ/ЛБН (и соответственно низкая эффективность ренатурации) в некоторых случаях может быть вызвана замедленным или не полным удалением жестких детергентов (например, SDS) в процессе сборки нанодисков.

2.9 Возможность использования ЛБН для структурных и биофизических исследований водорастворимых МП.

Данные, полученные в представленной работе, а также результаты исследований, проведенных рядом зарубежных лабораторий (см. Разд. 1.4, Глава 1), показали возможность использования мембраномоделирующих сред на основе нанодисков для солюбилизации и исследования мембранных белков и гидрофобных (слаборастворимых в воде) пептидных молекул. Однако, мембранные миметики, имеющие свойства, близкие к бислойной мембране, также необходимы для исследований некоторых классов водорастворимых пептидных молекул, таких как антимикробные мембраноактивные пептиды (АП) и пептиды, действующие на мембранные рецепторы со стороны гидрофобного региона бислоя. Для этих классов пептидных молекул специфические взаимодействия пептид/мембрана играют важную функциональную роль, модулируя их действие.

Вопрос о применимости мембраномоделирующих сред на основе ЛБН для структурных и биофизических исследований водорастворимых МП ранее не изучался. Следует отметить, что этот вопрос не является тривиальным, так как ЛБН, в отличие от везикул, бицелл и мицелл, содержат дополнительную компоненту, – MSP, которая является анионным белком (в работе использовали фрагмент 44–243 аполипопротеина А-1 человека, имеющий при физиологических условиях заряд -6), в то время как большинство МП обладают положительным зарядом.

В рамках работы для исследования взаимодействия водорастворимых МП с нанодисками были использованы модельные β-структурные пептиды, которые имеют

различные физико-химические свойства и представляют два класса мембраноактивных соединений. АП ареницин-2[1] (Ar2, 21 а.о., 2772 Да, заряд +6, средний индекс гидрофобности по шкале Kyte и Doolittle [338] –0.06[2].) из целомоцитов морского многощетинкового червя *Arenicola marina* (пескожил) селективно взаимодействует с мембранами, содержащими отрицательно заряженные липидные молекулы, и образует в них олигомерные поры (см. п. 3.3, Глава 3). Нейротоксин II[3] (NTII, 61 а.о., 6885 Да, заряд +4, индекс гидрофобности –1.10) из яда кобры *Naja oxiana* блокирует активацию никотинового ацетилхолинового рецептора, связываясь с его внеклеточным доменом, но, возможно, также использует механизм «мембранного катализа», взаимодействуя с полярными головками фосфатидилсерина (PS) из мембранного окружения рецептора [339]. Результаты исследования еще одного водорастворимого МП, токсина VsTx1, в окружении ЛБН приведены в п. 5.5, Глава 5. Выбранные в качестве объектов исследования пептиды растворимы в воде в миллимолярных концентрациях, однако, они значительно отличаются друг от друга по своим гидрофобным/гидрофильным свойствам. Так, несмотря на большой положительный заряд, Ar2 является наиболее гидрофобным из исследуемых пептидов.

2.9.1 Взаимодействие АП ареницина-2 с нанодисками.

Катионный АП Ar2 содержит в основном положительно заряженные и гидрофобные остатки. Как показали результаты исследований, проведенных в рамках представленной работы, Ar2 в воде имеет структуру β-шпильки, стабилизированной одной дисульфидной связью (см. п. 3.3, Глава 3). Ареницин-2 селективно взаимодействует с мембранами, содержащими отрицательно заряженные молекулы липидов, и, вероятно, образует в них олигомерные поры, сформированные с участием фосфолипидов (так называемые тороидальные поры) (см.п. 3.3). В больших концентрациях Ar2, по-видимому, приводит к мицеллизации бислоя [340]. Как предполагается, β-шпильки индивидуальных пептидов в составе поры имеют трансмембранную ориентацию такую, что *N*- и *C*-концевые фрагменты и регион β-поворота контактируют с полярными регионами на наружной и внутренней сторонах мембраны (п. 3.3). Несмотря на селективность пептида по отношению к мембранам различного заряда, Ar2 демонстрирует практически равное сродство к мицеллам анионных и цвиттер-ионных детергентов и способен формировать олигомеры в мицеллах обоих типов (п. 3.3).

---

[1] В работе использовали рекомбинантный аналог Ar2, полученный к.х.н. Баландиным С.В. (учебно-научный центр ИБХ РАН, руководитель д.х.н. Овчинникова Т.В.).

[2] Максимальное и минимальное значения индекса гидрофобности по шкале Kyte и Doolittle [338] равны +4.5 и –4.5 для poly-Ile и poly-Arg последовательностей, соответственно.

[3] В работе использовали рекомбинантный ^{2}H-^{15}N-меченый аналог NTII, полученный к.б.н. Люкмановой Е.Н. (лаборатория биоинженерии белка ИБХ РАН).

С целью изучения возможности получения стабильных комплексов Ar2 с ЛБН использовали нанодиски, содержащие нейтральные (POPC) и анионные (DOPG) «длинноцепочечные» липиды. Выбор этих сред был обусловлен тем, что Ar2 не взаимодействует с везикулами, сформированными из POPC, и с высокой аффинностью связывается с липосомами на основе DOPG (данные получены методом КД-спектроскопии, см. п. 3.3). Для моделирования возможного перехода β-шпильки Ar2 (длина ~ 3.5 нм) в трансмембранное состояние использовали смесь «короткоцепочечных» липидов различного заряда (DLPC/DLPG = 4 : 1, жирнокислотные цепи длиной 12 атомов углерода, расстояние между фосфатными группами на противоположных сторонах мембраны ~ 3.4 против ~ 3.7 нм у длинноцепочечных липидов [341]). (В работе ЛБН на основе смеси DLPC/DLPG были успешно использованы для наблюдения переходов между поверхностно-связанным и трансмембранным состоянием пептидного каналообразующего антибиотика Aam-I, см. п. 4.3, Глава 4).

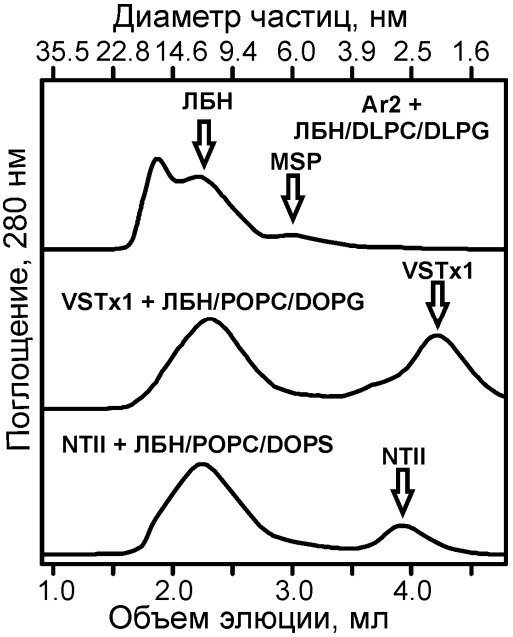


Рис. 2.10. Гель-фильтрационный анализ препаратов ЛБН после добавления мембраноактивных пептидов Ar2, VSTx1 и NTII. На хроматограммах показано положение пиков, соответствующее нанодискам, агрегатам MSP, NTII и VSTx1. Результаты исследования токсина VsTx1 описаны в п. 5.5 (Глава 5).

В ходе исследования водный раствор Ar2 добавляли к образцам нанодисков. Во всех случаях даже при добавлении малых концентраций пептида растворы ЛБН сильно опалесцировали, а при эквимолярных концентрациях (Ar2/ЛБН = 1 : 1) и выше растворы мутнели, что указывало на разрушение нанодисков с образованием более крупных частиц. Анализ супернатанта препаратов с помощью гель-фильтрации подтвердил это предположение. В образцах были выявлены большие комплексы, имеющие характерные размеры ~ 15 нм, остаточная фракция ЛБН диаметром ~ 10 – 11 нм, а также небольшое количество частиц диаметром ~ 6 нм (Рис. 2.10). Сравнение с результатами, показанными на рисунке 2.2А, позволило предположить, что эти частицы представляют собой агрегаты белка MSP. По-видимому, Ar2 вызывает слияние нанодисков, сопровождаемое

высвобождением молекул MSP. Сходный процесс известен как ремоделирование липопротеинов высокой плотности (lipoprotein remodeling), которое может происходить как *in vitro*, так и *in vivo* при взаимодействии липопротеиновых частиц с липофильными белками плазмы крови [333]. Ранее слияние нанодисков наблюдали при встраивании KcsA в нанодиски некоторых липидных составов (см. п. 2.1.5). Процессы самопроизвольного слияния ЛБН *in vitro* идут чрезвычайно медленно, но они значительно ускоряются в денатурирующих условиях [332].

Для периферической стабилизации фрагмента мембраны молекулы MSP, обладающие амфифильными свойствами, должны вносить в липидный бислой значительную положительную спонтанную кривизну. Аналогичное влияние на спонтанную кривизну бислоя оказывают многие амфифильные мембраноактивные пептиды, в частности АП, чье действие опосредовано формированием «тороидальных» пор, – регионов с большой положительной кривизной [209], или мицеллизацией бислоя. Ar2 не взаимодействует с липосомами на основе POPC, поэтому мы можем предположить, что слияние нанодисков, наблюдаемое в случае ЛБН/POPC, не связано напрямую с порообразующей активностью пептида, а вызвано его присоединением к периферическому участку фрагмента липидной мембраны ЛБН. Присоединенные молекулы Ar2 смещают отдельные участки белка MSP, что приводит к образованию дефектов в структуре ЛБН и слиянию нанодисков с образованием липопротеиновых частиц, содержащих большие фосфолипидные домены, и высвобождению свободных молекул MSP. В случае ЛБН, содержащих анионные липиды, может быть предложен альтернативный механизм формирования дефектов в структуре ЛБН, обусловленный способностью Ar2 взаимодействовать непосредственно с мембраной нанодиска.

Учитывая, что механизмы, связанные с изменением локальной кривизны липидного бислоя (образование «тороидальных» пор, мицеллизация бислоя), лежат в основе действия подавляющего большинства водорастворимых катионных АП, мы можем предположить, что многие из этих молекул будут обладать разрушающим действием на ЛБН. Таким образом, нанодиски, вероятно, не подходят в качестве среды для исследования подобных пептидов. Следует отметить, что существуют другие классы поро- и каналообразующих биомолекул, которые могут изучаться в средах на основе ЛБН. Так, в представленной работе в окружении ЛБН был успешно исследован гидрофобный каналообразующий антибиотик Aam-I (верхний предел растворимости в воде 30 мкМ, см. Главу 4) и K^+-канал KcsA. Кроме того, в литературе описано успешное встраивание в нанодиски других интегральных мембранных белков, образующих ионные каналы и поры,

таких, как никотиновый ацетилхолиновый рецептор [154], порообразующий компонент токсина сибирской язвы [153] и ряда белков, имеющих структуру β-бочонка [142].

Суммируя полученные результаты с результатами исследования ареницина-2 методом КД-спектроскопии в липидных везикулах (см. п. 3.3), можно сделать вывод, что классические мембраномоделирующие среды на основе детергентов лучше подходят для структурных исследований водорастворимых катионных порообразующих антимикробных пептидов, чем среды, содержащие липидный бислой, такие как везикулы и нанодиски. Отсутствие упорядоченной структуры у детергент-содержащих комплексов обуславливает их большую стабильность в присутствии мембраноактивных пептидов. Возможно, разрушение структуры липидного бислоя, вызываемое АП, также ведет и к разрушению нанодисков.

2.9.2 Взаимодействие нейротоксина NTII с нанодисками

Нейротоксин II (NTII), – катионный негидрофобный пептид, стабилизирован четырьмя дисульфидными связями и имеет так называемую «трехпетельную» β-структурную организацию, характерную для токсинов змей (Рис. 2.11) [36]. NTII является высокоспецифичным ингибитором никотинового ацетилхолинового рецептора мышечного типа, своей центральной петлей он блокирует сайты связывания лигандов, располагающиеся на внеклеточном домене рецептора [342]. В отличие от Ar2, NTII не имеет явно выраженной мембранной активности. В то же время в ходе исследований, проведенных с использованием методов ^{1}H,^{15}N- и ^{31}P-ЯМР-спектроскопии на липосомах DOPC/DOPS/холестерин (3:1:1), моделирующих мембранное окружение ацетилхолинового рецептора, предположили, что механизм действия NTII включает элементы «мембранного катализа» [339]. По-видимому, сайт, локализованный в области «головы» токсина вблизи остатков Glu2, Asp57 и Arg58 (см. Рис. 2.11 и 2.12), способен в стехиометрии 1:1 связывать заряженную головку молекулы фосфатидилсерина (PS) биологической мембраны, окружающей рецептор. Это взаимодействие, возможно, играет определенную роль на начальных этапах действия NTII и служит для придания молекуле токсина ориентации, оптимальной для образования комплекса токсин-рецептор [339].

Формирование ЛБН из смеси фосфолипидов POPC/DOPS/холестерин (3:1:1) при помощи стандартного протокола сборки нанодисков оказалось малоэффективным, поэтому были выбраны ЛБН на основе смеси POPC/DOPS (4:1). Кроме того, для сравнения были протестированы нанодиски на основе POPC и POPC/DOPG (3:1). Добавление к образцу токсина NTII препаратов ЛБН не приводило к их разрушению. Гель-фильтрационный анализ комплексов NTII/ЛБН не выявил разрушения нанодисков

при связывании токсина (Рис. 2.10). На хроматограммах видны отдельные пики, соответствующие нанодискам и свободному токсину (диаметр ~2.6 нм).

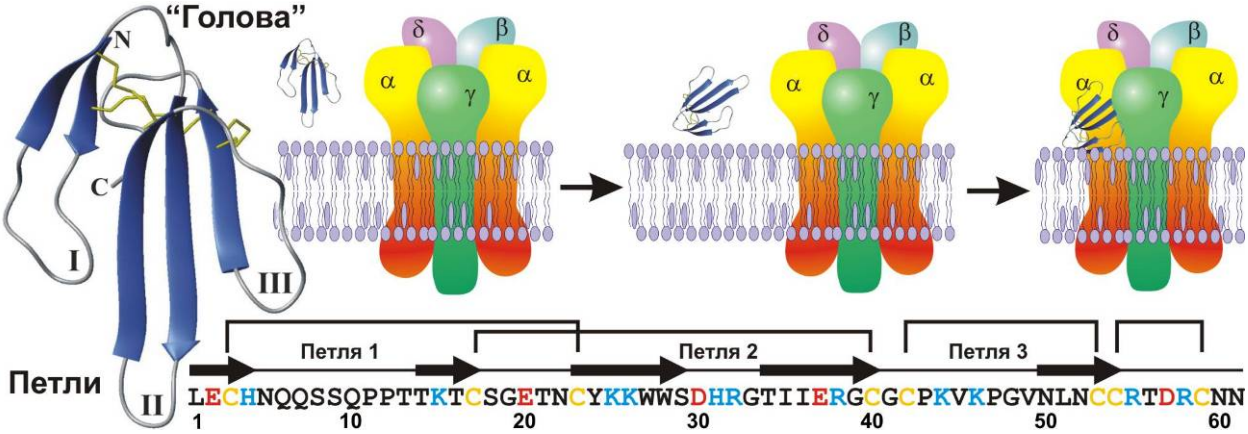


Рис. 2.11. Аминокислотная последовательность, пространственная структура токсина NTII (PDB код 1NOR) и возможная роль механизма «мембранного катализа» в образовании комплекса NTII/нАХР (по данным [339]). Остатки Cys выделены желтым цветом. Положительно и отрицательно заряженные остатки показаны голубым и красным, соответственно.

Титрование образца NTII раствором ЛБН/POPC показало, что токсин не взаимодействует с нанодисками на основе цвиттер-ионных липидов. Отсутствие детектируемого связывания с ЛБН/POPC косвенно указало на отсутствие неспецифического взаимодействия токсина с белковой компонентой нанодисков, – MSP. В тоже время титрование образца NTII растворами ЛБН, содержащими анионные липиды, приводило к постепенному уменьшению интенсивности ЯМР-сигналов пептида (Рис. 2.12А), что указывало на ассоциацию NTII с поверхностью мембраны. В этом случае из-за медленной реориентации нанодисков в растворе связывание пептида вело к значительному увеличению ширины ЯМР-линий и уменьшению интенсивности сигналов. Расчеты показали, что в условиях эксперимента с хорошей точностью можно использовать предположение о том, что интенсивность наблюдаемого сигнала ЯМР прямо пропорциональна равновесной концентрации свободного пептида в растворе ($[NTII]_f$).

Анализ измеренных кривых связывания с помощью уравнения равновесного распределения (Ур. 7.22, Рис. 2.12А) показал, что NTII имеет небольшое сродство к ЛБН, содержащим анионные липиды (POPC/DOPG и POPC/DOPS). Полученные значения коэффициентов равновесного распределения *Kp*, описывающие взаимодействие, равны ~ 2.13±0.07 и $1.07\pm0.07\times10^{3}\cdot M^{-1}$, соответственно. Бо́льшую аффинность NTII к ЛБН на основе POPC/DOPG (3:1) можно объяснить бо́льшим зарядом мембраны нанодиска (относительное содержание заряженного липида 25% против 20% у мембраны POPC/DOPS (4:1)). Кроме того, в мембране, содержащей DOPS, заряды NH_3^+- и COOH-групп серина образуют диполь, который может экранировать отрицательный заряд фосфатной группы. Таким образом, кажущийся заряд полярной головки у DOPS будет меньше, чем у DOPG. Полученные данные позволяют сделать предположение об

отсутствии значительной селективности у молекулы NTII при взаимодействии с анионными липидами, различающимися структурой полярных головок (фосфатидилсерин и фосфатидилглицерин).

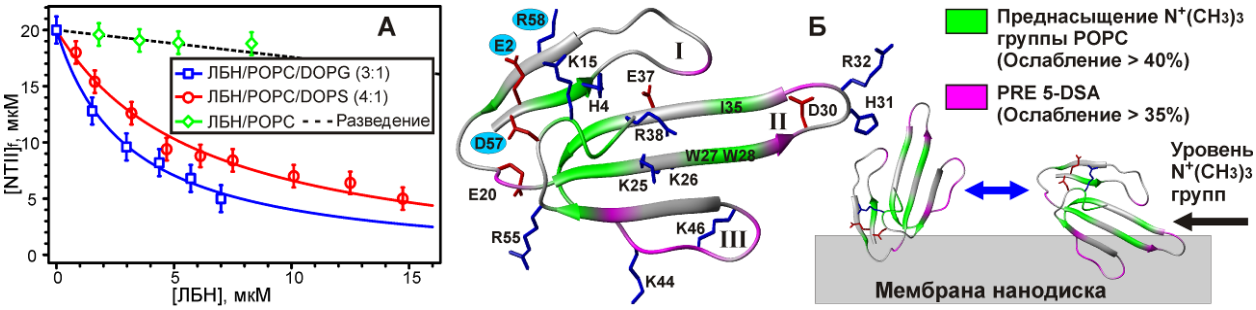


Рис. 2.12. Анализ изотерм связывания NTII с ЛБН и возможная топология взаимодействия молекулы NTII с поверхностью мембраны POPC/DOPS в составе ЛБН. (А) Изотермы связывания NTII с ЛБН аппроксимированы уравнением равновесного распределения (Ур. 7.22). Полученные параметры приведены в тексте. (Б) Структура NTII окрашена в соответствии с полученными экспериментальными данными (Рис. 2.13ГД). Остатки, формирующие предполагаемый сайт связывания с полярной головкой фосфатидилсерина [339], выделены голубыми кружками.

Топологию взаимодействия молекулы NTII с поверхностью мембраны POPC/DOPS в составе ЛБН изучали с использованием $^{2}H,^{15}N$-меченого аналога NTII. ЯМР-эксперименты проводили в условиях, когда практически весь токсин был связан с поверхностью нанодиска. Несмотря на значительное уширение и ослабление сигналов связанного пептида (Рис. 2.13А), применение дейтерированного аналога NTII и экспериментов TROSY, оптимизированных для уменьшения поперечной релаксации ядер ^{1}H и ^{15}N, позволило получить $^{1}H,^{15}N$-корреляционный спектр NTII в комплексе с ЛБН (Рис. 2.13Б). Сравнение ^{1}H и ^{15}N химических сдвигов молекулы NTII в водном окружении и в комплексе с ЛБН не выявило значительных изменений в пространственной структуре токсина при образовании комплекса. Изменения химических сдвигов, превышающие 0.03 и 0.2 м.д. (^{1}H и ^{15}N, соответственно) отмечены только для одного остатка Arg32 (данные не показаны).

Скорости кросс-корреляции релаксации ядер ^{15}N (η_{XY}), измеренные для HN-групп NTII в комплексе с ЛБН (Рис. 2.13В), показали большой разброс значений (от 2.5 до 40 Гц, среднее значение 16.3 ± 9.2 Гц, частота 800 МГц, 40°C), что соответствовало временам корреляции вращательных движений (τ_R) в диапазоне от 2 до 31 нс, со средним ~ 12.5 нс. Рассчитанное среднее значение τ_R соответствовало реориентации глобулярной частицы диаметром ~ 5.4 нм и массой ~ 34 кДа, что значительно превышает размеры молекулы NTII, но существенно меньше размеров нанодиска. Полученные данные указывают на значительную анизотропию взаимодействий в комплексе NTII/ЛБН, которая может объясняться либо наличием дополнительных степеней свободы у молекулы токсина в составе комплекса, либо вовлечением молекулы NTII в быстрый (по шкале ЯМР) обменный процесс между связанным и свободным состояниями.

Возможную ориентацию NTII на поверхности мембраны нанодиска определяли, измеряя перенос намагниченности между протонами липидов и HN-группами нейротоксина за счет ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Наибольший отклик в ЯМР-спектрах пептида детектировали при насыщении сигналов холиновой группы POPC. Существенное падение интенсивности ^{1}H,^{15}N-кросс-пиков наблюдалось для остатков, локализованных на двух участках молекулы NTII: 1) в области «головы» токсина вблизи от предполагаемого сайта связывания фосфатидилсерина, и 2) в центральной (второй) петле на уровне остатков Trp27, Trp28 и Ile35 (Рис. 2.12Б, Рис. 2.13Г). Наблюдаемое уменьшение интенсивности указывало на пространственную сближенность соответствующих HN-групп токсина с поверхностью бислоя ЛБН.

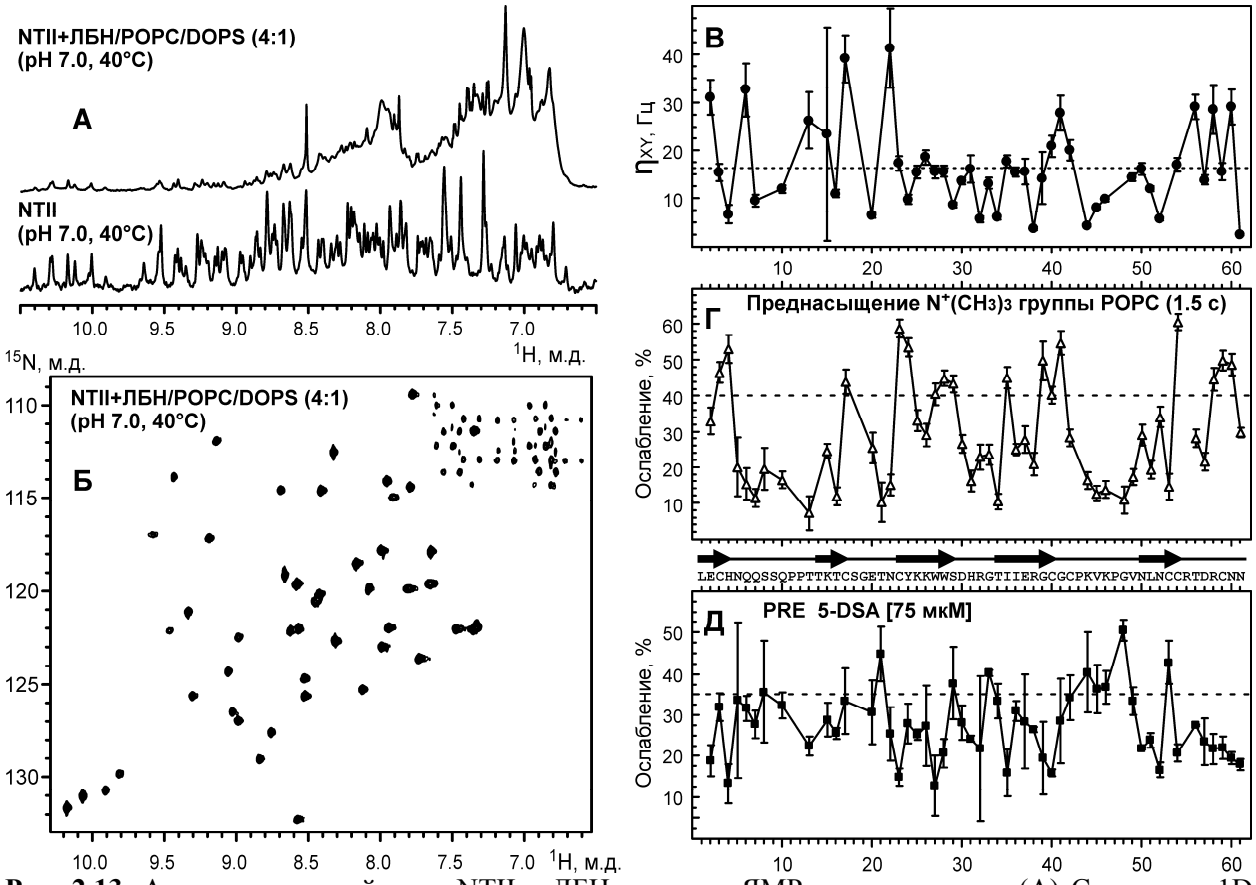


Рис. 2.13. Анализ взаимодействия NTII с ЛБН методом ЯМР-спектроскопии. (А) Сравнение 1D ^{1}H-спектров 45 мкМ ^{2}H,^{15}N-меченого аналога NTII в водном растворе (внизу) и в комплексе с 75 мкМ ЛБН/POPC/DOPS (4:1) (вверху). (Б) 2D ^{1}H,^{15}N-TROSY-спектр 45 мкМ ^{2}H,^{15}N-меченого NTII в комплексе с 75 мкМ ЛБН/POPC/DOPS (4:1). (В) скорость кросс-корреляции релаксации ядер ^{15}N (η_{XY}) молекулы NTII в комплексе с ЛБН/POPC/DOPS (4:1). Среднее значение показано пунктиром. (Г, Д) Относительное ослабление интенсивностей ^{1}H,^{15}N-TROSY-кросс-пиков NTII в комплексе с ЛБН/POPC/DOPS, вызванное (Г) преднасыщением сигнала холиновой группы POPC в течение 1.5 с или (Д) парамагнитным усилением релаксации (PRE) от 75 мкМ 5-DSA

Дополнительно с целью определения топологии NTII на поверхности нанодиска использовали липофильный спиновый зонд 5-DSA, который встраивается в бислой таким образом, что его спиновая метка располагается в гидрофобном регионе мембраны вблизи от области, занимаемой полярными головками. Наибольшее ослабление интенсивностей

HN-сигналов, вызванное эффектом парамагнитного усиления релаксации, наблюдалось у остатка Thr21 из «головы» токсина и остатков из третьей и второй петель (Рис. 2.12Б, Рис. 2.13Д), что указывало на наличие контакта соответствующих HN-групп с гидрофобным регионом бислоя ЛБН.

Полученные данные не согласуются с одной преимущественной ориентацией молекулы NTII на поверхности мембраны нанодиска (Рис. 2.12Б). Вероятно, токсин взаимодействует с поверхностью нанодиска в нескольких (минимум двух) ориентациях и участвует в быстрых (по шкале химических сдвигов ЯМР) обменных процессах между комплексами с различной топологией. При этом только одна из возможных топологий (Рис. 2.12Б) «совместима» со специфическим взаимодействием NTII с полярной головкой фосфатидилсерина в предполагаемом сайте связывания [339]. Таким образом, в комплексе NTII с ЛБН/POPC/DOPS неспецифические электростатические и гидрофобные взаимодействия имеют сравнимую энергию со специфическими взаимодействиями.

Следует отметить, что динамическое равновесие между комплексами с различной топологией может играть определенную роль в функционировании периферических мембранных белков и мембраноактивных пептидов. Так, в ходе недавнего ЯМР-исследования комплекса GTP-азы Rheb (семейство Ras) с ЛБН было установлено, что белок имеет две возможные ориентации относительно поверхности мембраны нанодиска. При этом заселенность этих состояний меняется в ходе гидролиза GTP [160].

2.9.3 Резюме

В представленном разделе на примере двух модельных водорастворимых β-структурных пептидов ареницина-2 и NTII была исследована возможность применения ЛБН для изучения специфических взаимодействий пептид/мембрана и механизмов «мембранного катализа» в функционировании мембраноактивных антимикробных пептидов и нейропептидов. Установлено, что нанодиски, содержащие молекулы фосфатидилхолина и фосфатидилглицерина, могут разрушаться при взаимодействии с катионными порообразующими пептидами и, возможно, не подходят в качестве мембраномоделирующей среды для изучения подобных молекул. В то же время среды на основе ЛБН могут применяться для исследования энергетики, стехиометрии и топологии взаимодействия мембраноактивных нейротоксинов с липидной мембраной. В ходе подобных исследований необходимо учитывать возможность неспецифических взаимодействий пептидных молекул с белковой компонентой (MSP) и с липидной мембраной нанодиска.

ГЛАВА 3 Исследование антибиотических пептидов, содержащих внутримолекулярные циклы

3.1 Химическая и пространственная структура нового двухкомпонентного лантибиотика лихеницидина (Lchα/Lchβ)

Гидрофобные (слаборастворимые в воде) пептиды лихеницидины Lchα и Lchβ, возможно принадлежащие к семейству двухкомпонентных лантибиотиков, были выделены из культуры штамма-продуцента термофильной грамположительной бактерии *Bacillus licheniformis* VK21 в учебно-научном центре ИБХ РАН под руководством д.х.н. Овчинниковой Т.В. Исследование спектра антибиотической активности пептидов выявило способность ингибировать рост широкого числа грамположительных бактерий, таких как *Staphylococcus aureus, Bacillus megaterium, Micrococcus luteus, Bacillus subtilis*. Индивидуальные пептиды демонстрировали антибактериальную активность в микромолярных концентрациях, в то время как смесь пептидов была значительно более активна. Наибольшее повышение активности (в 20 – 50 раз, в зависимости от тестовой культуры) наблюдалось для эквимолярной смеси Lchα/Lchβ (Рис. 3.1А). Так, по отношению к *M. luteus* IC_{50} индивидуальных пептидов Lchα и Lchβ было равно 1.2 и 2.6 μM, соответственно, в то время как смесь Lchα/Lchβ (1:1) демонстрировала IC_{50} = 9 нМ.

При исследовании лихеницидина были поставлены следующие задачи:

1. С использованием методов ЯМР-спектроскопии определить химическую и пространственную структуру, а также исследовать внутримолекулярную динамику природных пептидов Lchα и Lchβ.
2. На примере Lchα и Lchβ исследовать роль, которую играет внутримолекулярная циклизация в формировании «нативной/активной» пространственной структуры антибиотических МП в мембраноподобном окружении. На основе полученных структурных данных предложить молекулярный механизм антибиотического действия лихеницидина.

В качестве среды для исследования использовали изотропные миметики мембраны.

3.1.1 Определение первичной структуры лихеницидинов Lchα и Lchβ

Наличие в последовательности пептидов неканонических аминокислотных остатков и тиоэфирных связей, а также *N*-концевого остатка 2-оксомасляной кислоты (Рис. 3.1Г) делало невозможным определение первичной структуры лихеницидинов Lchα и Lchβ традиционными методами, - ступенчатой деградацией аминокислотной цепи по Эдману и масс-спектрометрическим анализом. Полная первичная структура пептидов

также не могла быть получена на основании данных по нуклеотидной последовательности, кодирующей предшественники пептидов, и данных тандемной масс-спектрометрии, в том числе, с привлечением информации по строению других представителей класса лантибиотиков и имеющихся в настоящее время сведений о специфичности модифицирующих ферментов.

Для определения полной первичной структуры пептидов Lchα и Lchβ был использован комплексный подход, включающий сопоставление результатов секвенирования нуклеотидной последовательности, кодирующей предшественники пептидов LchA1 и LchA2, данных масс-спектрометрии высокого разрешения и ЯМР-спектроскопии.

Методами генной инженерии были определены последовательности геномной ДНК *Bacillus licheniformis* VK21, кодирующие предшественники пептидов Lchα и Lchβ (LchA1 и LchA2)[1]. Сравнение последовательностей пептидов предшественников LchA1 и LchA2 с последовательностями предшественников других двухкомпонентных лантибиотиков показано на рисунке 3.1БВ. На рисунке 3.1Г приведены структуры нестандартных остатков, встречающихся в антибиотиках этого ряда. Следует отметить, что эти нестандартные остатки образуются в ходе посттрансляционных модификаций пептидов предшественников. Так 2,3-дидегидроаланин (Dha) и 2,3-дидегидробутирин (Dhb) образуются при дегидратации остатков Ser и Thr, соответственно. Последующее формирование тиоэфир-связанных остатков лантионина (Lan) и метиллантионина (MeLan) происходит при взаимодействии боковых цепей Dha и Dhb с остатками Cys. В случае лихеницидинов Lchα/Lchβ обе эти реакции (дегидратирование и циклизация), вероятно, катализируются одним ферментом LanM1/LanM2, уникальным для каждого из пептидов. Кроме того, в биосинтезе лихеницидинов также, вероятно, участвует пока не идентифицированная протеаза/секретаза LanT. *N*-концевой остаток 2-оксомасляной кислоты образуется путем спонтанного гидролиза *N*-концевого остатка Dhb.

Зрелые пептиды были проанализированы на масс-спектрометре ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (ИЦР ПФ) при ионизации в режиме электрораспыления[2]. Для Lchα и Lchβ наблюдались наборы двухзарядных и трехзарядных ионов, соответствующие моноизотопным молекулярным массам 3249.51 ± 0.01 Да и 3019.36 ± 0.01 Да, соответственно (Рис. 3.1ДЕ). Методом тандемной масс-спектрометрии, используя столкновительно-индуцированную фрагментацию (CID), наблюдалось

[1] Исследования были проведены в учебно-научном центре ИБХ РАН.
[2] Измерения проводили в центре масс-спектрометрии РАН, руководитель д.ф.-м.н. Николаев Е.Н. (Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля, ИБХФ РАН).

частичное фрагментирование пептидов Lchα и Lchβ. Полученные данные показаны на рисунке 3.2ДЕ вертикальными линиями.

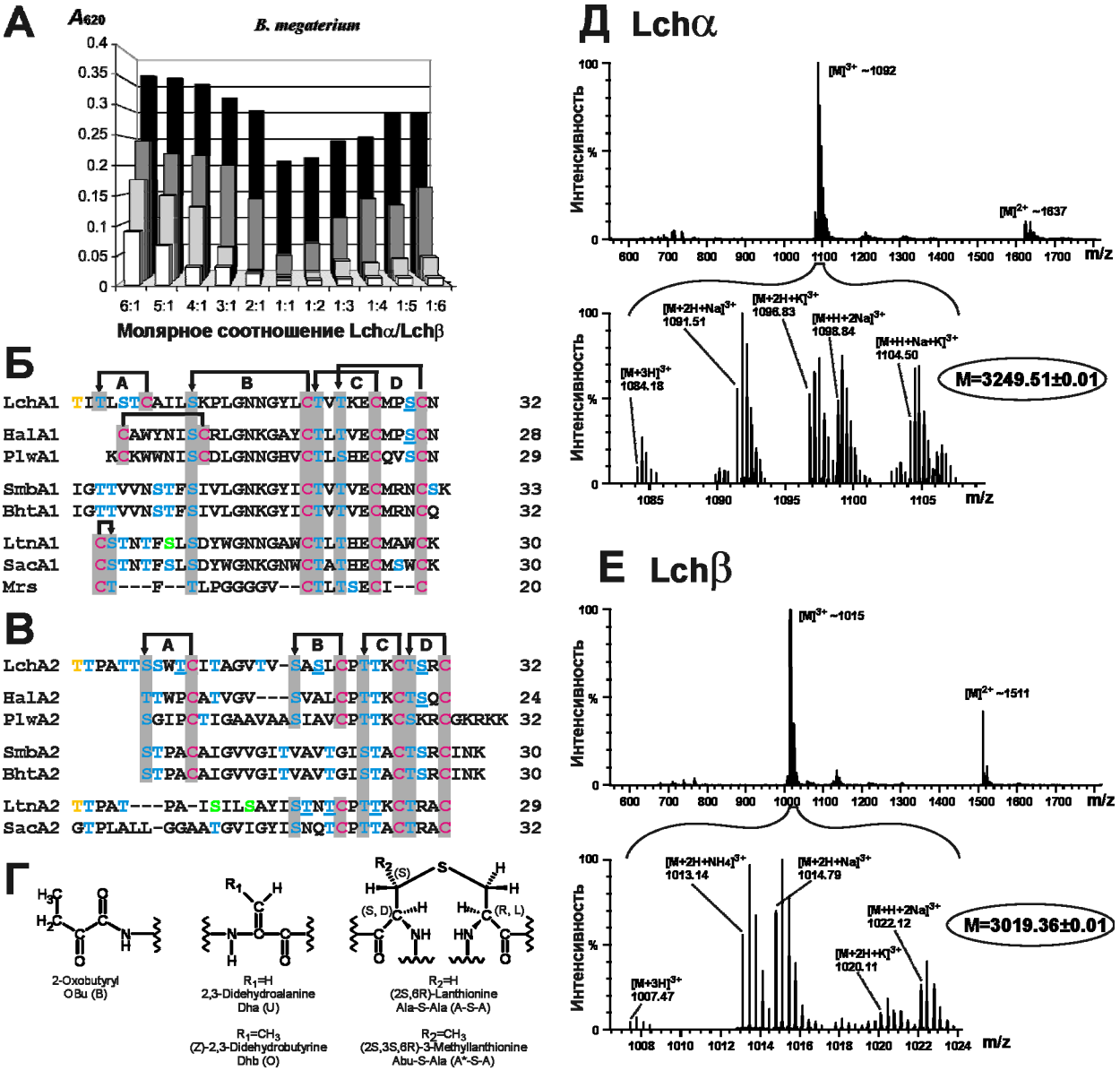


Рис. 3.1. (А) Эффект смесей пептидов Lchα и Lchβ в различной стехиометрии на рост грамположительной бактерии *Bacillus megaterium* VKM41. Данные, полученные для различных концентраций смеси Lchα/Lchβ, показаны белым (0.48 μM), светло-серым (0.36 μM), темно-серым (0.24 μM), и черным цветом (0.12 μM), соответственно. (Б,В) Сравнение аминокислотных последовательностей предшественников лантибиотиков LchA1 и LchA2 с пропептидами лантибиотиков: галодурацина (HalA1 и HalA2); плантарицина W (PlwA1 и PlwA2); SmbA1/SmbA2; Bht (BhtA1 и BhtA2); лактицина 3147 (LtnA1 и LtnA2); стафилококцина C55 (SacA1 и SacA2); мерсацидина (Mrs). Остатки Ser/Thr, посттрансляционно модифицированные до D-Ala/Obu, выделены зелёным/жёлтым цветом. Другие остатки Ser/Thr выделены бирюзовым цветом, а немодифицированные остатки подчеркнуты. Остатки Cys показаны малиновым цветом. Тиоэфирные и дисульфидные связи отмечены стрелками и выделены серым фоном. Тиоэфирные кольца в зрелых пептидах Lchα и Lchβ отмечены латинскими буквами A,B,C,D. (Г) Химические структуры посттрансляционно модифицированных аминокислотных остатков. 1). Остаток 2-оксомасляной кислоты. 2). R_1=H, остаток 2,3-дидегидроаланина или Dha (U); R_1=CH_3, остаток 2,3-дидегидробутирина или Dhb (O). 3). R_2=H, остатки лантионина или Ala-S-Ala (Lan); R_2=CH_3, 3-метиллантионин или Abu-S-Ala (MeLan). (Д,Е) Масс-спектры пептидов Lchα и Lchβ. Отдельно показаны наборы трехзарядных ионов. Соответствующие моноизотопные молекулярные массы пептидов приведены в эллипсах.

Так как изучаемые пептиды обладали гидрофобными свойствами (растворялись в метаноле, смесях метанол/вода (до 1:3) и метанол/хлороформ (до 2:3), но не растворялись в воде) было принято решение исследовать структуру лихеницидинов в частично дейтерированном метаноле (CD_3OH). Использование этого органического растворителя с низкой полярностью обеспечило низкую скорость поперечной релаксации (R_2) и, соответственно, небольшую полуширину ЯМР-сигналов, что позволило использовать методы ^{13}C ЯМР на натуральном содержании.

На основании анализа 2D ^{1}H TOCSY и NOESY спектров ЯМР было проведено полное отнесение сигналов ядер ^{1}H исследуемых образцов. На основании анализа 2D ^{13}C-HSQC спектров (Рис. 3.2АБ) было проведено полное отнесение сигналов ^{13}C ядер, атомы которых имеют ковалентно присоединенные протоны. Полученные данные позволили выделить спиновые системы отдельных остатков. Используя характерные значения химических сдвигов ядер ^{13}C, были установлены химические структуры для каждого из остатков. Наблюдаемые ЯЭО кросс-пики позволили соединить спиновые системы в последовательные цепочки, и, таким образом, установить первичную структуру нескольких фрагментов пептидов Lchα и Lchβ (Рис. 3.2ДЕ, идентифицированные фрагменты подчеркнуты).

Сопоставление полученных фрагментов с результатами секвенирования нуклеотидной последовательности генов пептидов предшественников LchA1 и LchA2 позволило восстановить полную первичную структуру новых лантибиотиков Lchα и Lchβ (Рис. 3.3). Структура пептидов Lchα и Lchβ включает *N*-концевой остаток 2-оксомасляной кислоты (OBu^1) и 31 аминокислотный остаток, соединенные в последовательности амидными связями. В состав аминокислотной последовательности наряду с остатками генетически кодируемых аминокислот и тиоэфир-связанных остатков лантионина (Lan) и метиллантионина (MeLan) входят остатки неканонических аминокислот Dha и Dhb. Наличие *N*-концевой группы OBu^1 было подтверждено на основании анализа TOCSY и ^{13}C-HSQC спектров, в которых для Lchα и Lchβ наблюдались характерные сигналы от фрагмента CH_3-CH_2- (^{1}H 2,93 и 1,09 мд; ^{13}C 30,1 и 5,8 мд). Наличие остатков Dha и Dhb было подтверждено по характерным сигналам в ^{13}C-HSQC спектрах (Рис. 3.2АБ). Также в аминокислотной последовательности Lchα и Lchβ были идентифицированы недегидратированные остатки Ser и Thr (Рис. 3.3).

Расположение тиоэфирных связей в молекуле лихеницидинов Lchα и Lchβ было определено на основании анализа двумерных ЯМР-спектров NOESY, в которых наблюдались кросс-пики между алифатическими протонами в остатках Lan или MeLan. Наличие ЯЭО кросс-пиков позволило сделать вывод, что в пептиде Lchα тиоэфирные

связи соединяют попарно остатки Ala[11] и Ala[21], Abu[3] и Ala[7], Abu[22] и Ala[27], Abu[24] и Ala[31] с образованием одного остатка Lan и трех остатков MeLan. В то же время в пептиде Lchβ тиоэфирные связи соединяют попарно остатки Ala[7] и Ala[11], Ala[19] и Ala[23], Abu[25] и Ala[28], Abu[29] и Ala[32] с образованием двух остатков Lan и двух остатков MeLan.

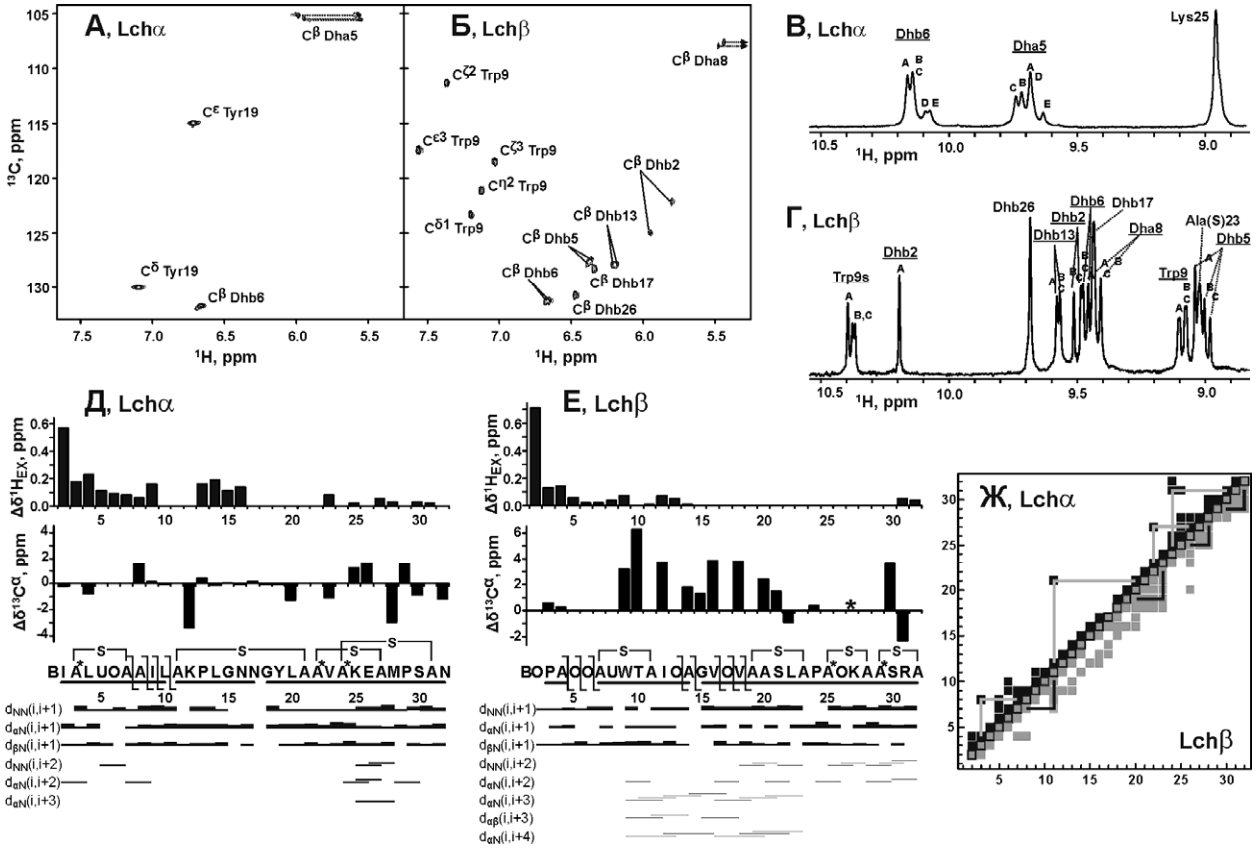


Рис 3.2. Данные ЯМР, полученные для лихеницидинов Lchα и Lchβ (0.5 мМ, CD_3OH, pH 3.5, 27ºC, 700 МГц). (А,Б) Фрагменты 2D ^{13}C-HSQC ЯМР-спектров, позволяющие идентифицировать остатки Dha и Dhb. (В,Г) Фрагменты ^{1}H-ЯМР-спектров, показывающие наличие конформационного обмена в молекулах пептидов. Показано полученное отнесение сигналов. Сигналы, принадлежащие разным конформационным состояниям, отмечены латинскими буквами (A,B,C,D,E) и (A,B,C) для Lchα и Lchβ, соответственно. В каждом случае наиболее заселенное состояние обозначено как A. (Д,Е) Карта ЯЭО контактов, построенная на основании NOESY спектров (τ_m = 200 мс), вторичные химические сдвиги ядер $^{13}C^{\alpha}$ и влияние конформационного обмена на химические сдвиги амидных протонов. Фрагменты пептидов, определенные по данным ЯМР, подчеркнуты. Фрагментация пептидов, наблюдаемая в экспериментах тандемной масс-спектрометрии, показана вертикальными линиями. (Ж) Карта контактов ЯЭО в пептидах Lchα и Lchβ. Остатки, формирующие тиоэфирные связи, соединены линиями.

Массы предложенных химических структур с учетом точности измерения совпадают с моноизотопными молекулярными массами лихеницидинов Lchα и Lchβ. Кроме того, измеренная масса Lchα (3249,515 Да) согласуется с расчетной массой пропептида LchA1 (3374,605 Да) с учетом 7 сайтов дегидратации (-126,074 Да) и одной реакции дезаминирования с присоединением молекулы воды (+0,984 Да). В свою очередь измеренная масса пептида Lchβ (3019.360 Да) согласуется с расчетной массой пропептида (3234,502 Да) с учетом наличия 12 сайтов дегидратации (-216,126 Да) и одной реакции дезаминирования с присоединением молекулы воды (+0,984 Да). Предложенные

химические структуры Lchα и Lchβ также согласуются с данными тандемной масс-спектрометрии (Рис. 3.2ДЕ). Сравнение полученных структур новых лантибиотиков Lchα и Lchβ со структурами других двухкомпонентных лантибиотиков показано на рисунке 3.3.

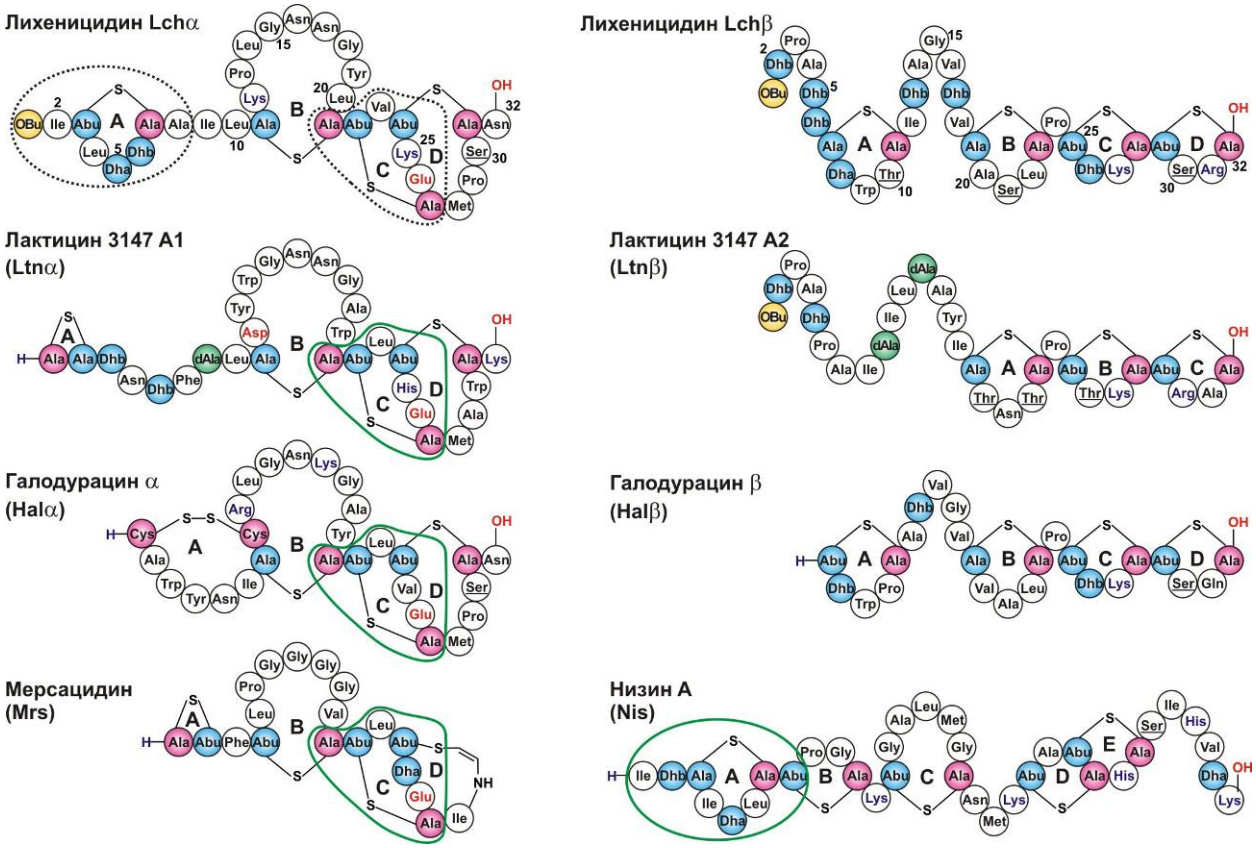


Рис 3.3. Сравнение структур лихеницидинов Lchα и Lchβ с другими лантибиотиками. Домены, связывающие липид II, обведены зеленым цветом. Цветовая кодировка остатков такая же, как на рисунке 4. Положительно и отрицательно заряженные остатки показаны синим и красным шрифтом, соответственно.

3.1.2 Пространственная структура и динамика Lchα и Lchβ в метаноле

При отнесении сигналов Lchα и Lchβ в метаноле было обнаружено, что для атомов некоторых аминокислотных остатков в ЯМР-спектрах наблюдаются несколько (до пяти для Lchα и до трех для Lchβ) сигналов с различными химическими сдвигами. На рисунках 3.2А-Г такие сигналы обозначены латинскими буквами (A,B,C,D,E) и (A,B,C) для Lchα и Lchβ, соответственно. Присутствие в спектрах более одного сигнала для какого-либо атома пептидной молекулы может свидетельствовать либо о гетерогенности образца, либо указывать на наличие процессов конформационного обмена, медленных по шкале времен ЯМР (конформационная гетерогенность). Сравнение химических сдвигов амидных протонов различных структурных состояний пептидов (Рис. 3.2ДЕ) позволяет установить, что наиболее сильно наблюдаемая гетерогенность проявляется в *N*-концевых частях Lchα и Lchβ. В то же время, хроматографический (ВЭЖХ на обращенной фазе) и масс-спектрометрический анализ препаратов Lchα и Lchβ не выявил их гетерогенности. Кроме того, отсутствие в ^{13}C-HSQC ЯМР-спектрах пептидов дополнительных (не отнесенных)

сигналов остатков Thr или Dhb, а также других сигналов, принадлежащих остаткам лидерных пептидов, подтвердило полный процессинг *N*-концевых последовательностей Lchα и Lchβ. Таким образом, можно сделать вывод, что пептиды Lchα и Lchβ в растворе метанола совершают флуктуации между 5-ю и 3-мя структурными состояниями, соответственно. Более того, эти конформационные переходы происходят с характерными временами, превышающими 100 миллисекунд.

Вероятно, наблюдаемые обменные процессы связаны с *cis*-*trans*-изомерией частично двойных связей CO-CO и CO-NH, находящихся в *N*-концевых остатках 2-оксомасляной кислоты (OBu^1). Дополнительный обменный процесс, наблюдаемый для Lchα, возможно связан с *cis*-*trans*-изомерией пептидной связи Lys11-Pro12. В то же время, имеющиеся экспериментальные данные не позволяют достоверно исключить наличие более сложных процессов конформационного обмена, например, флуктуации конформаций тиоэфирных колец, образованных остатками Lan и MeLan.

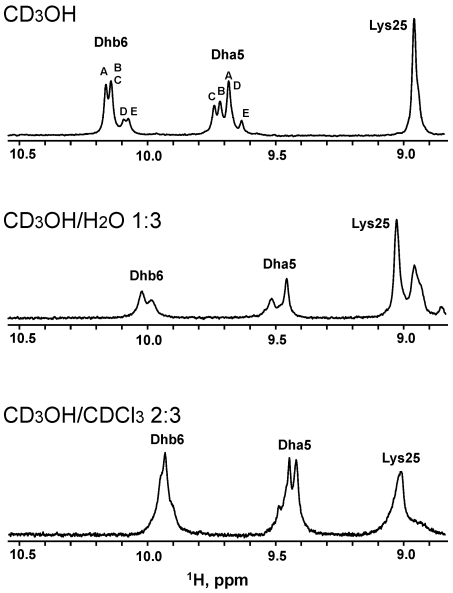


Рис. 3.4. Процессы конформационного обмена в *N*-концевой части Lchα не зависят от полярности окружения. Показаны фрагменты амидного региона 1D ^1H ЯМР-спектра пептида, измеренные в CD_3OH, CD_3OH/H_2O (1:3) и $CD_3OH/CDCl_3$ (2:3). $^1H^N$ сигналы остатков Dha5 и Dhb6 демонстрируют расщепления, вызванные обменными процессами во всех протестированных средах.

Метанол моделирует лишь малую часть свойств мембраны, это – изотропный растворитель с низкой полярностью, в то время как мембранное окружение анизотропно. Более того, при взаимодействии лихеницидинов с липидом II и возможном образовании ионных каналов в мембране клетки-мишени (см. ниже) пептиды могут оказываться еще в более гетерогенном окружении, образованном жирными цепями и полярными головками липидов, соседними пептидами и молекулами воды и ионами, заполняющими пору. С целью проанализировать влияние полярности окружения на процессы конформационного обмена в Lchα было проведено исследование пептида в бинарных растворах различной полярности: от полярной смеси CD_3OH/H_2O (1:3, v/v) до сравнительно гидрофобной смеси $CD_3OH/CDCl_3$ (2:3, v/v). Выход за эти пределы делал пептид нерастворимым. Во всех использованных средах наблюдалось характерное расщепление $^1H^N$ сигналов пептида на

несколько компонент (Рис. 3.4), что указывало на сохранение процессов конформационного обмена при изменении полярности окружения.

Используя данные ЯМР, полученные в метаноле, при помощи программы CYANA был произведен расчет пространственной структуры основной конформационной формы лихеницидинов Lchα и Lchβ. Для этого библиотека программы CYANA была дополнена данными, описывающими топологию нестандартных остатков. Результаты расчета пространственной структуры лихеницидинов представлены на рисунке 3.5, а статистика, описывающая полученные наборы структур, приведена в таблице 3.1. Характеристические контакты ЯЭО, наблюдаемые в NOESY спектрах, позволили установить, что пептидные связи X-Pro (по две в каждом пептиде) в основных конформационных формах Lchα и Lchβ имеют *trans*-ориентацию.

Параметр/Тип/Единицы	Lchα	Lchβ
Структуры, рассчитанные, отобранные для анализа	100 20	100 20
Штрафная функция CYANA (Å^2)	1.04 ± 0.13	1.19 ± 0.12
Ограничения на расстояния верхние/нижние: ЯЭО; водородные связи (число); тиоэфирные связи (число)	158/70 6/6 (3) 8/4 (4)	212/18 36/36 (18) 8/4 (4)
Ограничения на торсионные углы φ	13	18
Максимальные нарушения верхних, нижних и ван-дер-ваальсовых ограничений (Å)	0.24 0.10 0.20	0.26 0.04 0.23
Максимальное нарушение значений углов (°)	3.2	3.5
СКО атомных координат (Å) основная цепь; тяжелые атомы (общее Obu1-Asn32/Obu1-Ala^{S}32)	5.32 ± 1.64 6.45 ± 1.79	2.43 ± 0.95 3.10 ± 1.01
СКО атомных координат (Å) (*N*-концевой домен Ile2-Leu10/Ile2-Dhb6)	0.60 ± 0.32 1.02 ± 0.33	1.28 ± 0.47 2.01 ± 0.69
СКО атомных координат (Å) (центральный домен Ala^{S}11-Ala^{S}21/Ala^{S}7-Pro24)	2.07 ± 0.44 3.57 ± 0.69	0.19 ± 0.10 0.33 ± 0.12
СКО атомных координат (Å) (*C*-концевой домен Abu^{S}22-Asn32/Abu^{S}25-Ala^{S}32)	0.29 ± 0.14 1.01 ± 0.21	0.86 ± 0.59 1.73 ± 0.52

Табл. 3.1. Статистика для набора структур Lchα/Lchβ в метаноле, рассчитанных в программе CYANA.

Согласно полученным данным, Lchα имеет в своем составе два структурированных домена: *N*-концевой 2-10 и *C*-концевой 22-32, представляющие собой последовательность β-поворотов и стабилизированные тиоэфирными связями между остатками 3-7, 22-27 и 24-31, а также центральный подвижный домен, стабилизированный тиоэфирной связью 11-21. Суперпозиция 20-ти лучших структур для трех доменов пептида Lchα показана на рисунке 3.5Г. Отсутствие междоменных ЯЭО контактов в спектрах пептида указывает на то, что в растворе метанола домены не имеют фиксированной взаимной ориентации и связаны между собой гибкими шарнирными регионами (локализованными на остатках Ala^{S}11 и Ala^{S}21), движение вокруг которых происходит с характерными временами в наносекундном диапазоне (Рис. 3.5В). Напротив, пептид Lchβ структурирован в большей

своей части. Небольшой подвижный *N*-концевой домен переходит в α-спираль на участке 9-23, включающую две тиоэфирные связи 7-14, 19-23, за которой следует несколько β-поворотов, стабилизированных тиоэфирными связями между остатками 25-28 и 29-32. (Рис. 3.5АБ).

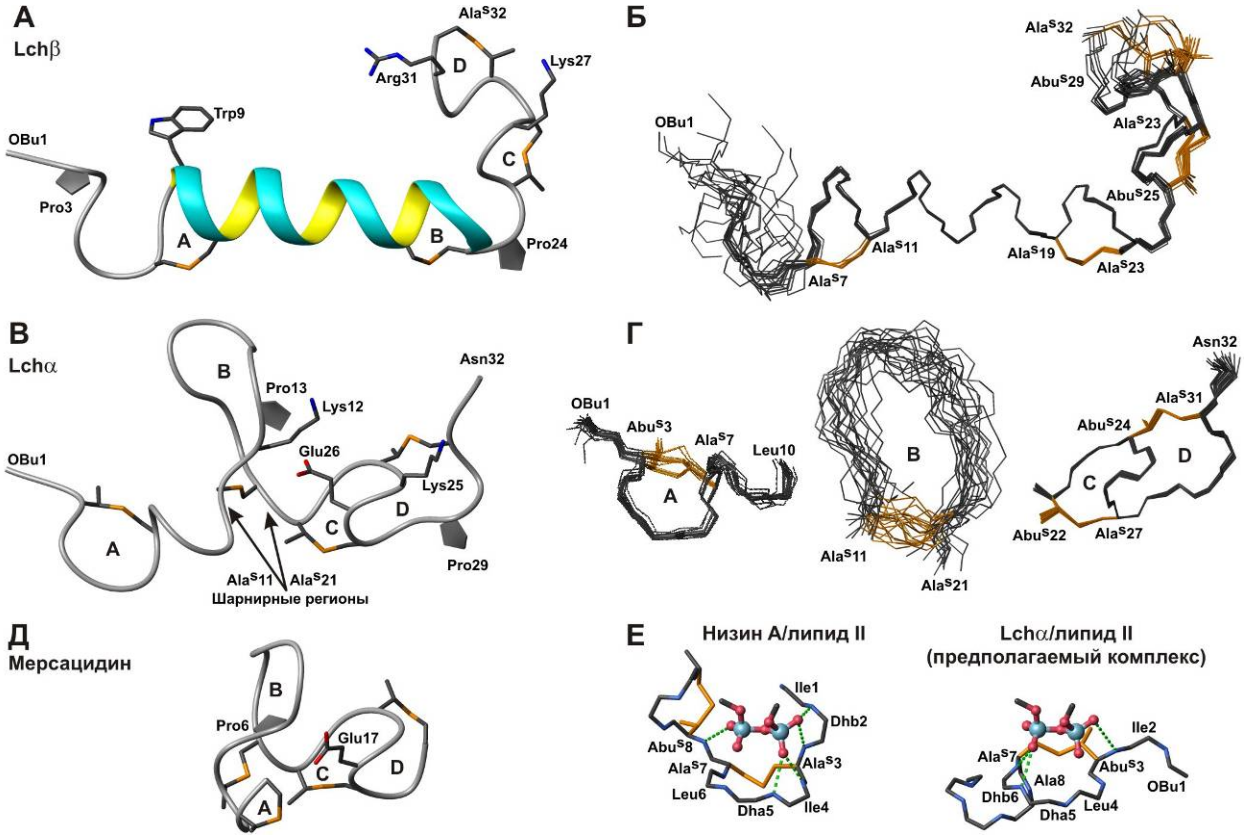


Рис. 3.5. Пространственная структура пептидов Lchα (В,Г) и Lchβ (А,Б) в ленточном представлении (А,Б) и в виде набора рассчитанных структур, совмещенных по атомам основной цепи (Б,Г). В случае Lchα совмещение проводилось отдельно по трем доменам пептида. Показаны боковые цепи ароматических и заряженных остатков, остатков Pro, а также боковые цепи остатков, образующих тиоэфирные связи. (Д) Кристаллическая структура мерсацидина (PDB 1QOW) [343]. (Е) Структура комплекса низин/липид II, определенная методом ЯМР-спектроскопии в растворе DMSO (PDB 1WCO) [199], и модель комплекса Lchα/липид II. Модель комплекса Lchα/липид II получена путем совмещения атомов основной цепи молекул низина и Lchα по региону тиоэфирного кольца А. Показаны только *N*-концевые фрагменты обоих пептидов и пирофосфатная группа липида II. Водородные связи между HN группами основной цепи пептидов и кислородами пирофосфатной группы липида II показаны зелеными пунктирными линиями.

3.1.3 Модель антимикробного действия лихеницидина Lchα/Lchβ

С целью построения модели антибиотического действия пептидов Lchα и Lchβ, выделенных из *B. licheniformis* VK21, было проведено сравнение структурно-функциональных характеристик этих пептидов со свойствами других лантибиотиков (Рис. 3.3, 3.5). Многие из лантибиотиков имеют специфические липидные мишени, представленные на мембране бактериальной клетки. Так, например, низин (Рис. 3.3) способен селективно связывать важнейший компонент биосинтеза клеточный стенки грамположительных бактерий, – липид II, путем образования комплекса между участком,

включающим *N*-концевое тиоэфирное кольцо (A), и пирофосфатной группой липида II. Структура комплекса низин/липид II, определенная методами $^{1}H,^{13}C,^{15}N$ ЯМР-спектроскопии в растворе DMSO (PDB 1WCO) [199], показана на рисунке 3.5E (гомологичный липид II–связывающий мотив встречается в галлидермине, эпидермине, мутацине 1140, субтилине, [18]). Взаимодействие с липидом II значительно усиливает порообразующую активность низина, что указывает на образование смешанных пор, образованных как молекулами лантибиотика, так и молекулами липида II. Согласно современным данным, подобная пора имеет стехиометрию низин/липид II (8:4) [344]. Кроме того, взаимодействие низина с липидом II препятствует дальнейшему вовлечению последнего в биосинтез клеточной стенки.

Лантибиотик мерсацидин также способен связывать липид II, при этом за связывание отвечает *C*-концевой регион, включающий два тиоэфирных кольца (C,D, Рис. 3.3, гомологичный липид II–связывающий мотив встречается в плантарицине C, лактицине 481, в α-компоненте лактицина 3147 и галодурацина) [18]. Молекулярный механизм взаимодействия мерсацидин/липид II в настоящее время не известен [344], однако образование комплекса в этом случае ингибирует реакцию трансгликозилирования в процессе биосинтеза пептидогликана и приводит к остановке процесса биосинтеза клеточной стенки и прекращению роста и деления клетки-мишени.

Следует отметить, что существуют и другие липидные мишени лантибиотиков, например, циннамицин и его гомолог дурамицин, способны образовывать комплексы (1:1) с молекулами фосфатидилэтаноламина (PE), широко представленными в бактериальных мембранах [18].

Двухкомпонентные пептиды представляют отдельный класс лантибиотиков. Согласно современным данным, антимикробное действие двухкомпонентных лантибиотиков может быть представлено как многостадийный процесс, результатом которого является образование пор в мембране и гибель клетки-мишени. На первой стадии этого процесса α-компонент селективно связывается с липидом II клеточной стенки бактерии (в известных на сегодняшний день пептидах встречается мерсацидин-подобный липид II–связывающий мотив). Второй этап процесса заключается в селективном присоединении β-компонента, представляющего собой вытянутую спираль, к образованному комплексу α-компонент/липид II в соотношении 1:1. Формирование тройного комплекса ведет к эффективному порообразованию в мембране клетки-мишени.

Полученные в рамках данной работы структурные данные позволяют предложить модель антимикробного действия лихеницидинов. Так, *N*-концевой и *C*-концевой домены Lchα проявляют черты структурного сходства с низин-подобными и мерсацидин-

подобными липид II-связывающими мотивами, соответственно (Рис. 3.3, 3.5). Вероятно, Lchα образует комплекс с липидом II с участием одного или двух предполагаемых сайтов связывания. Последующее вовлечение Lchβ во взаимодействие с этим комплексом в соотношении 1:1, по-видимому, опосредует его внедрение в мембрану, приводящее к образованию пор. Эта модель подтверждается рядом экспериментальных данных. Во-первых, смесь Lchα+Lchβ проявляет антимикробную активность в наномолярном диапазоне концентраций, что свидетельствует о наличии специфической молекулярной мишени на мембране клетки. Структурное сходство липид II-связывающих мотивов Lchα и других лантибиотиков указывает на липид II как на наиболее вероятную мишень для связывания с Lchα. Центральный домен Lchβ представляет собой протяженную спираль длиной около 23Å, что достаточно для проникновения через гидрофобный регион липидного бислоя. Предложенная модель хорошо согласуется с данными о синергическом действии Lchα и Lchβ, максимальный эффект от которого достигается при соотношении индивидуальных пептидов 1:1 (Рис. 3.1A). Таким образом, мы можем заключить, что лихеницидин относится к семейству двухкомпонентных лантибиотиков и имеет схожий механизм антимикробного действия. Полученные данные также позволяют объяснить наличие сравнительно слабой антимикробной активности у индивидуальных пептидов Lchα/Lchβ. Вероятно, взаимодействие Lchα с липидом II ведет к ингибированию биосинтеза пептидогликана по механизму, описанному для мерсацидин-подобных лантибиотиков [344]. В то же время катионный пептид Lchβ (заряд +1) может связываться с анионными липидами мембраны бактериальной клетки и приводить к образованию пор по аналогии с механизмом действия низина в отсутствие липида II.

3.1.4 Резюме

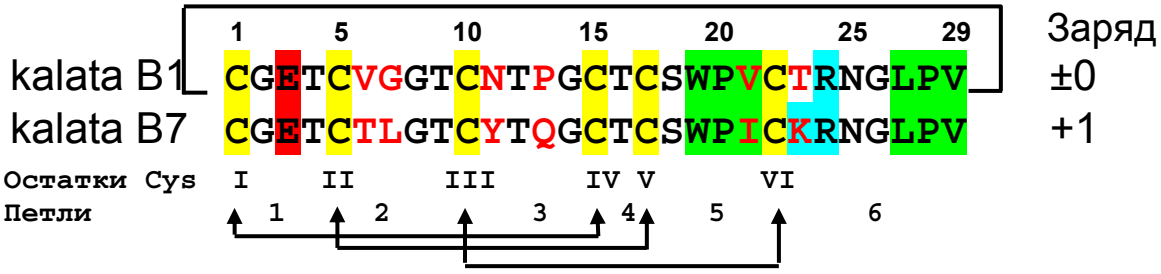
Методами ^{1}H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии с использованием классических мембраномоделирующих сред, – органических растворителей с низкой полярностью (метанол, смеси метанол/вода и метанол/хлороформ), определена первичная и пространственная структура нового двухкомпонентного лантибиотика лихеницидина Lchα/Lchβ, и предложен возможный механизм его антимикробной активности. Использование метанола в качестве основной среды для исследования позволило детально охарактеризовать конформационную гетерогенность молекул Lchα/Lchβ, обусловленную «медленными» (по шкале времен ЯМР) динамическими процессами.

Высокая конформационная подвижность молекул Lchα и Lchβ указывает на то, что внутримолекулярные ковалентные взаимодействия (тиоэфирные связи) являются не единственным фактором, ответственным за формирование «нативной» пространственной структуры этих антибиотиков в липидном бислое. Однако, участие внутримолекулярных

циклов в стабилизации рецепторных доменов Lchα и спирального домена Lchβ говорит о важности ковалентных взаимодействий для биологический активности. В то же время высокая внутримолекулярная подвижность пептида Lchα, позволяющая изменять взаимную ориентацию двух рецепторных доменов, соединенных гибким шарнирным участком, может играть важную роль в антибиотическом действии лихеницидина.

3.2 Пространственная структура, механизм взаимодействия с мицеллами DPC и двухвалентными катионами Mn^{2+} циклотидов Kalata B1 и Kalata B7

Циклические пептиды, – циклотиды Kalata B1 и B7 (KB1 и KB7), были выделены из африканского растения *Oldenlandia affinis* (семейство мареновые). Образцы пептидов для исследования были любезно предоставлены Проф. Ларсом Скьелдалом из Норвегии (Lars Skjeldal, Norwegian University of Life Sciences, IKBM, Aas, Norway). Аминокислотная последовательность KB1 и KB7 показана на рисунке 3.6. Основная цепь пептидов представляет собой цикл из 29 аминокислотных остатков (мол. масса 2892.4 и 3071.6 Да, соответственно). Пептиды отличаются друг от друга аминокислотными заменами в 6-и положениях и при нейтральных значениях pH имеют заряд ±0 и +1, соответственно.



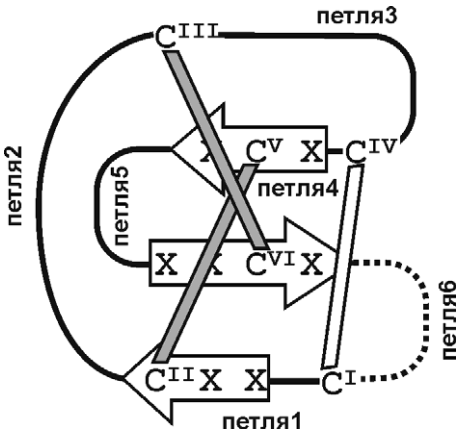


Рис. 3.6. Аминокислотная последовательность циклотидов Kalata B1 и B7 и общая топология структурного мотива «цистеиновый узел». Остатки Cys выделены желтым фоном и пронумерованы римскими цифрами. Положительно и отрицательно заряженные остатки показаны голубым и красным фоном. Остатки, образующие гидрофобные регионы, выделены зеленым фоном. Различия в аминокислотных последовательностях показаны красным. Полипептидный скелет циклотидов условно разбит на 6 петлевых участков, границами каждого из которых являются остатки цистеина. Разрыв полипептидной цепи в нециклических пептидах, содержащих «цистеиновый узел», находится в петле 6.

В настоящее время известно более 160 циклотидов, выделенных из растений семейств мареновые (*Rubiaceae*), фиалковые (*Violaceae*) и бобовые (*Fabaceae*) [345]. Кроме того, два циклических ингибитора трипсина выделено из растений семейства тыквенные (*Cucurbitaceae*) [346]. Циклотиды демонстрируют биологическую активность

широкого спектра действия, включая антимикробную, цитотоксическую, гемолитическую, противовирусную (ВИЧ) и инсектицидную активности. Отвары из *Oldenlandia affinis*, содержащие циклотиды KB1 и KB7, используются в народной африканской медицине для усиления родовой активности. Большая гидрофобность молекул циклотидов указывает на биологическую мембрану как на одну из мишеней действия этих пептидов. В то же время небольшой заряд циклотидов отличает их от антимикробных мембраноактивных пептидов (АП), которые в большинстве своем обладают катионными свойствами. Следует отметить, что данные о возможной мембранной активности циклотидов, полученные в настоящей работе, были позднее подтверждены прямыми исследованиями в везикулярных системах [347], где наблюдались поры, сформированные циклотидами, а также в ряде других работ [348].

Со структурной точки зрения циклотиды представляют собой небольшие циклические пептиды (от 28 до 37 аминокислотных остатков), основная цепь которых дополнительно стабилизирована тремя дисульфидными связями, имеющими топологию «цистеинового узла» (I–IV, II–V, III–VI, римские цифры обозначают остатки Cys). Подобная топология подразумевает наличие цикла, сформированного двумя дисульфидными связями (I–IV, II–V), который пронизывается третьим дисульфидом (III–VI, Рис. 3.6). Как структурный мотив цистеиновый узел часто встречается у β-структурных токсинов, антимикробных пептидов и ингибиторов ферментов из растений и животных, например, некоторые токсины паукообразных и моллюсков имеют подобную пространственную организацию [349]. В то же время, циклизация молекул циклотидов дополнительно усложняет топологию полипептидной цепи, что делает невозможным ее разворачивание без разрыва ковалентных связей. Возможно, именно топологические свойства полипептидной цепи обеспечивают стабильность структуры циклотидов, позволяя им выдерживать кипячение, обработку протеазами [350] и обеспечивая эффективность при пероральном применении [351].

Полипептидный скелет циклотидов можно условно разбить на 6 петлевых участков, границами каждого из которых являются остатки цистеина (Рис. 3.6). По первичной последовательности циклотиды подразделяют на два больших семейства «браслеты» и «ленты Мебиуса», последние выделяют благодаря наличию единственной *cys*-пептидной связи, образованной дипептидным фрагментом Xxx-Pro в петле 5 (Trp19-Pro20 в случае KB1 и KB7).

В связи с тем, что в молекулах циклотидов боковые группы цистеинов расположены близко друг к другу, определение схемы замыкания дисульфидных связей прямыми химическими методами затруднено. В момент выполнения исследований,

приведенных в работе, существовала альтернативная точка зрения на топологию дисульфидных связей в молекулах циклотидов. Исследователи, несогласные с концепцией «циклического цистеинового узла», предложили на основании собственных ЯМР-исследований альтернативную схему замыкания дисульфидных связей: топологию «лестница» (I–VI, II–V, III–IV) [352]. Однако, позже для KB1 комбинированным химическим и масс-спектрометрическим методом были получены убедительные аргументы в пользу топологии «цистеинового узла» [353].

<u>При исследовании циклотидов KB1 и KB7 были поставлены следующие задачи:</u>

1. Методами ЯМР-спектроскопии определить топологию дисульфидных связей в молекулах циклотидов.
2. Используя анизотропную мембраномоделирующую среду, определить пространственную структуру циклотидов в мембраноподобном окружении, а также энергетику и топологию взаимодействия пептид/мембрана. Исследовать роль, которую играют внутримолекулярная циклизация, а также гидрофобные взаимодействия с мембраноподобным окружением в формировании «нативной/активной» пространственной структуры циклотидов.
3. Определить механизм взаимодействия циклотидов с двухвалентными катионами металлов. (Возможность подобных взаимодействий была предсказана в одном из ранних ЯМР-исследований пептида KB1 [352]).

Выбор состава и концентрации компонентов мембраномоделирующей среды для исследования был обусловлен следующими факторами. (1) Пептиды KB1 и KB7 были выделены из природных источников и не содержали изотопных меток, что делало необходимым использование дейтерированных мембраномоделирующих сред. Во время выполнения исследований коммерчески доступными были только два дейтерированных детергента d38-DPC (цвиттер-ионный) и d25-SDS (анионный). Учитывая небольшой электрический заряд циклотидов KB1 и KB7 (Рис. 3.6), на начальном этапе в качестве среды для исследования были выбраны мицеллы дейтерированного цвиттер-ионного детергента d38-DPC, которые, возможно, хорошо моделируют свойства нейтральных биологических мембран, составленных из PC. (2) Для уменьшения неспецифической агрегации молекул МП следовало использовать концентрации детергента, соответствующие как минимум одной мицелле на одну молекулу пептида, что для DPC приводит к минимальному молярному соотношению детергент/пептид (D:P) ~ 60:1.

Следует отметить, что проведенный в рамках работы качественный анализ ЯМР-спектров KB1 и KB7 в окружении мицелл анионного детергента SDS не выявил

значительных различий в структуре пептидов при изменении свойств мембраномоделирующей среды (см. пункт 3.2.3).

3.2.1 Энергетика взаимодействия циклотидов KB1 и KB7 с поверхностью мицеллы DPC

Для наблюдения за формированием комплекса между пептидами KB1 и KB7 и мицеллами DPC были использованы диффузионные ЯМР-эксперименты и 1D ^{1}H ЯМР-спектроскопия. Измерения проводили при температуре 30°C и pH 2.8/2.6 (KB1/KB7) в растворе 5% D_2O. Химические сдвиги некоторых сигналов пептидов значительно изменялись при увеличении концентрации детергента в образце (увеличении молярного соотношения детергент/пептид D:P) (Рис. 3.7АБ). В приближении быстрого (по шкале времен ЯМР) обмена молекул пептида между водным раствором и мицеллами детергента наблюдаемые значения химических сдвигов позволяют оценить долю мицеллосвязанного пептида при данном значении D:P (Ур. 7.21). Для детального анализа изотерм связывания (Рис. 3.7АБ) наблюдали за изменением химического сдвига $^{1}H^{\varepsilon 1}$ остатка Trp19, который как в KB1, так и в KB7 находится в центре гидрофобной области (Рис. 3.8). Полученные кривые показали, что при D:P ~ 20:1 оба пептида находятся практически полностью в мицеллосвязанном состоянии.

Аппроксимация кривых связывания с помощью изотермы Ленгмюра (Ур. 7.23) позволила оценить параметры образования комплексов пептид/мицелла: свободную энергию ΔG^{0} = -5.4±0.1 и -4.7±0.1 кКал·М$^{-1}$ и число молекул DPC, формирующих сайт связывании пептида на поверхности мицеллы N = 4.9±0.1 и 3.1±0.1, для KB1 и KB7, соответственно. Сравнительно небольшие величины полученных параметров лучше согласуются с периферическим взаимодействием пептидов с поверхностью мицеллы DPC, чем с их встраиванием в гидрофобную область мицеллы. Следует отметить, что рассчитанная свободная энергия образования комплекса KB1/DPC хорошо согласуется с константой формирования комплекса KB1/липидный бислой DMPC (10^{4}·М$^{-1}$), измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) [354]. Полученные данные выявили б*о*льшее сродство пептида KB1 к поверхности мицеллы DPC по сравнению с KB7, что согласовывалось со сравнительной гидрофобностью пептидных молекул. Так, например, время элюции пептида KB7 с ВЭЖХ колонки с обращенной фазой C18 было меньше, чем у KB1 (28.4 против 29.2 мин) [355].

Трансляционная диффузия пептидов KB1 и KB7 в растворе значительно замедлялась при добавлении детергента DPC, указывая на формирование комплексов пептид/мицелла (Рис. 3.7АБ). При этом линейное падение коэффициента трансляционной диффузии пептидов (D_T), наблюдаемое при значениях D:P превышающих 20:1, указывало

на затруднение диффузии комплексов пептид/мицелла (кажущееся увеличение вязкости растворителя) при увеличении концентрации детергента в образце. Для оценки коэффициента трансляционной диффузии для комплексов KB1/DPC и KB7/DPC на бесконечном разведении значения D_T, измеренные в диапазоне D:P от 20:1 до 60:1, были экстраполированы на нулевую концентрацию детергента (Рис. 3.7АБ, пунктирные линии).

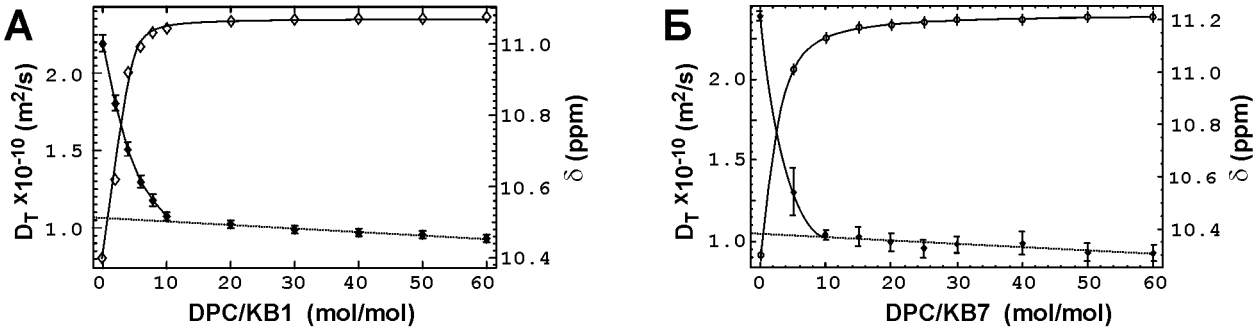


Рис 3.7. Титрование образцов пептидов (А) KB1 (3.6 мМ, 30°C, pH 2.8) и (Б) KB7 (1.6 мМ, 30°C, pH 2.6) детергентом DPC. Значения химического сдвига (δ) $H^{\varepsilon 1}$ протона остатка Trp19 аппроксимированы уравнением Ленгмюра (Ур. 7.23). Значения коэффициента трансляционной диффузии пептидов (D_T) в диапазоне D:P от 20:1 до 60:1 экстраполированы на нулевую концентрацию детергента (пунктирные линии).

Полученные коэффициенты диффузии 1.07±0.03 и 1.05±0.03 $\times 10^{-10}$ $м^2 \cdot с^{-1}$ соответствовали гидродинамическим радиусам (радиусам Стокса, R_H) 26.0±0.6 Å и 26.4±0.6 Å для KB1 и KB7, соответственно. Таким образом, характерные размеры комплексов KB1/DPC и KB7/DPC лишь ненамного превосходили размеры мицеллы DPC (D_T = 1.20±0.02 $\times 10^{-10}$ $м^2 \cdot с^{-1}$, R_H = 23.1±0.5 Å, см. п. 4.1.5.1). Следует отметить, что различие в коэффициентах трансляционной диффузии пептидов в водном растворе 2.4±0.1 и 2.8±0.1 $\times 10^{-10}$ $м^2 \cdot с^{-1}$ (R_H = 11.6±0.5 Å и 9.9±0.5 Å, для KB1 и KB7, соответственно), возможно, указывает на агрегацию KB1. В то же время в ходе исследования экспериментальных данных, говорящих в пользу агрегации пептидов в окружении мицелл DPC, получено не было.

3.2.2 Топология системы дисульфидных связей в молекулах циклотидов

Исследование топологии системы дисульфидных связей в молекулах циклотидов проводили с использованием образца пептида Kalata B1 в мицеллах DPC (3.6 мМ, D:P = 60:1, pH 2.8, 40ºC). Для точного установления конформации основной и боковой цепей остатков Cys наряду с интенсивностями ЯЭО были привлечены данные из КССВ $^3J_{HNH}{}^{\alpha}$ и $^3J_H{}^{\alpha}{}_H{}^{\beta}$, дающие информацию о значении торсионных углов φ и χ^1, соответственно (Табл. 3.2). Однако этих данных оказалось недостаточно для того, чтобы однозначно установить конформацию боковой цепи для 5-и (из 6-и) остатков Cys и достоверно различить ротамеры g^+ (-60°) и t (180°) торсионного угла χ^1. Для решения этой проблемы на натуральном содержании изотопа ^{13}C были измерены КССВ $^3J_C{}'{}_H{}^{\beta}$, также зависящие от величины угла χ^1. Из-за быстрой поперечной релаксации ядерной намагниченности (R_2)

измерение этих констант для образца KB1 в мицеллах было невозможно, поэтому соответствующие измерения проводили в растворе D_2O. Сравнительно небольшие изменения химических сдвигов H^{α} и H^{β} протонов указали на отсутствие изменений в конформации боковых цепей остатков Cys при переводе образца из водного раствора в окружение мицелл DPC (Табл. 3.2). Для измерения КССВ $^3J_{C'H}{}^{\beta}$ была разработана специальная методика, основанная на методе количественной J-корреляции [356] (см. п. 7.4.3.3). Полученные данные позволили точно определить ротамеры углов χ^1 остатков Cys на основании совместного анализа КССВ $^3J_H{}^{\alpha}{}_H{}^{\beta}$ и $^3J_{C'H}{}^{\beta}$ (Табл. 3.2).

Остаток	**Cys1(I)**	**Cys5(II)**	**Cys10(III)**	**Cys15(IV)**	**Cys17(V)**	**Cys22(VI)**
$\Delta\delta_H{}^{\alpha}$ (м.д.)[1]	0.00	0.12	-0.08	0.05	0.11	0.01
$\Delta\delta_H{}^{\beta 2}$ (м.д.)	0.00	-0.24	0.01	0.00	0.02	-0.05
$\Delta\delta_H{}^{\beta 3}$ (м.д.)	0.04	0.15	-0.02	0.04	0.03	0.06
$^3J_H{}^{\alpha}{}_H{}^{\beta 2}$ (Гц)[2]	12	3	12	12	4	14
$^3J_H{}^{\alpha}{}_H{}^{\beta 3}$ (Гц)	4	4	4	3	12	3
$^3J_{C'H}{}^{\beta 2}$ (Гц)[3]	n/o	n/o	n/o	n/o	9	n/o
$^3J_{C'H}{}^{\beta 3}$ (Гц)	n/o	9	n/o	n/o	n/o	n/o
Ротамер χ^1	g^+ (-60°)	g^- (+60°)	g^+ (-60°)	g^+ (-60°)	t (180°)	g^+ (-60°)

Табл. 3.2. Конформация боковых цепей остатков Cys в циклотиде KB1. (1) Изменения химических сдвигов H^{α} и H^{β} протонов Cys при переводе пептида из водного раствора в окружение мицелл DPC. Значения, превышающие 0.1 м.д. выделены серым фоном. (2) КССВ $^3J_H{}^{\alpha}{}_H{}^{\beta}$, измеренные в окружении мицелл DPC, ошибка измерения составляет не более 0.5 Гц. (3) КССВ $^3J_{C'H}{}^{\beta}$, измеренные в растворе D_2O. Только два C'-H^{β} кросс-пика наблюдались в дальнем ^{13}C-HMQC спектре, что соответствовало $^3J_{C'H}{}^{\beta}$ = 9±1 Гц. Для ненаблюдаемых кросс-пиков (n/o) значения $^3J_{C'H}{}^{\beta}$ составляли не более 4.5 Гц.

Параметр/Тип/Единицы	$KB1_0$	$KB1_{УЗЕЛ}$	$KB7_{УЗЕЛ}$
Структуры, рассчитанные, отобранные для анализа	1000 500	100 20	100 20
Штрафная функция CYANA (Å^2)	0.17 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.45 ± 0.06
Ограничения на расстояния верхние/нижние: ЯЭО; водородные связи (число); дисульфидные связи (число)	289/58 26/26 (13)	289/58 26/26 (13) 9/9 (3)	312/28 24/24 (12) 9/9 (3)
Ограничения на торсионные углы $\varphi/\chi^1/\chi^2$	21/11/1	21/11/1	23/12/1
Максимальные нарушения верхних, нижних и ван-дер-ваальсовых ограничений (Å)	0.19 0.10 0.15	0.12 0.07 0.13	0.15 0.10 0.14
Максимальное нарушение значений углов (°)	3.1	2.5	2.3
СКО атомных координат (Å) основная цепь; тяжелые атомы	0.31 ± 0.11 0.73 ± 0.13	0.12 ± 0.04 0.43 ± 0.06	0.13 ± 0.05 0.51 ± 0.09

Табл. 3.3. Статистика набора структур циклотидов KB1 и KB7 в комплексе с мицеллами DPC, рассчитанных в программе CYANA. Наборы структур $KB1_0$ и $KB1/7_{УЗЕЛ}$ рассчитаны без дополнительных ограничений на замыкание дисульфидных связей и с ограничениями, подразумевающими топологию «цистеинового узла», соответственно.

На основании данных ЯМР в программе CYANA был рассчитан набор 500 пространственных структур KB1 (из 1000 случайных стартовых конформаций) без

дополнительных ограничений на замыкание дисульфидных связей. При расчете структуры ван-дер-ваальсовы взаимодействия между S^{γ} атомами остатков Cys не учитывались (соответствующие атомные радиусы предполагались равными 0). Статистика полученного набора структур приведена в таблице 3.3. Анализ попарных расстояний между S^{γ} атомами остатков Cys в полученном наборе структур позволил однозначно определить замкнутые пары цистеинов [Cys1(I)–Cys15(IV), Cys5(II)–Cys17(V), Cys10(III)–Cys22(VI)], что соответствует топологии «цистеинового узла» (Табл. 3.4).

Остаток	**Cys1(I)**	**Cys5(II)**	**Cys10(III)**	**Cys15(IV)**	**Cys17(V)**
Cys5(II)	7.7/9.3				
Cys10(III)	5.3/6.5	3.6/5.1			
Cys15(IV)	2.0/3.5	9.0/10.5	5.9/6.6		
Cys17(V)	9.2/10.5	2.3/3.8	3.8/5.2	10.0/11.1	
Cys22(VI)	5.4/6.4	2.7/4.7	2.0/5.0	6.1/7.5	3.9/6.6

Табл. 3.4. Попарные расстояния (Å, минимум/максимум) между S^{γ} атомами остатков Cys в наборе структур $KB1_0$, рассчитанном без дополнительных ограничений на замыкание дисульфидных связей. Пары остатков Cys, подходящих для образования дисульфидных связей (минимальное расстояние S^{γ}-S^{γ} < 3.0 Å) отмечены серым цветом. Для Cys1 и Cys10 допустим лишь один вариант SS-связей (вместе с Cys15 и Cys17, соответственно). Для Cys5 одинаково возможно образование SS-связей с Cys17 и Cys22. Методом исключения получается единственно возможная тройка дисульфидов, являющаяся цистеиновым узлом.

3.2.3 Пространственные структуры циклотидов KB1 и KB7 в комплексе с мицеллами DPC

Финальный расчет структур пептидов KB1 и KB7 был произведен в программе CYANA с использованием ограничений на замыкание дисульфидных связей по схеме «цистеиновый узел» (Табл. 3.3). Пространственная структура пептидов KB1/KB7 в комплексе с мицеллой DPC (Рис. 3.8А, 3.9А) от Cys15 до Arg24 представляет собой β-шпильку с Trp19-Pro20 на ее конце; эти остатки образуют β-поворот VIa-типа. Другая часть молекулы представляет собой протяженную петлю, замыкающую циклическую структуру. Эта петля соединяется с β-шпилькой двумя β-поворотами Arg24-Leu27 (I'-типа) и Thr12-Cys15 (II-типа) и включает в себя обратный γ-поворот Leu27-Val29 и β-поворот I-типа Cys5-Gly8 (представлен в обоих пептидах). Также в структуре пептидов наблюдается третий нерегулярный β-тяж (остатки 3-5), соединенный водородными связями с β-шпилькой.

Распределение электростатического (Рис. 3.8Б, 3.9Б) и гидрофобного (Рис. 3.8В, 3.9В) потенциала на поверхности пептидов иллюстрирует их амфифильные свойства. В случае KB1 одна часть молекулы, сформированная β-шпилькой и петлями 2 и 6, содержит гидрофобные и ароматические остатки (Val6, Trp19, Val21, Leu27 и Val29), в то время как заряженные боковые цепи Glu3 и Arg24 находятся в другой части молекулы. В случае

КВ7 гидрофобные области формируют Trp19, Ile21, Leu27 и Val29, а заряженные группы остатков Glu3, Lys23 и Arg24 также расположены на противоположной стороне.

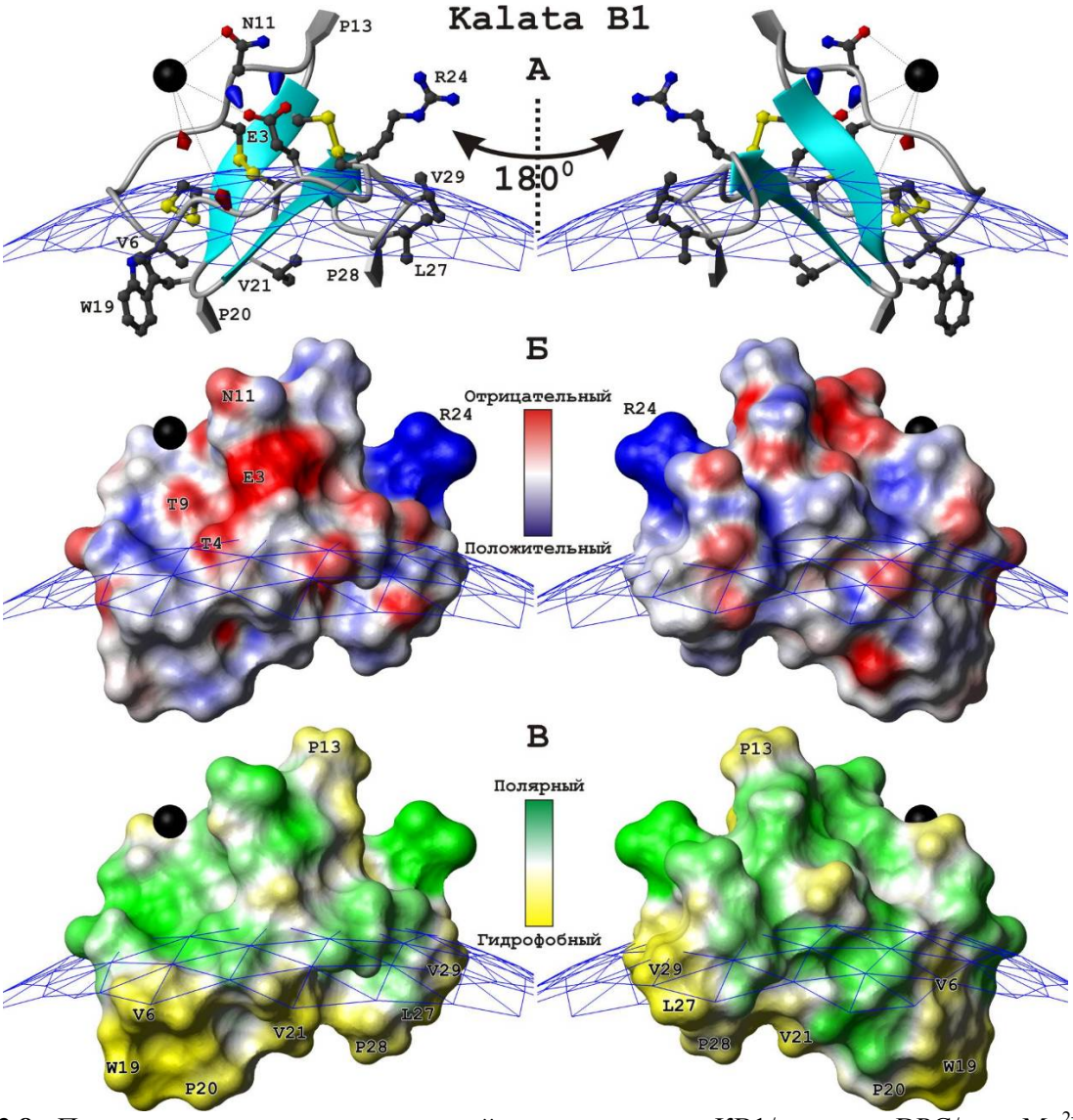


Рис. 3.8. Пространственная структура тройного комплекса КВ1/мицелла DPC/ион Mn^{2+}. (А) Структура КВ1 с указанием элементов вторичной структуры β-тяжей (голубые стрелки) и функционально важных остатков. (Б, В) Распределение электростатического потенциала и потенциала молекулярной гидрофобности на поверхности КВ1. Черным шаром (R = 1 Å) показан катион Mn^{2+}. Поверхность мицеллы с радиусом 32 Å показана синей сеткой.

Для исследования пространственной структуры циклотидов КВ1 и КВ7 были использованы кислые значения pH (2.8, 2.6). При таких условиях наблюдается минимум скорости обмена H^N протонов с растворителем. Измерение ЯМР-спектров при кислых значениях pH позволило значительно обузить и, соответственно, увеличить интенсивность сигналов амидных протонов. Для проверки возможности аппроксимации полученных структурных данных на физиологические условия (нейтральные значения pH) для комплексов КВ1/DPC и КВ7/DPC был измерен набор 1D и 2D ^1H ЯМР-спектров в диапазоне pH от 2.5 до 6.8. Сравнение спектров в крайних точках диапазона показало отсутствие значительных pH-зависимых изменений в структуре циклотидов. Следует

отметить, что оба пептида содержат только одну ионогенную группу (карбоксил боковой цепи Glu3), которая может изменять свое состояние при переходе из кислых значений pH в нейтральные. В ходе pH-титрования было определено значение pKa Glu3. Для обоих пептидов оно оказалось равным 3.4. Значительные изменения химических сдвигов при pH-титровании наблюдались лишь для протонов, находящихся в непосредственной близости от боковой группы Glu3. Сильный сдвиг (более 1 м.д. в слабое поле), наблюдаемый для сигналов амидных протонов Asn/Tyr11 и Thr/Thr12 (KB1/KB7), указал на участие этих групп в образовании водородных связей с карбоксильной группой боковой цепи Glu3 (Рис. 3.8A, соответствующие HN группы показаны синими конусами).

Для оценки влияния свойств мембраномоделирующей среды (заряда полярных головок детергента) на структуру циклотидов было проведено сравнение 2D TOCSY и NOESY спектров пептидов KB1 и KB7 в водном растворе, в окружении мицелл DPC (цвиттер-ионный детергент) и мицелл SDS (анионный детергент). Полученные данные не выявили значительных изменений в структуре циклотидов. Кроме того, также как и в случае мицелл DPC, не было получено никаких экспериментальных данных, указывающих на агрегацию пептидов в окружении мицелл анионного детергента SDS. Таким образом, можно утверждать, что мотив «циклического цистеинового узла» предает необычайную жесткость пространственной структуре циклотидов, которая не меняется при изменении pH среды и при переходе пептидов из водного раствора в комплекс с мицеллами детергента, моделирующими мембранное окружение.

3.2.4 Положение молекул KB1 и KB7 относительно поверхности мицеллы

Молекулы 5-доксилстеариновой кислоты (5-DSA) и 16-доксилстеариновой кислоты (16-DSA) встраиваются в мицеллу таким образом, что их спиновые метки располагаются в положениях, близких к поверхности мицеллы и ее центру, соответственно [357]. Вызываемая этими метками парамагнитная релаксация мицеллосвязанных пептидов значительно уширяет сигналы и, соответственно, уменьшает их интенсивность. Это позволяет определить топологию связывания пептида с мицеллой и построить модель комплекса пептид/мицелла.

Для определения эффекта спиновых меток на релаксацию протонов KB1 и KB7 анализировали относительное уменьшение амплитуды сигналов в NOESY спектрах (τ_m 100 мс) пептидов, вызванное добавлением спиновых меток (Рис. 3.10ВГ). Для KB1 были использованы обе метки, а для KB7 использовали только 5-DSA. Исследования проводили при pH 5.0, при котором боковая цепь Glu3 полностью заряжена. Спиновые зонды добавляли до молярного соотношения спин-метка/пептид 1:1, то есть до концентрации одна молекула DSA на мицеллу. Несмотря на то, что в случае KB1 обе метки (5-DSA и 16-

DSA) приводили к одинаковым кривым ослабления сигналов (Рис. 3.10В), 5-DSA вызывал более сильное ослабление амплитуды (уширение) пиков, указывая на периферический тип взаимодействия пептида с мицеллой. Полученные данные показали, что две части молекулы KB1 Gly26-Val29-Cys1-Gly7 и Ser18-Cys22 проникают внутрь мицеллы и формируют интерфейс взаимодействия комплекса пептид/мицелла (Рис. 3.10В). В то же время KB7 взаимодействует с мицеллой другим участком: Gly2-Gly8 и Trp19-Ile21(Рис. 3.10Г).

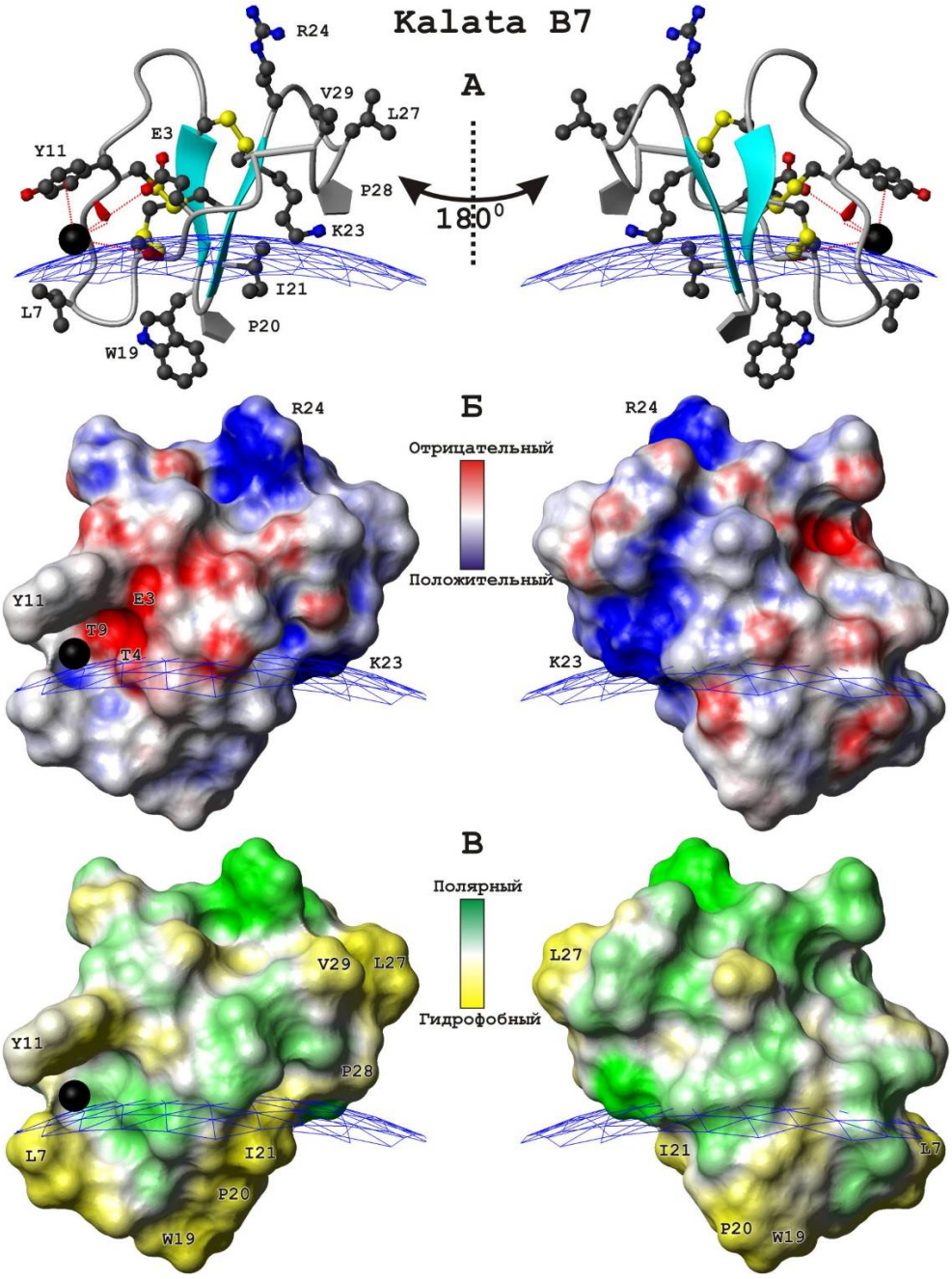


Рис. 3.9. Пространственная структура тройного комплекса KB7/мицелла DPC/ион Mn^{2+}. (А) Структура KB7 с указанием элементов вторичной структуры β-тяжей (голубые стрелки) и функционально важных остатков. (Б, В) Распределение электростатического потенциала и потенциала молекулярной гидрофобности на поверхности KB7. Черным шаром (R = 1 Å) показан катион Mn^{2+}. Поверхность мицеллы с радиусом 32 Å показана синей сеткой.

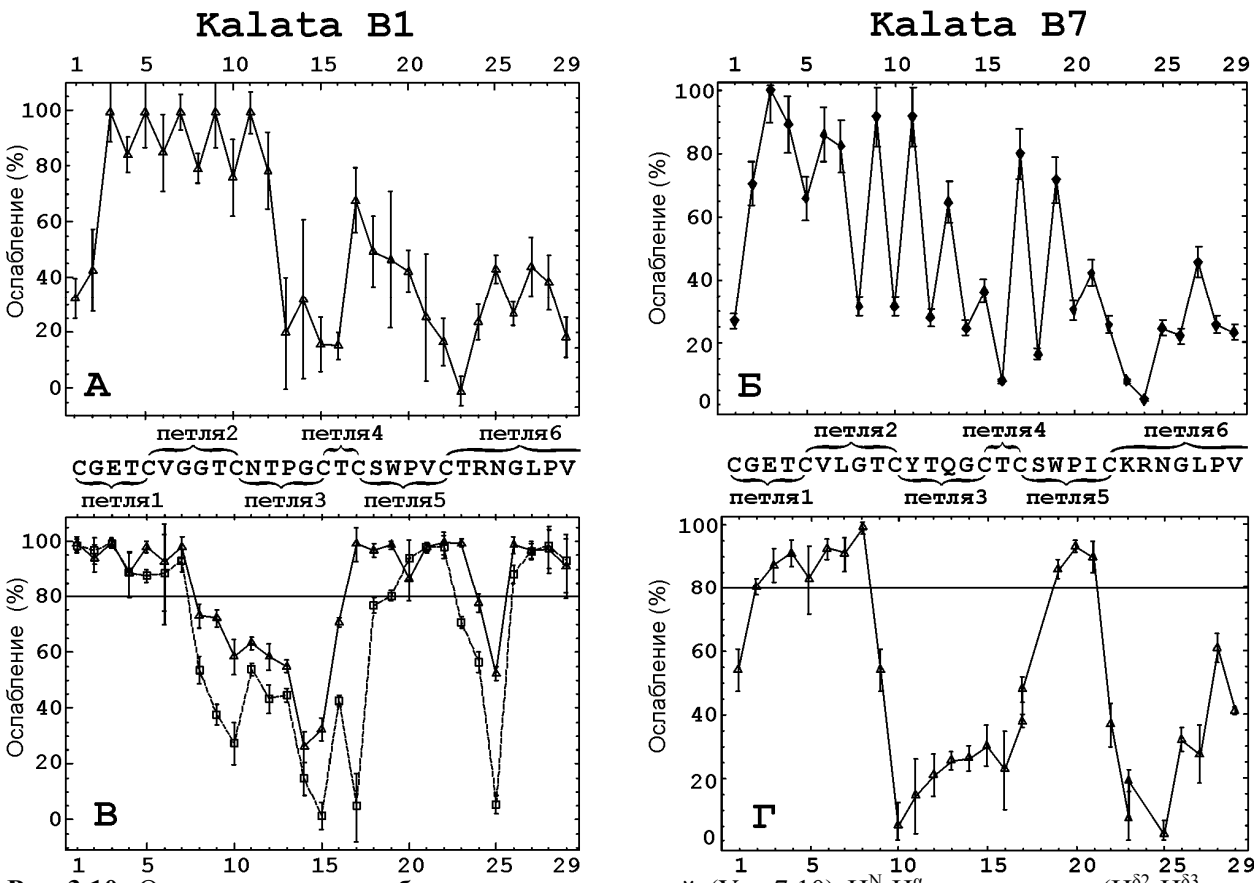


Рис 3.10. Относительное ослабление интенсивностей (Ур. 7.10) H^N-H^α кросс-пиков ($H^{\delta 2}$-$H^{\delta 3}$ для остатков Pro) в NOESY спектрах (τ_m 100 мс) КВ1 (1.8 мМ, D:P = 60:1, pH 5.0, 40°C) и КВ7 (0.6 мМ, D:P = 60:1, pH 5.0, 40°C), вызванное парамагнитными метками. (А) КВ1 + 3 мМ $MnCl_2$. (Б) КВ7 + 2.4 мМ $MnCl_2$. (В) КВ1 + 1.8 мМ 16-DSA (сплошная линия) или 5-DSA (пунктирная линия). (Г) КВ7 + 0.6 мМ 5-DSA. Уровень 80% на панелях (В,Г) отделяет остатки, заглубленные в гидрофобный регион мицеллы.

Модели комплексов пептид/мицелла (Рис. 2.13, 2.14) были построены на основании пространственной структуры пептидов и данных об уширении сигналов меткой 5-DSA, используя оригинальный подход (см. п. 7.6.1.1). Как видно из Рис. 3.8, пептид КВ1 взаимодействует с мицеллой, моделирующей мембрану, двумя гидрофобными кластерами. Один из них включает в себя фрагменты 2 и 5 петлевых участков (остатки Val6-Gly7 и Cys17-Cys22), другой – два поворота петли 6 (остатки Gly26-Val29). Нерегулярный β-тяж и его соседние остатки в петле 1 (Cys1-Cys5) также контактируют с поверхностью мицеллы.

Несмотря на большую гомологию первичной и пространственной структур двух пептидов, циклотид КВ7 демонстрирует иной характер связывания с частицами мембраномоделирующей среды (Рис. 3.9). КВ7 взаимодействует с поверхностью мицеллы 2-ым петлевым участком (остатки Thr6-Leu7), нерегулярным β-тяжем из петли 1 (остатки Gly2-Cys5), боковой цепью Tyr11, а также кончиком β-шпильки (гидрофобные остатки Trp19-Pro20-Ile21). Отличия в топологии комплексов KB1/DPC и KB7/DPC, вероятно, связаны с наличием дополнительного заряженного остатка (заменой Thr/Lys23) в

последовательности КВ7. Как видно из рисунков 3.8 и 3.9, пептид КВ7 имеет меньшую площадь взаимодействия с поверхностью мицеллы, чем КВ1, что прекрасно согласуется с данными об энергетике образования комплексов пептид/мицелла.

3.2.5 Сайт связывания двухвалентных катионов в молекулах КВ1 и КВ7

В ходе одного из ранних ЯМР-исследований пептида КВ1 было высказано предположение, что молекулы циклотидов могут связывать двухвалентные катионы металлов в сайте, расположенном вблизи от боковой цепи Glu3 [352]. Для определения способа взаимодействия с ионами металлов образцы, содержащие комплексы пептид/мицелла (КВ1/КВ7 1.8/0.6 мМ, D/P=60:1, pH 5.0, условия при которых карбоксильная группа Glu3 полностью заряжена) титровались парамагнитными катионами Mn^{2+} (в виде водного раствора соли $MnCl_2$). Из-за эффекта парамагнитного усиления релаксации (PRE) скорости поперечной R_2 и продольной R_1 релаксации для протонов пептидов КВ1 и КВ7 увеличивались линейно по мере роста концентрации Mn^{2+} в образцах (Рис. 3.11). При молярном отношении КВ1/Mn^{2+}=1:1.7 (КВ7/Mn^{2+}=1:4) кросс-пики в спектрах NOESY демонстрировали сильные уширения (Рис. 3.10АБ). При этом в обоих случаях наибольшее уширение наблюдалось для одних и тех же остатков.

Для количественного анализа эффекта PRE в 1D ^{1}H ЯМР-спектрах пептидов при разных концентрациях Mn^{2+} были измерены полуширины неперекрывающихся сигналов H^N протонов (12/7 для КВ1/КВ7). Полученные значения $\Delta\delta^1H^N$ были пересчитаны в скорости R_2 релаксации (Ур. 7.13, Рис. 3.11АВ). Кроме того, для 7-и H^N протонов пептида КВ7 при разных концентрациях Mn^{2+} были измерены скорости R_1 релаксации (Рис. 3.11Г). Анализ возможных источников эффекта PRE (по методике, описанной в [358]) показал, что ни свободно диффундирующие в растворе ионы Mn^{2+}, ни ионы, связанные с полярными головками детергента, не являются причиной наблюдаемых эффектов. Таким образом, усиление релаксации протонов было вызвано специфическим связыванием парамагнитного иона на поверхности пептидов. Точная локализация катиона Mn^{2+} на поверхности пептидов КВ1 и КВ7 была рассчитана на основании пространственной структуры и данных о зависимости эффекта PRE от концентрации Mn^{2+} (наклонов кривых, представленных на рисунках Рис. 3.11АВГ). Как видно из Рис. 3.8, связанный катион (черный шарик) скоординирован на поверхности КВ1 заряженной боковой группой Glu3, полярной боковой цепью Asn11 и карбонилами Thr4 и Thr9. Расстояние от катиона до атомов кислорода этих групп составляет величину порядка 4-8 Å. Таким образом, ион Mn^{2+} находится в частично гидратированном состоянии.

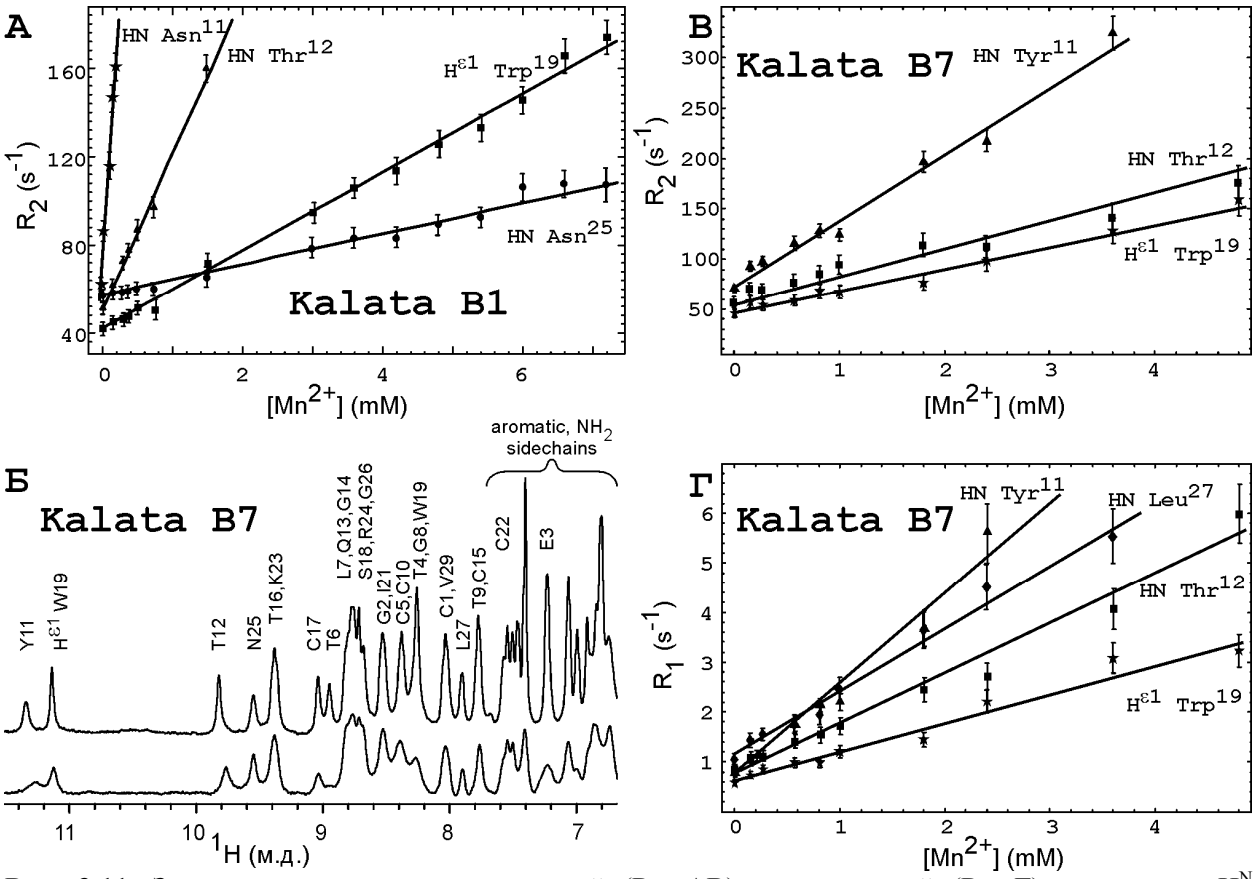


Рис. 3.11. Зависимость скорости поперечной (R_2, АВ) и продольной (R_1, Г) релаксации H^N протонов пептидов КВ1 (А) и КВ7 (ВГ) от концентрации [Mn^{2+}] (КВ1/КВ7 1.8/0.6 мМ, D/P=60:1, pH 5.0). (Б) Сравнение 1D ^{1}H ЯМР-спектров пептида КВ7, измеренных без добавления и в присутствии 2.4 мМ $MnCl_2$.

В случае КВ7 связанный катион Mn^{2+} скоординирован теми же группами, что и в КВ1, но с одним отличием: вместо полярной боковой цепи Asn11 у КВ7 находится ароматическое кольцо Tyr11, которое также может служить донором электронной плотности (Рис. 3.9). Таким образом в стабилизации связанного двухвалентного катиона определенную роль играют π-катионное взаимодействие, при котором водородную связь с молекулой воды из гидратной оболочки иона Mn^{2+} образует ароматическое кольцо Tyr11. Такие водородные связи наблюдались ранее в кристаллических структурах белков [359]. Следует отметить, что в случае комплекса КВ7/DPC связанный катион, видимо, также может непосредственно контактировать с полярными головками детергента.

Одновременное измерение скоростей релаксации R_2 и R_1 для пептида КВ7 позволило определить характерное время корреляции процесса парамагнитной релаксации (τ_C = 2,1±0,3 нс, Ур. 7.20), что в свою очередь позволило оценить константу диссоциации комплекса КВ7/DPC×Mn^{2+} (K_D = 0.4±0.1 М). Следует отметить, что значение τ_C, рассчитанное из экспериментальных данных, значительно меньше, чем ожидаемое время вращательной корреляции комплекса КВ7/DPC (τ_R ~ 14 нс, оценка получена из диффузионных данных и значения R_H). Наблюдаемый эффект может быть связан либо с быстрой релаксацией электронов иона Mn^{2+}, либо с присутствием дополнительных

степеней свободы у мицеллосвязанного пептида (что приводит к уменьшению эффективного значения τ_R), или с коротким временем жизни (~2.5 нс) связанного иона Mn^{2+} (Ур. 7.19). Вероятно, имеют место все эти факторы. Данные, полученные для пептида KB1, также позволяют оценить значение константы диссоциации комплекса KB1/DPC×Mn^{2+}. С одной стороны, линейный рост R_2 при увеличении концентрации Mn^{2+} указывает на то, что K_D >> 7 мМ. В то время как условие $\tau_C < \tau_R$ позволяет получить верхнюю оценку на значение K_D << 1.1 М. Таким образом, несмотря на различия в аминокислотной последовательности, оба циклотида KB1 и KB7 способны связывать двухвалентные катионы в одном и том же сайте и с примерно одинаковой аффинностью. Следует отметить, что для оценки величины константы диссоциации комплексов KB1/7×Mn^{2+} были использованы данные, полученные при значительном молярном избытке детергента DPC (D:P 60:1). DPC содержит в своей структуре фосфатную группу, которая также способна связывать двухвалентные катионы с аффинностью в молярном-миллимолярном диапазоне (см., например, [360]). В этих условиях проведенные расчеты дают завышенную оценку для констант диссоциации комплексов KBx×Mn^{2+}. Возможно, молекулы циклотидов в растворе (вне липидной мембраны/мицеллы детергента) имеют б*о*льшую аффинность по отношению к двухвалентным катионам металлов.

3.2.6 Возможная роль взаимодействий пептид/мембрана и пептид/двухвалентный катион в антимикробной активности различных семейств циклотидов

Несмотря на большое структурное разнообразие, антимикробные мембраноактивные пептиды (АП) имеют ряд похожих свойств, которые являются необходимыми для их активности. Эти свойства включают в себя гидрофобность и общий положительный заряд молекулы [11]. Однако для оптимальной мембранной активности АП должны иметь амфифильные свойства, то есть гидрофобные и заряженные остатки должны быть разделены на поверхности молекулы. В этом плане структура циклотидов KB1 и KB7 идеально подходит для взаимодействия с интерфейсом фосфолипидной мембраны. Пептиды имеют участки гидрофобной поверхности, сформированные короткими петлями, и взаимодействуют с мицеллами DPC (анизотропным мембранным миметиком), не проникая глубоко вглубь мицеллы. Полярные и заряженные (Glu3, Arg24 у KB1 и Glu3, Lys23, Arg24 у KB7) остатки пептидов находятся над гидрофобным регионом мицеллы, и, возможно, взаимодействуют с полярными головками детергента. Таким образом, полученные структуры комплексов пептид/мицелла моделируют гидрофобные и, частично, электростатические взаимодействия, возможно, участвующие в образовании комплекса пептид/мембрана.

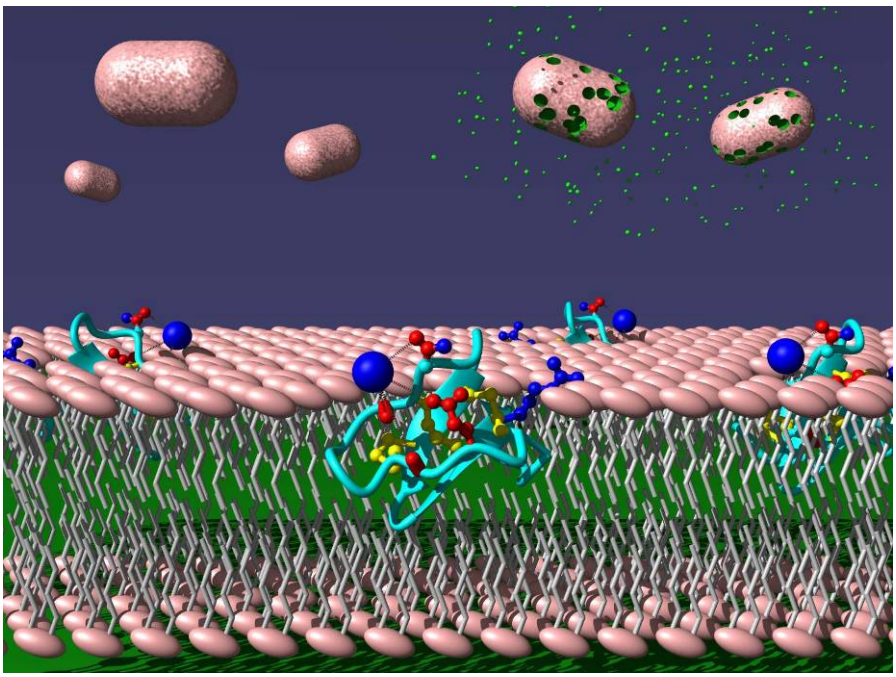


Рис. 3.12. Возможная топология пептида КВ1 в анионной мембране бактериальной клетки.

Сродство циклотидов к анионным мембранам бактериальных клеток может быть усилено специфичным связыванием двухвалентного катиона в сайте, расположенном на поверхности пептида вблизи от карбоксильной группы боковой цепи Glu3 (Рис. 3.12). Связывание, например, ионов Ca^{2+} (присутствующих в межклеточном пространстве в концентрациях > 1 мМ) увеличивает общий заряд пептида (от 0 до +2 для КВ1 и от +1 до +3 для КВ7) и его амфифильность. Во время взаимодействия с мембраной микробов связанный катион может экранировать отрицательный заряд боковой цепи Glu3 и взаимодействовать с анионными липидными головками, увеличивая, таким образом, мембранную активность пептидов. Кроме того, связывание молекулами циклотидов двухвалентных катионов, стабилизирующих молекулы липополисахарида (LPS [361]), может приводить к дестабилизации внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Наличие Lys23 у КВ7, увеличивающее общий заряд молекулы на +1 по сравнению с КВ1, по-видимому, увеличивает электростатическую и уменьшает гидрофобную составляющую энергии связывании пептида с мембраной.

Как уже отмечалось, два семейства циклотидов: «браслеты» и «кольца Мёбиуса» отличают по наличию в последних *cys*-пептидной связи, образованной фрагментом Xxx-Pro в петле 5. Оба этих семейства включают в себя молекулы, обладающие антимикробным, антивирусным и цитотоксическим действием. Как отмечалось ранее, члены обеих групп обладают похожими структурными свойствами: консервативным β-листом, состоящим из 3-х β-тяжей, и 3-мя дисульфидными мостиками, образующими «цистеиновый узел». Таким образом, различные профили активностей пептидов из двух семейств указывают на различие строения петлевых участков как главный детерминант

биологической активности. Предполагая, что первичной мишенью действия циклотидов является биологическая мембрана, можно сравнить структуры «браслетов» и «колец Мёбиуса» в рамках предложенной модели взаимодействия циклотидов с мембраной. Можно предположить, что основными детерминантами мембранной активности являются: 1) сайт связывания катиона, который увеличивает общий заряд молекулы и амфифильность, 2) распределение гидрофобных регионов на поверхности пептидов, что определяет топологию взаимодействия пептид/мембрана.

Пептид	I (1) II (2) III (3) IV(4)V (5) VI (6)	Общий заряд (+/-)
Браслеты		
cycloviolacin	CAESCVYIP.CTVTALLGCSCS...NRVCY..NGIP	±0(1/1)
circulin A	CGESCVWIP.C.ISAALGCSCK...NKVCYR.NGIP	+2(3/1)
VHR-1	CAESCVWIP.CTVTALLGCSCS...NKVCY..NGIP	±0(1/1)
VHL-1	CGESCAMISFC.FTEVIGCSCK...NKVCYL.NSIS	±0(2/2)
palicourein	TFCGETCRVIPVCTYSAALGCTCDDRSDGLCKR.NGDP	-1(4/5)
tricyclon A	IFDCGESCFLGT.C.YT..KGCSCGE..WKLCYGTNGGT	-1(2/3)
Кольца Мёбиуса	1 5 10 15 20 25 29	
kalata B1	CGETCVGGT.CN.T..PGCTCS...WPVCTR.NGLPV	±0(1/1)
kalata B2	CGETCFGGT.CN.T..PGCSCT...WPICTR.DGLPV	-1(1/2)
kalata B7	CGETCTLGT.CY.T..QGCTCS...WPICKR.NGLPV	+1(2/1)

Табл. 3.5. Сравнение аминокислотной последовательности для некоторых циклотидов с известной пространственной структурой. Последовательности циклотидов представлены в однобуквенном коде. Сравнение и выравнивание структур сделано на основании общих структурных элементов: положение остатков Cys, наличие β-тяжей (показаны стрелками) и α-спиралей (показаны прямоугольником). Гидрофобные остатки выделены серым фоном, заряженные остатки инвертированы. Нумерация приведена для пептида КВ1.

Сравнение некоторых известных на сегодняшний день последовательностей и пространственных структур циклотидов из двух семейств (Табл. 3.5) показывает, что сайт для координации двухвалентного катиона присущ обоим семействам. Относительное расположение карбоксильной группы боковой цепи Glu3 в первой петле и карбонилов Thr/Ser4 и Thr/Ser/Pro9 или Phe/Val10 в первом и втором петлевом участке характерно для всех циклотидов, чьи трехмерные структуры определены на сегодняшний день. В отсутствие связанного катиона общий заряд циклотидов находится в пределах от -2 до +2, таким образом, присоединение двухвалентного катиона делает циклотиды нейтральными или слабо катионными молекулами.

С другой стороны, циклотиды из двух семейств имеют различное распределение гидрофобных регионов по поверхности. Гидрофобные кластеры «колец Мёбиуса» формируются из остатков, находящихся в 5 и 6 петле, то есть можно предположить, что все эти пептиды взаимодействуют с мембраной также как и КВ1/КВ7, а именно β-шпилькой и третьим (неупорядоченным) β-тяжем. Напротив, в случае пептидов из группы «браслетов» гидрофобные регионы формируются остатками 2 и 3 петли, и эти пептиды

могут взаимодействовать с мембраной петлей, находящейся между 1 и 2 β-тяжами. Интересно, что только для пептидов из семейства «браслетов» этот петлевой участок включает в себя дополнительный структурный элемент, – короткую α-спираль. Анализ пространственных структур циклотидов из обоих семейств показывает, что во всех случаях локализация сайта связывания ионов двухвалентных металлов относительно гидрофобной поверхности пептида позволяет скоординированному катиону взаимодействовать с полярными головками липидов, образующих мембрану. Важность сайта связывания двухвалентных катионов для биологической активности циклотидов косвенно подтверждается следующими данными: (1) Остаток Glu3 является абсолютно консервативным для всех циклотидов; (2) Замена Glu3 или блокирование его заряда, например, метилированием, полностью лишает пептиды цитотоксической, антимикробной и инсектицидной активности [362,363].

Суммируя все вышесказанное, мы можем классифицировать циклотиды из семейств «браслетов» и «колец Мёбиуса» как антимикробные пептиды и предположить возможный механизм их действия. Мы полагаем, что взаимодействие с мембраной играет основную роль в их антибиотической активности. Первым этапом в действии циклотидов является присоединение пептидных мономеров (в комплексе с двухвалентными катионами) к мембране атакуемой клетки, опосредованное в основном гидрофобными взаимодействиями (Этот этап частично смоделирован в данной работе для циклотидов KB1 и KB7, Рис. 3.12). Второй этап, возможно, включает в себя образование пор из пептидных олигомеров в мембране клетки с последующим ее разрушением и проникновением пептидов внутрь клетки, как показано для других АП [15]. Различная активность для пептидов из семейств «браслетов» и «колец Мёбиуса» может быть объяснена различным способом начального взаимодействия с мембраной.

3.2.7 Резюме

Методами ^{1}H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии с использованием классических анизотропных мембраномоделирующих сред, мицелл детергентов, и парамагнитных меток, определена пространственная структура и энергетика образования тройных комплексов циклотиды (KB1/KB7)×(мицелла DPC)×(двухвалентный катион Mn^{2+}). Подтверждено наличие в молекулах циклотидов особой топологии дисульфидных связей, так называемого «цистеинового узла», которая придает необычайную жесткость пространственной структуре. Резюмируя результаты, полученные в работе, мы можем заключить, что основную роль в стабилизации пространственной структуры циклотидов играют внутримолекулярные взаимодействия, а за образование комплекса пептид/мембрана в основном ответственны неспецифические гидрофобные

взаимодействия. Кроме того, важную роль в биологической активности этих МП играет связывание двухвалентных катионов за счет специфических электростатических взаимодействий.

Результаты, полученные в настоящей работе (в 2006-2008 годах), получили дальнейшее развитие в ряде более поздних исследований, проведенных зарубежными авторами. В 2009 году анализ пептида varv F (семейство «ленты Мебиуса») методом рентгеновской кристаллографии напрямую подтвердил наличие «цистеинового узла» в структуре циклотидов [364]. Позднее David Craik и соавторы, используя методы, примененные в настоящей работе для исследования пептидов КВ1 и КВ7, определили топологию взаимодействия с модельными мембранами для ряда других циклотидов, включая циклотиды из семейства «браслетов» [365]. Эти же авторы, описали поры, сформированные циклотидами в модельных мембранных системах, и сделали предположение о том, что эти поры могут иметь «тороидальную» структуру [347,348]. Методами сайт-направленного мутагенеза David Craik и соавторы установили, что участок поверхности пептидов, окружающий боковую цепь Glu3 (выявленный в настоящей работе как сайт связывания двухвалентных катионов), является основным детерминантом биологической активности циклотидов [363]. Кроме того, в ряде последних работ было высказано предположение о том, что сайт связывания катионов вблизи Glu3 ответственен за взаимодействие с полярной головкой липида фосфатидилэтаноламина (PE) [366]. При этом карбоксильная группа Glu3 координирует положительно заряженную амидную группу липида ($-NH_3^+$). Однако, измеренная в водном растворе константа диссоциации комплекса КВ1×POPE (56 мМ) [367] не велика (и, возможно, должна быть еще меньше в присутствии липидного бислоя или мембранного миметика), что ставит под сомнение роль подобных взаимодействий при действии пептидов на реальные мембраны.

В настоящее время в нескольких зарубежных лабораториях ведутся интенсивные исследования известных и поиск новых циклотидов. Окончательный ответ о механизме мембранной активности циклотидов и о роли, которую в ней играет сайт, включающий боковую цепь Glu3, пока не получен.

3.3 Пространственная структура, динамика, олигомеризация в мембраномоделирующем окружении и возможный механизм действия Ареницина-2

Две изоформы антимикробного пептида ареницина (Ar1 и Ar2) были выделены из целомоцитов морского многощетинкового кольчатого червя *Arenicola marina* (пескожила морского) в учебно-научном центре ИБХ РАН под руководством д.х.н. Овчинниковой Т.В [368]. Оба пептида проявляют активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов, содержат 21 аминокислотный остаток (из которых 6 Arg, 3 Tyr, 3 Val и 2 Trp) и при физиологических условиях имеют заряд +6 (Рис. 3.13). Пептиды различаются гомологичной заменой Val/Ile11 и имеют молекулярную массу 2758.3 и 2772.3 Да, соответственно. По строению ареницины схожи с некоторыми АП животного происхождения, имеющими структуру β-шпильки, стабилизированной дисульфидными связями, однако в отличие от других пептидов в молекулах ареницинов присутствует только один дисульфид, сформированный остатками Cys в 3-м и 20-м положениях (Рис. 3.13).

В работе были использованы образцы ареницина-1 и его восстановленного линейного аналога (Рис. 3.13), полученные методом химического синтеза, а также образцы рекомбинантных аналогов ареницина-2 (немеченый и меченые изотопами ^{15}N и ^{13}C,^{15}N), полученные в бактериальной системе экспрессии (*E. coli*) к.х.н. Баландиным С.В. (учебно-научный центр ИБХ РАН, руководитель д.х.н. Овчинникова Т.В.).

<u>В рамках работы при исследовании ареницина были поставлены следующие задачи:</u>

1. Методами ЯМР-спектроскопии исследовать изменения, возникающие в пространственной структуре и внутримолекулярной динамике ареницина, при взаимодействии с анизотропным мембраномоделирующим окружением. Исследовать возможный механизм олигомеризации ареницина в различных мембраномоделирующих средах. Охарактеризовать топологию комплекса пептид/мицелла и определить роль, которую играет внутримолекулярная циклизация, гидрофобные и электростатические взаимодействия с мембраной, а также внутримолекулярная подвижность во взаимодействии ареницина с липидным бислоем.
2. Методами КД-спектроскопии охарактеризовать структуру Ar2 в липидных везикулах различного состава.
3. Провести совместный анализ полученных структурных данных и результатов электрофизиологического исследования ареницина в плоских бислойных липидных системах (БЛМ). Предложить модель мембранной активности пептида.

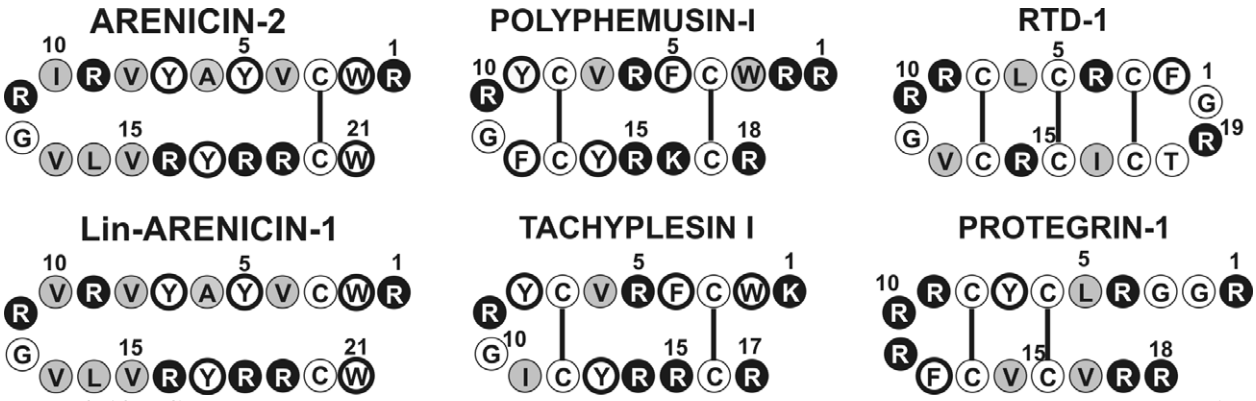


Рис. 3.13. Сравнение аминокислотной последовательности ареницинов с некоторыми АП животного происхождения, имеющими структуру β-шпильки, стабилизированной дисульфидными связями. Показаны структуры тахиплезина-1 и полифемузина-1 из хемоцитов мечехвоста (*Tachypleus tridentatus*), протегрина-1 из лейкоцитов свиньи и циклического θ-дефенсина из лейкоцитов макаки резус (RTD-1). Положительно заряженные и гидрофобные остатки показаны черным и серым фоном. Ароматические остатки выделены широкими контурами.

3.3.1 Пространственная структура и динамика ареницина-2 в воде

Ареницин содержит одну кислотную группу *C*-концевой карбоксил. Сравнение ЯМР-спектров Ar2 в диапазоне pH от 1.9 до 6.5 не выявило pH-зависимых изменений в структуре пептида (измеренное значение pKa для *C*-концевой карбоксильной группы составило 2.8). Методами ^{1}H ЯМР-спектроскопии была определена пространственная структура немеченого рекомбинантного аналога Ar2 в водном растворе при pH 3.3 (Рис. 3.14A, Табл. 3.6). Полученные данные показали, что пептид имеет конформацию β-шпильки, в которой два β-тяжа (Trp2-Ile10 и Val13-Trp20) соединены β-поворотом I' типа (Ile10-Arg11-Gly12-Val13). Заряженные и гидрофобные остатки ареницина разделены по разным сторонам β-шпильки, однако сильная правая закрутка β-листа молекулы лишает ее явно выраженной амфифильности.

β-Шпилька ареницина стабилизирована одной дисульфидной и девятью водородными связями. Исследование восстановленного линейного аналога ареницина-1 показало, что дисульфидная связь, замыкающая *N*- и *C*-концы молекулы, необходима для поддержания β-структурной конформации пептида.

Использование ^{15}N-меченого аналога ареницина-2 и данных о релаксации ядер ^{15}N позволило охарактеризовать как общую вращательную диффузию молекулы ареницина, так и внутримолекулярную динамику основной цепи пептида в двух диапазонах времен: в диапазоне быстрых движений (пико-наносекунды) и в диапазоне медленных конформационных флуктуаций (микро-миллисекунды). Для исследования было выбрано значение pH равное 4.5, при котором *C*-концевая карбоксильная группа пептида практически полностью заряжена. На ЯМР-спектрометре с рабочей частотой ^{1}H 800 МГц были измерены скорости трех релаксационных процессов, протекающих в спиновой паре ^{1}H-^{15}N (скорости продольной R_1 и поперечной R_2 релаксации ядра ^{15}N и величина

гетероядерного ЯЭО ^{15}N-{^{1}H}). Анализ релаксационных данных проводили в программе FastModelFree [369] с использованием так называемого «модель-независимого подхода» [370].

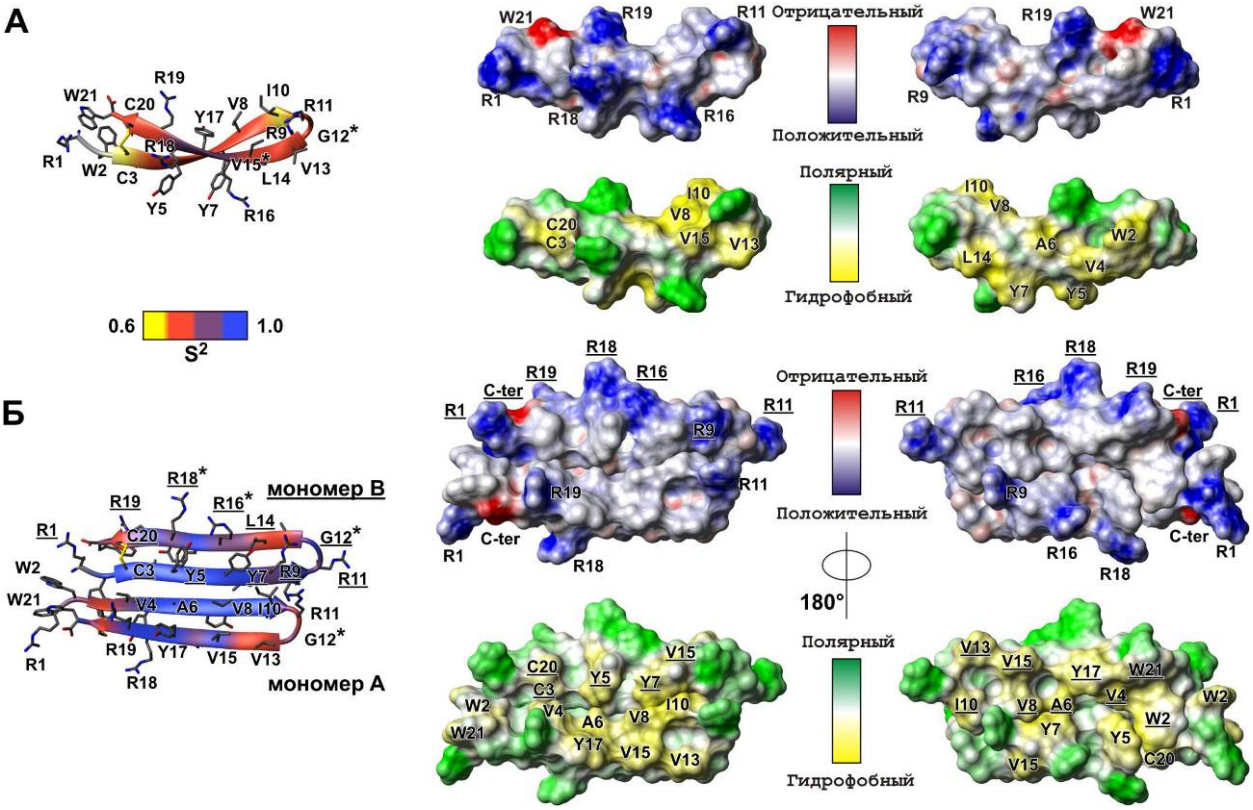


Рис. 3.14. Пространственная структура и динамика основной цепи мономера ареницина-2 в водном растворе (А) и димера пептида в комплексе с мицеллой DPC (Б). Основная цепь пептида окрашена в соответствии с полученными динамическими данными, цветом закодированы параметры порядка пс-нс движений (S^2). Остатки, вовлеченные во внутримолекулярные движения в пс-нс диапазоне времен, демонстрируют меньшие значения S^2. Остатки, вовлеченные в процессы конформационного обмена в мкс-мс диапазоне времен (демонстрирующие R_{EX} >2 Гц), отмечены звездочками. На панелях справа показано распределение электростатического потенциала и потенциала молекулярной гидрофобности на поверхности мономера и димера ареницина-2.

В водном окружении практически вся основная цепь ареницина совершает значительные движения в пико-наносекундном диапазоне, при этом среднее значение параметра порядка быстрых суб-наносекундных движений (S^2) составило 0.76 ± 0.04 (0 – соответствует полностью неограниченному движению вектора ^{1}H-^{15}N, 1 – соответствует реориентации вектора, зафиксированного в молекулярной системе координат). Центральные районы β-тяжей демонстрировали б*о*льшую стабильность в пс-нс диапазоне, чем *N* - и *C*-концевые фрагменты и регион β-поворота. Кроме того, для ряда HN-групп пептида (остатки Val4,Tyr7, Ile10, Arg11, Gly12, Val15, Arg19 и Trp21) наблюдались обменные процессы в микро-миллисекундном диапазоне времен. Наибольшая подвижность в этом диапазоне детектировалась у HN Gly12 (регион β-поворота). Общая реориентация пептида в растворе происходила с характерным временами τ_R ~ 1.5 нс (30°C, соответствующий радиус Стокса R_H ~ 12.3 Å, молекулярная масса ~ 3 кДа), что

согласуется с общей геометрией скрученной β-шпильки пептида, имеющей размеры 31x10x10 Å. Следует отметить, что полученная оценка гидродинамического радиуса мономера пептида в водном растворе согласовывалась с оценкой, полученной из диффузионных данных ($D_T \sim 2.1\times10^{-10}$ м$^2\cdot$с$^{-1}$, 27°C, 10% D_2O, $R_H \sim 12.0$ Å, Рис. 3.16Ж). Эти данные подтвердили, что β-шпилька ареницина в воде находится в мономерном состоянии.

Параметр/Тип/Единицы	Вода	Мицеллы DPC
Структуры, рассчитанные, отобранные для анализа	100 20	200 20
Штрафная функция CYANA (Å^2)	0.19 ± 0.03	0.74 ± 0.14
Ограничения на расстояния верхние/нижние: ЯЭО; водородные связи (число); дисульфидные связи (число)	172/0 18/18 (9) 3/3 (1)	542/0 (38 меж-мономерн.) 50/50 (25, 7 меж-мономерн.) 6/6 (2)
Ограничения на торсионные углы $\varphi/\chi^1/\chi^2$	19/14/0	38/28/1
Максимальные нарушения верхних, нижних и ван-дер-ваальсовых ограничений (Å)	0.24 0.11 0.18	0.28 0.18 0.14
Максимальное нарушение значений углов (°)	6.1	4.8
СКО атомных координат (Å) основная цепь; тяжелые атомы (Мономер A/B)	0.37 ± 0.11 1.18 ± 0.40	0.68±0.17(0.55±0.15/0.49±0.13) 2.01±0.30(1.92±0.38/1.86±0.37)

Табл. 3.6. Статистика для набора структур мономера ареницина-2 в водном растворе и димера пептида в комплексе с мицеллой DPC, рассчитанных в программе CYANA.

Для исследования подвижности боковых цепей пептида был измерен набор констант спин-спинового взаимодействия ($^3J_H{}^{\alpha}{}_H{}^{\beta}$ и $^3J_{NH}{}^{\beta}$), дающих информацию об угле χ1 боковой цепи. Анализ полученных данных позволил установить, что ряд боковых цепей пептида свободно вращаются вокруг связей CA-CB (Trp2, Leu14, Tyr17, Trp21, а также все остатки Arg 1, 9, 11, 16, 18, 19). Дополнительно были исследованы взаимодействия между боковыми цепями ароматических остатков (Trp, Tyr) и положительно заряженными боковыми цепями остатков Arg. Предполагалось, что эти «π-катионные» взаимодействия стабилизируют β-структуру пептида. Детальный анализ спектров NOESY позволил выявить контакты между Tyr5-Arg16/18, Tyr7-Arg16 и Tyr17-Arg19. Одновременное наблюдение ЯЭО кросс-пиков между Tyr5-Arg16 и Tyr5-Arg18 также указало на наличие динамических конформационных перестроек в молекуле пептида.

Полученные методом ЯМР экспериментальные данные позволили охарактеризовать внутримолекулярную динамику ареницина в водном растворе на уровне отдельных остатков, однако, к сожалению, эти методы не давали полной картины происходящих процессов. Например, остались необъяснимыми причины возникновения обменных процессов в β-повороте, замыкающем β-шпильку пептида. Для более детального исследования динамических процессов были применены теоретические методы молекулярной динамики.

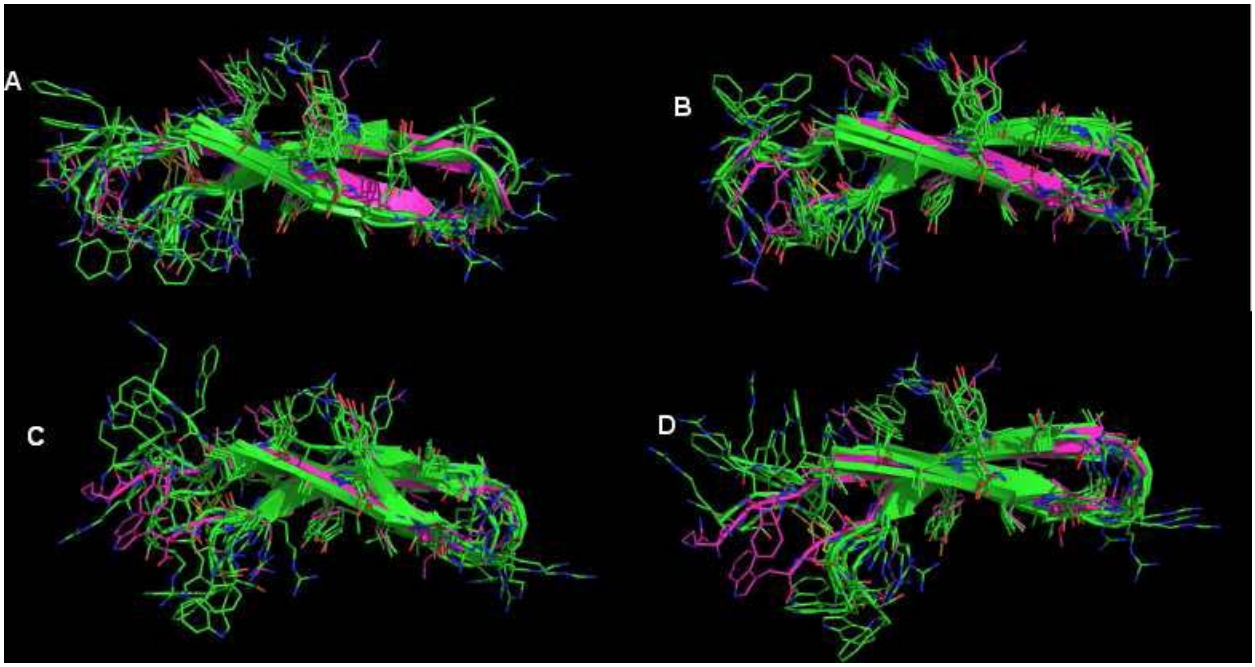
В явно-заданном водном окружении было рассчитано четыре молекулярно динамические траектории для молекулы ареницина-2 (расчеты проводили в программе NAMD [371] с использованием силового поля CHARMM27 [372])[1]. Длина каждой траектории составила 50 наносекунд. В качестве стартовых структур для молекулярной динамики были выбраны несколько структур из набора, определенного методом ЯМР. Анализ полученных траекторий позволил установить, что пептид сохраняет общую конформацию β-шпильки, однако на ее концах (*N*- и *C*-концевые остатки пептида и β-поворот) наблюдаются отклонения от классической геометрии β-листа. Эти фрагменты пептидной молекулы также демонстрировали наибольшую подвижность. Например, терминальные водородные связи с участием HN-групп остатков Val4 и Trp21 присутствовали в траекториях только ограниченное время (от 70 до 50%), а в некоторых траекториях вообще не наблюдались. Более того, во всех траекториях конформация β-поворота, замыкающего шпильку, менялась с I' типа, на IV или II' тип, что сопровождалось изменением конформации основной цепи остатка Gly12. Полученные данные позволили объяснить результаты ЯМР-исследования. Видимо, именно динамическое размыкание-замыкание водородных связей на конце β-шпильки, сопровождаемое разворачиванием фрагмента β-листа, и изменение конформации β-поворота ответственны за наблюдаемые мкс-мс обменные процессы.

По полученным траекториям был проведен анализ общей геометрии β-шпильки ареницина, в терминах угла изгиба и угла скручивания. Результаты показали, что правая закрутка шпильки пептида и значительный ее изгиб сохраняются во всех траекториях. Полученные средние значения углов (скручивание на 8 остатков 203º ± 19º, изгиб 30º ± 10º) прекрасно согласуются со значениями, наблюдаемыми в ЯМР-структуре пептида (213º ± 8º и 35º ± 4º). Таким образом, правая закрутка β-листа пептида не меняется в ходе динамических перестроек в молекуле (Рис 3.15). Полученные молекулярно-динамические траектории также позволили детально охарактеризовать взаимодействия между боковыми цепями пептида, которые стабилизируют структуру скрученной β-шпильки. Так был выявлен кластер взаимодействующих гидрофобных боковых цепей (Val8, Ile10, Val15, Val13) в области β-поворота, «π-катионные» взаимодействия (Tyr5/Arg16, Arg19/Trp21/Arg1 и др.), слабое взаимодействие «CH – π ароматика» ($C^{\beta}H$ Ala6/Tyr17) и водородные связи через молекулы воды (Рис 3.15).

Данные о величине правой закрутки β-шпильки ареницина в растворе позволили сделать предварительные предположения о структуре активной мембранной поры, возможно, образованной трансмембранными агрегатами пептида. Сравнение степени

[1] Расчеты проведены проф. Athanassios Stavrakoudis (University of Ioannina, Greece).

правой закрутки β-листа ареницина (25º/остаток) с углами скрученности, наблюдаемыми в мембранных белках, имеющих конформацию β-бочонка (~ 18º/остаток, для β-листов длиной 8-10 остатков), позволяет сделать предположение, что пептид должен испытывать раскручивание β-листа при взаимодействии с мембраной.



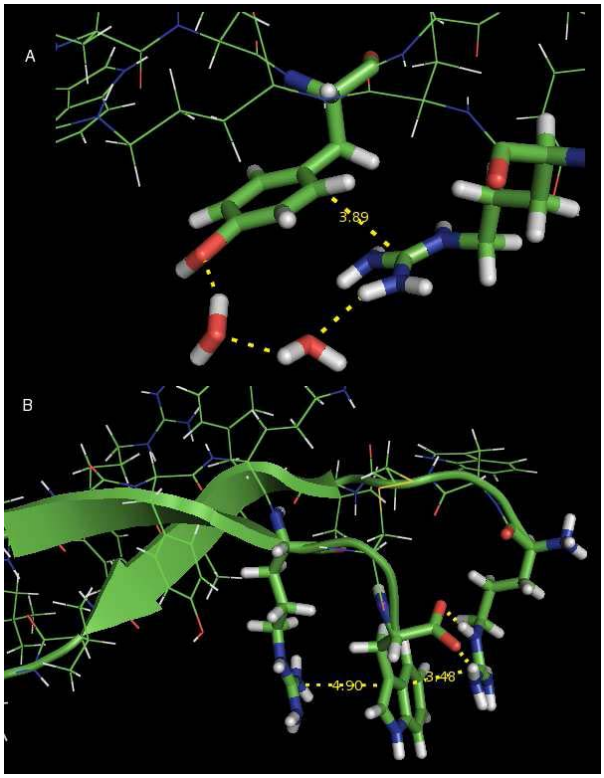


Рис 3.15. (вверху) Структуры ареницина-2, полученные в ходе молекулярно-динамического исследования. Для каждой из траекторий совмещено 5 структур (10, 20, 30, 40, 50 нс, зеленый цвет) и стартовая структура, определенная методом ЯМР (фиолетовый цвет). (слева) Дополнительные взаимодействия, стабилизирующие структуру пептида. Водородная связь через молекулы воды между боковыми группами Tyr5/Arg16. «π-катионные» взаимодействия между Arg19/Trp21/Arg1 и солевой мостик между COOH-группой Trp21 и Arg1.

3.3.2 Пространственная структура и динамика димера ареницина-2 в комплексе с мицеллой DPC

Для исследования пространственной структуры и динамики ареницина в мембраноподобном окружении была использована анизотропная мембраномоделирующая среда на основе мицелл цвиттер-ионного детергента DPC. При титровании образца

ареницина-2 детергентом в диапазоне D:P от 5 до 30 наблюдалось значительное уширение сигналов пептида, сопровождаемое их расщеплением на несколько компонент (Рис 3.16ДЕ), что указывало на наличие процессов медленного (по шкале времен ЯМР) конформационного обмена между несколькими состояниями пептида, включая свободный пептид в растворе и несколько состояний пептида в комплексе с мицеллами. Дальнейшее увеличение концентрации детергента в образце (D:P от 40 до 100) приводило к постепенному обужению сигналов и уменьшению числа компонент, полуширина которых выходила на плато при D:P = 60. В результате при D:P ≥ 80 в спектре наблюдалось два набора сигналов ареницина с $\Delta\nu^1H^N$ ~ 20-25 Гц (Рис 3.16Б), что свидетельствовало о формировании ассиметричного димера пептида в комплексе с мицеллой DPC (в водном растворе $\Delta\nu^1H^N$ была ~ 10-15 Гц). Монотонное замедление коэффициента трансляционной диффузии ареницина при добавлении детергента также подтвердило формирование комплексов пептид/мицелла (Рис 3.16Ж). Полученные ЯМР-данные (см. ниже) показали, что в мицеллах DPC при D:P ≥ 80 образуются стабильные димеры ареницина-2, которые сохраняют свою пространственную структуру вплоть до температуры 60°C и возможно при более высоких температурах, и не образуется агрегатов пептида более высокого порядка.

Используя ^{15}N- и $^{13}C,^{15}N$-меченые аналоги ареницина-2, при D:P = 100 была определена пространственная структура и динамика основной цепи димера пептида в комплексе с мицеллой DPC. Для исследования было выбрано значение pH равное 4.5, при котором *C*-концевая карбоксильная группа пептида практически полностью заряжена (значения pKa: 3.1 – мономер A, 2.9 – мономер B). Для расчета пространственной структуры были использованы данные о межпротонных расстояниях, полученные из интенсивностей кросс-пиков в 3D ^{15}N- и ^{13}C-NOESY спектрах, данные о конформации торсионных углов, полученные из КССВ $^3J_{HNH}{}^{\alpha}$, $^3J_H{}^{\alpha}{}_H{}^{\beta}$ и $^3J_H{}^{\beta}{}_H{}^{\gamma}$, а также данные о водородных связях, полученные на основании температурных градиентов химических сдвигов HN протонов и скоростях их обмена с растворителем (Рис. 3.17, Табл. 3.6).

Большая масса комплекса ареницин/мицелла и, соответственно, быстрая R_2 релаксация ядерной намагниченности значительно осложняли измерение КССВ классическими методами. Поэтому для измерения $^3J_{HNH}{}^{\alpha}$ была разработана специальная методика, основанная на амплитудно-модулированных $^1H,^{15}N$-корреляционных спектрах [373] (см. п. 7.4.3.1). Для измерения КССВ $^3J_H{}^{\alpha}{}_H{}^{\beta}$ и $^3J_H{}^{\beta}{}_H{}^{\gamma}$ при температуре 60°C в 100% D_2O был накоплен 2D $^1H,^1H$-COSY спектр немеченого образца пептида.

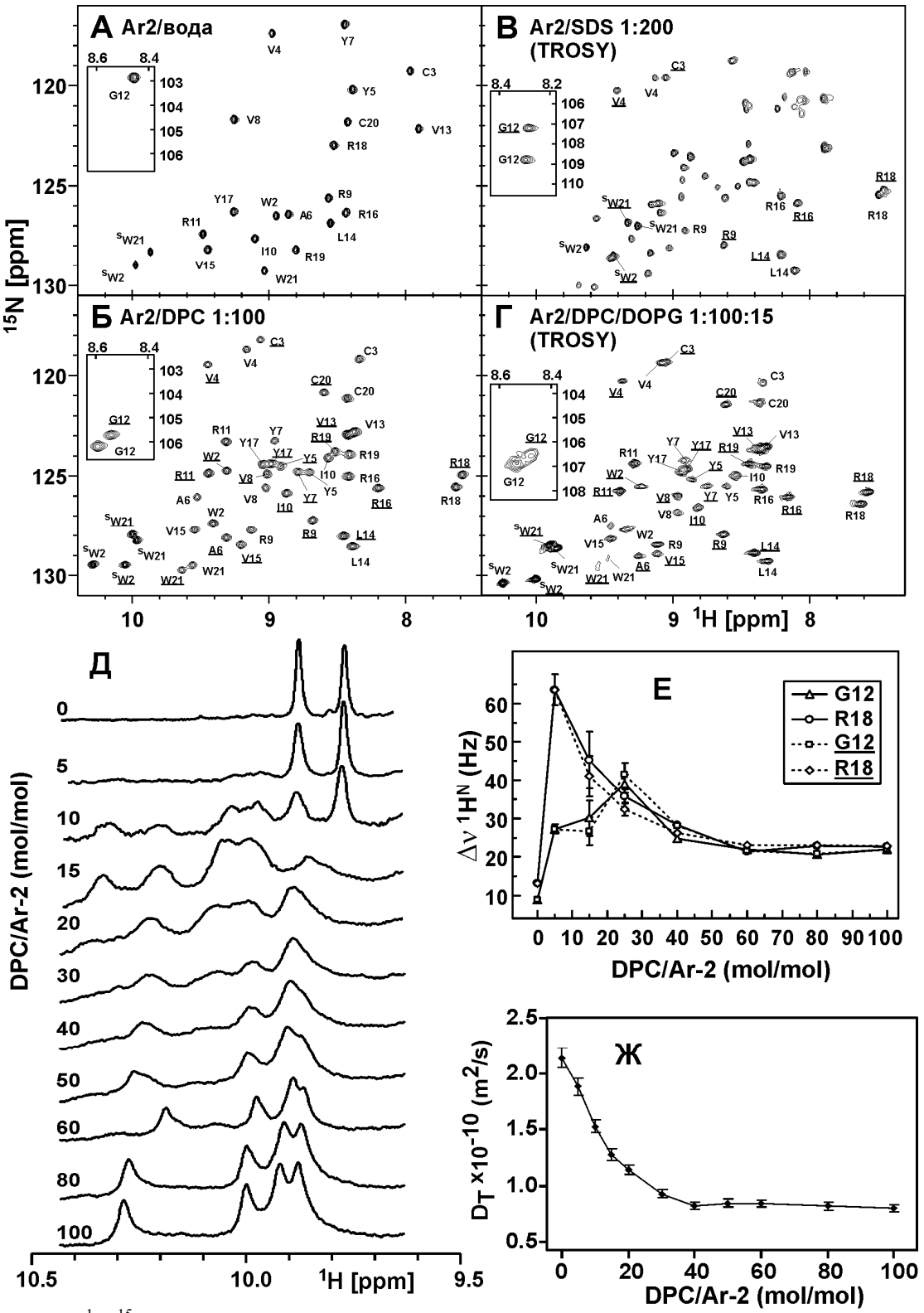


Рис 3.16. 2D $^{1}H,^{15}N$ корреляционные спектры ареницина-2 в водном растворе (А), мицеллах DPC (Б), мицеллах SDS (В) и бицеллах DPC/DOPG (Г). Все спектры получены при pH 4.5 и температуре 43ºC. Показано отнесение сигналов HN-групп основной цепи пептида и $HN^{\varepsilon 1}$-групп боковых цепей Trp (отмечены символом «s»). Сигналы, принадлежащие «мономеру B» в составе димера, подчеркнуты. (Д-Ж) Титрование ареницина-2 детергентом DPC. (Д) Сигналы $HN^{\varepsilon 1}$-групп боковых цепей Trp пептида (1.0 мМ, pH 3.3, 30ºC) при различных концентрациях детергента. (Е) Зависимость полуширины сигналов HN протонов от концентрации детергента (800 МГц, pH 4.5, 43ºC). (Ж) Значения коэффициента трансляционной диффузии пептида (1.0 мМ, pH 3.3, 27ºC, 10% D_2O) в зависимости от концентрации детергента.

Использованный набор экспериментальных данных позволил с высокой точностью рассчитать пространственную структуру димера ареницина-2 в комплексе с мицеллой DPC. Полученная пространственная структура представляет собой две параллельные β-шпильки (Рис. 3.14Б). При этом фрагменты Cys3-Ile10 и Val13-Cys20 каждого из пептидов образуют β-тяжи, а в регионах Ile10-Arg11-Gly12-Val13 формируются β-повороты II' типа. Каждая из β-шпилек в составе димера стабилизирована 9-ю водородными связями между группами основной цепи и имеет дину порядка 33.5 Å. Димер ареницина-2 образован путем параллельной ассоциации *N*-концевых β-тяжей отдельных мономеров (тип ассоциации CN↑↑NC), что и определяет его несимметричную природу. Димер пептида стабилизирован 7-ю межмолекулярными водородными связями, включающими HN-группы Cys3, Tyr5, Tyr7, Arg9 из мономера A и Cys3, Tyr5, Tyr7 мономера B. Два мономера ареницина-2 в составе димера имеют схожую, но не идентичную, конформацию. Это подтверждается расчетом величины среднеквадратичных отклонений (СКО) между полученными структурами. Так, минимальное значение СКО по атомам основной цепи между двумя мономерами составило 0.89 Å, в то время как разброс структур для каждого из мономеров был меньше (0.39 Å и 0.34 Å).

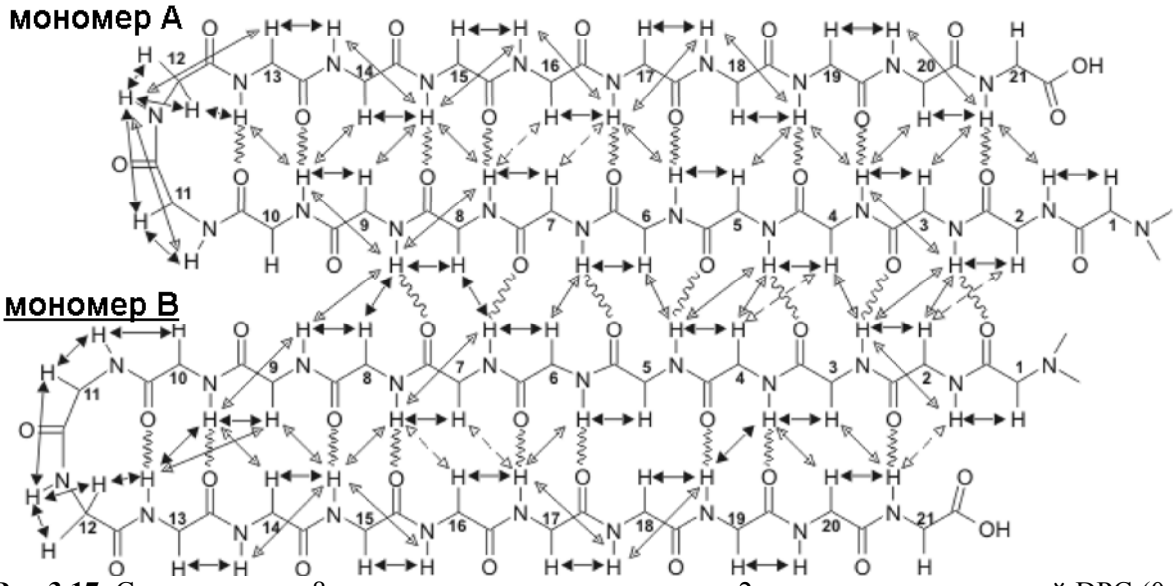


Рис 3.17. Схема укладки β-структуры в димере ареницина-2 в комплексе с мицеллой DPC (0.6 мМ димера, D:P = 100:1, pH 4.5, 43°C). Карта ЯЭО контактов построена на основании NOESY спектра с τ_m 60 мс. Водородные связи показаны волнистыми линиями.

Сравнение структуры димера со структурой мономера пептида в воде (Рис. 3.14Б) показало, что при связывании с мицеллой и димеризации скрученность и изгиб β-листа ареницина значительно уменьшается и тип β-поворота изменяется с I' на II'. Правая закрутка на 8 остатков уменьшается с 213º ± 8º до 52° ± 9° / 29°± 9° и изгиб β-листа уменьшается с 35º ± 4º до 6° ± 2° / 12° ± 2° (мономер A/B). Расчет СКО между двумя наборами структур также выявил значительные изменения в конформации β-шпильки.

Минимальное значение СКО по атомам основной цепи между мономером пептида в воде и мономерами в DPC составило 2.61 Å и 2.42 Å. Высокая скрученность β-листа ареницина в воде вероятно связана со склонностью к пространственной кластеризации у гидрофобных боковых цепей пептида. При этом скручивание β-шпильки приводит к уменьшению энергетически невыгодных контактов между гидрофобными боковыми цепями и растворителем. При встраивании димера пептида в мицеллу детергента контакты между гидрофобными боковыми цепями заменяются на контакты с жирнокислотными цепями детергента, что и приводит к практически полному «раскручиванию» β-листа ареницина.

Общая пространственная структура димера пептида напоминает плоский параллелограмм (Рис. 3.14Б) со сторонами ~36 Å и ~20Å, и толщиной ~14 Å (включая боковые цепи). Следует отметить, что наибольшая диагональ этого «параллелограмма» (расстояние между боковой цепью Trp21 мономера A и Arg11 мономера B) имеет длину ~47 Å. Интерфейс взаимодействия в димере (Cys3-Ile10 мономера A и Trp2-Arg9 мономера B) включает главным образом ароматические и гидрофобные остатки, в то время как все заряженные группы (*N*-концевые аминогруппы, гуанидиновые группы 12 остатков Arg (шесть на мономер) и *C*-концевые карбоксильные группы) расположены по периметру «параллелограмма» димера. Карты электростатического потенциала и потенциала молекулярной гидрофобности на поверхности димера ареницина-2 (Рис. 3.14Б) иллюстрируют его амфифильный характер. Ароматические и гидрофобные боковые цепи *N*-концевых β-тяжей и Val13, Val15 и Tyr17 из *C*-концевых тяжей β-шпильки формируют на двух плоских сторонах димера почти симметричные гидрофобные участки. Распределение гидрофобных и полярных групп на поверхности димера ареницина-2, наблюдаемое в мицеллах DPC, значительно отличается от распределения, наблюдаемого для мономера пептида в водном растворе, где большая правая закрутка β-шпильки эффективно предотвращает образование больших гидрофобных участков на поверхности пептида (Рис. 3.14А).

Для исследования динамики основной цепи в димере пептида на спектрометре с рабочей частотой ^{1}H 800 МГц были измерены скорости четырех релаксационных процессов, протекающих в спиновой паре ^{1}H-^{15}N (скорости продольной R_1 и поперечной R_2 релаксации ядра ^{15}N, величина гетероядерного ЯЭО ^{15}N-{^{1}H} и скорость η_{XY} процесса кросс-корреляции между диполь-дипольной релаксацией и релаксацией, возникающей благодаря анизотропии химического сдвига ядра ^{15}N). Анализ релаксационных данных в программе FastModelFree показал, что при взаимодействии ареницина с мицеллой DPC и димеризации основная цепь пептида значительно стабилизируется (среднее значение

параметра порядка для быстрых суб-наносекундных движений S^2 увеличивается с 0.76 ± 0.04 до 0.88 ± 0.07). При этом как и в водном окружении центральные районы β-тяжей пептида демонстрировали б*о*льшую стабильность в пс-нс диапазоне, чем *N* - и *C*-концевые фрагменты и регион β-поворота. Наименьшая подвижность в этом временном диапазоне наблюдалась для остатков, локализованных на интерфейсе димеризации (Рис. 3.14). Используя подход, предложенный в [374], на основе значений параметров порядка S^2 было рассчитано изменение конформационной энтропии основной цепи ареницина при взаимодействии с мицеллой DPC и димеризации (Ур. 7.3). Полученное значение соответствовало энтропийному вкладу в свободную энергию перехода ($T\Delta S$) равному ~ –9 ккал·M^{-1} (30ºC).

В отличие от наблюдаемых различий в пс-нс динамике, процессы мкс-мс конформационного обмена в молекуле ареницина в водном растворе и в мицеллах DPC имеют схожую локализацию. Самый большой (> 8 Гц) вклад обменных процессов в R_2 релаксацию ядер ^{15}N (R_{EX}) наблюдался для остатков Gly12 из двух мономеров. Кроме того, небольшие, но значительные вклады R_{EX} (> 2 Гц) детектировались на *C*-концевом тяже β-шпильки мономера B (Arg16 и Arg18). Вероятно, процессы конформационного обмена, наблюдаемые на остатке Gly12, связаны с динамическим изменением конформации β-поворота, например, из II' типа в I' тип и обратно. Сопоставление полученных данных с результатами динамических исследований ареницина в водном растворе (см. выше) позволяет предположить, что β-поворот в молекуле ареницина имеет предрасположение к подобным динамическим перестройкам, при этом наиболее заселенная конформация зависит от свойств окружающей среды и представляет собой тип I' в воде и II' в мицеллах DPC.

3.3.3 Стехиометрия и топология комплекса ареницин-2/мицелла DPC

«Модель-независимый» анализ ^{15}N-релаксационных данных показал, что вращательная диффузия димера ареницина в комплексе с мицеллой DPC характеризуется временем корреляции τ_R ~ 12.6 нс (43°C), что согласуется с реориентацией сравнительно большой частицы (R_H ~ 27.7 Å, молекулярная масса ~ 33 кДа). Схожая оценка для значения τ_R (12,4 ± 1,3 нс) была получена из измеренных скоростей кросс-корреляции η_{XY} (16.3 ± 1.8 c^{-1}). Предполагаемая масса смешанной мицеллы ареницин-2/DPC (~ 33 кДа) примерно соответствует димеру пептида (~5.5 кДа) в комплексе с 80 молекулами DPC (~ 28 кДа). Предложенная стехиометрия комплекса (2:80) согласуется с данными, полученными в ходе титрования образца пептида мицеллами DPC (Рис. 3.16ЕЖ), где не наблюдалось существенных изменений полуширины $^1H^N$ линий и коэффициента трансляционной диффузии пептида при соотношениях D:P, превышающих 40:1. Следует

отметить, что оценки гидродинамического радиуса комплекса пептид/мицелла (R_H ~ 29.5 Å), полученные из диффузионных данных (Рис. 3.16Ж, D_T ~ 0.85 $\times 10^{-10}$ м^2·с$^{-1}$, 27°C, 10% D_2O), указывают на возможное формирование более крупных комплексов, включающих до 100 молекул детергента на димер пептида.

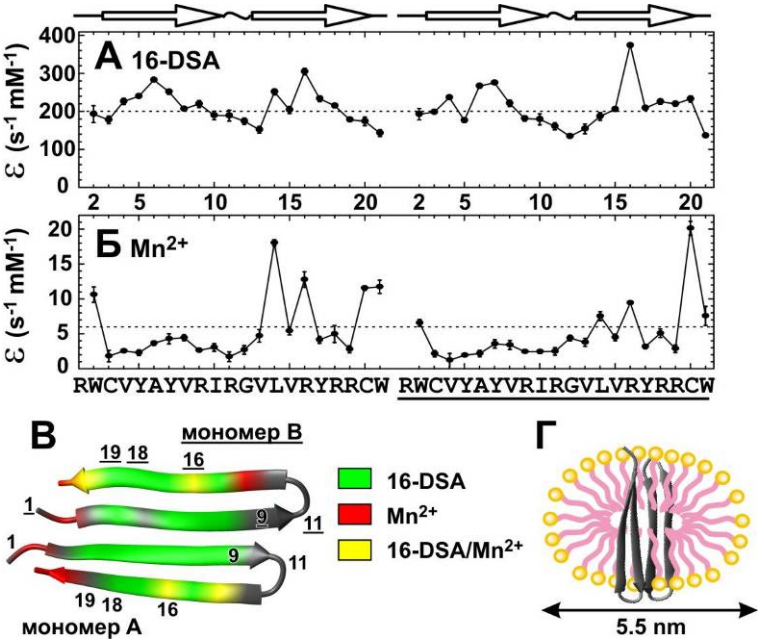


Рис 3.18. Парамагнитное усиление R_2 релаксации H^N протонов основной цепи димера ареницина-2 в комплексе с мицеллой DPC, вызванное добавлением гидрофобной спиновой метки (16-DSA) и водорастворимых парамагнитных катионов Mn^{2+} (в форме $MnCl_2$). (В) Данные PRE показаны на структуре димера ареницина/мицелла DPC. Остатки, сигналы которых ослабляются при добавлении 16-DSA, Mn^{2+} и обеих меток показаны зеленым, красным и желтым, соответственно. (Г) Предполагаемая топология комплекса димер ареницина-2/мицелла DPC.

Топология комплекса ареницин-2/DPC была исследована с помощью двух парамагнитных зондов 16-DSA и Mn^{2+}, имеющих разную локализацию в мицелле. Как уже отмечалось, парамагнитный нитроксидный радикал 16-DSA преимущественно локализован вблизи от центра мицеллы [357]. С другой стороны, двухвалентные катионы Mn^{2+} имеют сродство к отрицательно заряженным фосфатным группам детергента [375] (молекула ареницина-2 имеет только одну отрицательно заряженную группу – *C*-концевой карбоксил). Использование ^{15}N-меченого аналога пептида позволило количественно охарактеризовать удельный эффект PRE (ε Гц·мМ$^{-1}$), вызываемый спиновыми метками (Рис. 3.18АБ). Увеличение скоростей R_2 релаксации H^N протонов в центральных регионах четырех β-тяжей димера пептида, наблюдаемое в присутствии 16-DSA, показало, что димер ареницина встраивается в гидрофобную область мицеллы (Рис. 3.18АВ). С другой стороны, ионы Mn^{2+} эффективно усиливали релаксацию протонов из *N*- и *C*-концевых регионов и из остатков Leu14 и Arg16, принадлежащих к *C*-концевым β-тяжам обоих мономеров пептида (Рис. 3.18БВ).

Полученные данные согласуются с «трансмембранным» (TM) расположением димера ареницина-2 в мицелле DPC, при этом *N*- и *C*-концевые регионы, а также фрагменты, формирующие β-повороты, располагаются вне гидрофобные региона мицеллы (Рис. 3.18Г). Одновременное наблюдение сильного эффекта PRE, вызванного как 16-DSA, так и Mn^{2+}, для HN-групп остатков Arg16 из обоих мономеров указывает на то, что в

комплексе ареницин-2/DPC молекулы детергента могут изгибаться и взаимодействовать своими полярными группами с положительно заряженными боковыми цепями, расположенными в центре *C*-концевых β-тяжей димера. Таким образом, комплекс ареницин-2/мицелла DPC можно представить в виде вытянутого эллипсоида, в котором гидрофобные участки с двух сторон плоского димера охватывают две полусферы, состоящие из молекул детергента (Рис. 3.18Г). Предложенная модель согласуется с гидродинамическими данными, полученными для комплекса пептид/мицелла, эффективный диаметр комплекса ~ 2×28 Å примерно соответствует сумме удвоенного радиуса мицеллы DPC (~ 2×23Å) и толщине димера пептида (~ 10 Å). Из полученных результатов следует, что димер пептида прочно связан с мицеллой детергента и движется вместе с ней как единое целое.

3.3.4 Олигомеризация ареницина-2 в средах, содержащих анионные липиды/детергенты

Как уже отмечалось, ареницин-2 представляет собой катионный пептид (заряд +6), что, возможно, и обуславливает его селективное взаимодействие с отрицательно заряженными мембранами бактериальных клеток. Для моделирования мембран, содержащих отрицательно заряженные липидные молекулы, в работе были использованы смешанные бицеллы, содержащие детергент DPC и анионный липид DOPG, и мицеллы анионного детергента SDS.

Для структурных ЯМР-исследований ареницина в бицеллах DPC/DOPG был использован образец ареницин-2/DPC (1:100, 0.3 мМ / 30 мМ), который титровали анионным фосфолипидом DOPG. 2D $^{1}H,^{15}N$-TROSY спектр, измеренный при молярном соотношении ареницин-2/DPC/DOPG 1:100:15, показал, что пространственная организация димера пептида сохраняется (Рис. 3.16Г). Измеренные скорости кросс-корреляции релаксации η_{XY} для $^{1}H^{15}N$-групп пептида (38.8 ± 6.6 $с^{-1}$) позволили оценить общее время вращательной корреляции комплекса ареницин/DPC/DOPG. Полученное значение τ_R (25.5 ± 5.2 нс) соответствовало реориентации сферической частицы с R_H ~ 35.0 ± 2.2 Å и молекулярной массой ~ 67 ± 14 кДа. Сравнение полученных значений со свойствами комплекса ареницн-2/DPC (см. выше) указывает на то, что при титровании все добавленные молекулы DOPG (MW_{DOPG} = 797 Да) встраиваются в комплекс. В то же время не исключается включение в состав комплекса дополнительных копий димера пептида или молекул DPC.

Наиболее вероятным сайтом взаимодействия между анионными липидами и димером пептида являются положительно заряженные гуанидиновые группы остатков Arg. В то же время добавление DOPG в образец не вызывало больших изменений в

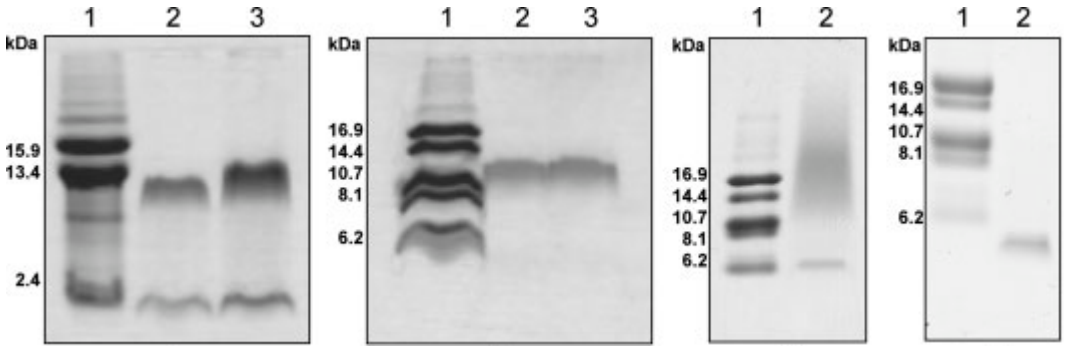
химических сдвигах HN^{ε}-групп боковых цепей остатков Arg (данные не показаны). Таким образом, можно предположить, что химическое окружение боковых цепей Arg меняется незначительно при добавлении DOPG к мицеллам DPC. Вероятнее всего гуанидиновые группы остатков Arg пептида в мицеллах DPC участвуют в электростатических взаимодействиях с отрицательно заряженными фосфатными группами детергента. Несмотря на это, изменения химических сдвигов HN-групп основной цепи пептида при добавлении DOPG, наблюдаемые для остатков Ala6, Val8, Val15, Tyr17 (расположены в центральном регионе всех четырех β-тяжей димера в непосредственной близости от Arg16), указали на возможные взаимодействия между фосфатными группами липида и боковыми цепями Arg из *C*-концевых β-тяжей димера.

Последующее увеличение концентрации DOPG в образце до молярного соотношения ареницин-2/DPC/DOPG 1:100:30 приводило к дальнейшему увеличению массы комплекса. 2D $^{1}H,^{15}N$-CRINEPT спектр, измеренный в этих условиях, выявил наличие сигналов, характерных для димера пептида, но имеющих полуширину $^{1}H^{N}$ линий ~ 70 Гц (данные не показаны). Полученные результаты согласуются с формированием крупных частиц с массой ~ 100 кДа, которые могут содержать более одной копии димера ареницина-2.

Анализ различных образцов ареницина-2 методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (Рис. 3.19А-Г) позволил предположить, что пептид в растворе мицелл SDS агрегирует с образованием тетрамеров (масса ~ 12 кДа, Рис. 3.19Б). Восстановление дисульфидных связей в молекуле пептида с помощью β-меркаптоэтанола приводило к частичной диссоциации тетрамеров с образованием небольших количеств мономера пептида (~ 2 кДа, Рис. 3.19А). Полная диссоциация тетрамеров ареницина наблюдалась только после кипячении образца пептида в присутствии β-меркаптоэтанола (Рис. 3.19Г). Следует отметить, что анализ образца ареницин/DPC (1:100), использованного для ЯМР-исследований, также выявил полосу, возможно, соответствующую димеру пептида (~ 6 кДа, Рис. 3.19В).

Для исследования структуры ареницина-2 в среде анионных мицелл образец пептида в воде тировали детергентом SDS. Изначально при добавлении SDS наблюдалось значительное уширение сигналов пептида, вероятно, вызванное его агрегацией, что делало невозможным измерение и анализ ЯМР-спектров. 2D $^{1}H,^{15}N$-кореляционный спектр, позволяющий провести качественный структурный анализ, был получен только при молярном соотношении ареницин/SDS 1:200 (Рис. 3.16В). Анализ спектров показал, что в окружении мицелл SDS также формируются асимметричные димеры пептида со структурой, аналогичной той, которая наблюдается в мицеллах DPC. Однако, положение

некоторых сигналов в спектре значительно отличались от положения сигналов в спектрах димера пептида, наблюдаемого в DPC и DPC/DOPG. Наблюдаемые эффекты, возможно, были обусловлены как прямым влиянием зарядов сульфатных групп на химические сдвиги сигналов пептида, так и изменениями в структуре димера, вызванными образованием тетрамеров. Следует отметить, что КД-спектры ареницина, измеренные в мицеллах SDS при D:P равных 200 и 50 указали на схожесть конформации пептида в этих условиях (Рис. 3.20).



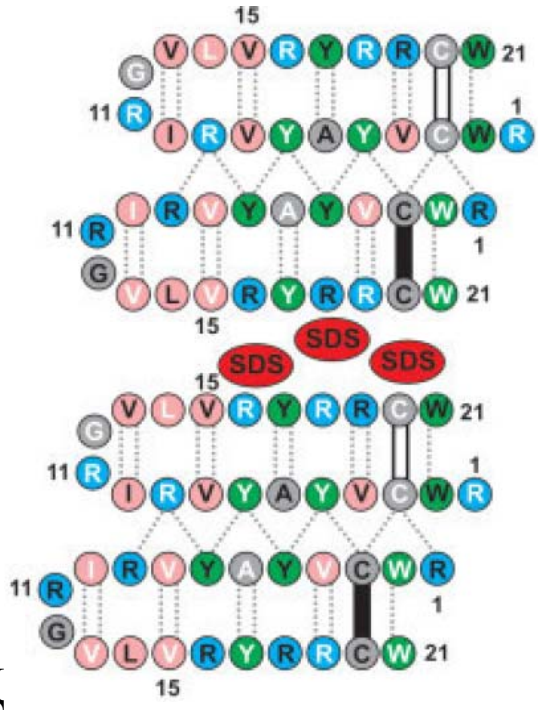


Рис. 3.19. (А-Г) Электрофоретический анализ (SDS-PAGE) образцов ареницина-2. (дорожки 1 - маркер молекулярных весов, дорожки 2 – рекомбинантный ареницин, дорожки 3 – синтетический ареницин). (А) частично восстановленный пептид в присутствии β-меркаптоэтанола. (Б) препарат пептида без добавления восстанавливающих агентов. (В) образец ареницин/DPC (1:100). (Г) полностью восстановленный препарат пептида после кипячения в присутствии β-меркаптоэтанола.

(Д) Возможная структура тетрамера ареницина-2 в мицеллах SDS. Ароматические, гидрофобные, положительно заряженные и другие остатки показаны зелеными, розовыми, голубыми и серыми кругами, соответственно. Остатки, чьи боковые цепи направлены из плоскости картинки в сторону читателя, показаны черным, другие остатки – белым. Отрицательно заряженные полярные головки SDS показаны красными овалами.

Эффективное время корреляции вращательных движений и гидродинамический радиус для комплекса ареницин/SDS были рассчитаны из измеренных скоростей релаксации ядер ^{15}N. Анализ полученных данных показал, что гидродинамические характеристики комплексов ареницин/SDS близки к характеристикам комплексов ареницин/DPC/DOPG. Увеличение размеров комплекса ареницин/SDS по сравнению с комплексом ареницин/DPC также может свидетельствовать об образовании высокомолекулярных агрегатов пептида, например, тетрамеров. (Эти детергенты имеют одинаковую длину жирнокислотных цепей 12 атомов углерода.) Однако, присутствие в

ЯМР-спектрах только двойного набора сигналов от каждого из мономеров пептида в составе димера указывает на отсутствие (или слабость) прямых контактов димер-димер при образовании высокомолекулярных агрегатов. Вероятно, контакты между отдельными димерами опосредованы встроенными между ними полярными головками детергента SDS (Рис. 3.19Д).

Следует отметить, что детальное ЯМР-исследование пространственной структуры ареницина в мицеллах SDS, как и исследование ареницина в бицеллах DPC/DOPG при высоких концентрациях отрицательно заряженного липида затруднены из-за большого размера комплексов пептид/мицелла(бицелла). Увеличение размера комплексов значительно понижает чувствительность ЯМР-экспериментов и делает невозможным измерение классических структурных данных ЯМР, таких как интенсивности ЯЭО и константы спин-спинового взаимодействия.

3.3.5 Сравнительный анализ структуры ареницина-2 в мембраномоделирующих средах методом КД-спектроскопии

Методом КД-спектроскопии был проведен сравнительный анализ структуры ареницина в воде, мицеллах и бицеллах, а также в везикулах, моделирующих липидный состав мембран различных клеток.[1] КД-спектр пептида в водном окружении имел «атипичный» вид (Рис. 3.20) и содержал четыре спектральные полосы: две положительные (при ~203 и ~230 нм) и две отрицательные (при ~195 и ~213 Нм). Подобный вид спектра может быть объяснен наличием сильной правой закрутки у β-листа пептида («дополнительная хиральность»), а также наличием спектральных полос от ароматических боковых цепей остатков Tyr/Trp и дисульфидной связи, которые также могут давать сигналы в этой области спектра [376]. При добавлении к образцу пептида маленьких моноламелярных везикул (SUV), содержащих цвиттер-ионный липид POPC и моделирующих мембрану эукариотических клеток, спектр ареницина не менялся (данные не показаны). Полученные данные выявили, что пептид не взаимодействует с мембранами, состоящими из нейтральных молекул фосфатидилхолина.

Добавление ареницина к анионным везикулам, содержащим большую долю фосфатидилэтаноламина (PE) и моделирующим состав цитоплазматической мембраны грамотрицательных бактерий (например, смесь POPE/POPG 7:3, или смесь G-, сделанная из полярного липидного экстракта *E. coli* (Avanti Polar Lipids) и содержащая PE, PG, и DPG (кардиолипин) в соотношении 67:23.2:9.8%), вызывало слияние липидных везикул, сопровождаемое помутнением и преципитацией образцов. В этих средах измерение и

[1] Измерения проводили совместно с сотрудниками лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН, руководитель д.ф.-м.н. Феофанов А.В.

анализ КД-спектров были невозможны. Неустойчивость этих везикул видимо была вызвана большим удельным содержанием липидов с отрицательной спонтанной кривизной (PE), что способствовало накоплению большого количества пептидных молекул в поверхностно-связанном состоянии.

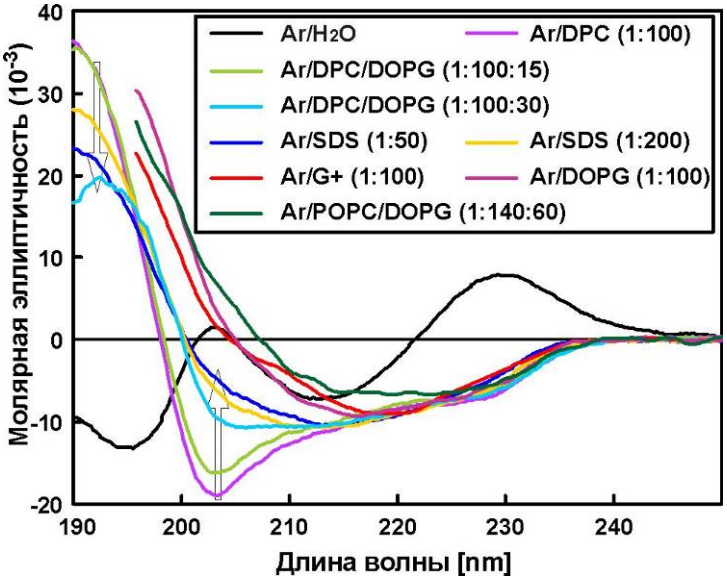


Рис 3.20. КД-спектры ареницина-2 в воде, мицеллах DPC и SDS, бицеллах DPC/DOPG и в липидных везикулах различного состава, в том числе моделирующих липидный состав цитоплазматической мембраны грамположительных бактерий (G+).

В то же время в работе удалось получить КД-спектры ареницина в SUV, моделирующих липидный состав мембран грамположительной бактерии *Micrococcus luteus* [377] (смесь G+, содержащая DPG (*E. coli*), PG (*E. coli*) и L-α-фосфатидилинозитол (соя, Avanti Polar Lipids) в соотношении 66:24:10%), а также в SUV из DOPG, в бицеллах DPC/DOPG, мицеллах DPC и SDS. Анализ полученных спектров КД (Рис. 3.20) указал на значительные изменения в структуре пептида, возникающие при его взаимодействии с модельными липидными мембранами и мембраномоделирующими средами на основе детергентов. При этом характерный вид КД-спектров пептида в мицеллах и бицеллах был значительно ближе к виду спектра в везикулярных системах (две спектральные полосы: положительная при ~195 нм и отрицательная при ~220 нм, что напоминает спектр канонической β-структуры), чем к спектру пептида в воде.

Следует отметить, что КД-спектры ареницина, измеренные в мембраномоделирующих средах на основе детергентов, содержали дополнительную отрицательную спектральную полосу при ~ 203 нм. Однако, интенсивность этой полосы значительно зависела от состава мембраномоделирующей среды. Наименьшая интенсивность наблюдалась для образцов ареницин-2/DPC/DOPG (1:100:30) и ареницин-2/SDS (1:50 и 1: 200) (Рис. 3.20). Принимая во внимание, что во всех использованных мембраномоделирующих средах пептид принимает конформацию β-структурных димеров, мы можем заключить, что пептид имеет аналогичную пространственную структуру и в везикулах, содержащих анионные липиды. Различия в интенсивности сигнала КД при ~ 203 нм могут быть объяснены либо вкладом от свободных (не

связанных с мембраной) мономеров пептида, спектр которых демонстрирует положительную полосу на этой длине волны, либо КД-сигналами от ароматических боковых цепей остатков Tyr/Trp, которые могут иметь разную ориентацию относительно β-структуры димера в мембраномоделирующих средах на основе мицелл детергентов и липидных везикул.

Полученные данные косвенно подтвердили то, что активной формой ареницина, ответственной за его биологическое действие является димер, сформированный путем ассоциации двух β-шпилек. Вероятно, димер является основным «структурным компонентом» пор, которые ареницин образует в модельных мембранных системах.

3.3.6 Свойства пор, образованных ареницином, в плоских бислойных липидных системах и модель мембранной активности пептида

В плоских бислойных липидных системах (БЛМ) различного липидного состава было проведено исследование пор, образованных ареницином-1.[1] В работе использовали смеси фосфолипидов, моделирующие клеточные мембраны грамотрицательных (G-) и грамположительных (G+, см. выше) бактерий. Было показано, что мембранолитическая активность ареницина существенным образом зависит от липидного состава мембран. Полный анализ флуктуаций проводимости, индуцируемых ареницином-1 в БЛМ различного состава (Рис. 3.21А-Е), позволил рассчитать наиболее вероятные размеры пор и каналов, образующихся в мембране под действием пептида. В БЛМ, отвечающих по составу клеточным мембранам грамотрицательных бактерий и содержащих значительную долю цвиттер-ионного липида, – фосфатидилэтаноламина (PE), наблюдались поры ареницина с низкой проводимостью. В то же время в БЛМ, содержащих в основном анионные липиды и моделирующих состав клеточной мембраны грамположительных бактерий, наблюдались поры ареницина с высокой проводимостью.

На основе полученных данных были предложены модели «тороидальных» пор, образованных тетрамером, гексамером и октамером ареницина. Эти модели показаны на Рис. 3.21Ж. В рамках предложенных моделей поры образуются путем агрегации димеров пептида, имеющих трансмембранную ориентацию. При этом ассоциация отдельных димеров пептида происходит не напрямую, а через полярные головки липидов. Высокомолекулярные агрегаты димеров ареницина стабилизированы электростатическими взаимодействиями между отрицательно заряженными фосфатными группами липидов и положительно заряженными боковыми цепями остатков Arg. Предложенные модели позволяют предсказать экспериментально наблюдаемые уровни проводимости пор ареницина с точностью до 5%.

[1] Измерения проведены в учебно-научном центре ИБХ РАН к.х.н. Барсуковым Л.И. и Сухановым С.В.

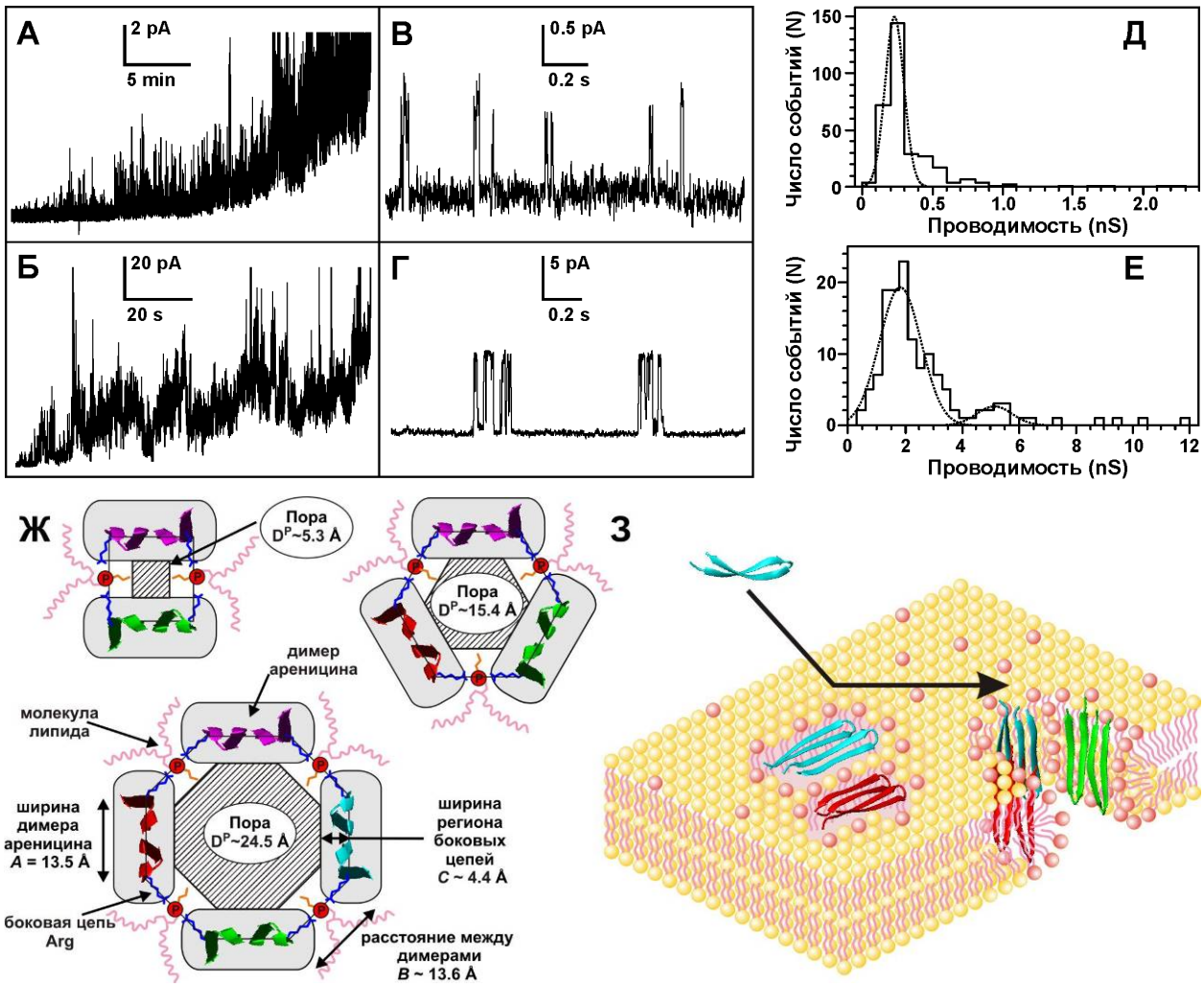


Рис 3.21. Флуктуации проводимости, индуцируемые ареницином-1 в бислойных липидных мембранах (БЛМ). Макроскопические индуцируемые пептидом (А,Б) записи токов через отдельные поры ареницина (В,Г) и гистограммы проводимости (Д,Е) показаны для БЛМ, моделирующих клеточные мембраны грамотрицательных (А,В,Д) и грамположительных (Б,Г,Е) бактерий. (Ж) Модели «тороидальных пор», образованных тетрамером, гексамером и октамером ареницина в липидной мембране, содержащей отрицательно заряженные липиды. На изображении моделей плоскость рисунка совпадает с плоскостью мембранного бислоя. Димеры пептида, образующие пору, показаны в ленточном представлении и раскрашены в разные цвета. (З) Предполагаемый механизм мембранной активности ареницина.

Полученные данные позволили предложить модель мембранной активности и антимикробного действия ареницина. В рамках модели действие пептида проходит в несколько этапов.

1. Молекулы ареницина (несущие положительный заряд +6) в конформации динамически подвижной и скрученной β-шпильки приближаются к поверхности мембраны клетки. Эффективность связывания пептида с поверхностью различных мембран определяется балансом между энтропийным и энтальпийным вкладом в свободную энергию ($\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S$). Несмотря на большую гидрофобность поверхности пептида, его связывание с незаряженными мембранами эукариотических клеток оказывается энергетически невыгодно.

2. При присоединении пептида к поверхности мембраны происходит значительное уменьшение скрученность β-шпильки, стабилизация ее динамики в пс-нс временном диапазоне и образование димеров пептида. Димеры пептида претерпевают дальнейшую олигомеризацию на поверхности мембраны клетки с участием отрицательно заряженных липидных головок. Образуется так называемая «ковровая» структура.
3. При увеличении концентрации пептидов в наружном монослое мембраны становится энергетически выгодным переход части пептидов в трансмембранное положение (длина β-шпильки ареницина > 30 Å).
4. Трансмембранные олигомеры ареницина образуют пептид-липидные («тороидальные») поры в мембране. В образовании каждой поры участвуют как димеры пептида, так и головки отрицательно заряженных липидов, встроенные между ними. Полярные группы боковых цепей ареницина и головки липидов выстилают внутренность поры, а гидрофобные участки димеров контактируют с жирнокислотными цепями окружающей мембраны. Образование «тороидальных» пор ведет к лизису и гибели бактериальной клетки.

3.3.7 Резюме

Методами гетероядерной $^{1}H,^{13}C,^{15}N$-ЯМР-спектроскопии определена пространственная структура ареницина-2 в водном растворе и классических анизотропных мембраномоделирующих средах: мицеллах детергентов и липид-детергентных бицеллах. Использование изотопно-меченых аналогов пептида позволило по данным релаксации ядер ^{15}N охарактеризовать динамику основной цепи пептида и отследить изменения, возникающие при взаимодействии ареницина с мембраноподобным окружением. Совместный анализ полученных структурных данных, данных КД-спектроскопии и результатов электрофизиологических исследований в БЛМ позволил смоделировать возможный тип взаимодействия ареницина с липидными мембранами и предложить механизм антимикробной активности пептида, опосредованный его мембранной активностью.

В работе впервые в мембраноподобном окружении определена пространственная структура высокого разрешения димера АП, имеющего конформацию β-шпильки. Ранее по данным ЯМР твердого тела в липидном бислое была качественно охарактеризована структура димера только для одного подобного пептида (протегрина-1) [224]. Кроме того, в работе впервые было показано, что конформация и динамика β-структурных АП, стабилизированных дисульфидными связями, может значительно меняться при взаимодействии с мембраной. Ранее подобные свойства были описаны только для

спиральных пептидов. По-видимому, внутримолекулярная циклизация является не единственным фактором, ответственным за формирование «активной» пространственной структуры ареницина в липидном бислое. Тем не менее результаты, полученные в работе, и данные [378] показали важность дисульфидной связи в молекуле пептида как для формирования конформации β-шпильки, так и для мембранной и биологической активности пептида.

Полученные данные позволяют предположить, что конформационная подвижность пептидной молекулы может выступать в качестве дополнительного фактора, обуславливающего селективность действия пептида на мембраны различных клеток. Так, молекула ареницина, обладая большой подвижностью в растворе, вероятно, приобретает фиксированную конформацию при связывании с поверхностью мембраны. Этот процесс вносит дополнительный энтропийный вклад в свободную энергию связывания ($T\Delta S \sim -9$ ккал$\cdot M^{-1}$), препятствуя ему. Возможно, этот энтропийный вклад может быть скомпенсирован энтальпией взаимодействия пептид-липид только в случае отрицательно заряженных липидных мембран таких как, например, внешние мембраны бактериальных клеток. При этом, несмотря на большую гидрофобность поверхности ареницина, связывание с незаряженными (цвиттер-ионными) мембранами эукариотических клеток оказывается энергетически невыгодно. (Отсутствие взаимодействия ареницина-2 с незаряженными липидными мембранами было показано в работе методом КД-спектроскопии.)

Следует отметить, что схожие результаты, иллюстрирующие влияние конформационной подвижности на активность порообразующих АП, были получены в работе для двух спиральных пептидов антиамебина и зервамицина (Глава 4).

Полученные данные иллюстрируют недостатки классических мембраномоделирующих сред на основе детергентов. Так, несмотря на отсутствие взаимодействия ареницина с цвиттер-ионными фосфолипидными мембранами, пептид с высокой аффинностью взаимодействовал с мицеллами цвиттер-ионных детергентов. Это указывает на необходимость тщательного анализа результатов полученных в мицеллярных средах. Высокодинамичные мицеллы детергентов, вероятно, способны удовлетворительно моделировать гидрофобную составляющую взаимодействия пептид/мембрана, но использование детергентов различного заряда, для моделирования электростатической компоненты этого взаимодействия может приводить к недостоверным результатам.

3.4 Аурелин: пространственная структура, взаимодействие с мицеллами DPC и липидными везикулами, возможная роль в качестве ингибитора K^+-каналов

Новый антимикробный пептид аурелин, проявляющий небольшую антимикробную активность против грамотрицательных (IC_{50} *E. coli* > 40 μM) и грамположительных бактерий (IC_{50}/MIC *Bacillus megaterium* B-392 0.625/10 μM и *Micrococcus luteus* Ac-2229 2.5/40 μM), был выделен из мезоглеи чашеобразной медузы *Aurelia aurita* в учебно-научном центре ИБХ РАН под руководством д.х.н. Овчинниковой Т.В. Пептид имеет молекулярную массу 4296.95 Да и содержит 40 аминокислотных остатков, из которых 6 Cys, 2 His, 5 Lys, 3 Arg, 2 Asp, 1 Glu (общий заряд молекулы +7/+5 при pH ~5/7). Последовательность аурелина (Рис. 3.22) не имеет гомологии ни с одним из ранее известных антимикробных пептидов, но демонстрирует сходство с токсинами морских анемон, блокирующими потенциалозависимые K^+-каналы (Kv каналы) такими как BgK [379] и ShK [380] (40% и 27.5% гомологии, соответственно). Эти токсины состоят из 35-37 аминокислотных остатков и имеют характерную пространственную структуру в виде перекрещенных спиралей (“helical cross-like motif”) [273] (Рис. 3.22), которая включает в себя два или три спиральных элемента и стабилизирована тремя дисульфидными связями, имеющими топологию: I–VI, II–IV, III–V (римские цифры обозначают остатки Cys).

Согласно данным мутагенеза, одним из основных структурных элементов (фармакофоров), ответственных за высокоспецифичное взаимодействие токсинов BgK и ShK с внешним вестибюлем Kv каналов, является «функциональная диада» (дипептидная последовательность Lys-Tyr) [379,381,382]. Как предполагают, при формировании комплекса токсин/канал положительно заряженная боковая цепь остатка Lys непосредственно блокирует область селективного фильтра поры ионного канала [383]. Последовательность аурелина содержит остаток Lys28 в гомологичной позиции, но следующий за ним остаток Tyr заменен на Leu29. Однако, следует отметить, что другие блокаторы Kv каналов из яда скорпионов и змей, структурно не гомологичные токсинам анемон, например, карибдотоксин (charybdotoxin) и α-дендротоксин (α-dendrotoxin) содержат «функциональные диады», представленные непоследовательными остатками (Рис. 3.23). В этом случае в формировании «диады» принимают участие два пространственно сближенных (6–8 Å) остатка, положительно заряженный Lys и ароматический/гидрофобный Phe/Leu [384,385]. Еще одним структурным детерминантом, ответственным за высокоспецифичное взаимодействие токсинов с поровым регионом Kv каналов, является «кольцо положительно заряженных остатков» [381,386]. Этот

структурный элемент, вероятно, играет ключевую роль в начальном распознавании молекулой токсина внешнего вестибюля Kv каналов, содержащего большое число анионных групп [381].

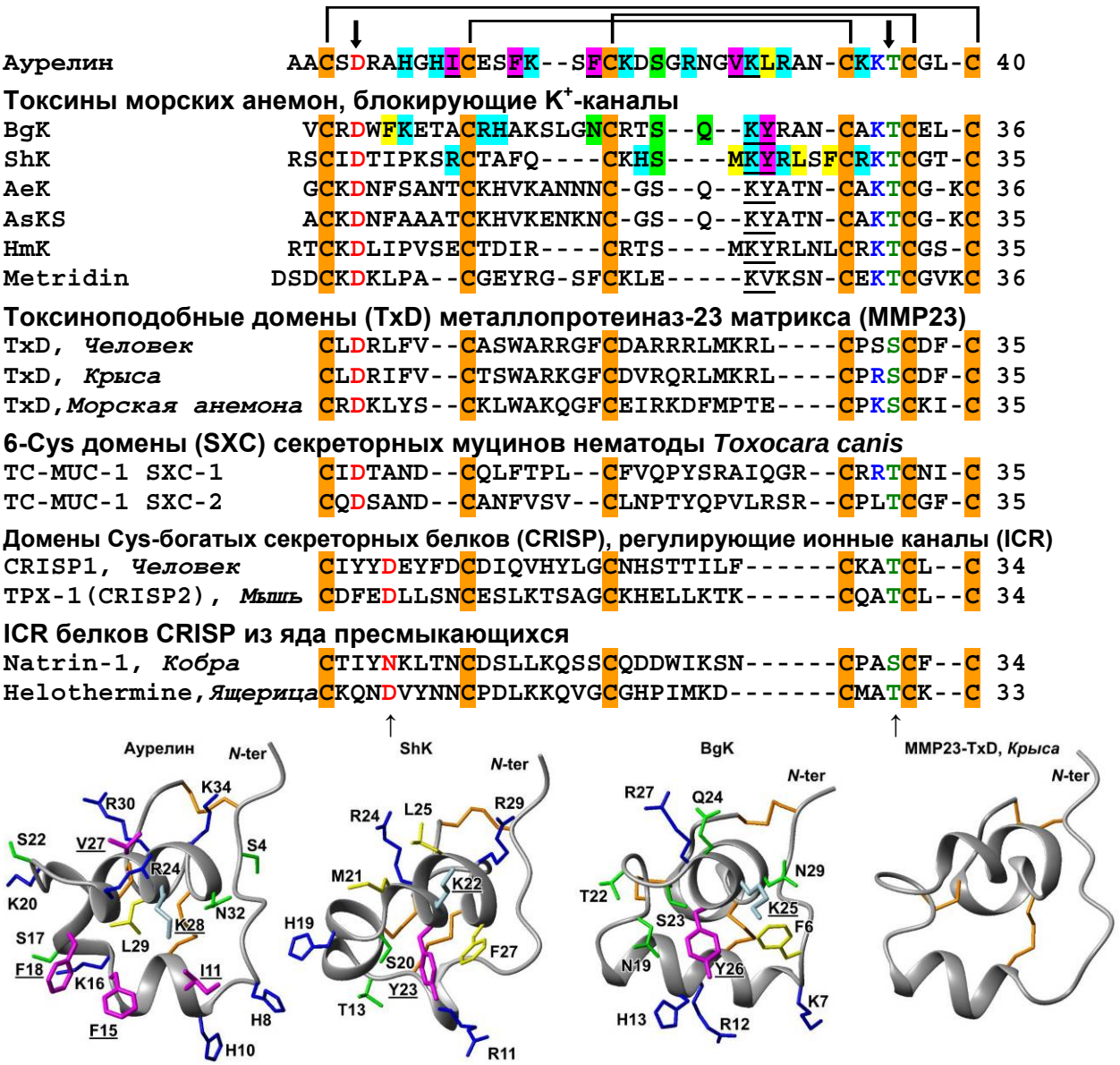


Рис. 3.22. (Вверху) Сравнение аминокислотной последовательности аурелина, токсинов морских анемон, блокирующих K^+-каналы, токсиноподобных доменов (TxD) металлопротеиназ-23 матрикса (MMP23), 6-Cys доменов (SXC) секреторных муцинов нематоды *Toxocara canis*, доменов, регулирующих ионные каналы (ICR) из Cys-богатых секреторных белков (CRISP) млекопитающих и из CRISP яда пресмыкающихся. (Внизу) сравнение пространственных структур аурелина (определена в настоящей работе), ShK, BgK и MMP23-TxD из крысы (PDB коды 2LG4, 1ROO, 1BGK и 2K72, соответственно). Остатки цистеина и дисульфидные связи окрашены оранжевым цветом. Показаны аминокислотные остатки BgK и ShK, важные для взаимодействия с Kv каналами, и соответствующие остатки аурелина. Остатки, принадлежащие «функциональной диаде» подчеркнуты и окрашены в голубой и пурпурный цвета. Для аурелина показаны несколько возможных участников «диады». На верхней панели остатки из консервативного мотива Asp/Lys-Thr показаны стрелками и выделены цветом.

Следует отметить, что гомологичный мотив, содержащий 6 остатков Cys, называемый «ShKT домен» (база данных SMART) или «CRISP-подобный домен» (база данных SCOP), также встречается в ряде белков позвоночных и беспозвоночных,

например, в секреторных гликопротеинах муцинах [387], металлопротеиназах из матрикса (MMP) [388] и Cys-богатых секреторных белках (CRISP) [389–391] (Рис. 3.22). Хотя функция отдельных ShKT доменов в этих белках до сих пор неизвестна, было высказано предположение, что они могут участвовать во внеклеточных и внутриклеточных белок/белковых взаимодействиях, действуя как сигнальный лиганд или даже как блокатор ионных каналов [388–391]. Например, многие белки семейства CRISP способны специфически блокировать K^+- и Ca^{2+}-каналы [389–391]. Способность ингибировать Kv каналы была описана для белка natrin (CRISP) из яда змеи *Naja atra* [390] и токсиноподобного домена (TxD) из металлопротеиназы-23 матрикса (MMP23) крысы [388].

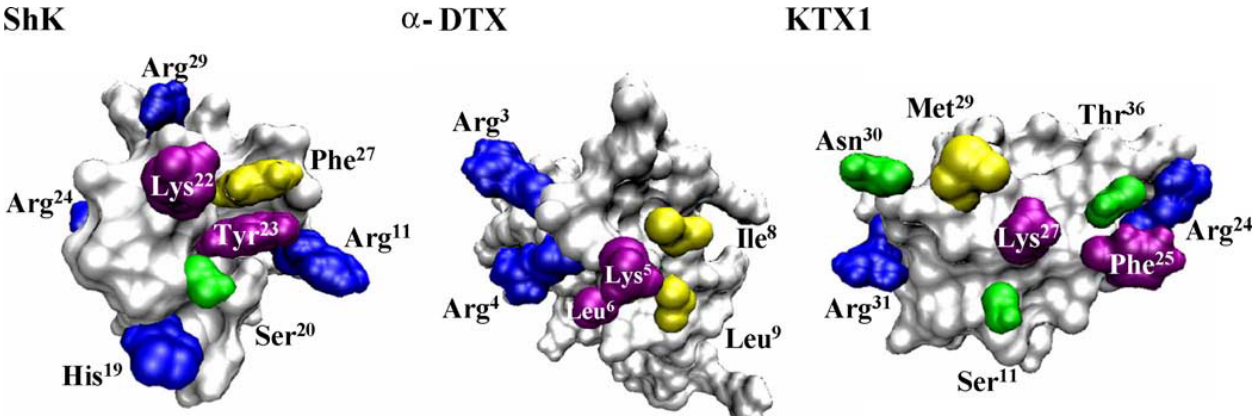


Рис. 3.23. Карты расположения остатков, важных для взаимодействия с Kv1.3 каналом крысы, на поверхности токсинов ShK из морской анемоны *S. heliantus*, α-дендротоксина (α-DTX) из яда змеи *Dendroaspis angusticeps* и KTX1 из яда скорпиона *Androctonus mauretanicus*. Ароматические/гидрофобные, положительно заряженные и другие полярные остатки окрашены в желтый, синий и зеленый цвета, соответственно. Остатки, принадлежащие «функциональной диаде» окрашены в пурпурный цвет. Рисунок взят из работы [381].

В работе были использованы рекомбинантные аналоги аурелина (немеченый и ^{15}N-меченый), полученные в бактериальной системе экспрессии (*E. coli*) Пантелеевым П.В. и к.х.н. Баландиным С.В. (учебно-научный центр ИБХ РАН, руководитель д.х.н. Овчинникова Т.В.)

В рамках работы при исследовании аурелина были поставлены следующие задачи:

1. Методами ЯМР-спектроскопии определить пространственную структуру и динамику основной цепи молекулы аурелина в водном растворе. Определить топологию системы дисульфидных связей в молекуле пептида и экспериментально подтвердить предположение о структурной гомологии аурелина с белками и пептидами, содержащими ShKT домен.
2. Используя мицеллы DPC и липидные везикулы различного состава, методами ЯМР-спектроскопии определить энергетику и топологию взаимодействия аурелина с мембраноподобными средами, а также изменения, возникающие в пространственной

структуре пептида при образовании комплекса. На основе полученных данных описать роль, которую играет внутримолекулярная циклизация в формировании пространственной структуры аурелина в мембране, а также установить роль межмолекулярных гидрофобных и электростатических взаимодействий при образовании комплекса пептида с липидным бислоем.

3. Используя структурные данные и теоретические методы молекулярного моделирования, предложить возможный механизм взаимодействия аурелина с поровым доменом K^+-каналов. Провести анализ активности аурелина методами электрофизиологии на мембранах ооцитов лягушки *Xenopus laevis*, экспрессирующих различные варианты Kv каналов.

3.4.1 Пространственная структура и динамика аурелина в воде

Пространственная структура аурелина была определена методом $^{1}H,^{15}N$-ЯМР-спектроскопии в водном растворе при pH 4.5 (Рис 3.24). Согласно полученным данным, молекула пептида представляет собой компактную глобулу, стабилизированную тремя дисульфидными связями (Cys3-Cys40, Cys12-Cys33 и Cys19-Cys37). Вторичная структура аурелина включает в себя два спиральных региона. Первый из них (His10-Asp21) разделен изгибом (~60°, остаток Phe15) на α-спиральный (His10-Phe15) и 3_{10}-спиральный (Lys16-Asp21) участки. Вторая область (Arg24-Asn32) имеет конформацию α-спирали. Структура аурелина стабилизирована 17 водородными связями между атомами основной цепи. Карты электростатического потенциала и потенциала молекулярной гидрофобности (Рис 3.25БВ) показали, что боковые цепи Ile11, Phe15, и Phe18 формируют на катионной поверхности аурелина (общий заряд молекулы + 7 при pH 4.5) гидрофобный участок. Эти свойства придают молекуле пептида умеренную амфифильность.

Зависимость химических сдвигов и КССВ $^{3}J_{HNH}{}^{\alpha}$ в молекуле аурелина от pH раствора была исследована в диапазоне от 2.0 до 6.0. Анализ кривых титрования позволили измерить значения pKa для боковых цепей Asp5, Glu13, Asp21 и *C*-концевой карбоксильной группы (2.8, 3.8, 3.0 и 2.6, соответственно). Сигналы HN-групп основной цепи остатков His8 и His10 значительно уширялись при pH выше 5.5. Поэтому, для определения pKa боковых цепей этих остатков было проведено исследование образца немеченого пептида в растворе 100% D_2O в диапазоне pH от 4.0 до 7.3. Изменение химических сдвигов $HC^{\varepsilon 1}$ протонов позволило определить значения pKa для His8 и His10 (6.03 и 6.28, соответственно). Таким образом, в условиях, при которых проводили структурное исследование аурелина (pH 4.5), все кислотные группы пептида и остатки His были практически полностью заряжены. Сравнение значений $^{3}J_{HNH}{}^{\alpha}$, измеренных при pH

3.2, 4.5 и 6.0, не выявило значительных pH-зависимых изменений в конформации основной цепи аурелина.

Параметр/Тип/Единицы		CYANA
Структуры, рассчитанные, отобранные для анализа		200 20
Штрафная функция CYANA ($Å^2$)		1.26±0.13
Ограничения на расстояния верхние/нижние: ЯЭО; водородные связи (число); дисульфидные связи (число)		667/45 36/36(18) 9/9 (3)
Ограничения на торсионные углы $\varphi/\psi/\chi^1$		35/11/19
Максимальные нарушения верхних, нижних и ван-дер-ваальсовых ограничений (Å)		0.29 0.10 0.26
Максимальное нарушение значений углов (°)		1.4
СКО атомных координат основная цепь; тяжелые атомы	весь пептид Ala1-Cys40	0.42±0.15 1.20±0.16
	упорядоченный участок Cys3-Cys40	0.23±0.08 1.17±0.16

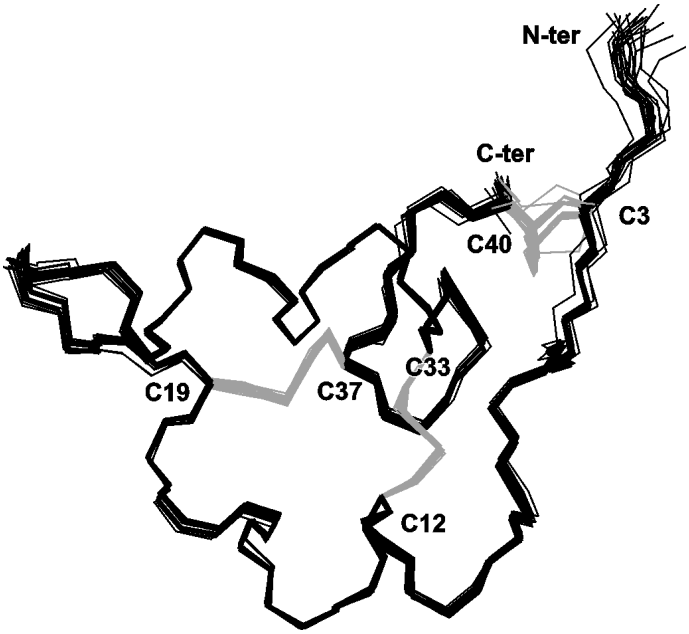


Рис 3.24. Набор 20-ти рассчитанных структур аурелина, совмещенных по атомам основной цепи. Черными и серыми линиями показаны основная цепь и дисульфидные связи. В таблице приведена статистика рассчитанного набора структур.

Титрование pH также не выявило существенных изменений химических сдвигов сигналов боковых цепей Arg и Lys при изменении ионизационного состояния карбоксильных групп пептида. Это указало на отсутствие формирования солевых мостиков между положительно и отрицательно заряженными остатками пептида. Однако, анализ кривой титрования для HN протона Thr36 указал на возможное формирование водородной связи с карбоксильной группой Asp5 (Рис 3.25A), которая вместе с дисульфидом Cys3-Cys40 определяет взаимное положение *N*- и *C*-концевых регионов пептида.

Динамику основной цепи аурелина в воде исследовали с помощью измерения релаксации ядер ^{15}N на частоте 60 МГц. Измеренные релаксационные параметры (скорости R_1 и R_2 релаксации и величина гетероядерного ЯЭО ^{15}N-{^1H}) были проанализированы в программе FastModelFree с использованием «модель-независимого» подхода. Значительная подвижность основной цепи пептида в пс-нс временном диапазоне наблюдалась на *N*-концевом участке (Ala2-Cys3) и в повороте (Asp21-Gly23), который соединяет два спиральных региона молекулы (Рис 3.25A). В то же время движения в мкс-мс диапазоне в основном наблюдались в двух α-спиральных регионах. Остатки пространственно сближенных участков молекулы, которые предшествовали первому и

замыкали второй α-спиральные регионы (Asp5-Gly9 и Lys34-Cys37), демонстрировали оба типа (пс-нс и мкс-мс) движений.

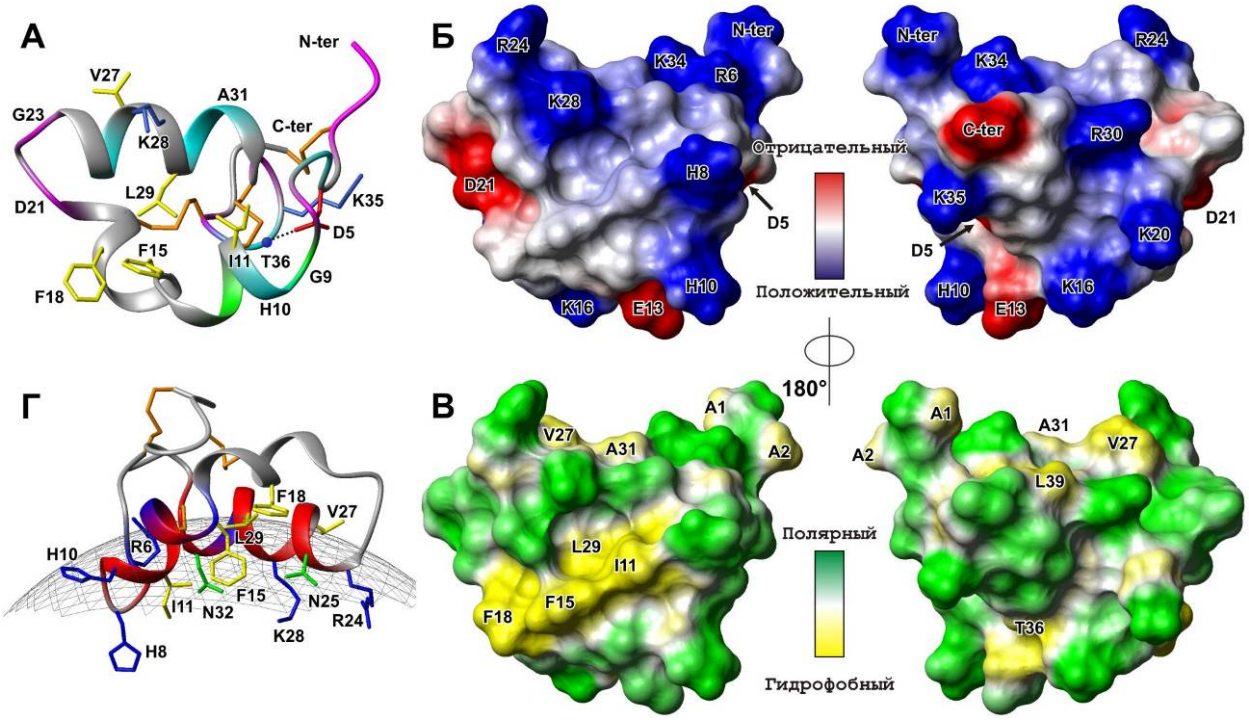


Рис. 3.25. (А) Пространственная структура и динамика основной цепи аурелина в воде. Основная цепь пептида окрашена в соответствии с полученными динамическими данными ЯМР. Остатки, совершающие высокоамплитудные движения в пс-нс диапазоне времен ($S^2 < 0.7$, τ_e отличны от нуля), выделены пурпурным цветом. Остатки, совершающие движения в мкс-мс диапазоне времен ($R_{EX} > 0$), выделены голубым цветом. Остатки, демонстрирующие подвижность в двух временных диапазонах, показаны зеленым. Боковая цепь остатка Lys28, предположительно блокирующая пору канала, и близлежащие ароматические/гидрофобные боковые цепи (Ile11, Phe15, Phe18, Val27 и Leu29) показаны синим и желтым цветом, соответственно. Боковые цепи Asp5 и Lys35 показаны красным и синим, соответственно. HN-группа Thr36 и водородная связь H^N Thr36 – $O^{\delta1}$ Asp5 показаны синей сферой и пунктирной линией. Дисульфидные связи окрашены оранжевым цветом. (Б, В) Распределение электростатического потенциала и потенциала молекулярной гидрофобности на поверхности аурелина. (Г) Модель комплекса аурелин/мицелла DPC. Основная цепь пептида окрашена в соответствии с полученными экспериментальными данными (Рис. 3.26ГД). Остатки, которые в присутствии спиновой метки 16-DSA демонстрируют сильный эффект PRE и, вероятно, находятся в гидрофобном регионе мицеллы, окрашены в красный цвет. Остатки, которые при встраивании пептида в мицеллу демонстрируют сильные изменения химических сдвигов, и, вероятно, контактируют с поверхностью мицеллы, окрашены синим. Поверхность мицеллы (радиус 23 Å) показана серой сеткой. Боковые цепи ароматических/гидрофобных, положительно заряженных и других полярных остатков, находящихся в контакте с мицеллой, показаны желтым, синим и зеленым цветами.

Общая реориентация пептида в растворе происходила с характерным временами τ_R ~ 1.8 нс (30°C, соответствующий радиус Стокса R_H ~ 13.1 Å, молекулярная масса ~ 4 кДа). Схожее значение R_H (13.9 ± 0.3 Å, соответствующая масса ~ 4.7 кДа) было рассчитано из коэффициента трансляционной диффузии пептида (D_T ~ 1.76±0.03×10^{-10} $м^2 \cdot с^{-1}$, 25°C, Рис 3.26В). Полученные значения согласуются с характерными размерами молекулы аурелина (31×28×22 Å), указывая на мономерное состояние пептида в растворе.

3.4.2 Взаимодействие аурелина с липидными везикулами и мицеллами DPC

Взаимодействие аурелина с везикулами различного липидного состава было исследовано методом ЯМР-спектроскопии. Цвиттер-ионные (POPC) и частично анионные (POPC/DOPG 3:1) везикулы были использованы для моделирования мембраны эукариотических и бактериальных клеток, соответственно. Титрование образца аурелина SUV POPC/DOPG приводило к постепенному уменьшению интенсивности ЯМР-сигналов пептида (Рис. 3.26А), что указывало на ассоциацию пептидных молекул с поверхностью липосом. В этом случае из-за медленной реориентации везикул в растворе молекулы связанного пептида не могут детектироваться методами ЯМР высокого разрешения, и интенсивность наблюдаемого сигнала ЯМР оказывается пропорциональна равновесной концентрации свободного пептида в растворе (C_f). Анализ измеренных изотерм связывания выявил эффективное взаимодействие аурелина с анионными SUV с коэффициентом распределения Kp равным $50\pm4\times10^3\cdot M^{-1}$ (Рис. 3.26Б, Ур. 7.22). Добавление 100 мМ NaCl значительно уменьшало сродство пептида к везикулам POPC/DOPG, но не блокировало связывание полностью ($Kp = 6.3\pm0.2\times10^3\cdot M^{-1}$). Вероятно, электростатические взаимодействия в основном ответственны за связывание пептида с поверхностью липидной мембраны. Этот вывод подтверждается отсутствием детектируемого взаимодействия аурелина с везикулами, содержащими цвиттер-ионный липид POPC (Рис. 3.26Б).

По сравнению с другими катионными АП морских беспозвоночных аурелин демонстрирует меньшую эффективность взаимодействия с отрицательно заряженными липидными везикулами. Например, пептиды полифемузины из хемоцитов мечехвоста, имеющие конформацию β-шпильки, взаимодействуют с везикулами POPC/POPG (3:1, 150 мМ NaCl) с Kp в диапазоне $30–50\times10^3\cdot M^{-1}$ [392]. В то же время слабое (или не детектируемое) взаимодействие с незаряженными липидными везикулами весьма типично для катионных АП. Например, очень слабое связывание с SUV POPC ($Kp \sim 1\text{-}3\times10^3\cdot M^{-1}$) детектировалось методом спектроскопии флюоресценции для полифемузинов [392]. Кроме того, отсутствие взаимодействия с везикулами POPC было показано в этой работе методам КД-спектроскопии для пептида ареницина (β-шпилька) из целомоцитов морского пескожила (Раздел 3.3). Несмотря на сравнительно низкое сродство к бислойным мембранам, можно предположить, что аурелин обладает способностью разрушать мембраны, содержащие анионные липиды, и именно эта способность определяет активность пептида против грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов.

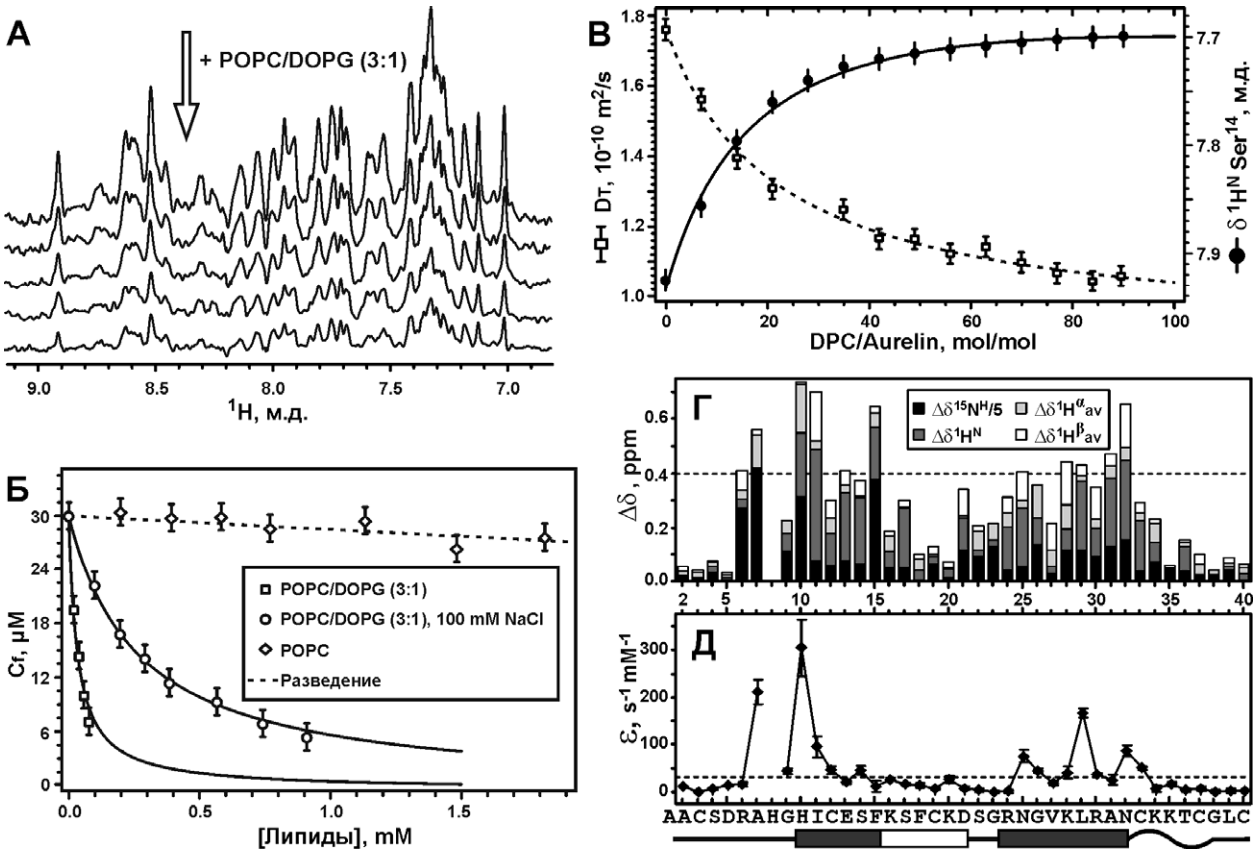


Рис. 3.26. Взаимодействие аурелина с липидными везикулами и мицеллами DPC. (А) Титрование образца 30 μM аурелина (10 мМ Трис-Ацетат, pH 7.0, 30°C) SUV, содержащими POPC/DOPG (3:1). Показаны амидно-ароматические регионы 1D ^{1}H ЯМР-спектров пептида, измеренных при увеличении концентрации липидов. Интенсивность ЯМР-сигналов пропорциональна равновесной концентрации свободного пептида в растворе (C_f). (Б) Изотермы связывания аурелина с SUV, содержащими POPC, POPC/DOPG (3:1) и POPC/DOPG (3:1, 100 мМ NaCl), аппроксимированы уравнением равновесного распределения (Ур. 7.22). Кривая разведения показана пунктирной линией. (В) Титрование образца аурелина (0.5 мМ, 25°C, pH 4.5) детергентом DPC. Значения химического сдвига (δ) H^N протона остатка Ser14 аппроксимированы уравнением равновесного распределения. Значения коэффициента трансляционной диффузии пептида (D_T, 5% D_2O) для удобства анализа аппроксимированы сглаженной линией. (Г) Изменение химических сдвигов $^{15}N^H$, $^{1}H^N$, $^{1}H^{\alpha}$ и $^{1}H^{\beta}$ ядер пептида при образовании комплекса с мицеллой DPC. Значения $\Delta\delta^{15}N^H$ разделены на 5. Значения $\Delta\delta^{1}H^{\alpha}$ для остатков Gly и $\Delta\delta^{1}H^{\beta}$ для остатков с не вырожденными $^{1}H^{\beta}$ хим. сдвигами усреднены. Уровень 0.4 м.д. отделяет остатки, которые, вероятно, находятся в контакте с мицеллой. (Д) Парамагнитное усиление R_2 релаксации H^N протонов основной цепи аурелина в комплексе с мицеллой DPC, вызванное добавлением гидрофобной спиновой метки (16-DSA). Уровень 30 $с^{-1}\cdot мМ^{-1}$ отделяет остатки, расположенные внутри и за пределами гидрофобного региона мицеллы. Следует отметить, что $^{1}H^N$ сигнал His8 не наблюдался в мицеллах DPC при pH > 4.5.

Липидные везикулы обладают практически «идеальными» мембраномоделирующими свойствам и, как показано выше, позволяют применять методы ЯМР-спектроскопии для исследования энергетики взаимодействия мембраноактивных пептидов с бислойными мембранами. Однако, большие размеры (≥ 30 нм) и медленная реориентация везикул в растворе делает невозможным структурные исследования мембраносвязанных белков и пептидов методами ЯМР высокого разрешения. Поэтому для исследования структуры и топологии взаимодействия аурелина с

мембраноподобными средами в качестве мембраномоделирующего окружения были использованы мицеллы DPC. Для наблюдения за формированием комплексов пептид/мицелла были использованы диффузионные измерения (pH 4.5, 25°C) и $^{1}H,^{15}N$-корреляционные ЯМР-спектры. Химические сдвиги нескольких остатков пептида испытывали значительные изменения при увеличении концентрации детергента в образце (Рис. 3.26ВГ). Для определения доли мицеллосвязанного пептида и анализа энергетики образования комплекса наблюдали за изменением химического сдвига H^N протона остатка Ser14 (Рис. 3.26В). Полученные данные показали, что пептид переходит полностью в мицеллосвязанное состояние только при молярном соотношении детергент/пептид (D:P) > 80. Таким образом, аурелин демонстрирует значительно меньшее сродство к поверхности мицеллы DPC, чем другие АП (циклотиды KB1 и KB7, и ареницин-2), изученные в настоящей работе. Использование изотермы Ленгмюра (Ур. 7.23) для аппроксимации кривой связывания не позволило адекватно описать полученную зависимость $\Delta\delta$(D:P) (данные не показаны). В то же время анализ изотермы с помощью уравнения равновесного распределения (Ур. 7.22, Рис. 3.26В) позволил оценить значение коэффициента распределения *Kp* ($0.97\pm0.01\times10^{3}\cdot M^{-1}$).

Коэффициент трансляционной диффузии аурелина также постепенно уменьшался при увеличении концентрации детергента в образце (Рис. 3.26В), что указывало на формирование комплексов аурелин/DPC. Измеренное значение D_T для пептида в комплексе с мицеллой ($1.04 \pm 0.03 \times 10^{-10}$ $м^2\cdot с^{-1}$, D:P 90:1, 25°C) соответствовало гидродинамическому радиусу R_H = 23.5 ± 0.6 Å. Таким образом, характерные размеры комплекса аурелин/DPC лишь ненамного превосходили размеры мицеллы DPC (R_H = 23.1±0.5 Å, см. п. 4.1.5.1). Сравнение значений КССВ $^{3}J_{HNH^{\alpha}}$ и температурных коэффициентов амидных протонов для аурелина в воде и в мицеллярном окружении не выявило значительных изменений в конформации пептида при образовании комплекса с мицеллой DPC.

Для исследования топологии комплекса аурелин/DPC был использован липид-растворимый спиновый зонд 16-DSA. Парамагнитное усиление R_2 релаксации H^N протонов (ε), вызванное добавлением 16-DSA, показало, что пептид встраивается в гидрофобную область мицеллы двумя регионами (Рис. 3.26Д). Эти регионы (Ala7-Ser14 и Gln25-Cys33) включают два α-спиральных участка и совпадают с сайтами, где наблюдаются наибольшие изменения химических сдвигов ядер пептида при образовании комплекса с мицеллой (Рис. 3.26Г). Следует отметить, что распределение величин ε на этих регионах демонстрирует характерную спиральную периодичность (*i,i+3/i+4*), что указывает на поверхностный тип связывания пептида с мицеллой. Модель комплекса

пептид/мицелла (Рис. 3.25Г) была построена на основании пространственной структуры пептида и данных парамагнитного усиления релаксации. В полученной модели пептид взаимодействует с поверхностью мицеллы DPC двумя α-спиральными участками, при этом гидрофобные боковые цепи Ile11, Phe15, Val27 и Leu29 расположены на интерфейсе взаимодействия. В то же время положительно заряженные боковые цепи Arg6, His8, His10, Arg24 и Lys28 проникают в гидрофобную область мицеллы или находятся в непосредственной близости от ее поверхности. Возможно, именно эти энергетически не выгодные контакты между заряженными группами пептида и гидрофобными цепями детергента и ответственны за низкое сродство аурелина к поверхности мицеллы DPC.

3.4.3 Сравнение пространственной структуры аурелина с другими белками, содержащими ShKT домены

Полученные результаты выявили гомологию пространственной структуры аурелина и токсинов морских анемон BgK и ShK (Рис. 3.22). Пептиды имеют идентичную схему замыкания дисульфидных связей (I–VI, II–IV, III–V) и схожую вторичную структуру, состоящую из трех спиральных элементов, однако относительная ориентация и длина этих спиралей значительно отличаются. Пептиды имеют схожее пространственное расположение боковой цепи Lys28 (номера остатков даны для аурелина), предположительно блокирующей пору Kv канала, относительно системы консервативных дисульфидных связей (значение СКО структуры аурелина относительно структур BgK и ShK, рассчитанное по C^{α} атомов шести остатков Cys и Lys28 составляет 1.68 и 1.39 Å, соответственно). В то же время, боковая цепь второго предполагаемого участника «функциональной диады» (Leu29) располагается в глубине гидрофобного ядра молекулы аурелина и не экспонирована в растворитель (Рис. 3.25AB).

Используя координаты C^{α} атомов 6-ти консервативных остатков Cys, структура аурелина также может быть довольно хорошо совмещена (СКО в диапазоне от 1.0 до 2.1 Å) со структурами ShKT доменов других белков, в том числе MMP23 крысы, белков CRISP из ядов змей (pseudechetoxin, pseudecin, stecrisp, triflin и natrin) и белка CRISP-2 мыши (pdb коды: 2K72, 2DDA, 2DDB, 1RC9, 1WVR, 1XTA и 2A05, соответственно). Наличие электростатического взаимодействия между остатками Asp5 и Lys35-Thr36 дополнительно подчеркивает структурную гомологию между аурелином и белками, содержащими ShKT домены. Эти остатки в токсинах анемон являются абсолютно консервативными (Рис. 3.22) и необходимы для корректного фолдинга синтетических аналогов BgK и ShK [379,382]. Кроме того, в ходе ЯМР-исследования ShK было высказано предположение о формировании солевого мостика между карбоксильной группой Asp и ε-аминогруппой Lys [393]. Гомологичный мотив Asp/Asn...-...Lys/Arg-

Thr/Ser (в некоторых случаях без положительно заряженных остатков Lys/Arg) присутствует и в ShKT доменах других белков (Рис. 3.22, стрелки). Анализ известных пространственных структур ShKT доменов показал, что в большинстве случаев консервативный остаток Asp (Asn в белках CRISP из ядов змей) может формировать либо водородную связь с HN-группой Thr/Ser, либо солевой мостик с предыдущим остатком Lys/Arg. Подобное электростатическое взаимодействие должно проявляться в значительном сдвиге ЯМР-сигнала H^N протона Thr/Ser в слабое поле. Действительно, во всех ShKT доменах, изученных к настоящему времени методом ЯМР-спектроскопии (ShK [380,393], BgK [379], MMP23-TxD крысы [388], ICR из CRISP-2 мыши [389]), включая аурелин, соответствующий $^1H^N$ сигнала имел химический сдвиг, превышающий 10 м.д.

3.4.4 Компьютерное моделирование комплекса аурелина с поровым доменом канала Kv1.1

Полученная пространственная структура аурелина позволила использовать теоретические методы молекулярной динамики и белок-белкового докинга для моделирования возможного взаимодействия пептида с K^+-каналами.[1] Как уже упоминалось, молекула аурелина содержит консервативный остаток Lys28, боковая цепь которого, возможно блокирует селективный фильтр поры Kv канала. Однако идентичность второго (гидрофобного/ароматического) остатка из «функциональной диады» остается неопределенной. Для молекулы аурелина в явно-заданном водном окружении была рассчитана молекулярно динамическая траектория (расчеты проводили в программе GROMACS 4.0.7 [394] с использованием силового поля Gromos 96 (45a3)). Длина траектории составила 60 наносекунд. В качестве стартовой структуры для молекулярной динамики была использована структура пептида, определенная методом ЯМР. Для выявления остатков, формирующих «функциональную диаду», по полученной траектории было рассчитано распределение расстояний между положительно заряженной группой Lys28 и близлежащими гидрофобными/ароматическими остатками (Ile11, Phe15, Phe18, Val27). Сравнение полученных данных с распределением расстояний в «диадах» токсинов BgK и ShK, также рассчитанных по молекулярно динамическим траекториям, (Рис. 3.27, левая панель) показало, что в случае аурелина «функциональная диада» может включать остатки Ile11 или Val27 (или Phe15 с меньшей вероятностью).

[1] Расчеты проведены к.ф.м.н. Чугуновым А.О., лаборатория моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН, руководитель д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.

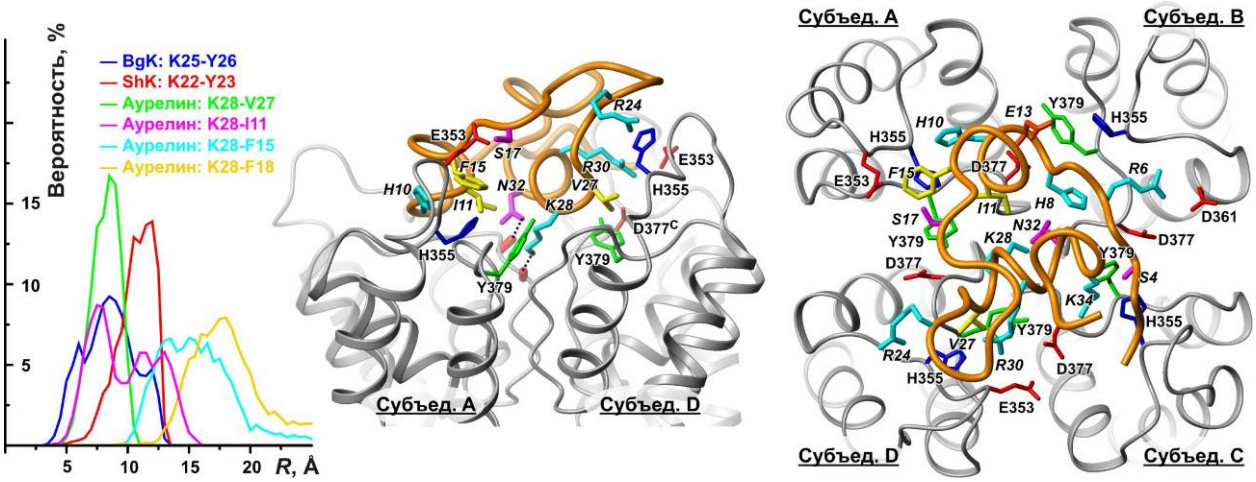


Рис. 3.27. Пространственная конфигурация «функциональной диады» в молекуле аурелина и возможное взаимодействие пептида с внешним вестибюлем Kv канала. На левой панели показано распределение расстояний (R) между атомом N^{ζ} остатка Lys, блокирующего селективный фильтр поры канала, и центрами масс боковых цепей близлежащих гидрофобных/ароматических остатков, – вероятных участников «функциональной диады». Распределения были рассчитаны по фрагментам (10–60 нс) молекулярно динамических траекторий BgK, ShK и аурелина. На средней и правой панелях показана модель комплекса аурелина с поровым доменом канала Kv1.1 человека. Четыре субъединицы (A-D), формирующие поровый домен канала, показаны серым цветом. Остатки, принадлежащие различным субъединицам, обозначены надстрочными индексами. Положительно заряженные, отрицательно заряженные и ароматические боковые цепи канала окрашены в синий, красный и зеленый цвета, соответственно. Молекула аурелина показана оранжевым цветом. Положительно заряженные, отрицательно заряженные, полярные и гидрофобные/ароматические боковые цепи пептида показаны жирными линиями и окрашены в голубой, оранжево-красный, пурпурный и желтый цвета, соответственно. Остатки пептида подписаны курсивом. На средней панели карбонильные группы основной цепи остатков Tyr375 и Gly376 из субъединицы B канала, участвующие в формировании селективного фильтра, показаны красными цилиндрами. Пунктирными линиями показаны водородные связи между соответствующими карбонильными группами и ε-аминогруппой Lys28 и NH_2 группой Asn32 пептида.

Компьютерная модель комплекса Kv1.1/аурелин была построена методом белок-белкового докинга с использованием модели Kv1.1 канала, построенной в программе MODELLER [395], используя в качестве шаблона кристаллическую структуру бактериального K^+-канала KcsA (PDB код: 1K4C), и ансамбля структур пептида, определенных методом ЯМР-спектроскопии и молекулярной динамики. Возможные комплексы пептид/канал были ранжированы по количеству межмолекулярных контактов и с использованием концепции комплементарности гидрофобных/гидрофильных свойств взаимодействующих поверхностей. Лучшее решение было дополнительно релаксировано в коротком молекулярно динамическом расчете. В полученной модели комплекса Kv1.1/аурелин (Рис. 3.27, средняя и правая панели) боковая цепь Lys28 напрямую блокирует пору канала, образуя несколько водородных связей с карбонильными группами основной цепи остатков Tyr375 из всех четырех субъединиц канала (A, B, C и D). NH_2 группа боковой цепи остатка Asn32 аурелина также образует водородную связь с карбонильной группой остатка $Gly376^B$ канала (Рис. 3.27, средняя панель, пунктирная

линия, надстрочный индекс обозначает субъединицу канала). Карбонилы остатков Tyr375 и Gly376 принадлежат региону селективного фильтра поры канала. Анионные боковые цепи Asp377 (внешний остаток селективного фильтра) канала взаимодействуют с «кольцом положительно заряженных остатков» молекулы аурелина ($Asp377^{A}$ – His8/His10; $Asp377^{B}$ – Arg6; $Asp377^{C}$ – Lys34). Полученный комплекс также стабилизирован водородными связями и солевыми мостиками между заряженными и полярными остатками аурелина и канала ($His355^{A}$-His10, $Glu353^{A}$ – Ser17; $Asp361^{B}$ – Arg6; $His355^{B}$ – Glu13; $His355^{C}$ – Ser4; $Glu353^{D}$ – Arg30; $His355^{D}$ – Arg24). С другой стороны, гидрофобные остатки Ile11/Phe15 и Val27 (вероятно, относящиеся к «функциональной диаде») взаимодействуют с кластерами остатков His355/Tyr379 из субъединиц A и D канала, соответственно. Общая структура комплекса Kv1.1/аурелин напоминает структуру комплекса Kv1.1/BgK, модель которого была построена на основании данных двойного мутагенеза [383].

Полученные результаты позволяют рассматривать аурелин как потенциальный блокатор K^{+}-каналов, имеющий два основных структурных элемента (фармакофора): «функциональную диаду» Lys28/(Ile11/Phe15 или Val27) и «кольцо положительно заряженных остатков» (Arg6, His8, His10, Lys34). Вовлечение двух остатков His, меняющих свое ионизационное состояние при pH ~ 6 (см. п. 3.4.1), в электростатические взаимодействия с отрицательно заряженными остатками канала указывает на возможную pH-зависимость действия аурелина. Для проверки выдвинутой гипотезы о способности аурелина блокировать поровый домен K^{+}-каналов были проведены электрофизиологические (patch-clamp) эксперименты на мембранах ооцитов лягушки *Xenopus laevis*, экспрессирующих различные варианты Kv каналов[1]. В соответствии с предсказаниями, полученными из модели Kv1.1/аурелин, в электрофизиологических экспериментах в присутствии аурелина было обнаружено pH-зависимое блокирование токов через каналы Kv1.1, Kv1.3 и *Shaker* (плодовая мушка *Drosophila melanogaster*). Пептид был активен только при pH < 6, в условиях, когда боковые цепи остатков His8 и His10 положительно заряжены. В то же время, пептид был неактивен при нейтральных pH, в условиях, когда боковые цепи остатков His8 и His10 не несут заряда. Наблюдаемый эффект не мог быть объяснен изменением ионизационного состояния остатков His из субъединиц канала (единственных аминокислотных остатков, имеющих pKa в диапазоне pH от 5 до 7), так как в отличие от Kv1.1 и Kv1.3 канал *Shaker* не содержит остатков His во

[1] Электрофизиологические измерения проведены А.А. Беркут (лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН) и С. Пеньёром (лаборатория токсикологии Католического университета г. Лёвен).

внешнем вестибюле порового домена. Полученные данные косвенно подтвердили корректность предложенной модели Kv1.1/аурелин.

3.4.5 Резюме

Методами гетероядерной $^{1}H,^{15}N$-ЯМР-спектроскопии определена пространственная структура и динамика основной цепи аурелина в водном растворе. Показана гомология пространственной структуры аурелина с белками и пептидами, содержащими ShKT домен, включая токсины морских анемон, блокирующие поровый домен K^+-каналов. Показано, что ЯМР-спектроскопия высокого разрешения может быть использована для определения энергетических параметров взаимодействия мембраноактивных пептидов с липидными везикулами. Определена энергетика взаимодействия аурелина с липосомами различного липидного состава. Используя мицеллы DPC в качестве мембраномоделирующего окружения, определена возможная топология взаимодействия аурелина с липидной мембраной. Полученные результаты позволяют предположить, что, пространственная структура аурелина определяется внутримолекулярными взаимодействиями (включая дисульфидные связи), а за образование комплекса пептид/мембрана, видимо, отвечают электростатические взаимодействия с полярными головками липидов.

Полученные результаты подтверждают выводы о недостатках сред на основе детергентов, сделанные при исследовании ареницина (п. 3.3). Так, несмотря на отсутствие взаимодействия аурелина с цвиттер-ионными фосфолипидными мембранами, в экспериментах наблюдалось взаимодействие пептида с мицеллами цвиттер-ионного детергента DPC. Отсутствие в мицеллах полужесткой двумерной упаковки молекул детергента, которая характерна для липидов в бислое, вероятно, делает невозможным четкое пространственное разграничение гидрофобного и полярного регионов, препятствуя одновременному моделированию электростатической и гидрофобной компонент взаимодействия МП/мембрана.

В работе предложен возможный механизм взаимодействия аурелина с поровым доменом K^+-каналов. В электрофизиологическом исследовании на мембранах ооцитов лягушки *Xenopus laevis* показано pH-зависимое блокирование токов через каналы Kv1.1, Kv1.3 и *Shaker* в присутствии аурелина. Полученные результаты указывают на определенный дуализм физико-химических и биохимических свойств молекулы аурелина, которая может демонстрировать два различных типа биологической активности. С одной стороны, аурелин (общий заряд молекулы +7/+5 при pH ~5/7) имеет свойства, типичные для катионного мембраноактивного АП. При этом, небольшая амфифильность молекулы пептида и умеренное сродство к отрицательно заряженным (POPC/DOPG 3:1) липидным

везикулам коррелируют с небольшой антибактериальной активностью аурелина. Сохранение аффинности пептида к везикулам POPC/DOPG в растворе 100 мМ NaCl указывает на то, что пептид может обладать сродством к бактериальной мембране и в физиологических условиях. Как показано в многочисленных исследованиях мембраноактивных АП [14,165,202,209], накопление пептидных молекул в наружном монослое мембраны уменьшает его стабильность и в конечном итоге приводит к разрушению бислоя. Таким образом, мы можем предположить, что наблюдаемая антимикробная активность аурелина опосредована мембранной активностью и обусловлена неспецифическим электростатическим взаимодействием с липидами бактериальной клетки. С другой стороны, аурелин имеет свойства, типичные для токсинов, действующих на поровые домены K^+-каналов, и в слабокислых pH (< 6) действительно блокирует токи через некоторые варианты Kv каналов. При этом в образование комплекса с поровым доменом K^+-каналов вовлечены высокоспецифические межмолекулярные взаимодействия. Следует отметить, что биологические эффекты, связанные с подобным pH-зависимым действием, также как и настоящая биологическая функция аурелина (АП или токсин-блокатор), в настоящее время остаются неизвестными.

Совмещение биологических свойств АП и токсина-блокатора в одной пептидной молекуле, описанное в данной работе для аурелина, не является уникальным. По крайней мере, один из дефензинов мясной мухи *Sarcophaga peregrina* сапецин B (sapecin B) демонстрирует сильную антимикробную активность в отношении грамположительных бактерий и в то же время блокирует Ca^{2+}-активируемые K^+-каналы в наномолярных концентрациях [396]. Недавнее обнаружение антибактериальных и противогрибковых свойств у классического блокатора K^+-каналов карибдотоксина (charybdotoxin) [397] показывает, что сочетание свойств АП/токсин в одной пептидной молекуле может иметь гораздо более широкое распространение, чем предполагалось ранее. Совпадение некоторых биофизических характеристик у молекул АП и токсинов-блокаторов, указывает на возможное отсутствие четкой границы между этими двумя типами защитных молекул. В этой связи стоит подчеркнуть, что потенциальный интерфейс взаимодействия аурелина с K^+-каналом (Рис. 3.27) практически полностью совпадает с сайтом на поверхности пептида, ответственным за взаимодействие с мицеллой DPC (Рис. 3.25Г).

ГЛАВА 4 Исследование линейных каналообразующих антибиотиков Aam-I и Zrv-IIB

Пептаиболы[1] – уникальные антибиотические пептиды, продуцируемые почвенными полупаразитическими грибами родов *Emericelopsis*, *Trichoderma* и родственных им [398]. Эти пептиды продуцируются нерибосомальным способом [248] и содержат большое количество нестандартных α,α-диалкилированных аминокислот, например, Aib (U, α-аминоизомасляная кислота), ацетилированный *N*-конец и *C*-концевой аминоспирт (Рис. 4.1) [399]. Пептаиболы состоят из 5-20 остатков и часто содержат *имино*кислотные остатки, такие как Pro (пролин) или Hyp (O, L-4-транс-гидроксипролин). Общая гидрофобность этих пептидов и способность образовывать амфифильные спиральные структуры в биологических мембранах придает пептаиболам мембранную и антибиотическую активности [197].

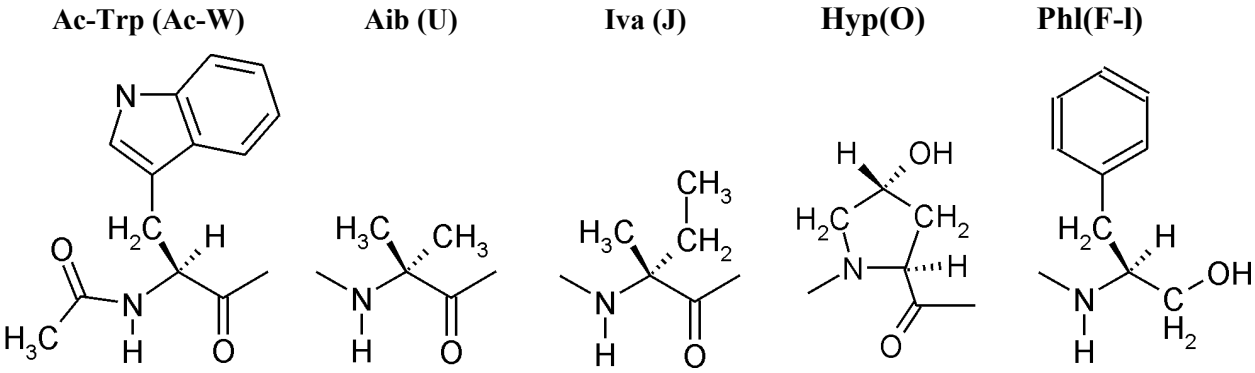


Рис. 4.1. Нестандартные остатки, встречающиеся в молекулах пептаиболов. Слева направо: ацетилированный триптофан (Ac-Trp, AC-W), α-аминоизомасляная кислота (Aib, U), D-изовалин (α-этил аланин, Iva, J), L-4-транс-гидроксипролин (Hyp, O), L-фенилаланинол (Phl, F-l).

В настоящее время известно более 300 пептаиболов. Последовательности всех этих пептидов вместе с имеющимися пространственными структурами высокого разрешения собраны в базе данных пептаиболов (http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol) [399]. Аминокислотные последовательности некоторых пептидов этого семейства приведены в Табл. 4.1. В природе они встречаются в виде сложных смесей родственно близких молекул, часто отличающихся друг от друга заменой одной или двух аминокислот [398]. По длине аминокислотной последовательности пептаиболы можно условно разбить на два больших класса: «длинные», содержащие 20-18 аминокислот, например, аламетицин и «короткие», содержащие 11-16 остатков, например, зервамицин и антиамебин. Кроме пептаиболов грибы синтезируют множество пептаибиотиков (peptaibotics), – биологически активных вторичных метаболитов, содержащих остатки Aib [400]. К ним относятся и липопептаиболы – короткие пептиды (5-11 остатков), содержащие короткую

[1] Термин «пептаиболы» происходит от сокращения соответствующего английского названия: “peptides containing both an Aib residue and a *C*-terminal amino alcohol” – peptaibols.

липидную цепь на *N*-конце молекулы [401], например, трихогин, содержащий октаноил.

Пептид	Последовательность	Литература
Зервамицин		[402–404]
Zrv-IIB	AcW^{1}I**Q**J^{4}I**T**UL^{8} U**OQ**U^{12}OUP^{15}**Phl**	
Zrv-IIA	AcW I**Q**U I**T**UL U**OQ**U OUP **Phl**	
Zrv-IC	AcW I**E**J I**T**UL U**OQ**U OUP **Phl**	
Zrv-Leu1	AcL I**Q**J I**T**UL U**OQ**U OUP **Phl**	
Другие варианты	F V V V P J J	
Антиамебин/Цефаибол		[402,404,405]
Aam-I	AcF^{1}UUU^{4}J**G**LU^{8} U**OQ**J^{12}OUP^{15}**Phl**	
Cpb-A	AcF UUU U**G**LJ U**OQ**J OUP **Phl**	
Cpb-B	AcF UUU J**G**LJ U**OQ**J OUP **Phl**	
Cpb-C	AcF UUU U**G**LJ U**OQ**U OUP **Phl**	
Другие варианты	V AAJ VA A P L	
Аламетицин		[163,197]
Alm-Rf50	AcUPUAU^{5}A**Q**U^{8}VU**G**L^{12}UPVU^{16}U**QQ**^{19}**Phl**	
Alm-Rf30	AcUPUAU^{5}A**Q**U^{8}VU**G**L^{12}UPVU^{16}U**EQ**^{19}**Phl**	
Другие варианты	AGSUA U**E** LAAV A AV A**E** **L-l** AG G I U J **V-l** A U V **I-l** A	
Спин-меченые аналоги Zrv-IIA, использованные в работе		
Zrv-T16	AcW^{1}I**Q**U^{4}I**T**UL^{8} U**OQ**U^{12}OUP^{15}**CT**	
Zrv-T0	**NT**W I**Q**U I**T**UL U**OQ**U OUP **Phl**	
Спиновые метки	4-карбокси-TEMPO (NT) 4-амино-TEMPO (CT)	



Табл. 4.1. Последовательности некоторых пептаиболов из семейств Зервамицина (Zrv), Антиамебина (Aam), Цефаибола (Cpb) и Аламетицина (Alm), а также спин-меченые аналоги Zrv-IIA, использованные в работе. Полярные остатки и остатки Gly показаны жирным шрифтом. Мотив, ответственный за спираль-изгибающие движения в аламетицине, и гомологичные мотивы в других пептидах, показаны серым цветом.

Со структурной точки зрения пептаиболы относятся к α-спиральному классу АП, α,α-диалкилированные остатки (Aib и Iva) накладывают сильные ограничения на конформацию полипептидной цепи, делая доступными только правозакрученную или левозакрученную спиральные конформации в гидрофобном окружении. Пептаиболы более гидрофобны, чем АМП растений и животных, и в водном растворе не имеют упорядоченной структуры. Как результат, эти пептиды слаборастворимы в воде и склонны к агрегации, например, для аламетицина верхний предел растворимости составляет 20 мкМ [406]. Эти свойства делают их идеально подходящими для связывания с мембраной в конформации спирали, а чередование в аминокислотной последовательности полярных и

неполярных остатков придает спирали пептаибола амфифильность, необходимую для начального поверхностного связывания. Природа еще более усилила сродство пептаиболов к мембране, заблокировав *N*- и *C*-концевые заряды основной цепи пептида. В большинстве случаев пептаиболы электрически нейтральны или несут один отрицательный заряд в *C*-концевой части молекулы, что отличает их от катионных АМП животных. Это, вероятно, указывает на различия в организации как мембран организмов-продуцентов АМП (грибы, животные), так и на различия в организации мембран клеток-мишеней, на которые нацелены эти пептиды.

Пептаиболы очень активны против грамположительных микроорганизмов [407,408], против бактерий класса *Mollicutes* (включая микоплазмы и спироплазмы) [166], а также против различных экзо- и эндо- паразитов, таких как амебы [409], малярийный плазмодий [410], гельминты [404,411] и нематоды [412]. Кроме того, некоторые пептаиболы обладают цитотоксической (противоопухолевой) [412] и нейролептической (по отношению к млекопитающим) [232,413] активностями. Основная природная функция этих пептидов связана с микопаразитизмом и защитой растений от патогенов. Пептаиболы, продуцируемые грибами симбионтами растений, вероятно, участвуют в разрушении клеточных стенок фитопатогенных грибов [414,415], в усилении вторичного метаболизма у растений [416], а также в защите растений от вирусов и бактерий [417,418].

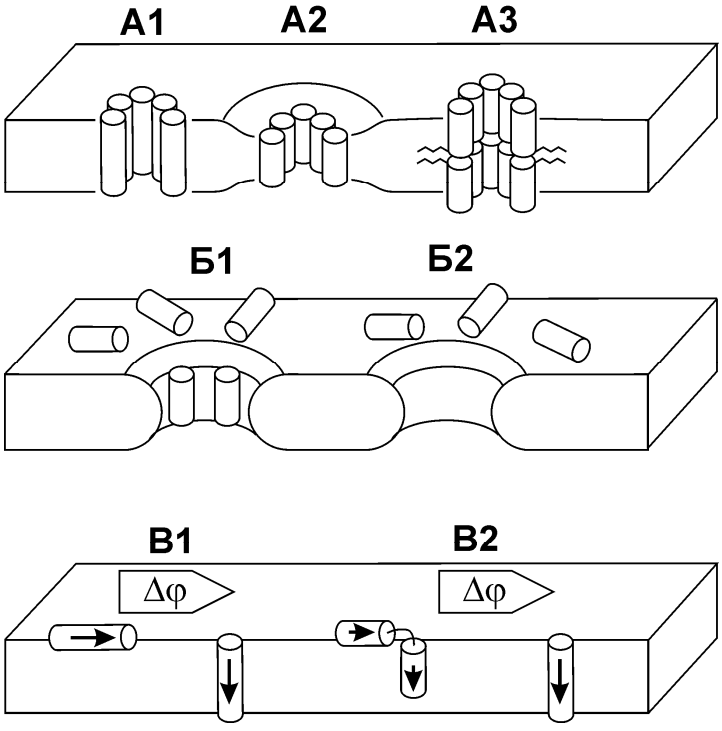


Рис. 4.2. Модели образования каналов пептаиболами.
А1 – Исходная BS-модель [205,206,210]. А2 – Модифицированная BS модель, включающая в себя эффект hydrophobic matching [419]. А3 – Модифицированная BS модель, включающая в себя олигомеризацию коротких пептидов по принципу *N*-конец к *N*-концу [420].
Б1 – Модель образования тороидальных пор, ковровый механизм [15,183,207]. Б2 – Модель дестабилизации бислоя и образования тороидальных пор свободно диффундирующими пептидами [421,422].
В – Модели потенциалозависимой активации каналов пептаиболов. В1 – Модель переориентации жесткого спирального диполя [205,231]. В2 – Модель конформационных изменений [210,423].

Биологические свойства пептаиболов коррелируют с каналообразующей активностью в модельных мембранных системах. Каналы, образованные этими пептидами, обладают рядом интересных свойств: несколькими хорошо определенными

уровнями проводимости, катион-анионной селективностью и потенциалозависимостью [163]. Это позволяет рассматривать пептаиболы как простые модели для потенциалозависимых ионных каналов [163]. В настоящее время общепринятой моделью для описания каналов, формируемых пептаиболами является модель связки спиралей (barrel stave model, BS модель), в рамках которой каналы образуются из разного числа спиральных мономеров наподобие сборки бочонка из дощечек (Рис. 4.2A1,A2). Вероятно, именно способность образовывать ионные каналы в мембранах клеток-мишеней лежит в основе антибиотического действия этих пептидов [197].

Два структурных подсемейства пептаиболов, состоящих из 16 аминокислотных остатков (Табл. 4.1), представлены тремя группами пептидов: зервамицинами (Zrv) [402,403], антиамебинами (Aam) [402,405] и цефаиболами (Cpb) [404]. Аминокислотные последовательности пептидов из двух семейств значительно отличаются (Табл. 4.1). *N*-концевой фрагмент зервамицинов (остатки 1-8) содержит в основном обычные L-α-аминокислотные остатки с регулярным чередованием полярных и гидрофобных групп. В то время как *N*-концевые фрагменты антиамебинов и цефаиболов в основном включают в себя ахиральные (Aib, Gly) и D- (Iva) остатки. *C*-концевые регионы (остатки 9-16) пептидов обоих подсемейств практически идентичны и включают в себя три Aib/Iva-Pro/Hyp структурных мотива. Репрезентативными представителями этих двух пептидных семейств являются Зервамицин-IIB (Zrv-IIB) и Антиамебин-I (Aam-I).

Биологические и функциональные свойства пептидов из двух подсемейств значительно разнятся. С одной стороны, Zrv-IIB несмотря на небольшую длину (16 остатков), проявляет биологическую [407,410,424] и каналообразующую [163,425–427] активности, сравнимые с активностью длинных (наиболее активных) пептаиболов, например, аламетицина (Alm, 20 остатков). В модельных мембранных системах (БЛМ [163,425] и везикулы [426,427]) Zrv-IIB формирует потенциалозависимые ионные каналы с характерным набором из десятков уровней проводимости, соответствующим предсказаниям BS модели.

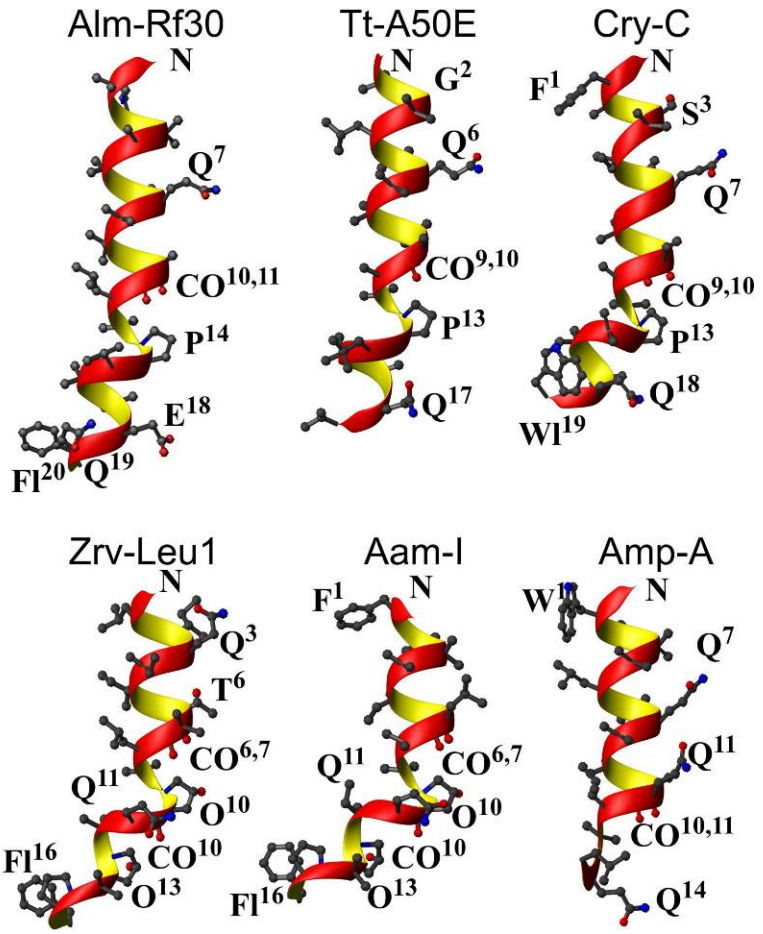
С другой стороны, в ходе сравнительного исследования противомалярийной активности коротких пептаиболов было показано, что антиамебин примерно в десять раз менее активен, чем зервамицин (IC_{50} ~ 6.2 и 0.5 мкМ) [410]. Кроме того, антиамебин демонстрирует на порядок меньшую (EC_{50} ~ 125 мкМ) гемолитическую активность, чем длинные пептаиболы [428]. В модельных мембранных системах проводимость, вызванная Aam-I, демонстрирует слабую потенциалозависимость и имеет дополнительную потенциалонезависимую компоненту [429–431]. Несмотря на кажущуюся большую гидрофобность, Aam-I обладает значительно более низким сродством к липидным

везикулам, чем Zrv-IIB [431]. Из-за очень слабой и атипичной каналообразующей активности применимость BS модели для описания мембранного действия антиамебина находится под вопросом [429,430]. Более того, в ряде работ для объяснения потенциалонезависимой проводимости высказывалось предположение о том, что Aam-I переносит катионы через мембрану по механизму ионофора-переносчика, а не формирует каналы согласно BS механизму [429,430].

Несмотря на различия в функциональной активности, пространственные структуры различных вариантов зервамицина (Zrv-Leu1, код CSD[1] KIYPUD) [403,432] и антиамебина/цефаибола (Aam-I, Cpb-A, Cpb-B, Cpb-C, коды PDB: 1JOH, 1OB4, 1OB6, 1OB7, код CSD FEJQOA) [429,433,434], определенные методом рентгеновской кристаллографии, демонстрируют значительное сходство. Оба класса пептидов в кристалле формируют правозакрученные спирали с изгибом (~30° - 50°) на остатке Hyp10 (Рис. 4.3). При этом *N*-концевые фрагменты пептидов (остатки 1-8) формируют α-спираль, а *C*-концевая часть молекулы имеет конформацию спирали, образованной последовательностью β-изгибов. Эта спиральная конформация, так называемый «β-bend ribbon spiral», структурно соответствует 3_{10}-спирали с пропущенными водородными связями на остатках Pro(Hyp) [435–437]. В то же время исследования антиамебина в растворе выявило необычные структурные свойства пептида. Так, КД-спектр пептида в метаноле указал на отсутствие спиральной конформации [428] (также см. п. 4.1.1.2), а $^{13}C^{\beta}$ сигналы метильных групп остатков Aib в *N*-концевой части пептида имели практически совпадающие химические сдвиги [428,438]. Для объяснения этих свойств была предложена структура Aam-I в метаноле, в которой *N*-концевая спираль пептида имеет левую закрутку (PDB 1GQ0) [438]. Аналогичные выводы были сделаны в ходе более раннего исследования антиамебина в DMSO [439].

Несмотря на более низкую биологическую и мембранную активность антиамебина, пептиды этого подсемейства широко распространены в различных грибах родов *Cephalosporium*, *Emericellopsis*, *Gliocladium*, и *Stilbella* (например, *Emericellopsis Minima*) [405]. Более того, существуют штаммы, например, копрофильный гриб *Stibella erythrocephala*, для которых синтез аналогов антиамебина является основным абиотическим механизмом, используемым для подавления развития конкурирующих видов грибов [440]. В то же время, пептиды семейства зервамицина широко распространены в других представителях рода *Emericellopsis*. Например, Zrv-IIB является основным компонентом смеси пептаиболов, продуцируемой грибом *Emericellopsis salmosynnemata* [402,424].

[1] CSD, Кембриджская структурная база данных; PDB, база данных структур белков



Пептид	N	Последовательность	L	Lα
Alm-Rf30 [210]	20	Ac-UPUAUAQUVUGLUPVUUEQF-l	31.9-33.7Å	20-29^0
Tt-A50E [441]	18	Ac-UGULUQUUUAAUPLUUQV-l	27.8-30.4Å	28-34^0
Cry-C [442]	19	Ac-FUSUJLQGUUAAUPUUUQW-l	29.9Å	37.8^0
Zrv-Leu1 [403,432]	16	Ac-LIQJITULUOQUOUPF-l	28.6Å	26-47^0
Aam-I [429,433,434]	16	Ac-FUUUJGLUUOQJOUPF-l U J U	26.8-30.3Å	32-46^0
Amp-A [443]	15	Ac-WAUULUQUUUQLUQL-l	26.5Å	-

Рис. 4.3. Пространственные структуры пептаиболов. Аламетицин-Rf30 (Alm-Rf30), трихотоксин-A50E (Tt-A50E), хрисоспермин-C (Cry-C), Leu-зервамицин (Zrv-Leu1), цефаибол, антиамебин-I (Aam-I), ампуллоспорин-A (Amp-A). Структуры показаны в ленточном представлении, также показаны боковые цепи и экспонированные карбонильные группы, полярные и ароматические боковые цепи подписаны. Последовательности пептидов, длина молекул (L) и угол изгиба спирали (Lα) приведены под рисунком.

Исследование структуры и динамики молекул пептаиболов, а также связи между структурой и активностью этих пептидов имеет чрезвычайную важность как для решения фундаментальной задачи медицины, – поиска (создания) новых антибиотических агентов на основе природных антимикробных пептидов, так и для решения фундаментальной задачи биотехнологии, – создания новых агентов (например, на основе грибов рода *Trichoderma*) для биоконтроля растительных патогенов [444]. Кроме того, структурные исследования пептаиболов чрезвычайно важны для решения ряда фундаментальных задач биофизики: (1) определения механизмов действия мембраноактивных антимикробных

пептидов, (2) описания структуры и механизмов работы ионных каналов на молекулярном уровне.

В данном разделе диссертационной работы описаны результаты сравнительного структурно-динамического исследования Zrv-IIB и Aam-I в изотропных (растворы органических растворителей с низкой полярностью) и анизотропных (мицеллы, бицеллы и липид-белковые нанодиски) мембраномоделирующих средах. **Целью исследования** являлось выявление принципов структурной организации спиральных мембраноактивных антимикробных пептидов и изучение взаимосвязи между структурой, динамикой и активностью подобных пептидов. В работе планировалось изучить зависимость структуры и динамики спиральных АП от свойств мембраномоделирующей среды, а также описать взаимодействия, стабилизирующие пространственную структуру и определяющие топологию комплексов АП/мембрана.

В рамках работы были поставлены следующие задачи:

1. Методами ЯМР-спектроскопии исследовать структуру и динамику Zrv-IIB в органических растворителях (метанол, смеси хлороформ-метанол и метанол-вода) и анизотропной мембраномоделирующей среде, – мицеллах DPC. Определить топологию комплекса Zrv-IIB/мицелла DPC.
2. Методами ЯМР-спектроскопии исследовать структуру и динамику Aam-I в органическом растворителе метаноле и в анизотропных мембраномоделирующих средах – бицеллах, мицеллах и липид-белковых нанодисках. Определить топологию комплекса Aam-I/бицелла и Aam-I/мембрана ЛБН.
3. Используя полученные данные, разработать модели, описывающие механизм мембранной активности зервамицина и антиамебина, и выявить структурные детерминанты, ответственные за наблюдаемые различия в биологической и мембранной активностях этих пептаиболов. Определить возможную роль внутримолекулярной подвижности (динамики) в функционировании спиральных мембраноактивных антимикробных пептидов.

Первичные структуры пептидов, использованных в работе, приведены в Табл. 4.1. Все пептиды были любезно предоставлены руководителем учебно-научного центра ИБХ РАН д.х.н. Овчинниковой Т.В. и Складневым Д.А. (ГосНИИ «Генетика»)

4.1 Пространственная структура и динамика Zrv-IIB в органических растворителях и мицеллах DPC[1]

4.1.1 Качественный анализ структуры Aam-I и Zrv-IIB в воде и мембраномоделирующих средах по данным ЯМР- и КД-спектроскопии. Выбор сред для исследования

4.1.1.1 Растворимость и возможная структура пептаиболов Aam-I и Zrv-IIB в воде по данным ЯМР-спектроскопии

Несмотря на большую гидрофобность молекул пептаиболов, использование ^{15}N-меченых аналогов Aam-I и Zrv-IIB, а также ЯМР-спектрометра, оснащенного датчиком с увеличенной чувствительностью типа cryoprobe, позволило измерить ^{15}N-HSQC спектры пептидов непосредственно в водной среде (10 мМ NaAc буфер, pH 5.2) (спектры показаны на Рис. 4.18А и 4.4А, соответственно). Сравнение полученных спектров показало, что, несмотря на кажущуюся большую гидрофобность, Aam-I значительно более растворим в воде, чем Zrv-IIB. Максимально достижимые концентрации пептидов в растворе, определенные методом ЯМР были равны ~ 30 и 4 мкМ, соответственно. Кроме того, качественный анализ спектров, полученных в водной среде и в различных мембраномоделирующих окружениях, указал на, возможно, значительные изменения в конформации пептидов (см. Рис.4.18 и 4.4)

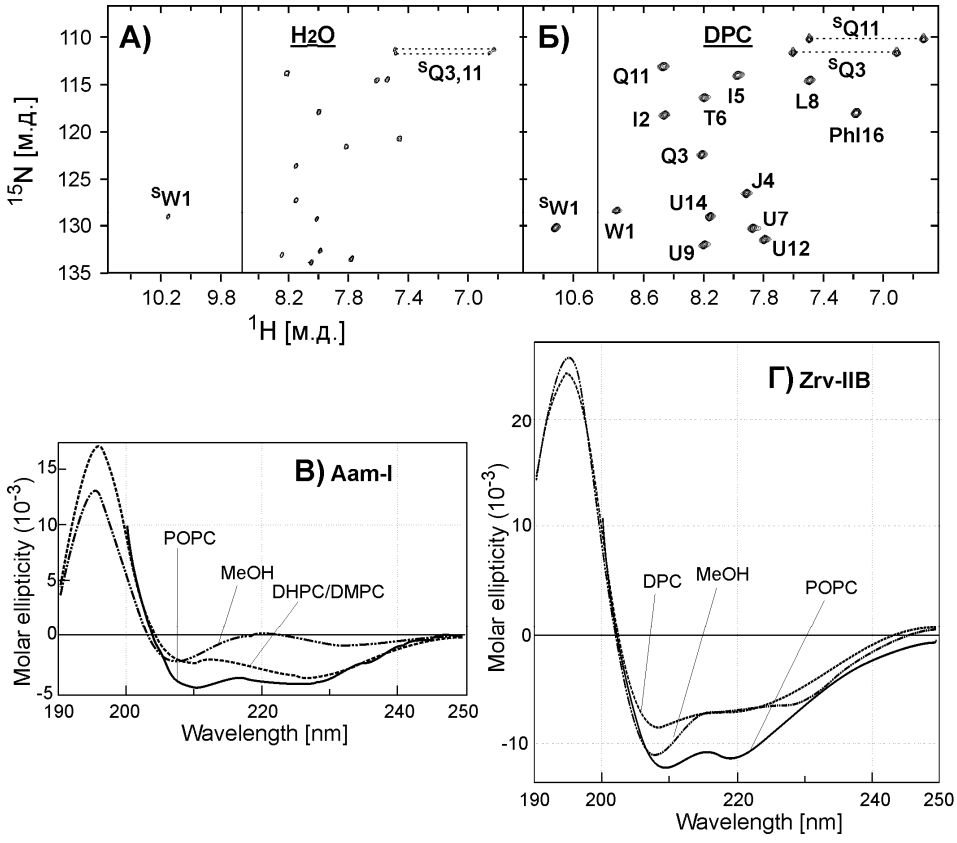


Рис. 4.4. 2D ^{1}H,^{15}N-HSQC спектры Zrv-IIB в воде (А) и мицеллах DPC (Б). (40ºС, 10 мМ NaAc буфер, pH 5.2).
(В) КД-спектры Aam-I в метаноле (2 мМ), бицеллах DMPC/DHPC (2 мМ, DMPC:DHPC = 4:1, P:L = 1:100) и в везикулах POPC (2 мМ, P:L = 1:100).
(Г) КД-спектры Zrv-IIB в метаноле (2 мМ), мицеллах DPC (2 мМ, P:L = 1:100) и в везикулах POPC (0.4 мМ, P:L = 1:500).
Из-за повышенного светорассеяния спектры в везикулах измеряли до 200 нм.

[1] Результаты исследования структуры и динамики Zrv-IIB (пункты 4.1.2-4.1.5) были получены в рамках кандидатской диссертации Шенкарева З.О. (2005 г.)

Бо́льшая растворимость Aam-I хорошо соотносится со сравнительно низким сродством пептида к поверхности липидных везикул, которое было отмечено ранее [431]. Наблюдаемые различия, возможно, вызваны, разными динамическими свойствами пептидов (см. ниже). Как показано в Разделе 4.2, *N*-концевой фрагмент молекулы Aam-I (остатки 1-8) в различных средах способен совершать переходы (в некоторых случаях кооперативные) между правозакрученной и левозакрученной спиральной конформациями. Молекулы воды, вероятно, стабилизируют промежуточные стадии этого обменного процесса путем гидратации амидных групп основной цепи пептида, что ведет к эффективному уменьшению общей гидрофобности и увеличению растворимости молекулы. В противоположность этому, наличие больших гидрофобных участков на поверхности «жесткой» правозакрученной спирали Zrv-IIB (см. п. 4.1.2-4.1.5), вероятно, вызывает агрегацию пептида и, соответственно, уменьшает его растворимость.

4.1.1.2 Конформация Aam-I и Zrv-IIB в мембраномоделирующих средах по данным КД-спектроскопии

Низкая растворимость пептидов в воде, а также неспособность водной среды поддерживать пространственную структуру пептидов, близкую к наблюдаемой в биологической мембране, требует использования мембраномоделирующих сред для исследования структуры и динамики Aam-I и Zrv-IIB. Однако среды, содержащие бислойную липидную мембрану, например, в форме везикул, из-за большого размера не подходят для структурных исследований методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения. В то же время метод КД-спектроскопии позволяет провести качественное сравнение конформации пептидов в везикулах и других (более подходящих для ЯМР) мембраномоделирующих средах. Следует учесть, что КД-спектр правозакрученной спиральной ($\alpha/3_{10}$) конформации имеет очень большую интенсивность, в то время как процессы обмена между спиральными конформациями с различным направлением закрутки (которые могут наблюдаться в молекулах пептаиболов) должны приводить к уменьшению интенсивности КД-спектра.

На рисунке 4.4B показаны КД-спектры Aam-I, полученные в маленьких моноламелярных липосомах (SUV) POPC, метаноле (изотропном растворителе с низкой полярностью) и бицеллах DMPC/DHPC (1:4, анизотропной мембраномоделирующей среде). Сравнение спектров показало, что солюбилизация пептида в метаноле ведет к значительному уменьшению интенсивности сигнала КД. При этом в спектре наблюдались две отрицательные полосы на ~ 205 и 230 нм и положительная полоса на ~ 195 нм. Общий вид спектра значительно отличался от канонического спектра спиральной конформации и был похож на спектр пептидов, имеющих конформацию правозакрученной спирали,

сформированной последовательностью β-изгибов (β-bend ribbon spiral) [437,445]. В то же время КД-спектр Aam-I в окружении DMPC/DHPC бицелл был более похож на спектр пептида в липосомах. В спектре наблюдалось две отрицательные полосы на ~ 205 и 220 нм и положительная полоса на ~ 195 нм, совпадающие с полосами, наблюдаемыми в спектрах правозакрученной α- или 3_{10}-спирали [446].

Полученные данные позволяют предположить, что *N*-концевой сегмент Aam-I в растворе метанола может совершать флуктуации между различно закрученными спиральными конформациями, и вклады этих состояний в общий КД-спектр пептида взаимно уничтожаются. Вероятно, общий вид КД-спектра Aam-I в метаноле в основном определятся вкладом от *C*-концевого сегмента, имеющего конформацию β-bend ribbon spiral. В то же время взаимодействие пептида с поверхностью липидных везикул или анизотропного мембранного миметика ведет к стабилизации правозакрученной спиральной конформации Aam-I. Эти предположения были экспериментально подтверждены в ходе дальнейших ЯМР-исследований пептида (п. 4.2).

На рисунке 4.4Г показаны КД-спектры Zrv-IIB, полученные в SUV POPC, метаноле и мицеллах DPC. Сравнение спектров показало, что пептид имеет правозакрученную спиральную конформацию во всех этих средах, и взаимодействие с липидной мембраной ведет лишь к небольшой стабилизации его структуры. Большая амплитуда КД-спектра Zrv-IIB (по сравнению с Aam-I) может объясняться меньшим содержанием ахиральных аминокислотных остатков в его последовательности (Табл. 4.1).

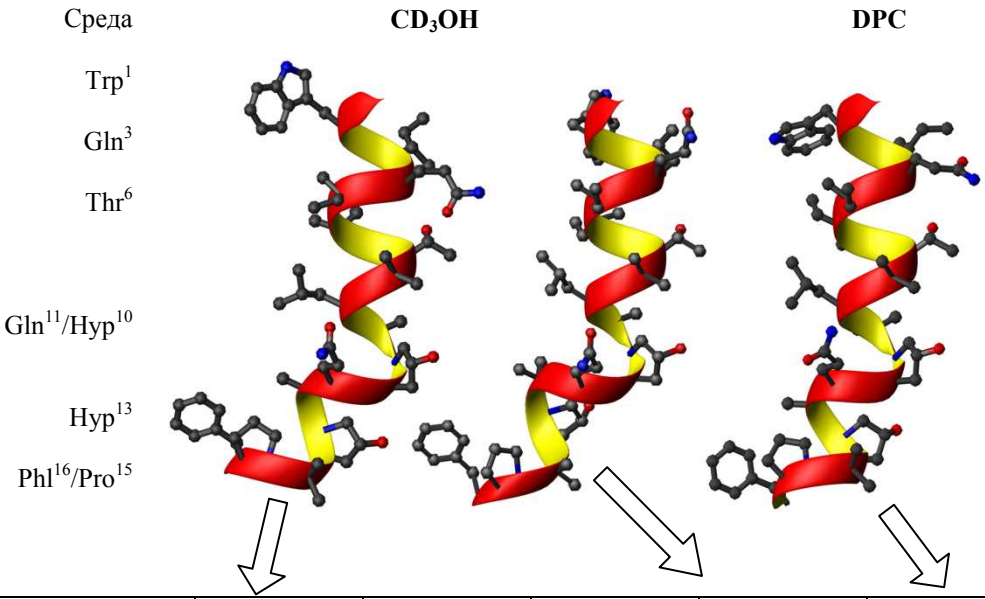
Для последующего ЯМР-исследования Zrv-IIB в качестве мембраномоделирующих сред были использованы: органические растворители различной полярности (метанол, смеси хлороформ-метанол и метанол-вода) и мицеллы DPC. Для исследования Aam-I использовали метанол, бицеллы DMPC/DHPC, мицеллы различных детергентов и ЛБН различного липидного состава.

4.1.2 Пространственная структура Zrv-IIB в органических растворителях с низкой полярностью [1]

Полное отнесение ^{1}H сигналов для Zrv-IIB в метаноле получено по стандартной процедуре, используя DQF-COSY, TOCSY и NOESY спектры. Наличие одного набора сигналов в спектрах указывало на отсутствие примесей и *cis*-*trans*-изомеров пептидных связей Xaa-Pro. *Trans*-ориентация пептидных связей Aib9-Hyp10, Aib12-Hyp13 и Aib14-Pro15 была установлена на основании наблюдения характеристических контактов ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) в NOESY спектрах. Анализ констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) и интенсивностей ЯЭО (по методике, предложенной в

[1] Исследование проводили с использование немеченого аналога пептида.

[447]) показал, что пирролидиновые кольца остатков Hyp10 и Hyp13 имеют *Up* конформацию, а кольцо Pro15 находится в усредненном *Twist* состоянии. Анализ КССВ $^3J_H{}^{\alpha}{}_H{}^{\beta}$ и $^3J_{NH}{}^{\beta}$ показал, что наиболее заселенный ротамер боковых цепей остатков Gln3, Leu8, Gln11 и Phl16 имеет угол $\chi 1 = -60^0$, в то время как боковые цепи Trp1, Ile2 и Ile5 свободно вращаются вокруг C^{α}-C^{β} связи.



Параметр/Тип/Единицы	Zrv0	ZrvI	ZrvII	ZrvIII	ZrvM
Структуры, рассчитанные/ минимизированные/ отобранные для анализа	100 20 20	1000 420 20	1000 420 20	1000 420 20	100 20 20
Штрафная функция ($Å^2$) Программа DYANA	0.02±0.01	0.07±0.02	0.07±0.01	0.08±0.04	0.02±0.01
Отнесенные пики ЯЭО	355	355	355	355	536
Ограничения на расстояния	129	129	129	129	174
верхние/нижние	19	19	19	19	29
Ограничения на	4	7	6	6	7
водородные связи,	4	3	4	3	3
$\alpha/3_{10}$/биф				1	
Ограничения на	8	8	8	8	8
торсионные углы ϕ/χ^1	4	4	4	4	3
Энергия ECEPP/2		-55.5±5.5	-58.2±3.9	-72.0±2.6	
(кКал/Моль) средн./мин.		-67.0	-66.1	-77.3	
СКО атомных координат	0.27±0.12			0.13 ± 0.04	0.20 ± 0.06
(Å) осн. цепь/тяж. атомы	1.48±0.29			1.12 ± 0.33	1.24 ± 0.33
Длина молекулы (L, Å)	22.3 – 26.2			24.5 – 28.1	26.0 - 26.8
Угол изгиба (Lα, градусы)	39 - 55			30 – 39	16 – 23
PDB код	1DLZ			1R9U	1IH9

Рис. 4.5. Пространственные структуры Zrv-IIB и структурная статистика, полученные в различных средах, моделирующих биологическую мембрану.

Сводка данных ЯМР, полученных для Zrv-IIB в метаноле, представлена на Рис. 4.6A, а структурная статистика и полученная структура на Рис. 4.5, колонка Zrv0. Молекула представляет собой правозакрученную спираль, изогнутую на Hyp^{10} под углом ~ 43^0. Спираль пептида имеет длину порядка 24 Å. Все полярные боковые группы сосредоточены на одной (выпуклой) стороне спирали, а гидрофобные боковые группы формируют вогнутую сторону. Полярная сторона дополнительно усилена

экспонированными CO-группами остатков Aib7, Hyp10, и HN группой Aib14, которые не участвуют в формировании внутримолекулярных водородных связей. Концы спирали также полярны из-за наличия CO- и HN-групп, не участвующих в формировании водородных связей. *N*-конец молекулы представляет собой α-спираль, а *C*-конец – спираль, сформированную последовательностью β-изгибов (β-bend ribbon spiral, 3_{10}-спираль с пропущенными водородными связями на остатках Pro/Hyp), молекула заканчивается витком α-спирали.

Необходимо отметить, что система водородных связей в спирали не может быть точно определена по данным спектроскопии ^{1}H-ЯМР. Так, в рамках полученной структуры необъяснимыми остались низкие температурные коэффициенты у HN-групп Gln^{3} и Aib^{14} (Рис. 4.6А). Более того, хотя характеристические ЯЭО-контакты и указывают на тип спирали в молекуле, эти результаты не могут считаться однозначными.

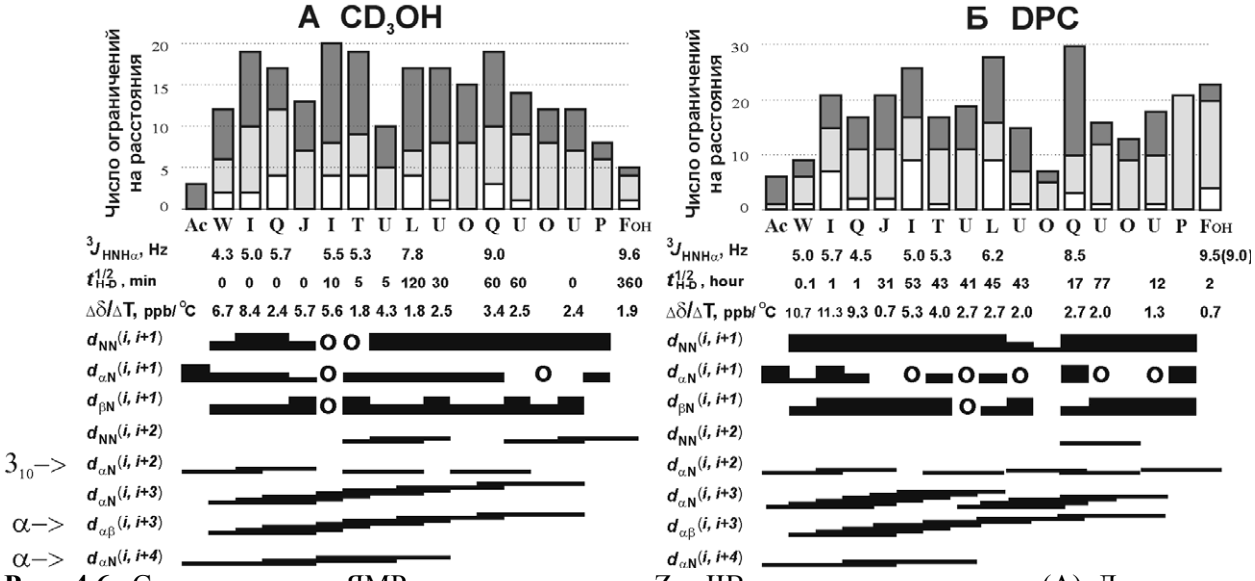


Рис. 4.6. Сводка данных ЯМР, полученных для Zrv-IIB в различных средах. (А) Данные для пептида в метаноле, концентрация 10 мМ (pH 5.8; 30^{0}C). (Б) Данные для пептида в растворе DPC мицелл, концентрация 1.8 мМ (pH 4.8; 30^{0}C). Карта ЯЭО контактов построена на основании NOESY спектров с τm 200 мс (метанол) и 100 мс (мицеллы). Число ограничений на расстояние показано для каждого остатка на верхних частях рисунков. Белым, серым и черным цветом показаны соответственно внутриостаточные, последовательные и средней дальности ($1<|i-j|\leq 4$) ЯЭО-контакты. Далеких ЯЭО-контактов в спектрах не наблюдалось. Значения КССВ $^{3}J_{HNH}\alpha$, температурные коэффициенты химических сдвигов амидных протонов основной цепи и времена H-D полуобмена (0 обозначает время полуобмена меньше 5 минут) показаны в соответствующих строках. Времена H-D полуобмена для пептида в метаноле показаны в минутах, а в мицеллах в часах. Слева отмечены ЯЭО-контакты, наличие которых позволяет сделать вывод о типе спирали в молекуле.

Один из важных вопросов о структуре зервамицина касается ориентации и подвижности боковой цепи Gln11. В моделях каналов, образованных зервамицином, эта боковая цепь играет важную роль в стабилизации спиральной связки и участвует в прохождении ионов через пору [432,448]. Наличие кросс-пика ЯЭО с положительной интенсивностью (свойственной маленьким, быстро вращающимся молекулам) между

протонами $C^{\gamma}H_2$ и $CONH_2$ групп боковой цепи Gln11 указывает на большую подвижность этой боковой цепи вокруг связей C^{β}-C^{γ} или C^{γ}-C^{δ}.

Метанол моделирует лишь малую часть свойств мембраны, это изотропный раствор с низкой полярностью, в то время как мембранное окружение анизотропно. Более того, при образовании каналов из связок мономеров пептид оказывается еще в более гетерогенном окружении, образованном жирными цепями и полярными головками липидов, соседними пептидами и молекулами воды и ионами, заполняющими пору. С целью проследить конформационные изменения, возникающие в молекуле Zrv-IIB при изменении полярности окружения, структура этого пептида была исследована в бинарных растворах различной полярности от смеси CD_3OH/H_2O (1:1, v/v) до смеси $CDCl_3/CD_3OH$ (9:1, v/v). Выход за эти пределы делал пептид нерастворимым.

Для Zrv-IIB во всех использованных растворах химические сдвиги алифатических и ароматических протонов, а также КССВ $^3J_{HNH}{}^{\alpha}$ и $^3J_H{}^{\alpha}{}_H{}^{\beta}$ практически не менялись. В случае амидных протонов основной цепи при переходе от метанола к смеси метанол/хлороформ (1:9, v/v) значительный сдвиг в сильное поле наблюдался только для экспонированных в растворитель HN-групп Trp1 и Ile2 (около 0.7-0.5 мд) и в меньшей степени для HN-групп Gln3, Iva4 и Aib14 (0.2-0.1 мд). Все остальные HN-группы демонстрировали изменение химического сдвига меньшее, чем 0.05 мд. Детальное сравнение 200 мс NOESY спектров в метаноле, смеси метанол/вода (1:1, v/v) и смеси метанол/хлороформ (1:9, v/v) не выявило значительных изменений в системе кросс-пиков ЯЭО.

Таким образом, в отличие от других пептаиболов, таких как аламетицин [449], хрисоспермин [450] и Aam-I (см. п. 4.2.1), Zrv-IIB имеет определенную структуру в метаноле, и эта структура сохраняется при значительном изменении полярности раствора, что говорит о ее большой стабильности.

4.1.3 Исследование $^{13}C,^{15}N$-меченого Zrv-IIB в метаноле

4.1.3.1 ЯМР-характеризация $^{13}C,^{15}N$-меченого Zrv-IIB и отнесение метильных групп остатков Aib

Полное отнесение ^{13}C и ^{15}N сигналов пептида было осуществлено, используя полученное ранее отнесение ^1H сигналов. Индексы химического сдвига (CSI) для ядер $^1H^{\alpha}$, $^{13}C^{\alpha}$ и ^{13}CO стандартных остатков в *N*-концевой части пептида соответствовали конформации α-спирали и были в полном согласии со структурой, полученной ранее (Рис. 4.7А). Как видно из рисунка, α-спиральная часть пептида заканчивается на остатке Leu^8.

Фрагмент ^{13}C-HSQC спектра для Zrv-IIB показан на Рис. 4.7Б. Очевидно, что все ^{13}C-сигналы метильных групп остатков Aib находятся в двух спектральных регионах и две

группы каждого из остатков располагаются в различных регионах. Полученное стереоспецифическое отнесение $^{13}C^{\beta}H_3$ групп остатков Aib позволило подтвердить эмпирическое правило, сформулированное на основании исследований других пептаиболов [442,450], позволяющее проводить стереоспецифическое отнесение метильных групп остатков Aib. Так, ^{13}C-сигналы pro-R $^{13}C^{\beta 2}$ метильных групп остатков Aib9, Aib12 и Aib14, находящихся перед остатками Pro/Hyp в конформации β-изгиба (β-bend ribbon spiral), и ^{13}C-сигнал pro-S $^{13}C^{\beta 1}$ метильной группы остатка Aib7, находящегося в α-спиральной конформации, были расположены в диапазоне от 27 до 29 мд, а остальные четыре группы в диапазоне от 24 до 26 мд. Следует отметить, что в работе в ходе исследования Aam-I был предложен новый подход, позволяющий напрямую оценивать заселенность правозакрученной спиральной конформации на основании анализа $^{13}C^{\beta}$ химических сдвигов остатков Aib и Iva (см. п. 4.2.1.4).

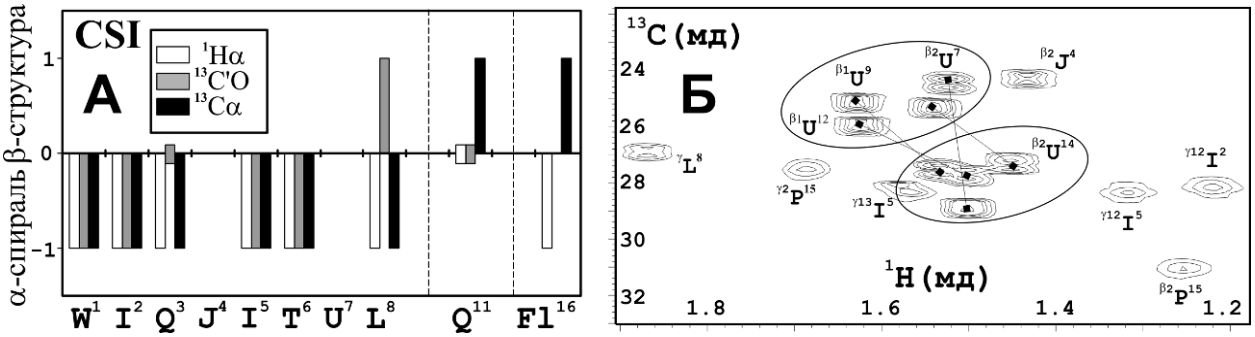


Рис. 4.7. (А) Индексы химического сдвига (CSI) для стандартных аминокислотных остатков в Zrv-IIB в метаноле. Индексы для ядер $^{1}H^{\alpha}$, $^{13}C^{\alpha}$ и ^{13}CO показаны черными, серыми и белыми прямоугольниками, соответственно. Знаки индексов для $^{13}C^{\alpha}$ и ^{13}CO изменены для удобства. Отрицательные значения обозначают спиральность. Индексы построены по алгоритму [28]. (Б) Регион метильных групп остатков Aib ^{13}C-HSQC спектра Zrv-IIB в метаноле. Показано отнесение для всех сигналов. Сигналы, принадлежащие одному остатку, соединены линией. ^{13}C-сигналы метильных групп остатков Aib расположены в двух различных спектральных регионах (обведены кружком).

4.1.3.2 Прямое наблюдение системы водородных связей в $^{13}C,^{15}N$-меченом Zrv-IIB в метаноле

В обычном ЯМР-исследовании выводы о роли отдельных HN-групп в качестве доноров водородных связей в пептиде обычно делаются на основании скоростей обмена амидных протонов на дейтерий растворителя [23] или их температурных градиентов [451]. Акцепторы водородных связей выделяются либо, используя предварительно рассчитанную структуру биомолекулы, либо на основании характерных контактов ЯЭО. Во многих случаях это приводит к невозможности определения точной системы водородных связей в спиральных белках и пептидах.

Используя $^{13}C,^{15}N$-меченые образцы биомолекул и дальний HNCO эксперимент, можно напрямую наблюдать перенос намагниченности через водородные связи типа

CO...HN, опосредованный КССВ $^{3h}J_{NC}$ [452]. Более того, величина этих констант (обычно < 1 Гц) напрямую связана с длиной водородной связи и может служить косвенной мерой ее стабильности [453]. Дальний HNCO спектр и полученная на его основе система водородных связей для Zrv-IIB в метаноле показаны на Рис. 4.8. Полученная система во многом совпадает с результатами ^{1}H-ЯМР, однако имеется несколько существенных отличий.

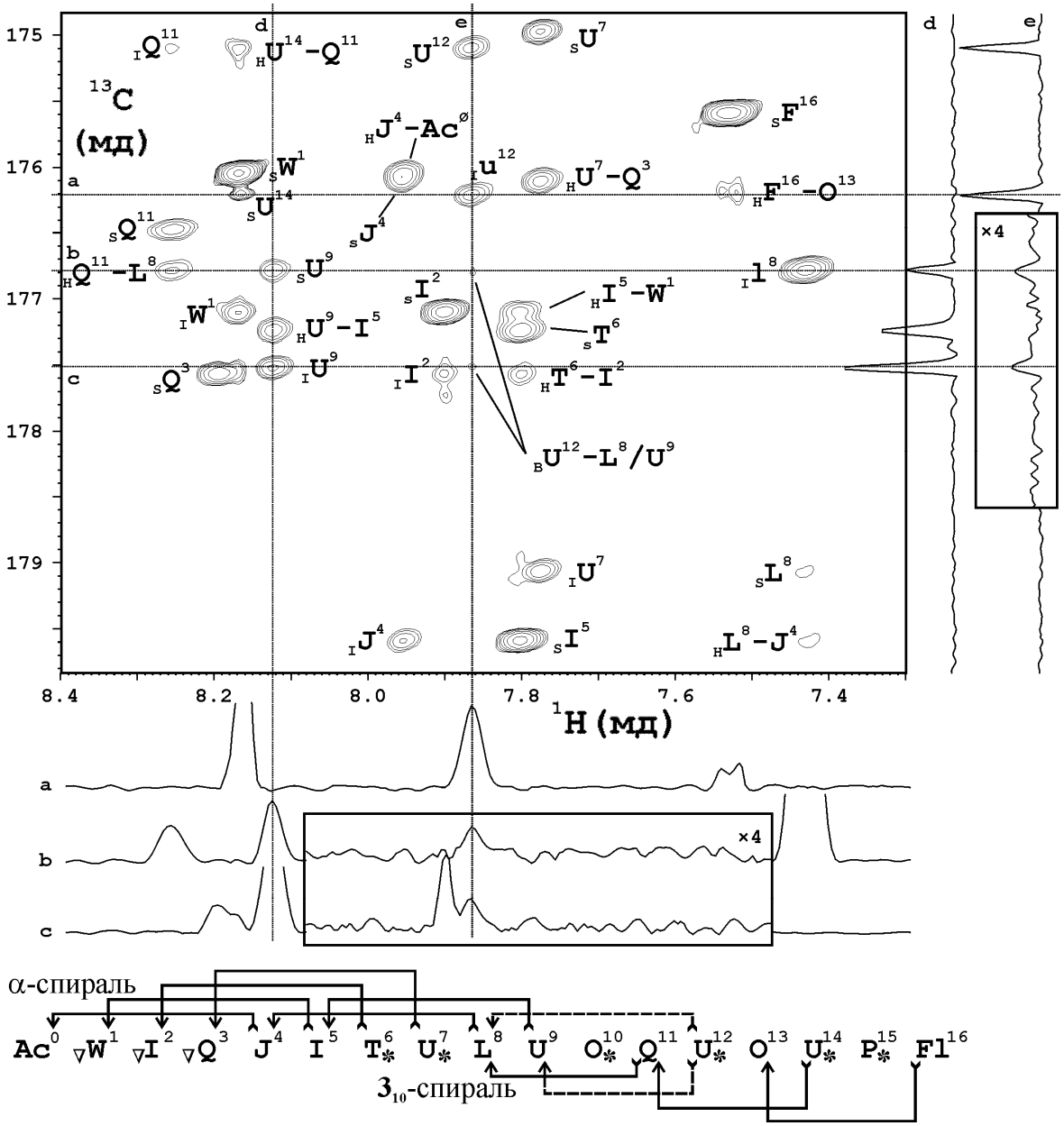


Рис. 4.8. Дальний HNCO спектр для 4 мМ Zrv-IIB в CD_3OH (pH 6.2; 32°C, Δ = 139.4 мс). Кросс-пики разделены на четыре категории: I – внутриостаточные через $^2J_{NC}$ КССВ; S – последовательные через $^1J_{NC}$ КССВ; H – через водородные связи; B – через бифуркационную водородную связь. Срезы через кросс-пики ядер, участвующих в формировании бифуркационной водородной связи, показаны снизу и справа от спектра. На нижней панели показана система водородных связей, основанная на анализе HNCO спектра. Водородные связи разделены на α-спиральные и 3_{10}-спиральные, бифуркационная водородная связь с HN Aib12 показана пунктиром. Экспонированные HN- и CO-группы показаны треугольниками и звездочками, соответственно.

N-конец пептида начинается с α-спиральной водородной связи между CO Ac0 и HN Iva4. Ранее не предполагалось, что эта HN-группа может участвовать в образовании водородной связи из-за быстрого обмена с растворителем. В то же время анализ HNCO спектра показал, что HN-протон Gln3 (также быстро обменивающийся с растворителем, но имеющий меньший температурный коэффициент, чем HN-протон Iva4) не участвует в формировании 3_{10}-спиральной водородной связи с CO Ac0 (величина $^{3h}J_{NC}$ меньше, чем предел детектирования – 0.05 Гц). Оказалось, что HN-группа Aib14 (несмотря на быстрый обмен с растворителем) формирует водородную связь с CO-группой Gln11, стабилизирующую β-изгиб. Более того, *C*-конец молекулы завершается еще одним β-изгибом с водородной связью HN Phl16 – CO Hyp13, а не витком α-спирали, как предполагалось ранее.

Таким образом, Zrv-IIB α-спирален от *N*-конца до Leu8, а *C*-конец представляет собой спираль, сформированную последовательностью β-изгибов (β-bend ribbon spiral). Подобная система водородных связей характерна для кристаллических структур 16-ти членных пептаиболов: Zrv-Leu1, Aam-I и цефаиболов [403,429,432–434].

Наиболее интересная водородная связь наблюдается в середине молекулы Zrv-IIB, в этой бифуркационной связи один донор HN Aib12 связан с двумя акцепторами CO Leu8 и CO Aib9, чему соответствуют два кросс-пика в дальнем HNCO спектре (соответствующие $^{3h}J_{NC}$ равны -0.09 и -0.08 Гц). Маленькие значения КССВ через бифуркационную водородную связь могут быть объяснены либо геометрией двух водородных связей, сформированных одновременно, либо динамическим обменом (быстрым по временной шкале ЯМР) между двумя обычными водородными связями (α ↔ 3_{10}). Такие водородные связи никогда не наблюдались в кристаллических структурах пептаиболов и очень редко встречаются в молекулах белков (4.2 % от всех водородно-связанных HN-групп [454]). Необходимо отметить, что ранее методом ЯМР не наблюдались бифуркационные водородные связи такого типа. Напротив, бифуркационные связи, соединяющие два донора с одним акцептором, встречаются довольно часто в молекулах белков (35.5 % от всех водородно-связанных CO-групп [454]).

4.1.3.3 Сила водородных связей в спирали Zrv-IIB, связь с динамическим поведением пептида

Величина КССВ через водородную связь зависит от длины связи [453] и от других геометрических параметров [455,456], например, средняя величина $^{3h}J_{NC}$ в β-структурах белков (где водородные связи обычно короче в среднем на 0.1 Å [454]) равна -0.65 Гц, а в α-спиралях (где водородные связи длиннее [454]) равна -0.38 Гц. Кроме того, величины $^{3h}J_{NC}$ значительно зависят от динамики белка или пептида [457]. Так постепенный перевод

модельного пептида из развернутого состояния в полностью спиральное путем добавления ТФЕ в водный раствор пептида, ведет к параллельному увеличению $^{3h}J_{NC}$ [458].

Средняя величина $^{3h}J_{NC}$ для Zrv-IIB (исключая бифуркационную водородную связь) равна -0.41±0.09 Гц (Рис. 4.9). Такие большие значения КССВ указывают на то, что спираль зервамицина имеет стабильность, сравнимую со стабильностью спиралей в глобулярных белках. Однако, значения $^{3h}J_{NC}$ не равномерно распределены по последовательности Zrv-IIB, на полярной стороне молекулы эти КССВ имеют меньшие величины. Более того, заметна прямая корреляция между пониженными значениями $^{3h}J_{NC}$ и обменным процессом в мкс-мс диапазоне, обнаруженным ранее на полярной стороне спирали зервамицина [459] (Рис. 4.9). Сравнение величин КССВ $^{3h}J_{NC}$ и вкладов обменного процесса (R_{EX}) в поперечную релаксацию ядер ^{15}N говорит о том, что этот обменный процесс включает в себя изменение геометрии водородных связей или перестройку системы водородных связей (например, α ↔ 3_{10} ↔ связь с растворителем) для трех HN-групп Thr6, Leu8 и Aib14. В пользу этого предположения свидетельствует влияние обменного процесса на HN-группы, находящиеся в пептидных связях с акцепторами этих водородных связей (Рис. 4.9).

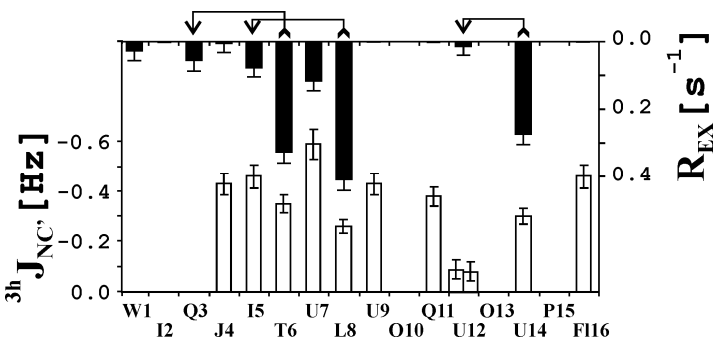


Рис. 4.9. Значения $^{3h}J_{NC}$ (Гц) через водородные связи (белые прямоугольники) и вклад обменного процесса в R_2 релаксацию ядер ^{15}N (c^{-1}) для тех же HN-групп (черные прямоугольники, данные взяты из [459]). Водородные связи, на которые влияет обменный процесс, показаны вверху рисунка.

Причины этого обменного процесса могут быть довольно сложными, однако, исследование концентрационной зависимости для Zrv-IIB в метаноле (п. 4.1.4.1) указывает на отсутствие межмолекулярных контактов между полярными сторонами спиралей мономеров зервамицина. Вероятно, наблюдаемый обменный процесс свойственен отдельной молекуле пептида. Высокая скорость обмена HN-протона Aib14 на дейтерий растворителя указывает на возможное динамическое размыкание-замыкание соответствующей водородной связи, в то время как в случае HN-групп Thr6 и Leu8 возможна динамическая перестройка системы водородных связей (α ↔ 3_{10}). В рамках этого предположения бифуркационная связь (HN Aib12 – CO Leu8, Aib9) представляет собой две одновременно сформированные водородные связи, а не динамическое переключение между двумя обычными водородными связями, так как R_{EX} для HN Aib12 очень мал (Рис. 4.9).

Наличие процесса конформационного обмена на полярной стороне спирали Zrv-IIB не противоречит ее высокой стабильности. Результаты, представленные в этом пункте свидетельствуют, что флуктуации в структуре зервамицина (если они присутствуют) соответствуют переходным формам, и правильно свернутый мономер пептида представляет собой основную форму Zrv-IIB в метаноле.

4.1.3.4 Уточнение структуры Zrv-IIB в метаноле

Расчет структуры пептида был повторен, используя ограничения на наблюдаемые в эксперименте водородные связи. Для выяснения типа бифуркационной водородной связи (HN Aib12 – CO Leu8, Aib9) (переключение между акцепторами, или две связи одновременно) было проведено три цикла расчета структуры в программе DYANA с последующей энергетической минимизацией в программе FANTOM, используя силовое поле ECEPP/2. В этих циклах водородная связь с HN Aib12 была ограничена как α-спиральная (HN Aib12 – CO Leu8), 3_{10}-спиральная (HN Aib12 – CO Aib9) или бифуркационная (HN Aib12 – CO Leu8, Aib9). Структурная статистика представлена на Рис. 4.5 (колонки ZrvI, ZrvII, ZrvIII, соответственно).

Для получения более полной структурной выборки в каждом из циклов расчета структуры в программе DYANA было рассчитано 1000 структур, и для лучших 420 из них была проведена энергетическая минимизация в программе FANTOM. Как показано в статистической таблице (Рис. 4.5), структуры с бифуркационной водородной связью (одновременно две водородные связи HN Aib12 – CO Leu8, Aib9) в среднем имеют на 10 кКал/Моль меньшую энергию, чем структуры с отдельной α-спиральной или 3_{10}-спиральной связью. Эти энергетические расчеты подтверждают, что в молекуле Zrv-IIB в метаноле действительно присутствует бифуркационная водородная связь.

Набор структур, полученный в цикле III (Рис. 4.5, колонка ZrvIII), может быть рассмотрен как уточненная структура Zrv-IIB в метаноле. Эта структура значительно отличается от структуры пептида в метаноле, полученной ранее, спираль молекулы изгибается на Нур^{10} в меньшей степени (средний угол изгиба равен 34^0, а не 43^0), что приводит к удлинению спирали пептида (длина спирали в наборе структур, полученном ранее, – 22.3 - 26.2 Å; длина спирали в уточненном наборе – 24.5 - 28.1 Å).

4.1.3.5 Взаимодействие HN- и CO-групп основной цепи Zrv-IIB с растворителем

Используя экспериментально измеренную систему водородных связей в молекуле зервамицина в метаноле, мы можем указать на все неучаствующие в образовании водородных связей HN- и CO-группы (они показаны на Рис. 4.8 треугольниками и звездочками, соответственно). Как видно из рисунка, *C*-конец молекулы более полярен,

чем *N*-конец (4 свободных CO-группы, против 3 свободных HN-групп), что объясняет ассиметрию вольтамперной характеристики пептида и активацию его каналов только *cis*-положительным потенциалом.

Неучастие определенной группы в образовании внутримолекулярной водородной связи не означает экспонирования этой группы в растворитель и образования устойчивых водородных связей с его молекулами. Вопрос о взаимодействии полярных групп основной цепи пептида с растворителем имеет огромную важность, так как в моделях, предложенных для описания каналов зервамицина, именно экспонированные CO-группы основной цепи участвуют в проведении ионов и молекул воды сквозь канал и формируют катионселективный фильтр [448].

Для детального исследования вопроса о способе взаимодействия спирали Zrv-IIB с растворителем подходят параметры ЯМР, чувствительные к образованию водородных связей HN- и CO-группами, например, вторичный химический сдвиг HN-протона ($\Delta\delta^1$HN) [460,461] и прямая КССВ через пептидную связь ($^1J_{NC}$) [460,462]. В спиральных пептидах химический сдвиг ^{1}HN зависит от конформации [463,464] и может выявлять наличие электрического дипольного момента у спирали (эффект “конца спирали”) [28], водородные связи между HN- и CO-группами и растворителем [460,461] и различные искривления спиральной структуры, включая изгибы и изломы [465]. КССВ $^1J_{NC}$ также чувствительны к эффекту “конца спирали” и водородным связям между HN- и CO-группами и растворителем [460,462].

На Рис. 4.10 приведены значения этих параметров для Zrv-IIB в метаноле вместе с площадью поверхности атомов кислорода карбонильных групп (S^{EXP}), доступной растворителю в полученных структурах. Все HN-протоны зервамицина имеют отрицательные вторичные сдвиги (Рис. 4.10B). *N*-концевой Trp1 и *C*-концевой Phl16 имеют крайние значения $\Delta\delta^1$HN, что типично для спиралей и, вероятно, является проявлением электрического дипольного момента. Однако сигнал амидного протона Leu8 также значительно смещен в сильное поле, более того, δ^1HN на *N*-конце зервамицина уменьшаются монотонно от Trp1 до Leu8. Это можно объяснить тем, что свободные карбонилы Thr6 и Aib7 поляризуют середину спирали, приводя к формированию псевдо *C*-конца спирали на Leu8 (аналогичная картина δ^1HN наблюдается в середине спирали аламетицина [449]). Таким образом, химические сдвиги HN-протонов в *N*-концевой части Zrv-IIB соответствуют регулярной α-спирали. В то же время $\Delta\delta^1$HN в *C*-концевой части пептида характерны для нерегулярной, изломанной спирали, что характерно для последовательности, содержащей остатки Pro/Hyp.

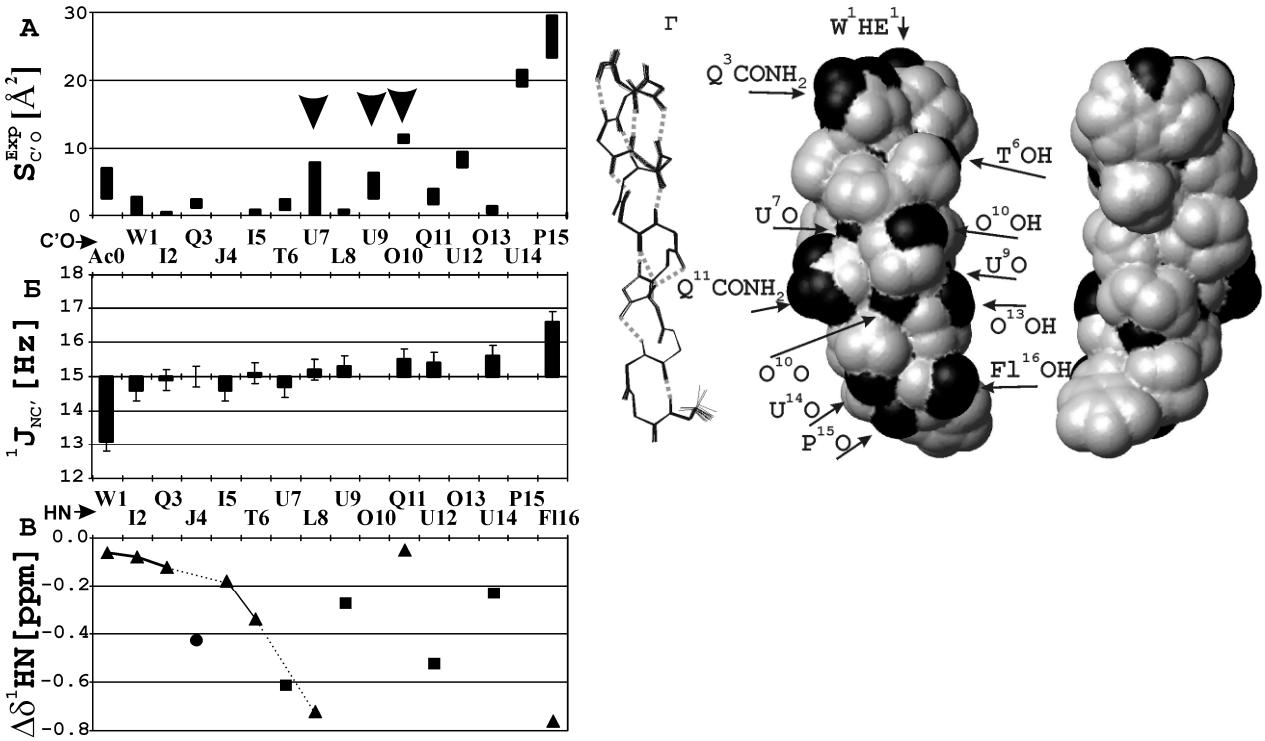


Рис. 4.10. (А) Площадь поверхности, доступная растворителю у кислорода карбонильных групп в наборе структур Zrv-IIB (черные прямоугольники). Стрелки обозначают экспонированные карбонилы, формирующие гидрофильный регион в середине спирали. (Б) Прямые КССВ через пептидную связь $^1J_{NC}$. КССВ для пептидных связей, содержащих Pro/Hyp, не были определены. (В) Вторичный химический сдвиг амидных протонов ($\Delta\delta^1HN=\delta^{HN} - \delta^{HN}_{RC}$). $\Delta\delta^1HN$ для остатков Aib и Iva (квадраты и кружок, соответственно) были вычислены в предположении, что δ^{HN}_{RC} для этих остатков равен 8.40 мд. Значения $\Delta\delta^1HN$ на *N*-конце молекулы соединены линией. (Г) Водородные связи в 20-ти лучших структурах Zrv-IIB в метаноле, и поверхности полярной (выпуклой) и гидрофобной (вогнутой) сторон спирали зервамицина. Полярные области показаны черным цветом и аннотированы.

КССВ $^1J_{NC}$ через пептидную связь в Zrv-IIB (Рис. 4.10Б) имеют однородные значения -15.0±0.8 Гц, что характерно для спиралей [460]. Значения $^1J_{NC}$ для *N*- и *C*-концевых остатков выходят за пределы этого диапазона из-за эффекта “конца спирали”. В общем, абсолютные значения $^1J_{NC}$ монотонно возрастают от *N*-конца пептида к *C*-концу, что указывает на увеличение частоты и силы водородных связей между CO-группами на *C*-конце молекулы и растворителем. С другой стороны, равномерность в значениях этих КССВ указывает на отсутствие участков сильной гидратации в середине спирали и на то, что водородные связи с растворителем у свободных карбонилов Thr^6, Aib^7 и Hyp^{10} имеют силу, сравнимую с силой внутримолекулярных водородных связей. В спирали аламетицина наблюдается совсем другая ситуация, у этого пептаибола в метаноле имеется два участка сильной гидратации в середине спирали (CO-группы Aib^{10} и Gly^{11}) [466].

Площади поверхности атомов кислорода карбонильных групп, доступной растворителю (S^{EXP}), в наборе структур Zrv-IIB (Рис. 4.10А) и кристаллических структурах длинных пептаиболов (аламетицина и трихотоксина) подтверждают вывод о разных способах взаимодействия этих пептидов с растворителем. В середине спиралей

аламетицина и трихотоксина имеются только две экспонированные CO-группы, сильно взаимодействующие с растворителем (CO Aib10/Aib9 (S^{EXP} ~ 6 Å^2) и CO Gly11/Ala10 (S^{EXP} ~ 20 Å^2)). В середине спирали зервамицина, напротив, находится несколько экспонированных карбонилов (CO Aib7, Aib9 и Hyp10 с небольшим S^{EXP} < 15.0 Å^2, Рис. 4.10А), которые значительно увеличивают полярный регион на поверхности спирали, сформированный боковыми группами Hyp10, Gln11 и Hyp13 (Рис. 4.10Г).

Возможно, именно увеличенный (по сравнению с аламетицином) полярный регион на поверхности спирали Zrv-IIB и другой тип взаимодействия пептид/растворитель приводят к изменению катионной селективности каналов этого пептида. Канал аламетицина имеет селективность ($K^+ > Na^+$) [467,468], в то время как канал зервамицина имеет другую селективность ($Na^+ > K^+$) [427]. Таким образом, увеличение полярной стороны пептида ведет к усилению селективности по отношению к ионам с меньшим радиусом (Na^+).

Полученные на этом этапе исследований данные свидетельствуют о том, что в отличие от длинных пептаиболов, спираль Zrv-IIB имеет стабильность, сравнимую со стабильностью спиралей глобулярных белков, а в середине спирали находится бифуркационная водородная связь. Пептид взаимодействует с растворителем большой полярной областью, сформированной из полярных боковых цепей и экспонированных CO-групп основной цепи, и эти группы по отдельности не формируют сайтов сильной гидратации. *C*-концевая часть спирали зервамицина боле полярна, чем *N*-концевая часть. Полученные данные объясняют уникальную селективность каналов Zrv-IIB, ассиметрию вольтамперной характеристики пептида и активацию его каналов только *cis*-положительным потенциалом.

4.1.4 Исследование спин-меченых аналогов зервамицина в метаноле

В работе использовали два спин-меченых аналога Zrv-IIA, содержащих парамагнитные TEMPO-группы вместо *N*-концевой ацетильной группы (Zrv-T0) и *C*-концевого Phl (Zrv-T16).

4.1.4.1 Межмолекулярные взаимодействия в Zrv-IIB и спин-меченых аналогах

В ЯМР-исследовании динамики Zrv-IIB, проведенном с использованием 3 мМ раствора ^{15}N-меченого Zrv-IIB в метаноле, был обнаружен обменный процесс на полярной стороне спирали [459]. В рамках настоящей работы было установлено, что этот процесс связан с изменением системы водородных связей (п. 4.1.3.3), однако причины возникновения этого процесса так и не были выявлены. Возможно, обменный процесс вызван межмолекулярными взаимодействиями (например, димеризацией) пептида в растворе.

Для исследования межмолекулярных взаимодействий в спирали Zrv-IIB изучали зависимость химических сдвигов и полуширин сигналов HN-протонов от концентрации пептида (0.1 - 18.1 мМ) в метаноле. Химические сдвиги и полуширины сигналов при увеличении концентрации пептида изменялись практически линейно в пределах 0.03 мд и 0.5 Гц, причем для амидных протонов, экспонированных в растворитель (Trp1, Ile2 и Gln3), зависимость была наибольшей. Химические сдвиги и полуширины сигналов HN-протонов остатков Thr6, Leu8 and Aib14, участвующих в обменном процессе (Рис. 4.11), практически не менялись в указанном диапазоне концентраций, что указывает на отсутствие сильных межмолекулярных взаимодействий на полярной стороне спирали Zrv-IIB.

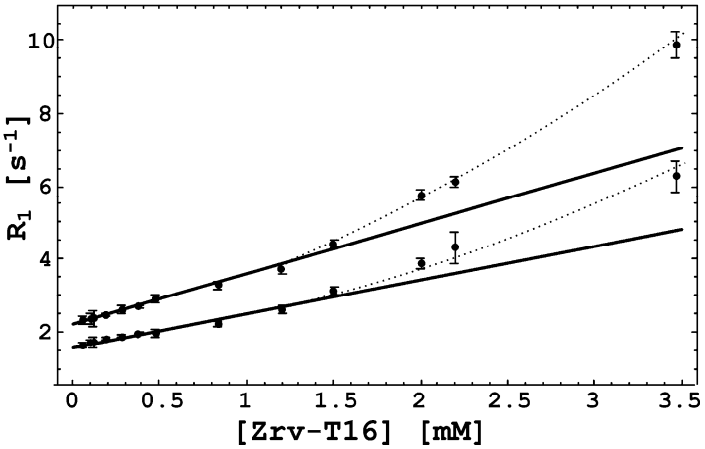


Рис. 4.11. Зависимость скорости релаксации R_1 для H^N и $H^{\varepsilon 1}$ протонов Trp1 (нижняя и верхняя кривые, соответственно) от концентрации Zrv-T16. Точки в диапазоне концентраций 0.05 - 1.6 мМ линейно аппроксимированы. Этот рисунок иллюстрирует влияние межмолекулярного парамагнитного усиления релаксации на скорости релаксации в спин-меченых пептидах.

Детальное исследование взаимодействия между мономерами зервамицина в растворе проводили на образце Zrv-T16 (спиновая метка на *C*-конце пептида), измеряя межмолекулярное парамагнитное усиление релаксации (Рис. 4.11). Наиболее сильные вклады межмолекулярной релаксации обнаружены для протонов HN-групп и боковых цепей остатков Trp1, Ile2, Gln3 и Iva4. Рассчитанные расстояния наибольшего сближения (d_0) между нитрооксидом спиновой метки и HN-протонами этих остатков составили только 2.1, 4.2, 5.2 и 6.1 Å, что примерно соответствует сумме радиусов Ван-дер-Ваальса и относительной доступности растворителю этих групп. Таким образом, в метаноле при концентрациях ниже 1.5 мМ зервамицин находится в состоянии мономера, однако нелинейность кривых при больших концентрациях (Рис. 4.11) указывает на межмолекулярные взаимодействия между *N*-концом одного и *C*-концом другого пептида. Видимо, эти взаимодействия модулируются спиральным макро-диполем молекулы и приводят к наблюдаемой в растворе толуола агрегации пептида по принципу *N*-конец к *C*-концу [469].

4.1.4.2 Измерение расстояний: протон – спиновая метка в спин-меченых аналогах Zrv-IIB

Парамагнитное усиление релаксации в спин-меченых аналогах зервамицина позволило измерить средние расстояния между HN-протонами основной цепи и спиновыми метками, находящимися на *N*- или *C*-конце молекул пептидов. Полученные данные и согласование их со структурой Zrv-IIB в метаноле показаны на Рис. 4.12. Эти расстояния усреднены как ($\langle r \rangle = \langle r^{-6} \rangle^{-1/6}$), следовательно, они ближе к расстояниям наибольшего сближения между протоном и спиновой меткой, чем просто к среднему расстоянию. Как мы видим в случае Zrv-IIB, отличие измеренных (усредненных) расстояний от расстояний в структуре зервамицина в метаноле не велико (< 4 Å), что разительно отличается от случая аламетицина, где разница в расстояниях была > 10 Å [423]. Более того, эта небольшая разница в случае зервамицина может быть объяснена, если принять во внимание подвижность спиновых меток и неспособность их к формированию водородных связей.

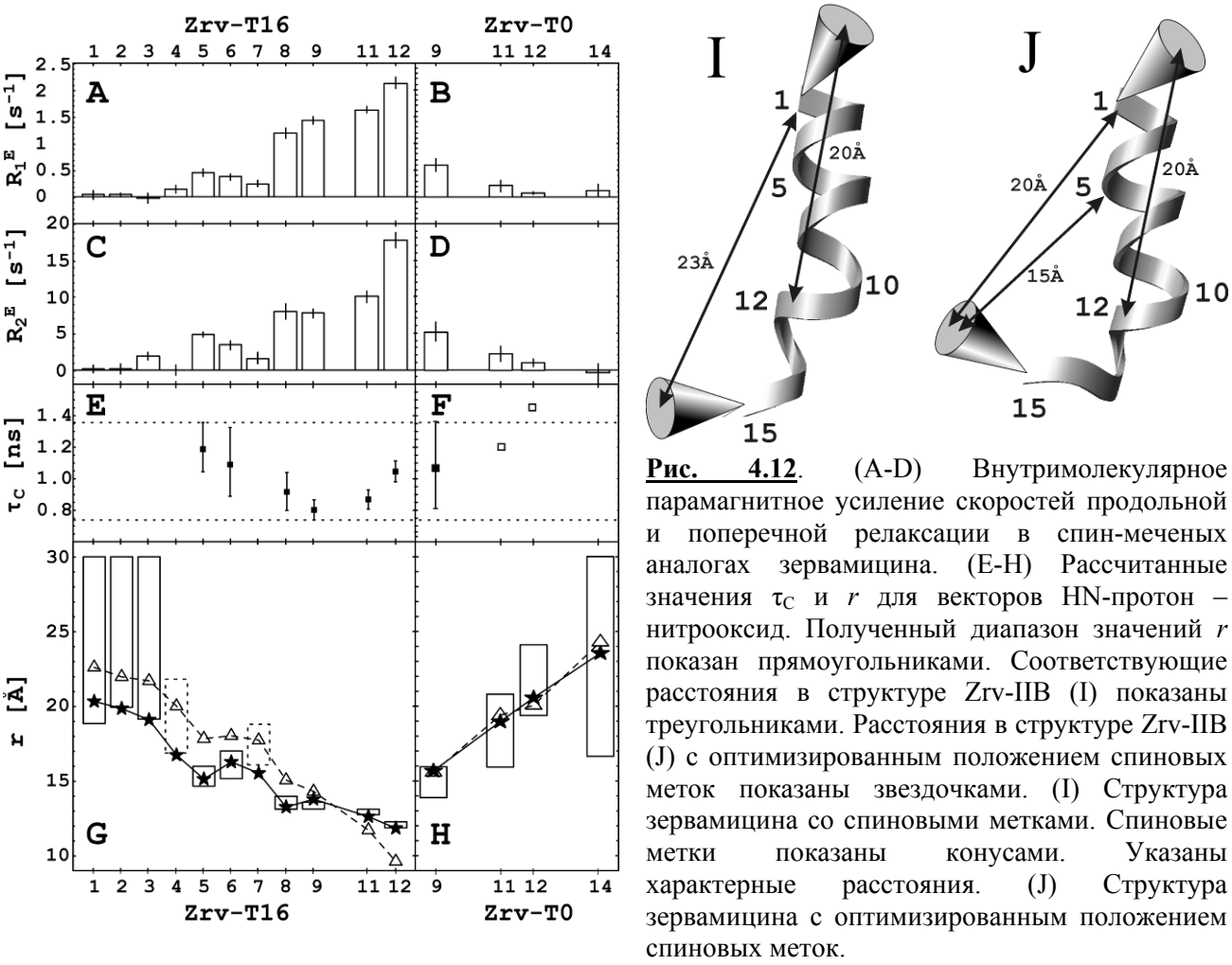


Рис. 4.12. (A-D) Внутримолекулярное парамагнитное усиление скоростей продольной и поперечной релаксации в спин-меченых аналогах зервамицина. (E-H) Рассчитанные значения τ_C и *r* для векторов HN-протон – нитрооксид. Полученный диапазон значений *r* показан прямоугольниками. Соответствующие расстояния в структуре Zrv-IIB (I) показаны треугольниками. Расстояния в структуре Zrv-IIB (J) с оптимизированным положением спиновых меток показаны звездочками. (I) Структура зервамицина со спиновыми метками. Спиновые метки показаны конусами. Указаны характерные расстояния. (J) Структура зервамицина с оптимизированным положением спиновых меток.

Полученные данные свидетельствуют о том, что Zrv-IIB в метаноле в отличие от длинного пептаибола аламетицина не совершает высокоамплитудных движений, изгибающих спираль. Видимо, особая стабильность Zrv-IIB вызвана заменой Gly11

(аламетицин) на Aib7 (зервамицин) в ответственном за шарнирные движения мотиве Gly11-Leu-Aib-Pro14 (самый стерически свободный остаток заменен на самый стерически ограниченный).

4.1.5 Пространственная структура Zrv-IIB в окружении мицелл DPC[1].

Исследование зервамицина в изотропных средах неполярных растворителей позволило детально охарактеризовать его структуру и динамику. Однако эти растворы лишь частично моделируют свойства мембраны, их объединяет с мембраной только гидрофобность, близкая к таковой у углеводородного региона бислоя. Бислойные мембраны анизотропны, они имеют как гидрофобную часть, так и окружающие ее полярные области. Это свойство мембран очень важно для действия амфифильных пептидов. Однако исследование структур пептидов и белков в мембранно-связанном состоянии методом ЯМР в растворе невозможно из-за очень медленной реориентации мембранных везикул, что ведет к значительному уширению линий. В этом отношении мицеллы детергентов представляют собой разумный компромисс, они обладают анизотропией и реориентируются достаточно быстро для наблюдения сигналов связанных белков и пептидов.

Мицеллы DPC – одна из наиболее удобных, и в то же время, дающих хорошее приближение к мембране, сред для ЯМР-исследования [85]. Эти мицеллы не заряжены (молекула DPC – цвиттер-ион) и хорошо моделируют свойства нейтральных биологических мембран, составленных из PC.

4.1.5.1 Стехиометрия комплекса Zrv-IIB/мицелла DPC

Формирование комплекса между Zrv-IIB и DPC наблюдали, измеряя коэффициент трансляционной диффузии мицелл DPC в растворе без пептида и измеряя коэффициент трансляционной диффузии Zrv-IIB в растворе, содержащем как пептид, так и детергент. Измеренный коэффициент диффузии мицеллы DPC был равен $1.20\pm0.02 \times 10^{-10}$ м^2/с, что соответствует радиусу Стокса 23.1±0.5 Å. В то же время коэффициент диффузии зервамицина в присутствии DPC (отношение пептид-детергент (P:D) = 1:40) был равен $1.06\pm0.02 \times 10^{-10}$ м^2/с, что соответствовало радиусу 26.2±0.5 Å. Эти данные свидетельствуют о том, что при связывании Zrv-IIB с мицеллой образуется комплекс, имеющий большие размеры чем мицелла DPC.

Мицелла DPC в условиях ЯМР-эксперимента состоит из 55±5 молекул детергента [357,470]. Предполагая, что пептид равномерно распределен между мицеллами (действительно, в результате исследования не было найдено никаких признаков агрегации

[1] Исследование проводили с использованием немеченого аналога пептида.

молекул зервамицина), можно сделать вывод о том, что в условиях эксперимента (70 мМ DPC, P:D = 1:40) одна мицелла в среднем несет на себе 1.6 (±0.3) молекул пептаибола, которые связаны с 66 (±12) молекулами детергента.

4.1.5.2 Структура Zrv-IIB в растворе DPC мицелл

Структура пептида была рассчитана, используя схему, применявшуюся для расчета структуры в метаноле. Сводка данных ЯМР представлена на Рис. 4.6Б, а структурная статистика и полученная структура на Рис. 4.5 (колонка ZrvM). Молекула представляет собой амфифильную правозакрученную спираль, изогнутую на Hyp10 под углом ~ 20^0. Спираль пептида имеет длину ~26 Å. По этим и другим параметрам структура очень близка к уточненной структуре Zrv-IIB в метаноле.

N-конец молекулы представляет собой α-спираль, начинающуюся с водородной связи CO Ac0 – HN Iva4, а *C*-конец – спираль, сформированную последовательностью β-изгибов (β-bend ribbon spiral). Точную систему водородных связей по данным ^{1}H-ЯМР установить не удалось, и было высказано предположение, что молекула может заканчиваться двумя α-спиральными водородными связями. Участие всех HN протонов (за исключением Trp1, Ile2 и Gln3) в образовании внутримолекулярных водородных связей было подтверждено как медленной скоростью обмена на дейтерий растворителя, так и низкими температурными градиентами (Рис. 4.6Б). Анализ КССВ $^3J_H{}^{\alpha}{}_H{}^{\beta}$ показал, что боковые цепи Trp^1, Ile^2, Gln^3 и Ile^5 подвижны, а наиболее заселенный ротамер боковых цепей остатков Thr^6, Leu^8, Gln^{11} и Phl^{16} имеет угол $\chi 1 = -60^0$. Эти результаты практически совпадают с данными по динамике боковых цепей, полученными в метаноле.

Распределение электростатического потенциала и потенциала молекулярной гидрофобности на поверхности мономера Zrv-IIB показаны на Рис. 4.13АБ. Как видно, молекула представляет собой амфифильную спираль с большим полярным участком на выпуклой стороне спирали и полностью гидрофобна с вогнутой стороны. Полярность *C*-концевого участка молекулы дополнительно усилена экспонированными карбонилами остатков Aib7, Aib9, Hyp10, Aib14 и Pro15, полярными боковыми группами Hyp10, Gln11 и Hyp13 и *C*-концевой спиртовой группой Phl16.

4.1.5.3 Топология комплекса Zrv-IIB/мицелла DPC

Для определения положения молекулы Zrv-IIB относительно гидрофобного региона мицеллы DPC были использованы два парамагнитных зонда: молекулы 5-доксилстеариновой (5-DSA) и 16-доксилстеариновой (16-DSA) кислот, которые встраиваются в мицеллу таким образом, что их спиновые метки располагаются в положениях, близких к поверхности мицеллы и ее центру, соответственно [357].

Относительное уменьшение интенсивности кросс-пиков в спектре NOESY в присутствии 16-DSA для различных остатков Zrv-IIB показано на Рис. 4.13B (Пармагнитый зонд 5-DSA вызывал аналогичное уменьшение интенсивности, но с большей амплитудой.) Как видно, представленный график имеет явно выраженную спиральную периодичность, при этом сигналы с гидрофобной поверхности спирали Zrv-IIB ослаблены сильнее, что указывает на поверхностный тип связывания пептида с мицеллой. Более того, сигналы *N*-концевых остатков пептида более уширены, что говорит о большем погружении *N*-конца молекулы в гидрофобную область мицеллы. На Рис. 4.13B представлена также модель комплекса Zrv-IIB/мицелла DPC, построенная по экспериментальным данным.

Полученные на этом этапе исследований результаты свидетельствуют о том, что Zrv-IIB связывается с поверхностью мицеллы DPC в конформации, близкой к конформации в метаноле. При связывании гидрофобная сторона спирали пептида обращена к мицелле, а полярная сторона экспонирована в воду. По сравнению с другими частями молекулы, *N*-конец пептида сильнее заглублен в мицеллу. Вероятно, подобный тип связывания имеет место и для бислойной мембраны. Для перевода пептида в трансмембранное (TM) состояние и формирования каналов по BS механизму необходимо либо наличие внешнего потенциала, либо значительное уменьшение толщины мембраны.

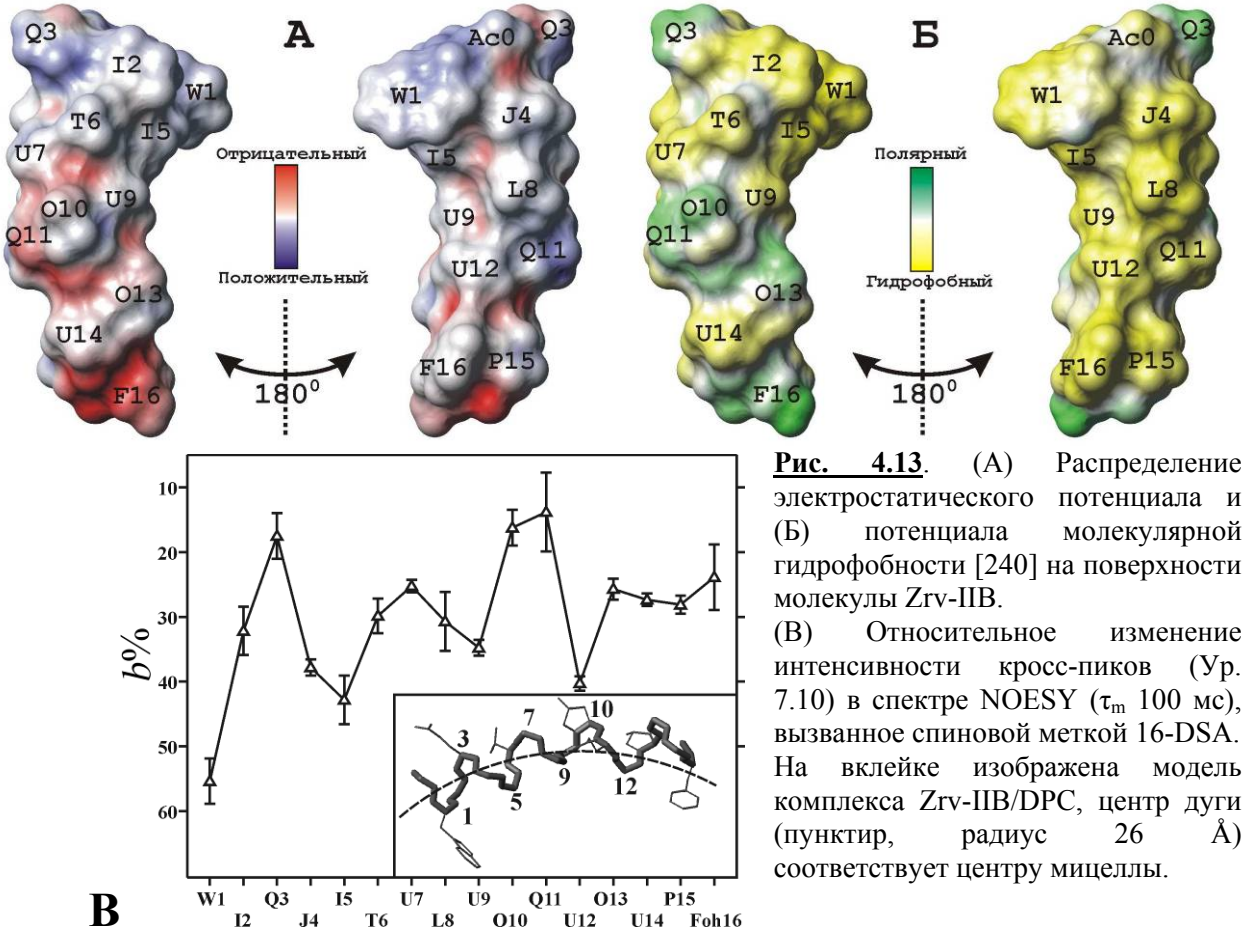


Рис. 4.13. (А) Распределение электростатического потенциала и (Б) потенциала молекулярной гидрофобности [240] на поверхности молекулы Zrv-IIB.
(В) Относительное изменение интенсивности кросс-пиков (Ур. 7.10) в спектре NOESY (τ_m 100 мс), вызванное спиновой меткой 16-DSA. На вклейке изображена модель комплекса Zrv-IIB/DPC, центр дуги (пунктир, радиус 26 Å) соответствует центру мицеллы.

Это предположение было подтверждено более поздним исследованием Zrv-IIB методом ЯМР твердого тела на ориентированных мембранах [216]. В ходе этого исследования было установлено что, в мембранах, содержащих PC с длиной жирнокислотных цепей, превышающей 12 атомов углерода, спираль пептида ориентирована параллельно поверхности бислоя, и, соответственно, пептид находится в поверхностно-связанном состоянии. В более тонких мембранах (diC12:0) наблюдалось равновесие между поверхностносвязанным и TM состоянием [216]. В то время как в мембранах, содержащих diC10:0 PC наблюдалось преимущественно TM состояние Zrv-IIB (спираль пептида ориентирована вдоль нормали к плоскости бислоя).

4.2 Пространственная структура и динамика Aam-I в метаноле, бицеллах, мицеллах и нанодисках

4.2.1 Структура и динамика Aam-I в метаноле, сравнение с Zrv-IIB

Практически полное (за исключением ароматических боковых цепей) отнесение ^{1}H, ^{13}C и ^{15}N сигналов для изотопно-меченого аналога Aam-I в метаноле получено, используя стандартные методы ЯМР-спектроскопии тройного резонанса [31]. Для отнесения сигналов основной цепи пептида использовали спектры ^{15}N-HSQC, HNCA, HNCO, HN(CA)CO и HN(CO)CA. Сигналы боковых цепей были отнесены, используя информацию из ^{13}C-HSQC, HNCACB и HCCH-TOCSY спектров. Стереоспецифическое отнесение протонов в прохиральных метиленовых группах и метильных групп остатков Aib было получено на основании совместного анализа вицинальных КССВ и интенсивностей кросс-пиков в ROESY спектре. Полученное отнесение для ^{1}H и ^{13}C ядер совпало с известным из литературных данных [438].

Один из основных вопросов, который предстояло решить в ходе исследования антиамебина, был связан с конформацией *N*-концевого (остатки 1-8) фрагмента пептида в растворе. Эта часть молекулы (Табл. 4.1) содержит пять ахиральных остатков (Aib, Gly), два L-остатка (Phe, Leu) и один D-остаток (Iva). Наличие пяти α,α-диалкилированных остатков (Aib, Iva) в этом сегменте указывало на большую склонность к формированию спиральной конформации, однако направление закрутки спирали оставалось не ясным [438,439].

4.2.1.1 Качественная характеристика конформации Aam-I в метаноле по данным ЯМР

Некоторые данные ЯМР-спектроскопии (химические сдвиги основной цепи [28], температурные градиенты химических сдвигов H^N протонов [451], КССВ [356,460,471–473], характерные контакты ЯЭО [23]) позволяют качественно характеризовать вторичную структуру (включая спиральную конформацию) полипептидов в растворе.

Кроме того, в случае пептаиболов большая разница химических сдвигов $^{13}C^{\beta}$ ядер у *pro-S* и *pro-R* метильных групп остатков Aib (магнитная неэквивалентность $^{13}C^{\beta}$ ядер или $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$) может выступать в качестве дополнительного индикатора спиральной конформации [474–476].[1] В настоящее время считается, что $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ в основном зависит от пространственного положения C^{β} метильной группы относительно близлежащей карбонильной (CO) группы (собственный остаток, т.е. от угла ψ основной цепи), а также от химического строения этой карбонильной группы (вторичный амид, пептидная связь Aib-Xxx или третичный амид, пептидная связь Aib-Pro/Hyp) [474–476]. Согласно опубликованным данным, в правозакрученной спиральной конформации остаток Aib, за которым следует *амино*кислотный остаток, демонстрирует значения $\Delta\delta^{13}C^{\beta} > +2$ м.д. В то время как остаток Aib, за которым следует *имино*кислотный остаток (Pro или Hyp) имеет $\Delta\delta^{13}C^{\beta} \sim -2$ м.д. [442]. В случае левозакрученной спиральной конформации значения $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ должны изменять знак на противоположный.

Значения $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ для Aam-I в метаноле (Рис. 4.14Б) указывают на то, что *C*-концевой фрагмент пептида (Aib8-Phl16) формирует правозакрученную спираль. В то же время остатки Aib2, Aib3 и Aib4 демонстрируют абсолютные значения $\Delta\delta^{13}C^{\beta} < 1$ м.д., что указывает, либо на неспиральную конформацию *N*-концевого сегмента, либо на быстрый (по шкале хим. сдвигов ЯМР) обмен между левозакрученной и правозакрученной спиральными конформациями. Наблюдаемые температурные градиенты амидных протонов ($\Delta\delta^{1}HN/\Delta T$, Рис. 4.14В) выявили формирование водородных связей с участием всех HN групп основной цепи пептида, начиная с остатка Aib3, что согласуется с конформацией 3_{10}-спирали. Последовательная цепочка сильных $HN_i \cdots HN_{i+1}$ ЯЭО-контактов, наблюдаемая в ROESY спектре для остатков от Aib2 до Aib9 (Рис. 4.14Г) и наличие $H^{\alpha}_i \cdots HN_{i+3,i+4}$ контактов для Ac0 and Phe1 (данные не показаны) также говорят в пользу спиральной конформации *N*-концевого сегмента Aam-I. Тем не менее, сильный последовательный ЯЭО-контакт $H^{\alpha}_i \cdots HN_{i+1}$ и маленькое значение КССВ $^{3}J_{HNH}{}^{\alpha}$ (<0.6 Гц), наблюдаемые для остатка Phe1, а также внутриостаточные и последовательные ЯЭО-контакты, наблюдаемые для остатка Iva5, были несовместимы со спиральной

[1] Каждый α,α-диалкилированный остаток (Aib, Iva) содержит две C^{β} группы, которые имеют различные названия в номенклатуре IUPAC и базе данных PDB. Одна из этих групп занимает положение, эквивалентное H^{α} атому L-аминокислотного остатка. У Aib эта метильная группа называется *pro-R* (IUPAC) или $C^{\beta1}$ (PDB), но в случае Iva эта метиленовая группа называется $C^{\beta2}$ (PDB). Другая C^{β} группа занимает положение, эквивалентное C^{β} группе L-аминокислотного остатка. У Aib эта метильная группа называется *pro-S* (IUPAC) или $C^{\beta2}$ (PDB), а в случае Iva эта метильная группа называется $C^{\beta1}$ (PDB). Для того, чтобы исключить возможную путаницу, в представленной работе пространственно эквивалентные C^{β} группы остатков Aib и Iva названы одинаково, как *pro-R* и *pro-S* (хотя для Iva это противоречит номенклатуре IUPAC). Кроме того, в работе магнитная неэквивалентность $^{13}C^{\beta}$ ядер ($\Delta\delta^{13}C^{\beta}$) рассчитывалась как результат разности (со знаком) между $^{13}C^{\beta}$ химическими сдвигами *pro-S* и *pro-R* групп. Таким образом, для остатков Iva значения $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ всегда отрицательны.

конформацией.

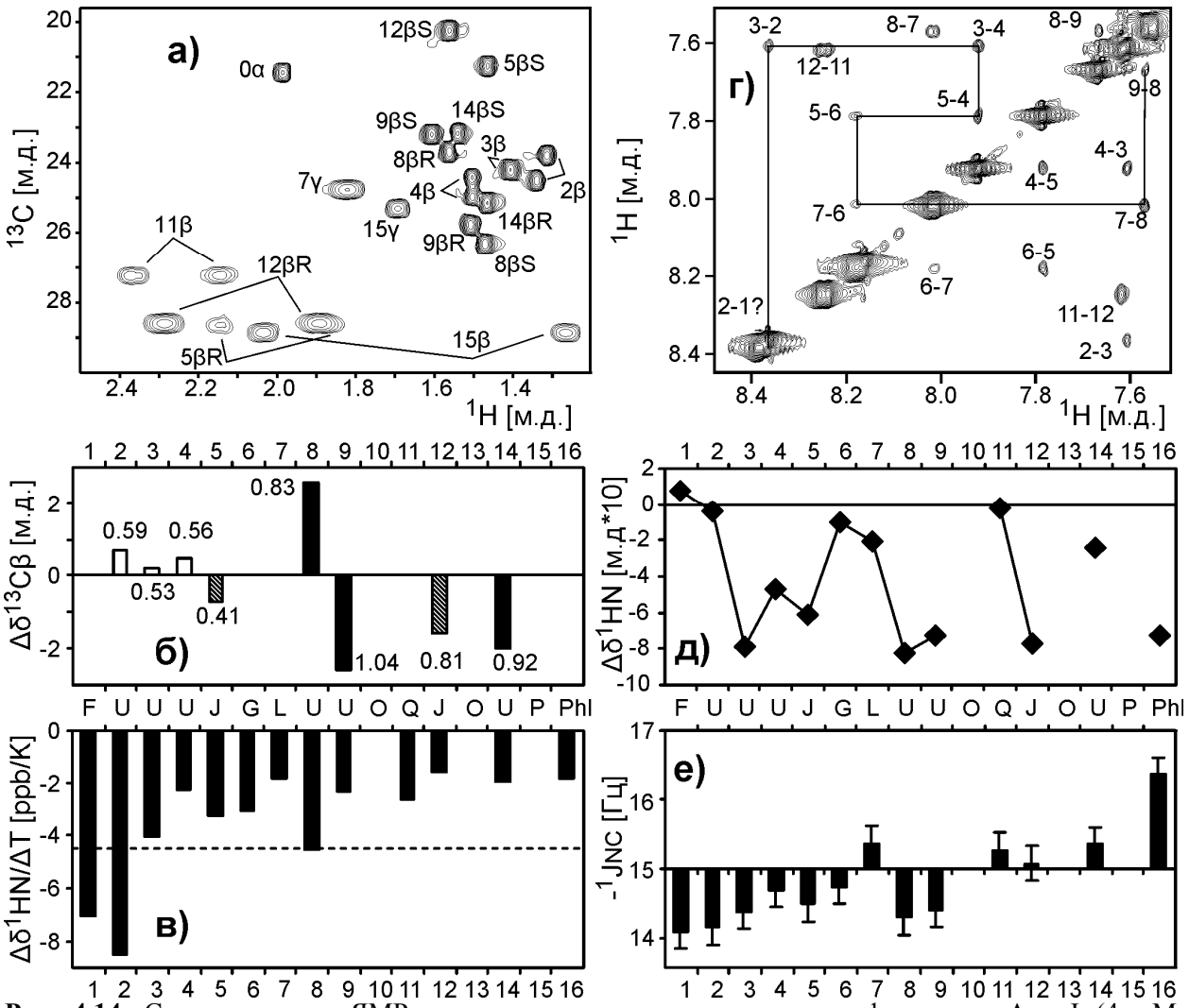


Рис. 4.14. Сводка данных ЯМР, качественно характеризующих конформацию Aam-I (4 мМ, немеченого или ^{13}C,^{15}N-меченого пептида, CD_3OH). (а) Фрагмент ^{13}C-HSQC спектра, накопленного с постоянным временем эволюции хим. сдвига ^{13}C. (б) Значения $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ для остатков Aib (черные прямоугольники – получено стереоспецифическое отнесение *pro-S* и *pro-R* групп, белые – нет отнесения) и Iva (заштрихованные прямоугольники). К значениям $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ для остатков Iva была прибавлена разность химических сдвигов между $^{13}C^{\beta}H_2$ и $^{13}C^{\beta}H_3$ группами в конформации развернутого клубка (6.8 м.д, см. Ур. 4.4). Для каждого остатка Aib и Iva показаны относительные заселенности правозакрученной конформации (P_R), рассчитанные по уравнениям 4.3 и 4.4. (в) Температурные градиенты химических сдвигов H^N протонов, измеренные в диапазоне 280-320 K. Пунктирная линия (- 4.5 ppb/K) отделяет группы, возможно участвующие в образовании водородных связей [451]. (г) Фрагмент 2D ROESY спектра (τ_m 250 мс, немеченый образец). Показаны последовательные $HN_i \cdots HN_{i+1}$ кросс-пики. (д) Вторичный химический сдвиг амидных протонов ($\Delta\delta^{1}HN=\delta^{HN} - \delta^{HN}{}_{RC}$). $\Delta\delta^{1}HN$ для остатков Aib и Iva были вычислены в предположении, что $\delta^{HN}{}_{RC}$ для этих остатков равен 8.40 мд. (е) Прямые КССВ через пептидную связь $^{1}J_{NC}$. КССВ для пептидных связей, содержащих Pro/Hyp, не были определены.

Наблюдаемые значения вторичных химических сдвигов амидных протонов ($\Delta\delta^{1}$HN, Рис. 4.14Д) были также противоречивы. С одной стороны, все $\Delta\delta^{1}$HN (за исключением Phe1) были отрицательны, что указывало на спиральную конформацию пептида [28]. С другой стороны, значения $\Delta\delta^{1}$HN в *N*-концевом сегменте были нерегулярны и, возможно, демонстрировали периодичность, что свойственно изломанным или сильно изогнутым спиралям [28]. Наблюдаемая картина значительно отличалась от

практически линейного распределения $\Delta\delta^1$HN по последовательности, которое ранее наблюдалось в *N*-концевых сегментах аламетицина [449] и Zrv-IIB (см. п. 4.1.3.5).

Значения прямых КССВ через пептидную связь ($^1J_{NC}$, Рис. 4.14E) были распределены вокруг среднего значения -14.8 Гц, которое является типичным для спиралей [460]. Резкие изменения значений $^1J_{NC}$, наблюдаемые на дипептиде Leu7-Aib8, указало на то, что Aam-I в метаноле состоит из двух практически независимых сегментов (Ac0-Leu7 и Aib8-Phl16). Более того, CO группа Gly6 и HN группы Aib8 и Aib9, вероятно, экспонированы в растворитель и формируют сайты сильной гидратации в середине молекулы пептида. Наблюдаемое для Aam-I распределение значений $^1J_{NC}$ по последовательности схоже с таковым у аламетицина [466] и не похоже на распределение, наблюдаемое для Zrv-IIB, где не было выявлено сайтов сильной гидратации основной цепи в середине молекулы (см. раздел 4.1.3.5).

4.2.1.2 Прямое наблюдение системы водородных связей в $^{13}C,^{15}N$-меченом Aam-I

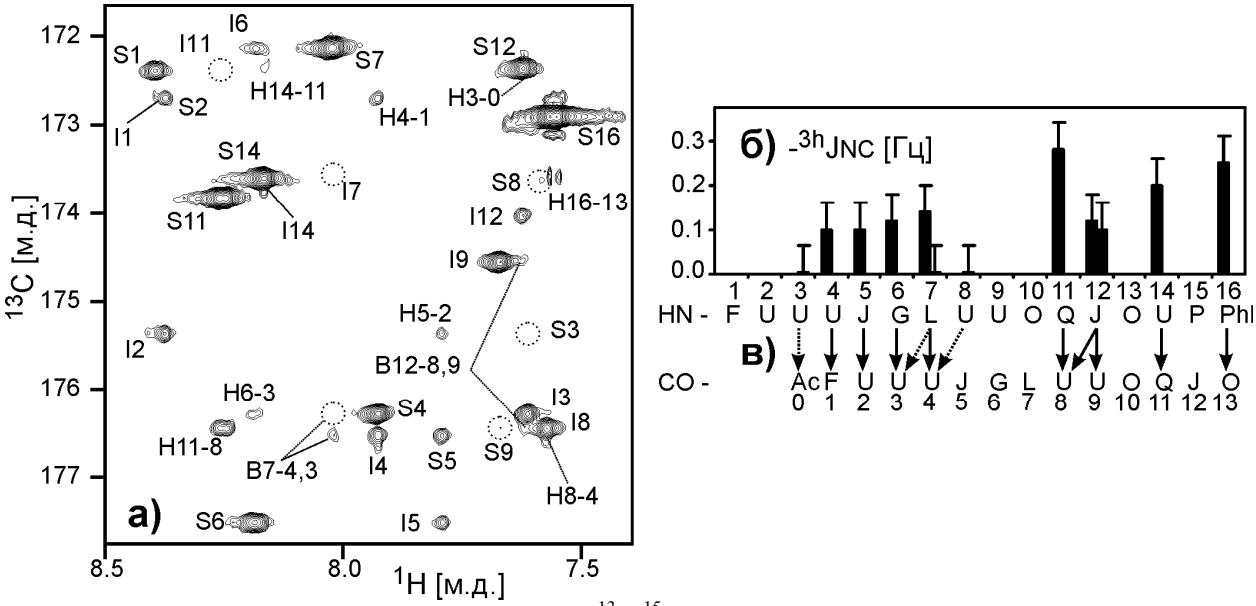


Рис. 4.15. (а) Дальний HNCO спектр для 4 мМ $^{13}C,^{15}N$-Aam-I в CD_3OH (pH 6.2; 30°C, Δ = 139.4 мс). Кросс-пики разделены на четыре категории: I – внутриостаточные через $^2J_{NC}$ КССВ; S – последовательные через $^1J_{NC}$ КССВ; H – через водородные связи (КССВ $^{3h}J_{NC}$); B – через бифуркационные водородные связи. Кросс-пики, имеющие низкую интенсивность (не наблюдаемые при данном пороге), обведены пунктирными кружками. (б) Значения $^{3h}J_{NC}$ (Гц) через водородные связи. (в) Система водородных связей в молекуле Aam-I. α-Спиральные и 3_{10}-спиральные водородные связи показаны наклонными и вертикальными стрелочками, соответственно. Достоверно не идентифицируемые водородные связи показаны пунктиром.

Использование $^{13}C,^{15}N$-меченого аналога пептида и дальнего HNCO эксперимента [452] (Рис. 4.15A) позволило напрямую наблюдать перенос намагниченности через водородные связи CO...HN (КССВ $^{3h}J_{NC}$, Рис. 4.15Б) и таким образом выявить систему водородных связей, стабилизирующих молекулу Aam-I в метаноле (Рис. 4.15B). Как и ожидалось, система водородных связей в *C*-концевом сегменте пептида (Aib8-Phl16) была идентична системе, наблюдаемой для Zrv-IIB (см. раздел 4.1.3.2). Эта часть молекулы

имеет конформацию спирали, сформированной последовательностью β-изгибов (β-bend ribbon spiral), которая стабилизирована тремя 3_{10}-спиральными водородными связями и одной бифуркационной связью (Iva12 H–N···O=C Aib8, Aib9). Соответствующие КССВ $^{3h}J_{NC}$ имеют значения в диапазоне -0.1 – -0.3 Гц, что указывает на относительную стабильность водородных связей. У HN групп Aib8 и Aib9 не наблюдалось сильных кросс-пиков через водородные связи (возможные амплитуды $^{3h}J_{NC}$ < 0.05 Гц). Следовательно, эти HN группы не формируют внутримолекулярных водородных связей и, возможно, экспонированы в растворитель, что согласуется с результатами анализа прямых КССВ $^{1}J_{NC}$ (см. выше).

Согласно полученным данным, *N*-концевой сегмент Aam-I (Phe1-Leu7) формирует 3_{10}-спираль. Однако, амплитуда КССВ $^{3h}J_{NC}$ в этой части молекулы (~ -0.1 Гц) была значительно ниже значений, наблюдаемых для стабильных спиралей (~ -0.38 Гц [452]). Одно из возможных объяснений этого эффекта связано с наличием динамической нестабильности у *N*-концевого сегмента молекулы Aam-I в метаноле. При этом, мы можем рассмотреть два варианта: либо эта часть молекулы совершает быстрые (по шкале ЯМР) обменные движения между сформированной 3_{10}-спиральной конформацией и неким развернутым конформационным состоянием, либо обменные процессы происходят между двумя 3_{10}-спиральными конформациями, которые отличаются направлением закрутки.

4.2.1.3 Конформация основной и боковых цепей Aam-I по данным КССВ

Для детального исследования природы обменных процессов в *N*-концевом сегменте Aam-I был проанализирован набор КССВ, зависящих от конформации основной цепи пептидной молекулы. Были измерены КССВ $^{3}J_{HNH}{}^{\alpha}$, $^{3}J_{HNC}$, $^{3}J_{HNC}{}^{\beta}$ и $^{3}J_{H}{}^{\alpha}{}_{C}$, зависящие от конформации угла φ основной цепи, а также КССВ $^{3}J_{H}{}^{\alpha}{}_{N}$, $^{1}J_{NC}{}^{\alpha}$ и $^{2}J_{NC}{}^{\alpha}$, зависящие от угла ψ. Результаты анализа КССВ приведены в Табл. 4.2.

Согласно кристаллическим структурам пептидов, содержащих остатки Aib, конформационное пространство, доступное этому остатку очень ограничено [477]. Только узкий регион углов φ/ψ $(-45^0 – -65^0)/(-20^0 – -55^0)$ разрешен в правозакрученных спиральных конформациях, включающих α-спираль [478], 3_{10}-спираль [479,480], и конформацию β-bend ribbon spiral [436]. Кроме того, для остатков Pro/Hyp в конформации β-bend ribbon spiral также разрешен только узкий диапазон углов ψ $(+5^0 – -30^0)$ [436,437]. Используя известные зависимости (уравнения Карплюса [471–473], была проведена оценка значений КССВ, зависящих от конформации основной цепи в правозакрученных спиральных конформациях: $^{3}J_{HNH}{}^{\alpha}$: (1.5 – 3.9 Гц), $^{3}J_{HNC}$: (1.6 – 3.4 Гц), $^{3}J_{HNC}{}^{\beta}$ для *pro-S* группы : (2.3 – 2.5 Гц), $^{3}J_{HNC}{}^{\beta}$ для *pro-R* группы : (0.5 – 1.5 Гц), $^{3}J_{H}{}^{\alpha}{}_{C}$: (0.7 – 1.2 Гц), $^{3}J_{H}{}^{\alpha}{}_{N}$: (0.6 – 1.8 Гц), $^{1}J_{NC}{}^{\alpha}$: (9.5 – 10.2 Гц) и $^{2}J_{NC}{}^{\alpha}$: (6.0 – 6.8 Гц).

Ост.	КССВ, зависящие от φ[ab])				Крист. структура[cd])		Одно значение φ[d])		Два симметричных значения φ[de])			КССВ, зависящие от ψ			Крист. структура[cd])	
	$^3J_{HNH}{}^{\alpha}$	$^3J_{HNC}{}^{\beta}$	$^3J_{HNC}$	$^3J_H{}^{\alpha}{}_C$	угол Φ_{PDB}	*СКО*	угол Φ_{MIN}	*СКО*	угол Φ_R	P_R	*СКО₂*	$^1J_{NC}{}^{\alpha}$	$^2J_{NC}{}^{\alpha}$	$^3J_H{}^{\alpha}{}_N$	Угол Ψ_{PDB}	*СКО*
	[Гц]	[Гц]	[Гц]	[Гц]	[°]	[Гц]	[°]	[Гц]	[°]		[Гц]	[Гц]	[Гц]	[Гц]	[°]	[Гц]
Phe1	5.3	2.3	1.5	3.0	-77	**0.8**	-76	**0.8**	-67	0.65	0.1	10.9	8.5	<0.6	-2	**0.9**
Aib2		1.2/1.4	3.5		-96	**2.2**	+44	**0.7**	-43	0.55	0.1	9.5	7.4		-50	0.2
Aib3		ND	ND		-56							9.6	6.3		-41	0.3
Aib4		1.5/1.7	2.5		-55	**0.6**	+57	**0.6**	-54	0.56	0.1	9.4	6.1		-53	0.4
Iva5		1.7/1.5	2.3		-56	0.5	-59	0.5	-60	0.43	0.2	9.4	6.2		-48	0.2
Gly6	4.8/6.6		0.6	2.0/4.0	-66	**1.2**	-77	**0.9**	-69	0.74	**0.6**	10.7	6.5	1.1/0.7	-39	**0.7**
Leu7	6.5	1.8	1	1.4	-76	**0.6**	-81	0.4	-81	1.00	0.4	10.1	6.9	0.9	-36	0.5
Aib8		1.9/1.4	2.1		-67	0.5	-60	0.4	-58	0.67	0.1	9.6	6.9		-36	0.3
Aib9		1.9/0.3	ND		-47	0.4	-32	0.1	-33	0.95	0.0	9.1	6.0		-49	0.5
Hyp10														1.4	-16	0.5
Gln11	8.8	1.3	0	2.0	-89	**0.8**	-100	0.4	-100	1.00	0.4	9.9	6.7	0.9	-12	0.2
Iva12		2.1/0.6	3.5		-52	0.5	-44	0.1	-44	0.91	0.0	9.3	6.2		-37	0.5
Hyp13														1.1	-16	0.1
Aib14		2.1/0.5	3.4		-47	0.2	-44	0.1	-44	0.94	0.1	9.4	6.2		-47	0.2
Pro15														1.3	-15	0.2
Phl16	9.4			1.9	-100	**0.8**	-134	**0.7**	-134	1.00	**0.7**					

Табл. 4.2. Значения КССВ, зависящих от углов φ/ψ, измеренные для Aam-I в метаноле, а также результаты их анализа.

a) КССВ $^3J_H{}^N{}_C{}^{\beta}$ для стереоспецифически отнесенных *pro-S* и *pro-R* групп остатков Aib/Iva подчеркнуты и приведены в последовательности *pro-S/pro-R*.

[b]) ND – КССВ не определяли из-за перекрытия сигналов в HNCA спектре.

[c]) Измеренные КССВ сравнивали с рассчитанными по опубликованной кристаллической структуре Aam-I (PDB 1JOH [429]).

[d]) Значения СКО, которые превышают экспериментальную ошибку измерения КССВ (0.5 Гц), показаны жирным шрифтом.

[e]) Значения P_R, однозначно соотнесенные с правозакрученной конформацией, подчеркнуты, для других остатков значения P_R могут быть заменены на 1- P_R.

Измеренные значения КССВ $^3J_{HNC}$ and $^3J_{HNC}{}^{\beta}$ для остатков Aib/Iva из *C*-концевого сегмента Aam-I (Aib9, Iva12, Aib14) совпадали с теоретически рассчитанными значениями (Табл. 4.2). *pro-S* группа демонстрировала «большую» константу $^3J_{HNC}{}^{\beta}$ (~ 2.0 Гц), в то время как *pro-R* группа – «малую» (< 1.0 Гц). В то же время КССВ для остатков Aib/Iva из *N*-концевого сегмента пептида (Aib2, Aib4 и Iva5) не совпадали с ожидаемыми значениями, что указывало либо на отсутствие спиральной конформации, либо на присутствие динамического усреднения КССВ между несколькими состояниями. «Средняя» величина $^3J_{HNC}{}^{\beta}$ (1.4 Гц), наблюдаемая для *pro-R* метильной группы остатка Aib8 из середины спирали Aam-I, также указала на наличие динамического усреднения между несколькими конформациями угла φ для этого остатка.

Детальное сравнение измеренного набора КССВ с константами, рассчитанными по опубликованной кристаллической структуре Aam-I (PDB 1JOH [429]), выявило несоответствие структур пептида в кристалле и в растворе метанола (Табл. 4.2, колонка «Крист. Структура»). Для сравнения для каждого из торсионных углов α (φ или ψ) пептидной молекулы было рассчитано среднеквадратичное отклонение (*СКО*) между наблюдаемыми (J^{OBS}) и теоретически рассчитанными по кристаллической структуре (J^{CALC}) КССВ (для расчета использовали уравнения Карплюса из [471–473]).

$$СКО(\alpha) = \sqrt{\frac{\sum_i^N (J_i^{OBS} - J_i^{CALC}(\alpha))^2}{N}} \qquad \text{(Ур. 4.1),}$$

Используя измеренный набор КССВ, зависящих от угла φ, были смоделированы две возможные ситуации (1) наличие одной «доминирующей» конформации молекулы Aam-I в растворе, соответствующей наблюдаемым КССВ; и (2) быстрое динамическое усреднение между двумя конформационными состояниями. В последнем случае предполагалось, что эти состояния (правозакрученное и левозакрученное) характеризуются одинаковыми по амплитуде, но разными по знаку значениями углов φ ($\Phi_L = -\Phi_R$) и разными относительными заселенностями (P_R и $1-P_R$). Значения Φ_R и P_R были получены путем минимизации следующей функции $СКО_2$:

$$СКО_2(\Phi_R, P_R) = P_R \cdot СКО(\Phi_R) + (1 - P_R) \cdot СКО(-\Phi_R) \qquad \text{(Ур. 4.2).}$$

Как показано в Табл. 4.2, измеренный набор КССВ лучше соотносится с динамическим усреднением между правозакрученным и левозакрученным состояниями (колонка «Два симметричных значения φ»), чем с одной «доминирующей» конформацией Aam-I в растворе (колонка «Одно значение φ»). Наблюдаемые для остатков Gly6 и Phl16 значения $СКО_2$, превышающие экспериментальную ошибку измерения КССВ (0.5 Гц), могут быть объяснены более сложным динамическим поведением остатка Gly и некорректной параметризацией уравнений Карплюса для остатка Phl (L-фенилаланинол, в

работе использовали параметризацию для Phe). Следует отметить, что аналогичное несоответствие значений КССВ для остатка Phl наблюдалось в случае Zrv-IIB (данные не показаны).

Полученные значения Φ_R и P_R (Табл. 4.2) подтверждают предположение о том, что *N*-концевой сегмент (остатки Phe1-Gly6 и, возможно Aib8) молекулы Aam-I в метаноле совершает быстрые (по шкале хим. сдвигов ЯМР) обменные переходы между правозакрученной и левозакрученной спиральными конформациями. При этом оба состояния имеют примерно равную заселенность. Полученные результаты позволяют объяснить все противоречия в ЯМР-данных, описывающих конформацию пептида в растворе, и прекрасно согласуются с результатами исследования пептида методом КД-спектроскопии (п. 4.1.1.2). Принимая во внимание результаты экспериментального определения системы водородных связей в этом сегменте (Рис. 4.15), мы можем сделать вывод, что оба состояния *N*-концевого сегмента молекулы Aam-I представляют собой 3_{10}-спирали.

Следует отметить, что аналогичные быстрые (по шкале ЯМР) переходы между правозакрученной и левозакрученной 3_{10}-спиральными конформациями в растворе ранее наблюдались для гексамерной, октамерной и декамерной poly-Aib последовательностей [475,481]. Эти переходы отличались высокой кооперативностью, высокой скоростью (~ 1200 переходов в секунду при комнатной температуре для декамера) и небольшой свободной энергией активации (~ 1.1 кКал*$М^{-1}$ на остаток Aib).

Конформация боковых цепей Aam-I в метаноле была определена на основании анализа КССВ, зависящих от торсионного угла χ^1 ($^3J_{NH}{}^{\beta}$ и $^3J_H{}^{\alpha}{}_H{}^{\beta}$), а также интенсивностей ЯЭО кросс-пиков в спектре ROESY. Как оказалось, наиболее заселенный ротамер боковых цепей L-остатков Gln11 и Phl16 имеет угол $\chi1 = -60°$ (*g*+), в то время как боковая цепь Phe1 свободно вращается вокруг C^{α}-C^{β} связи. Боковые цепи D-остатков Iva также имеют один наиболее заселенный ротамер (+60°) угла $\chi^{1,1}$ (вращение вокруг C^{α}-(*pro-R)*C^{β} связи). Пирролидиновые кольца остатков Hyp10 и Hyp13 имеют *Up* конформацию, а кольцо Pro15 находится в плоском или усредненном *Twist* состоянии. Полученные результаты в общем совпадают с результатами анализа конформации боковых цепей Zrv-IIB в метаноле (см. п. 4.1.2).

4.2.1.4 Использование магнитной неэквивалентности $^{13}C^{\beta}$ ядер остатков Aib и Iva ($\Delta\delta^{13}C^{\beta}$) для исследования динамики основной цепи молекул пептаиболов

Процесс(ы) быстрого конформационного обмена между правозакрученной и левозакрученной 3_{10}-спиральными состояниями позволяют объяснить наблюдаемые малые величины $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ на *N*-концевом сегменте Aam-I (Рис. 4.14Б). Полученные

результаты указывают на возможность использования магнитной неэквивалентности $^{13}C^{\beta}$ ядер для прямого анализа динамики основной цепи пептидов, содержащих остатки Aib и Iva. Из-за очень узкого диапазона углов φ/ψ, которые стерически доступны этим остаткам, наблюдаемые значения $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ должны преимущественно зависеть от относительной заселенности правозакрученной и левозакрученной спиральных конформаций и от химического строения близлежащей карбонильной группы (вторичный амид, пептидная связь Aib-Xxx или третичный амид, пептидная связь Aib-Pro/Hyp).

Для того, чтобы подтвердить эту гипотезу были проанализированы $^{13}C^{\beta}$ химические сдвиги остатков Aib/Iva в опубликованных структурах пептаиболов, для которых методом ЯМР было (i) установлено наличие правозакрученной спиральной конформации, (ii) показано отсутствие процессов конформационного обмена, связанных с изменением закрутки спирали, а также (iii) проведено стереоспецифическое отнесение сигналов $^{13}C^{\beta}$. Были использованы данные для: хрисоспермина (chrysospermin) C в окружении мицелл DPC [442], харзианина (harzianin) HC-IX [437], псевдоконина (pseudokonin) KL-III и KL-VI [482] и Zrv-IIB в метаноле (п. 4.1.3.1). *N*- и *C*-концевые остатки Aib были исключены из статистического анализа из-за возможной подвижности. Кроме того, были использованы данные для остатков Aib/Iva из *C*-концевого сегмента Aam-I (Aib9-Phl16), в котором на основании анализа КССВ не было обнаружено динамических изменений направления закрутки спирали (см. выше).

Результаты статистического анализа химических сдвигов $^{13}C^{\beta}$ позволили установить, что в правозакрученной дипептидной последовательности Aib-Xxx значения $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ равны +4.01±0.55 м.д. (8 случаев). Для правозакрученных дипептидных последовательностей Aib-Pro(Hyp) $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ равны -2.41±0.50 м.д. (11 случаев). Для остатков Iva были получены следующие значения $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$: последовательность Iva-Xxx -3.04±0.43 м.д. (3 случая) и последовательность Iva-Hyp -8.40 м.д. (один случай). Предполагая, что полученные средние значения для остатков Aib соответствуют 100% заселенной правозакрученной конформации и то, что в случае левозакрученной конформации значения $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ должны менять знак, мы можем записать два уравнения, связывающих наблюдаемые значения $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ с заселенностью правозакрученной конформации (P_R).

$$P_R^{Aib-Axx} = 0.5 \cdot (1 + \frac{\Delta\delta^{13}C^{\beta}}{+4.0 м.д.}) \quad P_R^{Aib-\mathrm{Pro/Hyp}} = 0.5 \cdot (1 + \frac{\Delta\delta^{13}C^{\beta}}{-2.4 м.д.}) \qquad \text{(Ур. 4.3)}$$

Предполагая, что значения $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ для остатка Iva могут быть представлены в виде суммы, независящей от конформации «химической» составляющей (разница химических сдвигов между метильной и метиленовой $^{13}C^{\beta}$ группой в конформации развернутого клубка) и компоненты, зависящей от конформации, и в первом приближении равной аналогичной зависимости для остатка Aib, мы можем записать аналогичные уравнения

для Iva. При этом, полученные статистические данные позволяют оценить «химическую» составляющую $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ для остатка Iva (-6.78±0.63 м.д.).

$$P_R^{Iva-Axx} = 0.5 * (1 + \frac{\Delta\delta^{13}C^{\beta} + 6.8 м.д.}{+4.0 м.д.}) \qquad P_R^{Iva-Pro/Hyp} = 0.5 * (1 + \frac{\Delta\delta^{13}C^{\beta} + 6.8 м.д.}{-2.4 м.д.}) \qquad \text{(Ур. 4.4)}$$

Применение предложенных уравнений к остаткам из *N*-концевого сегмента Aam-I дает значения заселенности правозакрученной конформации (P_R) (Рис. 4.14Б), практически совпадающие со значениями, полученными из анализа КССВ (Табл. 4.2, колонка «Два симметричных значения φ»). Более того, значение $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ для Aib8 (2.6 м.д.) указывает на то, что этот остаток также подвержен «конформационному усреднению», что совпадает с результатами, полученными из анализа КССВ.

Приведенные данные подтвердили применимость подхода, основанного на анализе магнитной неэквивалентности $^{13}C^{\beta}$ ядер для прямых исследований динамики основной цепи пептидов, содержащих остатки Aib и Iva в растворе. При применении предложенного подхода следует учитывать несколько факторов: (i) уравнения 4.3 и 4.4 правомерны только в случае быстрого (по шкале хим. сдвигов ЯМР) конформационного обмена (т.е. в тех случаях, когда для изучаемой молекулы наблюдается только один набор ЯМР-сигналов); (ii) эти уравнения дают информацию о динамических движениях с участием торсионного угла ψ основной цепи, в то время как анализ КССВ (Табл. 4.2, Ур. 4.1 и 4.2) дает информацию о движениях с участием угла φ; (iii) определение направления закрутки спирали пептида требует предварительного стереоспецифического отнесения C^{β} метильных групп остатков Aib (отнесение в случае остатков Iva – тривиально из-за различной химической природы C^{β} групп). Максимальная ошибка при определении значений P_R из уравнений 4.3 и 4.4 составляет 10% и 30%, соответственно. Вероятно, основным источником ошибок является зависимость $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ от точного значения торсионного угла ψ в структуре пептида. Так, например, наибольшее известное из литературы значение $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ для остатка Aib равно 5.3 м.д. [475], что отличается от значения 4.01 м.д., принятого в настоящей работе для полностью правозакрученной конформации.

4.2.1.5 Динамика основной цепи Aam-I в метаноле по данным релаксации ядер ^{15}N

Использование ^{15}N-меченого аналога Aam-I и данных о релаксации ядер ^{15}N позволило провести дополнительные исследования динамики основной цепи пептида в метаноле в двух диапазонах времен: в диапазоне «быстрых» движений (пико-наносекунды) и в диапазоне «медленных» конформационных флуктуаций/конформационного обмена (микро-миллисекунды), а также охарактеризовать общую вращательную диффузию молекулы Aam-I в растворе. Следует отметить, что

ранее применение подобного подхода для исследования Zrv-IIB в метаноле позволило выявить процессы конформационного обмена в мкс-мс диапазоне на полярной стороне спирали пептида [459], возможно связанные с изменением геометрии или перестройкой системы водородных связей (Рис. 4.9)[1].

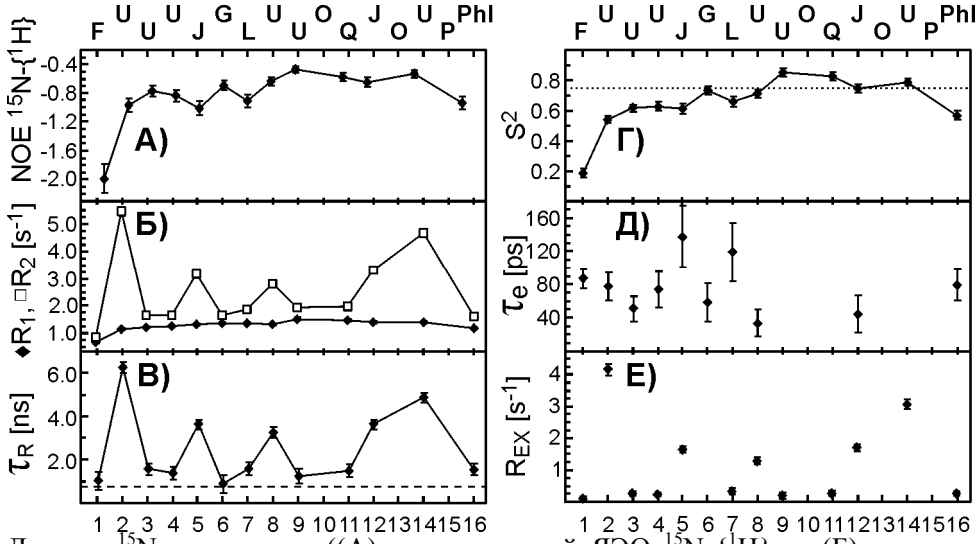


Рис. 4.16. Данные ^{15}N релаксации ((А) гетероядерный ЯЭО ^{15}N-{^{1}H}, и (Б) скорости R_1, R_2) и динамика основной цепи для 1 мМ ^{15}N-Aam-I в CD_3OH (pH 6.2; 30°C, 60 МГц). (В) Эффективные значения τ_R для каждого остатка были рассчитаны из отношения R_2/R_1. Общее время вращательной корреляции молекулы (τ_R 0.76 нс), полученное в ходе «модель-независимого» анализа релаксационных данных, показано пунктиром. (Г,Д,Е) Параметры движений основной цепи пептида, полученные в результате применения «модель-независимого» подхода. (Г) S^2 – параметр порядка движений в пс-нс диапазоне времен. Остатки, демонстрирующие $S^2 < 0.75$ (пунктир), совершают значительные движения в этом диапазоне. (Д) τ_e – характерные времена пс движений. (Е) R_{EX} – вклад мкс-мс обменных процессов в скорость R_2 релаксации ядер ^{15}N.

На ЯМР-спектрометре с частотой резонанса ^{15}N 60 МГц для Aam-I были измерены скорости трех релаксационных процессов, протекающих в спиновой паре ^{1}H-^{15}N (скорости продольной R_1 и поперечной R_2 релаксации ядра ^{15}N и величина гетероядерного ЯЭО ^{15}N-{^{1}H}, Рис. 4.16). Анализ релаксационных данных проводили с использованием «модель-независимого подхода» в программе FastModelFree [369].

Общая реориентация молекулы Aam-I в метаноле происходит с характерными временами τ_R ~ 0.76 нс (30°C), что совпадает со значением (0.75 нс, 31°C), полученным ранее для Zrv-IIB [459]. Кроме того, оба пептида демонстрировали схожее распределение пс-нс движений, демонстрируя параметры порядка S^2 в диапазоне от 0.6 до 0.8. При этом наибольшая подвижность в этом диапазоне (наименьшие значения S^2) наблюдалась для *N*- и *C*-концевых остатков (Рис. 4.16Г). Однако распределение и амплитуда мкс-мс конформационных флуктуаций, выраженная в величине вклада обменных процессов в скорость R_2 релаксации ядер ^{15}N (R_{EX}) для двух пептидов разительно отличалась. В молекуле Zrv-IIB значительные вклады R_{EX} с амплитудой <0.6 Гц (значение шкалировано

[1] Чтобы избежать путаницы отметим, что «медленные» μс-мс конформационные флуктуации (конформационный обмен) в свою очередь могут быть «быстрыми» или «медленными» по шкале химических сдвигов (шкале ЯМР).

на частоту ^{15}N 60 МГц) наблюдались только для остатков Thr6, Aib7, Aib8 и Aib14 (Рис. 4.9). В то же время амплитуда детектируемых вкладов R_{EX} для остатков Aib2, Iva5, Aib8, Iva12 и Aib14 Aam-I была значительно больше (1-4 Гц, Рис. 4.16E).

Полученные данные показали, что процесс перехода между правозакрученной и левозакрученной конформациями на остатках Phe1-Gly6 и Aib8 идет с характерными временами в диапазоне мкс-мс. Вероятно, дипептидные фрагменты Phe1-Aib2 и Aib4-Iva5, содержащие остатки L-Phe и D-Iva, для которых детектируются большие вклады R_{EX}, выступают в качестве центров нуклеации кооперативного изменения направления закрутки спирали на *N*-концевом (Phe1-Gly6) сегменте пептида. Наблюдение большой величины R_{EX} для Aib8 подтвердило наличие обменного процесса между правозакрученной и левозакрученной конформациями этого остатка. Однако связь этого процесса с кооперативными перестройками конформации фрагмента Phe1-Gly6 не могла быть подтверждена на основе экспериментальных данных.

Большие значения R_{EX}, наблюдаемые для остатков Iva12 и Aib14 (Рис. 4.16E), которые согласно данным КССВ и $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ имеют полностью правозакрученную конформацию, возможно связаны с другими факторами. Например, с флуктуацией системы водородных связей ($\alpha \leftrightarrow 3_{10} \leftrightarrow$ водородная связь с растворителем), как это было предложено в случае Zrv-IIB (п. 4.1.3.3).

4.2.1.6 Моделирование пространственной структуры Aam-I в метаноле

Для моделирования пространственной структуры различных конформационных состояний Aam-I в метаноле был использован метод Монте-Карло, сопряженный с энергетической минимизацией в программе FANTOM [483] и силовым полем ECEPP/3 [484]. Для учета эффектов растворителя использовали неявно заданную модель октанола [485]. Для ограничения конформационного пространства, доступного пептиду, были наложены ограничения, фиксирующие экспериментально определенную систему водородных связей. Кроме того, торсионные углы основной цепи на участке (Aib9-Phl16) были ограничены правозакрученной спиральной конформацией. Торсионные углы *N*-концевого фрагмента (Phe1-Iva5) поочередно ограничивались правозакрученной и левозакрученной конформациями. Торсионные углы шарнирного региона (Gly6-Aib8) в ходе симуляции не ограничивали.

Результаты моделирования структуры Aam-I в метаноле показаны на рисунке 4.17. Наиболее энергетически выгодная (-83.6 кКал·М$^{-1}$) структура пептида соответствовала конформации правозакрученной спирали (Рис. 4.17A). Набор структур с левой закруткой *N*-концевого сегмента имел сравнимую минимальную энергию (-82.7 кКал·М$^{-1}$). Эти структуры демонстрировали значительный изгиб в шарнирном регионе, который позволял

формировать контакты Ван-дер-Ваальса между *N*-концевым и *C*-концевым ароматическими остатками (Phe1 и Phl16, Рис. 4.17Б), которые энергетически компенсировали разрушение системы водородных связей в середине молекулы. Следует отметить, что в ходе симуляции также были получены «менее изогнутые» структуры пептида с левой закруткой *N*-концевого сегмента (Рис. 4.17В), однако такая конформация имела большую энергию (-77.2 кКал·М$^{-1}$). Основное отличие между двумя классами структур с левой закруткой *N*-концевого сегмента заключалось в конформации остатка Aib8. В «сильно изогнутых» структурах этот остаток имел левозакрученную конформацию (Рис. 4.17Б), а в «менее изогнутых» – правозакрученную (Рис. 4.17В).

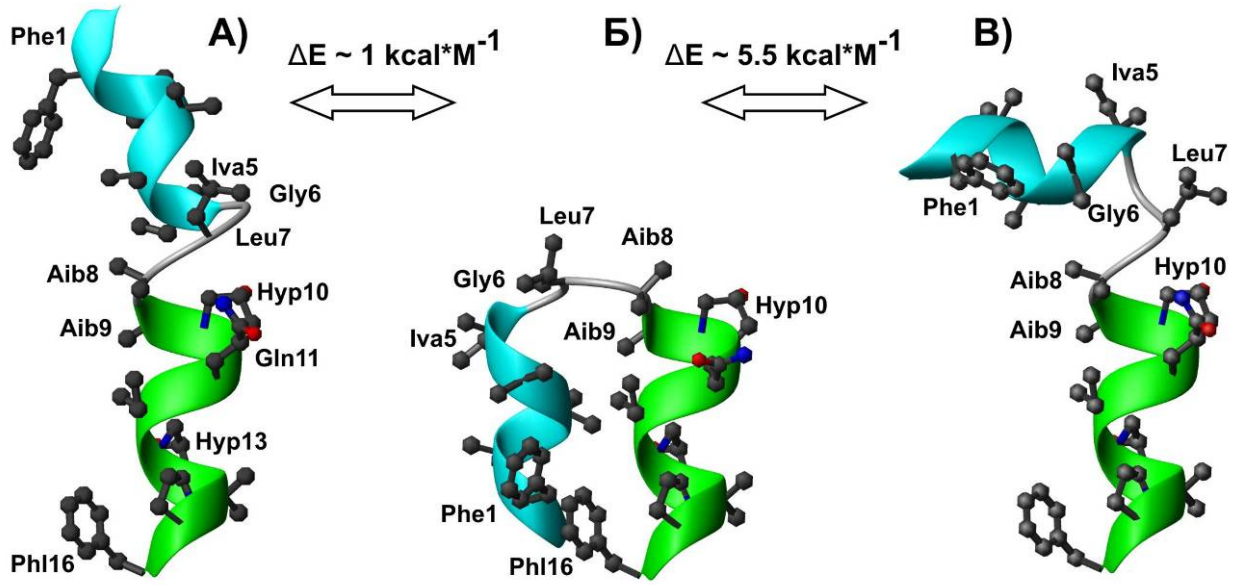


Рис. 4.17. Молекулярное моделировании обменных процессов в структуре Aam-I в метаноле. (А) Энергетически наиболее выгодная (полностью правозакрученная) конформация пептида. (Б) Наиболее энергетически выгодная структура пептида с левой закруткой спирали *N*-концевого сегмента. (В) Структура Aam-I с левой закруткой *N*-концевого сегмента и правой закруткой остатка Aib8.

Результаты проведенных вычислений подтвердили вовлечение остатка Aib8 в обменные процессы, связанные с изменением закрутки спирали *N*-концевого фрагмента Aam-I. Более того, процессы изменения направления закрутки сегмента Phe1-Gly6 и остатка Aib8, вероятно, скоррелированы. Согласно полученным данным, изменение конформации остатка Aib8 может сопровождаться высокоамплитудными спираль-изгибающими движениями вокруг шарнирного региона Gly6-Leu7-Aib8-Aib9-Hyp10 (Рис. 4.17БВ). Следует отметить, что ранее схожие движения, приводящие к значительному пространственному сближению *N*- и *C*-концевых фрагментов пептида, экспериментально наблюдались в спин-меченых аналогах аламетицина (Alm) в метаноле [231]. В Alm в качестве шарнирного региона выступает мотив Gly11-Leu12-Aib13-Pro14. Тот факт, что оба пептида (Alm и Aam-I) в метаноле демонстрируют значительную степень гидратации основной цепи у амидных связей Gly11-Leu12 и Leu7-Aib8, соответственно, указывает на

то, что взаимодействие групп основной цепи пептида с растворителем в области шарнирного региона необходимо для высокоамплитудных спираль-изгибающих движений. В согласии с этой гипотезой в молекуле Zrv-IIB в метаноле не было обнаружено ни значительной гидратации групп основной цепи, ни высокоамплитудных спираль-изгибающих движений (см. п. 4.1). Как уже отмечалось, стабильность шарнирного региона Zrv-IIB может быть вызвана заменой Gly11/Leu7(Alm/Aam-I) на стерически ограниченный остаток Aib7 (Zrv-IIB).

4.2.2 Структура и динамика Aam-I в окружении бицелл DMPC/DHPC, сравнение с Zrv-IIB в мицеллах DPC

4.2.2.1 2D $^{1}H,^{15}N$-корреляционные спектры Aam-I в мембраномоделирующих средах на основе детергентов

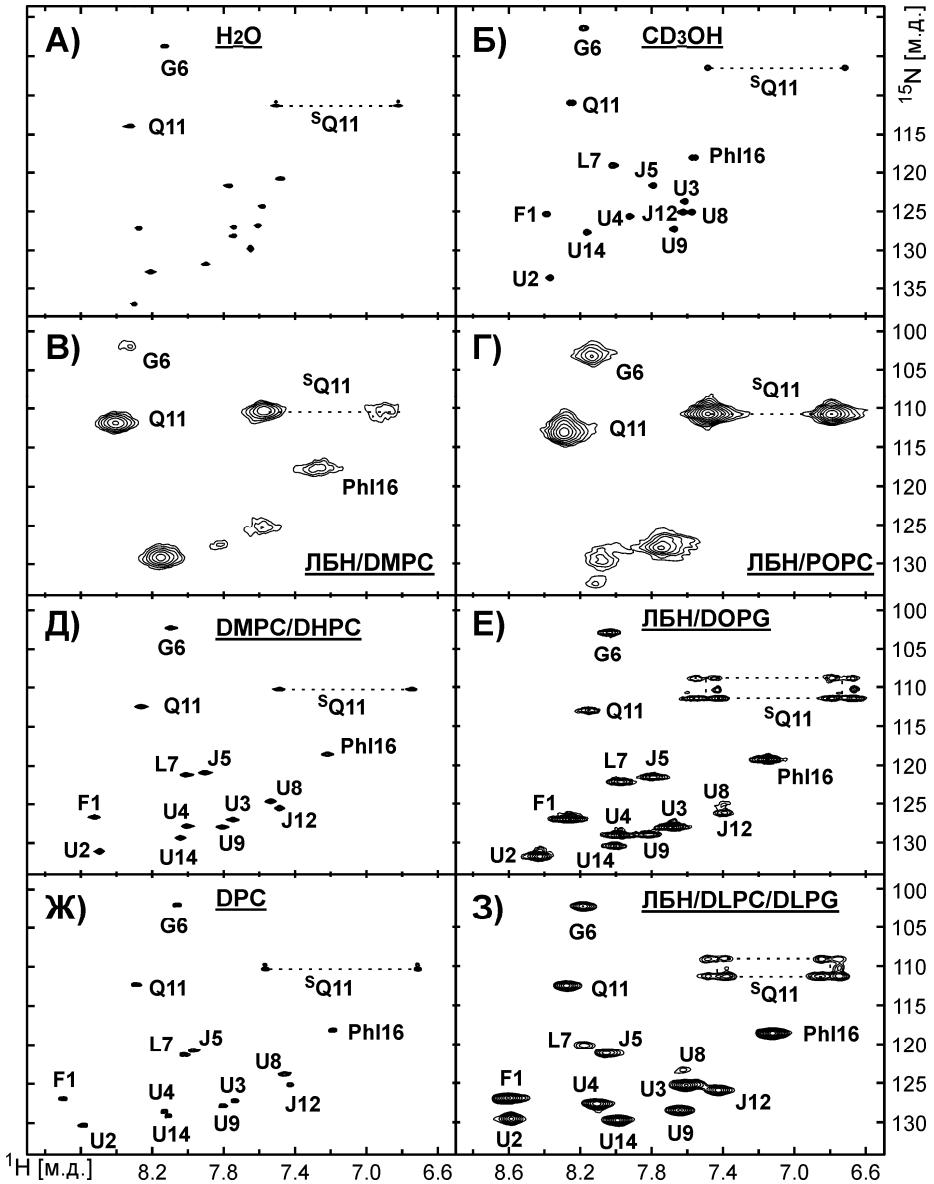


Рис. 4.18. 2D $^{1}H,^{15}N$-корреляционные спектры Aam-I в воде (А), метаноле (Б), нанодисках, содержащих DMPC (В), POPC (Г), DOPG (Е) и смесь DLPC/DLPG (4:1) (З), а также в бицеллах DMPC/DHPC (1:4) (Д) и мицеллах DPC (Ж). Спектры (А, Б, Д, Ж), (Е, З), и (В, Г) измерены с использованием HSQC, TROSY, и HMQC-CRINEPT экспериментов, соответственно. Спектры (А, Б, Д, Ж) и (В, Г, Е, З) измеряли при 40ºC и 45ºC, соответственно. Спектры (А, Д, Ж) и (В, Г, Е, З) измерены в 10 мМ NaAc буфере (pH 5.2) и

$^{13}C,^{15}N$-меченый аналог Aam-I исследовали в мембраномоделирующем окружении бицелл DMPC/DHPC (1:4, q=0.25), которые состоят из смеси длинноцепочечного (DMPC diC14:0) и короткоцепочечного (DHPC diC6:0) цвиттер-ионных липидов. Следует

отметить, что DHPC в растворе демонстрирует свойства, типичные для детергентов: образует мицеллы и имеет ККМ ~ 10 мМ [101]. ЯМР-исследование проводили при соотношении пептид/липид 1:150 (1мМ Aam-I, 30 мМ DMPC, 120 мМ DHPC, общее содержание липидов 7.5% в/в). Практически полное (за исключением ароматических боковых цепей) отнесение ^{1}H, ^{13}C и ^{15}N сигналов Aam-I получено, используя стандартные методы ЯМР-спектроскопии тройного резонанса [31]. Стереоспецифическое отнесение протонов в прохиральных метиленовых группах и метильных групп остатков Aib было получено в ходе расчета пространственной структуры (см. ниже).

Высокая чувствительность химических сдвигов HN групп основной цепи к структурным изменениям позволяет рассматривать 2D ^{1}H,^{15}N-корреляционный спектр как сигнатуру (отпечаток пальца) пространственной структуры белковой или пептидной молекулы. Для качественного анализа структуры Aam-I было проведено сравнение ^{1}H и ^{15}N химических сдвигов пептида в метаноле и анизотропных средах, содержащих детергенты (бицеллы DMPC/DHPC, мицеллы DHPC, DPC, LMPC, LMPG и SDS). Репрезентативные спектры показаны на Рис. 4.18, репрезентативные данные по сравнению химических сдвигов показаны на Рис. 4.19.

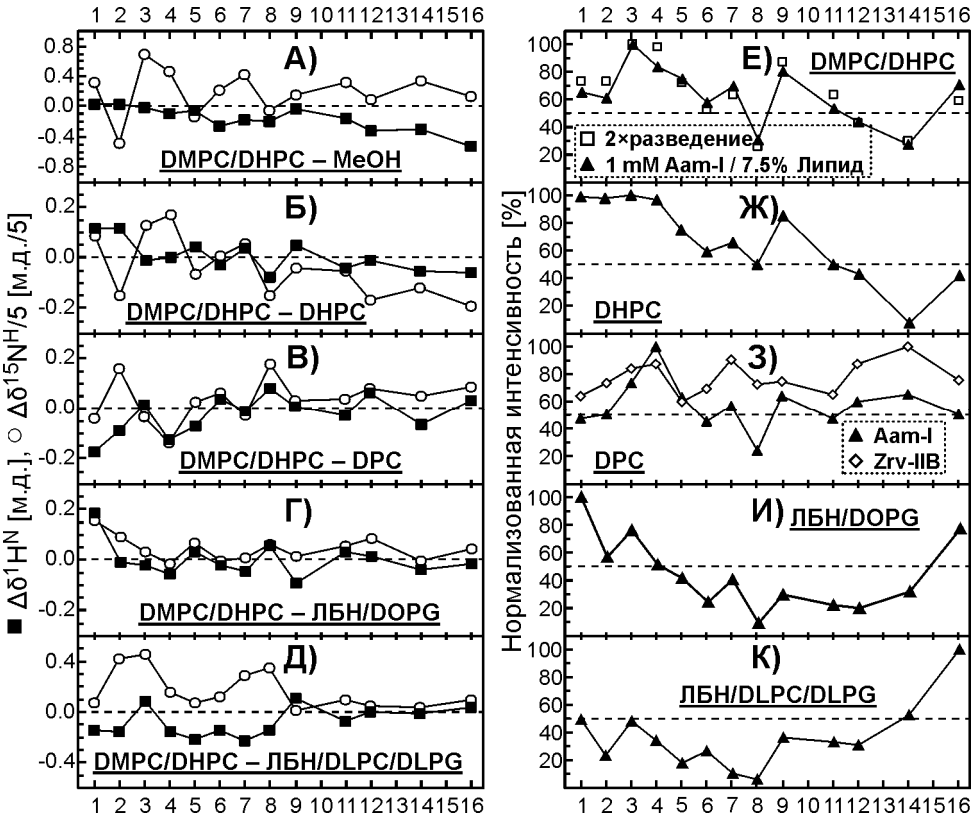


Рис. 4.19. Сравнение спектральных характеристик Aam-I в метаноле, бицеллах DMPC/DHPC (1:4), мицеллах DHPC и DPC, и ЛБН, содержащих липиды DOPG и DLPC/DLPG (4:1). (А-Д) Изменение химических сдвигов ^{1}H и ^{15}N основной цепи пептида. Внимание! Вертикальные оси имеют разные шкалы. (Е-К) Нормализованная амплитуда (интенсивность) кросс-пиков ^{1}H-^{15}N. Уровни 0.0 м.д. и 50% показаны пунктиром

Значительные изменения химических сдвигов основной цепи (значения $\Delta\delta^{1}H^{N}$ и $\Delta\delta^{15}N^{H}$ до 0.5 м.д. и 3.5 м.д., соответственно) наблюдались при переводе Aam-I из метанола в анизотропное окружение бицелл DMPC/DHPC (Рис. 4.19А). Наблюдаемые значения $\Delta\delta^{15}N^{H}$ демонстрировали спиральную (*i,i+3* and *i,i+4*) периодичность. При этом наибольшие $\Delta\delta^{15}N^{H}$ детектировались в *N*-концевом сегменте пептида, указывая на

возможное изменение содержания спиральной конформации в этом регионе. С другой стороны $^{1}H,^{15}N$-корреляционные спектры, измеренные в анизотропных мембраномоделирующих средах, были схожи ($\Delta\delta^{1}H^{N}$ и $\Delta\delta^{15}N^{H}$ < 0.2 и 1.0 м.д., соответственно, Рис. 4.19БВ). Полученные данные выявили схожесть пространственной структуры Aam-I во всех протестированных анизотропных мембраномоделирующих средах на основе детергентов. Тем не менее, различия в положении ^{1}H-^{15}N кросс-пиков Aam-I, наблюдаемые в бицеллах DMPC/DHPC и мицеллах чистого DHPC (Рис. 4.19Б), указали на взаимодействие между пептидом и липидной компонентой (DMPC) бицеллы.

4.2.2.2 Магнитная неэквивалентность 13Cβ ядер остатков Aib и Iva (Δδ13Cβ) в Aam-I и Zrv-IIB в анизотропных миметиках мембраны

Сравнение значений $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ для Aam-I в метаноле и бицеллах DMPC/DHPC (Рис. 4.20В) позволило подтвердить высказанное при анализе КД-спектров предположение (п. 4.1.1.2) о том, что взаимодействие пептида с анизотропной мембраномоделирующей средой ведет к стабилизации правозакрученной спиральной конформации. Относительные заселенности правозакрученного состояния (P_R рассчитаны из $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ согласно уравнениям 4.3 и 4.4) на участке Aib2-Iva5 увеличились от ~50% в метаноле до ~80 % в бицеллах. Значение P_R для остатка Aib8 возросло от ~80% до 100%, указывая на формирование полностью правозакрученной конформации. В то же время отличие рассчитанных значений P_R от 100% указало на сохранение некоторой подвижности в *N*-концевом сегменте пептида даже в комплексе с бицеллой. Эта подвижность, возможно, также связанная с конформационными переходами между правозакрученной и левозакрученной конформациями, имеет наибольшую амплитуду на остатке Aib2 (P_R ~70 %).

Значения $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ для $^{13}C,^{15}N$-меченого Zrv-IIB практически не менялись при переходе из метанола к мицеллам DPC (Рис. 4.20Г), боле того рассчитанные значения P_R превышали 85%, указывая на преобладание правозакрученной конформации в обеих средах.

4.2.2.3 Пространственная структура Aam-I в бицеллах DMPC/DHPC

Сводка данных ЯМР, полученная для Aam-I в бицеллах DMPC/DHPC, показана на Рис. 4.21А. Отсутствие дальних (i-j > 4) ЯЭО контактов, а также наблюдаемые контакты $d_{\alpha N}(i,i+2)$ и $d_{\alpha N}(i,i+3)$, распределенные по последовательности, указывают на правозакрученную спиральную конформацию пептида. КССВ $^{3}J_{H}{}^{N}{}_{H}{}^{\alpha}$ для остатков Phe1 and Leu7 (<6 Гц) также согласуются с правозакрученной α- или 3_{10}-спиральной конформацией *N*-концевого сегмента. КССВ $^{3}J_{H}{}^{N}{}_{H}{}^{\alpha}$ для Gln11 и Phl16 (>8 Гц) близки к значениям, наблюдаемым для Aam-I в метаноле, а также к значениям КССВ в других

пептаиболах (включая Zrv-IIB), имеющих конформацию β-bend ribbon spiral [437]. КССВ $^{3}J_{H}{}^{N}{}_{C'}$ для остатков Aib и Iva также имели значения, близкие к ожидаемым (1.6–3.4 Гц) в спиральной конформации. $d_{\alpha N}(i,i+4)$ ЯЭО контакты, обычно не наблюдаемые в конформации 3_{10}-спирали [23], позволили сделать предположение о формировании α-спирали на участках Phe1-Iva5 и Iva5-Aib9. Наличие одного набора сигналов в спектрах указало на отсутствие *cis-trans*-изомеров пептидных связей Xaa-Pro. *Trans*-ориентация пептидных связей Aib^{9}-Hyp^{10}, Iva^{12}-Hyp^{13} и Aib^{14}-Pro^{15} была установлена на основании наблюдения характеристических ЯЭО контактов.

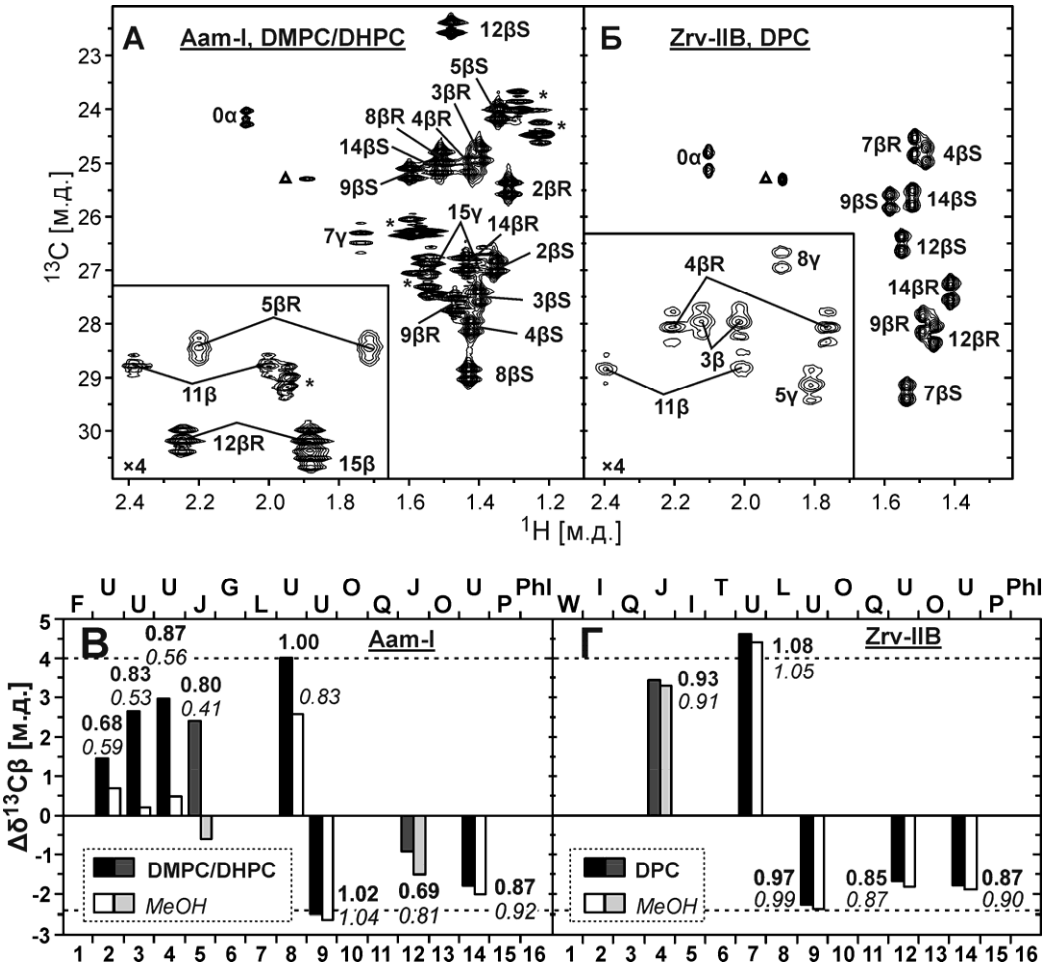
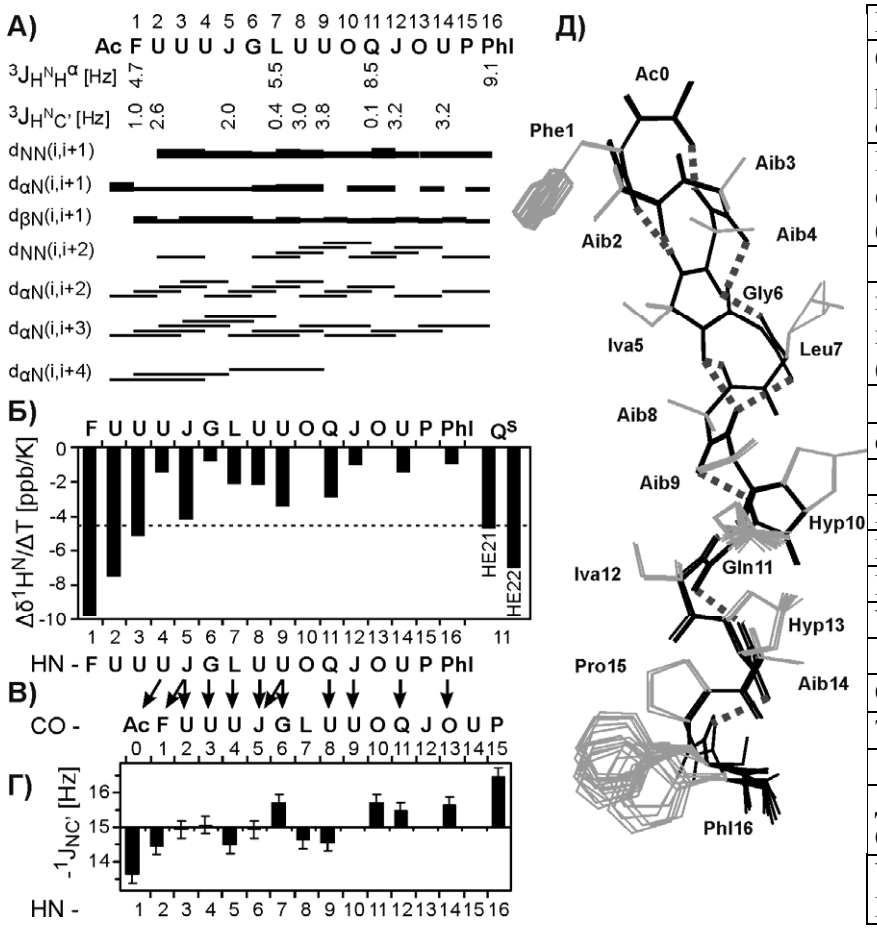


Рис. 4.20. (А,Б) Фрагменты 2D ^{13}C-HSQC спектров, измеренных для ^{13}C,^{15}N-меченых Aam-I и Zrv-IIB в бицеллах DMPC/DHPC и мицеллах d38-DPC, соответственно (10 мМ NaAc буфер, pH 5.2). Сигналы ацетата и липидов на натуральном содержании отмечены треугольниками и звездочками. (В,Г) Сравнение магнитной неэквивалентности $^{13}C^{\beta}$ ядер остатков Aib и Iva ($\Delta\delta^{13}C^{\beta}$) в Aam-I и Zrv-IIB в метаноле и анизотропных миметиках мембраны. Приведены рассчитанные по Ур. 4.3 и 4.4 заселенности правозакрученной конформации (P_R, для метанола – курсив). Пунктирные линии показывают уровни, соответствующие полностью правозакрученной конформации (P_R =1). Значения $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ для остатков Aib показаны черными (бицеллы/мицеллы) и белыми (метанол) прямоугольниками. К значениям $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$ для остатков Iva была прибавлена разность химических сдвигов между $^{13}C^{\beta}H_2$ и $^{13}C^{\beta}H_3$ группами в конформации развернутого клубка (6.8 м.д, Ур. 4.4).

Значения температурных градиентов амидных протонов ($\Delta\delta^{1}H^{N}/\Delta T$ Рис. 4.21Б) указали на формирование водородных связей всеми HN группами основной цепи на участке от Aib4 to Phl16. Значения прямых КССВ через пептидную связь ($^{1}J_{NC}$, Рис. 4.21Г) были распределены вокруг среднего значения -15.1 Гц, которое является типичным для

спиралей [460]. Резкие изменения значений $^1J_{NC}$, наблюдаемые для остатков Leu7 и Aib8, указали на наличие сайтов сильной гидратации в середине молекулы пептида на CO группе Gly6 и HN группах Aib8 и Aib9. Более того, HN группа Iva5 и CO группы Hyp10 и Gln11, вероятно, также формируют водородные связи с растворителем. Наблюдаемое для Aam-I в бицеллах распределение значений $^1J_{NC}$ по последовательности схоже с таковым у Aam-I в метаноле (см. раздел 4.4.1) и у аламетицина в метаноле [466] и не похоже на распределение, наблюдаемое для Zrv-IIB, где не было выявлено сайтов сильной гидратации основной цепи в середине молекулы (см. раздел 4.2.2.5).



Параметр	CYANA
Структуры рассчитанные, отобранные	40 20
Штрафная функция CYANA (Å^2)	0.93±0.01
Ограничения на расстояния	
верхние ЯЭО; водородн. связи (число);	196 20/20(10)
Ограничения на углы	
φ/ψ/χ^1	12/8/6
Нарушения ограничений	
Расст. (>0.2Å)	0
В.-д.-В. (>0.2Å)	2
В.-д.-В. (>0.4Å)	0
Углы (>1°)	0
СКО (Å) (Phe1-Phl16)	
Осн. Цепь	0.15±0.04
Тяжелые атомы	0.45±0.05
Геометрия спирали	
Длина (CH_3 Ac0 – CH_2OH Phl16) (Å)	26.7±0.5
Угол изгиба на Hyp10 (°)	26.3±0.6

Рис. 4.21. (А-Г) Сводка данных ЯМР, полученных для Aam-I (1 мМ) в бицеллах DMPC/DHPC (30/120 мМ 40ºC, 10 мМ NaAc буфер, pH 5.2), и (Д) рассчитанная пространственная структура пептида. (А) Карта ЯЭО контактов построена на основании 3D ^{15}N- и ^{13}C-NOESY-HSQC спектров с τ_m 100 мс. (Б) Температурные градиенты химических сдвигов H^N протонов, измеренные в диапазоне 280-320 K. Пунктирная линия (- 4.5 ppb/K) отделяет группы, возможно участвующие в образовании водородных связей [451]. (В) Система водородных связей, предложенная в ходе расчета пространственной структуры Aam-I. α-Спиральные и 3_{10}-спиральные водородные связи показаны наклонными и вертикальными стрелочками, соответственно. (Г) Прямые КССВ через пептидную связь $^1J_{NC}$. КССВ для пептидных связей, содержащих Pro/Hyp не были определены. (Д) набор 20-ти лучших структур Aam-I, совмещенных по атомам основной цепи (черные линии). Боковые цепи (только тяжелые атомы) показаны серым цветом. Водородные связи между группами основной цепи показаны пунктиром.

Рассчитанный по данным ЯМР набор 20 структур Aam-I и структурная статистика показаны на Рис. 4.21. Правозакрученная спираль пептида имеет длину ~26.7 Å и угол изгиба на остатке Hyp^{10} ~26°. *N*-концевой сегмент молекулы (Ac0-Aib9) имеет

конформацию 3_{10}-спирали, но содержит несколько α-спиральных водородных связей по краям (Рис. 4.21В). *C*-концевой сегмент (Hyp10-Phl16) имеет конформацию β-bend ribbon spiral. Сравнение полученной структуры (Рис. 4.22А) со структурой пептида, определенной методом РСА (Рис. 4.22Б), [429] указывает на различия в общей геометрии молекулы. Так, например, в кристаллической структуре спираль Aam-I имеет значительно больший угол изгиба на остатке Hyp^{10} (~50°). Небольшой изгиб молекулы Aam-I, наблюдаемый в растворе бицелл, лучше соотносится со структурой молекулы Zrv-IIB в окружении мицелл DPC, где угол изгиба спирали составляет ~20° (Рис. 4.22В)

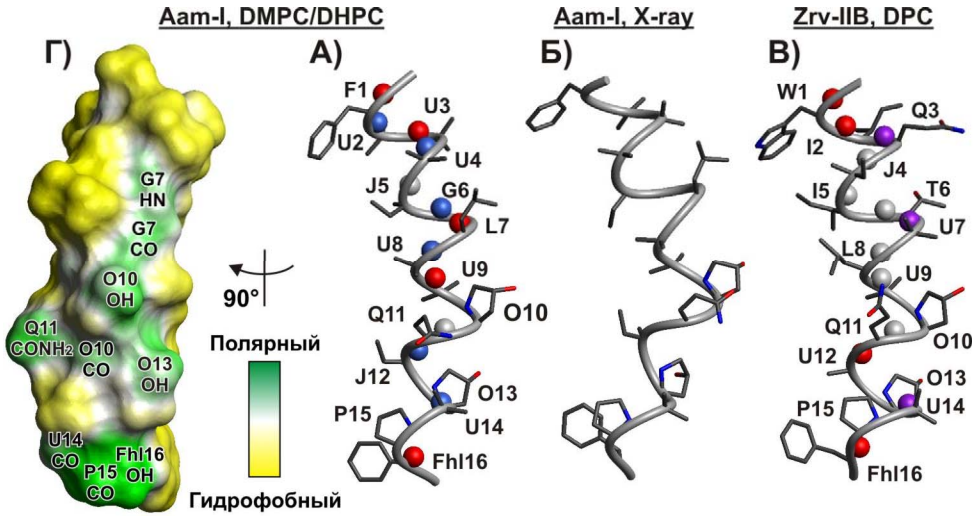


Рис. 4.22. Сравнение пространственной структуры Aam-I в бицеллах DMPC/DHPC (А) со структурой пептида в кристалле (Б, PDB 1JOH) и со структурой Zrv-IIB в мицеллах DPC (В). Результаты исследования динамики основной цепи Aam-I и Zrv-IIB схематически показаны на соответствующих панелях. NH группы, совершающие значительные движения в пс-нс и мкс-мс диапазонах времен (демонстрирующие параметры порядка $S^2<0.75$, или обменные вклады $R_{EX}>0$ Гц), показаны красными и синими сферами. NH группы, участвующие в движениях на двух временных диапазонах, показаны фиолетовым. (Г) Распределение потенциала молекулярной гидрофобности [240] на поверхности пептида.

Распределение потенциала молекулярной гидрофобности [240] на поверхности молекулы Aam-I (Рис. 4.22Г) указывает на амфифильность спирали пептида. Полярный регион сформирован на выпуклой стороне спирали группами основной и боковых цепей остатков Gly7, Hyp10, Gln11 и Hyp13. Полярность *C*-концевого участка молекулы дополнительно усилена экспонированными карбонилами остатков Aib14, Pro15 и *C*-концевой спиртовой группой Phl16. Распределение полярных и гидрофобных регионов на поверхности Aam-I схоже с распределением, наблюдаемым для Zrv-IIB (Рис. 4.13Б).

4.2.2.4 Динамика основной цепи Aam-I в бицеллах DMPC/DHPC и других анизотропных миметиках мембраны

Для исследования динамики основной цепи Aam-I в бицеллах DMPC/DHPC на ЯМР-спектрометре с частотой резонанса ^{15}N 60 МГц были измерены скорости четырех релаксационных процессов, протекающих в спиновой паре ^1H-^{15}N (скорости продольной R_1 и поперечной R_2 релаксации ядра ^{15}N, величина гетероядерного ЯЭО ^{15}N-{^1H} и

скорость η_{XY} процесса кросс-корреляции между диполь-дипольной релаксацией и релаксацией, возникающей благодаря анизотропии химического сдвига ядра ^{15}N, Рис. 2.23А-В). Анализ релаксационных данных проводили с использованием «модель-независимого подхода» в программе FastModelFree [369]. Согласно полученным данным, общая реориентация молекулы Aam-I в комплексе с бицеллой происходит с характерными временами τ_R ~10.1 нс (35°C). Это соответствует движению сравнительно большой частицы с гидродинамическим радиусом (R_H) ~24.2 Å. Полученное значение R_H меньше гидродинамического радиуса, ожидаемого для бицеллы DMPC/DHPC при q=0.25 (~28 Å) [101], что указывает на наличие дополнительных степеней свободы у молекулы пептида в комплексе с бицеллой.

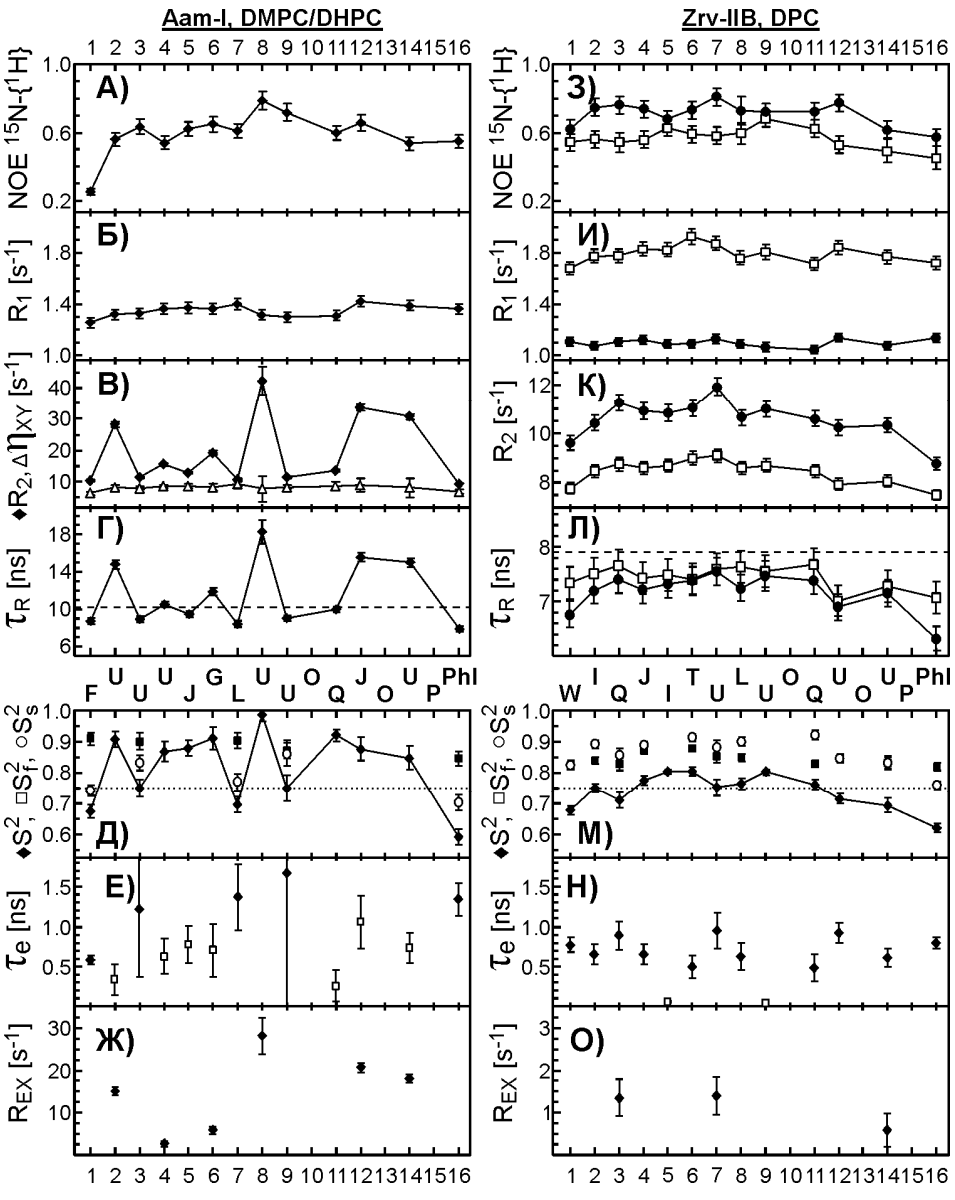


Рис. 4.23. Данные ^{15}N релаксации (ЯЭО ^{15}N-{^{1}H} и R_1, R_2 и η_{XY} (только для Aam-I)) и «модель-независимые» параметры движений основной цепи Aam-I в бицеллах DMPC/DHPC (35°C, 60 МГц) и Zrv-IIB в мицеллах DPC (30°C, 50 МГц (незаполненные квадраты) и 80 МГц (заполненные квадраты)). (Г,Л) Общее время вращательной корреляции (τ_R) молекул (10.1 нс для Aam-I и 7.9 нс для Zrv-IIB) показано пунктиром. (ДМ) S^2, S^2_f и S^2_s – общий параметр порядка пс-нс движений, параметр порядка быстрых пс движений и параметр порядка медленных пс-нс движений, соответственно. Остатки, демонстрирующие $S^2 < 0.75$ (пунктир), совершают значительные движения в пс-нс диапазоне. (Е,Н) τ_e – характерные времена пс-нс движений. (Ж,О) R_{EX} – вклад мкс-мс обменных процессов в скорость R_2 релаксации ядер ^{15}N.

В окружении бицелл конформационные флуктуации в мкс-мс диапазоне времен наблюдались для остатков Aib2, Aib4, Gly6, Aib8, Iva12 и Aib14 (Рис. 2.23Ж). Наибольшие вклады обменных движений в релаксацию (R_{EX} =15–30 Гц) детектировали для Aib2, Aib8,

Iva12 и Aib14. В то же время значительные движения в наносекундном диапазоне (параметры порядка S^2 < 0.75, характерные времена движений τ_e=0.5–1.5 нс) были обнаружены у остатков Phe1, Aib3, Leu7, Aib9, и Phl16 (Рис. 2.23ДЕ). Вероятно, другие остатки пептида также участвуют в движениях на этом диапазоне времен, однако эти движения скрыты влиянием мкс-мс обменных процессов на релаксацию. Распределение полученных динамических данных на молекуле Aam-I (Рис. 4.22А) указывает на то, что практически вся основная цепь пептида участвует в значительных движениях на разных диапазонах времен. Следует отметить, что наибольшая подвижность в пс-нс диапазоне времен (S^2<0.7) наблюдается для *N*- и *C*-концевых остатков пептида.

Из-за вкладов R_{EX} в поперечную релаксацию ядер ^{1}H и ^{15}N движения в мкс-мс диапазоне часто приводят к значительному уширению и, соответственно, к уменьшению амплитуды HN сигналов. Так, для Aam-I в бицеллах DMPC/DHPC значительное ослабление интенсивностей ^{1}H-^{15}N кросс-пиков (<50% от амплитуды наиболее интенсивного кросс-пика) наблюдалось для остатков Aib8, Iva12 и Aib14 (Рис. 4.19Е), демонстрирующих наибольшие вклады R_{EX}. Схожие распределения интенсивностей HN сигналов также наблюдались и в других анизотропных мембраномоделирующих средах: мицеллах DHPC, DPC, LMPC, LMPG, SDS и нанодисках DOPG (репрезентативные данные показаны на Рис. 4.19). Например, сигнал HN Aib8 имел небольшую амплитуду во всех изучаемых средах. Кроме того, наблюдаемое распределение мкс-мс конформационных флуктуаций в молекуле Aam-I в окружении бицелл практически совпадало с распределением, наблюдаемым в метаноле (Рис. 4.16Е).

Полученные результаты позволяют предположить, что наблюдаемые мкс-мс конформационные флуктуации являются неотъемлемым свойством молекулы Aam-I и проявляются независимо от характеристик мембраномоделирующего окружения. Локализация этих движений на ахиральных (Aib, Gly) и D-Iva остатках указывает на то, что соответствующие обменные процессы могут быть связаны с изменением направления закрутки отдельных остатков пептида (флуктуациями между положительными и отрицательными значениями углов φ/ψ основной цепи), которые в метаноле носят кооперативный характер. В этом случае меньшая амплитуда вкладов R_{EX}, наблюдаемых в метаноле отражает либо разные временные характеристики обменных процессов (вероятно имеющих большую скорость в метаноле), либо различия в заселенностях обменивающихся конформационных состояний (в метаноле наблюдаются практически равные заселенности правозакрученного и левозакрученного состояния).

4.2.2.5 Динамика основной цепи Zrv-IIB в мицеллах DPC, сравнение с динамикой Aam-I

Для исследования динамики основной цепи Zrv-IIB в мицеллах DPC на двух ЯМР-

спектрометрах с частотой резонанса ^{15}N 50 и 80 МГц были измерены скорости трех релаксационных процессов (R_1, R_2 ядер ^{15}N и ЯЭО ^{15}N-{^1H}, Рис. 2.23З-К). «Модель-независимый» анализ релаксационных данных проводили в программе DASHA [486]. Согласно полученным данным, общая реориентация молекулы Zrv-IIB в комплексе с мицеллой происходит с характерными временами τ_R ~7.9 нс (30°C). Это соответствует движению частицы с гидродинамическим радиусом (R_H) ~21.5 Å. Полученное значение R_H меньше гидродинамического радиуса мицеллы DPC (~23.1 Å, см. п. 4.1.5.1), что указывает на наличие дополнительных степеней свободы у молекулы пептида в комплексе с мицеллой.

Результаты анализа релаксационных данных (Рис. 2.23М-О) выявили большую стабильность молекулы Zrv-IIB в мкс-мс диапазоне по сравнению с Aam-I. Небольшие вклады R_{EX} (0.8–2 Гц, значения скорректированы на разницу в магнитном поле спектрометра) наблюдались только для трех остатков (Gln3, Aib7 и Aib14) на полярной (выпуклой) стороне спирали пептида (Рис. 2.23З-К). В отличие от Aam-I обменные процессы в молекуле Zrv-IIB не приводили к значительному ослаблению интенсивности HN сигналов (Рис. 4.19З). Локализация обменных процессов на полярной стороне спирали пептида указывает на другой механизм возникновения этих флуктуаций. Вероятно, наблюдаемые процессы связаны не с флуктуациями между положительными и отрицательными значениями углов φ/ψ основной цепи (как предполагается в случае Aam-I), а с флуктуациями системы водородных связей (α ↔ 3_{10} ↔ водородная связь с растворителем), как было предложено для Zrv-IIB в метаноле (п. 4.1.3.3).

С другой стороны, движения в наносекундном диапазоне (характерное время τ_e=0.71±0.16 нс, Рис. 4.19Н) наблюдались для 11 (из 13) HN групп основной цепи Zrv-IIB. Вероятно, эти движения связаны с качением и скольжением спирали пептида на поверхности мицеллы. Также как и для молекулы Aam-I наибольшая подвижность в пс-нс диапазоне времен (S^2<0.7) наблюдалась для *N*- и *C*-концевых остатков Zrv-IIB. Распределение полученных динамических данных на молекуле Zrv-IIB (Рис. 4.22В) наглядно показывает отличие от динамики Aam-I. Центральная часть спирали зервамицина (остатки Leu8 и Aib9 из шарнирного региона) не участвует в значительных движениях ни в одном из изученных временных диапазонов.

4.2.2.6 Топология комплекса Aam-I/бицелла DMPC/DHPC

Для исследования топологии комплекса Aam-I/DMPC/DHPC использовали два спиновых зонда: жирорастворимый 16-DSA, парамагнитная метка которого локализуется в гидрофобном регионе бицеллы [357], и водорастворимый Mn^{2+}, имеющий сродство к фосфатным группам липидов/детергентов [375]. Эффект парамагнитного усиления

релаксации (PRE, специфическое уширение сигналов пептида) наблюдали по ослаблению интенсивностей (Ур. 7.10) HN кросс-пиков в ^{15}N-HSQC спектрах при молярных соотношениях липид/16-DSA и липид/Mn^{2+} 75:1 и 150:1, соответственно.

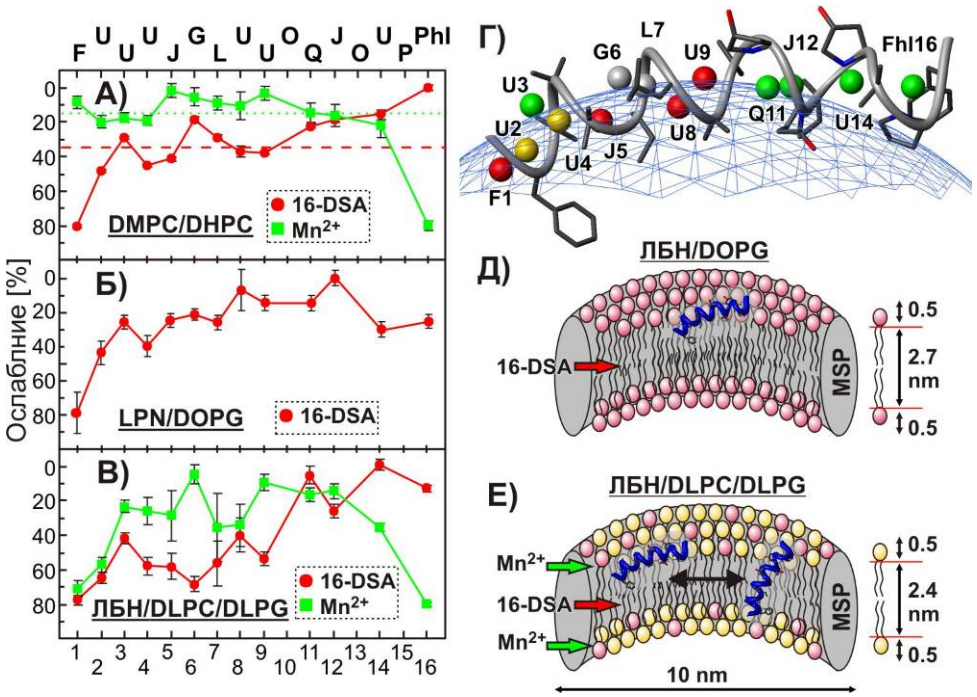


Рис. 4.24. Топология взаимодействия Aam-I с бицеллой DMPC/DHPC (А,Г), нанодисками DOPG (Б,Д) и нанодисками DLPC/DLPG (В,Е). (А,Б,В) Ослабление интенсивностей HN кросс-пиков в 2D ^{1}H,^{15}N спектрах парамагнитными зондами 16-DSA и $MnCl_2$. Уровень 35% на панели (А) отделяет H^N атомы, вероятно, лежащие внутри гидрофобного региона бицеллы и вне него. Уровень 15% на панели (А) отделяет HN атомы, вероятно, лежащие вблизи от фосфатных групп липидов. (Г) Модель комплекса Aam-I/DMPC/DHPC, построенная на основании данных, представленных на панели (А). HN-атомы, локализованные в гидрофобном регионе бицеллы и вблизи от фосфатных групп липидов, показаны красными и зелеными сферами, соответственно. HN-атомы, демонстрирующие ослабление сигналов обеими метками, показаны желтым. Поверхность гидрофобного «ядра» бицеллы (радиус 23.5 Å)[1] показана синей сеткой. (Д,Е) Модели комплексов Aam-I/ЛБН/DOPG и Aam-I/ЛБН/DLPC/DLPG. Дополнительно показаны: вероятная локализация парамагнитных зондов, толщина гидрофобного региона мембраны и толщина региона полярных головок. Следует учесть, что гидрофобная длина спирали Aam-I ~2.5 nm. Две молекулы MSP, экранирующие в нанодиске фрагмент мембраны от растворителя, показаны в виде тора.

Ослабление интенсивностей сигналов меткой 16-DSA (Рис. 4.24А, кружки) имело характерную спиральную (*i,i+3* и *i,i+4*) периодичность. Сигнал *N*-концевого остатка Phe1 был наиболее ослаблен (~80%), значительный эффект PRE (35-50%) также наблюдался для других остатков из *N*-концевого сегмента, принадлежащих гидрофобной (вогнутой) стороне спирали (Aib2, Aib4, Iva5, Aib8, Aib9). В то же время парамагнитные ионы Mn^{2+} значительно ослабляли (~80%) сигнал *C*-концевого Phl16, кроме того, слабый эффект PRE (15-30%) наблюдался для остатков Aib2-Aib4, Gln11, Iva12 и Aib14 (Рис.4.24А, квадраты). Согласно полученным данным, *N*- и *C*-концевые остатки пептида (Phe^1 и Phl^{16}) локализованы в гидрофобном регионе бицеллы и вблизи от фосфатных групп липидов, соответственно. Модель комплекса пептид/бицелла (Рис. 4.24Г) была построена на

[1] Предполагая R_H ~28 Å и толщину региона полярных головок ~4-5 Å [341].

основании пространственной структуры пептида и данных эффекта PRE, наблюдаемого в присутствии 16-DSA. Полученная модель согласовывалась с данными по ослаблению сигналов в присутствии Mn^{2+}. Aam-I связывается с поверхностью бицеллы так, что *N*-конец пептида заглубляется в гидрофобную область бицеллы. Топология комплекса Aam-I/DMPC/DHPC схожа с топологией комплекса Zrv-IIB/DPC (Рис. 4.13B).

Титрование образцов ^{15}N-Aam-I в мицеллах DPC, DHPC, LMPC, LMPG и SDS спиновым зондом 16-DSA приводило к ослаблению HN сигналов, аналогичному наблюдаемому в бицеллах DMPC/DHPC (данные не показаны). Таким образом, мы можем сделать вывод, что пептид в различных анизотропных мембраномоделирующих средах, основанных на детергентах, не только сохраняет свою структуру и динамику (см. выше), но и имеет схожий способ взаимодействия с поверхностью модельной мембранной системы. Топологию этого взаимодействия иллюстрирует предложенная модель комплекса Aam-I/DMPC/DHPC (Рис. 4.24Г).

4.2.3 Структура, динамика и топология взаимодействия Aam-I/мембрана в средах на основе липид-белковых нанодисков

4.2.3.1 Встраивание Aam-I в ЛБН

Для качественного исследования структуры и динамики Aam-I в средах, содержащих бислойную мембрану, были использованы миметики мембраны на основе липид-белковых нанодисков. Для приготовления комплексов Aam-I/ЛБН был разработан следующий оригинальный протокол. ^{15}N-Меченый аналог Aam-I, растворенный в метаноле, добавляли небольшими порциями к препаратам готовых «пустых» нанодисков, содержащих DLPC, DLPC/DLPG (4:1), DMPC, POPC или DOPG. Затем следовала инкубация в пробирках («Eppendorf», США) с открытой крышкой при перемешивании в течение 1 ч при 30°C, в результате чего происходило частичное испарение метанола из образцов и встраивание пептида в мембраны ЛБН. Конечная концентрация дейтерированного метанола (CD_3OH) в образцах проверялась методом ^{2}H-ЯМР и не превышала 2%. Использование этого метода позволило достичь сравнительно больших концентраций пептида (~ 0.5 мМ) и одновременно предохранить ЛБН от разрушения, которое могло быть вызвано большими концентрациями метанола. Комплексы Aam-I/ЛБН были проанализированы методами гель-фильтрации и ^{31}P-ЯМР-спектроскопии (см. Рис. 2.2). Согласно полученным данным, встраивание пептида в мембрану нанодиска (при соотношении пептид/липид 1:30) не вызывало значительного изменения размера ЛБН и не вносило значительных изменений в упаковку мембраны нанодиска.

4.2.3.2 Сравнение чувствительности различных методик для измерения ЯМР-спектров полипептидных молекул в составе нанодиска

С помощью полученных образцов Aam-I/ЛБН провели сравнение различных экспериментальных схем (HSQC, HMQC, TROSY) для измерения 2D $^{1}H,^{15}N$-корреляционных спектров полипептидов в составе мембраны нанодиска (репрезентативные спектры приведены на Рис. 4.18). Обнаружено, что наиболее чувствителен метод HMQC [35] с уменьшенным до 3 мс временем на передачу намагниченности, включающий в себя элементы градиентного эха для выбора путей передачи намагниченности, а также биноминальную последовательность и амплитудно-модулированные импульсы для предотвращения насыщения сигнала воды. В методах HSQC и TROSY, включающих в себя специальные элементы для увеличения чувствительности и амплитудно-модулированные импульсы на частоте сигнала воды [487,488], отмечена в среднем на 35% меньшая чувствительность. Однако, использование схемы TROSY позволяет добиться эффективного сужения спектральных линий (например, уменьшение $\Delta\nu^{1}H^{N}$ составило 10–15 Гц.

Высокая чувствительность схемы HMQC объясняется суммированием намагниченности, передающейся двумя путями: через константы спин-спинового взаимодействия и кросс-корреляцию релаксации (схема типа CRINEPT) [35]. При этом фазовые циклы экспериментов HSQC и TROSY эффективно подавляют последний путь (схема типа INEPT). Следует отметить, что в отличие от схем CRINEPT, ранее применявшихся для ЯМР-спектроскопии больших (вплоть до 1000 кДа) белковых комплексов с дейтерированными боковыми цепями [35,39], нами был использован вариант HMQC с развязкой от ^{15}N в момент детектирования. Отсутствие ожидаемого прироста чувствительности у схемы TROSY по сравнению с HSQC в случае комплексов Aam-I/ЛБН также, видимо, было обусловлено отсутствием дейтерирования боковых цепей пептида.

4.2.3.3 ЯМР-Спектроскопия 15N-Aam-I в составе нанодисков

Полученные 2D $^{1}H,^{15}N$-ЯМР-спектры Aam-I, встроенного в мембраны ЛБН различного состава, показаны на Рис. 4.18ВГЕЗ. Во всех этих спектрах наблюдается селективное обменное уширение сигналов, которое в некоторых случаях делало HN кросс-пики не наблюдаемыми. Так, в мембранах DMPC и POPC наблюдались только 2–3 интенсивных сигнала от основной цепи пептида (Рис. 4.18ВГ). Более того, два протона из NH_2-группы боковой цепи Gln11 демонстрировали в окружении ЛБН/DMPC разные интенсивности сигналов (Рис. 4.18В). В мембранах на основе DLPC (спектр не показан) и DLPC/DLPG наблюдалось селективное уширение сигналов *N*-концевой части пептида

(Рис. 4.18З и 4.19К), а в мембранах DOPG был значительно уширен сигнал HN-группы Aib8 центральной части пептида (Рис. 4.18Е и 4.19И). Подобное избирательное уширение сигналов свидетельствует о наличии обмена между несколькими мембраносвязанными состояниями пептида. Наблюдаемые процессы, видимо, протекают по-разному в мембранах различного состава. При этом наименьшее уширение сигналов наблюдалось в наиболее «рыхлой» из использованных мембран (DOPG).

Таким образом, из-за процессов конформационного обмена между несколькими мембраносвязанными состояниями пептида ЯМР-спектры Aam-I достаточного качества удалось получить только в нанодисках на основе анионного ненасыщенного липида DOPG (diC18:l) и в нанодисках на основе короткоцепочечных ненасыщенных липидов DLPC и DLPC/DLPG (4:1, diC12:0). Сравнение химических сдвигов и интенсивностей HN сигналов Aam-I в окружении ЛБН/DOPG со спектральными характеристиками пептида, наблюдаемыми в мембраномоделирующих средах на основе детергентов (например, бицеллах DMPC/DHPC, Рис. 4.19ГИ), показало, что структура и динамика Aam-I в составе нанодисков DOPG близка к наблюдаемой в классических мембранных миметиках. Так, например, по сравнению с бицеллами DMPC/DHPC происходит значительный сдвиг только одного сигнала (HN Phe1), а уширение сигнала HN-группы Aib8 наблюдается во всех мембранных миметиках на основе детергентов (бицеллы, мицеллы). В то же время структура и динамическая подвижность пептида в составе «тонких» мембран, содержащих DLPC и DLPC/DLPG, значительно отличалась от структуры, наблюдаемой в классических мембранных миметиках (см. ниже).

Наблюдаемая в ЛБН/DOPG ширина сигналов Aam-I в спектрах TROSY ($\Delta\nu^1H^N$ 50-60 Гц) и измеренная скорость кросс-корреляции ядер ^{15}N (η_{XY} ~ 52.5 Гц, частота 800 МГц, 45°C) соответствовали эффективному времени корреляции вращательных движений τ_R ~ 40 нс. Полученное значение ниже теоретически рассчитанных времен корреляции для дискоидальной частицы размером 10 × 4 нм (56–61 нс), что свидетельствует о наличии дополнительных степеней подвижности у пептида в составе комплекса с нанодиском (τ_R ~ 40 нс соответствует изотропной реориентации белковой частицы с массой ~ 100 кДа и R_H ~ 4.1 нм).

4.2.3.4 Топология комплекса Aam-I с ЛБН/DOPG и ЛБН/DLPC/DLPG

Титрование образца ^{15}N-Aam-I/ЛБН/DOPG спиновым зондом 16-DSA (Рис. 4.24БД) позволило установить, что топология взаимодействия пептида с бислоем DOPG совпадает с топологией взаимодействия, наблюдаемой в случае бицелл DMPC/DHPC (Рис. 4.24Г). Пептид взаимодействует с поверхностью фрагмента мембраны нанодиска, и *N*-конец молекулы заглубляется в гидрофобную область мембраны. Полученные данные

позволяют предположить, что Aam-I демонстрирует аналогичные структурно-динамические свойства и схожую топологию взаимодействия пептид/мембрана и в «настоящих» бислойных системах, например, в липидных везикулах и биологической мембране.

Периферический способ взаимодействия Aam-I с модельными системами, содержащими «длинноцепочечные» липиды (бицеллы DMPC/DHPC и нанодиски DOPG), согласуется с полученной пространственной структурой пептида. Длина гидрофобного региона на вогнутой стороне спирали (~25 Å) не превышает толщину гидрофобного региона бислоя DMPC (diC14:0, ~26.2 Å [341]) и DOPG (diC18:l, ~27.1 Å [341]), что делает переход пептида в ТМ состояние энергетически невыгодным из-за эффекта «несовпадения гидрофобной длины» (hydrophobic mismatch [489]). В то же время из литературных данных известно, что встраивание спиральных пептидов (включая пептаиболы) в регион полярных головок липидной мембраны приводит к нарушению ее структуры и может вызывать значительное уменьшение толщины бислоя [209]. Например, уменьшение толщины мембраны вплоть до ~ 1.5 Å ранее наблюдали методом дифракции рентгеновских лучей при взаимодействии аламетицина и меллитина с поверхностью мембран на основе фосфатидилхолина [209].

Исследование структуры, динамики и топологии взаимодействия Aam-I с «тонкими» мембранами проводили в ЛБН, содержащих смесь «короткоцепочечных» липидов DLPC/DLPG (4:1, diC12:0, толщина гидрофобного региона ~23.9 Å [341]). Выбор смеси цвиттер-ионного и анионного липида был обусловлен следующими причинами: (i) для Aam-I в комплексе с ЛБН на основе чистого DLPC наблюдались значительные уширения сигналов, вероятно обусловленные процессами конформационного обмена (данные не показаны); (ii) стабильность образцов ЛБН на основе чистого DLPG была недостаточна для измерения длительных ЯМР-экспериментов. Использование смеси этих липидов позволило получить ЯМР-спектры пептида достаточного качества (Рис. 4.18З) и проводить исследования в течение как минимум одной недели при 45ºС.

Частичное отнесение ^{1}H и ^{15}N сигналов основной цепи пептида было получено на основании анализа последовательных $^{1}H^{N}$-$^{1}H^{N}$, $^{1}H^{\alpha}$-$^{1}H^{N}$, и $^{1}H^{\beta}$-$^{1}H^{N}$ ЯЭО контактов, наблюдаемых в 3D ^{1}H-NOESY-^{15}N-TROSY спектре (τ_m=40 мс). ЯЭО контакты не наблюдались для HN сигналов остатков Iva5, Leu7 и Aib8, которые демонстрировали сильное уширение. Сравнение химических сдвигов и интенсивностей HN сигналов Aam-I в окружении ЛБН/DLPC/DLPG со спектральными характеристиками, наблюдаемыми в бицеллах DMPC/DHPC (Рис. 4.19ДК), показало, что структура и динамическая подвижность *N*-концевого (Phe1-Aib8) сегмента пептида значительно меняется при встраивании Aam-I в «тонкую» бислойную мембрану. Наблюдались изменения $\Delta\delta^{1}H^{N}$ и

$\Delta\delta^{15}N^{H}$ с амплитудой до 0.2 and 2.3 м.д., соответственно. Кроме того, вероятно, из-за процессов конформационного обмена сигналы *N*-концевого сегмента пептида в окружении ЛБН/DLPC/DLPG были уширены и имели низкую амплитуду. Также как и в случае комплексов Aam-I с частицами других мембраномоделирующих сред измеренная скорость кросс-корреляции η_{XY} ядер ^{15}N и рассчитанное из нее значение R_H (~41 Å) указали на наличие дополнительных степеней подвижности у пептида в составе комплекса с нанодиском. (По данным гель-фильтрации радиус ЛБН/DLPC/DLPG равен ~49 Å).

Для исследования топологии взаимодействия Aam-I с фрагментом мембраны ЛБН/DLPC/DLPG использовали парамагнитные зонды 16-DSA и Mn^{2+}. Данные PRE, полученные для 16-DSA (Рис. 4.24B, кружки), отличались от данных, полученных в бицеллах DMPC/DHPC и нанодисках DOPG, и указали на практически полное встраивание *N*-концевого сегмента пептида (Phe1-Aib9) в гидрофобную область мембраны (наблюдаемое ослабление сигналов 40-80%). В то же время интенсивность сигналов *C*-концевых остатков Gln11-Phl16 практически не менялась при добавлении 16-DSA (ослабление <30%). С другой стороны, добавление парамагнитных катионов Mn^{2+} приводило к значительному уширению сигналов *N*- и *C*-концевых остатков (Рис.4.24A, квадраты). Сильное ослабление, наблюдаемое для сигналов Phe1, Aib2 и Phl16 (>50%), указало на сближенность этих остатков с регионом фосфатных групп липидной мембраны.

Полученные противоречивые данные могут быть объяснены динамическими флуктуациями пептидной молекулы между состояниями с различной топологией в мембране (поверхностносвязанное ↔ TM), которые сопровождаются переходами *N*-конца молекулы Aam-I из середины гидрофобного региона в регион фосфатных групп на противоположной стороне мембраны нанодиска и обратно (Рис.4.24E). В ходе этих флуктуаций *C*-конец пептидной молекулы, по-видимому, остается заякоренным на одной из сторон мембраны нанодиска, что согласуется с отсутствием обменного уширения у HN сигнала остатка Phl16 (Рис. 4.19K). Альтернативная модель, объясняющая наблюдаемые данные PRE, подразумевает флуктуацию *N*-конца спирали Aam-I из гидрофобного региона в регион фосфатных групп на той же стороне мембраны нанодиска, на которой заякорен *C*-конец. Однако движения подобного типа не должны зависеть от гидрофобной толщины мембраны, а значит должны наблюдаться в бицеллах DMPC/DHPC и нанодисках DOPG, что опровергает эту модель.

Отсутствие динамического изменения топологии Aam-I в мицеллах детергентов, использованных в работе, многие из которых имеют небольшую гидрофобную длину, например, DPC (C12:0) и DHPC (diC6:0), вероятно, отражает различие в структурной

организации мицелл и нанодисков. Комплекс пептида с высоко-динамичной мицеллой детергента может быть представлен в виде смешанной мицеллы, в которой молекулы детергента экранируют гидрофобные участки пептида от растворителя. В этом случае топология комплекса пептид/мицелла должна в основном зависеть не от соотношения гидрофобной длины пептида и длины жирных цепочек детергента, а от распределения полярных и неполярных регионов на поверхности пептида. С другой стороны, полужесткая двумерная упаковка липидов в мембране нанодиска фиксирует положение отдельных молекул липидов и не позволяет им взаимодействовать с изолированными гидрофобными (полярными) областями на поверхности пептида. Схожая ситуация описана в представленной работе при исследовании ПЧД-KvAP в мицеллах анионных детергентов и ЛБН, содержащих анионные липиды (см. Главу 5).

Наблюдение динамических переходов молекулы Aam-I из поверхностносвязанного в ТМ состояние в мембранах, содержащих короткоцепочечные липиды (diC12:0), согласуется с результатами исследования Zrv-IIB методом ЯМР твердого тела на ориентированных мембранах [216].

4.3 Модель действия Zrv-IIB и Aam-I

Пептиды Aam-I и Zrv-IIB дают уникальную возможность для исследования структурно-функциональных зависимостей в молекулах пептаиболов. Как уже отмечалось, эти пептиды, содержащие 16 остатков, имеют практически идентичную структуру *C*-концевых сегментов (Aib9-Phl16) и совершенно разные последовательности *N*-концевых фрагментов (1-8) (Табл. 4.1). Именно эти различия и приводят к значительным отличиям мембранной и антибиотической активности. Так, биологическая [407,410,424] и каналообразующая активность [163,425–427] Zrv-IIB не уступает активности длинных (18-20 остатков) пептаиболов, таких, например, как аламетицин (Alm, 20 остатков, Табл. 4.1). Каналы зервамицина характеризуются сильной потенциалозависимостью и несколькими (более 10) уровнями проводимости. В то же время, Aam-I демонстрирует значительно меньшую антипаразитарную [410] и гемолитическую активности [428], а его слабая каналообразующая активность в плоских и везикулярных модельных системах характеризуется небольшой потенциалозависимостью с одним уровнем проводимости и содержит дополнительную потенциалонезависимую компоненту [429–431]. Кроме того, несмотря на кажущуюся большую гидрофобность Aam-I, он обладает значительно более низким сродством к липидным везикулам, чем Zrv-IIB [431].

В настоящее время общепризнанной моделью мембранной активности длинных пептаиболов является модель связки спиралей (Barrel-Stave, BS) [163] (Рис. 4.2). BS

модель подразумевает ассоциацию ТМ спиралей пептида в мембране, приводящую к формированию ионопроводящих спиральных связок (helical bundle) [163]. Согласно литературным данным, каналы Zrv-IIB также подчиняются BS модели [163,425], в то время как атипичная каналообразующая активность Aam-I плохо согласуется с предсказаниями BS модели [429,430]. Результаты, полученные в настоящем разделе, позволяют объяснить различия в мембранной активности пептидов со структурно-динамической точки зрения в рамках модифицированной BS модели (Рис. 4.25).

4.3.1 Модифицированная модель «связки спиралей» для описания порообразующей активности Zrv-IIB

Распределение электростатического потенциала и потенциала молекулярной гидрофобности на поверхности мономера Zrv-IIB (Рис. 4.13АБ) иллюстрирует амфифильность молекулы пептида. На выпуклой стороне спирали находится большой полярный участок, молекула полностью гидрофобна с вогнутой стороны. Спираль имеет длину ~26 Å, достаточную для того, чтобы пронизать гидрофобный регион мембраны с учетом эффекта уменьшения толщины мембраны, и дипольный момент около 50 D, достаточный для сильного взаимодействия спирали с ТМ электрическим потенциалом. Таким образом, молекула Zrv-IIB идеально подходит для формирования потенциалозависимых ионных каналов из связки спиралей, в которых полярные стороны формируют внутренность поры, а гидрофобные стороны контактируют с липидами и соседними пептидами в связке.

Особую роль в образовании “жесткой и длинной” спиральной конформации мономера Zrv-IIB играют остатки Aib. Эти остатки расположены в ключевых местах последовательности: (1) перед каждым из остатков Pro/Hyp, что необходимо для формирования “длинной” спирали из последовательности β-изгибов (β-bend ribbon spiral) на *C*-конце пептида (эта спираль длиннее чем α-спираль на ~0.5 Å на остаток), (2) в последовательности Aib^{7}-Leu-Aib-Hyp^{10}, что предотвращает движения, изгибающие спираль вокруг остатка Hyp^{10}.

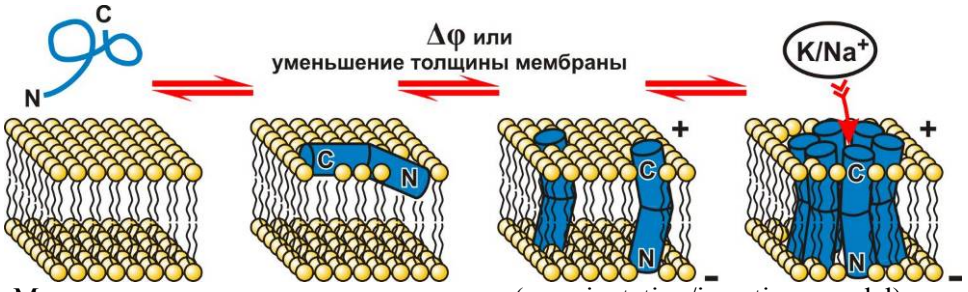


Рис. 4.25. Модель *npe*-ориентации-встраивания (preorientation/insertion model), описывающая мембранную активность Zrv-IIB и Aam-I.

Предполагая, что способ начального связывания пептида с поверхностью мембраны моделируется структурой комплекса Zrv-IIB/мицелла DPC, можно предложить

модель действия Zrv-IIB. Эта модель *пре*-ориентации-встраивания (preorientation/insertion model, Рис. 4.25) по сравнению с классическим BS механизмом включает дополнительный этап: переход пептида из поверхностносвязанного в ТМ состояние под действием внешнего электрического поля или эффекта уменьшения толщины мембраны.

В рамках предложенной модели (Рис. 4.25) Zrv-IIB не имеет определенной конформации в водном растворе, и на первом этапе происходит его присоединение к поверхности мембраны, сопряженное с формированием спиральной конформации, эта спираль связывается параллельно поверхности мембраны с *N*-концевым фрагментом, чуть заглубленным в гидрофобный регион. На втором этапе трансмембранный электрический потенциал или утончение мембраны, вызванное поверхностносвязанными молекулами пептида, переводит мономер зервамицина в трансмембранное (ТМ) состояние. Различие в энергии между ТМ и поверхностносвязанным состоянием пептида невелико, поэтому на мембране одновременно присутствуют пептиды в обоих состояниях. На третьем этапе ТМ мономеры пептида агрегируют и формируют каналы из связок спиралей. Каналы имеют энергию, сравнимую с энергией мономеров, и поэтому они метастабильны, периодически распадаются и собираются вновь. Через эти каналы происходит ток ионов и вытекание цитоплазматического содержимого из клетки-мишени. Рассмотрим подробнее ключевые аспекты предложенной модели.

4.3.1.1 Потенциалозависимая активация каналов Zrv-IIB

В рамках модели *пре*-ориентации-встраивания потенциалозависимая активация пептида связана с реориентацией жесткого спирального диполя из поверхностно связанного состояния в ТМ состояние и переноса *N*-конца молекулы через мембрану. Большие структурные перестройки в молекуле пептида и изменение угла изгиба спирали в ходе этого процесса представляются маловероятными из-за жесткости спирали зервамицина. Простые расчеты показывают согласие предложенной модели и экспериментальных данных. Так, дипольный момент ~50 D при длине спирали ~26 Å соответствует зарядам +0.4*e* и -0.4*e* на *N*- и *C*-конце пептида, соответственно, что прекрасно согласуется с экспериментальной величиной воротного заряда $\alpha = 0.41$ [425]. Более того, большая потенциалозависимость действия Zrv-IIB (параметр *Ve* = 4.52 мВ [425]), соответствующая таковой у аламетицина (*Ve* = 4.5 мВ [163]), легко может быть объяснена, учитывая жесткость спирали зервамицина. В случае аламетицина значительные спираль-изгибающие движения [423] (вероятно, сохраняющиеся и в мембранно-связанном состоянии [241,490]) приводят к эффективному уменьшению дипольного момента, которое может достигать 25% (от ~70 D до ~50 D). Таким образом, динамические движения в “длинном” аламетицине (20 остатков) сближают его по

величине дипольного момента и общей длине спирали с “коротким” зервамицином (16 остатков). Следует отметить, что согласно современным данным, при низких концентрациях аламетицин взаимодействует в основном с интерфейсом фосфолипидной мембраны, и его спираль (также как и спираль зервамицина) ориентирована параллельно плоскости бислоя (см. например [491], мембрана POPC).

Ассиметрия вольтамперной характеристики Zrv-IIB может быть объяснена из относительной полярности *C*-концевой части молекулы (Рис. 4.13АБ). Видимо, экспонированные карбонильные группы и полярные боковые цепи в этой части молекулы формируют множественные водородные связи с головками липидов, создавая тем самым своеобразный якорь на поверхности мембраны. Это позволяет проникать пептиду вглубь бислоя только *N*-концевой частью, что соответствует экспериментально наблюдаемой активации только *cis*-положительным потенциалом и инактивации в присутствии *cis*-отрицательного потенциала [425,426].

4.3.1.2 Потенциалонезависимое поведение Zrv-IIB

Потенциалонезависимое поведение Zrv-IIB, наблюдаемое в везикулярных системах при больших отношениях пептид-липид (P:L) [426,427], может быть объяснено из статистических и энергетических соображений. Активация внешним трансмембранным потенциалом в 100 мВ (типичное значение для активации каналов зервамицина) приводит к дополнительной стабилизации TM состояния на 0.8 кКал/Моль (мембрана толщиной 30 Å, μD ~ 50 D), что сравнимо с характерной энергией тепловых движений (RT ~ 0.6 кКал/Моль). Подобная небольшая разница в энергии ведет к увеличению заселенности TM состояния меньше, чем в 4 раза. Аналогичное увеличение концентрации пептида в TM состоянии может быть достигнуто увеличением концентрации мембраносвязанного пептида. Таким образом, TM потенциал не является необходимым условием для формирования каналов Zrv-IIB.

Результаты подобных расчетов согласуются с экспериментальными данными, полученными методом ЯМР твердого тела на ориентированных мембранах [216]. Так, в мембранах, составленных из DOPC (di-C18:1-PC), di-C16:1-PC или di-C14:1-PC (толщина гидрофобного региона 27-25 Å), наблюдается в основном поверхностно связанное состояние зервамицина. В более тонких мембранах, составленных из DLPC (di-C12:0-PC, толщина гидрофобного региона ~24 Å), наблюдается равновесие между поверхностносвязанным и TM состояниями, а в мембранах DCPC (di-C10:0-PC) (толщина гидрофобного региона ~ 22 Å) равновесие смещается в сторону TM состояния [216].

4.3.1.3 Возможная структура каналов Zrv-IIB

Взаимодействия *N*-конец к *C*-концу между спиралями зервамицина, наблюдаемые

при больших концентрациях в метаноле, модулируются дипольным моментом спиралей пептида и, вероятно, не имеют отношения к агрегации ТМ мономеров пептида в мембране в процессе формирования каналов. Ассиметрия вольтамперной характеристики указывает на то, что пептиды в связке должны быть ориентированы параллельно. Хотя в этом случае отталкивание спиральных диполей должно дестабилизировать связки, этот эффект может быть скомпенсирован поляризацией молекул воды внутри поры, как это предложено для аламетицина [241].

Так как молекулы Zrv-IIB изогнуты, существует два различных способа их упаковки в ТМ связку: либо путем ассоциации *N*-концевых спиралей пептидов, либо путем ассоциации *C*-концевых спиралей. Анализ структуры Zrv-IIB в метаноле показывает, что боковые цепи аминокислотных остатков на *N*-конце молекулы подвижны, а конформация боковых цепей на *C*-конце фиксирована. Эта ситуация не меняется и при присоединении пептида к поверхности мицеллы DPC. Подобное распределение подвижности в молекуле должно стабилизировать ассоциацию *C*-концов мономеров зервамицина, так как в этом случае должны уменьшаться потери энтропии при олигомеризации пептидов. Боковые цепи на *C*-конце молекулы, возможно, имеют заранее определенную конформацию, необходимую для сборки канала. Таким образом, можно предположить, что сборка мономеров Zrv-IIB в канал (связку спиралей) происходит путем ассоциации *C*-концевых частей молекул, как это предлагалось ранее [448], что отличается от возможной *N*-концевой упаковки мономеров аламетицина в каналы [241,492].

Большая площадь полярной стороны у амфифильной спирали зервамицина (Рис. 4.13АБ) делает более выгодным формирование пор с большим радиусом и, соответственно, с большим числом мономеров (13 – 14 у зервамицина, против 10 – 11 у аламетицина [163,425]). Более быстрая кинетика каналов Zrv-IIB, возможно, связана с меньшей длиной мономера пептида, и, соответственно, с уменьшением выигрыша в энергии от эффекта hydrophobic matching. Также, быстрые межуровневые переходы с характерными временами порядка миллисекунд могут быть вызваны обменным процессом, наблюдаемым в мономерах зервамицина в этом временном диапазоне [459].

4.3.1.4 Селективность каналов Zrv-IIB

В отличие от длинных пептаиболов Zrv-IIB взаимодействует с растворителем большой полярной областью, сформированной из полярных боковых цепей и экспонированных CO-групп основной цепи, и эти группы по отдельности не формируют сайтов сильной гидратации. Возможно, именно увеличенный (по сравнению с аламетицином) полярный регион на поверхности спирали Zrv-IIB и другой тип взаимодействия пептид/растворитель приводят к изменению селективности каналов этого

пептида по отношению к одновалентным катионам. Каналы аламетицина имеют селективность ($K^+ > Na^+$) [467,468], в то время как каналы зервамицина имеют другую селективность ($Na^+ > K^+$) [427]. Увеличение полярной стороны ведет к усилению взаимодействия пептида с ионами, имеющими меньший радиус (Na^+), что говорит о частичной их дегидратации при проходе через канал.

4.3.2 Структура и динамика Aam-I в контексте модифицированной модели «связки спиралей»

Данные, полученные в ходе представленного исследования, показали, что Aam-I и Zrv-IIB имеют сходную пространственную структуру и топологию взаимодействия с модельной мембраной.

1. Также как и зервамицин, антиамебин в анизотропном мембраномоделирующем окружении формирует правозакрученную амфифильную спираль с небольшим изгибом (20-30º) на Hyp10. Спираль Aam-I также имеет достаточную длину (~26 Å) для того, чтобы пронизать гидрофобный регион мембраны с учетом эффекта уменьшения толщины мембраны или в присутствии ТМ электрического потенциала (Рис. 4.22А).
2. Также как и в случае Zrv-IIB, большие полярные участки находятся на выпуклой стороне спирали Aam-I, в то время как вогнутая сторона практически полностью гидрофобна (Рис. 4.22Г).
3. В отсутствие ТМ потенциала спираль Aam-I, как и спираль Zrv-IIB, располагается параллельно поверхности мембраны с *N*-концевым фрагментом, чуть заглубленным в гидрофобный регион, и способна совершать спонтанные переходы между поверхностносвязанным и ТМ состояниями в тонких мембранах, состоящих из diC12:0 липидов (Рис. 4.24).

Подобное совпадение структурных свойств позволяет рассматривать мембранную активность Aam-I в контексте модели *npe*-ориентации-встраивания, предложенной для Zrv-IIB (Рис. 4.25). В рамках этой модели каналы Aam-I формируются из параллельных спиральных связок пептида, и полярные стороны молекул образуют внутренность поры, а гидрофобные стороны контактируют с липидами и соседними пептидами в связке.

Несмотря на значительное сходство пространственных структур, динамика пептаиболов Aam-I и Zrv-IIB значительно отличается (Рис. 4.22АВ и 4.23). Молекула антиамебина независимо от типа мембраномоделирующего окружения (метанол, мицеллы, бицеллы, нанодиски) имеет «склонность» к конформационным флуктуациям в мкс-мс диапазоне времен. Эти обменные процессы локализованы на ахиральных и α,α-диалкилированных остатках (Aib, D-Iva и Gly) и, вероятно, вызваны переходами между

правозакрученной и левозакрученной спиральными конформациями (флуктуациями между положительными и отрицательными значениями углов φ/ψ основной цепи).

Вероятно, особую роль в формировании “подвижной” спиральной конформации Aam-I играют остатки Aib и D-Iva, придающие «жесткость» спирали Zrv-IIB. Локализация в *N*-концевом сегменте Aam-I практически ахиральной последовательности Aib2-Aib-Aib-D-Iva-Gly6 придает пептиду уникальные динамические свойства – способность динамически изменять направление закрутки спирали. Кроме того, наличие двух последовательных остатков Aib, располагающихся в шарнирном регионе молекулы (Leu7-Aib-Aib-Hyp10), обуславливает возможность высокоамплитудных спираль-изгибающих движений (Рис. 4.17).

Наличие высокоамплитудных процессов конформационного обмена в молекуле Aam-I в водном растворе и в мембраносвязанном состоянии должно приводить к значительному снижению эффективности трех основных этапов предложенного механизма порообразования (Рис. 4.25). Рассмотрим подробнее влияние динамической подвижности пептида на ключевые этапы предложенной модели.

4.3.2.1 Начальное связывание Aam-I с поверхностью мембраны

Увеличенная (по сравнению с Zrv-IIB) подвижность Aam-I в водном растворе, возможно, ответственна за наблюдаемое увеличение растворимости антиамебина (с 4 мкМ до 30 мкМ), что в свою очередь ведет к уменьшению эффективности начального связывания пептида с мембраной. Взаимодействие молекул воды с группами основной цепи Aam-I, вероятно, стабилизирует промежуточные состояния обменных процессов на *N*-концевом сегменте спирали пептида, уменьшая их кооперативность. В этом случае число конформационных состояний, доступных молекуле Aam-I в водном растворе, равно 2^N, где N (= 7) число подвижных остатков в пептиде (Phe1-Gly6 и Aib8). Это приводит к возникновению дополнительного положительного энтропийного вклада в свободную энергию ($\Delta G=\Delta H-T\Delta S$) образования комплекса пептид/мембрана, при котором Aam-I практически полностью переходит в правозакрученную конформацию. Оценка величины этого вклада ($-T\Delta S$) при комнатной температуре дает значение ~ 3 кКал×М$^{-1}$ (~ 0.4 кКал×М$^{-1}$ на одну дополнительную степень свободы). Подобное изменение свободной энергии может приводить к уменьшению константы образования комплекса пептид/мембрана почти на 2 порядка (по сравнению с «жесткими» пептаиболами, например, с Zrv-IIB). Полученная оценка согласуется с имеющимися экспериментальными данными по взаимодействию пептаиболов с липидными везикулами [431].

4.3.2.2 Переход молекулы Aam-I в ТМ состояние

Пониженная эффективность связывания пептида с поверхностью мембраны в свою очередь, возможно, приводит к отсутствию эффекта уменьшения толщины мембраны [209]. Кроме того, флуктуации между несколькими мембраносвязанными состояниями и значительные спираль-изгибающие движения уменьшают эффективный дипольный момент спирали Aam-I, ослабляя энергию взаимодействия с ТМ электрическим потенциалом. Оба этих фактора затрудняют переход молекул пептида из поверхностносвязанного в ТМ состояние.

Следует отметить, что предполагаемое уменьшение дипольного момента спирали Aam-I, вызванное повышенной динамической подвижностью пептида, количественно согласуется со слабой потенциалозависимостью, наблюдаемой в плоских модельных системах (параметр *Ve* = 20 мВ [430]). Предполагая, что каналы пептида образованы ассоциацией 6 мономеров [493], можно оценить величину воротного заряда (α = 0.2), приходящегося на один мономер. Эта величина соответствует зарядам +0.2*e* и -0.2*e* на *N*- и *C*-конце спирали пептида и при длине молекулы ~26 Å дает дипольный момент ~25 D в два раза меньший, чем у конформационно стабильной молекулы Zrv-IIB.

Топология взаимодействия спирали Aam-I с нанодисками различного липидного состава позволяет предположить, что, как и в случае Zrv-IIB, при потенциалозависимой активации и переходе пептида в ТМ состояние, именно *N*-конец молекулы переносится через мембрану. При этом *C*-конец выступает в роли своеобразного якоря и закрепляется на *cis*-стороне поверхности мембраны. Это предположение согласуется с экспериментально наблюдаемой ассиметрией вольтамперной характеристики Aam-I, которая соответствует активации только *cis*-положительным потенциалом [430].

4.3.2.3 Образование каналов из связок спиралей Aam-I

Повышенная динамическая подвижность молекулы Aam-I в мкс-мс диапазоне времен также может препятствовать образованию ионопроводящих спиральных связок по Barrel-Stave механизму из-за ослабления специфических контактов между молекулами пептида. Возможно, наличие единственного уровня проводимости канала Aam-I обуславливается неспособностью молекулы этого пептаибола формировать стабильные комплексы спираль-спираль высокого порядка. Согласно результатам недавнего молекулярно-динамического исследования [493], единственный уровень проводимости канала Aam-I соответствует связке из 6 спиралей пептида, в то время как для Zrv-IIB и аламетицина наблюдаются уровни, соответствующие связкам с N=10 и более [163].

Резюмируя полученные результаты, мы можем предположить, что повышенная динамическая подвижность Aam-I, «закодированная» в первичной структуре

(последовательности) пептида, ответственна за его низкую мембранную активность, что в свою очередь обуславливает низкую антибиотическую активность антиамебина. Это предположение ведет к дополнительному вопросу: «Зачем природа создала и использует этот слабоактивный антибиотический пептид? Ведь гомологичный, но менее конформационно подвижный Zrv-IIB превосходит Aam-I как по мембранной, так и по антибиотической активности?». Возможный ответ на этот вопрос кроется в тонком балансе свойств, которыми должен обладать любой мембраноактивный антибиотик. С одной стороны, мембраноактивное антибиотическое соединение должно обладать достаточной эффективностью, чтобы выполнять возложенные на него защитные функции, а с другой стороны, эффективность его должна быть ограничена так, чтобы не приносить вреда клеткам организма хозяина, чье существование также зависит от целостности биологической мембраны. В этом отношении может быть упомянута супер-продукция пептидов группы антиамебина копрофильным грибом *Stibella erythrocephala* [440]. Этот гриб продуцирует антиамебины в концентрациях, достаточных для подавления роста всех конкурирующих видов грибов, но в то же время эти концентрации безопасны для самого организма продуцента. Таким образом, повышенная динамическая подвижность, «закодированная» в последовательности Aam-I, вероятно, представляет собой дополнительный механизм, который наряду с другими факторами (спиральность, гидрофобность, амфифильность, заряд [12], см. Литературный обзор п. 1.5), позволяет сдвигать профиль антибиотической активности спиральных мембраноактивных пептидов от клеток организма продуцента к чужеродным клеткам.

4.3.3 Резюме

Результаты, полученные в ходе исследований пептаиболов Aam-I и Zrv-IIB, выявляют основные принципы, использованные природой при конструировании спиральных антимикробных пептидов, действующих на мембраны клеток, а также механизмы формирования ионных каналов этими пептидами.

Исследование структуры и динамики Zrv-IIB в различных средах, моделирующих биологическую мембрану (растворители с низкой полярностью, мицеллы детергента), показало, что пептид, независимо от свойств мембраномоделирующего окружения, формирует правозакрученную спираль. Исследование топологии взаимодействия пептида с мицеллой DPC позволило предсказать возможный тип взаимодействия зервамицина с биологическими мембранами. Полученные данные позволили предположить, что особую роль в активности зервамицина по сравнению с другими пептаиболами играет стабильность его спиральной структуры. Отсутствие высокоамплитудных шарнирных движений, система устойчивых водородных связей и конформация β-bend ribbon spiral в

C-концевой части молекулы придают пептиду длину (~ 26 Å), достаточную для того, чтобы пронизывать гидрофобную часть мембраны и образовывать трансмембранные ионные каналы из связок спиралей. В отличие от длинных пептаиболов, в молекулах которых шарнирные движения эффективно уменьшают как общую длину, так и дипольный момент спирали, Zrv-IIB обладает дипольным моментом (~ 50 D), достаточным для высокоэффективного потенциалозависимого действия. В то же время, увеличение амфифильности и полярного угла спирали зервамицина позволяет формировать, в среднем, большие связки и, соответственно, каналы с большим сечением пор, что также усиливает биологическую активность пептида.

С другой стороны, исследование структуры и динамики Aam-I в различных средах, моделирующих биологическую мембрану (растворители с низкой полярностью, мицеллы и бицеллы, содержащие детергент, и липид-белковые нанодиски), показало, что пептид, независимо от свойств мембраномоделирующего окружения, имеет «склонность» к конформационным флуктуациям в мкс-мс диапазоне времен, и эти обменные процессы вызваны переходами между правозакрученной и левозакрученной спиральной конформацией у ахиральных и α,α-диалкилированных остатков (Aib, D-Iva и Gly). Вероятно, именно эти структурно-динамические свойства Aam-I ответственны за его низкую биологическую и каналообразующую активности. Проведенное исследование топологии взаимодействия Aam-I с мицеллами, бицеллами и нанодисками различного липидного состава позволило предсказать возможный тип взаимодействия пептида с биологическими мембранами. На основании полученных результатов предложена модель действия антиамебина и зервамицина, объясняющая все известные на сегодня экспериментальные данные.

Сопоставляя результаты исследования Aam-I/Zrv-IIB и ареницина-2 (п. 3.3), можно выдвинуть предположение, что конформационная подвижность представляет собой дополнительное свойство, которое наряду с другими факторами (гидрофобность, амфифильность, заряд) определяет мембранную активность АП и позволяет сдвигать профиль антибиотической активности от клеток организма-продуцента к чужеродным клеткам. В случае Aam-I высокая конформационная подвижность затрудняет как начальное связывание пептида с мембраной, так и последующие процессы каналообразования, что приводит к ослаблению антибиотической активности Aam-I на порядок по сравнению с гомологичным, но «стабильным» пептидом Zrv-IIB.

Данные о топологии взаимодействия Aam-I и Zrv-IIB с модельными мембранными системами показали, что для спиральных пептидов, не обладающих зарядом, основным детерминантом мембранной активности являются гидрофобные взаимодействия. Именно эти взаимодействия определяют топологию комплекса пептид-мембрана и обуславливают

переход молекул пептида в ТМ состояние в «тонких» мембранах, где толщина гидрофобного региона меньше либо равна гидрофобной длине спирали пептида.

Кроме того, проведенные исследования позволили охарактеризовать влияние, которое свойства мембраномоделирующей среды могут оказывать на структуру и динамику мембраноактивных пептидов. Так, «стабильный» пептид Zrv-IIB практически не меняет свою пространственную структуру при переходе из растворителей с низкой полярностью в анизотропную мембраномоделирующую среду (мицеллы DPC), в то время как структура динамически подвижного Aam-I меняется значительно. Кооперативные флуктуации *N*-концевого сегмента пептида между правозакрученной и левозакрученной спиральной конформациями с равной заселенностью наблюдаемые в метаноле, в анизотропных средах (мицеллы, бицеллы, нанодиски) сменяются одним преимущественно заселенным правозакрученным состоянием с мкс-мс конформационными флуктуациями на уровне отдельных остатков. Полученные результаты указывают на необходимость тщательного выбора мембраномоделирующей среды при исследовании подвижных молекул. В этом случае неправильно выбранная среда может приводить к стабилизации «ненативной» конформации или к значительному усилению динамики.

Одним из важных результатов, полученных в представленном разделе, является использование для исследований «тонких» ЛБН, содержащих «короткоцепочечные» фосфолипиды (diC12:0). В результате было установлено, что упорядоченный фрагмент липидной мембраны в составе нанодисков делает доступным для исследования такие состояния мембраноактивных пептидов, которые в принципе не могут быть изучены в средах, содержащих детергенты. А именно, «тонкие» нанодиски позволили наблюдать переходы спирали Aam-I из состояния, связанного с поверхностью мембраны, в ТМ состояние, которые не наблюдаются в динамически подвижных бицеллах и мицеллах. Согласно литературным данным, «тонкие» нанодиски ранее не использовались для биохимических, биофизических и структурных исследований МБ и МП.

Результаты проведенных исследований, несомненно, будут полезны при дизайне новых или модификации природных антибиотических агентов, – задаче, которая приобрела особую важность в последнее время в связи с распространением патогенных микроорганизмов, резистентных к “классическим” антибиотикам. Кроме того, результаты представленного исследования открывают путь к пониманию работы ионных каналов на молекулярном уровне, а также дополнительно расширяют диапазон возможного применения сред на основе липид-белковых нанодисков для структурных исследований мембранных биомолекул.

ГЛАВА 5. Исследование потенциалочувствительного домена канала KvAP

Одним из важных классов мембранных белков являются потенциалозависимые катионные (K^+, Na^+, Ca^{2+}) каналы (Kv, Nav, Cav каналы). Они участвуют во многих жизненно-необходимых клеточных процессах, включая регуляцию осмотического баланса, возбудимость мембран, передачу нервного импульса [250], и присутствуют в клетках практически всех организмов – от бактерий и архей до человека [251]. Ключевым структурным элементом в механизме действия потенциалозависимых каналов являются их потенциалочувствительные (ПЧД) или вольт-сенсорные (VSD) домены, которые отвечают за потенциалозависимую активацию, реагируя на изменения трансмембранного потенциала конформационными перестройками [257,258]. При этом роль датчика ТМ потенциала выполняет спираль S4, содержащая несколько (обычно 4) консервативных остатка Arg/Lys, положительные заряды, которых переносятся через мембрану в ходе активации. Согласно современным данным, ПЧД представляют собой функционально независимые домены, слабо связанные с порой, что позволяет исследовать структуру и динамику изолированных доменов.

Изучение строения и функций катионных каналов и их ПЧД является одной из наиболее актуальных задач современной биофизики и интересно по ряду причин. Во-первых, это может помочь в понимании общих принципов протекания потенциалозависимых процессов в клетке [258]. Так, структуры, гомологичные ПЧД катионных каналов, были обнаружены в белках с принципиально отличной функцией и строением (см. Лит. обзор Раздел 1.6). В частности, потенциалозависимые протонные каналы млекопитающих (Hv каналы) функционируют в виде димера субъединиц, имеющих строение, схожее с ПЧД [270]. Потенциалозависимая фосфатаза, обнаруженная у асцидий, имеет ПЧД, ковалентно связанный с цитоплазматическим ферментативным доменом [269]. Во-вторых, знание структуры ПЧД необходимо для исследований, направленных на создание новых лекарственных препаратов. Известно, что мутации в генах K, Na, Ca каналов являются причиной некоторых наследственных заболеваний человека [274]. ПЧД ионных каналов являются мишенью для различных токсинов животного и растительного происхождения, блокирующих потенциалозависимую активацию [281]. Это открывает перспективы создания новых лекарственных средств, действие которых направлено на модуляцию процесса потенциалозависимой активации [282].

Объектом исследования данного раздела диссертационной работы являлся изолированный потенциалочувствительный домен K^+-канала KvAP (ПЧД-KvAP) из

термофильной архебактерии *Aeropyrum pernix* (Рис. 5.1). Имеющиеся на момент начала выполнения работ (2008 год) структурные данные о ПЧД-KvAP были противоречивы. Три известные кристаллические структуры, полученные при разных условиях кристаллизации, сильно отличались друг от друга (см. Рис. 5.8) [267,280]. Было высказано предположение, что важную роль в стабилизации структуры ПЧД-KvAP играет мембранное окружение, и только плоская бислойная мембрана может обеспечивать нативную конформацию домена [280]. Кроме того, методами ЭПР-спектроскопии было показано, что изолированный ПЧД-KvAP, реконструированный в липидные везикулы, принимает пространственную структуру схожую со структурой домена в полноразмерном функциональном канале KvAP в открытом или инактивированном состоянии [268,299].

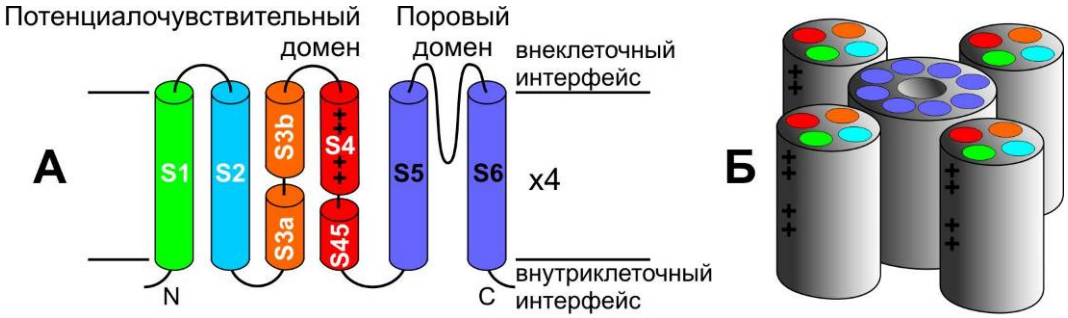


Рис. 5.1. (А) Схема строения одной субъединицы полноразмерного канала KvAP. Спирали ПЧД (S1-S4) и порового домена (S5, S6) показаны различными цветами. Консервативные остатки Arg, ответственные за потенциалозависимую активацию, показаны знаком «+». (Б) Пространственная организация гомотетрамера канала KvAP, содержащего один поровый домен (ПД) и четыре ПЧД в клеточной мембране. Относительная ориентация ПЧД и ПД может различаться в различных состояниях Kv канала (закрытом, открытом, инактивированном и т.д.).

Цели и задачи исследования. Целью исследований, описанных в представленном разделе, являлось: (1) определение структурных и динамических характеристик молекулы ПЧД-KvAP методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения, (2) установление влияния, которое свойства мембраномоделирующей среды могут оказывать на структуру и динамику спиральных мембранных белков, (3) исследование роли внутримолекулярной динамики в функционировании рецепторных МБ, а также (4) изучение механизма взаимодействия ПЧД-KvAP с мембраноактивным токсином VSTx1 (паук *Grammostola spatulata*), влияющим на потенциалозависимую активацию канала KvAP. В рамках работы были поставлены следующие задачи:

1. Изучить возможность использования ЛБН в качестве среды сравнения при выборе оптимальной мембраномоделирующей среды на основе детергентов для структурно-динамических исследований МБ.
2. Получить данные о пространственной структуре и внутримолекулярной динамике ПЧД-KvAP в различных мембраномоделирующих средах.
3. Исследовать процессы формирования (фолдинга) «нативной» структуры ПЧД-KvAP.

4. Изучить взаимодействие токсина VSTx1 с ПЧД-KvAP в различных мембраномоделирующих средах.

Образцы ПЧД-KvAP и его изотопно-меченые (^{2}H,^{13}C,^{15}N) варианты были получены в бактериальной системе экспрессии (*E. coli*) к.х.н. Шингаровой Л.Н. (лаборатория биоинженерии белка ИБХ РАН). Последовательность рекомбинантного белка (Рис. 5.5) содержала первые 148 а.о. (17.3 кДа) из последовательности субъединицы канала KvAP и дополнительную His_6 последовательность на *C*-конце. Рекомбинантный аналог VSTx1 (дополнительно содержащий остатки Gly-Ser на *N*-конце, Рис. 5.19A) был получен в бактериальной системе экспрессии (*E. coli*) к.б.н. Люкмановой Е.Н. (лаборатория биоинженерии белка ИБХ РАН).

5.1 ЛБН как «среда сравнения» для скрининга детергент-содержащих мембраномоделирующих сред при ЯМР-исследованиях МБ[1]

Невозможность структурных исследований мембранных белков методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения непосредственно в бислойной липидной мембране обуславливает необходимость применения детергент-содержащих мембраномоделирующих сред, при этом выбор оптимальной среды представляет собой непростую задачу. Идеальная мембраномоделирующая среда на основе детергента должна сохранять пространственную структуру и функциональность инкапсулированной белковой молекулы и в то же время обеспечивать достаточное качество ЯМР-спектров, необходимое для структурных исследований. Для контроля нативного состояния белковой молекулы в ходе скрининга мембраномоделирующих сред могут использоваться функциональные тесты, такие как связывание лигандов или ферментативная активность. Однако, в тех случаях когда, прямые функциональные тесты не возможны, предположение о том, что ЯМР-спектр хорошего качества, наблюдаемый в мицеллах или бицеллах, соответствует нативной конформации МБ в липидном бислое, может оказаться ошибочным. В настоящее время для подбора мембранного миметика чаще всего применяют два критерия: (1) КД-спектроскопия используется для оценки вторичной структуры и (2) 2D ^{1}H,^{15}N-корреляционные спектры (HSQC или TROSY) используются для оценки качества спектров ЯМР.

В настоящей работе был предложен новый подход для скрининга детергент-содержащих мембраномоделирующих сред, который может применяться в тех случаях, когда функциональное состояние МБ в окружении миметика мембраны не может быть

[1] Исследование ПЧД в цвиттер-ионных детергентах и ЛБН было проведено совместно с А.С. Парамоновым в рамках его кандидатской диссертации (руководители А.С. Арсеньев и З.О. Шенкарев, 2009 г.)

проверено биохимическими или физико-химическими методами. Предложенный метод использует тот факт, что химические сдвиги ядер белка очень чувствительны к структурным изменениям. Таким образом, 2D $^{1}H,^{15}N$-корреляционный спектр может рассматриваться как сигнатура (отпечаток пальца) пространственной структуры белковой молекулы. В этом случае 2D $^{1}H,^{15}N$-спектр МБ, измеренный в системе, содержащей бислойную липидную мембрану (например, в липид-белковых нанодисках), может быть использован в качестве «спектра сравнения» для скрининга классических миметиков мембраны (мицелл или небольших бицелл), которые больше подходят для детальных структурных исследований (Рис. 5.2).

Предложенный подход был протестирован при исследовании ПЧД-KvAP, – изолированного домена, чье функциональное состояние не может быть протестировано в функциональных тестах.

5.1.1 ЯМР-спектроскопия ^{15}N-ПЧД-KvAP в составе нанодисков

Рекомбинантный ПЧД-KvAP был экстрагирован из мембран *E. coli* в виде мономера с помощью мягкого неионного детергента (DDM) и встроен в ЛБН, содержащие цвиттер-ионные насыщенные (DMPC), анионные насыщенные (DMPG) липиды или смесь ненасыщенных липидов различного заряда (POPC/DOPG 3:1). Использованная процедура получения комплексов ПЧД-KvAP/ЛБН была схожа с методом, ранее использованным для реконструкции ПЧД-KvAP в липидные везикулы [268], при которой пространственная структура домена сохранялась.

2D $^{1}H,^{15}N$-TROSY спектры ПЧД-KvAP в составе фрагментов мембран ЛБН (Рис. 5.3) имели достаточное качество для того, чтобы служить «спектрами сравнения» при скрининге «классических» мембраномоделирующих сред. Схожесть полученных $^{1}H,^{15}N$-спектров позволила предположить, что заряд и степень насыщенности липидных молекул не оказывают большого влияния на структуру домена. Все полученные спектры демонстрировали значительные уширения некоторых кросс-пиков, что свидетельствовало о наличии процессов конформационного (мкс-мс) обмена в молекуле ПЧД-KvAP. Наблюдаемые обменные уширения были меньше в ЛБН, содержащих анионные липиды, что вело к визуальному улучшению качества ЯМР-спектров (Рис. 5.3). В этой связи следует отметить, что мембрана *Aeropyrum pernix*, природное окружение канала KvAP, также содержит большое количество анионных фосфолипидов [494].

Для анализа стехиометрии комплексов ПЧД-KvAP/ЛБН/DMPG была использована следующая стратегия. Концентрация липидных молекул в образце была измерена с помощью 1D ^{1}H ЯМР-спектроскопии. Соотношение молярных концентраций ПЧД-KvAP и MSP было оценено по данным аминокислотного анализа. Общую концентрацию белка измеряли спектрофотометрически. Полученные данные показали, что каждый комплекс

ПЧД-KvAP/ЛБН/DMPG содержит одну молекулу ПЧД-KvAP, две молекулы MSP и ~ 100 молекул липидов. Коэффициент трансляционной диффузии (D_T 0.64×10^{-10} $м^2\cdot с^{-1}$, 30ºC) молекул DMPG и скорость кросс-корреляции релаксации η_{XY} ядер ^{15}N ПЧД-KvAP (59 Гц, на частоте 700 МГц при 45°, τ_R ~ 52 нс) соответствовали реориентации в растворе сферической частицы с гидродинамическим радиусом (R_H) ~ 43 Å и 45 Å, соответственно. Полученные оценки для значения R_H хорошо согласуются с диаметром комплекса ПЧД-KvAP/ЛБН/DMPG, измеренном методом гель-фильтрации (~ 9.5 нм). Суммируя полученные данные, можно сделать вывод, что молекула ПЧД-KvAP полностью ассоциирована с частицей ЛБН и реориентируется с ней в растворе как единое целое.

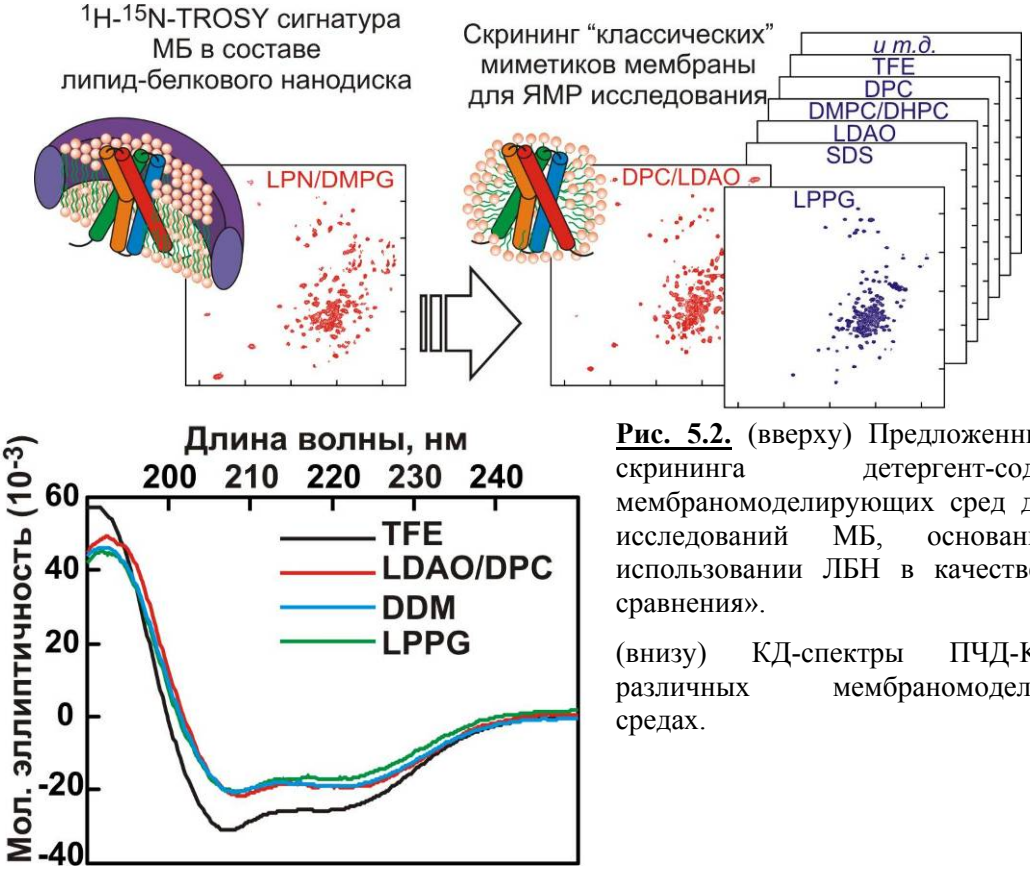


Рис. 5.2. (вверху) Предложенный метод скрининга детергент-содержащих мембраномоделирующих сред для ЯМР-исследований МБ, основанный на использовании ЛБН в качестве «среды сравнения».

(внизу) КД-спектры ПЧД-KvAP в различных мембраномоделирующих средах.

5.1.2 Скрининг мембраномоделирующих сред для исследования ПЧД-KvAP

2D $^1H,^{15}N$-TROSY спектр ПЧД-KvAP, полученный в нанодисках DMPG, был использован в качестве «спектра сравнения» при анализе спектров домена в «классических» мембраномоделирующих средах: мицеллах, бицеллах и органическом растворителе низкой полярности трифторэтаноле (TFE). $^1H,^{15}N$-HSQC спектры ПЧД-KvAP, полученные в мицеллах анионных детергентов (SDS, LMPG, LPPG) и в растворе TFE (Рис. 5.3), существенно отличались от спектра домена в нанодисках. Эти спектры характеризовались небольшой дисперсией $^1H^N$ сигналов (7-9 м.д.), что типично для спиральных белков без выраженных спираль-спиральных взаимодействий, и практически однородными интенсивностями кросс-пиков, что указывало на схожесть динамических

свойств у остатков в различных частях белка.

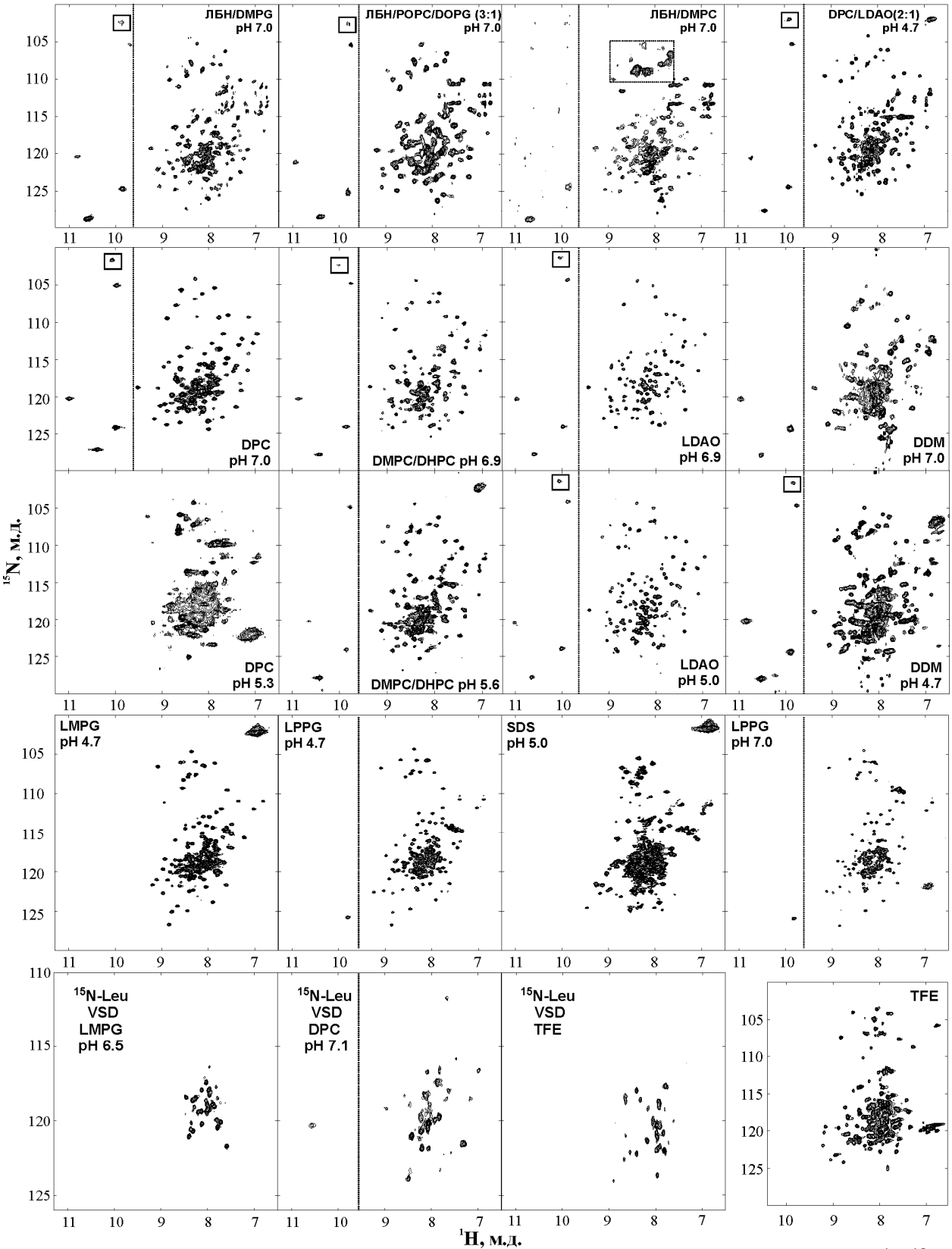


Рис. 5.3. ЯМР-скрининг мембраномоделирующих сред для исследования ПЧД-KvAP. 2D $^{1}H,^{15}N$-HSQC и $^{1}H,^{15}N$-TROSY (для ЛБН) спектры измерены при 45°C с использованием 600 МГц или 700 МГц (для ЛБН) ЯМР-спектрометров. Состав мембранного миметика и pH указаны на каждой панели. Типичные концентрации ПЧД-KvAP и детергентов были равны 0.2 мМ и 40 мМ, соответственно. Концентрации комплексов ПЧД-KvAP/ЛБН были равны 0.06 – 0.13 мМ. HN кросс-пики, «завернутые» по направлению ^{15}N, отмечены прямоугольниками. Регионы спектров, выделенные штриховой линией, для увеличения соотношения сигнал-шум преобразованы с сильной экспоненциальной взвешивающей функцией и показаны с меньшим порогом.

В противоположность этому $^{1}H,^{15}N$-HSQC спектры ПЧД-KvAP, полученные в цвиттер-ионных мицеллах DPC (при нейтральных pH) и бицеллах DMPC/DHPC (1:4) (Рис. 5.3), демонстрировали большую дисперсию $^{1}H^{N}$ сигналов (7-11 м.д.). Эти спектры были схожи со спектрами домена в составе нанодисков и демонстрировали похожее расположение характеристических слабопольных сигналов, а также значительные уширения сигналов, вызванные медленными (мкс-мс) процессами конформационного обмена. $^{1}H,^{15}N$-HSQC спектры ПЧД-KvAP, измеренные в мицеллах слабокатионного детергента LDAO, также были очень близки к спектрам в нанодисках, при этом наблюдаемые обменные уширения имели меньшую величину (Рис. 5.3). Однако образец ПЧД-KvAP в мицеллах LDAO был нестабилен. По данным электрофоретического анализа в течение недели после солюбилизации домена в этом детергенте молекулы домена формировали большие агрегаты, которые не разрушались в жестком детергенте SDS (данные не показаны). Полученные результаты указали на нестабильность пространственной структуры ПЧД-KvAP в окружении мицелл LDAO.

Основываясь на сравнении спектров ПЧД-KvAP в ЛБН и «классических» мембраномоделирующих средах, можно сделать вывод, что домен сохраняет пространственную структуру, близкую к структуре в бислойной липидной мембране, только в средах на основе цвиттер-ионных детергентов. Этот вывод не может быть сделан на основании анализа КД-спектров ПЧД-KvAP (Рис. 5.2). Согласно данным КД-спектроскопии, домен имеет практически идентичную вторичную структуру, характеризующуюся 60% содержанием α-спиральных элементов, во всех протестированных детергент-содержащих миметиках мембраны. Органический растворитель TFE был единственной средой, в которой по данным КД-спектроскопии вторичная структура ПЧД-KvAP значительно отличалась (спиральность ~ 80%). Полученные результаты убедительно показали ограничения метода КД-спектроскопии для сравнительного анализа структуры спиральных МБ в различных мембраномоделирующих средах, и в то же время выявили преимущество предложенного подхода, основанного на сравнении 2D $^{1}H,^{15}N$-ЯМР «сигнатур».

Дальнейший подбор условий для солюбилизации ПЧД-KvAP показал, что оптимальным для исследования домена является окружение смешанных мицелл DPC/LDAO (2:1, pH ~ 5.0). В этих условиях $^{1}H,^{15}N$-спектр ПЧД-KvAP соответствует наблюдаемому в нанодисках, обменные уширения сигналов минимальны, и при этом образец домена остается стабильным в течение времени, необходимого для измерения ЯМР-экспериментов. Детальное структурно-динамическое ЯМР-исследование ПЧД-KvAP, проведенное в этой мембраномоделирующей среде (см. п. 5.2), выявило пространственную структуру, схожую с кристаллической структурой изолированного

домена [267], а также с моделью структуры ПЧД, полученной в ходе исследования полноразмерного канала KvAP в липидных везикулах методом ЭПР-спектроскопии [299]. Полученные результаты подтвердили применимость предложенного подхода, использующего ЛБН в качестве «среды сравнения» при скрининге «классических» мембранных миметиков.

5.1.3 Резюме

Результаты, изложенные в этом разделе, на момент публикации (2010 год), являлись первым успешным примером использования ЛБН для исследования политопного (состоящего из нескольких ТМ спиралей) мембранного белка методом ЯМР-спектроскопии. Несмотря на то, что в проведенных исследованиях нанодиски играли лишь вспомогательную роль, хорошее взаимное соответствие ЯМР-спектров ПЧД-KvAP, измеренных в ЛБН/DMPG и мицеллах DPC/LDAO, указало на возможность прямых структурных ЯМР-исследований спиральных МБ в составе региона бислойной мембраны нанодиска. К сожалению, несмотря на постоянно растущее количество примеров использования ЛБН для ЯМР-исследований МБ, к настоящему времени (2014 год) не было опубликовано ни одного примера установления пространственной структуры спирального МБ в составе мембраны ЛБН. Так, даже использование специально оптимизированных для ЯМР-спектроскопии нанодисков небольшого диаметра (8 нм) не позволило получить $^{1}H,^{15}N$-спектры бактериородопсина с качеством, достаточным для определения пространственной структуры [142].

Метод скрининга мембранных миметиков, предложенный в настоящей работе, основанный на сравнительном анализе 2D $^{1}H,^{15}N$-спектров в детергент-содержащих средах и нанодисках, был недавно успешно применен при исследовании бактериального МБ YgaP, содержащего сравнительно большой цитоплазматический домен, возможно, обладающий родоназной активностью [495]. В этом случае солюбилизация белка в смеси детергентов DC7PC/LMPG с концентрацией, превышающей некоторое пороговое значение, вела к денатурации цитоплазматического домена, однако подобный эффект не наблюдался в нанодисках на основе DMPC [495].

5.2 Структура и динамика «нативного» состояния ПЧД-KvAP

5.2.1 Отнесение ЯМР-сигналов и вторичная структура ПЧД-KvAP в мицеллах DPC/LDAO

Сравнение $^{1}H,^{15}N$-TROSY спектров ПЧД в окружении смешанных мицелл DPC/LDAO (2:1, pH 4.7) и ЛБН/DMPG (pH 7.0) показано на Рис. 5.4. Большая дисперсия $^{1}H^{N}$ сигналов основной цепи (от 6.8 до 10.7 м.д.) указывает на присутствие в молекуле домена сформированной третичной структуры. Уширения сигналов, наблюдаемые для

некоторых остатков (например, Leu26, Trp70, Ala100, и т.д.), указывают на наличие процессов мкс-мс конформационного обмена в молекуле ПЧД.

Для отнесения сигналов белка использовали четыре образца с разными типами введения изотопных меток (^{15}N, ^{13}C/^{15}N, ^{2}H/^{15}N, ^{2}H/^{13}C/^{15}N). Во всех трех образцах конечная концентрация белка составила ~ 1 мМ при молярном соотношении ПЧД-KvAP/DPC/LDAO ~1:100:50. Использование дейтерированного образца оказалось необходимым для уменьшения скоростей поперечной релаксации ядер $^{1}H^{N}$, $^{15}N^{H}$ и ^{13}C [496,497]. Дейтерирование ПЧД в сочетании с экспериментальными методиками оптимизации поперечной релаксации в спиновой паре ^{1}H-^{15}N (TROSY) позволило значительно обузить ЯМР-сигналы и наблюдать практически все спиновые системы белка в спектре 3D HNCA-TROSY. Однако, низкая чувствительность, обусловленная большой массой комплекса домен/мицелла и процессами мкс-мс конформационного обмена, не позволила применить стандартные методики последовательного отнесения спиновых систем. Так, в спектрах HN(CA)CO и HNCACB-TROSY наблюдалось только 70% ожидаемых спиновых систем, а в спектре CBCA(CO)NH, измеренном на ^{13}C/^{15}N-меченом образце, присутствовали только самые интенсивные сигналы.

Для отнесения сигналов основной цепи домена была использована альтернативная методика, основанная на анализе (*i,i+1*), *(i,i+2)* и *(i,i+3)* H^{N}-H^{N} контактов в 3D NOESY–^{15}N-HSQC спектре (τ_m = 150 мс), измеренном на ^{2}H,^{15}N-меченом образце ПЧД-KvAP. Дополнительное использование информации о последовательных контактах из 3D HNCA-TROSY, HN(CA)CO и HNCACB-TROSY спектров, а также информации из HSQC спектра селективно ^{15}N-Leu-меченого образца ПЧД-KvAP позволило получить практически полное (>90%) отнесение сигналов $^{1}H^{N}$, $^{15}N^{H}$, ^{13}C’ и $^{13}C^{\alpha}$ основной цепи и частичное отнесение боковых цепей (~75% $^{13}C^{\beta}$).

Сводка данных ЯМР, полученная для ПЧД-KvAP в мицеллах DPC/LDAO, показана на Рис. 5.5. Для идентификации элементов вторичной структуры были использованы вторичные химические сдвиги ($\Delta\delta = \delta_{obs}-\delta_{rc}$)[1] ядер $^{13}C^{\alpha}$, $^{13}C^{\beta}$ и ^{13}C’ [464] и характерные H^{N}-H^{N} ЯЭО контакты [23]. Эти данные были дополнены данными по скоростям обмена H^{N} протонов с растворителем и данными по температурным градиентам ($\Delta\delta^{1}H^{N}/\Delta T$) [451], которые указывали либо на формирование внутримолекулярных водородных связей, либо на экранирование основной цепи белка от растворителя внутри комплекса белок/детергент. Согласно полученной информации, вторичная структура домена в мицеллярном окружении (Рис. 5.5) включает в себя пять спиралей (S1, S2, S23, S3b и S4), которые характеризуются положительными значениями $\Delta\delta^{13}C^{\alpha}$ и $\Delta\delta^{13}$C’, отрицательными

[1]Разница между наблюдаемым химическим сдвигом δ_{obs} и сдвигом в конформации неупорядоченного клубка δ_{rc}.

значениями $\Delta\delta^{13}C^{\beta}$, наличием *(i,i+1), (i,i+2)* и *(i,i+3)* ЯЭО контактов, замедленным обменом с растворителем и маленькими значениями $\Delta\delta^{1}H^{N}/\Delta T$. Кроме того. в молекуле ПЧД-KvAP наблюдались три «псевдо-спиральных» сегмента (S0, S3a и S45), которые характеризовались либо нерегулярными значениями $\Delta\delta^{13}C$, либо быстрым обменом амидных протонов с растворителем.

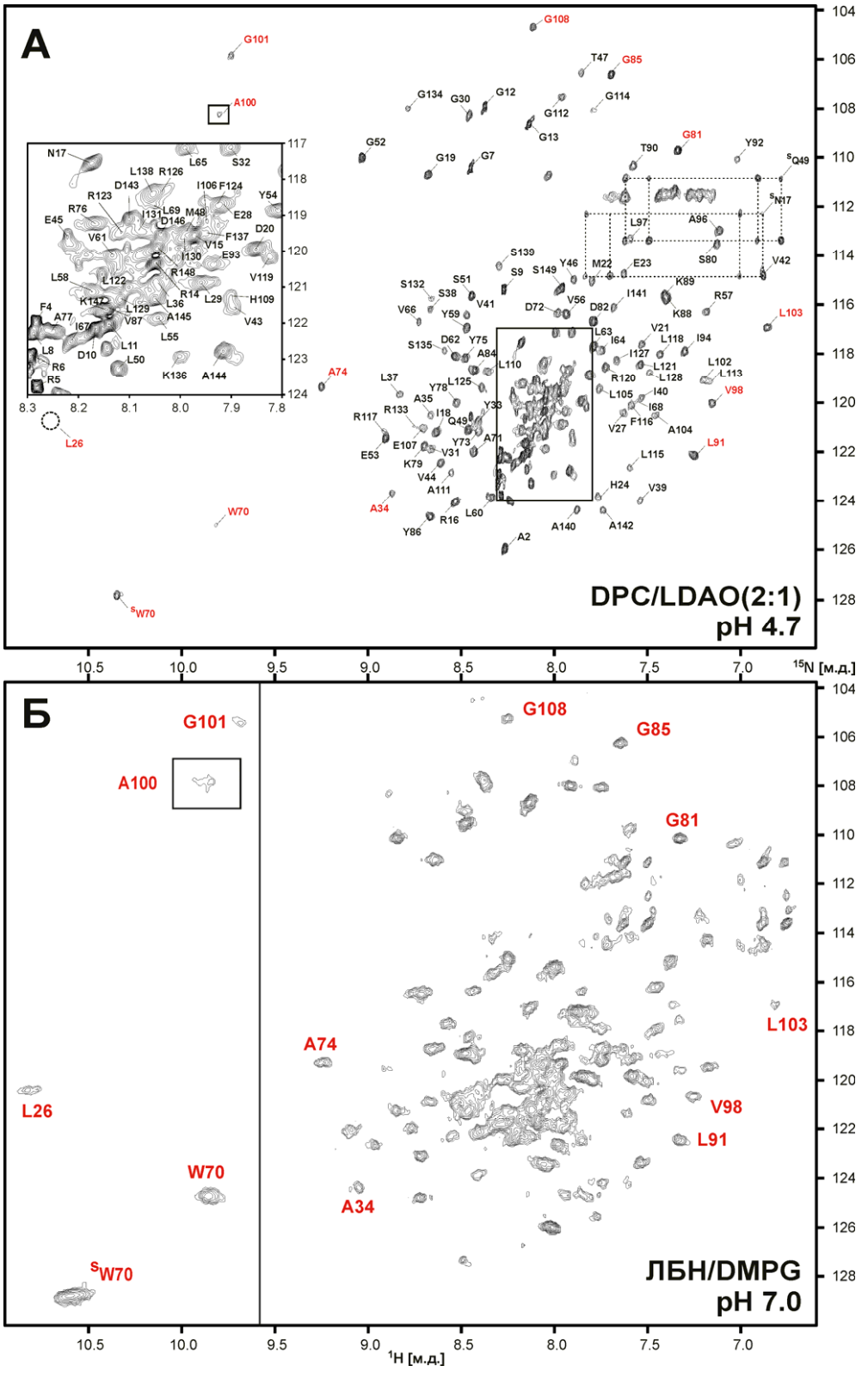


Рис. 5.4. 2D ^{1}H,^{15}N-TROSY спектры (А) 1 мМ ^{2}H,^{15}N-меченого ПЧД-KvAP в 100 мМ d38-DPC, 50 мМ LDAO, pH 4.7, 42°C и (Б) 0.06 мМ ^{15}N-меченого (не дейтерированного) ПЧД-KvAP в комплексе с ЛБН/DMPG, pH 7.0, 45°C. Кросс-пики, заключенные в квадратики, «завернуты» по ^{15}N-направлению. HN кросс-пик Leu26 (обведен кружком) не наблюдается при выбранном пороге отображения.

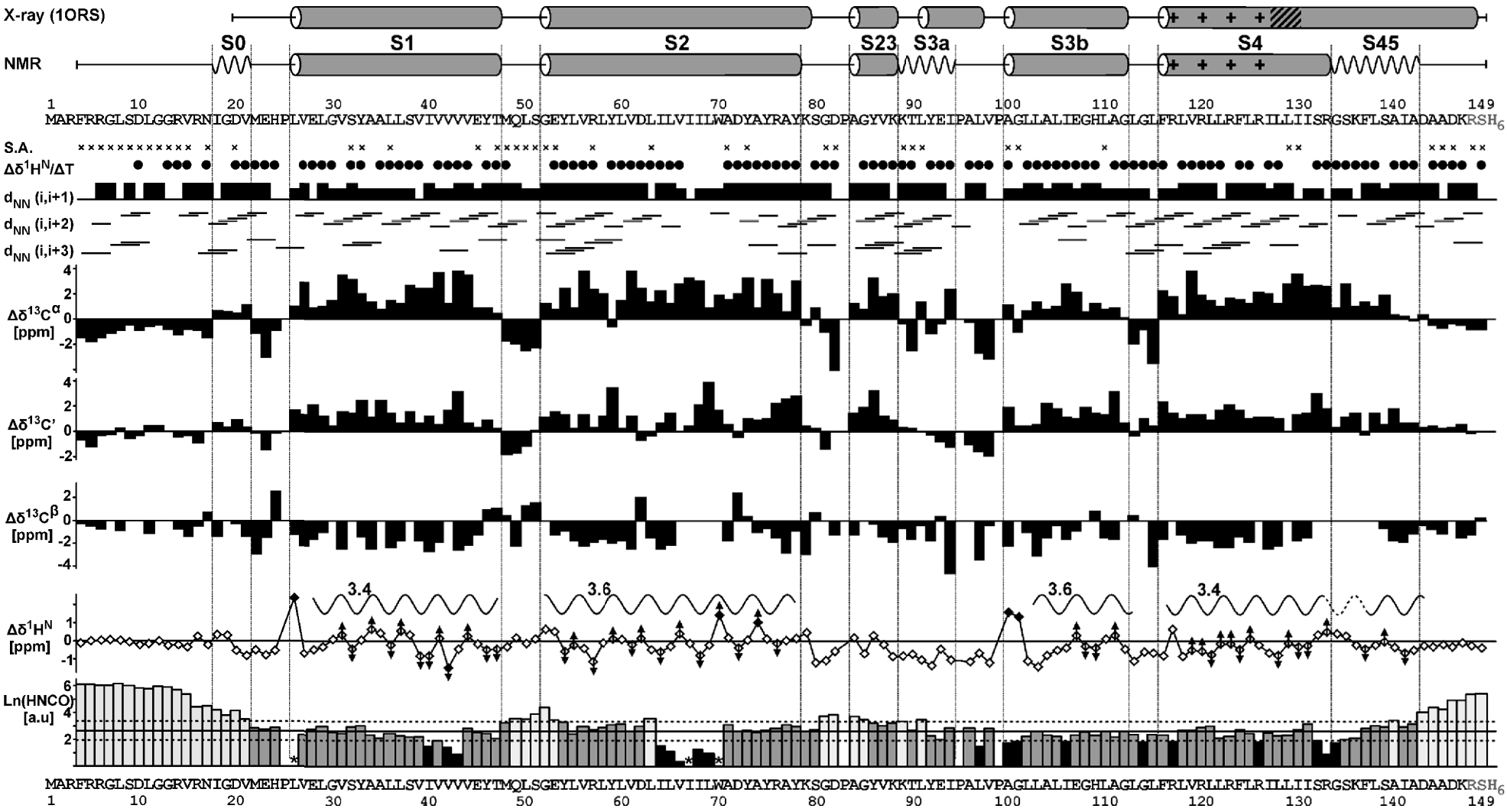

X-ray (1ORS)
NMR
S0
S1
S2
S23
S3a
S3b
S4
S45
MARFRRGLSDLGGRVRNIGDVMEHPLVELGVSYAALLSVIVVVVEYTMQLSGEYLVRLYLVDLILVIILWADYAYRAYKSGDPAGYVKKTLYEIPALVPAGLLALIEGHLAGLGLFRLVRLLRFLRILLIISRGSKFLSAIADAADKRSH6
S.A.
Δδ1HN/ΔT
dNN (i,i+1)
dNN (i,i+2)
dNN (i,i+3)
Δδ13Cα [ppm]
Δδ13C' [ppm]
Δδ13Cβ [ppm]
Δδ1HN [ppm]
3.4
3.6
3.6
3.4
Ln(HNCO) [a.u]

Рис. 5.5. Данные ЯМР, определяющие вторичную структуру ПЧД-KvAP в смешанных мицеллах DPC/LDAO (2:1, pH 4.7 42°C). (S.A.) Крестиками обозначены H^N протоны, для которых в 3D ^{15}N-HNH-NOESY спектре (τ_m 150 мс) наблюдались кросс-пики на ^1H частоте воды. Отсутствие кросс-пика указывает на замедленный обмен $^1H^N$ с растворителем. ($\Delta\delta^1H^N/\Delta T$) Кружки обозначают амидные протоны, имеющие амплитуду температурного градиента менее 4.5 ppb/K. Температурные градиенты измеряли в диапазоне 25 - 50ºC, используя спектры 3D HNCO. (d_{NN}) H^N-H^N ЯЭО контакты, наблюдаемые в 3D спектре HNH-NOESY (τ_m 150 мс). ($\Delta\delta$) Вторичные химические сдвиги ядер $^{13}C^\alpha$, $^{13}C'$, $^{13}C^\beta$ и $^1H^N$. Положительные значения $\Delta\delta^{13}C^\alpha$ и $\Delta\delta^{13}C'$ и отрицательные значения $\Delta\delta^{13}C^\beta$ указывают на спиральную конформацию. Периодичность значений $\Delta\delta^1H^N$ показана волнистыми линиями, указаны периоды колебаний, выраженные в числе остатков на виток. Потеря периодичности между сегментами S4 и S45 показана пунктиром. Остатки, принадлежащие сегментам S1, S2, S3b, S4 и S45 и демонстрирующие большие сдвиги $\Delta\delta^1H^N$ по сравнению с соседями, показаны стрелками. Значения $\Delta\delta^1H^N$ на *N*-концевых участках сегментов S1, S2, S3b и S4 могут включать вклады от электростатических эффектов, вызванных дипольным моментом спиралей. $^1H^N$, обсуждаемые в тексте, помечены заполненными ромбиками. (Ln[HNCO]) Логарифм интенсивности кросс-пиков в спектре 3D HNCO. Уровень, соответствующий средней интенсивности (рассчитан по участку S1-S45), показан линией. Уровни, соответствующие в два раза большей и в два раза меньшей интенсивностям, показаны пунктиром. Интенсивности HNCO пиков разбиты на три категории: слабые, средние и сильные (черные, серые и белые прямоугольники, соответственно). Звездочками обозначены не наблюдаемые пики HNCO. Элементы вторичной структуры, наблюдаемые в кристалле изолированного ПЧД-KvAP [267] (X-Ray 1ORS) и определенные в настоящей работе (NMR) показаны наверху рисунка. Спирали показаны цилиндрами, а псевдо-спиральные элементы – волнистыми линиями. Шарнирный регион между S4 и S45, выявленный в ЭПР-исследовании [299], заштрихован. Консервативные остатки Arg, ответственные за потенциалозависимую активацию показаны знаком «+». Остатки, дополнительно введенные в последовательность домена при клонировании, показаны серым.

Сравнение наблюдаемой в растворе вторичной структуры с вторичной структурой изолированного ПЧД-KvAP в кристалле [267] (Рис. 5.5, вверху) выявило лишь небольшие различия. Так, в растворе наблюдались искажения в сегментах S3a и S45 и присутствовал дополнительный «псевдо-спиральный» участок S0. Следует отметить, что увеличенная доступность растворителю на участках S23-S3a согласуется с данными, полученными ранее методом Cis-сканирующего мутагенеза на полноразмерном канале KvAP в мембране клеток *E. coli* [498]. Кроме того, наличие изгиба спирали (шарнирного региона) между участками S4 и S45 (которые имеют структуру одной прямой α-спирали в кристалле) ранее наблюдалось в ходе ЭПР-исследования полноразмерного канала KvAP в липидной мембране [299]. С другой стороны, короткий элемент S0 ранее не наблюдался в кристаллографическом исследовании из-за низкой электронной плотности *N*-концевого участка ПЧД-KvAP. Этот сегмент включает в себя только 4 остатка (Ile18-Val21) и, возможно, представляет собой один виток спирали или последовательность β-поворотов. Однако, в структуре химерного Kv1.2/2.1 канала млекопитающих есть схожий короткий (~ 10 а.о.) спиральный элемент (S0), который располагается на интерфейсе вода/мембрана [263]. Спиральный элемент S0 также наблюдали в ходе более позднего структурного ЯМР-исследования ПЧД-KvAP, проведенного в мицеллах DC7PC [314] (см. Лит. Обзор п. 1.6.3)

5.2.2 Изгиб ТМ спиралей и межспиральные контакты в молекуле ПЧД-KvAP

Вторичные химические сдвиги амидных протонов ($\Delta\delta^1H^N$, Рис. 5.5) в спиралях S1, S2, S3b, S4, и S45 демонстрировали характерную периодичность. Наиболее значительные сдвиги в сильное и слабое поле наблюдались для каждого 3-го и 4-го остатков. Подобная периодичность химических сдвигов обычно является следствием изгиба спирали [499,500], при этом более короткие водородные связи на вогнутой стороне спирали ведут к сдвигу сигналов $^1H^N$ в слабое поле ($\Delta\delta^1H^N > 0$), а удлинение водородных связей на выпуклой стороне ведет к сдвигу в сильное поле [463,500]. Сравнение кристаллической структуры ПЧД-KvAP [267] с полученными данными ЯМР показало, что изгиб спиралей S1, S2, S3b и S4 соответствует наблюдаемой периодичности значений $\Delta\delta^1H^N$ (Рис. 5.6). Это позволяет сделать вывод о том, что изгиб спиралей домена, наблюдаемый в кристаллическом окружении, сохраняется при солюбилизации молекулы ПЧД-KvAP в мицеллах DPC/LDAO. Наблюдаемая периодичность значений $\Delta\delta^1H^N$ нарушается в шарнирном регионе на стыке сегментов S4 и S45, более того, период изменений $\Delta\delta^1H^N$ на участке S45 не совпадает с изгибом этого сегмента в кристалле (Рис. 5.6). Эти данные дополнительно подтверждают предположение о том, что в растворе мицелл элементы S4 и S45 ведут себя как независимые спирали, возможно, соединенные гибким шарниром.

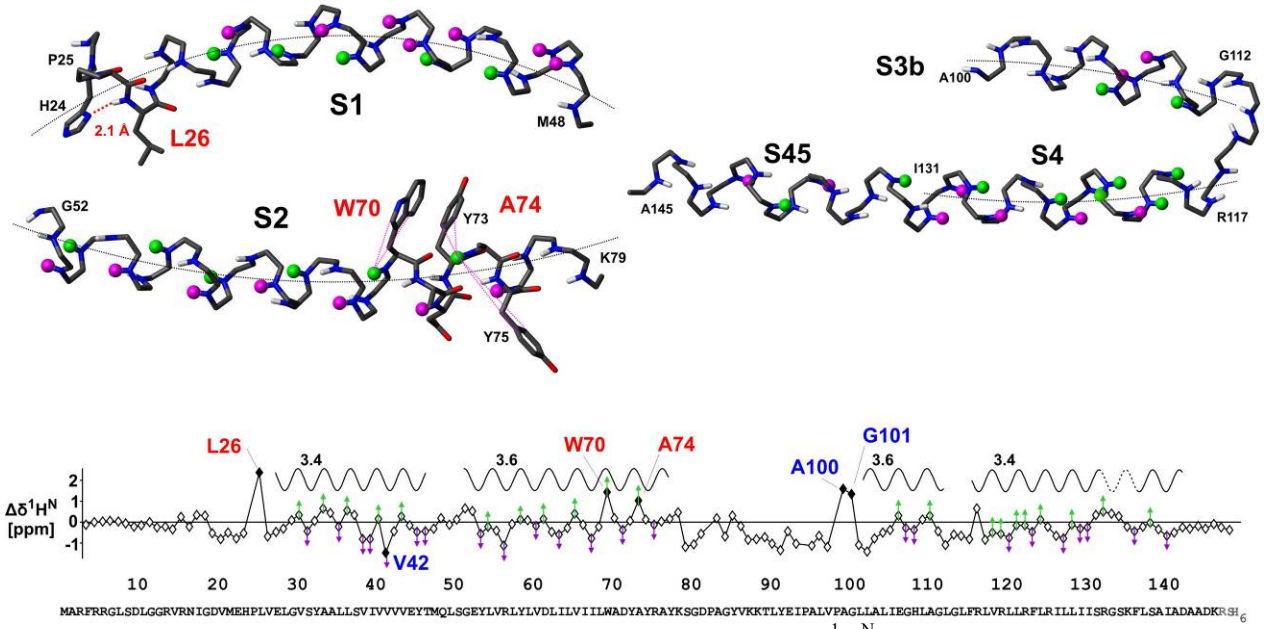


Рис. 5.6. Вторичные химические сдвиги амидных протонов ($\Delta\delta^1H^N$) отражают изгиб спиралей в молекуле ПЧД-KvAP. Фрагменты кристаллической структуры изолированного домена (PDB код 1ORS), соответствующие спиралям S1, S2, S3b, S4 и S45, показаны наверху. Зеленые (малиновые) шарики и стрелочки обозначают $^1H^N$ сигналы, сдвинутые в слабое (сильное) поле. *N*-концевые фрагменты спиралей не анализировались из-за возможного влияния электрического дипольного момента. Из рисунка хорошо заметна корреляция между кривизной спирали и значениями $\Delta\delta^1H^N$ (см. текст).

Наблюдаемые вторичные сдвиги $\Delta\delta^1H^N$ также несут информацию и о других взаимодействиях в рамках третичной структуры ПЧД-KvAP. Так, например, большой сдвиг сигнала $^1H^N$ Leu26 в слабое поле (+2.38 м.д.), вероятно, вызван комбинацией трех

электростатических эффектов (1) образование водородной связи с боковой цепью His24, (2) кольцевой ток в боковой цепи His24 (в присутствии магнитного поля ЯМР-спектрометра, эффект «ring-current shift» [463]), (3) дипольный момент спирали S1 (Рис. 5.6). Значительные сдвиги $^{1}H^{N}$ сигналов Trp70 и Ala74 в слабое поле (+1.44 и +1.02 м.д.) также могут быть объяснены эффектом «ring-current shift», вызванном боковыми цепями соседних ароматических остатков Trp70, Tyr73 и Tyr 75 (Рис. 5.6).

Анализ кристаллической структуры ПЧД-KvAP показал, что за значительные $\Delta\delta^{1}H^{N}$ сдвиги сигналов Ala100 и Gly101 (спираль S3b, +1.59 и +1.34 м.д.), ответственны сильные водородные связи с заряженной боковой Asp62 (спираль S1) и связанной с белком молекулой воды (Рис. 5.7). Присутствие связанной молекулы воды вблизи от Gly101 и пространственная сближенность $^{1}H^{N}$ Gly101 (S3b) и ароматической боковой цепи Tyr59 (S1) были подтверждены наблюдаемыми ЯЭО контактами (Рис. 5.7). Кроме того, большой сдвиг в сильное поле (-1.45 м.д.) $^{1}H^{N}$ сигнала Val42 может быть объяснен разрушением α-спиральной водородной связи в середине участка S1, вызванного взаимодействием с заряженной боковой цепью Arg133 (S4). Полученные данные согласуются с кристаллической структурой ПЧД-KvAP, в которой солевой мостик Asp62-Arg133 (S1-S4) является одним из главных межспиральных взаимодействий, которые стабилизируют третичную структуру домена [267].

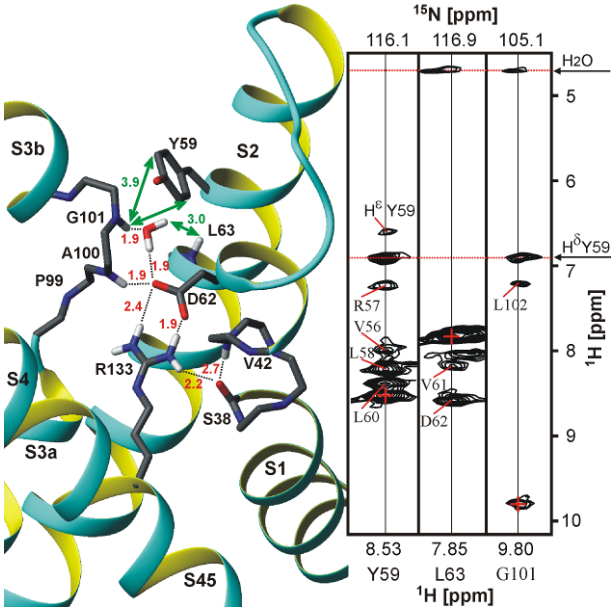


Рис. 5.7. Данные ЯМР, полученные для молекулы ПЧД-KvAP в мицеллах DPC/LDAO, подтверждают формирование межспирального солевого мостика Asp62-Arg133 и наличие связанной молекулы воды, наблюдаемой в кристаллической структуре домена (PDB код 1ORS). Длины водородных связей и расстояния протон-протон (Å), наблюдаемые в кристаллической структуре, показаны красным и зеленым цветами, соответственно. На вкладке показан фрагмент 3D HNH-NOESY спектра (τ_m 150 мс), измеренного с использованием ^{2}H,^{15}N-меченого образца ПЧД-KvAP. Диагональные кросс-пики показаны красными крестиками. Резонансные ^{1}H частоты воды и $^{1}H^{\delta}$ Tyr59 показаны красным пунктиром.

Сравнение измеренных химических сдвигов ядер ^{1}H, ^{13}C и ^{15}N ПЧД-KvAP со значениями, предсказанными по имеющимся кристаллическим структурам домена (расчет химических сдвигов проводили в программе SPARTA [501]), показало, что пространственная структура домена в мицеллах DPC/LDAO лучше соответствует структуре изолированного домена, чем структурам домена в кристаллах полноразмерного канала KvAP (Рис. 5.8).

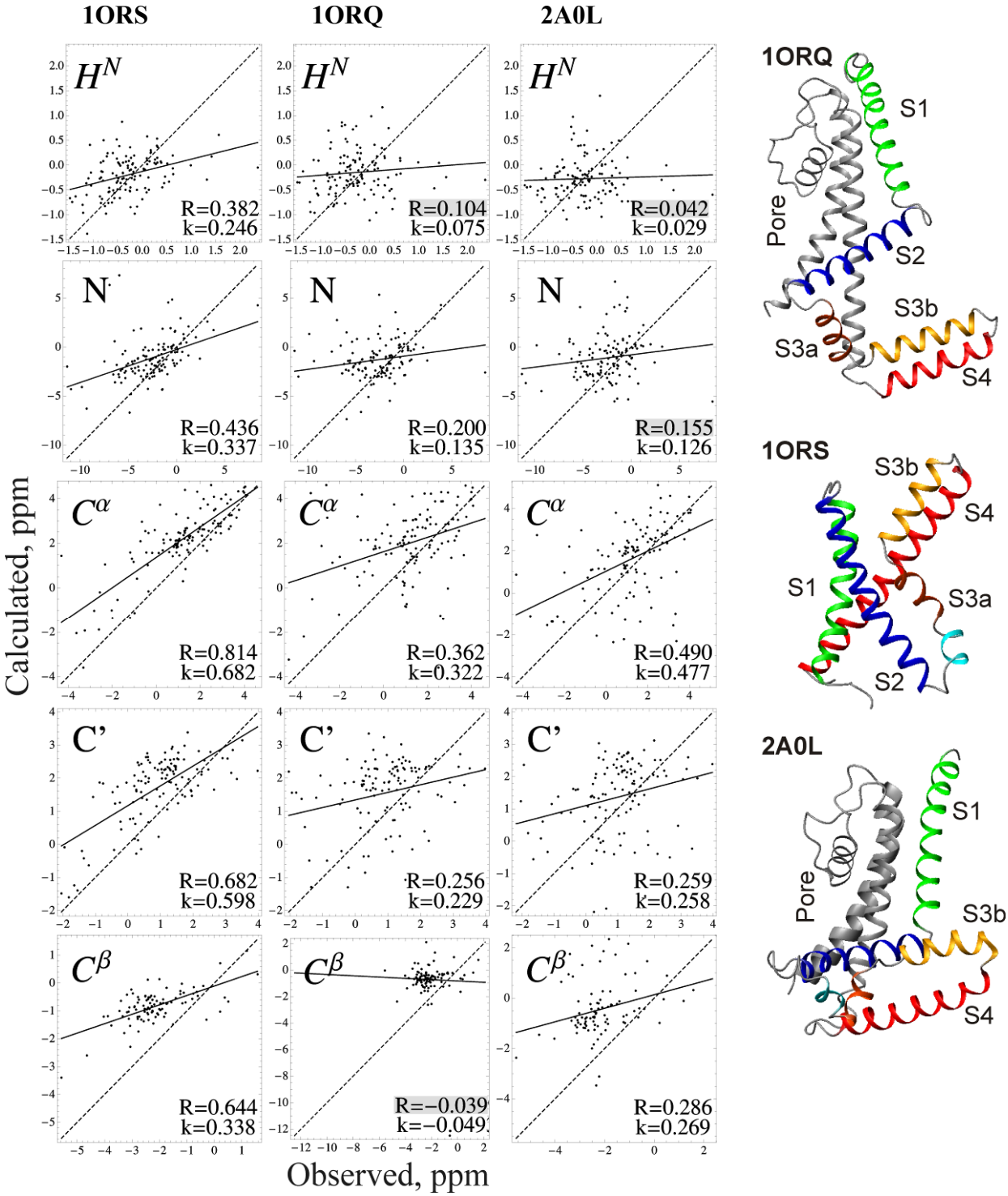


Рис. 5.8. Сравнение вторичных химических сдвигов (разница между наблюдаемым/рассчитанным химическим сдвигом $\delta_{obs}/\delta_{calc}$ и сдвигом в конформации неупорядоченного клубка δ_{rc}), измеренных для ПЧД-KvAP в смешанных мицеллах DPC/LDAO ($\Delta\delta_{obs}$), со значениями, предсказанными по имеющимся кристаллическим структурам домена ($\Delta\delta_{calc}$). Кристаллические структуры и соответствующие коды PDB показаны справа. На каждой диаграмме приведен коэффициент корреляции (***R***) и угол наклона линии приближающей зависимость $\Delta\delta_{calc}$ от $\Delta\delta_{obs}$ ***k***. Значения ***R,*** выделенные серым, указывают на отсутствие корреляции с вероятностью, превышающей 95%. Идеально коррелированные пары значений должны приближаться диагональной линией (пунктир) с наклоном ***k*** = 1.0.

5.2.3 Динамика основной цепи ПЧД-KvAP в мицеллах DPC/LDAO

Большой разброс интенсивностей кросс-пиков в 3D HNCO спектре домена (Рис. 5.5) указывает на значительную внутримолекулярную подвижность ПЧД-KvAP. При этом

значительное увеличение или уменьшение интенсивностей кросс-пиков по сравнению со средними значениями, вероятно, является следствием быстрых (нс-пс) и медленных (мкс-мс) движений, соответственно. Наблюдаемое распределение интенсивностей указывает на значительную нс-пс подвижность в *N*- и *C*-концевых регионах, петле S1-S2 и спиралях S23-S3a (Рис. 5.9E). В то же время значительные мкс-мс флуктуации локализованы в центральных регионах сегментов S1 и S2 и в шарнирных регионах между спиралями S3a-S3b и S4-S45 (Рис. 5.9Ж). Значительное уширение HN сигнала Leu26, вероятно, вызвано динамическим протонированием/депротонированием боковой цепи His24, образующей водородную связь с амидной группой Leu26 (см. выше).

Для более детального исследования динамики основной цепи ПЧД-KvAP в мицеллах DPC/LDAO на спектрометре с рабочей частотой ^{1}H 600 МГц были измерены релаксационные параметры ядер ^{15}N (Рис. 5.9). Из-за перекрывания сигналов в 2D ^{1}H,^{15}N-корреляционных спектрах домена и из-за недостаточной чувствительности в случае уширенных остатков релаксационные данные были получены только для 99 (из ~ 145) $^{15}N^{H}$ групп. Наличие значительных пс-нс движений в *N*- и *C*-концевых регионах домена (включая *C*-концевой фрагмент спирали S45) и петле S1-S2 было подтверждено низкими (< 0.6) значениями гетероядерного ЯЭО ^{15}N-{^{1}H} (Рис. 5.9). Наличие мкс-мс конформационных флуктуаций анализировали, используя произведение $R_1 \times R_2$, как описано в [502]. Значения $R_1 \times R_2$, превышающие пороговое значение 20 c^{-2}, наблюдаемые в середине спиралей S1 и S2, а также в шарнирных регионах между спиралями S3a-S3b и S4-S45 (Рис. 5.9), подтвердили наличие значительной мкс-мс подвижности в этих регионах домена.

Полученные данные показали, что основная цепь ПЧД-KvAP в окружении мицелл DPC/LDAO совершает движения в нескольких временных диапазонах. В дополнение к полученным данным, указавшим на значительные пс-нс движения в *N*- и *C*-концевых регионах домена (включая *C*-концевой фрагмент спирали S45), петле S1-S2 и сегментах S23-S3a (Рис. 5.19E), мы можем предположить наличие подвижности в этом диапазоне времен у всего сегмента S45. Действительно, этот «псевдо-спиральный» элемент характеризуется небольшими величинами $\Delta\delta^{13}C^{\alpha}$ и $\Delta\delta^{13}C'$ и отсутствием характеристических (*i,i+3*) контактов ЯЭО (Рис. 5.5). Подвижность сегмента S45, вероятно, связана со спираль-изгибающими движениями, происходящими в шарнирном регионе (Ile131-Arg133), соединяющем спирали S4 и S45. Следует отметить, что высокоамплитудные спираль-изгибающие движения с центром на остатке Ile130 были выявлены в ходе исследования изолированного ПЧД-KvAP в мицеллах β-децилмальтозида (DM) методами компьютерного моделирования и молекулярной динамики [503].

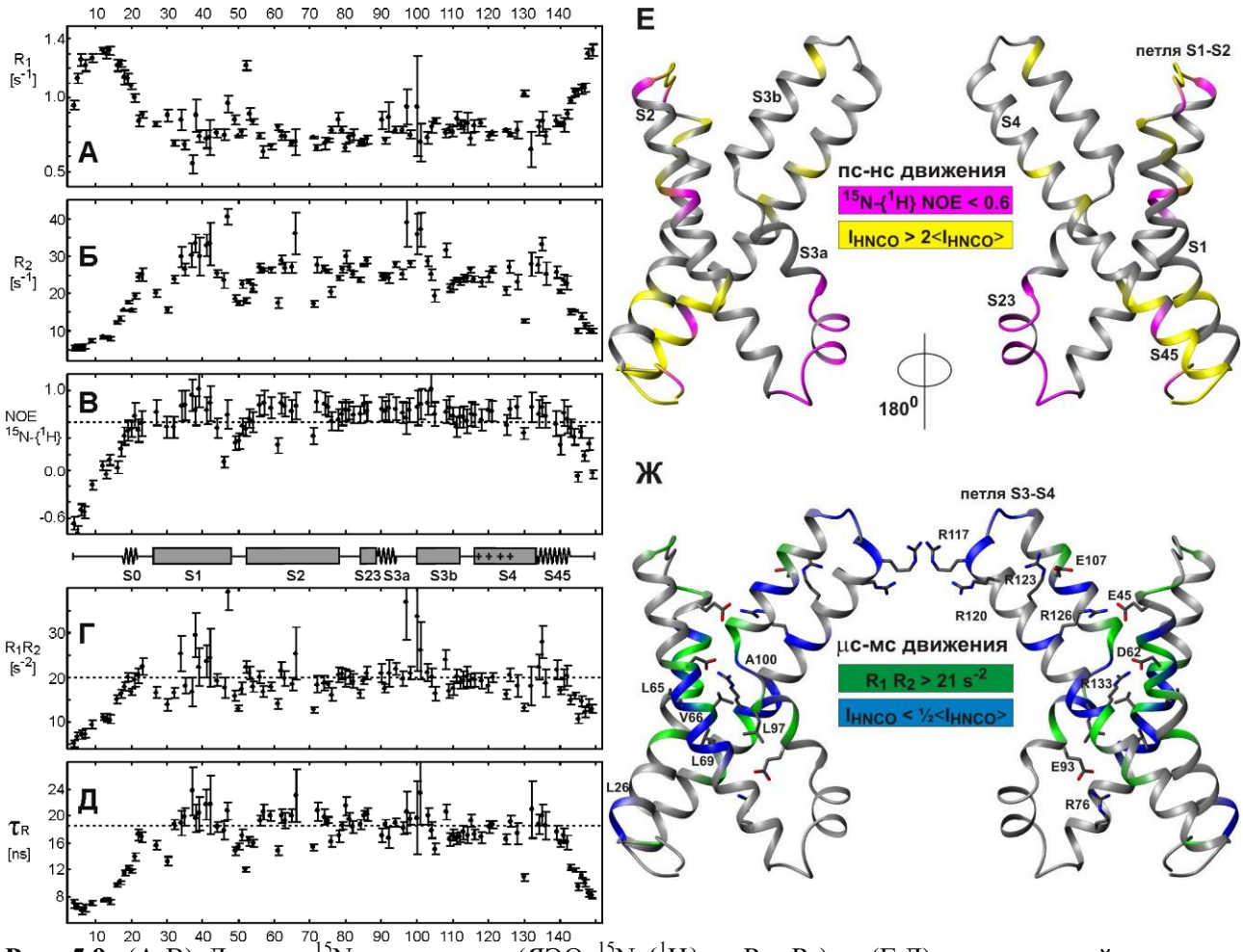


Рис. 5.9. (А-В) Данные ^{15}N релаксации (ЯЭО ^{15}N-{^{1}H} и R_1, R_2) и (Г,Д) качественный анализ динамики основной цепи ПЧД-KvAP в мицеллах DPC/LDAO (pH 4.7, 45º, 60 МГц). (В) Остатки, демонстрирующие ЯЭО < 0.6, совершают значительные движения в пс-нс диапазоне. (Г) Остатки, демонстрирующие произведение $R_1 \times R_2 > 20$ с$^{-2}$, подвергаются значительным конформационным флуктуациям в мкс-мс диапазоне [502]. (Д) Эффективные времена вращательной корреляции рассчитаны из отношения R_2/R_1. Среднее значение (18.4 нс, рассчитано по «стабильным» регионам молекулы: ЯЭО > 0.6, $R_1 \times R_2 < 20$ с$^{-2}$) показано пунктиром. (Е,Ж) Распределение пс-нс и мкс-мс движений показано на кристаллической структуре изолированного ПЧД-KvAP (PDB 1ORS). (Е) Остатки, демонстрирующие ЯЭО ^{15}N-{^{1}H} < 0.6, и последовательные пары остатков, у которых интенсивность кросс-пиков в HNCO спектре в два раза превышает среднее значение, показаны желтым и малиновым цветом, соответственно. (Ж) Остатки, демонстрирующие $R_1 \times R_2 >$ 21 с$^{-2}$, и последовательные пары остатков, у которых интенсивность HNCO кросс-пиков в два раза меньше среднего значения, показаны зеленым и синим цветом, соответственно.

Согласно полученным данным, петля S3b-S4 в отличие от других петлевых участков домена не совершает значительных движений в пс-нс диапазоне, что согласуется с замедленным обменом амидных протонов с растворителем и наличием (*i,i+2*) и (*i,i+3*) ЯЭО контактов в этом регионе молекулы (Рис. 5.5). Таким образом, спиральная шпилька S3b-S4 (так называемая “потенциалочувствительная лопасть”) является довольно стабильным структурным элементом, что было также отмечено в ходе кристаллографического исследования [267]. Несмотря на значительные различия в общей структуре ПЧД-KvAP, спиральная шпилька S3b-S4 имела одинаковую пространственную структуру во всех трех кристаллических формах [267,280].

Наиболее интересным свойством внутримолекулярной динамики ПЧД-KvAP является наличие выраженных мкс-мс движений в спиральной связке, образующей домен (Рис. 5.9Ж). Эти движения локализованы во всех 4-х спиралях домена на остатках, участвующих в формировании межспиральных контактов (на уровне солевого мостика Asp62-Arg133), включая Ala100, Gly101 (которые взаимодействуют с Asp62 через сеть электростатических взаимодействий, Рис. 5.7) и гидрофобные остатки Leu65, Val66, Ala96, Leu97, которые согласно данным МД разделяют внеклеточную и внутриклеточную полости домена, заполненные растворителем [503,504]. Один набор ЯМР-сигналов, наблюдаемый для всех остатков ПЧД-KvAP, указывает на то, что обменные процессы в молекуле домена идут быстро по шкале химических сдвигов ЯМР. Вероятно, конформационные флуктуации, связанные с этими процессами, имеют малую амплитуду и не вызывают разрушения солевого мостика Asp62-Arg133. Следует учесть, что низкоамплитудные движения в регионе межспиральных контактов могут вызывать сравнительно большие относительные перемещения концов спиралей и петлевых регионов. Однако релаксационные ЯМР-данные могут быть не чувствительны к движениям подобного типа.

5.2.4 Гидродинамические свойства и топология комплекса ПЧД-KvAP/мицелла DPC/LDAO

Эффективное время вращательной корреляции (τ_R) для каждого из остатков ПЧД-KvAP в комплексе с мицеллой DPC/LDAO было рассчитано из отношения R_2/R_1 (Рис. 5.9Д). Среднее значение τ_R (18.4 нс), рассчитанное по «стабильным» регионам молекулы (ЯЭО > 0.6, $R_1 \times R_2 < 20$ c^{-2}), соответствовало реориентации в растворе сравнительно большого комплекса ПЧД/мицелла ($R_H \sim 32$ Å, масса ~ 50 кДа). Полученная оценка для гидродинамического радиуса совпадает с суммой радиуса поперечного сечения ПЧД-KvAP (~ 10 Å) и длиной молекулы детергента (~ 20 Å для DPC и LDAO). Таким образом, комплекс KvAP/мицелла представляет собой мономер белка, гидрофобная поверхность которого покрыта одним слоем детергента (как схематически показано на Рис. 5.10). Подобная топология комплекса согласуется с наблюдаемым распределением ЯЭО контактов между $^1H^N$ группами ПЧД-KvAP и метильными группами детергента LDAO[1] (Рис. 5.10Б), а также с данными по парамагнитному усилению релаксации, вызванному спиновым зондом 16-DSA (Рис. 5.10А).

Наблюдаемое распределение ЯЭО контактов между $^1H^N$ группами ПЧД-KvAP и протонами воды (Рис. 5.10Г) показало, что молекула домена с внеклеточной и внутриклеточной сторон мембраны содержит две полости, заполненные растворителем,

[1] В работе использовали дейтерированный вариант d38-DPC, что не позволяло наблюдать ЯЭО контакты на протоны этого детергента.

которые разделяются гидрофобными остатками (Leu65, Val66, Ala96, Leu97), располагающимися чуть ниже уровня солевого мостика Asp62-Arg133, при этом молекулы воды способны проникать на уровень, соответствующий середине гидрофобного региона бислоя. Данные по парамагнитному усилению релаксации, вызванному парамагнитными катионами Mn^{2+} (Рис. 5.10В), подтвердили наличие полости, заполненной растворителем с внутриклеточной стороны домена и указали на наличие нескольких сайтов связывания двухвалентных катионов в этом регионе ПЧД-KvAP. Следует отметить, что пространственная организация домена в виде «песочных часов» с двумя полостями, заполненными растворителем, согласуется с результатами комплексного исследования топологии изолированного ПЧД-KvAP в фосфолипидной мембране методами дифракции нейтронов, ЯМР-спектроскопии твердого тела и молекулярной динамики [312].

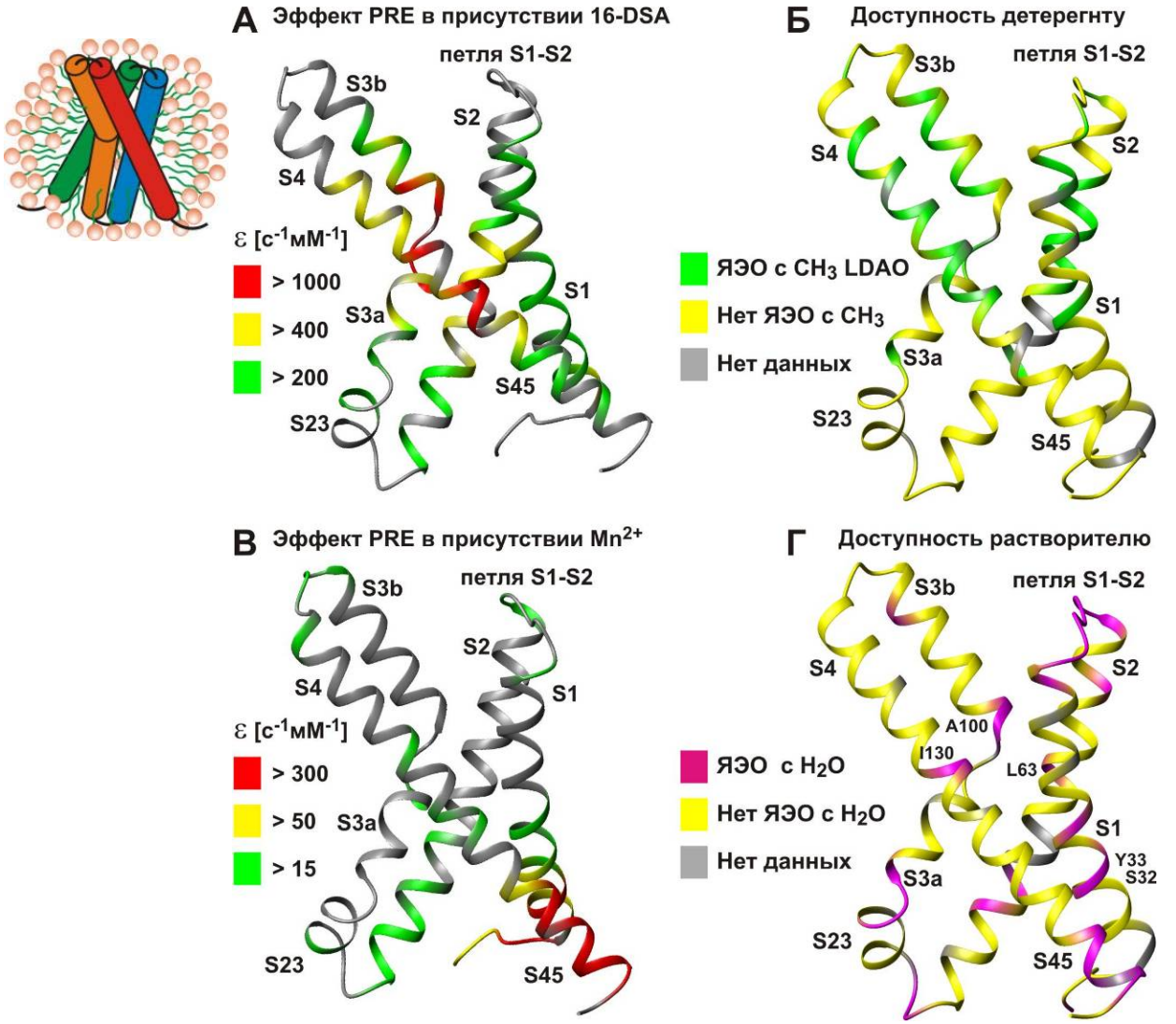


Рис. 5.10. Предполагаемая топология комплекса ПЧД-KvAP мицелла DPC/LDAO. (А,В) Парамагнитное усиление R_2 релаксации H^N протонов основной цепи ПЧД-KvAP, вызванное добавлением гидрофобной спиновой метки (16-DSA) и водорастворимых парамагнитных катионов Mn^{2+} (в форме $MnCl_2$). (Б,Г) Доступность отдельных HN протонов ПЧД-KvAP детергенту и растворителю. Доступность детергенту и растворителю анализировали по наличию кросс-пиков на частоте метильной группы детергента LDAO (0.83 м.д.) и воды (4.63 м.д.) в 3D HNH-NOESY спектре (τ_m 150 мс) $^2H,^{15}N$-меченого домена.

5.2.5 Качественный анализ динамики ПЧД-KvAP в нанодисках различного липидного состава

Конформационные флуктуации в мкс-мс диапазоне времен, наблюдаемые в ПЧД-KvAP, вероятно, отражают способность спиралей домена совершать скользящие движения друг относительно друга. Для того, чтобы качественно проанализировать динамику домена в средах, содержащих бислойную липидную мембрану, было проведено сравнение амплитуд отдельных HN сигналов (Рис. 5.4, показаны красным) в 2D $^{1}H,^{15}N$-TROSY спектрах ПЧД-KvAP, измеренных в мицеллах DPC, мицеллах DPC/LDAO и в нанодисках, содержащих различные липиды (DMPC, DMPG и POPC/DOPG 3:1) (Рис. 5.11). Уширения сигналов Ala100 и Gly101, вызванные обменными процессами, наблюдались во всех протестированных средах, что указывало на присутствие схожих мкс-мс флуктуаций. Вероятно, эти межспиральные движения являются свойством потенциалочувствительного домена и также присутствуют в полноразмерном канале KvAP, встроенном в бислойную мембрану.

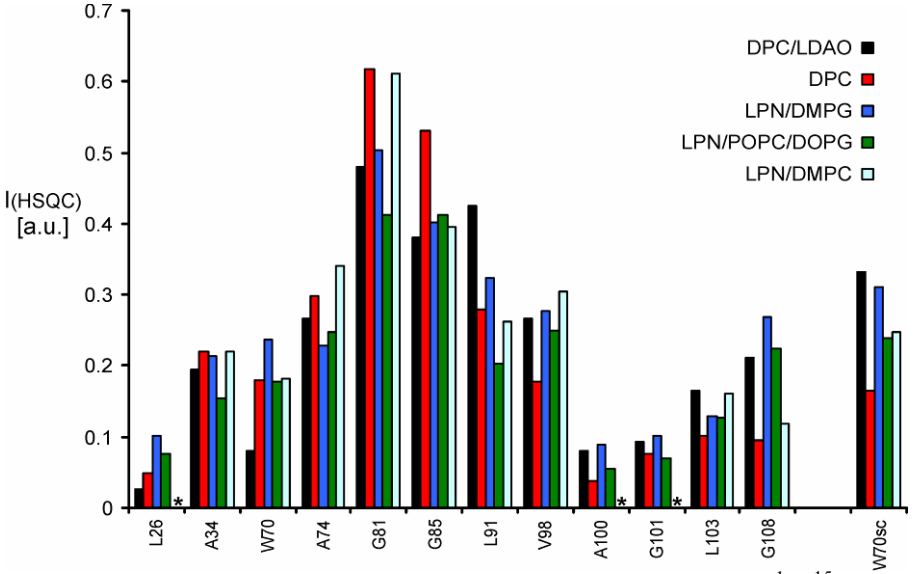


Рис. 5.11. Нормализованные амплитуды некоторых HN кросс-пиков в 2D $^{1}H,^{15}N$-TROSY спектрах ПЧД-KvAP, измеренных в различных мембраномоделирующих средах. Также показана интенсивность $HN^{\varepsilon 1}$ сигнала боковой цепи Trp70 (W70sc). HN кросс-пики Leu26, Ala100 и Gly101 в ЛБН/DMPC (звездочки) не наблюдались из-за сильного уширения.

5.2.6 Резюме.

Резюмируя полученные результаты, мы можем заключить, что в ходе исследований была охарактеризована вторичная и третичная структура, а также внутримолекулярная динамика ПЧД-KvAP в окружении смешанных мицелл DPC/LDAO. Сравнение полученных данных с результатами предыдущих исследований канала KvAP и ПЧД-KvAP методами РСА и ЭПР-спектроскопии [267,268,299] показало соответствие пространственной структуры домена в окружении мицелл DPC/LDAO структуре домена в активированном состоянии (ТМ потенциал отсутствует, состояние соответствующее открытому или инактивированному каналу). Следует отметить, что аналогичная

пространственная структура была получена в ходе более позднего ЯМР-исследования изолированного ПЧД-KvAP в мицеллах DC7PC [314][1].

Наблюдаемая структурная организация ПЧД, содержащего большие полости, заполненные растворителем, согласуется с концепцией «сфокусированного электрического поля», в рамках которой предполагается, что основное падение ТМ потенциала происходит на небольшом участке в середине ПЧД, длина которого (5-10 Å) значительно меньше толщины бислоя (~40 Å) [293]. Именно через этот участок и осуществляется перенос 4-х элементарных положительных зарядов в ходе потенциалозависимой активации.

Движения спиралей домена относительно друг друга, наблюдаемые в мкс-мс диапазоне времен, отражают конформационную нестабильность, свойственную структуре домена. ЯМР-данные, полученные в липид-белковых нанодисках, показали, что схожие внутримолекулярные движения наблюдаются и у ПЧД в составе бислойной фосфолипидной мембраны независимо от заряда и степени насыщенности липидных молекул. Мы можем предположить, что наблюдаемая «модель» внутримолекулярной подвижности является неотъемлемым свойством ПЧД в активированном состоянии. Возможно, именно эти движения являются прообразами высокоамплитудных конформационных перестроек, происходящих в домене при изменении ТМ потенциала. Несмотря на то, что для построения полной модели потенциалозависимой активации необходимо знание пространственной структуры домена в состоянии покоя (ТМ потенциал -70 – -100 мВ), полученные динамические данные позволяют сделать некоторые выводы об этом процессе. Так, петля S1-S2 и спиральные сегменты S23-S3a и S45 наиболее подвижны в пс-нс диапазоне времен, и, возможно, именно эти структурные элементы служат для компенсации больших относительных перемещений спиралей домена при потенциалозависимой активации. С другой стороны, сегменты домена, стабильные в пс-нс диапазоне (спирали S1, S2 и спиральная шпилька S3b-S4), вероятно, не меняют свою структуру в ходе цикла активация/инактивация.

Полученные динамические данные согласуются с моделью, в которой переход ПЧД из состояния покоя в активированное состояние сопровождается скользящим движением сравнительно стабильной спиральной шпильки S3b-S4 («потенциалочувствительная лопасть») относительно спиралей S1 и S2 [263]. Исследование доступности авидину биотина, ковалентно присоединенного через линкеры разной длины к различным участкам канала KvAP, показало, что шпилька S3b-S4 может перемещаться в ходе потенциалозависимой активации на расстояние более 15 Å вдоль

[1] PDB код 2KYH, опубликовано после публикации основных результатов, изложенных в представленном разделе работы.

оси, перпендикулярной плоскости липидного бислоя [318]. В то же время полученные динамические данные указывают на неприменимость ряда моделей, подразумевающих изменение конформации или разрушение спиральной шпильки S3b-S4 [325] для описания потенциалозависимой активации канала KvAP (см. Лит. обзор п. 1.6.4).

Следует отметить, что на момент публикации результатов исследований (2010 год), представленные экспериментальные данные впервые описывали возможность ‘медленных’ (мкс-мс) межспиральных движений в молекулах политопных МБ.

5.3 Структура и динамика «расплавленного» состояния ПЧД

5.3.1 Вторичная структура и изгиб спиралей в молекуле ПЧД-KvAP в мицеллах LPPG

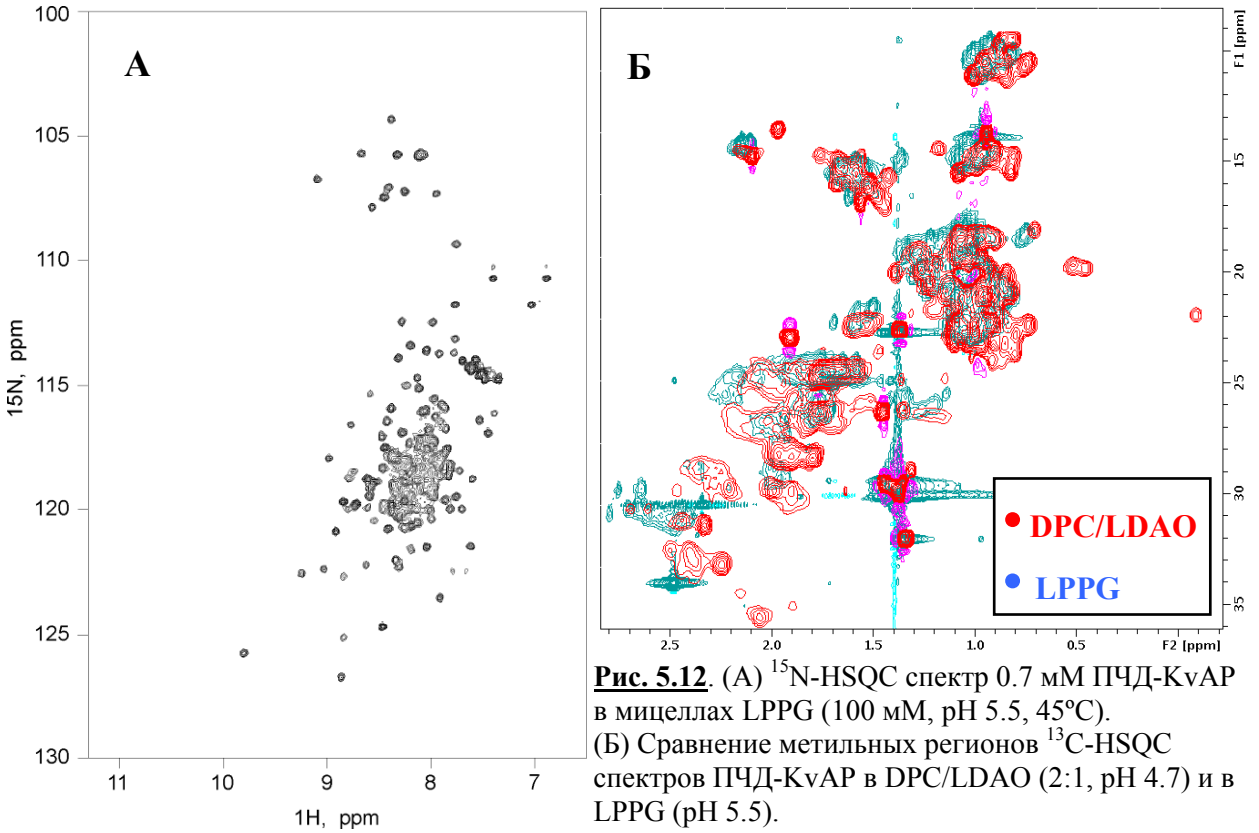


Рис. 5.12. (А) ^{15}N-HSQC спектр 0.7 мМ ПЧД-KvAP в мицеллах LPPG (100 мМ, pH 5.5, 45ºC). (Б) Сравнение метильных регионов ^{13}C-HSQC спектров ПЧД-KvAP в DPC/LDAO (2:1, pH 4.7) и в LPPG (pH 5.5).

ЯМР спектры ПЧД-KvAP, полученные в окружении мицелл анионных лизо-фосфатидилглицеролов (LPPG и LMPG), значительно отличались от спектров «нативного» состояния домена, наблюдаемого в ЛБН и мицеллах цвиттер-ионных детергентов, что указывало на существенные отличия в пространственной структуре. Для исследования структуры и динамики этого «ненативного» состояния ПЧД-KvAP использовали ^{2}H,^{13}C,^{15}N-меченый аналог домена, солюбилизированный в мицеллах LPPG (pH 5.5). В ^{1}H,^{15}N- и ^{1}H,^{13}C-HSQC спектрах ПЧД в этой среде (Рис. 5.12) наблюдалась значительно меньшая дисперсия сигналов $^{1}H^{N}$ (от 7.5 до 9.2 м.д.) и CH_3-протонов по сравнению с DPC/LDAO. Это, а также однородная ширина линий в ЯМР-спектрах

косвенно указывали на отсутствие сильных межспиральных контактов в молекуле ПЧД. Отнесение сигналов домена производили по стандартной методике, используя комбинацию 3D спектров HNH-NOESY, HNCA, HNCO, HN(CO)CA, HNCACB и HN(CA)CO [31]. Было получено практически полное (>90%) отнесение сигналов ядер основной ($^{1}H^{N}$, $^{15}N^{H}$, $^{13}C'$ и $^{13}C^{\alpha}$) и боковых (~ 90% $^{13}C^{\beta}$) цепей домена.

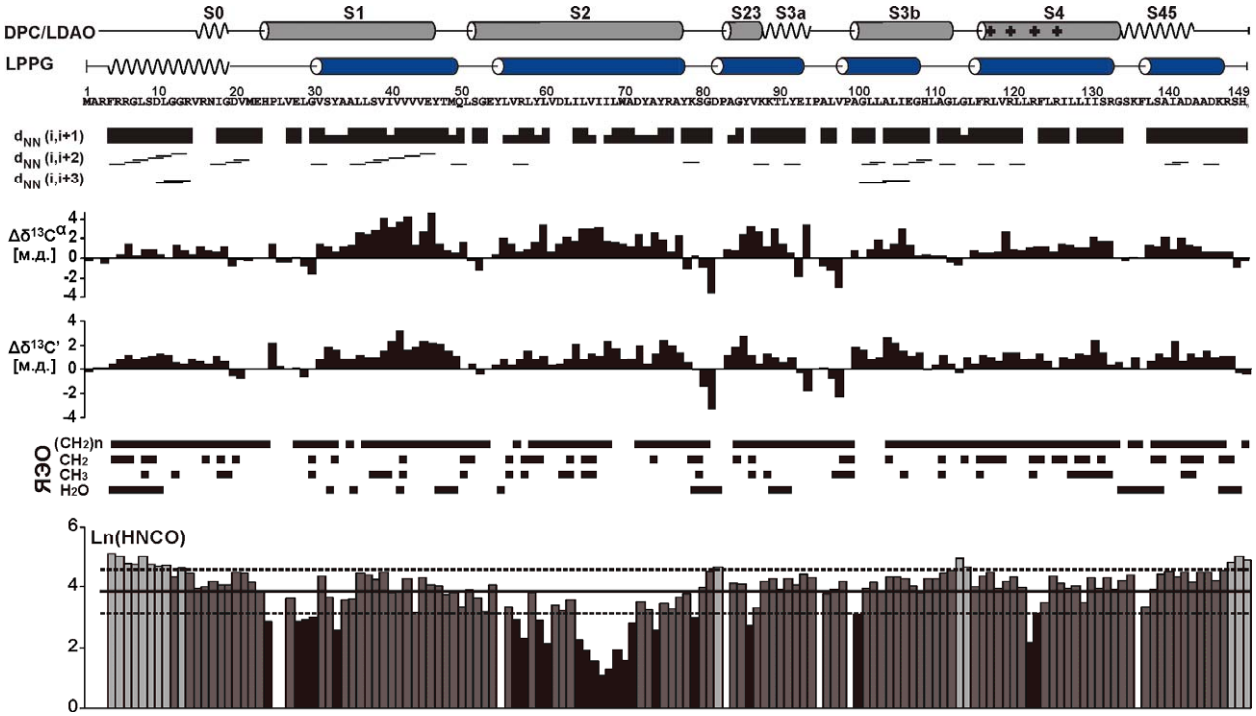


Рис. 5.13. Данные ЯМР, определяющие вторичную структуру ПЧД-KvAP в мицеллах LPPG (pH 5.5 45°C). (Вверху) Элементы вторичной структуры, наблюдаемые в мицеллах LPPG и DPC/LDAO. (d_{NN}) H^{N}-H^{N} ЯЭО контакты, наблюдаемые в 3D спектре HNH-NOESY (τ_m 150 мс). ($\Delta\delta$) Вторичные химические сдвиги ядер $^{13}C^{\alpha}$ и $^{13}C'$. Положительные значения указывают на спиральную конформацию. (ЯЭО) обозначены H^{N} протоны, для которых в HNH-NOESY спектре (τ_m 150 мс) наблюдались кросс-пики на ^{1}H частоте воды, и CH_2 и CH_3 группы детергента (степень включения изотопа ^{2}H в боковые цепи белка ~ 85%). (Ln[HNCO]) Логарифм интенсивности кросс-пиков в спектре 3D HNCO. Показаны уровни, соответствующие средней и в два раза большей и в два раза меньшей интенсивностям. Интенсивности HNCO пиков разбиты на три категории: слабые, средние и сильные (черные, серые и белые прямоугольники, соответственно).

Для идентификации элементов вторичной структуры были использованы вторичные химические сдвиги ($\Delta\delta$) ядер $^{13}C^{\alpha}$ и $^{13}C'$ [464] и характерные H^{N}-H^{N} ЯЭО контакты [23]. Данные о вторичных химических сдвигах дополнялись информацией о наличии либо отсутствии в спектрах NOESY контактов между амидными протонами и сигналом растворителя, которые указывали либо на формирование внутримолекулярных водородных связей, либо на экранирование основной цепи белка от растворителя внутри комплекса белок/детергент. Как показано на Рис. 5.13, общий вид (количество спиральных элементов) вторичной структуры ПЧД-KvAP в мицеллах LPPG и DPC/LDAO совпадает. Однако, наблюдаются значительные изменения в положении отдельных спиралей. Так, в LPPG (по сравнению с DPC/LDAO) спиральный сегмент S0 имеет значительно бо́льшую длину (14 против 4 остатков), спираль S1 длиннее на 10 остатков, спираль S2 начинается

на 4 остатка позже, спирали S23 и S3a объединены в одну, имеющую более упорядоченную структуру, спираль S3b короче на 4 остатка, а сегмент S45 имеет бо́льшую длину и заканчивается практически на *C*-конце домена (Lys147).

Периодический характер значений вторичных химических сдвигов H^N протонов в мицеллах DPC/LDAO позволил получить информацию об изгибе спиралей в молекуле ПЧД-KvAP. Анализ вторичных химических сдвигов $\Delta\delta^1H^N$ в окружении LPPG выявил отсутствие изгиба спиралей, обусловленного формированием «нативной» третичной структуры на всех участках домена за исключением *C*-концевого фрагмента спирали S1 (Рис. 5.14).

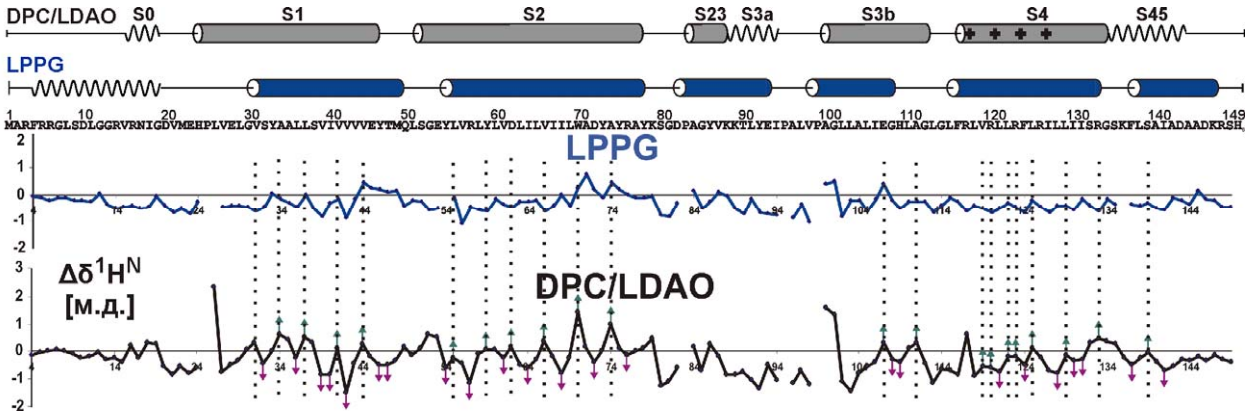


Рис. 5.14. Вторичные химические сдвиги (Δδ) амидных протонов в мицеллах DPC/LDAO и LPPG. Зеленые (малиновые) стрелочки обозначают $^1H^N$ сигналы, сдвинутые в слабое (сильное) поле в мицеллах DPC/LDAO и локализованные на вогнутых (выпуклых) сторонах спиралей ПЧД-KvAP.

5.3.2 Динамика основной цепи ПЧД-KvAP в мицеллах LPPG и гидродинамические свойства комплекса домен/мицелла

Более однородные (по сравнению с DPC/LDAO) значения интенсивностей кросс-пиков в 3D HNCO спектре (Рис. 5.13) указали на более «однородные» динамические характеристики основной цепи белка в комплексе ПЧД-KvAP/LPPG. Вероятно, *N*- и *C*-концевые участки домена, экспонированные в растворитель в окружении DPC/LDAO, при солюбилизации домена в LPPG ассоциируют с поверхностью мицеллы. В пользу этого предположения также свидетельствуют наблюдаемые практически на всех участках домена ЯЭО контакты между амидными протонами белка и CH_2-/CH_3-группами детергента (Рис. 5.13). Следует отметить, что значительное уменьшение интенсивностей кросс-пиков HNCO по сравнению со средними значениями, возможно указывающее на присутствие медленных мкс-мс движений, наблюдалось только в середине спирального участка S2 и на входе в спираль S1 (Рис. 5.13).

Для детального исследования динамики основной цепи ПЧД-KvAP в мицеллах LPPG на спектрометре с рабочей частотой ^1H 600 МГц были измерены релаксационные параметры ядер ^{15}N (Рис. 5.15). Релаксационные данные были получены для 90 (из ~ 145) $^{15}N^H$ групп. Значения ЯЭО ^{15}N-{^1H} в мицеллах LPPG оказались более однородными, чем

в DPC/LDAO, где *N*-концевой участок домена имел большую подвижность в пс-нс диапазоне, и, соответственно, демонстрировал более низкие значения ЯЭО, чем ТМ спирали белка. Это подтверждает предположение о том, что в среде LPPG *N*-концевой участок домена ассоциирован с поверхностью мицеллы. В то же время подвижность других участков домена в пс-нс диапазоне времен значительно увеличилась. Так, среднее значение ^{15}N-{^{1}H} ЯЭО, рассчитанное по спиралям S1-S4, уменьшилось с 0.71±0.09 (DPC/LDAO) до 0.63±0.08 (LPPG). Значения произведения скоростей релаксации $R_1 \times R_2$ для различных остатков ПЧД-KvAP в LPPG не превышали пороговой величины 20 c^{-2} [502], что указывало на отсутствие явно выраженных процессов конформационного обмена в мкс-мс диапазоне времен. Таким образом, разрушение третичной структуры домена в мицеллах LPPG («плавление») приводило к увеличению подвижности основной цепи белка в пс-нс диапазоне времен и одновременно вело к исчезновению характерных мкс-мс движений, свойственных «нативной» структуре ПЧД.

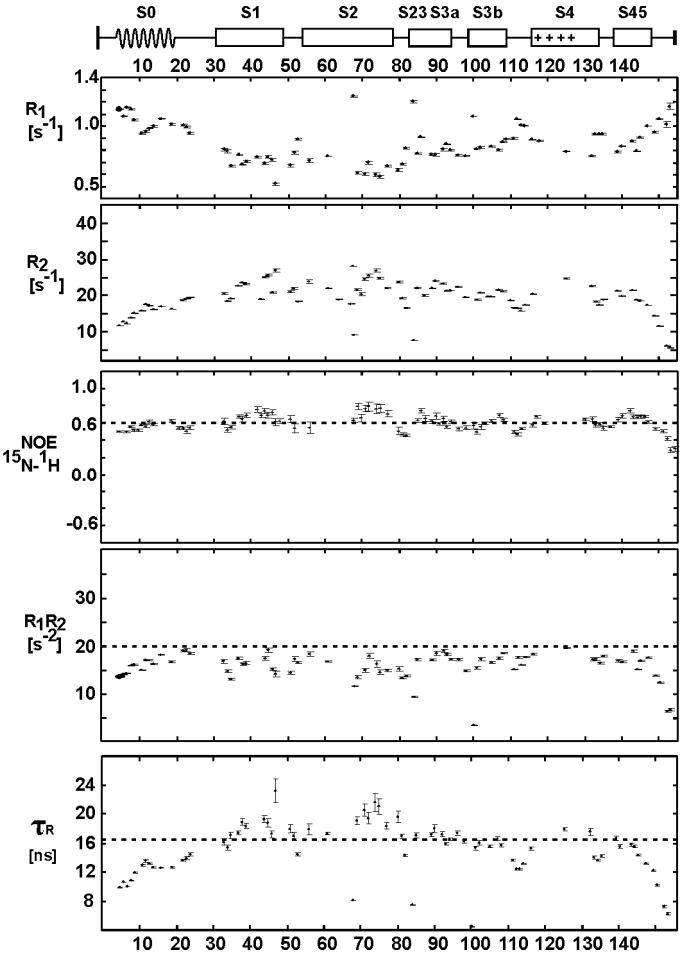


Рис. 5.15. Данные ^{15}N релаксации (ЯЭО ^{15}N-{^{1}H} и R_1, R_2) и качественный анализ динамики основной цепи ПЧД-KvAP в мицеллах LPPG (pH 5.5, 45º, 60 МГц). Остатки с ЯЭО < 0.6 совершают значительные движения в пс-нс диапазоне. Отсутствие остатков с произведением $R_1 \times R_2$ > 20 c^{-2} указывает на отсутствие значительных конформационных флуктуаций в мкс-мс диапазоне [502]. Эффективные времена вращательной корреляции (τ_R) рассчитаны из отношения R_2/R_1. Среднее значение (17.3 нс, рассчитано по «стабильным» регионам молекулы: ЯЭО > 0.6) показано пунктиром.

Эффективное время вращательной корреляции (τ_R) для каждого из остатков ПЧД-KvAP в комплексе с мицеллой LPPG было рассчитано из отношения R_2/R_1 (Рис. 5.15). Среднее значение τ_R (~ 17.3 нс), рассчитанное по «стабильным» регионам молекулы (ЯЭО > 0.6), соответствовало реориентации в растворе комплекса ПЧД-KvAP/мицелла с R_H ~ 31 Å. Незначительное уменьшение размера комплекса белок/мицелла при переходе из

DPC/LDAO в LPPG, возможно, связано с уменьшением подвижности *N*- и *C*-концевых участков домена при встраивании их в мицеллу. Кроме того, наблюдаемый эффект может быть связан с увеличением подвижности отдельных остатков в нс диапазоне, что приводит к эффективному понижению кажущихся значений τ_R. Тем не менее, мы можем сделать вывод, что комплекс ПЧД-KvAP/мицелла имеет сравнимые размеры в обеих средах. Вероятно, плотность упаковки комплексов также примерно одинакова. Полученные данные косвенно указывают на компактность упаковки домена в мицеллах LPPG.

5.3.3 Сравнение межспиральных расстояний ПЧД-KvAP в мицеллах DPC/LDAO и LPPG

Для сравнения третичной структуры ПЧД в окружении мицелл LPPG и DPC/LDAO использовали спин-меченые варианты домена и данные эффекта парамагнитного усиления релаксации (PRE). Были получены мутантные варианты ПЧД, содержащие неспаренные остатки Cys в положении 112 (петля S3b-S4) и 140 (*C*-концевой участок). По остаткам Cys, используя тиол-реактивный реагент MTSL, вводили спиновые метки. Для контроля использовали образцы, модифицированные непарамагнитной меткой ацетил-MTSL. Относительное ослабление интенсивностей HN-сигналов ПЧД в окружении мицелл LPPG и DPC/LDAO, вызванное эффектом PRE от введенных спиновых меток, наблюдали в 2D $^{1}H,^{15}N$-HSQC спектрах (Рис. 5.16). Теоретические кривые ослабления интенсивности HN-сигналов рассчитывали по кристаллической структуре домена, предполагая, что диамагнитные вклады в скорости R2 релаксации у различных HN-протонов имеют равную амплитуду. Следует отметить, что величина эффекта PRE и, соответственно, ослабление интенсивности HN сигнала, пропорциональна среднему $\langle r^{-6} \rangle$, где r – расстояние между наблюдаемым протоном и спиновой меткой. Поэтому в случае присутствия высокоамплитудных внутримолекулярные движений, наблюдаемая величина эффекта PRE будет определяться расстоянием наибольшего сближения между протоном и спиновой меткой, а не просто средним расстоянием.

Сравнение величины эффекта PRE, наблюдаемого в мицеллах DPC/LDAO, с теоретически рассчитанными значениями, выявили некоторые отличия (Рис. 5.16), вероятно, связанные с отличием в структуре ПЧД в растворе и кристалле, а также с конформационными флуктуациями молекулы домена в растворе. В то же время данные, полученные в мицеллах LPPG, показали, что при переходе из DPC/LDAO расстояние между спиралями домена значительно увеличивается, но сохраняются «остаточные» межспиральные контакты, например, между петлевыми участками S34 и S12, а также между *N*- и *C*-концевыми участками (Рис. 5.16).

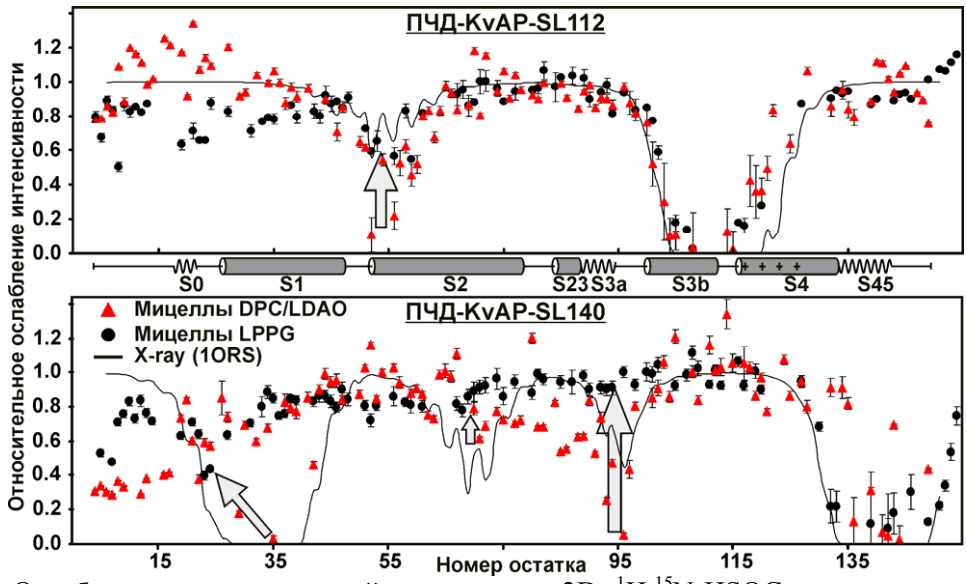


Рис. 5.16. Ослабление интенсивностей сигналов в 2D $^{1}H,^{15}N$-HSQC спектрах спин-меченых аналогов ПЧД, вызванное парамагнитной релаксацией. Бо́льшее ослабление соответствует меньшему расстоянию протон/спин-метка. Стрелками схематически показано увеличение межспиральных расстояний при переводе домена из DPC/LDAO в LPPG. Сплошной линией показаны теоретические значения, рассчитанные для кристаллической структуры домена.

5.3.4 Резюме

Резюмируя полученные результаты, можно сделать вывод, что в мицеллах LPPG ПЧД-KvAP находится в «расплавленном» или «предсвернутом» состоянии, напоминающем состояние «расплавленной глобулы» водорастворимых белков [505]. По сравнению с «нативным» состоянием домена, наблюдаемым в DPC/LDAO, «расплавленное» состояние характеризуется:

1. небольшим изменением вторичной структуры, при котором содержание α-спиральных элементов практически не меняется (~ 60%);
2. частичным разрушением третичной структуры белка, а именно диссоциацией тесных контактов спираль-спираль и уменьшением изгибов ТМ спиралей, вызванных межспиральным взаимодействием;
3. увеличением подвижности основной цепи МБ в пс-нс временном диапазоне и разрушением «модели» внутримолекулярной подвижности, характерной для «нативной» пространственной структуры.

В «расплавленном» состоянии сохраняется компактная упаковка домена и до некоторой степени взаимная ориентация ТМ спиралей. Это состояние включает практически полностью сформированную вторичную структуру и «пред-сформированные» третичные контакты между ТМ спиралями. Вероятно, «расплавленное» состояние ПЧД-KvAP отличается от денатурированного состояния МБ, наблюдаемого в жестких детергентах. Так, например, согласно данным КД- и ЭПР-спектроскопии, солюбилизация бактериородопсина *H. salinarum* в SDS приводит к значительному уменьшению содержания α-спиральных элементов вторичной структуры белка (от 78% до

53% [506]), а также к полной потере межспиральных контактов и разрушению упаковки ТМ спиралей [81].

Следует подчеркнуть, что ранее в литературе «расплавленное» состояние для молекул интегральных спиральных МБ описано не было.

Тот факт, что инкапсуляция ПЧД-KvAP в ЛБН, содержащие анионные липиды (DMPG и POPC/DOPG), не приводит к «плавлению» структуры домена, позволяет сделать предположения о возможных механизмах этого процесса. Как уже отмечалось, связка из четырех спиралей, образующая ПЧД-KvAP, стабилизирована электростатическими взаимодействиями между заряженными боковыми цепями (например, Asp62-Arg133, Glu45-Arg126 и Glu107-Arg123 см. Рис. 5.7 и 5.9Ж). Вероятно, заряженные головки анионных детергентов (например, лизо-фосфатидилглицеролов LMPG и LPPG) конкурируют с отрицательно заряженными боковыми цепями белка при образовании солевых мостиков, что и приводит к частичной денатурации или «плавлению» третичной структуры ПЧД. Подобный процесс не происходит в бислое, содержащем анионные липиды, так как полужесткая двумерная «матрица» липидной мембраны эффективно предотвращает контакты между полярными головками липидов и заряженными боковыми цепями из середины ТМ спиралей белковой молекулы. Таким образом, внутримолекулярные электростатические взаимодействия и двумерная упаковка липидного бислоя играют важную роль в стабилизации «нативной» структуры ПЧД. Полученные данные подчеркивают принципиальные отличия пространственной организации мембранных белков от глобулярных, в стабилизации структуры которых существенную роль играют гидрофобные и ван-дер-ваальсовые взаимодействия в гидрофобном ядре.

Полученные результаты также характеризуют влияние различных мембраномоделирующих сред на структуру и динамику МБ и демонстрируют преимущества ЛБН, которые в отличие от сред на основе детергентов позволяют исследовать зависимость структуры и активности МБ от свойств липидных молекул (заряд полярных головок, длина и степень насыщенности жирнокислотных цепей и т.д.), формирующих бислой, а также изучать МБ в окружении, близком к нативному. В этой связи необходимо подчеркнуть, что нативное окружение канала KvAP, мембрана археи *Aeropyrum pernix*, содержит преимущественно анионные липиды [494].

Полученные данные также иллюстрируют тот факт, что ЯМР-спектры хорошего качества не всегда соответствуют «нативной» конформации МБ и указывают на необходимость осторожного применения лизо-фосфатидилглицеролов в качестве компонент мембраномоделирующих сред. В последнее время детергенты этого типа, благодаря способности обеспечивать превосходные спектральные характеристики

солюбилизированных МБ, все чаще применяются в ЯМР-исследованиях [507,508]. При этом в полученных структурах зачастую отсутствует плотная упаковка ТМ спиралей белка, что косвенно указывает на отсутствие «нативной» третичной структуры. В некоторых случаях денатурирующее действие лизо-фосфатидилглицеролов было подтверждено экспериментально. Так, например, при ЯМР-исследовании транспортера Smr, участвующего в обеспечении множественной лекарственной устойчивости у бактерий, было установлено, что, хотя лизо-липиды LMPG и LPPG обеспечивают высокое качество спектров ЯМР и большую временную стабильность препаратов белка, солюбилизация в этих анионных детергентах разрушает нативную пространственную структуру транспортера и ведет к потере его функциональной активности [102].

5.4 Формирование «нативной» пространственной структуры ПЧД-KvAP из «расплавленного» состояния (фолдинг *in vitro*)

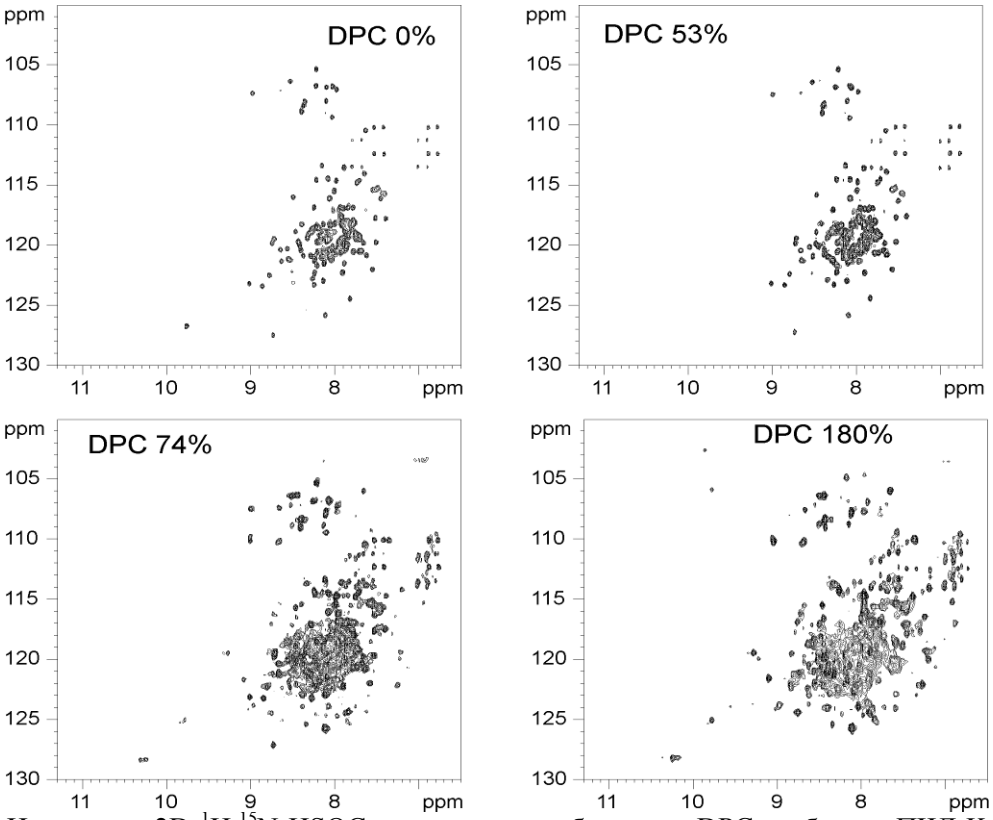


Рис. 5.17. Изменение 2D $^{1}H,^{15}N$-HSQC спектра при добавлении DPC в образец ПЧД-KvAP/LPPG (показано процентное содержание DPC, pH 7.0).

Для исследования механизмов формирования «нативной» пространственной структуры ПЧД из «расплавленного» состояния образец домена в мицеллах LPPG титровали детергентом DPC (Рис. 5.17). Относительное содержание двух форм белка оценивали по интенсивности характеристических кросс-пиков в 2D $^{1}H,^{15}N$-HSQC спектрах. При относительной молярной концентрации LPPG (χ^{LPPG}) < 0.7 наблюдали смесь «нативной» и «расплавленной» формы с характерным временем обмена между ними более 20 мс. При χ^{LPPG} ~ 0.55 заселенность двух состояний была примерно

одинакова, а при $\chi^{LPPG} < 0.4$ в спектрах в основном наблюдалось сигналы «нативного» состояния. Таким образом, переход между «расплавленным» и «нативным» состояниями ПЧД обратим, и изменение свойств мембраномоделирующего окружения вызывает самопроизвольный фолдинг домена. Анализ полученной кривой фолдинга (Рис. 5.18А) с помощью уравнения 7.25 позволил установить, что свободная энергия процесса фолдинга ПЧД в отсутствие денатурирующего детергента (ΔG_F^0) равна -8.4 ± 1.4 ккал/М.

Измеренные значения средней скорости кросс-корреляции релаксации η_{XY} ядер ^{15}N в образце показало, что формирование «нативной» пространственной структуры ПЧД-KvAP сопровождается увеличением гидродинамического радиуса комплекса домен/мицелла с ~26.5 Å до ~28.5 Å. Наблюдаемое увеличение радиуса может быть связано как с переходом *N*- и *C*-концевых участков домена из состояния, связанного с мицеллой, в растворитель, так и с уменьшением подвижности отдельных остатков в нс диапазоне, что приводит к эффективному понижению среднего значения η_{XY}.

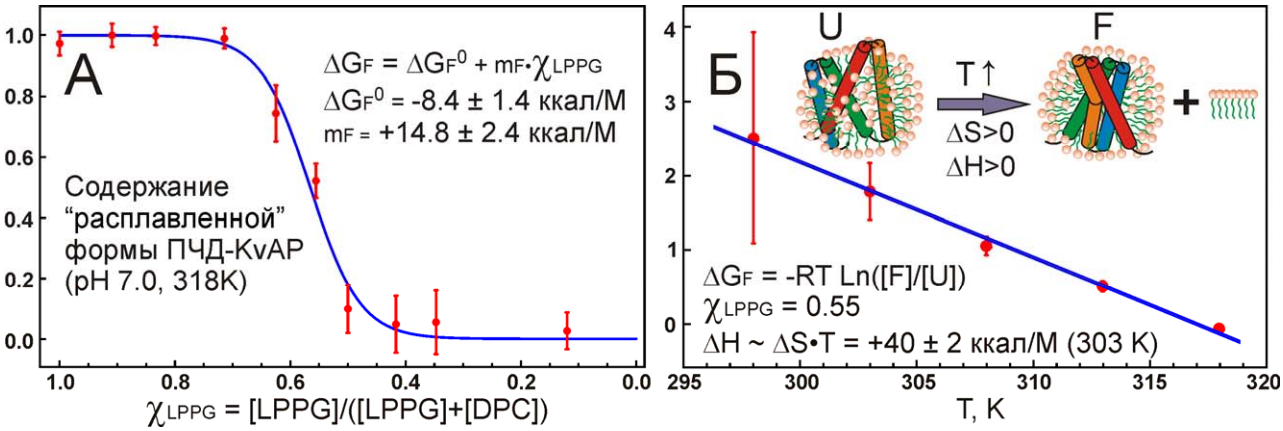


Рис. 5.18. (А) Относительное содержание «расплавленной» формы ПЧД-KvAP при уменьшении концентрации LPPG в образце. (Б) Зависимость свободной энергии (ΔG_F) процесса фолдинга от температуры и модель формирования «нативной» структуры ПЧД-KvAP из «расплавленного» состояния.

Спектры ПЧД, полученные при $\chi^{LPPG} \sim 0.55$, показали, что доля «нативного» состояния растет с увеличением температуры («эндотермический фолдинг»). Анализ температурной зависимости позволил оценить величину энтальпийного и энтропийного вклада в свободную энергию ($\Delta G_F = \Delta H - T \cdot \Delta S$) процесса фолдинга (Рис. 5.18Б). Как оказалось, фолдинг ПЧД-KvAP сопровождается увеличением энтальпии и энтропии системы и при комнатной температуре энтальпийный и энтропийный вклады в ΔG_F имеют сравнимую величину (+40 ± 2 ккал/М). Рост энтальпии системы при формировании «нативной» структуры ПЧД-KvAP, вероятно, связан с разрушением энергетически благоприятных контактов домена с молекулами детергента, которые стабилизируют «расплавленное» состояние. В свою очередь высвобождение этих «лишних» молекул детергента в раствор (в форме мицелл) приводит к увеличению энтропии системы (Рис. 18Б). Можно предположить, что дальнейшее повышение температуры системы будет

приводить к дальнейшему переходу связанных с МБ молекул детергента в раствор и к формированию агрегатов белка, стабилизированных гидрофобными контактами между спиральными регионами. Полученные данные согласуются с результатами исследования температурной зависимости процесса димеризации ТМ спиралей в детергент-содержащих средах [509].

Полученные результаты иллюстрируют отличия в структурной организации МБ от глобулярных белков. В случае водорастворимых молекул процессы фолдинга обычно идут с понижением энтропии и энтальпии системы («экзотермический фолдинг»). Наблюдаемая обратимость переходов между частично денатурированным и «нативным» состоянием ПЧД указывает на то, что состояние «расплавленной глобулы» может выступать в роли одного из интермедиатов процесса фолдинга МБ *in vitro* (перехода белка из полностью денатурированного в структурированное состояние) и, возможно, играет роль так называемого «ядра фолдинга» [510].

5.5 Взаимодействие токсина VSTx1 с ПЧД-KvAP в мицеллах и нанодисках

Токсин VSTx1 из яда паука *Grammostola spatulata* (чилийский розовый птицеед) – небольшой (34 а.о., 4010 Да) β-структурный пептид, содержащий как положительно заряженные (заряд +3), так и некоторое количество гидрофобных остатков. Индекс гидрофобности молекулы VSTx1 по шкале Kyte и Doolittle [338] равен -0.27. Токсин стабилизирован тремя дисульфидными связями, образующими «цистеиновый узел» (Рис. 5.19А) [511]. VSTx1 ингибирует потенциалозависимую активацию канала KvAP и некоторых других Kv каналов [512] путем специфического взаимодействия с потенциалочувствительными доменами, вероятно, блокируя ПЧД в инактивированном или активированном состоянии (состояния, наблюдаемые при деполяризации мембраны, значение ТМ потенциала ~ 0 мВ) [513]. VSTx1 слабо взаимодействует с мембранами на основе цвиттер-ионных липидов, имеет значительное сродство к интерфейсу фосфолипидных мембран, содержащих анионные липиды, и при этом не обладает порообразующей и мембранолитической активностью [511]. Согласно современным данным, при образовании комплекса с ПЧД VSTx1 использует механизмы «мембранного катализа» [10]. Активность токсина значительно зависит от липидного состава и механического состояния бислойной мембраны, окружающей канал [301]. Например, токсин по-разному действует на каналы в мембранах ооцитов и БЛМ, кроме того, действие токсина модулируется силой растяжения, приложенной к мембране. Кажущаяся константа взаимодействия ПЧД-KvAP/VSTx1 уменьшается при переходе из липосом в мицеллы неионного детергента (DDM) более чем на 3 порядка (от 100 нМ до 300 мкМ)

[10].

2.1.1 Взаимодействие токсина VSTx1 с нанодисками и мицеллами

Ранее для исследования взаимодействия VSTx1 с липосомами использовали смесь фосфолипидов на основе цвиттер-ионного фосфатидилэтаноламина и анионного фосфатидилглицерина (POPE/POPG, 3:1) [10]. Однако, как было показано в Главе 2 представленной работы, формирование ЛБН, содержащих значительную фракцию фосфатидилэтаноламина, малоэффективно, вероятно, из-за высокой отрицательной спонтанной кривизны образуемого бислоя. Поэтому для оценки энергетики взаимодействия токсина VSTx1 с мембранами ЛБН использовали нанодиски, содержащие цвиттер-ионный фосфатидилхолин и анионный фосфатидилглицерин (POPC и смесь POPC/DOPG, 3:1). Для оценки вклада неспецифических взаимодействий, обусловленных присутствием в ЛБН белковой компоненты, использовали препарат MSP, несодержащий липиды. Титрование образца VSTx1 раствором ЛБН либо раствором белка MSP, который в водном окружении образует сравнительно большие агрегаты (диаметр ~ 6 нм), приводило к постепенному уменьшению интенсивности ЯМР-сигналов пептида (Рис. 5.19В), что указывало на ассоциацию VSTx1 с поверхностью нанодисков или молекулами MSP. В этом случае из-за медленной реориентации нанодисков и агрегатов MSP в растворе связывание пептида вело к значительному увеличению ширины ЯМР-линий и уменьшению интенсивности сигналов. Расчеты показали, что в условиях эксперимента с хорошей точностью можно использовать предположение о том, что интенсивность наблюдаемого сигнала ЯМР прямо пропорциональна равновесной концентрации свободного пептида в растворе ($[VSTx1]_f$).

Анализ измеренных кривых связывания с помощью уравнения равновесного распределения (Ур. 7.22, Рис. 5.19Г, Табл. 5.1) показал, что VSTx1 эффективно взаимодействует с ЛБН, содержащими анионные липиды (смесь POPC/DOPG), и менее эффективно взаимодействует с нанодисками на основе цвиттер-ионных липидов (POPC). Несмотря на то, что модель равновесного распределения плохо аппроксимировала экспериментальные данные, использование этого метода позволило сравнить полученные результаты с литературными данными, описывающими взаимодействие VSTx1 с липидными везикулами. Рассчитанные коэффициенты распределения ($K_p \sim 17.8 \times 10^3$ и 2.6×10^3 M^{-1} соответственно) значительно превышали значения, наблюдаемые ранее для везикул POPE/POPG (3:1) и POPC ($K_p \sim 2 \times 10^3$ и $< 0.002 \times 10^3$ M^{-1} соответственно) [10,511]. Эти различия в аффинности токсина могут быть обусловлены как отличиями в упаковке молекул фосфолипидов в мембранах ЛБН и везикулах [145], так и использованием в экспериментах различных буферных систем. В работах [10,511]

связывание токсина изучали в буферах, содержащих 150 мМ KCl и NaCl, соответственно, в то время как в нашей работе использовали буфер без добавления соли. Увеличение ионной силы раствора, приводящее к частичному экранированию электростатических взаимодействий, вероятно, уменьшает сродство VSTx1 к липидным мембранам. Наблюдаемое слабое взаимодействие VSTx1 с белком MSP (Рис. 5.19Г, Табл. 5.1), по-видимому, обусловленное электростатическим взаимодействием между положительно заряженной молекулой токсина и анионной молекулой MSP, также может выступать в роли дополнительного фактора, усиливающего аффинность токсина к ЛБН.

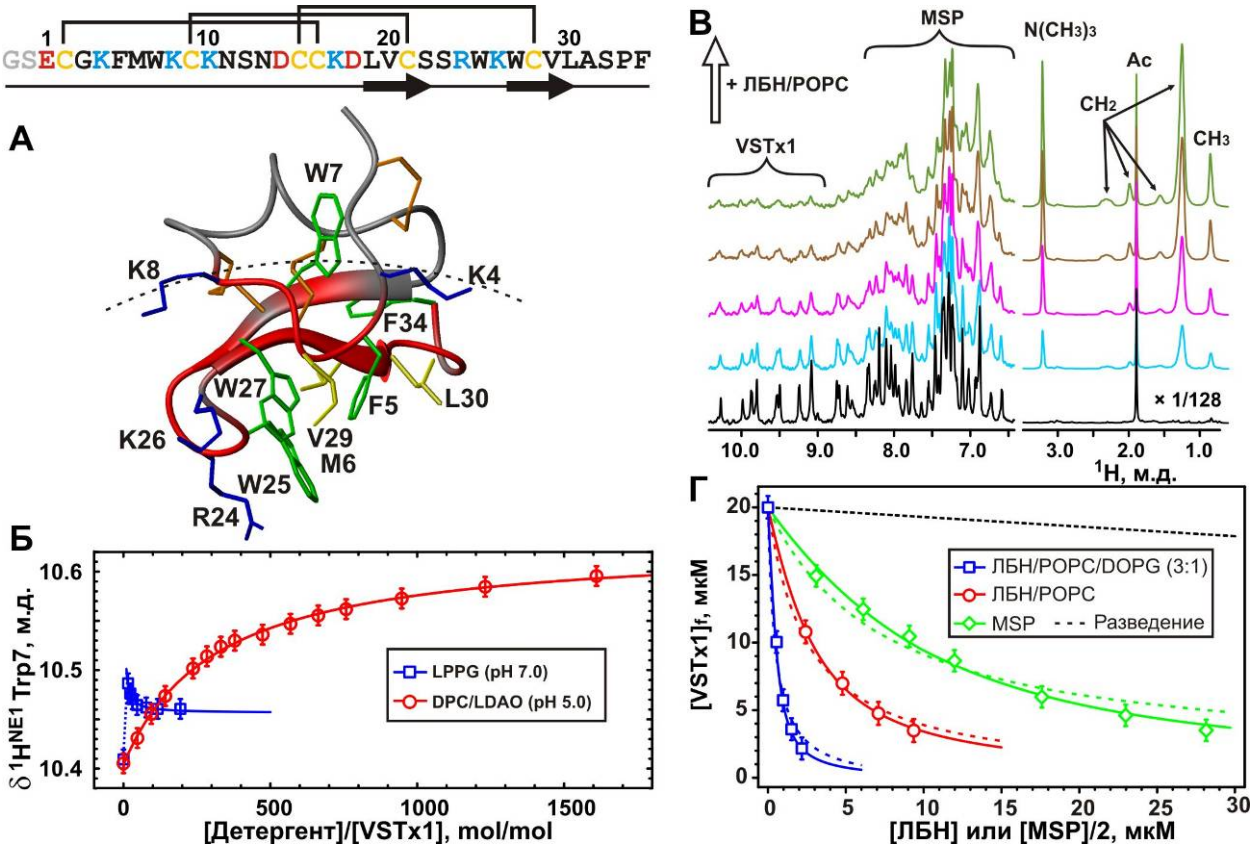


Рис. 5.19. (А) Последовательность токсина VSTx1 (дополнительные остатки Gly-Ser показаны серым цветом) и топология взаимодействия токсина с мицеллой DPC/LDAO (2:1). В работе использовали пространственную структуру VSTx1, полученную методом ЯМР-спектроскопии (PDB код 1S6X) [511]. Поверхность мицеллы показана пунктиром. Красным цветом показаны фрагменты основной цепи пептида, демонстрирующие значительный эффект PRE в присутствии спинового зонда 5-DSA (ε > 10 Гц·мМ$^{-1}$) или демонстрирующие значительные изменения химических сдвигов ($\Delta\delta^1H^{15}N$ > 0.2 м.д.). (Б) Изотермы связывания 50 мкМ VSTx1 с мицеллами DPC/LDAO (pH 5.0) и LPPG (pH 7.0). Значения химического сдвига $H^{\varepsilon 1}$ протона остатка Trp7 в DPC/LDAO аппроксимированы уравнением равновесного распределения (Ур. 7.22). (В) Взаимодействие VSTx1 с ЛБН/POPC. Показаны фрагменты 1D ^{1}H-спектров 20 мкМ VSTx1, измеренных при различных концентрациях ЛБН. (Г) Изотермы связывания VSTx1 с ЛБН и MSP, аппроксимированные уравнением равновесного распределения (пунктирные линии) и уравнением Ленгмюра (Ур. 7.23, сплошные линии). Полученные параметры приведены в таблице 5.1.

Анализ кривых связывания с помощью изотермы Ленгмюра (Ур. 7.22, Рис. 5.19Г, Табл. 5.1) позволил установить, что VSTx1 имеет примерно одинаковую аффинность к сайтам на поверхности нанодиска или на молекуле MSP ($K_n \sim 0.05 \times 10^6 \cdot – 0.13 \times 10^6$ М$^{-1}$), однако, число сайтов связывания значительно отличается. Так, нанодиск, содержащий

POPC (~150 молекул), может связать до ~10 молекул токсина, а добавление отрицательно заряженных липидов увеличивает число сайтов связывания до ~ 35 (~4 молекулы липидов на молекулу токсина). В свою очередь, каждая молекула MSP (в отсутствие липидов) способна связать до 1.6 молекулы VSTx1, что ведет к практически полной компенсации ее заряда.

Пептид	ЛБН или MSP	Равновесное распределение		Изотерма Ленгмюра	
		K_p(ЛБН, MSP×2)* × 10^6, M^{-1}	K_p(Липиды)* × 10^3, M^{-1}	K_n** × 10^6, M^{-1}	n***
VSTx1	ЛБН/POPC	0.39 ± 0.02	2.6 ± 0.2	0.06 ± 0.01	9.6 ± 1.5
	ЛБН/POPC/DOPG (3 : 1)	2.68 ± 0.24	17.8 ± 1.6	0.13 ± 0.02	34.5 ± 3.9
	MSP×2	0.10 ± 0.01		0.05 ± 0.02	3.2 ± 0.9
	DPC/LDAO		0.058±0.003		

Табл. 5.1. Энергетические и стехиометрические параметры, описывающие взаимодействие VSTx1 с ЛБН, MSP и мицеллами DPC/LDAO.
*K_p – коэффициент распределения. В качестве концентрации «неводной» среды использовали концентрацию ЛБН или липидов (детергентов), предполагая, что один нанодиск содержит две молекулы MSP и 150 молекул липида.
**K_n – константа формирования комплекса пептид–сайт связывания.
***n – число сайтов связывания пептида на поверхности нанодиска.

Гель-фильтрационный анализ комплексов VSTx1/ЛБН не выявил разрушения нанодисков при связывании токсина. На хроматограммах (Рис. 2.10) наблюдались отдельные пики для частиц диаметром ~10–11 и ~2.0 нм, которые, вероятно, соответствовали нанодискам и свободному токсину, диссоциированному с поверхности нанодиска (для хроматографии использовали буфер, содержащий 100 мМ NaCl).

Для исследования эффективности взаимодействия токсина VSTx1 (заряд +3) со слабо-катионными мицеллами DPC/LDAO (2:1, pH 5.0) и анионными мицеллами LPPG (pH 7.0) образцы токсина (50 мкМ) титровали мицеллами детергентов. При добавлении мицелл наблюдались изменения химических сдвигов сигналов токсина, что указывало на быстрый (по шкале ЯМР) обмен между связанным и свободным состояниями токсина. Для определения доли мицеллосвязанного пептида и анализа энергетики образования комплекса наблюдали за изменением химического сдвига $H^{N\varepsilon 1}$ протона остатка Trp7 (Рис. 5.19Б). Токсин полностью связывался с мицеллами LPPG при молярном соотношении детергент/пептид (D:P) ~ 150. Немонотонное изменение химических сдвигов пептида при взаимодействии с мицеллами (резкий скачок при начальном добавлении небольшого количества LPPG) не позволило аппроксимировать кривую связывания каким-либо уравнением (Рис. 5.19Б). В случае мицелл DPC/LDAO токсин полностью переходил в мицеллосвязанное состояние только при D:P > 1600, а изотерма связывания адекватно описывалась уравнением равновесного распределения с коэффициентом *Kp* равным 58±3·M^{-1} (Рис. 5.19Б).

Исследование ^{15}N-меченого аналога VSTx1 в окружении мицелл DPC/LDAO не выявило значительных изменений в пространственной структуре токсина при

образовании комплекса с мицеллой. Использование парамагнитного зонда 5-DSA показало, что VSTx1 связывается с мицеллой DPC/LDAO гидрофобным участком, включающим кластер ароматических и алифатических остатков (Рис. 5.19А), а положительно заряженные боковые цепи токсина (Lys4, Lys8, Arg24 и Lys26) проникают вглубь или контактируют с поверхностью мицеллы. Тем не менее, бо́льшая аффинность VSTx1 к мицеллам LPPG и нанодискам, содержащим анионные липиды, указывает на важную роль электростатических взаимодействий при образовании комплекса токсин/модельная мембрана.

5.5.1 Взаимодействие ПЧД-KvAP с токсином VSTx1 в мицеллах DPC/LDAO

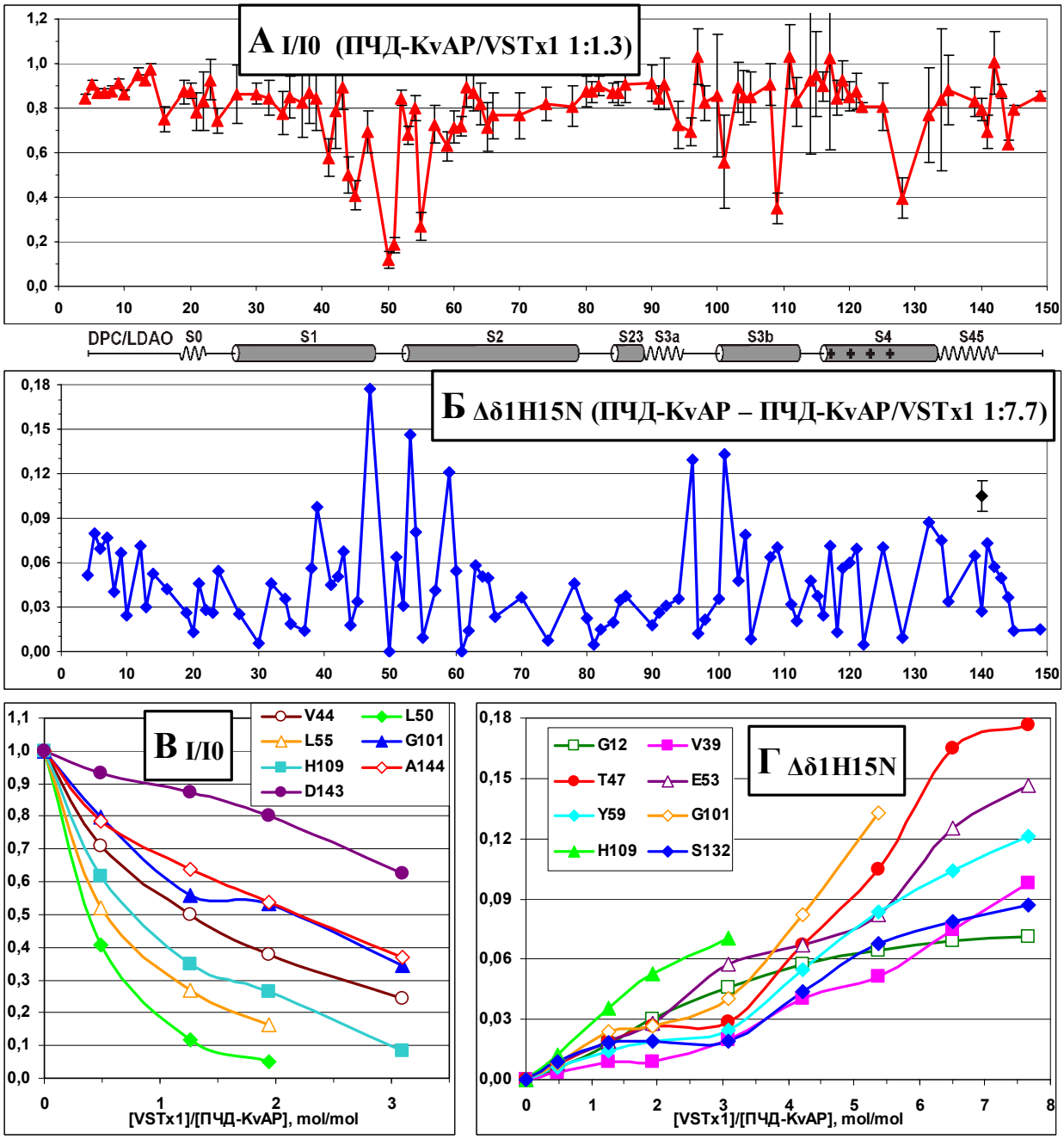


Рис. 5.20. (А) Относительное изменение амплитуды $^{1}H,^{15}N$-сигналов ПЧД-KvAP в мицеллах DPC/LDAO (pH 5.0) при добавлении 1.3-кратного избытка токсина VSTx1. (Б) Изменение

приведенного химического сдвига ^{1}H,^{15}N-групп $\left(\Delta\delta^{1}\mathrm{H}^{15}\mathrm{N} = \sqrt{(\Delta\delta^{1}\mathrm{H})^{2} + (\Delta\delta^{15}\mathrm{N}/5)^{2}}\right)$ ПЧД-KvAP в мицеллах DPC/LDAO при добавлении 7.7-кратного избытка токсина VSTx1. (В,Г) Зависимость амплитуды и ^{1}H^{15}N химических сдвигов некоторых сигналов домена от концентрации токсина в образце.

Для идентификации остатков ПЧД-KvAP, участвующих во взаимодействии с токсином VSTx1 в 2D ^{15}N-HSQC спектрах домена (0.25 мМ, 40 мМ DPC, 20 мМ LDAO, pH 5.0) измеряли амплитуды и химические сдвиги ^{1}H^{15}N сигналов при увеличении молярного соотношения VSTx1/ПЧД-KvAP от 0 до 7.7 (финальная концентрация токсина с учетом разведения 1.5 мМ). Амплитуда некоторых сигналов ПЧД значительно уменьшалась при добавлении токсина (Рис. 5.20АВ), кроме того для некоторых сигналов наблюдались небольшие ($\Delta\delta^{1}$H < 0.1 м.д.; $\Delta\delta^{15}$N < 0.88 м.д.) изменения химических сдвигов (Рис. 5.20БГ). Присоединение молекул токсина к мицеллам вело к утяжелению комплексов, содержащих ПЧД-KvAP, что в свою очередь приводило к постепенному увеличению ширины (уменьшению амплитуды) сигналов даже для тех остатков домена, которые не взаимодействуют с VSTx1. Величина этого эффекта линейно зависела от концентрации токсина (например, см. данные для Asp143, Рис. 5.20В).

Всего были проанализированы данные для 93 остатков домена, чьи сигналы в 2D ^{1}H,^{15}N-спектрах не перекрывались. Как схематически показано на Рис. 5.21, наибольшее изменение химических сдвигов и амплитуд сигналов ПЧД-KvAP наблюдалось на двух участках домена: в области петли S1-S2 и в области межспиральных контактов на спиралях S1, S4 и участке между S3a и S3b. Также наблюдалось значительное ослабление сигнала His109 из спирали S3b, принадлежащей «потенциалочувствительной лопасти». Вероятно, эти остатки и образуют интерфейс взаимодействия в комплексе ПЧД-KvAP/VSTx1.

Титрование образца ^{15}N-VSTx1 раствором немеченого ПЧД, позволило картировать сайт связывания на поверхности токсина. Наибольшие изменения химических сдвигов и амплитуд сигналов ЯМР детектировались на двух погруженных в мицеллу участках: петле Phe5-Lys8 и фрагменте β-шпильки, включающем *С*-концевой участок токсина Ser22-Phe34 (Рис. 5.21, HN сигнал Lys4 в спектрах не наблюдался).

Для установления взаимной ориентации взаимодействующих молекул были использованы спин-меченые варианты ПЧД-KvAP. Спиновые метки вводили по остаткам 112 (петля S3b-S4) и 56 (петля S1-S2). Эффект PRE наблюдали на HN-группах молекулы ^{15}N-VSTx1. Полученные данные (Рис. 5.21) показали, что при образовании комплекса петлевой участок Phe5-Lys8 молекулы VSTx1 контактирует с петлей S1-S2 ПЧД-KvAP, а β-шпилька и *С*-концевой участок токсина направлены в сторону «потенциалочувствительной лопасти» S3b-S4. Комплекс VSTx1/S12, вероятно, стабилизирован электростатическими взаимодействиями между остатками Lys4/Lys8

VSTx1 и Glu53/Glu45 ПЧД-KvAP. Во взаимодействии VSTx1/S3b, вероятно, участвует солевой мостик между остатками Arg24/Lys26 токсина и Glu107 ПЧД-KvAP.

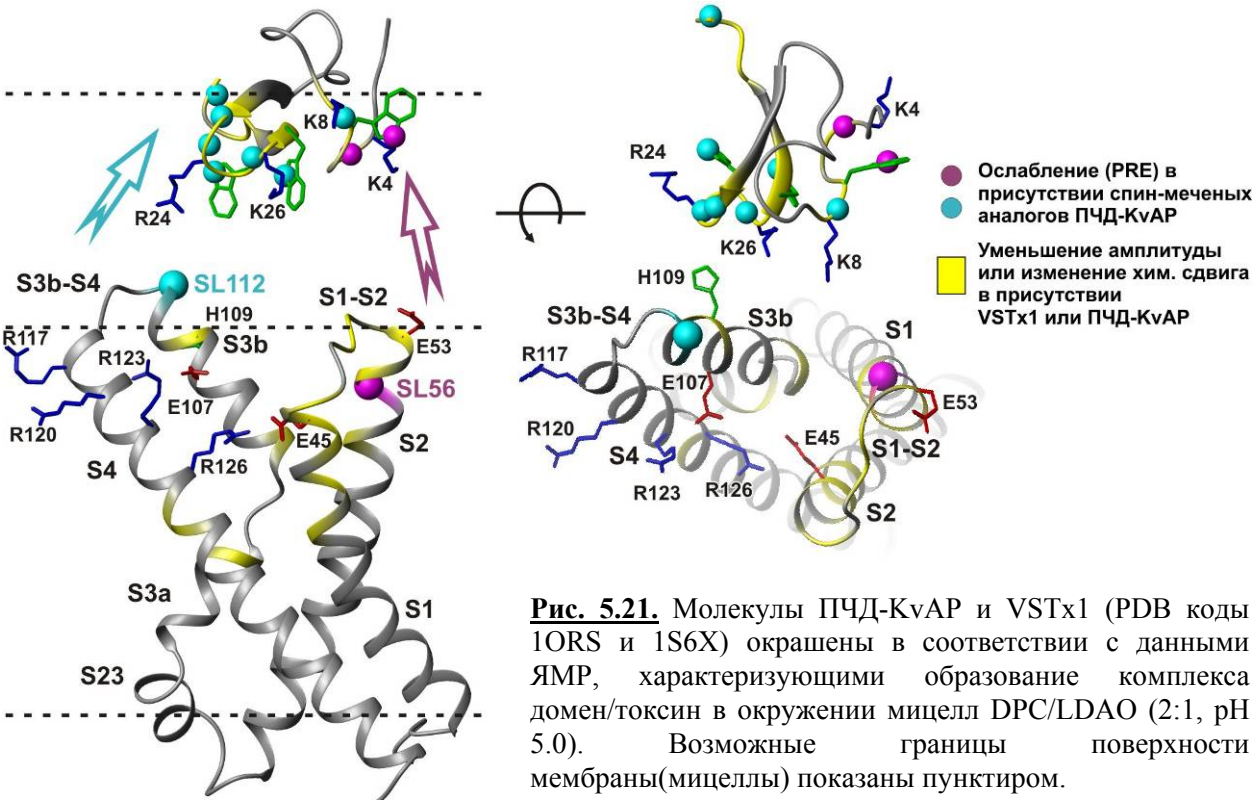


Рис. 5.21. Молекулы ПЧД-KvAP и VSTx1 (PDB коды 1ORS и 1S6X) окрашены в соответствии с данными ЯМР, характеризующими образование комплекса домен/токсин в окружении мицелл DPC/LDAO (2:1, pH 5.0). Возможные границы поверхности мембраны(мицеллы) показаны пунктиром.

Увеличение концентрации токсина VSTx1 в образце приводило к изменению химических сдвигов ПЧД-KvAP даже на участках, значительно удаленных от предполагаемого сайта связывания, например, на *N*- и *C*- концевых фрагментах домена. Наблюдаемый эффект может быть объяснен либо аллостерическими эффектами при связывании токсина, либо наличием дополнительного неспецифического взаимодействия молекул. На существование нескольких мод взаимодействия токсин/домен указывают различные типы кривых изменения химических сдвигов домена (Рис. 5.20Г). Так, при титровании токсином наблюдались как простые обратно параболические кривые (например, His109, Gly12), свидетельствующие о мономодальном взаимодействии, так и сигмоидальные зависимости (например, Thr47, Gly101), свидетельствующие о наличии нескольких центров связывания. Следует отметить, что сигмоидальные зависимости не могут быть объяснены неполным связыванием токсина с мицеллами детергента. Согласно полученной оценке коэффициента распределения *Kp* при наибольшей концентрации VSTx1 (1.5 мМ, концентрация детергента ~ 60 мМ) доля свободного токсина в образце не превышала 25%, что также было подтверждено значениями химических сдвигов остатков Trp, наблюдаемыми в 1D ^{1}H-ЯМР спектре. Таким образом, мы можем сделать вывод о наличии дополнительного(ых) неспецифического(их) сайта(ов) взаимодействия токсина VSTx1 с молекулой ПЧД-KvAP в составе мицеллы DPC/LDAO. Однако, из-за низкого

сродства к мицеллам сравнительный анализ энергетики специфических и неспецифических взаимодействий был невозможен.

Согласно некоторым косвенным данным (отсутствие изменения химического сдвига $^{1}H^{N\varepsilon 1}$ Trp7 VSTx1 при добавлении ПЧД-KvAP), только связанные с поверхностью мицеллы молекулы токсина способны взаимодействовать с доменом. Таким образом, начальное связывание с интерфейсом фосфолипидной мембраны (мицеллы), окружающей канал, является одним из важных этапов в действии VSTx1. Это связывание придает токсину ориентацию, необходимую для эффективного взаимодействия с участками ПЧД, погруженными в мембрану. Глубина расположения молекулы VSTx1 относительно поверхности мембраны, вероятно, не меняется при взаимодействии с ПЧД.

5.5.2 Взаимодействие ПЧД-KvAP с токсином VSTx1 в мицеллах LPPG

Для исследования возможного взаимодействия токсина VSTx1 с «расплавленным» состоянием ПЧД-KvAP в 2D ^{15}N-HSQC спектрах домена (0.2 мМ, 30 мМ LPPG, pH 7.0) измеряли амплитуды и химические сдвиги $^{1}H^{15}N$ сигналов при увеличении молярного соотношения VSTx1/ПЧД-KvAP от 0 до 9 (финальная концентрация токсина с учетом разведения ~ 1.5 мМ). Всего были проанализированы данные для 66 остатков домена, чьи сигналы в 2D ^{1}H,^{15}N-спектрах не перекрывались. В отличие от ситуации, наблюдаемой в мицеллах DPC/LDAO, амплитуды и химические сдвиги сигналов ПЧД-KvAP менялись лишь незначительно при добавлении токсина (данные не показаны). При этом даже при наибольшей концентрации VSTx1 в образце практически весь токсин находился в мицеллосвязанном состоянии. Таким образом, мы можем сделать вывод об отсутствии специфического взаимодействия между токсином VSTx1 и «расплавленным» состоянием ПЧД-KvAP в окружении мицелл LPPG. Полученные результаты дополнительно подтверждают вывод о «ненативной» пространственной организации домена в мицеллах анионных детергентов.

5.5.3 Взаимодействие токсина VSTx1 с ПЧД-KvAP в составе мембраны ЛБН

Для исследования взаимодействия токсина VSTx1 с ПЧД-KvAP в составе мембраны нанодиска использовали комплексы ПЧД-KvAP/ЛБН/POPC/DOPG (3:1). Постепенное добавление токсина к образцу домена в нанодисках (90 мкМ) вплоть до 15-кратного избытка приводило к изменениям в ^{1}H,^{15}N-TROSY спектре домена (Рис. 5.22Б). При титровании токсином наблюдались два типа эффектов. При добавлении эквимолярной концентрации VSTx1 интенсивность некоторых сигналов ПЧД-KvAP, например, HN Leu50, HN Ser51 и H_2N Gln49, значительно уменьшалась, падая до нуля при молярном соотношении [VSTx1]/[ПЧД-KvAP] ~ 3 (Рис. 5.22В, красная кривая). При этом значительного уширения этих сигналов не наблюдалось. С другой стороны, химические

сдвиги сигналов некоторых остатков (например, Arg117, Glu53) изменялись в диапазоне молярных соотношений [VSTx1]/[ПЧД-KvAP] от 1 до 15, демонстрируя характерную сигмоидальную зависимость (Рис. 5.22В, зеленая кривая). Следует отметить, что согласно параметрам изотермы связывания VSTx1×ЛБН/POPC/DOPG (см. выше) в условиях эксперимента практически весь токсин был связан с поверхностью нанодиска. При наибольшей концентрации VSTx1 доля свободного токсина не превышала 4%.

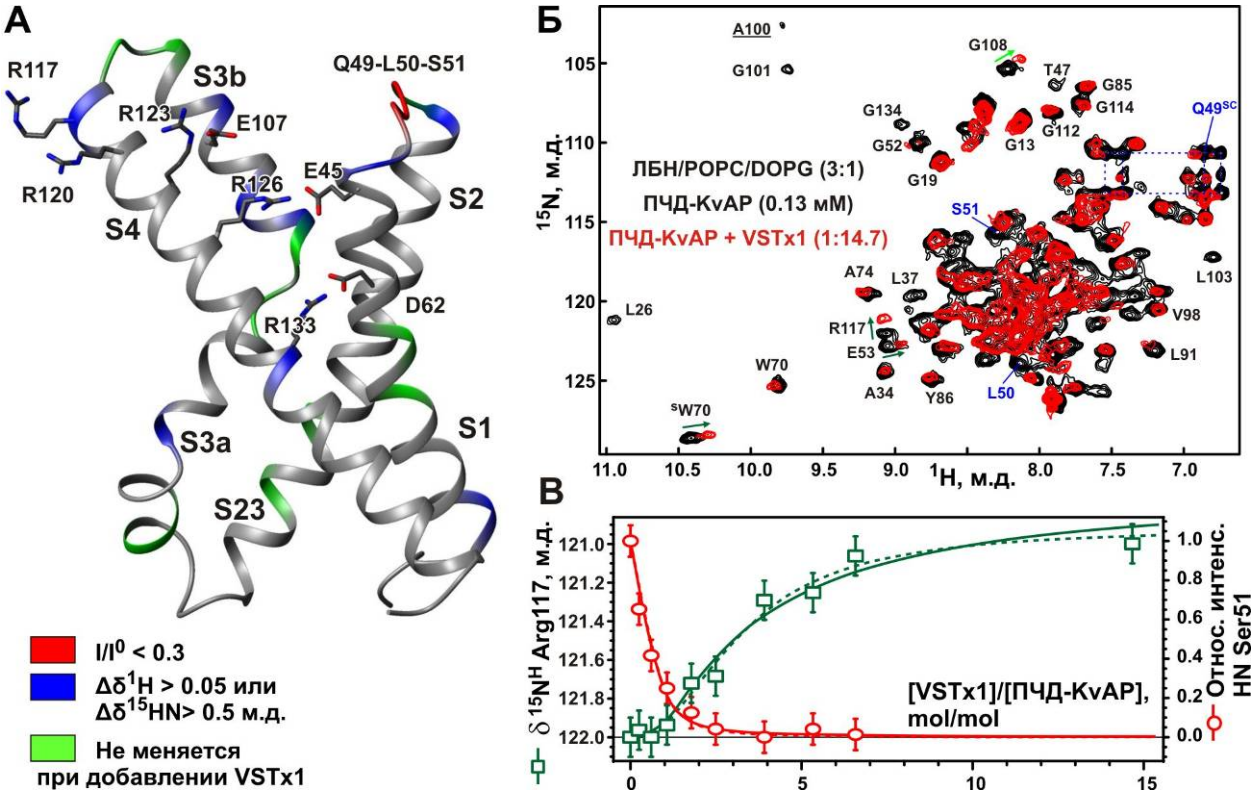


Рис. 5.22. Расположение аминокислотных остатков на молекуле ПЧД-KvAP, сигналы которых изменяются при добавлении токсина VSTx1 в окружении ЛБН/POPC/DOPG (3:1). Высокоаффинный (специфический) сайт связывания токсина (показан красным) локализован на петлевом участке S1-S2 (Gln49-Ser51). Синим цветом показаны остатки, возможно, участвующие в формировании низкоаффинных (неспецифических) сайтов связывания токсина. Показаны остатки Arg, отвечающие за потенциалозависимую активацию ПЧД, а также солевые мостики, стабилизирующие структуру домена. (Б) Сравнение 2D ^{1}H,^{15}N-TROSY спектров 90 мкМ ^{15}N-меченого ПЧД-KvAP в комплексе с ЛБН/POPC/DOPG (3:1) (pH 7.0, 45°C), измеренных без добавления VSTx1 (черные контуры) и в присутствии 15-кратного избытка токсина (красные контуры). Предполагаемое отнесение сигналов получено по аналогии со спектрами ПЧД-KvAP в мицеллах DPC/LDAO. Зелеными стрелками показаны сигналы, химические сдвиги которых изменяются при добавлении токсина. Сигналы, демонстрирующие значительное изменение амплитуды при связывании токсина показаны синим. (В) Зависимость интенсивности сигнала HN Ser51 и химического сдвига $^{15}N^{H}$ Arg117 от молярного соотношения [VSTx1]/[ПЧД-KvAP]. Полученные зависимости аппроксимированы уравнением 7.24, включающим либо два сайта связывания (высокоаффинный и низкоаффинный) токсина на молекуле домена (сплошные линии), либо один высокоаффинный и N_2 низкоаффинных сайтов связывания токсина (пунктир).

Полученные данные подтвердили предположение, сделанное при исследовании в окружении мицелл DPC/LDAO, что на молекуле ПЧД-KvAP локализовано несколько сайтов связывания VSTx1. Высокоаффинный (специфический) сайт связывания токсина (Рис. 5.22А, показан красным) находится на петлевом участке S1-S2 (остатки Gln49, Leu50, Ser51). Взаимодействие с этим сайтом проявляется в ^{1}H,^{15}N-TROSY спектрах

домена как медленный (по шкале хим. сдвигов ЯМР) обменный процесс. В этом случае интенсивность сигналов HN Leu50, HN Ser51 и H_2N Gln49 отражает относительную концентрацию свободного домена, в то время как сигналы комплекса токсин/домен либо значительно уширены, либо попадают под другие, неотнесенные сигналы домена, и не детектируются. Низкоаффинные (неспецифические) сайты связывания токсина (Рис. 5.22А, показаны синим) локализованы на разных участках домена. Взаимодействие с этими сайтами происходит только после заполнения специфического сайта и проявляется в $^{1}H,^{15}N$-TROSY спектрах ПЧД-KvAP как быстрый (по шкале ЯМР) обменный процесс. В этом случае химические сдвиги сигналов отражают относительную заселенность неспецифических сайтов молекулами VSTx1.

Для количественного анализа взаимодействия ПЧД-KvAP/VSTx1 зависимости интенсивности сигнала HN Ser51 и химического сдвига ^{15}N Arg117 от концентрации [VSTx1] были аппроксимированы уравнением 7.24, включающими одновременное взаимодействие с одним высокоаффинным (специфическим) сайтом связывания и одним или несколькими низкоаффинными (неспецифическими) сайтами. Предложенные уравнения адекватно описывали экспериментальные данные, при этом лучшее соответствие наблюдалось для варианта с несколькими низкоаффинными сайтами. Методом нелинейной регрессии были получены следующие параметры взаимодействия: K_1 ~ 60 (константа формирования комплекса со специфическим сайтом, выраженная в обратной концентрации комплекса ПЧД-KvAP/ЛБН (90 мкМ)$^{-1}$); K_2 ~ 1.2 (константа формирования комплекса с неспецифическим сайтом); N_2 = 3.2 (число неспецифических сайтов связывания токсина на молекуле домена). Следует отметить, что для получения безразмерных констант формирования комплексов необходимо привести константы K_1 и K_2 к концентрации липидов, т.е. умножить значения на количество липидных молекул в нанодиске (~ 100). Полученные результаты показывают, что константа взаимодействия со специфическим сайтом, локализованным на петлевом участке S1-S2, в 50 раз меньше константы для неспецифического сайта(ов) (разница свободной энергии образования комплексов ΔG ~ 2.4 ккал/М).

5.5.4 Резюме.

Резюмируя полученные результаты, можно сделать несколько выводов:

1. Пространственная структура VSTx1 в основном стабилизирована внутримолекулярными взаимодействиями, а за образование комплекса пептид/мембрана ответственны как электростатические, так и гидрофобные взаимодействия с липидами. При этом электростатические взаимодействия играют основную роль.

2. Взаимодействие ПЧД-KvAP/VSTx1 во многом определяется начальным связыванием пептида с мембраной или миметиком мембраны. Встраивание в интерфейсный регион липидного бислоя придает токсину ориентацию необходимую для эффективного взаимодействия с ПЧД и позволяет образовать комплекс с участками домена, погруженными в мембрану.
3. VSTx1 при взаимодействии с ПЧД-KvAP образует комплекс с участком S1-S2 домена. Этот комплекс, вероятно, стабилизирован электростатическими взаимодействиями (солевыми мостиками). При этом молекула токсина также образует солевые связи со спиралью S3b, блокируя ее движения. Участие ароматических и алифатических остатков VSTx1 в формировании интерфейса взаимодействия с ПЧД указывает на возможное вовлечение гидрофобных взаимодействий в стабилизацию комплекса токсин/домен.
4. В мицеллах DPC/LDAO и ЛБН на основе POPC/DOPG наблюдается как специфическое, так и неспецифическое взаимодействие ПЧД-KvAP/VSTx1. Взаимодействие VSTx1 со специфическим сайтом на $\Delta G \sim 2.4$ кКал·М$^{-1}$ более выгодно, чем неспецифические взаимодействия токсин/домен. В мицеллах LPPG наблюдается только неспецифическое взаимодействие, что косвенно подтверждает вывод о денатурирующем действии этого анионного детергента.

В работе впервые получены прямые структурные данные о локализации специфического сайта связывания токсинов паукообразных на ПЧД K^+-каналов, и предложен механизм влияния «вольт-сенсорных» токсинов на процесс потенциалозависимой активации. Полученные данные показали, что для модуляции процесса потенциалозависимой активации ПЧД не требуется прямого контакта между молекулой токсина и «датчиком потенциала», – спиралью S4. Вероятно, токсин встраивается в интерфейсный регион липидного бислоя и из этого состояния связывается с участком S1-S2 домена. Токсин оказывает свое блокирующее действие, препятствуя движению спирали S3b, ковалентно присоединенной к спирали S4. Пространственная сближенность молекулы токсина со спиралью S3b согласуется с данными мутагенеза [282]. В то же время, полученные данные противоречат результатам моделирования комплекса ПЧД-KvAP/VSTx1, проведенного с использованием методов молекулярной динамики в явно заданном липидном бислое в отсутствие ТМ потенциала [514]. В ходе этого исследования наблюдались прямые контакты между токсином VSTx1 и спиралью S4 ПЧД.

В пользу локализации основного сайта связывания «вольт-сенсорных» токсинов на спиральной шпильке S1-S2 также может говорить тот факт, что положение этого участка ПЧД относительно интерфейса липидной мембраны не меняется в ходе цикла

потенциалозависимой активации, в то время как лопасть вольт-сенсора в ходе этого процесса, вероятно, значительно меняет свое положение, перемещаясь из середины липидного бислоя на интерфейс и обратно [318]. При этом, согласно некоторым экспериментальным данным, комплекс «вольт-сенсорный» токсин/ПЧД не разрушается при потенциалозависимых изменениях конформации домена [323].

Описанная в литературе зависимость активности VSTx1 от липидного состава и механического состояния бислойной мембраны [301] может указывать и на другие механизмы влияния токсина на потенциалозависимую активацию. Возможно, VSTx1, связываясь с участком S1-S2, нарушает специфические взаимодействия между лопастью вольт-сенсора (S3b-S4) и молекулами фосфолипидов, необходимые для стабилизации ПЧД в различных состояниях [300], или своими заряженными группами локально изменяет электрическое поле в окружении датчика потенциала спирали S4, при этом, не контактируя с ней напрямую. Следует отметить, что последний механизм, получивший название «lipoelectric modification», вероятно, играет роль при модуляции потенциалозависимой активации Kv и Nav каналов ω-3 и ω-6 all-*cis* полиненасыщенными жирными кислотами, например, докозагексаеновой кислотой (ДГК) [279].

Полученные в работе экспериментальные результаты меняют существующую парадигму действия «вольт-сенсорных» токсинов, в рамках которой постулируется, что основной сайт связывания токсинов локализован на «потенциалочувствительной лопасти» и, в частности, на спирали S4 ПЧД.

ГЛАВА 6. Заключение. Обсуждение результатов

В работе в окружении различных мембраномоделирующих сред проведено исследование пространственной структуры мембраноактивных пептидов нескольких семейств (гидрофобные антибиотики, антимикробные пептиды, мембраноактивные нейротоксины). Полученные результаты позволили описать возможные изменения в конформации и динамике пептидов, возникающие при образовании комплекса с мембраной, и, таким образом, охарактеризовать роль различных внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий в стабилизации «нативной/активной» пространственной структуры и мембранной активности этих молекул. Кроме того, результаты, полученные в работе, позволили сделать предположение о роли внутримолекулярной динамики пептидов в их мембранной активности.

Структуры некоторых из изученных пептидов (KB1, KB7, аурелин, VSTx1 и NTII) являются жесткими и практически не меняются при взаимодействии с модельной мембраной. Полученные данные указывают на то, что эти молекулы стабилизированы в основном ковалентными взаимодействиями (дисульфидные связи, циклизация основной цепи), а также внутримолекулярными электростатическими (водородные связи, солевые мостики) и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями. Преимущественная локализация гидрофобных остатков в отдельных областях на поверхности этих пептидов указывает на то, что гидрофобные взаимодействия, включая межмолекулярные взаимодействия с липидами, не вносят большого вклада в стабилизацию пространственной структуры, однако эти взаимодействия играют важную роль при формировании комплекса пептид/мембрана. Внутримолекулярная динамика, вероятно, не оказывает выраженного влияния на функцию «жестких» МП. Напротив, данные, полученные для β-структурного антимикробного пептида ареницина-2 и спирального антибиотика пептаибола Aam-I, указывают на существенную роль конформационной подвижности в функционировании этих молекул и на значительный вклад межмолекулярных взаимодействий пептид/липид в формирование «нативной/активной» пространственной структуры.

На примере аурелина и ареницина-2 показано, что именно электростатические взаимодействия определяют селективность начального связывания и возможную дальнейшую олигомеризацию катионных МП в отрицательно заряженном бислое, моделирующем мембраны бактериальных клеток. Примеры VSTx1 и NTII также указали на большую роль электростатических взаимодействий в связывании катионных нейротоксинов с мембраной. В то же время в случае пептидов, не обладающих большим положительным зарядом, таких как циклотиды KB1 и KB7 и пептаиболы Aam-I и Zrv-II, основным детерминантом мембранной активности являются гидрофобные

взаимодействия. Эти взаимодействия также могут оказывать значительное влияние на топологию комплекса пептид-мембрана и в случае заряженных МП, например, обуславливая ТМ ориентацию димера ареницина.

Сопоставляя результаты исследования Aam-I и ареницина-2, можно выдвинуть предположение, что конформационная подвижность представляет собой дополнительное свойство, которое наряду с другими факторами (гидрофобность, амфифильность, заряд) определяет мембранную активность антибиотических МП и позволяет сдвигать профиль их активности от клеток организма-продуцента к чужеродным клеткам. Возможно, именно энтропийный вклад ($-T\times\Delta S$) в свободную энергию, связанный с уменьшением внутримолекулярной подвижности пептида при связывании с мембраной, предотвращает взаимодействие ареницина, содержащего значительную долю гидрофобных остатков, с незаряженными мембранами эукариотических клеток. В случае Aam-I высокая конформационная подвижность затрудняет как начальное связывание пептида с мембраной, так и последующие процессы (поро)каналообразования, что приводит к ослаблению антибиотической активности Aam-I на порядок по сравнению с гомологичным, но «стабильным» пептидом Zrv-IIB. С другой стороны, в функционировании лантибиотика лихеницидина высокая внутримолекулярная подвижность пептида Lchα играет совершенно иную роль, и, вероятно, служит для изменения взаимной ориентации двух рецепторных доменов, соединенных гибким шарнирным участком.

Результаты исследования лихеницидина и циклотидов показывают неправомерность широко распространенной концепции, описывающей действие мембраноактивных пептидов только в рамках неспецифических взаимодействий пептид/мембрана. Так, в Lchα и KB1/7 были выявлены сайты, ответственные за специфическое взаимодействие с липидом II (важнейшим компонентом биосинтеза клеточной стенки грамположительных бактерий) и двухвалентными катионами, соответственно. Эти сайты важны для биологической активности пептидов. Исследование взаимодействия NTII с нанодисками, содержащими фосфатидилсерин, также подтвердило возможное участие специфических взаимодействий с липидами мембран в функционировании нейротоксинов, действующих на мембранные рецепторы. С точки зрения роли специфических взаимодействий в функционировании МП наиболее интересным результатом работы являются данные, полученные для аурелина. Этот пептид одновременно обладает свойствами катионного антимикробного пептида, неспецифически действующего на мембраны, содержащие анионные липиды, и токсина-блокатора, способного взаимодействовать с поровым доменом K^+-каналов благодаря высокоспецифическим межмолекулярным взаимодействиям. Подобный дуализм свойств

не является уникальным и ранее был описан для дефензина сапецина B [396] и блокатора K^+-каналов карибдотоксина [397]. Совпадение некоторых биофизических характеристик у молекул антимикробных МП и токсинов-блокаторов указывает на возможное отсутствие четкой границы между этими двумя типами защитных молекул.

Результаты исследования потенциалочувствительного домена канала KvAP указали на важную роль внутримолекулярной динамики в функционировании рецепторных МБ. Так, в молекуле домена впервые для МБ наблюдали «медленные» (мкс-мс) межспиральные движения. Эти движения отражают конформационную нестабильность, свойственную структуре домена, и, возможно, являются прообразом высокоамплитудных конформационных перестроек, происходящих в ПЧД при изменении ТМ потенциала. Полученные структурно-динамические данные согласуются с концепцией «сфокусированного электрического поля» и с моделью, в которой переход ПЧД из состояния покоя в активированное состояние сопровождается скользящим движением сравнительно стабильной спиральной шпильки S3b-S4 («потенциалочувствительная лопасть») относительно спиралей S1 и S2 [263]. Кроме того, исследование с использованием токсина VSTx1 показало, что для модуляции процесса потенциалозависимой активации ПЧД не требуется прямого контакта между молекулой токсина и «датчиком потенциала», – спиралью S4. Согласно полученным данным, токсин встраивается в интерфейсный регион липидного бислоя и из этого состояния связывается с участком S1-S2 домена. Токсин оказывает свое блокирующее действие, препятствуя движению спирали S3b, ковалентно присоединенной к спирали S4. Полученные данные согласуются с результатами мутагенеза [282], но в то же время меняют существующую концепцию действия «вольт-сенсорных» токсинов, предполагающую прямое взаимодействие токсина с «датчиком потенциала» спиралью S4 ПЧД.

Исследование ПЧД-KvAP в окружении анионных мицелл лизо-фосфатидилглицерола LPPG выявило ключевую роль электростатических взаимодействий (внутримолекулярных солевых мостиков) в стабилизации «нативной» структуры домена. Взаимодействие отрицательно заряженных групп детергента с положительно заряженными группами белка вызывает разрушение солевых мостиков и приводит к частичной «денатурации» («плавлению») пространственной структуры ПЧД-KvAP. Полученные данные подчеркивают принципиальные отличия пространственной организации мембранных белков от глобулярных, в стабилизации структуры которых существенную роль играют гидрофобные и ван-дер-ваальсовые взаимодействия в гидрофобном ядре. Проведенные исследования впервые позволили охарактеризовать состояние спирального МБ, которое по своим свойствам напоминает состояние «расплавленной глобулы» водорастворимых белков. Это состояние характеризуется

значительным увеличением внутримолекулярной подвижности основной цепи белка в пс-нс диапазоне, что, вероятно, напрямую связано с разрушением третичных (межспиральных) контактов. Наблюдаемые обратимые переходы между «нативным» и «расплавленным» состояниями ПЧД-KvAP, вызванные изменением свойств мембраномоделирующей среды, указывают на то, что «расплавленное» состояние может выступать в роли одного из интермедиатов процесса фолдинга МБ *in vitro* (перехода белка из денатурированного в структурированное состояние). Отсутствие эффекта «плавления» ПЧД-KvAP в мембранах, содержащих анионные липиды, иллюстрирует важную роль двумерной упаковки липидного бислоя в стабилизации пространственной структуры спиральных МБ. Возможно, именно «рыхлая» структура бицелл и мицелл обуславливает низкую стабильность МБ в мембраномоделирующих средах на основе детергентов. Изучение температурной зависимости процесса фолдинга ПЧД-KvAP из «расплавленного» состояния показало, что в отличие от глобулярных белков формирование «нативной» структуры МБ в окружении мицелл детергентов сопровождается увеличением энтальпии и энтропии системы и является эндотермическим процессом. Рост энтропии системы в ходе фолдинга МБ, вероятно, связан с уменьшением количества молекул детергента, необходимых для солюбилизации «нативного» состояния МБ по сравнению с «расплавленным». Полученные данные согласуются с результатами исследования температурной зависимости процесса димеризации ТМ спиралей в детергент-содержащих средах [509].

Результаты, полученные в работе, позволили сформулировать рекомендации по выбору оптимальных мембраномоделирующих сред для ЯМР-исследований МБ и МП. Так, на примере Zrv-IIB показано, что для исследования конформационно «жестких» МП могут использоваться различные среды, включая изотропные растворители. В то же время исследование конформационно подвижных молекул, например, Aam-I и ПЧД-KvAP, требует тщательной оптимизации состава детергент-содержащей среды или фосфолипидного состава мембраны нанодисков. Неправильный выбор среды может приводить к «ненативным» структурно-динамическим состояниям, таким как равновесие между право- и левозакрученной спиральной конформацией, обнаруженное для Aam-I в метаноле, или «расплавленное» состояние ПЧД-KvAP, наблюдаемое в мицеллах LPPG. Данные, полученные для катионных МП ареницина и аурелина, выявили недостатки, свойственные детергент-содержащим средам. Эти пептиды не взаимодействовали с мембранами, содержащими цвиттер-ионные фосфолипиды, и в то же время образовывали комплексы с мицеллами цвиттер-ионных детергентов. Вероятно, мицеллы способны удовлетворительно моделировать только гидрофобную составляющую взаимодействия пептид/мембрана, а использование детергентов различного заряда для моделирования

электростатической компоненты этого взаимодействия может приводить к недостоверным результатам.

Многие из выше перечисленных результатов не могли бы быть получены без применения новой мембраномоделирующей среды, – липид-белковых нанодисков. В работе впервые показана возможность применения ЛБН для структурно-динамических ЯМР-исследований МБ и МП. Полученные данные продемонстрировали большой исследовательский потенциал применения ЛБН, позволяющих изучать такие состояния мембранных биомолекул, которые не доступны для исследования в средах на основе детергентов. Например, только использование ЛБН позволило впервые методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения наблюдать динамические переходы между поверхностносвязанным и ТМ состояниями спирального пептида (Aam-I), вызванные изменением гидрофобной толщины бислоя. Из-за особенностей строения подобные переходы невозможно наблюдать в мицеллах и бицеллах, содержащих детергенты. Возможность использования для формирования ЛБН различных липидов и их смесей, а также подходы применения ЛБН, развитые в диссертационной работе, открывают новые перспективы для структурно-функциональных исследований мембранных биомолекул с атомным разрешением в практически нативном окружении.

ГЛАВА 7. Экспериментальная часть (Материалы и методы исследований)

7.1 Объекты исследования и материалы

7.1.1 Реактивы

В работе использовали дейтерированный d3-метанол (CD_3OH, 99.5% дейтерия), дейтерированный d1-хлороформ ($CDCl_3$, 100% дейтерия) и дейтерированный d2-трифторэтанол (CF_3CD_2OH, 98% дейтерия) производства «CIL» (США). Все использованные фосфолипиды и их смеси, включая короткоцепочечные липиды (DHPC, DLPC, DHPC, POPC, DOPG, DOPC, DMPC, DMPG, экстракт полярных липидов из *E. coli*, кардиолипин (DPG) из *E. coli*, PG из *E. coli* и L-R-фосфатидилинозитол из сои) и лизофосфолипиды (LMPC, LMPG, LPPG) были произведены «Avanti Polar Lipids» (США). Дейтерированные детергенты d38-DPC и d25-SDS были произведены «CIL» (США). Немеченые детергенты (холат натрия, DDM, LDAO, DPC, SDS) были произведены «Anatrace» (США).

7.1.2 Препараты белков, использованные в работе

7.1.2.1 Фрагмент аполипопротеина MSP

Белок MSP (фрагмент 44–243 аполипопротеина A-1 человека), содержащий на *N*-конце дополнительную последовательность, кодирующую шесть остатков His и сайт для специфического гидролиза протеазой TEV (26.0 кДа, молярный коэффициент поглощения E_{280} = 26.93 $мМ^{-1}\cdot см^{-1}$), был получен к.б.н. Люкмановой Е.Н. (лаборатория биоинженерии белка, отдел биоинженерии ИБХ РАН, Руководитель академик Кирпичников М.П.) методом рекомбинантной продукции в бактериальных клетках (*E. coli*). Белок очищали с помощью металлоаффинной хроматографии на смоле Ni^{2+} Sepharose 6 Fast Flow («GE Healthcare», США).

В некоторых случаях в работе использовали препарат белка MSP^- (23.3 kDa, E_{280} = 23.95 $мМ^{-1}\cdot см^{-1}$) с отщепленной при помощи TEV протеазы His_6 последовательностью.

7.1.2.2 K+ канал KcsA

Немеченый и ^{15}N-меченый аналоги гомотетрамера K+ канала KcsA (tKcsA, *Streptomyces lividans*), содержащие *C*-концевую His6 последовательность (18.5 кДа, E_{280} = 34.95 $мМ^{-1}\cdot см^{-1}$, для мономера), были получены к.б.н. Некрасовой О.В. (группа нанобиоинженерии, отдел биоинженерии ИБХ РАН) методом рекомбинантной продукции в бактериальных клетках (*E. coli*). Белок был выделен из бактериальных мембран с помощью мягкого детергента DDM и очищен на смоле Ni^{2+} Sepharose 6 Fast Flow.

7.1.2.3 ПЧД K+ канала KvAP

Немеченый и ^{15}N-, ^{13}C,^{15}N- и ^{2}H,^{13}C,^{15}N-меченые аналоги изолированного ПЧД канала KvAP (остатки 1-148, архея *Aeropyrum pernix*), дополнительно содержащие *C*-концевую His_6 последовательность (17.3 кДа, E_{280} = 18.91 мМ$^{-1}$·см$^{-1}$), были получены к.х.н. Шингаровой Л.Н. (лаборатория биоинженерии белка ИБХ РАН) методом рекомбинантной продукции в клетках *E. coli*. Белок был выделен из бактериальных мембран с помощью мягкого детергента DDM и очищен на смоле Ni^{2+} Sepharose 6 Fast Flow.

7.1.2.4 Бактериородопсин ESR

Немеченый аналог бактериородопсина грамположительной психрофильной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (ESR), содержащий *C*-концевую His_6 последовательность (28.8 кДа, E_{280} = 46.87 мМ$^{-1}$·см$^{-1}$, E_{534} = 43.0 мМ$^{-1}$·см$^{-1}$), был получен к.х.н. Петровской Л.Е. (лаборатория биоинженерии белка ИБХ РАН) методом рекомбинантной продукции в клетках *E. coli*. Белок был выделен из бактериальных мембран с помощью мягкого детергента DDM и очищен на смоле Ni^{2+} Sepharose 6 Fast Flow. Немеченый аналог ESR был также получен к.б.н. Люкмановой Е.Н. и Копеиной Л.С. (лаборатория биоинженерии белка ИБХ РАН) методом бесклеточного синтеза. Белок синтезировали в системе диализного типа на основе экстракта S30 из клеток *E. coli* (штамм A19) в виде осадка трансляционной смеси (ТС).

7.1.2.5 ТМ-домен рецепторной киназы ErbB3

ТМ домен рецепторной тирозинкиназы ErbB3 человека (TM-ErbB3, остатки 639-670), содержащий *C*-концевую His_6 последовательность (4.7 кДа E_{280} = 6.99 мМ$^{-1}$·см$^{-1}$) получен к.б.н. Люкмановой Е.Н. и Хабибулиной Н.Ф. (лаборатория биоинженерии белка ИБХ РАН) методом бесклеточного синтеза в присутствии ЛБН. Для синтеза тотально ^{15}N,^{13}C-меченого и селективно ^{15}N-меченых вариантов TM-ErbB3 использовали либо алгальный гидролизат, содержащий ^{15}N,^{13}C-меченые аминокислоты (ГосНИИ «Генетика») либо отдельные ^{15}N-меченые аминокислоты («Sigma-Aldrich», США).

7.1.3 Препараты пептидов, использованные в работе

7.1.3.1 Пептаиболы Aam-I и Zrv-IIB

Аналоги пептаиболов антиамебина I (Aam-I, 1671 Да, *Emericellopsis minima*) и зервамицина IIB (Zrv-IIB, 1838 Да, *Emericellopsis salmosynnemata*) были любезно предоставлены руководителем учебно-научного центра ИБХ РАН д.х.н. Овчинниковой Т.В. и Складневым Д.А. (ГосНИИ «Генетика»). Природный Zrv-IIB и его ^{15}N- и ^{13}C,^{15}N-меченые аналоги были выделены из культуры гриба *Emericellopsis salmosynnemata* (штамм 336, IMI 58330), выращенной либо на обычной среде, либо на средах, обогащенных изотопами ^{13}C и ^{15}N. Спин-меченые аналоги Zrv-IIA, содержащие замену Iva/Aib4, были получены методом твердофазного химического синтеза. Природный Aam-I

и его ^{15}N- и ^{13}C,^{15}N-меченые аналоги были выделены из культуры гриба *Emericellopsis minima* (штамм F-1483336 из всероссийской коллекции микроорганизмов, ВКМ), выращенной либо на обычной среде, либо на средах, обогащенных изотопами ^{13}C и ^{15}N.

7.1.3.2 Двухкомпонентный лантибиотик Lchα/Lchβ

Образцы немеченых пептидов лихеницидинов Lchα и Lchβ (3250 и 3019 Да, соответственно) были выделены из культуры термофильной грамположительной бактерии *Bacillus licheniformis* VK21 в учебно-научном центре ИБХ РАН под руководством д.х.н. Овчинниковой Т.В.

7.1.3.3 Циклотиды KB1 и KB7

Немеченые циклические пептиды, – циклотиды Kalata B1 и B7 (KB1 и KB7, 2892 и 3072 Да, соответственно), были выделены из африканского растения *Oldenlandia affinis* (семейство мареновые) и предоставлены для исследования Проф. Ларсом Скьелдалом из Норвегии (Lars Skjeldal, Norwegian University of Life Sciences, IKBM, Aas, Norway).

7.1.3.4 Антимикробный пептид ареницин-2

Образцы немеченого, ^{15}N-меченого и ^{13}C,^{15}N-меченого АП ареницина-2 (Ar2, 2772 Да, морской многощетинковый червь *Arenicola marina*) были получены в учебно-научном центре ИБХ РАН под руководством д.х.н. Овчинниковой Т.В методом рекомбинантной продукции в клетках *E. coli*.

7.1.3.5 Антимикробный пептид аурелин

Образцы немеченого и ^{15}N-меченого АП аурелина (4297 Да, сцифоидная медуза *Aurelia aurita*) были получены в учебно-научном центре ИБХ РАН под руководством д.х.н. Овчинниковой Т.В. методом рекомбинантной продукции в клетках *E. coli*.

7.1.3.6 Нейротоксин II

Образцы немеченого, ^{15}N-меченого и ^{2}H,^{15}N-меченого нейротоксина II (NTII, 6885 Да, кобра *Naja oxiana*) были получены к.б.н. Люкмановой Е.Н. (лаборатория биоинженерии белка ИБХ РАН) методом рекомбинантной продукции в клетках *E. coli*.

7.1.3.7 Вольт-сенсорный токсин VsTx1

Образцы немеченого и ^{15}N-меченого аналогов VsTx1 (паук *Grammostola spatulata*, чилийский розовый птицеед), дополнительно содержащих остатки Gly-Ser на *N*-конце (4142 Да) были получены к.б.н. Люкмановой Е.Н. и к.б.н. Шулепко М.А. (лаборатория биоинженерии белка ИБХ РАН) методом рекомбинантной продукции в клетках *E. coli*.

7.1.4 Измерение концентрации препаратов МП и МБ методом спектрофотометрии

Концентрацию белков и пептидов, содержащих остатки Trp и Tyr, измеряли по поглощению при λ = 280 нм с учетом соответствующего расчетного молярного коэффициента поглощения (приведены выше). UV-Vis спектры получали при комнатной

температуре в диапазоне длин волн от 210 до 700 нм, используя спектрофотометр Cary-50 («Varian», США). Спектры образцов бактериородопсина ESR приближали суммой 4-х Гауссовых линий с центрами в ~ 210, 280, 390, и 530 нм, используя программу Mathematica (Wolfram research). Вклад от светорассеяния учитывали в процедуре вписывания с использованием формулы Релея и дополнительного вариабельного параметра.

7.2 Получение и анализ ЛБН и комплексов МБ/ЛБН и МП/ЛБН

Эксперименты по реконструкции ЛБН и комплексов МБ/ЛБН, а также последующий биохимический анализ полученных препаратов проведены совместно с к.б.н. Люкмановой Е.Н. (лаборатория биоинженерии белка ИБХ РАН).

7.2.1 Реконструкция ЛБН и комплексов МБ/ЛБН и МП/ЛБН

7.2.1.1 Реконструкция и очистка «пустых» ЛБН

Очищенный белок MSP смешивали в молярном соотношении 1:75 с липидами в присутствии детергента холата натрия (молярное соотношение холат/липиды 2:1) и инкубировали смесь в течение 3 ч при 4ºС. В случае использования насыщенных липидов (DMPC, DLPC) температуру реакции поддерживали не ниже 25°С. Самопроизвольную сборку нанодисков инициировали путем сорбции детергента на смолу Bio-BeadsTM («Bio-Rad Laboratories», США) в течение 1.5 ч. Супернатант содержал смесь ЛБН, свободного MSP и липидных везикул. Очистку нанодисков проводили на смоле Ni^{2+} Sepharose 6 Fast Flow, уравновешенной буфером А (20 мМ Tris/HCl, 1 мМ NaN_3, 250 мМ NaCl, pH 8.0). После нанесения реакционной смеси смолу промывали 4-кратным объемом буфера А. Элюцию ЛБН проводили буфером А, содержащим 100 мМ имидазол.

7.2.1.2 Реконструкция комплексов ЛБН/KcsA

Для получения ЛБН на основе DMPC, DOPC или POPC использовали очищенный препарат tKcsA в буфере 50 мМ Tris/HCl, pH 7.5, содержащем 10 мМ KCl и 10 мМ DDM. Препарат tKcsA смешивали с MSP, липидами и холатом натрия в молярном соотношении 1:20:800:1600. Конечная концентрация tKcsA составляла 26 мкМ. Смесь инкубировали в течение ночи при умеренном перемешивании при 4° в случае ненасыщенных липидов (DOPC, POPC) и при 25º в случае насыщенных липидов (DMPC). Затем добавляли смолу Bio-Beads^{TM} и дополнительно инкубировали при интенсивном перемешивании при 4 или 25ºС, в зависимости от используемых липидов, в течение 2 ч. Полученную смесь липосом, пустых ЛБН и ЛБН, содержащих KcsA, фракционировали с помощью смолы Ni^{2+} Sepharose 6 Fast Flow, предварительно уравновешенной буфером А. Фракцию нанодисков, содержащих KcsA, элюировали буфером А, содержащим 500 мМ имидазол, диализовали против 20 мМ Tris/HCl, pH 6.9, содержащего 5 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА и 1 мМ NaN_3, и

концентрировали с помощью ультрафильтрационной ячейки NMWL 10000 («Millipore», США). Эффективность встраивания tKcsA в ЛБН на основе DMPC составила ~ 70%.

7.2.1.3 Реконструкция комплексов ЛБН/ПЧД-KvAP

Для получения ЛБН на основе DMPC, DMPG или смеси POPC/DOPG (3:1) использовали очищенный препарат ПЧД в буфере 50 мМ Tris/HCl, pH 8.0, содержащем 100 мМ KCl и 30 мМ DDM. Препарат ПЧД смешивали с MSP^{-}, липидами и холатом натрия в молярном соотношении 1:20:800:1600. Конечная концентрация ПЧД составляла 0.5 мг/мл. Реконструкцию и очистку комплексов проводили по протоколу, описанному выше для tKcsA (элюцию с колонки осуществляли в присутствии 100 мМ имидазола). Эффективность встраивания ПЧД в ЛБН составила ~ 30%.

7.2.1.4 Фолдинг ESR в средах на основе ЛБН

Препарат ESR, полученный в бактериальной системе, осаждали из мицелл DDM с помощью 10% холодной (-20 °C) трихлоруксусной кислоты. Осадок был трижды промыт холодным ацетоном (-20 °C) и высушен на воздухе. Осадок, содержащий ESR, после бесклеточного синтеза отделяли от ТС с помощью центрифугирования (15 мин, 14000 об/мин). В обоих случаях осадок белка солюбилизировали в буфере А, содержащем 2% SDS. Образец ESR/SDS (47 мкМ, 0.17 мл) смешивали с MSP^{-}, all-*trans*-ретиналем, и липидами (DMPC или DMPG) в соотношении 1:30:4:1800 без добавления холата натрия. Окончательный объем реакции составил 2.0 мл, финальная концентрация ESR – 4.0 мкМ, концентрация SDS была доведена до 0.5% (молярное соотношение ESR/SDS ~ 1:4300). Реконструкцию и очистку комплексов проводили по протоколу, описанному выше для tKcsA (элюцию с колонки осуществляли в присутствии 100 мМ имидазола).

Для оценки выхода реакции фолдинга концентрацию активного бактериородопсина ESR, рефолдированного в мембране ЛБН, оценивали по поглощению при 534 нм, используя молярный коэффициент поглощения (E_{534} = 43.0 $мМ^{-1} \cdot см^{-1}$). Это значение было получено для ESR, выделенного из мембраны *E. coli* в мягком детергенте DDM в присутствии кофактора all-*trans*-ретиналя. Общую концентрацию ESR в составе ЛБН после фолдинга оценивали с помощью Western блота методом денситометрии в программе OptiQuant 3.00 (Packard Instrument Company), используя моноклональные антитела против His_6 последовательности (Merck, Darmstadt, Germany).

Для приготовления комплексов ESR/ЛБН, содержащих активный бактериородопсин, был использован стандартный протокол реконструкции. Образец активного ESR (выделение из мембран *E.coli* в присутствии all-*trans*-ретиналя) в DDM (66 мкМ, 0.45 мл) смешивали в буфере А с MSP^{-}, DMPG, и холатом натрия в соотношении 1:20:1600:3200. Окончательный объем реакции составил 5.0 мл, концентрация ESR – 6.0 мкМ, а молярное соотношение ESR/DDM ~ 1:60.

7.2.1.5 Фолдинг KcsA в средах на основе ЛБН

Образец tKcsA после очистки в 1% DDM был осажден с помощью 10% холодной трихлоруксусной кислоты, как описано выше для ESR. Осадок белка был солюбилизирован в буфере А, содержащем 1% SDS, что привело к формированию мономера mKcsA. Образец mKcsA/SDS (70 мкМ, 0.15 мл) смешивали с MSP^{-}, липидами (DOPE/DOPG 7:3, POPC, POPC/DOPG 7:3, DMPC или DMPG) и холатом натрия в соотношении 1:20:800:1600. Окончательный объем реакции составил 0.45 мл, концентрация mKcsA – 23 мкМ, а молярное соотношение mKcsA/SDS ~ 1:500. Реконструкцию и очистку комплексов проводили по протоколу, описанному выше (элюцию с колонки осуществляли в присутствии 500 мМ имидазола).

Количество tKcsA и mKcsA в комплексе с ЛБН после очистки препаратов на смоле Ni^{2+} Sepharose 6 Fast Flow оценивали методом денситометрии в программе OptiQuant 3.00 (Packard Instrument Company), используя SDS-электрофорограммы, окрашенные Кумасси.

7.2.1.6 Бесклеточный синтез TM-ErbB3 в присутствии ЛБН

Для бесклеточного синтеза TM-ErbB3 в растворимой форме в ТС добавляли предварительно сформированные ЛБН на основе DMPG в концентрации 0.05 мМ. Концентрацию TM-ErbB3, синтезированного в растворимой и нерастворимой форме, оценивали с помощью Western блота, используя как моноклональные антитела против His_6 последовательности так и калибровочные образцы домена, очищенные в присутствии детергентов, концентрация белка в которых была определена спектрофотометрически. Выход синтеза TM-ErbB3 в присутствии ЛБН составил ~1.8 мг/мл ТС, из которых ~1.6 мг/мл находились в растворимой форме. Полученное значение соответствует концентрации 0.27 мМ и молярному соотношению TM-ErbB3/ЛБН ~5:1. Полученные комплексы TM-ErbB3/ЛБН очищали на смоле Ni^{2+} Sepharose 6 Fast Flow, концентрировали и использовали для последующего ЯМР-анализа.

7.2.1.7 Встраивание Aam-I в ЛБН

Для встраивания в нанодиски был приготовлен раствор ^{15}N-Aam-I в дейтерированном метаноле (C^2H_3OH) с концентрацией 15 мг/мл. Использовали заранее сформированные ЛБН на основе DOPG, POPC, DMPC, DLPC или смеси DLPC/DLPG 4:1. Раствор ЛБН (100 мкМ, 500 мкл, буфер 10 мМ Tris/Ac, 1 мМ ЭДТА, 5% ^2H_2O, pH 7.0) титровали добавлением по 4 мкл раствора антиамебина с последующей инкубацией в пробирках фирмы «Eppendorf» (США) с открытой крышкой при умеренном перемешивании в течение 1 ч в термостате при 30^o. Для приготовления образца в целях получения спектров ЯМР процедуру повторяли 7 раз. Результирующая концентрация пептида составляла ~ 0.5 мМ (~ 5 пептидов на один диск). Конечная концентрация метанола в образце не превышала 2%, что было определено методом ^{2}H-ЯМР.

7.2.1.8 Встраивание NTII и VsTx1 в ЛБН

Комплексы NTII/ЛБН и VsTx1/ЛБН получали либо добавлением раствора нанодисков (концентрация 50-100 мкМ) в образцы пептидов (объем 500 мкл, концентрация 20-30 мкМ), либо добавлением растворенных токсинов (концентрация 100-200 мкМ) в образцы нанодисков (объем 500 мкл, концентрация 50-100 мкМ). Для экспериментов использовали буфер 10 мМ Tris/Ac, 1 мМ ЭДТА, pH 7.0.

7.2.2 Физико-химический анализ ЛБН и комплексов МБ/ЛБН и МП/ЛБН

7.2.2.1 Гель-фильтрация

Гель-фильтрацию с разделением частиц по размеру проводили на смоле Superdex-200, на колонке Tricorn 5/200 («GE Healthcare», Швеция) в буфере (10 мМ Трис-HCl, 0.1 М NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ NaN_3, pH 7.4). В качестве калибровочных белков использовали тироглобулин (669 кДа, радиус Стокса R_H = 8.5 нм), ферритин (440 кДа, R_H = 6.1 нм), каталазу (232 кДа, R_H = 5.22 нм), альдолазу (158 кДа, R_H = 4.81 нм), БСА (67 кДа, R_H = 3.55 нм), овальбумин (43 кДа, R_H = 3.05 нм). Скорость потока через колонку – 0.3 мл/мин, детектирование производили на длине волны 280 нм. Размер частиц определяли по калибровочной кривой зависимости объема элюции от $\lg R_H$. Все приведенные в работе значения размера (диаметра) частиц соответствуют удвоенным значениям R_H.

7.2.2.2 ЯМР-спектроскопия

1D ^{1}H, 1D ^{2}H, 2D ^{1}H-^{13}C, 2D ^{1}H-^{15}N, 3D HNCO, 3D HNCA и 3D ^{15}N-NOESY ЯМР-спектры получали при 40–45°C на спектрометрах AVANCE-700 и AVANCE-III-800 («Bruker», Германия), укомплектованных датчиками с криогенно охлаждаемой ^{1}H-катушкой с рабочей частотой по протонам 700 и 800 МГц, соответственно. Значение pH образцов во всех случаях было ~ 7.0. Для измерения корреляционных 2D ^{1}H,^{13}C-спектров использовали схему HSQC, включающую в себя специальные элементы для увеличения чувствительности и градиентное эхо для выбора путей передачи намагниченности [487]. Для измерения корреляционных 2D ^{1}H,^{15}N-спектров использовали схему TROSY со специальными элементами для увеличения чувствительности, градиентным эхо и амплитудно-модулированными импульсами для предотвращения насыщения сигнала воды [488], либо схему HMQC [35] с уменьшенным до 3 мс временем на передачу намагниченности, также включающую в себя градиентное эхо, амплитудно-модулированные импульсы и дополнительную биноминальную последовательность для предотвращения насыщения сигнала воды. Для измерения 3D HNCO и HNCA спектров ^{15}N-^{13}C-меченого аналога TM-ErbB3 в комплексе с ЛБН/DMPG использовали схему TROSY. Для измерения 3D ^{15}N-NOESY спектра Aam-I в комплексе с ЛБН/DLPC/DLPG (время смешивания τ_m=40 мс) также использовали схему TROSY. Химические сдвиги протонов измеряли относительно остаточного сигнала протонов воды, химический сдвиг

которого составляет 4,75 м.д. при 30°C. Химические сдвиги ядер ^{15}N и ^{13}C были вычислены с использованием соответствующих гиромагнитных соотношений [515].

Спектры 1D ^{31}P-ЯМР получали при температуре 25°C на спектрометре ECA-600 («JEOL», Япония) с рабочей частотой по протонам 600 МГц. Химические сдвиги ядер ^{31}P измеряли относительно сигнала фосфатной группы DMPC, солюбилизированного в холате натрия, чей химический сдвиг равен – -0,5 м.д. при 25°C [329].

ЯМР-методы анализа размера, энергии образования и топологии комплексов МП/ЛБН описаны ниже в соответствующих пунктах.

7.3 Исследование МП в липосомах и КД-спектроскопия

7.3.1 Исследование МП в липосомах

Для приготовления липосом сухие навески фосфолипидов или их смесей растворяли в 10 мМ Tris/Ac буфере (pH 7.0), в некоторых случаях с добавлением соли (100 мМ NaCl). Полученные растворы озвучивали в ультразвуковой ванне и подвергали нескольким циклам замораживания/оттаивания для получения больших мультиламелярных везикул. Для получения маленьких моноламелярных везикул (SUV) с характерными размерами ~ 30 нм растворы обрабатывали ультразвуком с помощью дезинтегратора («Badelin Electronic GmbH», Великобритания). Обработку проводили на льду в течение 10 сек с 5-кратным повтором и паузами (20 сек) для охлаждения.

Для измерения КД-спектров образцы ареницина-2 в том же буфере постепенно добавляли к образцам SUV. Концентрация липидов (детергентов) в образцах составляла 15 мМ, концентрация Ar2 была в диапазоне от 0.07 до 0.3 мМ.

Для измерения изотерм связывания аурелина с липосомами раствор SUV (концентрация ~ 20 мМ) добавляли в образцы пептида (объем 500 мкл, концентрация 30 мкМ).

7.3.2 Спектроскопия кругового дихроизма

КД-спектры получали в диапазоне длин волн от 190 нм (195 нм в случае образцов в SUV) до 250 нм при комнатной температуре на приборе Jasco J-810 («Jasco», Япония) совместно с сотрудником отдела структурной биологии ИБХ РАН Самсоновой О. В. Анализ вторичной структуры проводили, используя набор программ CDpro [516].

7.4 Структурные исследования МБ и МП методами ЯМР-спектроскопии

7.4.1 Приготовление образцов МП и МБ в классических мембраномоделирующих средах

7.4.1.1 Солюбилизация МП

Сухие навески пептидов (Aam-I, Zrv-IIB и Lchα и Lchβ) растворяли в изотропных

растворителях. pH раствора меняли, используя CDOOH, или концентрированный раствор NaOH. Конечные концентрации пептидов, объем образцов и pH раствора (не корректированные показания pH-метра) приведены в таблице 7.1.

МП/МБ	Метки[1]	Среда[2] Соотношение D:P	Конц. (мМ); Объем (мл)[3]; pH[4]; T (ºC)	ЯМР-спектрометр(ы)[5] ЯМР-спектры[6]
Lchα	–	CD_3OH $CD_3OH/CDCl_3$ до 2:3 CD_3OH/H_2O до 1:3	0.5; 0.5; 3.5; 27	AV-700; TOCSY, NOESY (200), DQF-COSY, ^{13}C-HSQC (н.с.)
Lchβ	–	CD_3OH	0.5; 0.5; 3.5; 27	– // –
KB1	–	Вода; d38-DPC (60:1); d25-SDS (60:1)	3.6; 0.5; 2.8; 40	UNITY-600; DRX-500; AV-700; 2D TOCSY, NOESY (50), DQF-COSY, ^{13}C-HSQC, ^{13}C-HMBC (н.с.)
KB7	–	– // –	1.6; 0.5; 2.6; 30	UNITY-600; DRX-500; AV-700; 2D TOCSY, NOESY (100), DQF-COSY
Ar2	–	Вода	1.0; 0.5; 3.3; 15	UNITY-600; DRX-500; 2D TOCSY, NOESY (100), DQF-COSY
	–, N, CN	d38-DPC (100:1)	1.2; 0.35; 4.5; 43	AV-600; AV-800; 2D ^{15}N-HSQC, ^{15}N-TROSY, ^{13}C-HSQC, DQF-COSY, 3D ^{15}N-NOESY (60), ^{13}C-NOESY (60), HNCO, HNCA, HNCACB, H(C)CH-TOCSY
	–, N, CN	d25-SDS (200:1) d38-DPC/DOPG (100:1)	– // –	AV-800; 2D ^{15}N-TROSY
Аурелин	–, N	Вода d38-DPC/DOPG (90:1)	0.5; 0.5; 4.5; 30	AV-600; 2D ^{15}N-HSQC, NOESY; TOCSY; DQF-COSY; 3D ^{15}N-NOESY (80), ^{15}N-TOCSY
VsTx1	–, N	Вода d38-DPC/LDAO (60:30:1)	0.5; 0.5; 5.0; 45	AV-600/800; 2D ^{15}N-HSQC, 3D ^{15}N-NOESY, ^{15}N-TOCSY
Aam-I	–, N, CN	CD_3OH	4.0; 0.5; 6.0; 30	DRX-500; ^{15}N-HSQC, ^{13}C-HSQC, DQF-COSY, ROESY (250), TOCSY, HNCO, HNCA, HNCACB, H(C)CH-TOCSY
	N, CN	DHPC/DMPC (120:30:1)	1.0; 0.5; 5.2; 40	AV-600; 2D ^{15}N-HSQC, ^{13}C-HSQC, 3D ^{15}N-NOESY (100), ^{13}C-NOESY (100), HNCO, HNCA, HNCACB, H(C)CH-TOCSY
	N	SDS, DPC, DHPC, LMPC, LMPG	0.1; 0.5; 5.2; 40	AV-600/800; 2D ^{15}N-HSQC
Zrv-IIB	–, N, CN	CD_3OH $CD_3OH/CDCl_3$ до 1:9 CD_3OH/H_2O до 1:1	10.8/4.0; 0.5; 6.0; 30	UNITY-600; DRX-500; 2D TOCSY, NOESY (200), DQF-COSY; ^{15}N-HSQC; ^{13}C-HSQC; HNCO, HNCA
	sl16 sl0	CD_3OH	0.1-18; 0.15; 6.0; 30	DRX-500; 2D TOCSY, NOESY
	–, N	DPC (40:1)	1.8; 0.5; 6.8; 30	UNITY-600; 2D TOCSY, NOESY (100), DQF-COSY; ^{15}N-HSQC
ПЧД	N	TFE, DPC, LDAO, SDS, LPPG, LMPG, смеси DPC/LDAO, бицеллы DHPC/DMPC (120:30:1)	0.1-0.2; 0.5; 5.0-7.0; 30-45	AV-700; 2D ^{15}N-HSQC
	CN, DCN	DPC/LDAO (100:50:1)	1.0; 0.35; 4.7; 42	AV-700; 2D ^{15}N-HSQC, ^{15}N-TROSY, ^{13}C-HSQC, 3D ^{15}N-NOESY (150), ^{13}C/^{15}N-NOESY (150), HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCACONH
	DCN	LPPG (200:1)	1.0; 0.35; 5.5; 45	– // –
	N/sl112	DPC/LDAO (100:50:1)	0.2; 0.35; 4.7; 45	AV-800; 2D ^{15}N-HSQC, ^{15}N-TROSY
	N/sl140	LPPG (200:1)	0.2; 0.35; 5.5; 45	
–, sl56, sl112, N, NC ПЧД / –,N Vstx		DPC/LDAO	0.1-0.2; 0.5; 5.0; 45	AV-800; 2D ^{15}N-HSQC, ^{15}N-TROSY, 3D HNCO

Табл. 7.1. Образцы МП и МБ, использованные в работе, и параметры измерения ЯМР-экспериментов. (продолжение на следующей странице)

1 – «–», «N», «CN», «DCN» – обозначает немеченый, ^{15}N-меченый, ^{13}C,^{15}N-меченый и ^{2}H,^{13}C,^{15}N-меченый образцы. sl*N* – обозначает образец МП/МБ, содержащий спин-метку в положении *N*.
2 – Для смесей изотропных растворителей соотношения соответствуют объемным долям. Для липидов/детергентов – молярным соотношениям.
3 – Для образцов в стандартных ампулах ЯМР объем оставлял ~0.5 мл. Для образцов в ампулах Shigemi (Япония) – 0.35 мл. Для образцов в толстостенных ЯМР ампулах – 0.15 мл.
4 – Для изотропных растворителей приведенные значения pH соответствуют не корректированным показаниям pH-метра.
5 – Спектрометры AVANCE-III-600, AVANCE-700, AVANCE-III-800 («Bruker», Германия) были укомплектованы криогенно охлаждаемыми датчиками тройного резонанса (HCN) с повышенной чувствительностью. Спектрометры DRX-500 («Bruker») и Unity-600 («Varian», США) были укомплектованы обычными датчиками тройного резонанса (HCN).
6 – Для NOESY/ROESY спектров в скобках приведено значение времени смешивания (мс), использованного для анализа пространственной структуры. (н.с.) – натуральное содержание.

Для приготовления мицелл и бицелл сухие навески детергентов и липидов растворяли в требуемом объеме буфера или деионизированной воды. Полученные растворы обрабатывали ультразвуком с использованием ультразвуковой ванны. Для приготовления комплексов МП с мицеллами и бицеллами использовали два метода: (1) к сухим навескам пептидов добавляли предварительно приготовленные растворы детергентов и липидов, либо к раствору МП в воде добавляли концентрированные растворы детергентов и липидов. Первый метод использовали для гидрофобных (слаборастворимых в воде) пептидов. Во всех случаях конечное молярное соотношение детергент(липид)/пептид было не менее 40:1 и в большинстве случаев не превышало 200:1. Конечные концентрации пептидов, детергентов и липидов, объем образцов и pH раствора приведены в таблице 7.1.

7.4.1.2 Солюбилизация ПЧД

ПЧД осаждали из раствора, содержащего DDM, с помощью 10% холодной трихлоруксусной кислоты и промывали холодным ацетоном (см. п. 7.2.1.4). Осадок растворяли либо в 0.5 мл d2-TFE, либо в 0.35-0.5 мл водных растворов детергентов (липидов). pH образцов меняли путем добавления HCl либо NaOH. Во всех случаях конечное молярное соотношение детергент(липид)/белок было не менее 120:1 и в большинстве случаев не превышало 200:1. Конечные концентрации пептидов, детергентов и липидов, объем образцов и pH раствора приведены в таблице 7.1.

7.4.2 Измерение ЯМР спектров и отнесение сигналов

ЯМР-спектрометры, ЯМР-эксперименты и параметры их измерения перечислены в таблице 7.1. Для подавления остаточных сигналов растворителя в гомоядерных ^{1}H экспериментах использовали методы WATERGATE [517], FLIP-BACK [518] и EXCITATION SCULPTING [519]. Использовали как селективные биноминальные последовательности, так и амплитудно-модулированные импульсы на частоте сигналов растворителя (1/2 мс для 90/180º импульса, форма Sin(x)). В гетероядерных экспериментах (^{13}C, ^{15}N) с детекцией по протонам (^{1}H) подавление остаточных сигналов растворителя

осуществляли с помощью градиентного эха для выбора путей передачи намагниченности [31,487,488].

В метаноле химические сдвиги ^{1}H измеряли относительно остаточного CD_2H сигнала растворителя (3.31 мд). В водных образцах химические сдвиги ^{1}H измеряли относительно остаточного сигнала протонов воды, химический сдвиг которого составляет 4,75 м.д. при 30°C. Химические сдвиги ядер ^{15}N и ^{13}C были вычислены с использованием соответствующих гиромагнитных соотношений [515]. Значения индексов химических сдвигов (CSI) ядер $^{1}H^{\alpha}$, $^{13}C^{\alpha}$, $^{13}C'$, $^{13}C^{\beta}$ и анализ вторичной структуры МП и МБ проводили по методике изложенной в [464].

Отнесение сигналов основной и боковых цепей МБ и МП проводили в программах XEASY [520] и CARA [521]. Для немеченых и ^{15}N-меченых образцов отнесение сигналов ядер ^{1}H (^{1}H и ^{15}N) проводили по стандартной методике [23] на основании совместного анализа 2D TOCSY, DQF-COSY и NOESY или 3D ^{15}N-TOCSY и ^{15}N-NOESY спектров. Отнесение сигналов ^{13}C на натуральном содержании этого изотопа проводили, используя ^{13}C-HSQC спектры и известное (предполагаемое) отнесение сигналов ядер ^{1}H. Для образцов, содержащих изотопные метки ^{13}C,^{15}N и ^{2}H,^{13}C,^{15}N, отнесение сигналов основной цепи проводили согласно методике, изложенной в [31], используя комбинацию 3D спектров тройного резонанса (HCN) HNCO/HN(CA)CO, HNCA/HN(CO)CA и HNCACB/CBCACONH. Кроме того, использовали данные о последовательных контактах, полученные из 3D ^{15}N-NOESY спектров. Отнесение сигналов боковых цепей осуществляли с использованием 3D H(C)CH-TOCSY и 3D ^{13}C-NOESY спектров. При исследовании ПЧД в некоторых случаях использовали 3D эксперименты тройного резонанса (HCN), основанные на TROSY.

7.4.3 Измерение КССВ, стереоспецифическое отнесение прохиральных протонов и ограничения на торсионные углы.

7.4.3.1 Угол φ основной цепи КССВ $^{3}J_{H}{}^{N}{}_{H}{}^{\alpha}$, $^{3}J_{HNC}$, $^{3}J_{HNC}{}^{\beta}$ и $^{3}J_{H}{}^{\alpha}{}_{C}$

Для немеченых образцов гомоядерные константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) $^{3}J_{H}{}^{N}{}_{H}{}^{\alpha}$ измеряли либо по 1D спектрам, либо по 1D срезам 2D NOESY/TOCSY спектров путем нелинейной аппроксимации формы линий. Каждый срез приближали суммой двух Лоренцевых линий в программе Mathematica (Wolfram research). Для ^{15}N-меченых образцов гомоядерные КССВ $^{3}J_{H}{}^{N}{}_{H}{}^{\alpha}$ количественно измеряли, используя 3D HNHA эксперимент [356].

Для измерения КССВ $^{3}J_{H}{}^{N}{}_{H}{}^{\alpha}$ в комплексе (димер Ar2/мицелла DPC), имеющем большую массу, был разработан новый количественный подход, основанный на амплитудно-модулированных ^{1}H,^{15}N-корреляционных спектрах [373]. Для этого в первую INEPT последовательность эксперимента TROSY был вставлен специальный элемент для

эволюции намагниченности по $^{3}J_{H}{}^{N}{}_{H}{}^{\alpha}$. Селективную инверсию намагниченности ядер $^{1}H^{\alpha}$ осуществляли с помощью двух амплитудно-модулированных импульсов Re-Burp [522] (1.8 мс). Изменение положения этих импульсов позволило измерить два TROSY спектра с эволюцией по $^{3}J_{H}{}^{N}{}_{H}{}^{\alpha}$ и без нее. Значение КССВ было рассчитано по формуле:

$$I_m / I_d = \cos(\pi \cdot J \cdot 2\tau), \qquad \text{(Ур. 7.1)}$$

где 2τ – время эволюции КССВ (36 мс), а Im и Id – интенсивность сигнала HN-группы в спектре с эволюцией КССВ и без нее, соответственно. Для учета селективной T1 релаксации H^{α} протонов (spin-flips) в сравнительно большом комплексе (димер пептида/мицелла детергента) полученные значения КССВ были шкалированы вверх на 20%.

Измерение КССВ $^{3}J_{HNH}{}^{\alpha}$, $^{3}J_{HNC}$, $^{3}J_{HNC}{}^{\beta}$ и $^{3}J_{H}{}^{\alpha}{}_{C}$ для образцов $^{13}C,^{15}N$-Aam-I в метаноле и бицеллах DMPC/DHPC проводили с помощью 2D/3D экспериментов тройного резонанса типа E.COSY [471].

Ограничения на угол φ основной цепи были рассчитаны из значений КССВ и ограничений на межпротонные расстояния с использованием соответствующих уравнений Карплюса [471].

7.4.3.2 Угол ψ основной цепи КССВ $^{3}J_{H}{}^{\alpha}{}_{N}$, $^{1}J_{NC}{}^{\alpha}$ и $^{2}J_{NC}{}^{\alpha}$

В образцах ^{15}N-меченых пептидов гетероядерные константы $^{3}J_{NH}{}^{\alpha}$ измеряли либо по относительному сдвигу HN-Hα кросс-пиков в NOESY спектрах, снятых без развязки от ^{15}N [523], либо используя количественный эксперимент 3D HNHB [356]. Для образца $^{13}C,^{15}N$-Aam-I в метаноле геминальные и вицинальные КССВ $^{1}J_{NC}{}^{\alpha}$ и $^{2}J_{NC}{}^{\alpha}$ измеряли по 1D срезам 2D ^{15}N-HSQC спектров, накопленных без развязки от $^{13}C^{\alpha}$ и с применением методики «шкалирования КССВ» (J-multiplication) по направлению t1 [524]. Расщепление линий, обусловленное КССВ, увеличивали в 4 раза. Точные значения КССВ определяли, приближая каждый срез суммой нескольких Лоренцевых линий в программе Mathematica (Wolfram research).

Ограничения на угол ψ основной цепи были рассчитаны из значений КССВ и ограничений на межпротонные расстояния с использованием соответствующих уравнений Карплюса [472,473][471] .

7.4.3.3 Углы χ боковых цепей, КССВ $^{3}J_{H}{}^{\alpha}{}_{N}$, $^{1}J_{NC}{}^{\alpha}$ и $^{2}J_{NC}{}^{\alpha}$, стереоспецифическое отнесение прохиральных протонов (групп)

В образцах, содержащих немеченые пептиды, гомоядерные КССВ $^{3}J_{H}{}^{\alpha}{}_{H}{}^{\beta}$ и $^{3}J_{H}{}^{\beta}{}_{H}{}^{\gamma}$ оценивали, анализируя мультиплеты в спектрах 2D DQF-COSY или COSY, измеренных в 100% D_2O. Для количественного измерения КССВ по DQF-COSY и COSY спектрам использовали программу ACME [525]. Для того, чтобы уменьшить ширину спектральных

линий измерение DQF-COSY спектров для образца, содержащего комплексы (димер Ar2/мицелла DPC), проводили при повышенной температуре (60ºC), используя обычный датчик тройного резонанса.

В образцах ^{15}N-меченых пептидов гетероядерные константы $^{3}J_{NH}^{\beta}$ измеряли либо по относительному сдвигу HN-Hβ кросс-пиков в NOESY спектрах, снятых без развязки от ^{15}N [523], либо используя количественный эксперимент 3D HNHB [356].

Для образца ^{13}C,^{15}N-Aam-I в метаноле КССВ $^{3}J_{HNC}^{\beta}$ остатков Aib/Iva количественно измеряли, используя амплитудно-модулированный ^{13}C-HSQC эксперимент с постоянным временем эволюции по ^{13}C (54 ms). Значения КССВ были рассчитаны из отношения интенсивностей C^{β}-H^{β} кросс-пиков в спектрах, измеренных с и без селективной развязки от HN протонов [356].

Для количественной оценки значений КССВ $^{3}J_{C'H}^{\beta}$ в образце KB1 на натуральном содержании изотопа ^{13}C (3.6 мМ, D_2O, без добавления детергента) был применен оригинальный количественный подход, основанный на амплитудно-модулированном фазочувствительном, рефокусированном ^{13}C-HMQC эксперименте, накопленном с использованием селективных ^{13}CO импульсов и оптимизированном для передачи намагниченности через небольшие (по амплитуде) КССВ J_{HC} (были использованы две задержки на эволюцию J_{HC} равные 40 мс). В этом спектре измеряли интенсивности кросс-пиков ^{13}C'-$^{1}H^{\beta}(^{12}C^{\beta})$. Для сравнения были использованы интенсивности $H^{\beta}(^{12}C^{\beta})$-$H^{\beta}(^{12}C^{\beta})$ кросс-пиков, наблюдаемых в гомоядерном спектре NOESY (τ_m 200 мс), измеренном с дополнительной спин-эхо последовательностью (общая длина 80 мс). Значение КССВ рассчитывали по формуле 7.1 (2τ = 80 мс) с учетом калибровочного коэффициента.

Ограничения на углы χ боковых цепей были рассчитаны из значений КССВ и ограничений на межпротонные расстояния с использованием соответствующего уравнения Карплюса [526].

Стереоспецифическое отнесение прохиральных протонов (H^{α} протоны Gly, $H^{\beta}/H^{\gamma}/H^{\delta}$ метиленовые протоны и метильные группы остатков Val/Leu) было проведено на основании измеренных значений КССВ и наблюдаемых ЯЭО–контактов. Стереоспецифическое отнесение метильных групп остатков Aib проводили по NOESY спектрам в ходе процесса расчета пространственной структуры (см. п. 7.4.5).

7.4.4 Анализ системы водородных связей

7.4.4.1 Идентификация доноров внутримолекулярных водородных связей

Для идентификации доноров внутримолекулярных водородных связей использовали следующие данные: (1) скорость обмена амидных протонов на дейтерий растворителя, (2) скорость обмена амидных протонов с протонами воды и (3) температурные коэффициенты амидных протонов.

Для измерения обмена амидных протонов на дейтерий растворителя образцы МП (в некоторых случаях в комплексе с мицеллами / бицеллами) лиофильно высушивали и растворяли в дейтерированном растворителе (D_2O, CD_3OD). Скорости обмена оценивали по серии 1D или 2D NOESY/TOCSY спектров (для немеченых МП), либо по серии 2D ^{15}N-HSQC спектров (для ^{15}N-меченых МП), снятых сразу после растворения. Времена полуобмена вычисляли путем вписывания экспоненты в зависимость интенсивности ЯМР-сигнала HN-протона от времени.

Для образцов, содержащих ^{15}N-меченые МП, амидные протоны, быстро обменивающиеся с протонами растворителя, идентифицировали с помощью эксперимента CLEANEX-PM [527] (τ_m = 20 мс). Для образцов ^{2}H,^{13}C,^{15}N-меченого ПЧД с этой целью анализировали кросс-пики ЯЭО между HN протонами ПЧД и протонами воды в 3D ^{15}N-NOESY спектрах (см. п. 7.6.2).

Температурные коэффициенты амидных протонов ($\Delta\delta^1H^N/\Delta T$) измеряли по 1D или 2D NOESY/TOCSY спектрам (для немеченых МП) либо по 2D ^{15}N-HSQC спектрам (для ^{15}N-меченых МП), снятым в диапазоне температур от 5˚C (20˚C для криогенно охлаждаемых датчиков) до 50˚C. Для Aam-I и Zrv-IIB температурные коэффициенты CO- и HN-групп измеряли из набора HNCO и HN(CA)CO спектров, накопленных в диапазоне температур 10-50˚C.

При анализе полученных данных использовали предположение о том, что HN протоны, медленно обменивающиеся с растворителем и демонстрирующие значения $\Delta\delta^1H^N/\Delta T$, по амплитуде меньшие чем $4.5\cdot10^{-3}$ м.д/˚C, могут участвовать в формировании внутримолекулярных водородных связей [451].

7.4.4.2 Исследование системы водородных связей по данным КССВ

Для образцов ^{13}C,^{15}N-меченых Aam-I и Zrv-IIB в метаноле систему водородных связей определяли напрямую, используя КССВ $^{3h}J_{NC'}$ (через водородные связи). Для идентификации водородных связей и количественного измерения $^{3h}J_{NC'}$ использовали дальний 2D HNCO эксперимент при двух температурах 32 и 42ºC [452]. Задержки на эволюцию КССВ $^{3h}J_{NC'}$ (τ_J) составляли 133 или 139.4 мс. Для сравнения был накоплен специальный сравнительный 2D HNCO эксперимент. Значение КССВ рассчитывали по формуле, которая в отличие от 7.1 включала зависимость Sin ($\pi\cdot J\cdot\tau$) [452]. Общее время накопления дальнего и сравнительного эксперимента составило 66 и 1 час, соответственно.

Для образцов ^{13}C,^{15}N-меченых Aam-I и Zrv-IIB наличие сильных водородных связей с растворителем также выявляли по прямым КССВ $^{1}J_{NC'}$ (через пептидную связь) по методу, предложенному в [460]. Значения $^{1}J_{NC'}$ измеряли по 1D срезам 2D ^{15}N-HSQC спектров, накопленных без развязки от ^{13}C' и с применением методики «шкалирования

КССВ» (J-multiplication) по направлению t1 [524]. Расщепление линий, обусловленное КССВ, увеличивали в 2 раза. Точные значения КССВ определяли, приближая каждый срез суммой нескольких Лоренцевых линий в программе Mathematica (Wolfram research).

7.4.5 Расчет пространственной структуры

Расчет пространственной структуры по данным ЯМР был осуществлен в программах DYANA [528] или CYANA [34], используя метод молекулярной динамики в пространстве торсионных углов и алгоритм “моделируемого отжига” (simulated annealing). Ограничения на межпротонные расстояния были вычислены из объемов кросс-пиков ЯЭО по калибровке “$1/r^6$”. Времена смешивания (τ_m) в спектрах NOESY/ROESY, использованных для измерения объемов кросс-пиков ЯЭО, приведены в таблице 7.1. В некоторых случаях данные, полученные из перекрытых ЯЭО кросс-пиков, включались в расчет, используя так называемые «неоднозначные» ограничения на расстояния (ambiguous distance restraints, программа CYANA). Стереоспецифическое отнесение для прохиральных протонов (групп) и ограничения на торсионные углы основной и боковых цепей были получены, как описано в п. 7.4.3. В случае неизвестного стереоспецифического отнесения использовали ограничения на псевдоатомы (программа DYANA) или «плавающее» стереоспецифическое отнесение (floating assignment, программа CYANA).

Для пептаиболов Aam-I и Zrv-IIB стереоспецифическое отнесение метильных групп остатков Aib было проведено на промежуточном этапе расчета структуры в результате нескольких последовательных итераций. На каждом этапе ограничения на расстояния для различно отнесенных метильных групп проверяли на согласование с другими ограничениями, и при наличии нарушений метильные группы одного остатка Aib переотносились.

Доноры водородных связей были определены, как описано в п. 7.4.4.1. Акцепторы водородных связей были найдены при анализе предварительно рассчитанных структур. На водородные связи были наложены дополнительные (верхние и нижние) ограничения на расстояния (1.8 Å ≤ dHNO ≤ 2.3 Å и 2.8 Å ≤ dNO ≤ 3.3 Å).

Системы дисульфидных связей в пептидах KB1, KB7 и аурелин, а также системы тиоэфирных связей в пептидах Lchα и Lchβ были определены на основании анализа контактов ЯЭО и подтверждены в ходе предварительных этапов расчета пространственной структуры.

В некоторых случаях на последнем этапе расчета структуры для пар протонов, находящихся друг от друга на расстоянии, меньшем 3.0 Å и в то же время не дающих кросс-пика в спектрах NOESY, вводили дополнительные нижние ограничения на расстояния величиной 3.0 Å.

7.5 Исследование динамических характеристик МБ и МП методами ЯМР-спектроскопии

7.5.1 Измерение и анализ данных ^{15}N релаксации

Для измерения скоростей продольной и поперечной релаксации R_1 и R_2 применяли псевдо-3D эксперименты, представляющие собой модифицированные варианты 2D ^{1}H,^{15}N-корреляционного спектра HSQC [50] с дополнительным «релаксационным» измерением [50]. В полученных спектрах измеряли интенсивности пиков. Для определения R_1 и R_2 полученные значения интенсивностей с помощью нелинейной регрессии приближали экспоненциальной функцией. Для измерения величины гетероядерного ЯЭО ^{15}N-{^{1}H} также применяли эксперименты, основанные на 2D HSQC [50]. В режиме смешанного накопления (interleave) было получено два ^{1}H,^{15}N-корреляционных спектра – с преднасыщением протонов и без. Величину гетероядерного ЯЭО получали как отношение интенсивности пика в спектре с преднасыщением ^{1}H и без преднасыщения. Параметры экспериментов (температура, напряженность магнитного поля ЯМР-спектрометра) приведены в основном тексте работы.

Из отношения измеренных значений R_1 и R_2 оценивали эффективное время корреляции вращательных движений, используя следующую формулу [529]:

$$\tau_R = \frac{1}{\omega_N}\sqrt{\frac{3}{2(1+a)}\left(\frac{R_2}{R_1}-\frac{7}{6}(1+a)\right)}, \qquad \text{(Ур. 7.2)}$$

где ω_N – резонансная частота ядер азота, a=0.02.

По полученным данным качественно определяли характеристики динамической подвижности основной цепи МП и МБ. Остатки, для которых величина гетероядерного ЯЭО была ниже некого порогового значения 0.6-0.7 (точное значение зависело от размера (τ_R) изучаемой системы), относили к участкам, совершающим «быстрые» движения с характерными временами порядка пикосекунд-наносекунд. Для выявления конформационных флуктуаций в диапазоне микросекунд-миллисекунд использовали произведение $R_1 \cdot R_2$ [502]. Остатки, для которых произведение $R_1 \cdot R_2$ превышало некое пороговое значение (величина зависит от напряженности магнитного поля и равна 20 с$^{-2}$ для спектрометра с частотой по ^{1}H 600 МГц), относили к участкам, совершающим «медленные» конформационные флуктуации.

Количественный анализ данных ^{15}N релаксации проводили с использованием так называемого «модель-независимого» (model-free) подхода [370]. Расчеты осуществляли в программах TENSOR [530], DASHA [486] и FAST-Modelfree [369]. Использовали модели изотропной и анизотропной вращательной диффузии.

7.5.1.1 Расчет конформационной энтропии

Изменение конформационной энтропии (ΔS) основной цепи ареницина-2 и, соответственно, величину энтропийного вклада в свободную энергию (TΔS) перехода пептида из водной среды в мицеллосвязанное состояние рассчитывали из параметров порядка быстрых суб-наносекундных движений (S^2), полученных в ходе модель-независимого анализа данных ^{15}N релаксации. Изменение конформационной энтропии рассчитывали по формуле 7.3, предложенной в [374].

$$\Delta S = \sum_i Ln \frac{3 - \sqrt{1 + 8\sqrt{S_i^2(A)}}}{3 - \sqrt{1 + 8\sqrt{S_i^2(B)}}}, \qquad \text{(Ур. 7.3)}$$

где S^2_i (A/B) – параметры порядка суб-наносекундных движений для HN группы остатка *i* пептида в состоянии A и B.

7.5.2 Измерение и анализ параметров диффузии и размера частиц методами ЯМР-спектроскопии

7.5.2.1 Измерение коэффициента трансляционной диффузии D_T

Коэффициент трансляционной диффузии (D_T) МП/МБ в водном растворе и в комплексе с мицеллами и ЛБН измеряли методом ЯМР с использованием эксперимента имитированного спинового эха с варьированием мощности градиентных импульсов [531] по методике DOSY [532]. В каждом эксперименте получали серию из 24-х 1D ^1H-спектров, соответствующих различной интенсивности градиентных импульсов (*g*) от 0.6 до 32 гаусс/см. Задержки на диффузию (Δ) составляли от 100 до 300 мс, длина градиентного импульса (δ) — 2 мс. В полученных спектрах для пиков, значительно превышающих уровень шума из амидного и ароматического региона спектра белка, а также для сигналов липидов/детергентов определяли зависимость интенсивности (*I*) от интенсивности градиентных импульсов (*g*). Обработку данных производили в программе TOPSPIN (Bruker). Полученные зависимости *I*(*g*) приближали функцией:

$$I = I_0 e^{-D_T \gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)} \qquad \text{(Ур. 7.4)}$$

Полученное значение коэффициента диффузии было скорректировано на эффект, вызванный тем, что мицеллы занимают некоторую долю объема раствора, ограничивая тем самым собственную трансляционную диффузию, а также диффузию других частиц в растворе [533]

$$D_T(\Phi) \approx D_T^0 \cdot (1\text{-}3.6 \cdot \Phi), \qquad \text{(Ур. 7.5)}$$

, где $D_T(\Phi)$ измеренный коэффициент диффузии, D_T^0 — истинный коэффициент диффузии, соответствующий диффузии при концентрации частиц, стремящейся к нулю, Φ — доля объема, занятая диффундирующими частицами. Значение Φ было рассчитано

как общий объем растворенных детергентов и белка к объему образца, в предположении, что их плотность ~1 г/см^3. В некоторых случаях значения D_T^0 рассчитывали путем экстраполяции экспериментально измеренной зависимости $D_T(\Phi)$ на нулевую концентрацию детергента.

Из полученного коэффициента трансляционной диффузии D_T^0 рассчитывали гидродинамический радиус частиц (радиус Стокса, R_H), используя уравнение Стокса-Эйнштейна и предполагая сферическую форму частиц:

$$D_T^0 = \frac{kT}{6\pi\eta \cdot R_H}, \qquad \text{(Ур. 7.6)}$$

где η — вязкость раствора, T — температура и k — константа Больцмана.

7.5.2.2 Измерение эффективного времени корреляции вращательных движений τ_R,

Скорости процесса кросс-корреляции между диполь-дипольной релаксацией и релаксацией, возникающей из-за анизотропии химического сдвига ядра ^{15}N (η_{XY}), измеряли на высокопольных спектрометрах (AVANCE-III-800 или Avance-700), используя амплитудно-модулированные 1D или 2D ^{1}H,^{15}N-TROSY-спектры [534]. Скорость процесса кросс-корреляции рассчитывали по формуле

$$I_m / I_d = \exp(-\eta_{XY} 2T), \qquad \text{(Ур. 7.7}$$

, где T – время эволюции (11 мс), а Im и Id – интенсивность сигнала HN-группы в спектре с эволюцией по TROSY и anti-TROSY пути, соответственно. Эффективное время корреляции вращательных движений (τ_R) для МП/МБ в комплексе с мицеллами и ЛБН рассчитывали по упрощенной формуле [534], пренебрегая величиной спектральной плотности на частоте резонанса ^{15}N (J_N) по сравнению со спектральной плотностью на нулевой частоте (J_0).

$$\eta_{XY} \approx 1.4\rho\sigma\tau_R,\ \rho = \frac{(\mu_0/4\pi)\gamma_H\gamma_N h}{4\pi\cdot(r_{HN})^3},\ \sigma = \gamma_N B_0 \delta_N / 3, \qquad \text{(Ур. 7.8)}$$

где γ_N и γ_H – гиромагнитные отношения ядер ^{15}N и ^{1}H, соответственно, h –постоянная Планка, r_{NH} – межъядерное расстояние ^{15}N-^{1}H, B0 – внешнее поле и δ_N – анизотропия тензора химического сдвига ядра ^{15}N (CSA).

В некоторых случаях значение τ_R получали из анализа скоростей релаксации R_1 и R_2 ядер ^{15}N (ур. 7.2) либо в результате обработки всего набора релаксационных данных в рамках модель-независимого подхода. Гидродинамический радиус (R_H) оценивали из полученных значений τ_R, используя уравнение Стокса:

$$\frac{1}{6\tau_R} = \frac{kT}{8\pi\eta\cdot(R_H)^3}, \qquad \text{(Ур. 7.9)}$$

7.5.2.3 Оценка масс комплексов МП и МБ с частицами мембраномоделирующих сред

Массу комплексов МП/мицелла и МБ/мицелла оценивали из рассчитанных значений R_H, предполагая, что комплексы имеют сферическую форму и их плотность совпадает с плотностью мицеллы DPC. Считали, что мицелла DPC состоит из 55 молекул детергента [357] массой ~ 350 Да каждая и имеет R_H ~ 23.1 Å.

7.6 Измерение и анализ эффекта парамагнитного усиления релаксации и межмолекулярного ЯЭО

7.6.1 Определение топологии взаимодействия МБ и МП с частицами мембраномоделирующих сред на основании данных PRE

Для исследования положения различных пептидов и ПЧД относительно поверхности мицелл, бицелл и нанодисков использовали эффект парамагнитного усиления релаксации (PRE). Для этого в образцы, содержащие комплексы МП(МВ)/мицелла(бицелла/нанодиск), добавляли либо липофильные спиновые метки (5-доксилстеариновой кислоты или 16-доксилстеариновой кислоты (Sigma, USA)), парамагнитная группа которых локализована в разных областях гидрофобного региона мицеллы/бислоя, либо парамагнитные ионы Mn^{2+}, имеющие сродство к фосфатным группам головок липидов и детергентов. Спиновые метки добавляли в виде сухих навесок либо в небольшом количестве метанола до конечного соотношения метка/детергент(липид) 1:60 -1:100, то есть примерно в расчете одна метка на мицеллу, или две метки на нанодиск. Поскольку 5-доксилстеариновая кислота и 16-доксилстеариновая кислота водонерастворимы, предполагалось, что все спиновые метки связаны с мицеллами, бицеллами или фосфолипидным бислоем в составе нанодисков. Ионы Mn^{2+} добавляли в виде концентрированного раствора солей $MnCl_2$, или $MnSO_4$ до конечного соотношения катион/детергент(липид) ~ 1:10.

Величину эффекта PRE измеряли либо качественно по ослаблению интенсивности сигналов в присутствии парамагнитных меток/ионов, либо используя приближенный количественный метод, описанный в работе [48]. В случае немеченых пептидов ослабление интенсивности сигналов наблюдали в 2D NOESY или TOCSY спектрах, используя кросс-пики, соответствующие пространственно сближенным парам протонов, например внутриостаточные $HN\text{-}H^{\alpha}$ кросс-пики. В случае ^{15}N-меченых молекул ослабление интенсивности $^{15}N\text{-}^{1}H$ кросс-пиков наблюдали в 2D $^{1}H,^{15}N$ HSQC или TROSY спектрах. Относительное ослабление сигнала для каждого остатка (b_i) рассчитывали по формуле:

$$b_i = (1 - \frac{I_i^{sl}}{I_i^0}) \times 100\% , \qquad \text{(Ур. 7.10)}$$

где I^0 и I^{sl} интенсивности сигналов без добавления и с добавлением спин-метки, соответственно. Приближенный количественный метод [48] использовали только для ^{15}N-меченых молекул, в результате анализа $^1H,^{15}N$ HSQC или TROSY спектров для каждого остатка получали значение удельного эффекта PRE (ε_i), имеющее размерность ($Гц \cdot М^{-1}$). Следует отметить, что несмотря на использование в обоих методах интенсивностей $^1H,^{15}N$ кросс-пиков, полученные значения b_i и ε_i в основном отражают величину эффекта PRE для HN протона. Это связано с тем, что гиромагнитное отношение ядра ^1H в 10 раз превышает соотношение для ядра ^{15}N, и ядро протона в 100 сильнее взаимодействует с магнитным полем, создаваемым меткой, чем ядро атома азота (см. Ур. 7.11).

7.6.1.1 Моделирование комплексов пептид/ мицелла

Для построения моделей комплексов МП/мицелла (бицелла) на основе данных PRE была разработана следующая оригинальная методика.

1. Используя условно выбранные пороговые значения для величин b_i или ε_i, атомы молекулы МП (по одному атому или атомной паре на остаток) разделяли на две категории: атомы, лежащие внутри сферического региона с центром, совпадающим с центром мицеллы (бицеллы), и атомы, лежащие вне этого региона.
2. Используя процедуру поиска минимума нелинейной функции в программе Mathematica (Wolfram research), находили оптимальное положение центра этого сферического региона (в декартовых координатах) и его радиус (всего 4 вариабельных параметра) относительно молекулы МП, представленной в виде набора фиксированных декартовых координат атомов с измеренными значениями b_i или ε_i.

Предполагали, что полученные координаты сферического региона соответствуют центру мицеллы (бицеллы). Полученное значение радиуса сравнивали со значением R_H комплекса МП/мицелла, измеренным из релаксационных или диффузионных данных, или с известным из литературы радиусом мицеллы (бицеллы) для использованных детергентов.

7.6.2 Определение топологии взаимодействия МБ и МП с частицами мембраномоделирующих сред на основании межмолекулярного ЯЭО

Межмолекулярный ЯЭО между HN протонами молекул МП(МБ) и протонами воды или протонами липидов измеряли, используя варианты белков и пептидов с дейтерированными боковыми цепями. Для наблюдения межмолекулярного ЯЭО в работе использовали два метода.

Для исследования топологии взаимодействия $^2H,^{15}N$-меченого варианта токсина NTII с ЛБН в 2D $^{15}N,^1H$-TROSY-спектрах наблюдали изменения интенсивностей (ослабление) кросс-пиков пептида при преднасыщении холиновой группы липида POPC. Сигнал $(CH_3)_3N^+$-группы (химический сдвиг – 3.2 м.д.) насыщали на мощности 125 Гц в

течение 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 и 3.0 с, используя задержку на релаксацию, равную 3 с. Ослабление количественно описывали, используя Ур. 7.10.

Для исследования топологии взаимодействия $^{2}H,^{13}C,^{15}N$-меченого варианта ПЧД с мицеллами d38-DPC/LDAO и LPPG в 3D ^{15}N-NOESY спектрах, снятых с большим временем смешивания (τ_m = 150 мс), наблюдали ЯЭО контакты между HN протонами ПЧД и протонами воды (химический сдвиг – 4.63 м.д. при 42ºC), а также между HN протонами ПЧД и метильными группами (CH_3) недейтерированных детергентов LDAO и LPPG. (химический сдвиг – 0.8 м.д.).

7.6.3 Исследование спин-меченых аналогов зервамицина в метаноле.

7.6.3.1 Приготовление образцов и ЯМР-спектроскопия.

Пептиды растворяли в 0.15 мл CD_3OH (использовали толстостенные ампулы) в различных концентрациях: Zrv-IIB – в диапазоне 0.1 – 18.1 мМ; Zrv-T16 – в диапазоне 0.05 – 3.5 мМ; Zrv-T0 – в единственной концентрации 0.5 мМ. Параметры экспериментов приведены в таблице 7.1. Разница химических сдвигов ^{1}HN между Zrv-IIB и спин-мечеными аналогами была в пределах 0.02 мд, за исключением ^{1}HN Iva4 и Aib7, для которых разница составила 0.09 мд и 0.06 мд, соответственно. КССВ $^{3}J_{H}{}^{N}{}_{H}{}^{\alpha}$ также совпадали во всех трех пептидах в пределах точности измерений. Это указывало на сохранение пространственной структуры молекул при введении спиновых меток и замены Iva/Aib4. Однако стоить отметить, что в пептидах Zrv-T0 и Zrv-T16 первый и последний виток спирали (соответственно) были не наблюдаемы из-за парамагнитного уширения, вызванного спиновыми метками.

Полуширины, КССВ $^{3}J_{H}{}^{N}{}_{H}{}^{\alpha}$, интенсивности и точные положения сигналов в амидной и ароматической области 1D ^{1}H ЯМР-спектра были определены путем нелинейного вписывания спектров в программе Mathematica (Wolfram research) с учетом неэкспоненциальной взвешивающей функции. Скорости продольной релаксации (R_1) для амидных протонов были измерены при помощи метода инверсии-восстановления (inversion recovery). Скорости поперечной релаксации (R_2) были вычислены из полуширин линий в спектре (Ур. 7.13).

7.6.3.2 Измерение расстояний: протон – спиновая метка.

Факторы внутримолекулярного усиления релаксации (R_1^{E} и R_2^{E}) были вычислены как разница между скоростями релаксации в спин-меченых пептидах и Zrv-IIB. Для выявления эффекта межмолекулярного усиления релаксации скорости релаксации R_1 и R_2 были линейно экстраполированы на нулевую концентрацию пептидов. Скорости релаксации для пептида Zrv-T0 были измерены при одной концентрации (0.5 мМ), при которой межмолекулярным вкладом в релаксацию можно пренебречь. Расчеты

выполнялись в приближении, что все три пептида имеют одинаковые диамагнитные вклады в релаксацию HN-протонов (за исключением HN Iva[4] и Aib[7]).

Расстояния между нитрооксидом спиновой метки и HN протонами (r) и эффективное время корреляции для реориентации векторов протон-нитрооксид (τ_C) были рассчитаны, используя упрощенную форму уравнений Соломона-Бломбергена [535], пренебрегая всеми членами, включающими в себя Ларморову частоту для неспаренного электрона.

$$R_1^E = \frac{2}{15}\frac{\gamma_I^2 g^2 S(S+1)\beta^2}{r^6}\frac{3\tau_C}{1+\omega_I^2\tau_C^2}, \qquad \text{(Ур. 7.11.1)}$$

$$R_2^E = \frac{1}{15}\frac{\gamma_I^2 g^2 S(S+1)\beta^2}{r^6}\left(4\tau_C + \frac{3\tau_C}{1+\omega_I^2\tau_C^2}\right), \qquad \text{(Ур. 7.11.2)}$$

где γ_I – гиромагнитное отношение для протона, S – полный спин электрона (1/2), g – фактор Ланде (2), β – магнетон Бора.

Факторы межмолекулярного усиления релаксации ($R_1^E{}_{Inter}$) были вычислены из концентрационных зависимостей скоростей релаксации R_1 в Zrv-T16, используя линейное приближение для начальных точек. Межмолекулярное усиление релаксации рассматривалось либо как обусловленное трансляционной диффузией, либо как обусловленное вращательной диффузией [535]. Используя параметры для Zrv-IIB в метаноле ($D_T \sim 3.96 \times 10^{-10}$ м$^2\cdot$с$^{-1}$ и время вращательной корреляции (τ_R) ~ 0.75 нс) было обнаружено, что межмолекулярная парамагнитная релаксация для Zrv-T16 в модели вращательной диффузии имеет в два раза большую эффективность, чем в модели трансляционной диффузии. Таким образом, для дальнейших расчетов и вычисления расстояний наибольшего сближения (d_0) между нитрооксидом и протоном из разных молекул была использована модель релаксации, вызванной вращательной диффузией с τ_R = 0.75 нс.

$$R_1^{E\ Inter} = \frac{8\pi}{15}\frac{\gamma_I^2 g^2 S(S+1)\beta^2 N_S}{d_0^3}\frac{\tau_R}{1+\omega_I^2\tau_R^2}; \qquad \text{(Ур. 7.12),}$$

где N_S – число парамагнитных радикалов в единичном объеме (концентрация спин-меченого пептида).

7.6.4 Определение структуры комплексов KB1/DPC и KB7/DPC с ионами Mn^{2+}

Образцы комплексов KB1/7 с мицеллами DPC (2.0/0.6 мМ, D:P = 60:1, 40ºC, pH 5.0) титровали раствором $MnCl_2$. Полуширины, КССВ $^3J_H{}^N{}_H{}^\alpha$, интенсивности и точные положения неперекрывающихся сигналов в амидной области 1D ^{1}H ЯМР-спектра для нескольких концентраций Mn^{2+} (от 0.03 мМ до 7.2/5.0 мМ, KB1/7) были определены путем

нелинейного вписывания спектров в программе Mathematica. Скорости поперечной релаксации (R_2) HN-протонов были вычислены из полуширин линий в спектрах (Ур. 7.13). Скорости продольной релаксации (R_1) для неперекрывающихся амидных протонов были измерены при помощи метода инверсии-восстановления (только для пептида KB7).

$$R_2 = \pi \cdot \Delta\delta \qquad \text{(Ур. 7.13)}$$

Эффект PRE, вызываемый ионами Mn^{2+}, приводил к увеличению наблюдаемых значений R_1 и R_2 при увеличении концентрации Mn^{2+} в образце. В предельном случае быстрого обмена ионов Mn^{2+} между связанным и свободным состоянием значения $R_{1,2}$ для протонов подчиняются следующей формуле:

$$R_{1,2} = R_{1,2}^0 + (R_{1,2}^D + R_{1,2}^H)[Mn^{2+}]_{free} + \frac{R_{1,2}^B[KBx/DPC \cdot Mn^{2+}]}{[KBx/DPC]_0} \qquad \text{(Ур. 7.14),}$$

где $R_{1,2}^0$ – скорость релаксации протона в растворе, не содержащем парамагнитных ионов, $R_{1,2}^D$, $R_{1,2}^H$ и $R_{1,2}^B$ – факторы межмолекулярного усиления релаксации, вызванного ионами Mn^{2+}, свободно диффундирующими в растворе, ионами, связанными с фосфатными группами детергента (DPC), и ионами, специфически связанными с пептидом, соответственно. Концентрация специфически связанных ионов Mn^{2+} (концентрация комплексов $KBx/DPC \cdot Mn^{2+}$) и концентрация несвязанных с KBx ионов ($[Mn^{2+}]_{free}$) выражаются через следующие соотношения:

$$K_d = \frac{[KBx/DPC]_{free} \cdot [Mn^{2+}]_{free}}{[KBx/DPC \cdot Mn^{2+}]};\ [Mn^{2+}]_0 = [Mn^{2+}]_{free} + [KBx/DPC \cdot Mn^{2+}];$$

$$[KBx/DPC]_0 = [KBx/DPC]_{free} + [KBx/DPC \cdot Mn^{2+}]; \qquad \text{(Ур. 7.15),}$$

где, K_d – константа диссоциации комплекса $KBx/DPC \cdot Mn^{2+}$. При низкой концентрации Mn^{2+} ($[Mn^{2+}]_0 << K_d$) эти уравнения могут быть упрощены:

$$\frac{[KBx/DPC \cdot Mn^{2+}]}{[KBx/DPC]_0} \cong \frac{[Mn^{2+}]_0}{([KBx/DPC]_0 + K_d)}. \qquad \text{(Ур. 7.16)}$$

Оценка величины различных факторов межмолекулярного усиления релаксации ($R_{1,2}^D$, $R_{1,2}^H$ и $R_{1,2}^B$) с использованием уравнений Соломона-Бломбергена для диполь-дипольной релаксации и методов, изложенных в [358], показала, что величинами $R_{1,2}^D$ и $R_{1,2}^H$ по сравнению с $R_{1,2}^B$ можно пренебречь. Таким образом, при низкой концентрации Mn^{2+}, пренебрегая всеми членами, включающими в себя Ларморову частоту для неспаренного электрона, мы можем записать:

$$R_{1,2} = R_{1,2}^0 + \frac{[Mn^{2+}]_0}{([KBx/DPC]_0 + K_d)} R_{1,2}^B, \text{ или} \qquad \text{(Ур. 7.17)}$$

$$R_1 = R_1^0 + [Mn^{2+}]_0 \frac{A_1}{r^6}, \qquad \text{(Ур. 7.18.1)}$$

$$R_2 = R_2^0 + [\mathrm{Mn}^{2+}]_0 \frac{A_2}{r^6}. \qquad \text{(Ур. 7.18.2)}$$

где $R_{1,2}{}^B$ даются уравнениями 7.11, с учетом спина электронов иона Mn^{2+} (S = 5/2) и эффективного времени корреляции процесса парамагнитной релаксации τ_C, которое представимо в виде обратной суммы следующих времен: τ_M – время жизни связанного иона Mn^{2+}, τ_E – характерное время релаксации электронов Mn^{2+} и τ_R – эффективное время корреляции для реориентации вектора протон-Mn^{2+} (примерно равное общему времени вращательной корреляции комплекса KBx/DPC×Mn^{2+}).

$$\frac{1}{\tau_C} = \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{\tau_E} + \frac{1}{\tau_R} \qquad \text{(Ур. 7.19),}$$

Значение τ_C может быть рассчитано из экспериментально измеренных зависимостей скоростей R_1 и R_2 от концентрации Mn^{2+}:

$$2\omega_I \tau_C = \sqrt{\frac{6A_2}{A_1} - 7} \qquad \text{(Ур. 7.20).}$$

Координаты связанного катиона Mn^{2+} были определены с помощью процедуры поиска минимума нелинейной функции в программе Mathematica (Wolfram research). Значения, полученные из уравнений (7.19.1), подгоняли к экспериментальным релаксационным данным для нескольких HN протонов, используя декартовы координаты из рассчитанной структуры пептида. В процедуре минимизации было 4 вариабельных параметра: декартовы координаты катиона и A_1. Константу диссоциации комплекса KB7/DPC×Mn^{2+} (K_d) рассчитывали из полученного значения A_1 и значения τ_C, рассчитанного по ур. 7.20 (KB7). Для KB1 K_d оценивали, предполагая, что $\tau_C \approx \tau_R$ (14 нс).

7.6.5 Исследование спин-меченых вариантов ПЧД и их комплексов с токсином VsTx1

Для приготовления спин-меченых образцов ПЧД использовали мутантные варианты домена (немеченые или ^{15}N-меченые), содержащие искусственно введенные неспаренные остатки Cys в положениях 56, 112 или 140. Присоединение тиол-реактивных спиновых меток проводили по следующему протоколу:

1. Межмолекулярные дисульфидные связи в образцах ПЧД солюбилизированного в мицеллах DDM восстанавливали добавлением дитиотрейтола (ДТТ). После восстановления ДТТ отмывали с помощью гель-фильтрации на колонках PD10 (GE Healthcare, США).
2. К образцам восстановленного ПЧД добавляли 20-кратный избыток спиновой метки MTSL (Toronto research chemicals, Канада). Для приготовления «контрольных» образцов был использован ацетилированный аналог спиновой метки MTSL, не

содержащий неспаренный электрон. После инкубации в течение ночи избыток метки удаляли с помощью хроматографии на металлоаффинной смоле с одновременной заменой детергента на смесь DPC/LDAO либо LPPG.

Для качественного измерения величины эффекта PRE, используя формулу 7.10, сравнивали интенсивности кросс-пиков в спектрах ^{15}N-TROSY «парамагнитного» и «диамагнитного» образцов ПЧД. Относительное уменьшение амплитуды сигнала в спин-меченом образце (b_i) свидетельствовало о степени сближенности соответствующего амидного протона со спиновой меткой.

Расчет теоретических значений относительного ослабления сигнала для каждого остатка (b_i) был проведен по известной кристаллической структуре изолированного ПЧД (PDB 1ORS). В структуре домена измеряли расстояния между HN-протонами и C^{α} атомами остатков, замененных на остатки Cys и модифицированных тиол-реактивными спиновыми метками. По измеренным расстояниям, используя формулу 7.11.2, рассчитывали парамагнитный вклад в релаксацию (R_2^E). Расчеты проводили в предположении, что эффективное время корреляции реориентации векторов протон-нитрооксид (τ_C) совпадает с общим временем вращательной корреляции комплекса ПЧД/мицелла DPC/LDAO ($\tau_R \approx 18$ нс). Из полученных значений R_2^E, предполагая, что все HN-протоны имеют сравнимую скорость поперечной релаксации в «диамагнитном» образце (R_2^0), были рассчитаны значения параметров b_i.

Для исследования структуры комплекса ПЧД/VsTx1 использовали спин-меченые варианты домена, не содержащие изотопных меток и ^{15}N-меченый вариант токсина. Величину эффекта PRE также анализировали качественно (факторы b_i, уравнение 7.10) по ослаблению интенсивностей кросс-пиков VsTx1 в спектре ^{15}N-HSQC относительно интенсивности сигналов пептида в комплексе с ПЧД, не содержащим спиновых меток.

7.7 Определение энергетических параметров процессов образования комплексов и фолдинга МБ *in vitro*

7.7.1 Анализ изотерм связывания МП с частицами мембраномоделирующих сред

Изотермы связывания МП с частицами мембраномоделирующих сред измеряли в приближении быстрого и медленного обмена молекулы пептида между свободным и связанным состоянием. В первом случае наблюдали за изменением химических сдвигов молекулы пептида при увеличении концентрации детергента в образце. В приближении быстрого обмена наблюдаемый химический сдвиг сигнала (δ^{obs}) зависит от нескольких параметров: химического сдвига в свободном состоянии (δ^{free}), химического сдвига в

мицеллосвязанном состоянии (δ^{bound}) и от концентрации свободной ($[P]_{free}$) и связанной ($[P]_{bound}$) форм пептида.

$$\delta^{obs} = \frac{\delta^{free}[P]_{free} + \delta^{bound}[P]_{bound}}{[P]_0};\ [P]_0 = [P]_{free} + [P]_{bound} \qquad \text{(Ур. 7.21)}$$

В приближении медленного обмена молекул пептида между раствором и поверхностью липосом и нанодисков предполагали, что интегральные интенсивности в 1D ^{1}H-ЯМР-спектре пропорциональны равновесной концентрации пептида в растворе ($[P]_{free}$).

Полученные кривые связывания аппроксимировали либо уравнением равновесного распределения (Ур. 7.22), либо с помощью изотермы Ленгмюра (Ур. 7.23), учитывая разведение исходных образцов при титровании:

$$\frac{[P]_{bound}}{[ЛБН / Липид / Детергент]} = K_P \cdot [P]_{free} \quad , \qquad \text{(Ур. 7.22)}$$

$$Exp(\frac{\Delta G^0}{RT}) = \frac{1}{K_n} = \frac{[P]_{free} \cdot (n \cdot [ЛБН / Липид / Детергент] - [P]_{bound})}{[P]_{bound}}, \qquad \text{(Ур. 7.23),}$$

где [ЛБН/Липид/Детергент] – концентрация ЛБН (в предположении, что один нанодиск содержит две молекулы MSP) или концентрация липидов (в предположении, что один нанодиск содержит 150 молекул липида) или концентрация липидов во внешнем монослое везикул (0.6*[Липид]) или концентрация детергента в растворе, $[P]_{bound}$ – концентрация пептида, связанного с ЛБН, липосомами или мицеллами ($[P]_0 = [P]_{free} + [P]_{bound}$), K_p – коэффициент распределения, n – число сайтов связывания пептида на поверхности нанодиска (или $N = 1/n$ – число молекул липида/детергента, формирующих сайт связывания), K_n и ΔG^0 – константа и свободная энергия образования комплекса пептид–сайт связывания.

7.7.2 Анализ специфических и неспецифических взаимодействий в комплексе ПЧД/VsTx1

Для анализа взаимодействия токсина VSTx1 с ПЧД-KvAP в составе ЛБН использовали аналитическое решение следующих систем уравнений, включающих одновременное взаимодействие токсина с одним высокоаффинным сайтом (константа взаимодействия K_1) и одним или несколькими низкоаффинными сайтами (число сайтов N_2, константа взаимодействия K_2), располагающимися на молекуле домена. Предполагалось, что весь токсин связан с мембраной ЛБН, либо с ПЧД-KvAP в составе ЛБН.

$$\begin{cases} [VSTx1]_0 = [VSTx1]_{free} + [VSTx1]^1_{bound} + N_2 \cdot [VSTx1]^2_{bound} \\ [VSTx1]^1_{bound} = K_1 \cdot [VSTx1]_{free} \cdot (1 - [VSTx1]^1_{bound}) \\ [VSTx1]^2_{bound} = K_2 \cdot [VSTx1]_{free} \cdot (1 - [VSTx1]^2_{bound}) \end{cases} \quad \text{(Ур. 7.24)}$$

где $[VSTx1]_0$, $[VSTx1]_{free}$, $[VSTx1]^1_{bound}$ и $[VSTx1]^2_{bound}$ – общая концентрации токсина в образце, концентрация токсина связанного с мембраной ЛБН и концентрации токсина связанного с высокоаффинным и одним низкоаффинным сайтами связывания на молекуле домена. Для всех низкоаффинных сайтов предполагалась равная константа взаимодействия (K_2) и, соответственно, равная заселенность. В расчетах все концентрации и константы равновесия были приведены к концентрации комплексов ПЧД-KvAP/ЛБН, то есть, в выбранной системе, концентрация ПЧД считалась равной 1. Для моделирования ситуации с одним низкоаффинным сайтом значение параметра N_2 фиксировалось равным 1.

7.7.3 Анализ свободной энергии процесса фолдига ПЧД-KvAP

Зависимость относительного содержания «нативной» и «расплавленной» форм ПЧД-KvAP от относительной молярной концентрации денатурирующего детергента LPPG (χ^{LPPG}) = [LPPG]/([LPPG]+[DPC]) анализировали с помощью уравнения, подразумевающего равновесие между двумя состояниями [536].

$$[U] = \frac{1}{1 + \exp\left(-\Delta G_F / RT\right)} \qquad \Delta G_F = \Delta G_F^0 + m_F \cdot \chi^{LPPG} \quad \text{(Ур. 7.25)}$$

,

где [U] – концентрация «расплавленной» формы белка, определенная из относительных интенсивностей кросс-пиков в 2D $^1H,^{15}N$-HSQC спектре, ΔG_F^0 – свободная энергия процесса фолдинга, в отсутствии денатурирующего детергента, а m_F – фактор характеризующий зависимость свободной энергии от концентрации денатурирующего детергента.

В случая равновесия между «нативной» и «расплавленной» формой ПЧД-KvAP свободную энергию процесса фолдинга (ΔG_F), рассчитывали по формуле:

$$\Delta G_F = -RTLn([F]/[U]), \quad \text{(Ур. 7.26)}$$

где [F] и [U] – концентрации «нативной» и «расплавленной» формы белка, определенные из относительных интенсивностей кросс-пиков в 2D $^1H,^{15}N$-HSQC спектре. Изменение энтропии и энтальпии в процессе фолдинга домена определяли, используя зависимость ΔG_F от температуры, по формуле $\Delta G_F = \Delta H - T \cdot \Delta S$.

7.8 Компьютерное моделирование

7.8.1 Aam-I и Zrv-IIB

Пространственную структуру Zrv-IIB в метаноле уточняли с учетом экспериментально наблюдаемой системы водородных связей. Для этого были введены стандартные ограничения на водородные связи, наблюдаемые в дальнем HNCO спектре (см. п. 7.4.4). Для выяснения типа водородной связи с HN-группы Aib^{12} было проведено три структурных расчета в программе DYANA (Рис. 4.5, колонки ZrvI, ZrvII, ZrvIII), в которых эта водородная связь была ограничена как α-спиральная (HN Aib^{12} – CO Leu^{8}), 3_{10}-спиральная (HN Aib^{12} – CO Aib^{9}) или бифуркационная (HN Aib12 – CO Leu8, Aib9), соответственно. В последнем случае верхние и нижние ограничения на обе карбонильные группы были увеличены на 0.2 Å по сравнению ограничениями для “обычных” водородных связей.

Энергетическая минимизация для каждого из структурных расчетов была проведена в программе FANTOM [483] с силовым полем ECEPP/2 [537] и всеми теми ограничениями, что были использованы для расчетов в программе DYANA. Использовалась “неявно заданная” модель растворителя, соответствующая циклогексану [485], диэлектрическая проницаемость ε была равна расстоянию (в ангстремах) между зарядами ($\varepsilon = r$).

Моделирование структуры Aam-I в метаноле и конформационный поиск методом Монте-Карло также проводили в программе FANTOM [483]. В расчете использовали силовое поле ECEPP/3 [484] и “неявно заданную” модель растворителя, соответствующую октанолу [485], диэлектрическая проницаемость ε была равна расстоянию (в ангстремах) между зарядами. Для моделирования структур пептида с разным направлением закрутки спирали на отдельных участках молекулы вводили ограничения на торсионные углы φ и ψ основной цепи.

7.8.2 Ареницин и аурелин

Расчеты молекулярно-динамических траекторий для ареницина в воде были выполнены проф. Athanassios Stavrakoudis (University of Ioannina, Greece). Расчеты молекулярно-динамических траекторий аурелина в воде и моделирование структуры комплекса аурелина с поровым доменом канала Kv1.1 человека были выполнены к.ф.-м.н. Чугуновым А.О. (Лаборатория моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН, руководитель проф. д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г). Детали расчетов приведены в основном тексте диссертационной работы.

7.9 Подготовка рисунков, депонирование экспериментальных данных и полученных структур

Визуальный анализ полученных структур, включая определение размеров молекул и углов изгибов спиралей, а также подготовка рисунков как в литературном обзоре, так и в экспериментальной части диссертационной работы были выполнены с использованием программы MOLMOL [538]. Угол изгиба спирали пептаиболов Aam-I и Zrv-IIB на остатке Pro/Hyp(i) вычисляли как угол между осями цилиндров, включающих в себя атомы основной цепи остатков (от 1 до i-1) и (от i до N), где N – число остатков в молекуле. Анализ вторичной структуры в рассчитанных по ЯМР-данным наборах пространственных структур проводили с помощью программы STRIDE [539].

Дипольный момент для молекул пептаиболов рассчитывали в программе SYBYL (Tripos inc. США), используя заряды силового поля CVFF [540]. Расчет электростатического потенциала [239] и потенциала молекулярной гидрофобности (МНР) [240] на поверхности молекул был выполнен в программе MOLMOL, используя утилиты, созданные к.ф-м.н. П.Е. Волынским (Лаборатория моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН, руководитель проф. д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г).

Полученные в работе ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N химические сдвиги и значения КССВ для изучаемых молекул были депонированы в “Банк данных ЯМР” (BMRB, BioMagneticResonanceBank, www.bmrb.wisc.edu/), коды доступа приведены в таблице 7.2. Пространственные структуры, полученные в работе, а также экспериментальные ограничения, использованные при расчете структуры, были депонированы в “Базу данных структур белков” (PDB, www.rcsb.org/pdb/), коды доступа приведены в таблице 7.2.

МП	Среда	Код доступа BMRB / данные[1]		Код доступа PDB, коментарий[2]
Lchα	CD_3OH	16707	δHC	2KTN, ^{1}H-ЯМР (^{13}C нат. содерж.)
Lchβ	CD_3OH	16709	δHC	2KTO, ^{1}H-ЯМР (^{13}C нат. содерж.)
KB1	D_2O	6627	δHC	
	DPC		δH, J	1ZNU, ^{1}H-ЯМР
KB7	DPC			2JWM, ^{1}H-ЯМР
Ar2	H_2O	15115	δH	2JNI, ^{1}H-ЯМР
	DPC, димер	17430	δHCN	2L8X, ^{1}H,^{13}C,^{15}N-ЯМР
Аурелин	Вода	17792	δHCN	2LG4, ^{1}H, ^{15}N-ЯМР (^{13}C нат. содерж.)
Aam-I	CD_3OH	15056	δHCN	
	DHPC/DMPC	18861	δHCN	2M1F ,^{1}H,^{13}C,^{15}N-ЯМР
Zrv-IIB	CD_3OH	4601	δHCN, J	1DLZ, ^{1}H-ЯМР
				1R9U, ^{1}H-ЯМР + ограничения на водородные связи из $^{3h}J_{NC}$’
	DPC	4993	δHCN, J	1IH9, ^{1}H-ЯМР

Табл. 7.2. Депонирование экспериментальных данных и пространственных структур, полученных в работе, в международные базы данных.
1 – δ («H», «C», «N») обозначает химические сдвиги ^{1}H, ^{13}C и ^{15}N ядер. J обозначает КССВ.
2 – Указано по каким данным была рассчитана структура

Выводы

1. Для структурно-динамических исследований МБ и МП методами ЯМР высокого разрешения предложена новая мембраномоделирующая среда, – липид-белковые нанодиски, которая позволяет изучать «нативное» состояние мембранных биомолекул, что не всегда возможно в средах на основе детергентов. Показано, что инкапсуляция денатурированных МБ в нанодиски вызывает самопроизвольный фолдинг белка, и эффективность этого процесса зависит от липидного состава мембраны нанодиска.
2. Исследована структура и динамика ряда МП, принадлежащих трем классам: гидрофобные антибиотики, антимикробные пептиды и нейротоксины. Показано, что эффективность образования и топология комплекса пептид-мембрана, а также олигомеризация МП в мембраноподобном окружении зависят как от гидрофобных и электростатических взаимодействий МП с липидами, так и от конформационной подвижности, что требует учета совокупности структурно-динамических факторов для описания конформации и механизма действия МП.
3. Показано, что гомологичные спиральные антибиотики Aam-I и Zrv-IIB обладают разными динамическими характеристиками. Предложена модель мембранной активности Aam-I и Zrv-IIB, включающая образование пор, состоящих из спиральных мономеров пептидов. Повышенная конформационная подвижность Aam-I значительно ослабляет начальное присоединение пептида к мембране и последующие процессы порообразования.
4. Показано, что конформация и динамика β-структурного МП (ареницина-2), стабилизированного дисульфидными связями, может значительно меняться при взаимодействии с мембраной. Определена пространственная структура димера ареницина-2 в мембраноподобном окружении и предложена модель мембранной активности, включающая образование смешанных пептид/липидных пор, основным структурным элементом которых являются β-структурный димер ареницина.
5. Показано, что важную роль в мембранной активности и антибиотическом действии двухкомпонентного лантибиотика лихеницидина и циклотидов KB1 и KB7 играют специфические взаимодействия конкретных функциональных групп МП с липидными мишенями и двухвалентными катионами, соответственно.
6. Показано, что аурелин одновременно обладает свойствами антимикробного МП, неспецифически действующего на мембраны, и специфического токсина, блокирующего K+-каналы.

7. Показано, что важную роль в стабилизации «нативной» конформации ПЧД KvAP играют внутримолекулярные электростатические взаимодействия (солевые мостики) и двумерная упаковка липидного бислоя, окружающего домен. В «нативном» состоянии, соответствующем структуре домена в открытом состоянии канала, обнаружены «медленные» (мкс-мс) движения спиралей ПЧД, – прообраз высокоамплитудных перестроек, происходящих при потенциалозависимой активации.
8. Для ПЧД описано состояние, сходное с состоянием «расплавленной глобулы» водорастворимых белков, возможно, являющееся одним из интермедиатов процесса фолдинга МБ in vitro. «Расплавленное» состояние характеризуется компактной упаковкой, небольшими изменениями вторичной структуры, частичным разрушением третичной структуры и увеличением подвижности основной цепи МБ в пс-нс временном диапазоне. Показано, что в отличие от глобулярных белков формирование «нативной» структуры МБ в детергент-содержащих средах может сопровождаться увеличением энтальпии и энтропии системы.
9. Предложен механизм молекулярного действия токсина VSTx1, влияющего на потенциалозависимую активацию K+-каналов. Показано, что токсин связывается с интерфейсным регионом липидного бислоя и впоследствии образует комплекс с петлевыми участками ПЧД KvAP. Связанная молекула токсина блокирует активацию ПЧД, не образуя прямых контактов с «датчиком потенциала» спиралью S4.

Список литературы

[1] K.H. Lundstrom, ed., Structural Genomics on Membrane Proteins, 1 edition, CRC Press, Boca Raton, 2006.

[2] E. Wallin, G. von Heijne, Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms, Protein Sci. 7 (1998) 1029–1038.

[3] J.P. Overington, B. Al-Lazikani, A.L. Hopkins, How many drug targets are there?, Nat. Rev. Drug Discov. 5 (2006) 993–996.

[4] D.E. Warschawski, A.A. Arnold, M. Beaugrand, A. Gravel, É. Chartrand, I. Marcotte, Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins, Biochim. Biophys. Acta. 1808 (2011) 1957–1974.

[5] I. Bahar, T.R. Lezon, A. Bakan, I.H. Shrivastava, Normal Mode Analysis of Biomolecular Structures: Functional Mechanisms of Membrane Proteins, Chem. Rev. 110 (2010) 1463–1497.

[6] K. Oxenoid, J.J. Chou, The present and future of solution NMR in investigating the structure and dynamics of channels and transporters, Curr. Opin. Struct. Biol. 23 (2013) 547–554.

[7] A. Gautier, Structure determination of α-helical membrane proteins by solution-state NMR: emphasis on retinal proteins, Biochim. Biophys. Acta. 1837 (2014) 578–588.

[8] C.R. Sanders, F. Sönnichsen, Solution NMR of membrane proteins: practice and challenges, Magn. Reson. Chem. MRC. 44 Spec No (2006) S24–40.

[9] L. Maler, Solution NMR studies of peptide-lipid interactions in model membranes, Mol. Membr. Biol. 29 (2012) 155–176.

[10] S.Y. Lee, R. MacKinnon, A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom, Nature. 430 (2004) 232–235.

[11] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, Nature. 415 (2002) 389–395.

[12] A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero, Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides, Biopolymers. 55 (2000) 4–30.

[13] J.P. Powers, R.E. Hancock, The relationship between peptide structure and antibacterial activity, Peptides. 24 (2003) 1681–1691.

[14] P. Bulet, R. Stocklin, L. Menin, Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates, Immunol.Rev. 198 (2004) 169–184.

[15] K. Matsuzaki, Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes, Biochim.Biophys.Acta. 1462 (1999) 1–10.

[16] M.R. Yeaman, N.Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, Pharmacol.Rev. 55 (2003) 27–55.

[17] A.M. Aerts, I.E.J.A. François, B.P.A. Cammue, K. Thevissen, The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins, Cell. Mol. Life Sci. 65 (2008) 2069–2079.

[18] J.M. Willey, W.A. van der Donk, Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function, Annu. Rev. Microbiol. 61 (2007) 477–501.

[19] D.C. Rees, L. DeAntonio, D. Eisenberg, Hydrophobic organization of membrane proteins, Science. 245 (1989) 510–513.

[20] B.D. Silverman, Hydrophobicity of transmembrane proteins: Spatially profiling the distribution, Protein Sci. Publ. Protein Soc. 12 (2003) 586–599.

[21] M. Weingarth, A. Prokofyev, E.A.W. van der Cruijsen, D. Nand, A.M.J.J. Bonvin, O. Pongs, et al., Structural determinants of specific lipid binding to potassium channels, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 3983–3988.

[22] J.-J. Lacapère, E. Pebay-Peyroula, J.-M. Neumann, C. Etchebest, Determining membrane protein structures: still a challenge!, Trends Biochem. Sci. 32 (2007) 259–270.

[23] K. Wuthrich, NMR of Proteins and Nucleic Acids, John Wiley and Sons, New York, 1986.

[24] J. Cavanagh, W.J. Fairbrother, A.G.P. III, N.J. Skelton, M. Rance, Protein NMR Spectroscopy, Second Edition: Principles and Practice, 2nd ed., Academic Press, 2006.
[25] S. Raman, O.F. Lange, P. Rossi, M. Tyka, X. Wang, J. Aramini, et al., NMR structure determination for larger proteins using backbone-only data, Science. 327 (2010) 1014–1018.
[26] A. Bhattacharya, Chemistry: Breaking the billion-hertz barrier, Nat. News. 463 (2010) 605–606.
[27] V. Tugarinov, V. Kanelis, L.E. Kay, Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy, Nat. Protoc. 1 (2006) 749–754.
[28] D.S. Wishart, B.D. Sykes, Chemical shifts as a tool for structure determination, Methods Enzym. 239 (1994) 363–392.
[29] Y. Shen, O. Lange, F. Delaglio, P. Rossi, J.M. Aramini, G. Liu, et al., Consistent blind protein structure generation from NMR chemical shift data, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (2008) 4685–4690.
[30] V.F. Bystrov, Spin-spin coupling and the conformational states of peptide systems, ProgNMR Spec. 10 (1976) 41–81.
[31] M. Sattler, J. Schleucher, C. Griesinger, Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 34 (1999) 93–158.
[32] R.R. Ernst, Nuclear Magnetic Resonance Fourier Transform Spectroscopy (Nobel Lecture), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 31 (1992) 805–823.
[33] S. Grzesiek, F. Cordier, A.J. Dingley, Scalar couplings across hydrogen bonds, Methods Enzym. 338 (2001) 111–133.
[34] P. Guntert, Automated NMR structure calculation with CYANA, Methods Mol. Biol. Clifton NJ. 278 (2004) 353–378.
[35] R. Riek, J. Fiaux, E.B. Bertelsen, A.L. Horwich, K. Wuthrich, Solution NMR techniques for large molecular and supramolecular structures, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 12144–12153.
[36] A.P. Golovanov, A.L. Lomize, A.S. Arseniev, Y.N. Utkin, V.I. Tsetlin, Two-dimensional 1H-NMR study of the spatial structure of neurotoxin II from Naja naja oxiana, Eur. J. Biochem. 213 (1993) 1213–1223.
[37] V. Tugarinov, W.Y. Choy, V.Y. Orekhov, L.E. Kay, Solution NMR-derived global fold of a monomeric 82-kDa enzyme, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 102 (2005) 622–627.
[38] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wuthrich, Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 94 (1997) 12366–12371.
[39] R. Horst, E.B. Bertelsen, J. Fiaux, G. Wider, A.L. Horwich, K. Wuthrich, Direct NMR observation of a substrate protein bound to the chaperonin GroEL, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 102 (2005) 12748–12753.
[40] A. Mainz, T.L. Religa, R. Sprangers, R. Linser, L.E. Kay, B. Reif, NMR Spectroscopy of Soluble Protein Complexes at One Mega-Dalton and Beyond, Angew. Chem. Int. Ed. 52 (2013) 8746–8751.
[41] T.L. Religa, R. Sprangers, L.E. Kay, Dynamic regulation of archaeal proteasome gate opening as studied by TROSY NMR, Science. 328 (2010) 98–102.
[42] R.L. Isaacson, P.J. Simpson, M. Liu, E. Cota, X. Zhang, P. Freemont, et al., A new labeling method for methyl transverse relaxation-optimized spectroscopy NMR spectra of alanine residues, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 15428–15429.
[43] S. Rajesh, D. Nietlispach, H. Nakayama, K. Takio, E.D. Laue, T. Shibata, et al., A novel method for the biosynthesis of deuterated proteins with selective protonation at the aromatic rings of Phe, Tyr and Trp, J. Biomol. NMR. 27 (2003) 81–86.

[44] D. Staunton, R. Schlinkert, G. Zanetti, S.A. Colebrook, I.D. Campbell, Cell-free expression and selective isotope labelling in protein NMR, Magn. Reson. Chem. MRC. 44 Spec No (2006) S2–9.
[45] M. Kainosho, T. Torizawa, Y. Iwashita, T. Terauchi, A. Mei Ono, P. Güntert, Optimal isotope labelling for NMR protein structure determinations, Nature. 440 (2006) 52–57.
[46] I. Maslennikov, S. Choe, Advances in NMR structures of integral membrane proteins, Curr. Opin. Struct. Biol. 23 (2013) 555–562.
[47] A. Bax, A. Grishaev, Weak alignment NMR: a hawk-eyed view of biomolecular structure, Curr. Opin. Struct. Biol. 15 (2005) 563–570.
[48] J.L. Battiste, G. Wagner, Utilization of site-directed spin labeling and high-resolution heteronuclear nuclear magnetic resonance for global fold determination of large proteins with limited nuclear overhauser effect data, Biochemistry. 39 (2000) 5355–5365.
[49] A. Grishaev, V. Tugarinov, L.E. Kay, J. Trewhella, A. Bax, Refined solution structure of the 82-kDa enzyme malate synthase G from joint NMR and synchrotron SAXS restraints, J. Biomol. NMR. 40 (2008) 95–106.
[50] D.M. Korzhnev, M. Billeter, A.S. Arseniev, V.Y. Orekhov, NMR studies of Brownian tumbling and internal motions in proteins, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 38 (2001) 197.
[51] X. Liao, D. Long, D.-W. Li, R. Brüschweiler, V. Tugarinov, Probing side-chain dynamics in proteins by the measurement of nine deuterium relaxation rates per methyl group, J. Phys. Chem. B. 116 (2012) 606–620.
[52] A. Goldbourt, Biomolecular magic-angle spinning solid-state NMR: recent methods and applications, Curr. Opin. Biotechnol. 24 (2013) 705–715.
[53] C. Aisenbrey, M. Michalek, E.S. Salnikov, B. Bechinger, Solid-State NMR Approaches to Study Protein Structure and Protein–Lipid Interactions, in: J.H. Kleinschmidt (Ed.), Lipid-Protein Interact., Humana Press, 2013: pp. 357–387.
[54] D.T. Murray, N. Das, T.A. Cross, Solid state NMR strategy for characterizing native membrane protein structures, Acc. Chem. Res. 46 (2013) 2172–2181.
[55] S.J. Opella, Structure determination of membrane proteins in their native phospholipid bilayer environment by rotationally aligned solid-state NMR spectroscopy, Acc. Chem. Res. 46 (2013) 2145–2153.
[56] S.H. Park, B.B. Das, F. Casagrande, Y. Tian, H.J. Nothnagel, M. Chu, et al., Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers, Nature. 491 (2012) 779–783.
[57] A. Gautier, H.R. Mott, M.J. Bostock, J.P. Kirkpatrick, D. Nietlispach, Structure determination of the seven-helix transmembrane receptor sensory rhodopsin II by solution NMR spectroscopy, Nat. Struct. Mol. Biol. 17 (2010) 768–774.
[58] S. Reckel, D. Gottstein, J. Stehle, F. Löhr, M.-K. Verhoefen, M. Takeda, et al., Solution NMR structure of proteorhodopsin, Angew. Chem. Int. Ed Engl. 50 (2011) 11942–11946.
[59] E.C. McCusker, S.E. Bane, M.A. O'Malley, A.S. Robinson, Heterologous GPCR expression: a bottleneck to obtaining crystal structures, Biotechnol. Prog. 23 (2007) 540–547.
[60] F. Junge, B. Schneider, S. Reckel, D. Schwarz, V. Dötsch, F. Bernhard, Large-scale production of functional membrane proteins, Cell. Mol. Life Sci. CMLS. 65 (2008) 1729–1755.
[61] J.H. Chill, J.M. Louis, C. Miller, A. Bax, NMR study of the tetrameric KcsA potassium channel in detergent micelles, Protein Sci. 15 (2006) 684–698.
[62] K.A. Baker, C. Tzitzilonis, W. Kwiatkowski, S. Choe, R. Riek, Conformational dynamics of the KcsA potassium channel governs gating properties, Nat.Struct.Mol.Biol. 14 (2007) 1089–1095.
[63] D.M. Rosenbaum, S.G.F. Rasmussen, B.K. Kobilka, The structure and function of G-protein-coupled receptors, Nature. 459 (2009) 356–363.

[64] B. Schneider, F. Junge, V.A. Shirokov, F. Durst, D. Schwarz, V. Dötsch, et al., Membrane protein expression in cell-free systems, Methods Mol. Biol. Clifton NJ. 601 (2010) 165–186.
[65] C. Klammt, D. Schwarz, K. Fendler, W. Haase, V. Dötsch, F. Bernhard, Evaluation of detergents for the soluble expression of alpha-helical and beta-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system, FEBS J. 272 (2005) 6024–6038.
[66] K. Shimono, M. Goto, T. Kikukawa, S. Miyauchi, M. Shirouzu, N. Kamo, et al., Production of functional bacteriorhodopsin by an Escherichia coli cell-free protein synthesis system supplemented with steroid detergent and lipid, Protein Sci. Publ. Protein Soc. 18 (2009) 2160–2171.
[67] R. Kalmbach, I. Chizhov, M.C. Schumacher, T. Friedrich, E. Bamberg, M. Engelhard, Functional cell-free synthesis of a seven helix membrane protein: in situ insertion of bacteriorhodopsin into liposomes, J. Mol. Biol. 371 (2007) 639–648.
[68] J.-L. Popot, T. Althoff, D. Bagnard, J.-L. Banères, P. Bazzacco, E. Billon-Denis, et al., Amphipols from A to Z, Annu. Rev. Biophys. 40 (2011) 379–408.
[69] K.-H. Park, E. Billon-Denis, T. Dahmane, F. Lebaupain, B. Pucci, C. Breyton, et al., In the cauldron of cell-free synthesis of membrane proteins: playing with new surfactants, New Biotechnol. 28 (2011) 255–261.
[70] C. Klammt, M.H. Perrin, I. Maslennikov, L. Renault, M. Krupa, W. Kwiatkowski, et al., Polymer-based cell-free expression of ligand-binding family B G-protein coupled receptors without detergents, Protein Sci. Publ. Protein Soc. 20 (2011) 1030–1041.
[71] F. Katzen, J.E. Fletcher, J.-P. Yang, D. Kang, T.C. Peterson, J.A. Cappuccio, et al., Insertion of membrane proteins into discoidal membranes using a cell-free protein expression approach, J. Proteome Res. 7 (2008) 3535–3542.
[72] J.A. Cappuccio, C.D. Blanchette, T.A. Sulchek, E.S. Arroyo, J.M. Kralj, A.K. Hinz, et al., Cell-free co-expression of functional membrane proteins and apolipoprotein, forming soluble nanolipoprotein particles, Mol. Cell. Proteomics. 7 (2008) 2246–2253.
[73] C. Roos, M. Zocher, D. Müller, D. Münch, T. Schneider, H.-G. Sahl, et al., Characterization of co-translationally formed nanodisc complexes with small multidrug transporters, proteorhodopsin and with the E. coli MraY translocase, Biochim. Biophys. Acta. 1818 (2012) 3098–3106.
[74] H. Kiefer, In vitro folding of alpha-helical membrane proteins, Biochim. Biophys. Acta. 1610 (2003) 57–62.
[75] A.G. Komarov, K.M. Linn, J.J. Devereaux, F.I. Valiyaveetil, Modular strategy for the semisynthesis of a K+ channel: investigating interactions of the pore helix, ACS Chem. Biol. 4 (2009) 1029–1038.
[76] S. Fiedler, J. Broecker, S. Keller, Protein folding in membranes, Cell. Mol. Life Sci. CMLS. 67 (2010) 1779–1798.
[77] P.J. Booth, P. Curnow, Membrane proteins shape up: understanding in vitro folding, Curr. Opin. Struct. Biol. 16 (2006) 480–488.
[78] J. Frauenfeld, J. Gumbart, E.O. van der Sluis, S. Funes, M. Gartmann, B. Beatrix, et al., Cryo-EM structure of the ribosome–SecYE complex in the membrane environment, Nat. Struct. Mol. Biol. 18 (2011) 614–621.
[79] J.-L. Banères, J.-L. Popot, B. Mouillac, New advances in production and functional folding of G-protein-coupled receptors, Trends Biotechnol. 29 (2011) 314–322.
[80] A.M. Stanley, K.G. Fleming, The process of folding proteins into membranes: challenges and progress, Arch. Biochem. Biophys. 469 (2008) 46–66.
[81] V. Krishnamani, B.G. Hegde, R. Langen, J.K. Lanyi, Secondary and tertiary structure of bacteriorhodopsin in the SDS denatured state, Biochemistry. 51 (2012) 1051–1060.
[82] M. Bosse, L. Thomas, R. Hassert, A.G. Beck-Sickinger, D. Huster, P. Schmidt, Assessment of a fully active class A G protein-coupled receptor isolated from in vitro folding, Biochemistry. 50 (2011) 9817–9825.

[83] V. Krishnamani, J.K. Lanyi, Structural Changes in Bacteriorhodopsin during In Vitro Refolding from a Partially Denatured State, Biophys. J. 100 (2011) 1559–1567.
[84] S.J. Allen, A.R. Curran, R.H. Templer, W. Meijberg, P.J. Booth, Controlling the folding efficiency of an integral membrane protein, J. Mol. Biol. 342 (2004) 1293–1304.
[85] O. Vinogradova, F. Sonnichsen, C.R. Sanders, On choosing a detergent for solution NMR studies of membrane proteins, J.Biomol.NMR. 11 (1998) 381–386.
[86] R.C. Page, J.D. Moore, H.B. Nguyen, M. Sharma, R. Chase, F.P. Gao, et al., Comprehensive evaluation of solution nuclear magnetic resonance spectroscopy sample preparation for helical integral membrane proteins, J. Struct. Funct. Genomics. 7 (2006) 51–64.
[87] R.D. Krueger-Koplin, P.L. Sorgen, S.T. Krueger-Koplin, I.O. Rivera-Torres, S.M. Cahill, D.B. Hicks, et al., An evaluation of detergents for NMR structural studies of membrane proteins, J. Biomol. NMR. 28 (2004) 43–57.
[88] B. Mui, L. Chow, M.J. Hope, Extrusion technique to generate liposomes of defined size, Methods Enzymol. 367 (2003) 3–14.
[89] M.N. Triba, D.E. Warschawski, P.F. Devaux, Reinvestigation by Phosphorus NMR of Lipid Distribution in Bicelles, Biophys. J. 88 (2005) 1887–1901.
[90] F.D. Sonnichsen, J.E. Van Eyk, R.S. Hodges, B.D. Sykes, Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide, Biochemistry. 31 (1992) 8790–8798.
[91] M. Perham, J. Liao, P. Wittung-Stafshede, Differential effects of alcohols on conformational switchovers in alpha-helical and beta-sheet protein models, Biochemistry. 45 (2006) 7740–7749.
[92] O. Vinogradova, P. Badola, L. Czerski, F.D. Sönnichsen, C.R. Sanders, Escherichia coli diacylglycerol kinase: a case study in the application of solution NMR methods to an integral membrane protein, Biophys J. 72 (1997) 2688–2701.
[93] V.K. Rastogi, M.E. Girvin, Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase, Nature. 402 (1999) 263–268.
[94] K.V. Pervushin, V.Y. Orekhov, A.I. Popov, L.Y. Musina, A.S. Arseniev, Three-dimensional structure of (1-71)bacterioopsin solubilized in methanol/chloroform and SDS micelles determined by 15N-1H heteronuclear NMR spectroscopy, Eur.J.Biochem. 219 (1994) 571–583.
[95] J.T. Davies, A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent, in: Proc. 2nd Int. Congr. Surf. Act., Butterworths London, 1957: p. 426.
[96] R.S. Prosser, F. Evanics, J.L. Kitevski, M.S. Al-Abdul-Wahid, Current applications of bicelles in NMR studies of membrane-associated amphiphiles and proteins, Biochemistry. 45 (2006) 8453–8465.
[97] Y. Imaishi, R. Kakehashi, T. Nezu, H. Maeda, Dodecyldimethylamine Oxide Micelles in Solutions without Added Salt, J. Colloid Interface Sci. 197 (1998) 309–316.
[98] C. Tian, M.D. Karra, C.D. Ellis, J. Jacob, K. Oxenoid, F. Sönnichsen, et al., Membrane protein preparation for TROSY NMR screening, Methods Enzymol. 394 (2005) 321–334.
[99] D. Nietlispach, A. Gautier, Solution NMR studies of polytopic α-helical membrane proteins, Curr. Opin. Struct. Biol. 21 (2011) 497–508.
[100] W.D. Van Horn, H.J. Kim, C.D. Ellis, A. Hadziselimovic, E.S. Sulistijo, M.D. Karra, et al., Solution nuclear magnetic resonance structure of membrane-integral diacylglycerol kinase, Science. 324 (2009) 1726–1729.
[101] K.J. Glover, J.A. Whiles, G. Wu, N. Yu, R. Deems, J.O. Struppe, et al., Structural evaluation of phospholipid bicelles for solution-state studies of membrane-associated biomolecules, Biophys. J. 81 (2001) 2163–2171.
[102] S.F. Poget, M.E. Girvin, Solution NMR of membrane proteins in bilayer mimics: small is beautiful, but sometimes bigger is better, Biochim. Biophys. Acta. 1768 (2007) 3098–3106.

[103] S.F. Poget, R. Harris, S.M. Cahill, M.E. Girvin, 1H, 13C, 15N backbone NMR assignments of the Staphylococcus aureus small multidrug-resistance pump (Smr) in a functionally active conformation, Biomol. NMR Assign. 4 (2010) 139–142.
[104] E.V. Bocharov, K.S. Mineev, P.E. Volynsky, Y.S. Ermolyuk, E.N. Tkach, A.G. Sobol, et al., Spatial structure of the dimeric transmembrane domain of the growth factor receptor ErbB2 presumably corresponding to the receptor active state, J. Biol. Chem. 283 (2008) 6950–6956.
[105] K.S. Mineev, N.F. Khabibullina, E.N. Lyukmanova, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov, A.S. Arseniev, Spatial structure and dimer–monomer equilibrium of the ErbB3 transmembrane domain in DPC micelles, Biochim. Biophys. Acta. 1808 (2011) 2081–2088.
[106] Y. Zhou, T. Cierpicki, R.H. Jimenez, S.M. Lukasik, J.F. Ellena, D.S. Cafiso, et al., NMR solution structure of the integral membrane enzyme DsbB: functional insights into DsbB-catalyzed disulfide bond formation, Mol.Cell. 31 (2008) 896–908.
[107] S. Hiller, R.G. Garces, T.J. Malia, V.Y. Orekhov, M. Colombini, G. Wagner, Solution Structure of the Integral Human Membrane Protein VDAC-1 in Detergent Micelles, Science. 321 (2008) 1206–1210.
[108] M. Bayrhuber, T. Meins, M. Habeck, S. Becker, K. Giller, S. Villinger, et al., Structure of the human voltage-dependent anion channel, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (2008) 15370–15375.
[109] K.R. MacKenzie, J.H. Prestegard, D.M. Engelman, A transmembrane helix dimer: structure and implications, Science. 276 (1997) 131–133.
[110] A. Arora, F. Abildgaard, J.H. Bushweller, L.K. Tamm, Structure of outer membrane protein A transmembrane domain by NMR spectroscopy, Nat. Struct. Biol. 8 (2001) 334–338.
[111] K. Oxenoid, J.J. Chou, The structure of phospholamban pentamer reveals a channel-like architecture in membranes, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 10870–10875.
[112] J.R. Schnell, J.J. Chou, Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus, Nature. 451 (2008) 591–595.
[113] T.-L. Lau, C. Kim, M.H. Ginsberg, T.S. Ulmer, The structure of the integrin alphaIIbbeta3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling, EMBO J. 28 (2009) 1351–1361.
[114] M.E. Call, K.W. Wucherpfennig, J.J. Chou, The structural basis for intramembrane assembly of an activating immunoreceptor complex, Nat. Immunol. 11 (2010) 1023–1029.
[115] M.J. Berardi, W.M. Shih, S.C. Harrison, J.J. Chou, Mitochondrial uncoupling protein 2 structure determined by NMR molecular fragment searching, Nature. 476 (2011) 109–113.
[116] D. Li, J.A. Lyons, V.E. Pye, L. Vogeley, D. Aragão, C.P. Kenyon, et al., Crystal structure of the integral membrane diacylglycerol kinase, Nature. 497 (2013) 521–524.
[117] J.J. Chou, J.D. Kaufman, S.J. Stahl, P.T. Wingfield, A. Bax, Micelle-induced curvature in a water-insoluble HIV-1 Env peptide revealed by NMR dipolar coupling measurement in stretched polyacrylamide gel, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 2450–2451.
[118] R.J. Cushley, M. Okon, NMR studies of lipoprotein structure, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 31 (2002) 177–206.
[119] G.J. Miller, N.E. Miller, Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease, Lancet. 1 (1975) 16–19.
[120] M.S. Lauer, P.B. Fontanarosa, Updated guidelines for cholesterol management, JAMA J. Am. Med. Assoc. 285 (2001) 2508–2509.
[121] Y. Huang, J.A. DiDonato, B.S. Levison, D. Schmitt, L. Li, Y. Wu, et al., An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma, Nat. Med. 20 (2014) 193–203.
[122] G.H. Rothblat, M.C. Phillips, High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport, Curr. Opin. Lipidol. 21 (2010) 229.

[123] R.G.D. Silva, R. Huang, J. Morris, J. Fang, E.O. Gracheva, G. Ren, et al., Structure of apolipoprotein AI in spherical high density lipoproteins of different sizes, Proc. Natl. Acad. Sci. 105 (2008) 12176–12181.
[124] L. Li, J. Chen, V.K. Mishra, J.A. Kurtz, D. Cao, A.E. Klon, et al., Double belt structure of discoidal high density lipoproteins: molecular basis for size heterogeneity, J. Mol. Biol. 343 (2004) 1293–1311.
[125] J.P. Segrest, M.K. Jones, A.E. Klon, C.J. Sheldahl, M. Hellinger, H.D. Loof, et al., A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein, J Biol Chem. 274 (1999) 31755–31758.
[126] Z. Wu, M.A. Wagner, L. Zheng, J.S. Parks, J.M. Shy 3rd, J.D. Smith, et al., The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction, Nat. Struct. Mol. Biol. 14 (2007) 861–868.
[127] K.-A. Rye, Apolipoprotein A-II Inhibits High Density Lipoprotein Remodeling and Lipid-poor Apolipoprotein A-I Formation, J. Biol. Chem. 278 (2003) 22530–22536.
[128] D.W. Borhani, D.P. Rogers, J.A. Engler, C.G. Brouillette, Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation, Proc Natl Acad Sci U A. 94 (1997) 12291–12296.
[129] D.P. Rogers, C.G. Brouillette, J.A. Engler, S.W. Tendian, L. Roberts, V.K. Mishra, et al., Truncation of the amino terminus of human apolipoprotein A-I substantially alters only the lipid-free conformation, Biochemistry. 36 (1997) 288–300.
[130] A.E. Klon, M.K. Jones, J.P. Segrest, S.C. Harvey, Molecular belt models for the apolipoprotein A-I Paris and Milano mutations, Biophys J. 79 (2000) 1679–1685.
[131] D.P. Rogers, L.M. Roberts, J. Lebowitz, G. Datta, G.M. Anantharamaiah, J.A. Engler, et al., The lipid-free structure of apolipoprotein A-I: effects of amino-terminal deletions, Biochemistry. 37 (1998) 11714–11725.
[132] M.K. Jones, L. Zhang, A. Catte, L. Li, M.N. Oda, G. Ren, et al., Assessment of the Validity of the Double Superhelix Model for Reconstituted High Density Lipoproteins: A COMBINED COMPUTATIONAL-EXPERIMENTAL APPROACH, J. Biol. Chem. 285 (2010) 41161–41171.
[133] C.E. Matz, A. Jonas, Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions, J. Biol. Chem. 257 (1982) 4535–4540.
[134] T.. Bayburt, Y.V. Grinkova, S.G. Sligar, Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins, Nano Lett. 2 (2002) 853–856.
[135] A. Nath, W.M. Atkins, S.G. Sligar, Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins, Biochemistry. 46 (2007) 2059–2069.
[136] S. Banerjee, T. Huber, T.P. Sakmar, Rapid incorporation of functional rhodopsin into nanoscale apolipoprotein bound bilayer (NABB) particles, J. Mol. Biol. 377 (2008) 1067–1081.
[137] C.-P.L. Wan, M.H. Chiu, X. Wu, S.K. Lee, E.J. Prenner, P.M.M. Weers, Apolipoprotein-induced conversion of phosphatidylcholine bilayer vesicles into nanodisks, Biochim. Biophys. Acta. 1808 (2011) 606–613.
[138] C.D. Blanchette, R. Law, W.H. Benner, J.B. Pesavento, J.A. Cappuccio, V. Walsworth, et al., Quantifying size distributions of nanolipoprotein particles with single-particle analysis and molecular dynamic simulations, J. Lipid Res. 49 (2008) 1420–1430.
[139] I.G. Denisov, Y.V. Grinkova, A.A. Lazarides, S.G. Sligar, Directed Self-Assembly of Monodisperse Phospholipid Bilayer Nanodiscs with Controlled Size, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 3477–3487.
[140] Y.V. Grinkova, I.G. Denisov, S.G. Sligar, Engineering extended membrane scaffold proteins for self-assembly of soluble nanoscale lipid bilayers, Protein Eng. Des. Sel. 23 (2010) 843–848.
[141] R. Puthenveetil, O. Vinogradova, Optimization of the design and preparation of nanoscale phospholipid bilayers for its application to solution NMR, Proteins. 81 (2013) 1222–1231.

[142] F. Hagn, M. Etzkorn, T. Raschle, G. Wagner, Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 1919–1925.
[143] B.A. Chromy, E. Arroyo, C.D. Blanchette, G. Bench, H. Benner, J.A. Cappuccio, et al., Different Apolipoproteins Impact Nanolipoprotein Particle Formation, J. Am. Chem. Soc. 129 (2007) 14348–14354.
[144] I.G. Denisov, M.A. McLean, A.W. Shaw, Y.V. Grinkova, S.G. Sligar, Thermotropic phase transition in soluble nanoscale lipid bilayers, J. Phys. Chem. B. 109 (2005) 15580–15588.
[145] M. Nakano, M. Fukuda, T. Kudo, M. Miyazaki, Y. Wada, N. Matsuzaki, et al., Static and Dynamic Properties of Phospholipid Bilayer Nanodiscs, J. Am. Chem. Soc. 131 (2009) 8308–8312.
[146] K. Mörs, C. Roos, F. Scholz, J. Wachtveitl, V. Dötsch, F. Bernhard, et al., Modified lipid and protein dynamics in nanodiscs, Biochim. Biophys. Acta. 1828 (2013) 1222–1229.
[147] T.H. Bayburt, S.G. Sligar, Membrane protein assembly into Nanodiscs, FEBS Lett. 584 (2010) 1721–1727.
[148] M.A. Schuler, I.G. Denisov, S.G. Sligar, Nanodiscs as a new tool to examine lipid-protein interactions, Methods Mol. Biol. Clifton NJ. 974 (2013) 415–433.
[149] M.R. Whorton, M.P. Bokoch, S.G.F. Rasmussen, B. Huang, R.N. Zare, B. Kobilka, et al., A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104 (2007) 7682–7687.
[150] D.E. Moustaine, S. Granier, E. Doumazane, P. Scholler, R. Rahmeh, P. Bron, et al., Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling, Proc. Natl. Acad. Sci. 109 (2012) 16342–16347.
[151] T. Boldog, S. Grimme, M. Li, S.G. Sligar, G.L. Hazelbauer, Nanodiscs separate chemoreceptor oligomeric states and reveal their signaling properties, Proc Natl Acad Sci U A. 103 (2006) 11509–11514.
[152] A.W. Shaw, V.S. Pureza, S.G. Sligar, J.H. Morrissey, The local phospholipid environment modulates the activation of blood clotting, J. Biol. Chem. 282 (2007) 6556–6563.
[153] H. Katayama, J. Wang, F. Tama, L. Chollet, E.P. Gogol, R.J. Collier, et al., Three-dimensional structure of the anthrax toxin pore inserted into lipid nanodiscs and lipid vesicles, Proc. Natl. Acad. Sci. 107 (2010) 3453–3457.
[154] J.R. Sheng, S. Grimme, P. Bhattacharya, M.H.B. Stowell, M. Artinger, B.S. Prabahakar, et al., In vivo adsorption of autoantibodies in myasthenia gravis using Nanodisc-incorporated acetylcholine receptor, Exp. Neurol. 225 (2010) 320–327.
[155] P. Bhattacharya, S. Grimme, B. Ganesh, A. Gopisetty, J.R. Sheng, O. Martinez, et al., Nanodisc-Incorporated Hemagglutinin Provides Protective Immunity against Influenza Virus Infection, J. Virol. 84 (2009) 361–371.
[156] N.O. Fischer, E. Infante, T. Ishikawa, C.D. Blanchette, N. Bourne, P.D. Hoeprich, et al., Conjugation to Nickel-Chelating Nanolipoprotein Particles Increases the Potency and Efficacy of Subunit Vaccines to Prevent West Nile Encephalitis, Bioconjug. Chem. 21 (2010) 1018–1022.
[157] R.O. Ryan, Nanobiotechnology applications of reconstituted high density lipoprotein, J. Nanobiotechnology. 8 (2010) 28–28.
[158] C. Yoshiura, Y. Kofuku, T. Ueda, Y. Mase, M. Yokogawa, M. Osawa, et al., NMR Analyses of the Interaction between CCR5 and Its Ligand Using Functional Reconstitution of CCR5 in Lipid Bilayers, J. Am. Chem. Soc. 132 (2010) 6768–6777.
[159] T. Raschle, S. Hiller, T.-Y. Yu, A.J. Rice, T. Walz, G. Wagner, Structural and functional characterization of the integral membrane protein VDAC-1 in lipid bilayer nanodiscs, J. Am. Chem. Soc. 131 (2009) 17777–17779.
[160] M.T. Mazhab-Jafari, C.B. Marshall, P.B. Stathopulos, Y. Kobashigawa, V. Stambolic, L.E. Kay, et al., Membrane-dependent modulation of the mTOR activator Rheb: NMR

observations of a GTPase tethered to a lipid-bilayer nanodisc, J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 3367–3370.
[161] R.I. Lehrer, W. Lu, α-Defensins in human innate immunity, Immunol. Rev. 245 (2012) 84–112.
[162] F. Semple, J.R. Dorin, β-Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more?, J. Innate Immun. 4 (2012) 337–348.
[163] M.S. Sansom, The biophysics of peptide models of ion channels, Prog Biophys Mol Biol. 55 (1991) 139–235.
[164] R.M. Epand, R.F. Epand, Liposomes as models for antimicrobial peptides, Methods Enzym. 372 (2003) 124–133.
[165] Y. Shai, Mode of action of membrane active antimicrobial peptides, Biopolymers. 66 (2002) 236–248.
[166] L. Beven, H. Wroblewski, Effect of natural amphipathic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes, Res.Microbiol. 148 (1997) 163–175.
[167] D. Wade, A. Boman, B. Wahlin, C.M. Drain, D. Andreu, H.G. Boman, et al., All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides, ProcNatlAcadSci USA. 87 (1990) 4761–4765.
[168] A. Giangaspero, L. Sandri, A. Tossi, Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides, Eur.J.Biochem. 268 (2001) 5589–5600.
[169] N. Papo, Y. Shai, Exploring peptide membrane interaction using surface plasmon resonance: differentiation between pore formation versus membrane disruption by lytic peptides, Biochemistry. 42 (2003) 458–466.
[170] S. Kobayashi, Y. Hirakura, K. Matsuzaki, Bacteria-selective synergism between the antimicrobial peptides alpha-helical magainin 2 and cyclic beta-sheet tachyplesin I: toward cocktail therapy, Biochemistry. 40 (2001) 14330–14335.
[171] J.P. Tam, Y.A. Lu, J.L. Yang, K.W. Chiu, An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 96 (1999) 8913–8918.
[172] L. Beven, O. Helluin, G. Molle, H. Duclohier, H. Wroblewski, Correlation between anti-bacterial activity and pore sizes of two classes of voltage-dependent channel-forming peptides, Biochim.Biophys.Acta. 1421 (1999) 53–63.
[173] M. Dathe, C. Kaduk, E. Tachikawa, M.F. Melzig, H. Wenschuh, M. Bienert, Proline at position 14 of alamethicin is essential for hemolytic activity, catecholamine secretion from chromaffin cells and enhanced metabolic activity in endothelial cells, Biochim.Biophys.Acta. 1370 (1998) 175–183.
[174] H. Yan, R.E. Hancock, Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides, AntimicrobAgents Chemother. 45 (2001) 1558–1560.
[175] D.J. Craik, N.L. Daly, J. Mulvenna, M.R. Plan, M. Trabi, Discovery, structure and biological activities of the cyclotides, CurrProtein PeptSci. 5 (2004) 297–315.
[176] P. Nicolas, D. Vanhoye, M. Amiche, Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides, Peptides. 24 (2003) 1669–1680.
[177] A. Mor, K. Hani, P. Nicolas, The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms, J.Biol.Chem. 269 (1994) 31635–31641.
[178] T. Hara, Y. Mitani, K. Tanaka, N. Uematsu, A. Takakura, T. Tachi, et al., Heterodimer formation between the antimicrobial peptides magainin 2 and PGLa in lipid bilayers: a cross-linking study, Biochemistry. 40 (2001) 12395–12399.
[179] F. Garcia-Olmedo, A. Molina, J.M. Alamillo, P. Rodriguez-Palenzuela, Plant defense peptides, Biopolymers. 47 (1998) 479–491.
[180] P. Veronese, M.T. Ruiz, M.A. Coca, A. Hernandez-Lopez, H. Lee, J.I. Ibeas, et al., In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy, Plant Physiol. 131 (2003) 1580–1590.

[181] H. Duclohier, G. Molle, G. Spach, Antimicrobial peptide magainin I from Xenopus skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers, Biophys.J. 56 (1989) 1017–1021.
[182] B.L. Kagan, M.E. Selsted, T. Ganz, R.I. Lehrer, Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes, ProcNatlAcadSci USA. 87 (1990) 210–214.
[183] H.W. Huang, Action of antimicrobial peptides: two-state model, Biochemistry. 39 (2000) 8347–8352.
[184] M.T. Lee, F.Y. Chen, H.W. Huang, Energetics of pore formation induced by membrane active peptides, Biochemistry. 43 (2004) 3590–3599.
[185] W.T. Heller, K. He, S.J. Ludtke, T.A. Harroun, H.W. Huang, Effect of changing the size of lipid headgroup on peptide insertion into membranes, Biophys.J. 73 (1997) 239–244.
[186] J.R. Lewis, D.S. Cafiso, Correlation between the free energy of a channel-forming voltage-gated peptide and the spontaneous curvature of bilayer lipids, Biochemistry. 38 (1999) 5932–5938.
[187] L. Ding, L. Yang, T.M. Weiss, A.J. Waring, R.I. Lehrer, H.W. Huang, Interaction of antimicrobial peptides with lipopolysaccharides, Biochemistry. 42 (2003) 12251–12259.
[188] S.M. Bezrukov, R.P. Rand, I. Vodyanoy, V.A. Parsegian, Lipid packing stress and polypeptide aggregation: alamethicin channel probed by proton titration of lipid charge, Faraday Discuss. (1998) 173–183.
[189] S.L. Keller, S.M. Bezrukov, S.M. Gruner, M.W. Tate, I. Vodyanoy, V.A. Parsegian, Probability of alamethicin conductance states varies with nonlamellar tendency of bilayer phospholipids, Biophys.J. 65 (1993) 23–27.
[190] J.A. Killian, Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes, Biochim.Biophys.Acta. 1376 (1998) 401–415.
[191] M.. Sperotto, A theoretical model for the association of amphiphilic transmembrane peptides in lipid bilayers, Eur.Biophys.J. 26 (1997) 405–416.
[192] J.E. Hall, I. Vodyanoy, T.M. Balasubramanian, G.R. Marshall, Alamethicin. A rich model for channel behavior, Biophys.J. 45 (1984) 233–247.
[193] S.M. Dalla, G. Menestrina, Liposomes in the study of pore-forming toxins, Methods Enzym. 372:99-124. (2003) 99–124.
[194] L. Zhang, A. Rozek, R.E. Hancock, Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes, J.Biol.Chem. 276 (2001) 35714–35722.
[195] R.E. Hancock, M.G. Scott, The role of antimicrobial peptides in animal defenses, ProcNatlAcadSci USA. 97 (2000) 8856–8861.
[196] Y. Shai, Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides, Biochim.Biophys.Acta. 1462 (1999) 55–70.
[197] H. Duclohier, H. Wroblewski, Voltage-dependent pore formation and antimicrobial activity by alamethicin and analogues, J.Membr.Biol. 184 (2001) 1–12.
[198] K.A. Brogden, Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, Nat.Rev.Microbiol. 3 (2005) 238–250.
[199] S.-T.D. Hsu, E. Breukink, E. Tischenko, M.A.G. Lutters, B. de Kruijff, R. Kaptein, et al., The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics, Nat. Struct. Mol. Biol. 11 (2004) 963–967.
[200] E. Breukink, B. de Kruijff, The lantibiotic nisin, a special case or not?, Biochim.Biophys.Acta. 1462 (1999) 223–234.
[201] B.B. Finlay, R.E. Hancock, Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections?, Nat.Rev.Microbiol. 2 (2004) 497–504.
[202] J. Gesell, M. Zasloff, S.J. Opella, Two-dimensional 1H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/water solution, J.Biomol.NMR. 9 (1997) 127–135.

[203] A. Laederach, A.H. Andreotti, D.B. Fulton, Solution and micelle-bound structures of tachyplesin I and its active aromatic linear derivatives, Biochemistry. 41 (2002) 12359–12368.
[204] A. Rozek, C.L. Friedrich, R.E. Hancock, Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles, Biochemistry. 39 (2000) 15765–15774.
[205] G. Baumann, P. Mueller, A molecular model of membrane excitability, J.Supramol.Struct. 2 (1974) 538–557.
[206] G. Boheim, Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes, J.Membr.Biol. 19 (1974) 277–303.
[207] Z. Oren, Y. Shai, Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides, Biopolymers. 47 (1998) 451–463.
[208] F.Y. Chen, M.T. Lee, H.W. Huang, Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation, Biophys.J. 84 (2003) 3751–3758.
[209] H.W. Huang, Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity, Biochim. Biophys. Acta. 1758 (2006) 1292–1302.
[210] R.O. Fox, F.M. Richards, A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-A resolution, Nature. 300 (1982) 325–330.
[211] S.J. Ludtke, K. He, Y. Wu, H.W. Huang, Cooperative membrane insertion of magainin correlated with its cytolytic activity, Biochim.Biophys.Acta. 1190 (1994) 181–184.
[212] L. Yang, T.A. Harroun, T.M. Weiss, L. Ding, H.W. Huang, Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores, Biophys.J. 81 (2001) 1475–1485.
[213] A. Zemel, D.R. Fattal, A. Ben Shaul, Energetics and self-assembly of amphipathic peptide pores in lipid membranes, Biophys.J. 84 (2003) 2242–2255.
[214] N. Papo, Y. Shai, Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes?, Peptides. 24 (2003) 1693–1703.
[215] Y. Bessin, N. Saint, L. Marri, D. Marchini, G. Molle, Antibacterial activity and pore-forming properties of ceratotoxins: a mechanism of action based on the barrel stave model, Biochim.Biophys.Acta. 1667 (2004) 148–156.
[216] B. Bechinger, D.A. Skladnev, A. Ogrel, X. Li, E.V. Rogozhkina, T.V. Ovchinnikova, et al., 15N and 31P solid-state NMR investigations on the orientation of zervamicin II and alamethicin in phosphatidylcholine membranes, Biochemistry. 40 (2001) 9428–9437.
[217] K. Wakamatsu, A. Takeda, T. Tachi, K. Matsuzaki, Dimer structure of magainin 2 bound to phospholipid vesicles, Biopolymers. 64 (2002) 314–327.
[218] K. He, S.J. Ludtke, D.L. Worcester, H.W. Huang, Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores, Biophys.J. 70 (1996) 2659–2666.
[219] S.J. Ludtke, K. He, W.T. Heller, T.A. Harroun, L. Yang, H.W. Huang, Membrane pores induced by magainin, Biochemistry. 35 (1996) 13723–13728.
[220] N. Saint, L. Marri, D. Marchini, G. Molle, The antibacterial peptide ceratotoxin A displays alamethicin-like behavior in lipid bilayers, Peptides. 24 (2003) 1779–1784.
[221] N. Uematsu, K. Matsuzaki, Polar angle as a determinant of amphipathic alpha-helix-lipid interactions: a model peptide study, Biophys.J. 79 (2000) 2075–2083.
[222] D.P. Tieleman, V. Borisenko, M.S. Sansom, G.A. Woolley, Understanding pH-dependent selectivity of alamethicin K18 channels by computer simulation, Biophys.J. 84 (2003) 1464–1469.
[223] S. Qian, W. Wang, L. Yang, H.W. Huang, Structure of transmembrane pore induced by Bax-derived peptide: evidence for lipidic pores, Proc. Natl. Acad. Sci. 105 (2008) 17379–17383.
[224] R. Mani, S.D. Cady, M. Tang, A.J. Waring, R.I. Lehrer, M. Hong, Membrane-dependent oligomeric structure and pore formation of a beta-hairpin antimicrobial peptide in lipid bilayers from solid-state NMR, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103 (2006) 16242–16247.
[225] S. Qian, W. Wang, L. Yang, H.W. Huang, Structure of the alamethicin pore reconstructed by x-ray diffraction analysis, Biophys. J. 94 (2008) 3512–3522.

[226] G. Wang, X. Li, Z. Wang, APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design, Nucleic Acids Res. 37 (2009) D933–937.
[227] M. Dathe, T. Wieprecht, Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells, Biochim.Biophys.Acta. 1462 (1999) 71–87.
[228] M. Dathe, H. Nikolenko, J. Meyer, M. Beyermann, M. Bienert, Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge, FEBS Lett. 501 (2001) 146–150.
[229] M. Dathe, J. Meyer, M. Beyermann, B. Maul, C. Hoischen, M. Bienert, General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides, Biochim.Biophys.Acta. 1558 (2002) 171–186.
[230] L. Zhang, R. Benz, R.E. Hancock, Influence of proline residues on the antibacterial and synergistic activities of alpha-helical peptides, Biochemistry. 38 (1999) 8102–8111.
[231] J. Jacob, H. Duclohier, D.S. Cafiso, The role of proline and glycine in determining the backbone flexibility of a channel-forming peptide, Biophys.J. 76 (1999) 1367–1376.
[232] P.A. Grigoriev, B. Schlegel, M. Kronen, A. Berg, A. Hartl, U. Grafe, Differences in membrane pore formation by peptaibols, J.Pept.Sci. 9 (2003) 763–768.
[233] G. Menestrina, K.P. Voges, G. Jung, G. Boheim, Voltage-dependent channel formation by rods of helical polypeptides, J.Membr.Biol. 93 (1986) 111–132.
[234] M. Zasloff, B. Martin, H.C. Chen, Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues, ProcNatlAcadSci USA. 85 (1988) 910–913.
[235] H. Duclohier, Helical kink and channel behaviour: a comparative study with the peptaibols alamethicin, trichotoxin and antiamoebin, Eur.Biophys.J. 33 (2004) 169–174.
[236] D. Eisenberg, Three-dimensional structure of membrane and surface proteins, Annu.Rev.Biochem. 53:595-623. (1984) 595–623.
[237] D.J. Barlow, J.M. Thornton, Helix geometry in proteins, J.Mol.Biol. 201 (1988) 601–619.
[238] T. Blundell, D. Barlow, N. Borkakoti, J. Thornton, Solvent-induced distortions and the curvature of alpha-helices, Nature. 306 (1983) 281–283.
[239] A. Nicholls, B. Honig, A rapid finite difference algorithm, utilizing successive over-relaxation to solve the Poisson-Bolzmann equation, J.Comp.Chem. 12 (1990) 435–445.
[240] R.G. Efremov, A.J. Alix, Environmental characteristics of residues in proteins: three-dimensional molecular hydrophobicity potential approach, J.Biomol.Struct.Dyn. 11 (1993) 483–507.
[241] D.P. Tieleman, B. Hess, M.S. Sansom, Analysis and evaluation of channel models: simulations of alamethicin, Biophys.J. 83 (2002) 2393–2407.
[242] C.D. Fjell, J.A. Hiss, R.E.W. Hancock, G. Schneider, Designing antimicrobial peptides: form follows function, Nat. Rev. Drug Discov. 11 (2012) 37–51.
[243] E. Gwyer Findlay, S.M. Currie, D.J. Davidson, Cationic host defence peptides: potential as antiviral therapeutics, BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther. 27 (2013) 479–493.
[244] N. Do, G. Weindl, L. Grohmann, M. Salwiczek, B. Koksch, H.C. Korting, et al., Cationic membrane-active peptides - anticancer and antifungal activity as well as penetration into human skin, Exp. Dermatol. 23 (2014) 326–331.
[245] A. Peschel, How do bacteria resist human antimicrobial peptides?, Trends Microbiol. 10 (2002) 179–186.
[246] M.E. Selsted, Theta-defensins: cyclic antimicrobial peptides produced by binary ligation of truncated alpha-defensins, CurrProtein PeptSci. 5 (2004) 365–371.
[247] G. DeGray, K. Rajasekaran, F. Smith, J. Sanford, H. Daniell, Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi, Plant Physiol. 127 (2001) 852–862.
[248] T. Degenkolb, R. Karimi Aghcheh, R. Dieckmann, T. Neuhof, S.E. Baker, I.S. Druzhinina, et al., The Production of Multiple Small Peptaibol Families by Single 14-

Module Peptide Synthetases in Trichoderma/Hypocrea, Chem. Biodivers. 9 (2012) 499–535.
[249] A. Wiest, D. Grzegorski, B.W. Xu, C. Goulard, S. Rebuffat, D.J. Ebbole, et al., Identification of peptaibols from Trichoderma virens and cloning of a peptaibol synthetase, J.Biol.Chem. 277 (2002) 20862–20868.
[250] B. Hille, Ion Channels of Excitable Membranes (3rd ed.), Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, 2001.
[251] C. Derst, A. Karschin, Evolutionary link between prokaryotic and eukaryotic K+ channels, JExp Biol. 201 (1998) 2791–2799.
[252] F.H. Yu, W.A. Catterall, The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis, Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ. 2004 (2004) re15.
[253] Y. Kubo, T.J. Baldwin, Y.N. Jan, L.Y. Jan, Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel, Nature. 362 (1993) 127–133.
[254] D.A. Doyle, J.M. Cabral, R.A. Pfuetzner, A. Kuo, J.M. Gulbis, S.L. Cohen, et al., The structure of the potassium channel: molecular basis of K+ conduction and selectivity, Science. 280 (1998) 69–77.
[255] A.N. Miller, S.B. Long, Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1, Science. 335 (2012) 432–436.
[256] S.G. Brohawn, J. del Mármol, R. MacKinnon, Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K+ ion channel, Science. 335 (2012) 436–441.
[257] S.I. Borjesson, F. Elinder, Structure, function, and modification of the voltage sensor in voltage-gated ion channels, Cell Biochem. 52 (2008) 149–174.
[258] K.J. Swartz, Sensing voltage across lipid membranes, Nature. 456 (2008) 891–897.
[259] C.M. Armstrong, F. Bezanilla, Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels, Nature. 242 (1973) 459–461.
[260] N.E. Schoppa, K. McCormack, M.A. Tanouye, F.J. Sigworth, The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels, Science. 255 (1992) 1712–1715.
[261] S.K. Aggarwal, R. MacKinnon, Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K+ channel, Neuron. 16 (1996) 1169–1177.
[262] C.A. Ahern, R. Horn, Specificity of charge-carrying residues in the voltage sensor of potassium channels, J.Gen.Physiol. 123 (2004) 205–216.
[263] S.B. Long, X. Tao, E.B. Campbell, R. MacKinnon, Atomic structure of a voltage-dependent K+ channel in a lipid membrane-like environment, Nature. 450 (2007) 376–382.
[264] R. Mannikko, F. Elinder, H.P. Larsson, Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages, Nature. 419 (2002) 837–841.
[265] Z. Lu, A.M. Klem, Y. Ramu, Ion conduction pore is conserved among potassium channels, Nature. 413 (2001) 809–813.
[266] Z. Lu, A.M. Klem, Y. Ramu, Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K+ channels, J.Gen.Physiol. 120 (2002) 663–676.
[267] Y. Jiang, A. Lee, J. Chen, V. Ruta, M. Cadene, B.T. Chait, et al., X-ray structure of a voltage-dependent K+ channel, Nature. 423 (2003) 33–41.
[268] S. Chakrapani, L.G. Cuello, D.M. Cortes, E. Perozo, Structural dynamics of an isolated voltage-sensor domain in a lipid bilayer, Structure. 16 (2008) 398–409.
[269] Y. Murata, H. Iwasaki, M. Sasaki, K. Inaba, Y. Okamura, Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor, Nature. 435 (2005) 1239–1243.
[270] I.S. Ramsey, M.M. Moran, J.A. Chong, D.E. Clapham, A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain, Nature. 440 (2006) 1213–1216.
[271] M. Capasso, T.E. DeCoursey, M.J.S. Dyer, pH regulation and beyond: unanticipated functions for the voltage-gated proton channel, HVCN1, Trends Cell Biol. 21 (2011) 20–28.

[272] F. Tombola, M.H. Ulbrich, S.C. Kohout, E.Y. Isacoff, The opening of the two pores of the Hv1 voltage-gated proton channel is tuned by cooperativity, Nat. Struct. Mol. Biol. 17 (2010) 44–50.
[273] S. Mouhat, B. Jouirou, A. Mosbah, M. De Waard, J.-M. Sabatier, Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels, Biochem. J. 378 (2004) 717–726.
[274] F.M. Ashcroft, Ion channels and disease (1st ed.), Academic press, San Diego, CA, 2000.
[275] N.J. Bokil, J.M. Baisden, D.J. Radford, K.M. Summers, Molecular genetics of long QT syndrome, Mol. Genet. Metab. 101 (2010) 1–8.
[276] A.M. Waszkielewicz, A. Gunia, N. Szkaradek, K. Słoczyńska, S. Krupińska, H. Marona, Ion channels as drug targets in central nervous system disorders, Curr. Med. Chem. 20 (2013) 1241–1285.
[277] M.W. Pennington, C. Beeton, C.A. Galea, B.J. Smith, V. Chi, K.P. Monaghan, et al., Engineering a stable and selective peptide blocker of the Kv1.3 channel in T lymphocytes, Mol. Pharmacol. 75 (2009) 762–773.
[278] M.J. Gunthorpe, C.H. Large, R. Sankar, The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K+ channel opener for the treatment of epilepsy, Epilepsia. 53 (2012) 412–424.
[279] S.I. Borjesson, F. Elinder, An electrostatic potassium channel opener targeting the final voltage sensor transition, J. Gen. Physiol. 137 (2011) 563–577.
[280] S.Y. Lee, A. Lee, J. Chen, R. MacKinnon, Structure of the KvAP voltage-dependent K+ channel and its dependence on the lipid membrane, ProcNatlAcadSci USA. 102 (2005) 15441–15446.
[281] Y. Li-Smerin, K.J. Swartz, Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated Ca2+ and K+ channels, Proc Natl Acad Sci U A. 95 (1998) 8585–8589.
[282] A.A. Alabi, M.I. Bahamonde, H.J. Jung, J.I. Kim, K.J. Swartz, Portability of paddle motif function and pharmacology in voltage sensors, Nature. 450 (2007) 370–375.
[283] K.J. Swartz, Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels, Toxicon. 49 (2007) 213–230.
[284] K.J. Swartz, R. MacKinnon, Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K+ channels, Neuron. 18 (1997) 675–682.
[285] Y. Jiang, V. Ruta, J. Chen, A. Lee, R. MacKinnon, The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K+ channel, Nature. 423 (2003) 42–48.
[286] S.B. Long, E.B. Campbell, R. MacKinnon, Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K+ channel, Science. 309 (2005) 897–903.
[287] S.B. Long, E.B. Campbell, R. MacKinnon, Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling, Science. 309 (2005) 903–908.
[288] D.M. Papazian, X.M. Shao, S.A. Seoh, A.F. Mock, Y. Huang, D.H. Wainstock, Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K+ channel, Neuron. 14 (1995) 1293–1301.
[289] S.A. Seoh, D. Sigg, D.M. Papazian, F. Bezanilla, Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K+ channel, Neuron. 16 (1996) 1159–1167.
[290] N. Yang, R. Horn, Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels, Neuron. 15 (1995) 213–218.
[291] D.M. Starace, F. Bezanilla, A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field, Nature. 427 (2004) 548–553.
[292] O.K. Asamoah, J.P. Wuskell, L.M. Loew, F. Bezanilla, A fluorometric approach to local electric field measurements in a voltage-gated ion channel, Neuron. 37 (2003) 85–97.
[293] C.A. Ahern, R. Horn, Focused electric field across the voltage sensor of potassium channels, Neuron. 48 (2005) 25–29.
[294] X. Tao, A. Lee, W. Limapichat, D.A. Dougherty, R. MacKinnon, A gating charge transfer center in voltage sensors, Science. 328 (2010) 67–73.
[295] D. Schmidt, Q.X. Jiang, R. MacKinnon, Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors, Nature. 444 (2006) 775–779.

[296] Y. Ramu, Y. Xu, Z. Lu, Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels, Nature. 442 (2006) 696–699.
[297] Y. Xu, Y. Ramu, Z. Lu, Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K+ channels, Nature. 451 (2008) 826–829.
[298] H. Zheng, W. Liu, L.Y. Anderson, Q.-X. Jiang, Lipid-dependent gating of a voltage-gated potassium channel, Nat. Commun. 2 (2011) 250.
[299] L.G. Cuello, D.M. Cortes, E. Perozo, Molecular architecture of the KvAP voltage-dependent K+ channel in a lipid bilayer, Science. 306 (2004) 491–495.
[300] M. Milescu, F. Bosmans, S. Lee, A.A. Alabi, J.I. Kim, K.J. Swartz, Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins, Nat.Struct.Mol.Biol. 16 (2009) 1080–1085.
[301] D. Schmidt, R. MacKinnon, Voltage-dependent K+ channel gating and voltage sensor toxin sensitivity depend on the mechanical state of the lipid membrane, ProcNatlAcadSci USA. 105 (2008) 19276–19281.
[302] J. Payandeh, T. Scheuer, N. Zheng, W.A. Catterall, The crystal structure of a voltage-gated sodium channel, Nature. 475 (2011) 353–358.
[303] J. Payandeh, T.M. Gamal El-Din, T. Scheuer, N. Zheng, W.A. Catterall, Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states, Nature. 486 (2012) 135–139.
[304] X. Zhang, W. Ren, P. DeCaen, C. Yan, X. Tao, L. Tang, et al., Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel, Nature. 486 (2012) 130–134.
[305] M. Laine, M.C. Lin, J.P. Bannister, W.R. Silverman, A.F. Mock, B. Roux, et al., Atomic proximity between S4 segment and pore domain in Shaker potassium channels, Neuron. 39 (2003) 467–481.
[306] K. Takeshita, S. Sakata, E. Yamashita, Y. Fujiwara, A. Kawanabe, T. Kurokawa, et al., X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel, Nat. Struct. Mol. Biol. 21 (2014) 352–357.
[307] G.M. Clayton, S. Altieri, L. Heginbotham, V.M. Unger, J.H. Morais-Cabral, Structure of the transmembrane regions of a bacterial cyclic nucleotide-regulated channel, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105 (2008) 1511–1515.
[308] M. Liao, E. Cao, D. Julius, Y. Cheng, Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy, Nature. 504 (2013) 107–112.
[309] E. Cao, M. Liao, Y. Cheng, D. Julius, TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms, Nature. 504 (2013) 113–118.
[310] M. Vamvouka, J. Cieslak, E.N. Van, W. Hubbell, A. Gross, The structure of the lipid-embedded potassium channel voltage sensor determined by double-electron-electron resonance spectroscopy, Protein Sci. 17 (2008) 506–517.
[311] Q. Li, S. Wanderling, P. Sompornpisut, E. Perozo, Structural basis of lipid-driven conformational transitions in the KvAP voltage-sensing domain, Nat. Struct. Mol. Biol. (2014).
[312] D. Krepkiy, M. Mihailescu, J.A. Freites, E.V. Schow, D.L. Worcester, K. Gawrisch, et al., Structure and hydration of membranes embedded with voltage-sensing domains, Nature. 462 (2009) 473–479.
[313] D. Krepkiy, K. Gawrisch, K.J. Swartz, Structural Interactions between Lipids, Water and S1–S4 Voltage-Sensing Domains, J. Mol. Biol. 423 (2012) 632–647.
[314] J.A. Butterwick, R. MacKinnon, Solution Structure and Phospholipid Interactions of the Isolated Voltage-Sensor Domain from KvAP, J. Mol. Biol. 403 (2010) 591–606.
[315] U. Henrion, J. Renhorn, S.I. Börjesson, E.M. Nelson, C.S. Schwaiger, P. Bjelkmar, et al., Tracking a complete voltage-sensor cycle with metal-ion bridges, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (2012) 8552–8557.
[316] M.Ø. Jensen, V. Jogini, D.W. Borhani, A.E. Leffler, R.O. Dror, D.E. Shaw, Mechanism of voltage gating in potassium channels, Science. 336 (2012) 229–233.

[317] H.P. Larsson, O.S. Baker, D.S. Dhillon, E.Y. Isacoff, Transmembrane movement of the shaker K+ channel S4, Neuron. 16 (1996) 387–397.
[318] V. Ruta, J. Chen, R. MacKinnon, Calibrated measurement of gating-charge arginine displacement in the KvAP voltage-dependent K+ channel, Cell. 123 (2005) 463–475.
[319] N. Yang, A.L. George, R. Horn, Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels, Neuron. 16 (1996) 113–122.
[320] F.V. Campos, B. Chanda, B. Roux, F. Bezanilla, Two atomic constraints unambiguously position the S4 segment relative to S1 and S2 segments in the closed state of Shaker K channel, Proc Natl Acad Sci U A. 104 (2007) 7904–7909.
[321] R.B. Darman, A.A. Ivy, V. Ketty, R.O. Blaustein, Constraints on voltage sensor movement in the shaker K+ channel, J.Gen.Physiol. 128 (2006) 687–699.
[322] M. Milescu, J. Vobecky, S.H. Roh, S.H. Kim, H.J. Jung, J.I. Kim, et al., Tarantula toxins interact with voltage sensors within lipid membranes, J.Gen.Physiol. 130 (2007) 497–511.
[323] L.R. Phillips, M. Milescu, Y. Li-Smerin, J.A. Mindell, J.I. Kim, K.J. Swartz, Voltage-sensor activation with a tarantula toxin as cargo, Nature. 436 (2005) 857–860.
[324] Y. Xu, Y. Ramu, H.-G. Shin, J. Yamakaze, Z. Lu, Energetic role of the paddle motif in voltage gating of Shaker K(+) channels, Nat. Struct. Mol. Biol. 20 (2013) 574–581.
[325] E. Vargas, V. Yarov-Yarovoy, F. Khalili-Araghi, W.A. Catterall, M.L. Klein, M. Tarek, et al., An emerging consensus on voltage-dependent gating from computational modeling and molecular dynamics simulations, J. Gen. Physiol. 140 (2012) 587–594.
[326] A.Y. Shih, I.G. Denisov, J.C. Phillips, S.G. Sligar, K. Schulten, Molecular dynamics simulations of discoidal bilayers assembled from truncated human lipoproteins, Biophys. J. 88 (2005) 548–556.
[327] A. Ortega, J. García de la Torre, Hydrodynamic properties of rodlike and disklike particles in dilute solution, J. Chem. Phys. 119 (2003) 9914–9919.
[328] M.A. Carbone, P.M. Macdonald, Cardiotoxin II segregates phosphatidylglycerol from mixtures with phosphatidylcholine: (31)P and (2)H NMR spectroscopic evidence, Biochemistry. 35 (1996) 3368–3378.
[329] J.M. Pearce, R.A. Komoroski, Resolution of phospholipid molecular species by 31P NMR, Magn. Reson. Med. 29 (1993) 724–731.
[330] S. Uysal, V. Vásquez, V. Tereshko, K. Esaki, F.A. Fellouse, S.S. Sidhu, et al., Crystal structure of full-length KcsA in its closed conformation, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (2009) 6644–6649.
[331] D.M. Cortes, L.G. Cuello, E. Perozo, Molecular architecture of full-length KcsA: role of cytoplasmic domains in ion permeation and activation gating, J. Gen. Physiol. 117 (2001) 165–180.
[332] S. Jayaraman, D.L. Gantz, O. Gursky, Poly(ethylene glycol)-Induced Fusion and Destabilization of Human Plasma High-Density Lipoproteins, Biochemistry. 43 (2004) 5520–5531.
[333] M.A. Clay, D.H. Pyle, K.-A. Rye, P.J. Barter, Formation of spherical, reconstituted high density lipoproteins containing both apolipoproteins AI and A-II is mediated by lecithin: cholesterol acyltransferase, J. Biol. Chem. 275 (2000) 9019–9025.
[334] В.В.Чупин, О.В. Некрасова, М.П. Кирпичников, А.С. Арсеньев, Способ получения ренатурированных мембранных белков, Патент РФ № 2306319, 2007.
[335] F.I. Valiyaveetil, Y. Zhou, R. MacKinnon, Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K+ channel, Biochemistry. 41 (2002) 10771–10777.
[336] J.H. Chill, J.M. Louis, F. Delaglio, A. Bax, Local and global structure of the monomeric subunit of the potassium channel KcsA probed by NMR, Biochim.Biophys.Acta. 1768 (2007) 3260–3270.
[337] K.S. Huang, H. Bayley, M.J. Liao, E. London, H.G. Khorana, Refolding of an integral membrane protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments, J. Biol. Chem. 256 (1981) 3802–3809.

[338] J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, J. Mol. Biol. 157 (1982) 105–132.
[339] D.M. Lesovoy, E.V. Bocharov, E.N. Lyukmanova, Y.A. Kosinsky, M.A. Shulepko, D.A. Dolgikh, et al., Specific membrane binding of neurotoxin II can facilitate its delivery to acetylcholine receptor, Biophys. J. 97 (2009) 2089–2097.
[340] J. Andrä, I. Jakovkin, J. Grötzinger, O. Hecht, A.D. Krasnosdembskaya, T. Goldmann, et al., Structure and mode of action of the antimicrobial peptide arenicin, Biochem. J. 410 (2008) 113–122.
[341] J.F. Nagle, S. Tristram-Nagle, Structure of lipid bilayers, Biochim. Biophys. Acta. 1469 (2000) 159–195.
[342] F. Teixeira-Clerc, A. Ménez, P. Kessler, How do short neurotoxins bind to a muscular-type nicotinic acetylcholine receptor?, J. Biol. Chem. 277 (2002) 25741–25747.
[343] T.R. Schneider, J. Kärcher, E. Pohl, P. Lubini, G.M. Sheldrick, Ab initio structure determination of the lantibiotic mersacidin, Acta Crystallogr Biol Crystallogr. 56 (2000) 705–713.
[344] E. Breukink, B. de Kruijff, Lipid II as a target for antibiotics, Nat. Rev. Drug Discov. 5 (2006) 321–323.
[345] A.G. Poth, M.L. Colgrave, R. Philip, B. Kerenga, N.L. Daly, M.A. Anderson, et al., Discovery of Cyclotides in the Fabaceae Plant Family Provides New Insights into the Cyclization, Evolution, and Distribution of Circular Proteins, ACS Chem. Biol. 6 (2011) 345–355.
[346] J.F. Hernandez, J. Gagnon, L. Chiche, T.M. Nguyen, J.P. Andrieu, A. Heitz, et al., Squash trypsin inhibitors from Momordica cochinchinensis exhibit an atypical macrocyclic structure, Biochemistry. 39 (2000) 5722–5730.
[347] Y.-H. Huang, M.L. Colgrave, N.L. Daly, A. Keleshian, B. Martinac, D.J. Craik, The Biological Activity of the Prototypic Cyclotide Kalata B1 Is Modulated by the Formation of Multimeric Pores, J. Biol. Chem. 284 (2009) 20699–20707.
[348] C.K. Wang, H.P. Wacklin, D.J. Craik, Cyclotides Insert into Lipid Bilayers to Form Membrane Pores and Destabilize the Membrane through Hydrophobic and Phosphoethanolamine-specific Interactions, J. Biol. Chem. 287 (2012) 43884–43898.
[349] N.L. Daly, D.J. Craik, Bioactive cystine knot proteins, Curr. Opin. Chem. Biol. 15 (2011) 362–368.
[350] K.J. Rosengren, N.L. Daly, M.R. Plan, C. Waine, D.J. Craik, Twists, knots, and rings in proteins. Structural definition of the cyclotide framework, J.Biol.Chem. 278 (2003) 8606–8616.
[351] L. Gran, F. Sandberg, K. Sletten, Oldenlandia affinis (R&S) DC. A plant containing uteroactive peptides used in African traditional medicine, J.Ethnopharmacol. 70 (2000) 197–203.
[352] L. Skjeldal, L. Gran, K. Sletten, B.F. Volkman, Refined structure and metal binding site of the kalata B1 peptide, Arch.Biochem.Biophys. 399 (2002) 142–148.
[353] U. Goransson, D.J. Craik, Disulfide mapping of the cyclotide kalata B1. Chemical proof of the cystic cystine knot motif, J.Biol.Chem. 278 (2003) 48188–48196.
[354] H. Kamimori, K. Hall, D.J. Craik, M.I. Aguilar, Studies on the membrane interactions of the cyclotides kalata B1 and kalata B6 on model membrane systems by surface plasmon resonance, Anal.Biochem. 337 (2005) 149–153.
[355] M.R.R. Plan, U. Göransson, R.J. Clark, N.L. Daly, M.L. Colgrave, D.J. Craik, The cyclotide fingerprint in oldenlandia affinis: elucidation of chemically modified, linear and novel macrocyclic peptides, ChemBioChem. 8 (2007) 1001–1011.
[356] A. Bax, G.W. Vuister, S. Grzesiek, F. Delaglio, A.C. Wang, R. Tschudin, et al., Measurement of homo- and heteronuclear J couplings from quantitative J correlation, Methods Enzymol. 239 (1994) 79–105.

[357] L.R. Brown, C. Bösch, K. Wüthrich, Location and orientation relative to the micelle surface for glucagon in mixed micelles with dodecylphosphocholine: EPR and NMR studies, Biochim Biophys Acta. 642 (1981) 296–312.
[358] A.P. Golovanov, I.L. Barsukov, A.S. Arseniev, V.F. Bystrov, S.V. Sukhanov, L.I. Barsukov, The divalent cation-binding sites of gramicidin A transmembrane ion-channel, Biopolymers. 31 (1991) 425–434.
[359] M. Levitt, M.F. Perutz, Aromatic rings act as hydrogen bond acceptors, J. Mol. Biol. 201 (1988) 751–754.
[360] P.M. Macdonald, J. Seelig, Calcium binding to mixed phosphatidylglycerol-phosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium nuclear magnetic resonance, Biochemistry. 26 (1987) 1231–1240.
[361] L. van Alphen, A. Verkleij, J. Leunissen-Bijvelt, B. Lugtenberg, Architecture of the outer membrane of Escherichia coli. III. Protein-lipopolysaccharide complexes in intramembraneous particles, J. Bacteriol. 134 (1978) 1089–1098.
[362] A. Herrmann, E. Svangård, P. Claeson, J. Gullbo, L. Bohlin, U. Göransson, Key role of glutamic acid for the cytotoxic activity of the cyclotide cycloviolacin O2, Cell. Mol. Life Sci. 63 (2006) 235–245.
[363] S.M. Simonsen, L. Sando, K.J. Rosengren, C.K. Wang, M.L. Colgrave, N.L. Daly, et al., Alanine Scanning Mutagenesis of the Prototypic Cyclotide Reveals a Cluster of Residues Essential for Bioactivity, J. Biol. Chem. 283 (2008) 9805–9813.
[364] C.K. Wang, S.-H. Hu, J.L. Martin, T. Sjögren, J. Hajdu, L. Bohlin, et al., Combined X-ray and NMR Analysis of the Stability of the Cyclotide Cystine Knot Fold That Underpins Its Insecticidal Activity and Potential Use as a Drug Scaffold, J. Biol. Chem. 284 (2009) 10672–10683.
[365] C.K. Wang, M.L. Colgrave, D.C. Ireland, Q. Kaas, D.J. Craik, Despite a Conserved Cystine Knot Motif, Different Cyclotides Have Different Membrane Binding Modes, Biophys. J. 97 (2009) 1471–1481.
[366] S.T. Henriques, Y.-H. Huang, M.A.R.B. Castanho, L.A. Bagatolli, S. Sonza, G. Tachedjian, et al., Phosphatidylethanolamine Binding Is a Conserved Feature of Cyclotide-Membrane Interactions, J. Biol. Chem. 287 (2012) 33629–33643.
[367] S.T. Henriques, Y.-H. Huang, K.J. Rosengren, H.G. Franquelim, F.A. Carvalho, A. Johnson, et al., Decoding the Membrane Activity of the Cyclotide Kalata B1: THE IMPORTANCE OF PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE PHOSPHOLIPIDS AND LIPID ORGANIZATION ON HEMOLYTIC AND ANTI-HIV ACTIVITIES, J. Biol. Chem. 286 (2011) 24231–24241.
[368] T.V. Ovchinnikova, G.M. Aleshina, S.V. Balandin, A.D. Krasnosdembskaya, M.L. Markelov, E.I. Frolova, et al., Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta Arenicola marina, FEBS Lett. 577 (2004) 209–214.
[369] R. Cole, J.P. Loria, FAST-Modelfree: a program for rapid automated analysis of solution NMR spin-relaxation data, J. Biomol. NMR. 26 (2003) 203–213.
[370] G. Lipari, A. Szabo, Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity, J. Am. Chem. Soc. 104 (1982) 4546–4559.
[371] J.C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, et al., Scalable molecular dynamics with NAMD, J. Comput. Chem. 26 (2005) 1781–1802.
[372] A. D. MacKerell, D. Bashford, Bellott, R. L. Dunbrack, J.D. Evanseck, M.J. Field, et al., All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins†, J. Phys. Chem. B. 102 (1998) 3586–3616.
[373] P. Permi, I. Kilpeläinen, A. Annila, S. Heikkinen, Intensity modulated HSQC and HMQC: two simple methods to measure 3J(HNH)alpha in proteins, J. Biomol. NMR. 16 (2000) 29–37.

[374] D. Yang, L.E. Kay, Contributions to conformational entropy arising from bond vector fluctuations measured from NMR-derived order parameters: application to protein folding, J. Mol. Biol. 263 (1996) 369–382.
[375] J.J. Buffy, T. Hong, S. Yamaguchi, A.J. Waring, R.I. Lehrer, M. Hong, Solid-state NMR investigation of the depth of insertion of protegrin-1 in lipid bilayers using paramagnetic Mn2+, Biophys. J. 85 (2003) 2363–2373.
[376] P.C. Kahn, The interpretation of near-ultraviolet circular dichroism, Methods Enzymol. 61 (1979) 339–378.
[377] L.I. Barsukov, V.I. Kulikov, L.D. Bergelson, Lipid transfer proteins as a tool in the study of membrane structure. Inside-outside distribution of the phospholipids in the protoplasmic membrane of Micrococcus lysodeikticus, Biochem. Biophys. Res. Commun. 71 (1976) 704–711.
[378] J. Andrä, M.U. Hammer, J. Grötzinger, I. Jakovkin, B. Lindner, E. Vollmer, et al., Significance of the cyclic structure and of arginine residues for the antibacterial activity of arenicin-1 and its interaction with phospholipid and lipopolysaccharide model membranes, Biol. Chem. 390 (2009) 337–349.
[379] M. Dauplais, A. Lecoq, J. Song, J. Cotton, N. Jamin, B. Gilquin, et al., On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures, J. Biol. Chem. 272 (1997) 4302–4309.
[380] J.E. Tudor, P.K. Pallaghy, M.W. Pennington, R.S. Norton, Solution structure of ShK toxin, a novel potassium channel inhibitor from a sea anemone, Nat. Struct. Biol. 3 (1996) 317–320.
[381] B. Jouirou, S. Mouhat, N. Andreotti, M. De Waard, J.-M. Sabatier, Toxin determinants required for interaction with voltage-gated K+ channels, Toxicon. 43 (2004) 909–914.
[382] M.W. Pennington, V.M. Mahnir, I. Khaytin, I. Zaydenberg, M.E. Byrnes, W.R. Kem, An essential binding surface for ShK toxin interaction with rat brain potassium channels, Biochemistry. 35 (1996) 16407–16411.
[383] B. Gilquin, J. Racapé, A. Wrisch, V. Visan, A. Lecoq, S. Grissmer, et al., Structure of the BgK-Kv1.1 complex based on distance restraints identified by double mutant cycles. Molecular basis for convergent evolution of Kv1 channel blockers, J. Biol. Chem. 277 (2002) 37406–37413.
[384] S. Gasparini, J.M. Danse, A. Lecoq, S. Pinkasfeld, S. Zinn-Justin, L.C. Young, et al., Delineation of the functional site of alpha-dendrotoxin. The functional topographies of dendrotoxins are different but share a conserved core with those of other Kv1 potassium channel-blocking toxins, J. Biol. Chem. 273 (1998) 25393–25403.
[385] D. Naranjo, C. Miller, A strongly interacting pair of residues on the contact surface of charybdotoxin and a Shaker K+ channel, Neuron. 16 (1996) 123–130.
[386] L. Verdier, A. Al-Sabi, J.E.F. Rivier, B.M. Olivera, H. Terlau, T. Carlomagno, Identification of a novel pharmacophore for peptide toxins interacting with K+ channels, J. Biol. Chem. 280 (2005) 21246–21255.
[387] A. Loukas, M. Hintz, D. Linder, N.P. Mullin, J. Parkinson, K.K. Tetteh, et al., A family of secreted mucins from the parasitic nematode Toxocara canis bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs, J. Biol. Chem. 275 (2000) 39600–39607.
[388] S. Rangaraju, K.K. Khoo, Z.-P. Feng, G. Crossley, D. Nugent, I. Khaytin, et al., Potassium channel modulation by a toxin domain in matrix metalloprotease 23, J. Biol. Chem. 285 (2010) 9124–9136.
[389] G.M. Gibbs, M.J. Scanlon, J. Swarbrick, S. Curtis, E. Gallant, A.F. Dulhunty, et al., The cysteine-rich secretory protein domain of Tpx-1 is related to ion channel toxins and regulates ryanodine receptor Ca2+ signaling, J. Biol. Chem. 281 (2006) 4156–4163.
[390] F. Wang, H. Li, M. Liu, H. Song, H. Han, Q. Wang, et al., Structural and functional analysis of natrin, a venom protein that targets various ion channels, Biochem. Biophys. Res. Commun. 351 (2006) 443–448.

[391] Y. Yamazaki, T. Morita, Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins, Toxicon. 44 (2004) 227–231.
[392] J.-P.S. Powers, A. Tan, A. Ramamoorthy, R.E.W. Hancock, Solution Structure and Interaction of the Antimicrobial Polyphemusins with Lipid Membranes, Biochemistry. 44 (2005) 15504–15513.
[393] J.E. Tudor, M.W. Pennington, R.S. Norton, Ionisation behaviour and solution properties of the potassium-channel blocker ShK toxin, Eur. J. Biochem. FEBS. 251 (1998) 133–141.
[394] B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl, GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation, J. Chem. Theory Comput. 4 (2008) 435–447.
[395] N. Eswar, B. Webb, M.A. Marti-Renom, M.S. Madhusudhan, D. Eramian, M.-Y. Shen, et al., Comparative protein structure modeling using Modeller, Curr. Protoc. Bioinforma. Chapter 5 (2006) Unit 5.6.
[396] M. Shimoda, H. Takagi, S. Kurata, T. Yoshioka, S. Natori, Inhibition of the Ca(2+)-activated K(+)-channel by sapecin B, an insect antibacterial protein, FEBS Lett. 339 (1994) 59–62.
[397] N.Y. Yount, M.R. Yeaman, Multidimensional signatures in antimicrobial peptides, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 7363–7368.
[398] J.K. Chugh, B.A. Wallace, Peptaibols: models for ion channels, Biochem.Soc.Trans. 29 (2001) 565–570.
[399] L. Whitmore, B.A. Wallace, The Peptaibol Database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols, Nucleic Acids Res. 32 (2004) D593–D594.
[400] T. Degenkolb, A. Berg, W. Gams, B. Schlegel, U. Grafe, The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions, J.Pept.Sci. 9 (2003) 666–678.
[401] C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, C. Peggion, R.F. Epand, R.M. Epand, Lipopeptaibols, a novel family of membrane active, antimicrobial peptides, Cell MolLife Sci. 58 (2001) 1179–1188.
[402] K.L. Rinehart, J.C. Cook, H. Meng, K.L. Olson, R.C. Pandey, Mass spectrometric determination of molecular formulas for membrane-modifying antibiotics, Nature. 269 (1977) 832–833.
[403] I.L. Karle, J.L. Flippen-Anderson, S. Agarwalla, P. Balaram, Crystal structure of [Leu1]zervamicin, a membrane ion-channel peptide: implications for gating mechanisms, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 88 (1991) 5307–5311.
[404] M. Schiell, J. Hofmann, M. Kurz, F.R. Schmidt, L. Vértesy, M. Vogel, et al., Cephaibols, new peptaibol antibiotics with anthelmintic properties from Acremonium tubakii DSM 12774, J. Antibiot. (Tokyo). 54 (2001) 220–233.
[405] A. Jaworski, H. Bruckner, New sequences and new fungal producers of peptaibol antibiotics antiamoebins, J.Pept.Sci. 6 (2000) 149–167.
[406] S.J. Archer, J.F. Ellena, D.S. Cafiso, Dynamics and aggregation of the peptide ion channel alamethicin. Measurements using spin-labeled peptides, Biophys.J. 60 (1991) 389–398.
[407] W.C. Jen, G.A. Jones, D. Brewer, V.O. Parkinson, A. Taylor, The antibacterial activity of alamethicins and zervamicins, J.Appl.Bacteriol. 63 (1987) 293–298.
[408] H. Bruckner, H. Graf, Paracelsin, a peptide antibiotic containing alpha-aminoisobutyric acid, isolated from Trichoderma reesei Simmons. Part A, Experientia. 39 (1983) 528–530.
[409] M. el Hajji, S. Rebuffat, D. Lecommandeur, B. Bodo, Isolation and sequence determination of trichorzianines A antifungal peptides from Trichoderma harzianum, IntJPeptProtein Res. 29 (1987) 207–215.
[410] G. Nagaraj, M.V. Uma, M.S. Shivayogi, H. Balaram, Antimalarial activities of peptide antibiotics isolated from fungi, Antimicrob. Agents Chemother. 45 (2001) 145–149.

[411] L. Vertesy, M. Kurz, M. Schiell, J. Hofmann, Cephaibols: novel antiparasitics from Acremonium tubakii process for their production, and use thereof, Patent US 6582949, 2003.
[412] J.W. Metzger, B. Schlegel, W. Fleck, K. Dornberger, W. Ihn, W. Schade, et al., Chrysospermins, active peptides from apiocrea chrysosperma having a pharmacological effect and a use thereof, Patent US 5432157, 1995.
[413] M. Ritzau, S. Heinze, K. Dornberger, A. Berg, W. Fleck, B. Schlegel, et al., Ampullosporin, a new peptaibol-type antibiotic from Sepedonium ampullosporum HKI-0053 with neuroleptic activity in mice, J.Antibiot.(Tokyo). 50 (1997) 722–728.
[414] M. Lorito, V. Farkas, S. Rebuffat, B. Bodo, C.P. Kubicek, Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by Trichoderma harzianum, J.Bacteriol. 178 (1996) 6382–6385.
[415] M. Schirmbock, M. Lorito, Y.L. Wang, C.K. Hayes, I. risan-Atac, F. Scala, et al., Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of Trichoderma harzianum against phytopathogenic fungi, Appl.Environ.Microbiol. 60 (1994) 4364–4370.
[416] J. Engelberth, T. Koch, F. Kuhnemann, W. Boland, Channel-Forming Peptaibols Are Potent Elicitors of Plant Secondary Metabolism and Tendril Coiling, AngewChemIntEd Engl. 39 (2000) 1860–1862.
[417] Y.H. Kim, W.H. Yeo, Y.S. Kim, S.Y. Chae, K.S. Kim, Antivral activity of antibiotic peptaibols, chrysospermins B and D, produced by Apiocrea sp 14 against TMV infection, J.Microbiol.Biotech. 10 (2000) 522–528.
[418] B.S. Yun, I.D. Yoo, J.H. Kim, Y.H. Kim, S.J. Lee, K.S. Kim, et al., Peptaivirins A and B, two new antiviral peptaibols against TMV infection, Tetrahedron Lett. 41 (2000) 1429–1431.
[419] S. Wada, A. Iida, K. Asami, T. Fujita, Ion channel-forming property of trichorovin-XII, an 11-residue peptaibol from the fungus Trichoderma viride, in planar lipid bilayer membranes, Bioorg.Med.Chem.Lett. 6 (1996) 2275–2278.
[420] C. Toniolo, C. Peggion, M. Crisma, F. Formaggio, X. Shui, D.S. Eggleston, Structure determination of racemic trichogin A IV using centrosymmetric crystals, Nat.Struct.Biol. 1 (1994) 908–914.
[421] B. Bechinger, Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin, J.Membr.Biol. 156 (1997) 197–211.
[422] B. Bechinger, The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy, Biochim.Biophys.Acta. 1462 (1999) 157–183.
[423] C.L. North, J.C. Franklin, R.G. Bryant, D.S. Cafiso, Molecular flexibility demonstrated by paramagnetic enhancements of nuclear relaxation. Application to alamethicin: a voltage-gated peptide channel, Biophys.J. 67 (1994) 1861–1866.
[424] A.D. Argoudelis, L.E. Johnson, Antibiotics Zervacin I and Zervacin II and process for preparing the same, Patent US 3907990, 1975.
[425] P. Balaram, K. Krishna, M. Sukumar, I.R. Mellor, M.S. Sansom, The properties of ion channels formed by zervamicins, Eur.Biophys.J. 21 (1992) 117–128.
[426] T.N. Kropacheva, J. Raap, Voltage-dependent interaction of the peptaibol antibiotic zervamicin II with phospholipid vesicles, FEBS Lett. 460 (1999) 500–504.
[427] T.N. Kropacheva, J. Raap, Ion transport across a phospholipid membrane mediated by the peptide trichogin GA IV, Biochim.Biophys.Acta. 1567 (2002) 193–203.
[428] H. Bruckner, H. Graf, M. Bokel, Paracelsin; characterization by NMR spectroscopy and circular dichroism, and hemolytic properties of a peptaibol antibiotic from the cellulolytically active mold Trichoderma reesei. Part B, Experientia. 40 (1984) 1189–1197.

[429] C.F. Snook, G.A. Woolley, G. Oliva, V. Pattabhi, S.F. Wood, T.L. Blundell, et al., The structure and function of antiamoebin I, a proline-rich membrane-active polypeptide, Structure. 6 (1998) 783–792.
[430] H. Duclohier, C.F. Snook, B.A. Wallace, Antiamoebin can function as a carrier or as a pore-forming peptaibol, Biochim.Biophys.Acta. 1415 (1998) 255–260.
[431] T.N. Kropacheva, E.S. Salnikov, H.-H. Nguyen, S. Reissmann, Z.A. Yakimenko, A.A. Tagaev, et al., Membrane association and activity of 15/16-membered peptide antibiotics: zervamicin IIB, ampullosporin A and antiamoebin I, Biochim. Biophys. Acta. 1715 (2005) 6–18.
[432] I.L. Karle, J.L. Flippen-Anderson, S. Agarwalla, P. Balaram, Conformation of the flexible bent helix of Leu1-zervamicin in crystal C and a possible gating action for ion passage, Biopolymers. 34 (1994) 721–735.
[433] I.L. Karle, M.A. Perozzo, V.K. Mishra, P. Balaram, Crystal structure of the channel-forming polypeptide antiamoebin in a membrane-mimetic environment, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 95 (1998) 5501–5504.
[434] G. Bunkoczi, M. Schiell, L. Vertesy, G.M. Sheldrick, Crystal structures of cephaibols, J.Pept.Sci. 9 (2003) 745–752.
[435] I.L. Karle, J. Flippen-Anderson, M. Sukumar, P. Balaram, Conformation of a 16-residue zervamicin IIA analog peptide containing three different structural features: 3(10)-helix, alpha-helix, and beta-bend ribbon, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 84 (1987) 5087–5091.
[436] B.D. Blasio, V. Pavone, M. Saviano, A. Lombardi, F. Nastri, C. Pedone, et al., Structural characterization of the beta-bend ribbon spiral: crystallographic analysis of two long (L-Pro-Aib)n sequential peptides, J.Am.Chem.Soc. 114 (1992) 6273–6278.
[437] I. Segalas, Y. Prigent, D. Davoust, B. Bodo, S. Rebuffat, Characterization of a type of beta-bend ribbon spiral generated by the repeating (Xaa-Yaa-Aib-Pro) motif: the solution structure of Harzianin HC IX, a 14-residue peptaibol forming voltage-dependent ion channels, Biopolymers. 50 (1999) 71–85.
[438] T.P. Galbraith, R. Harris, P.C. Driscoll, B.A. Wallace, Solution NMR studies of antiamoebin, a membrane channel-forming polypeptide, Biophys.J. 84 (2003) 185–194.
[439] M.K. Das, S. Raghothama, P. Balaram, Membrane channel forming polypeptides. Molecular conformation and mitochondrial uncoupling activity of antiamoebin, an alpha-aminoisobutyric acid containing peptide, Biochemistry. 25 (1986) 7110–7117.
[440] N.A. Lehr, A. Meffert, L. Antelo, O. Sterner, H. Anke, R.W.S. Weber, Antiamoebins, myrocin B and the basis of antifungal antibiosis in the coprophilous fungus Stilbella erythrocephala (syn. S. fimetaria), FEMS Microbiol. Ecol. 55 (2006) 105–112.
[441] J.K. Chugh, H. Bruckner, B.A. Wallace, Model for a helical bundle channel based on the high-resolution crystal structure of trichotoxin_A50E, Biochemistry. 41 (2002) 12934–12941.
[442] R. Anders, O. Ohlenschlager, V. Soskic, H. Wenschuh, B. Heise, L.R. Brown, The NMR solution structure of the ion channel peptaibol chrysospermin C bound to dodecylphosphocholine micelles, Eur.J.Biochem. 267 (2000) 1784–1794.
[443] M. Kronen, H. Gorls, H.H. Nguyen, S. Reissmann, M. Bohl, J. Suhnel, et al., Crystal structure and conformational analysis of ampullosporin A, J.Pept.Sci. 9 (2003) 729–744.
[444] A. Schuster, M. Schmoll, Biology and biotechnology of Trichoderma, Appl. Microbiol. Biotechnol. 87 (2010) 787–799.
[445] G. Yoder, T.A. Keiderling, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, Characterization of beta-bend ribbon spiral forming peptides using electronic and vibrational CD, Biopolymers. 35 (1995) 103–111.
[446] C. Toniolo, A. Polese, F. Formaggio, M. Crisma, J. Kamphuis, Circular Dichroism Spectrum of a peptide 3(10)-helix, J.Am.Chem.Soc. 118 (1996) 2744–2745.
[447] M. Cai, Y. Huang, J. Liu, R. Krishnamoorthi, Solution conformations of proline rings in proteins studied by NMR spectroscopy, J.Biomol.NMR. 6 (1995) 123–128.

[448] M.S. Sansom, P. Balaram, I.L. Karle, Ion channel formation by zervamicin-IIB. A molecular modelling study, Eur.Biophys.J. 21 (1993) 369–383.
[449] A. Yee, R. Babiuk, J.D. O'Neil, The conformation of an alamethicin in methanol by multinuclear NMR spectroscopy and Distance Geometry/Simulated Annealing, Biopolymers. 36 (1995) 781–792.
[450] R. Anders, H. Wenschuh, V. Soskic, S. Fischer-Fruhholz, O. Ohlenschlager, K. Dornberger, et al., A solution NMR study of the selectively 13C, 15N-labeled peptaibol chrysospermin C in methanol, J.Pept.Res. 52 (1998) 34–44.
[451] N.J. Baxter, M.P. Williamson, Temperature dependence of 1H chemical shifts in proteins, J.Biomol.NMR. 9 (1997) 359–369.
[452] F. Cordier, S. Grzesiek, Direct Observation of Hydrogen Bonds in Proteins by Interresidue 3hJNC' Scalar Couplings, J.Am.Chem.Soc. 121 (1999) 1601–1602.
[453] G. Cornilescu, B.E. Ramirez, K. Frank, G.M. Clore, A.M. Gronenborn, A. Bax, Correlation between 3hJNC' and Hydrogen Bond Length in Proteins, J.Am.Chem.Soc. 121 (1999) 6275–6279.
[454] E.N. Baker, R.E. Hubbard, Hydrogen bonding in globular proteins, Prog.Biophys.Mol.Biol. 44 (1984) 97–179.
[455] M. Barfield, Structural dependencies of interresidue scalar coupling (h3)J(NC') and donor (1)H chemical shifts in the hydrogen bonding regions of proteins, J.Am.Chem.Soc. 124 (2002) 4158–4168.
[456] C. Scheurer, R. Bruschweiler, Quantum-chemical characterization of nuclear spin-spin couplings across hydrogen bonds, J.Am.Chem.Soc. 121 (1999) 8661–8662.
[457] P.R. Markwick, R. Sprangers, M. Sattler, Dynamic effects on j-couplings across hydrogen bonds in proteins, J.Am.Chem.Soc. 125 (2003) 644–645.
[458] V.A. Jaravine, A.T. Alexandrescu, S. Grzesiek, Observation of the closing of individual hydrogen bonds during TFE-induced helix formation in a peptide, Protein Sci. 10 (2001) 943–950.
[459] D.M. Korzhnev, E.V. Bocharov, A.V. Zhuravlyova, V.Y. Orekhov, T.V. Ovchinnikova, M. Billeter, et al., Backbone dynamics of the channel-forming antibiotic zervamicin IIB studied by 15N NMR relaxation, FEBS Lett. 495 (2001) 52–55.
[460] N. Juranic, P.K. Ilich, S. Macura, Hydrogen bonding networks in proteins as revealed by the amide 1JNC' coupling constant, J.Am.Chem.Soc. 117 (1995) 405–410.
[461] M. Llinas, M.P. Klein, Charge relay at the peptide bond. A proton magnetic resonance study of solvation effects on the amide electron density distribution, J.Am.Chem.Soc. 97 (1975) 4731–4737.
[462] N. Juranic, M.C. Moncrieffe, V.A. Likic, F.G. Prendergast, S. Macura, Structural dependencies of h3JNC' scalar coupling in protein H-bond chains, J.Am.Chem.Soc. 124 (2002) 14221–14226.
[463] T. Asakura, K. Taoka, M. Demura, M.P. Williamson, The relationship between amide proton chemical shifts and secondary structure in proteins, J.Biomol.NMR. 6 (1995) 227–236.
[464] D.S. Wishart, D.A. Case, Use of chemical shifts in macromolecular structure determination, Methods Enzym. 338 (2001) 3–34.
[465] F.J. Blanco, J. Herranz, C. Gonzalez, M.A. Jimenez, M. Rico, J. Santoro, et al., NMR chemical shifts: a tool to characterize distortions of peptide and protein helices, J.Am.Chem.Soc. 114 (1992) 9676–9677.
[466] A.A. Yee, K. Marat, J.D. O'Neil, The interactions with solvent, heat stability, and 13C-labelling of alamethicin, an ion-channel-forming peptide, Eur.J.Biochem. 243 (1997) 283–291.
[467] W. Hanke, G. Boheim, The lowest conductance state of the alamethicin pore, Biochim.Biophys.Acta. 596 (1980) 456–462.
[468] M. Eisenberg, J.E. Hall, C.A. Mead, The nature of the voltage-dependent conductance induced by alamethicin in black lipid membranes, J.Membr.Biol. 14 (1973) 143–176.

[469] A.D. Milov, Y.D. Tsvetkov, E.Y. Gorbunova, L.G. Mustaeva, T.V. Ovchinnikova, J. Raap, Self-aggregation properties of spin-labeled zervamicin IIA as studied by PELDOR spectroscopy, Biopolymers. 64 (2002) 328–336.
[470] J. Lauterwein, C. Bosch, L.R. Brown, K. Wuthrich, Physicochemical studies of the protein-lipid interactions in melittin-containing micelles, Biochim.Biophys.Acta. 556 (1979) 244–264.
[471] J.M. Schmidt, M. Blümel, F. Löhr, H. Rüterjans, Self-consistent 3J coupling analysis for the joint calibration of Karplus coefficients and evaluation of torsion angles, J. Biomol. NMR. 14 (1999) 1–12.
[472] J. Wirmer, H. Schwalbe, Angular dependence of 1J(Ni,Calphai) and 2J(Ni,Calpha(i-1)) coupling constants measured in J-modulated HSQCs, J. Biomol. NMR. 23 (2002) 47–55.
[473] F. Löhr, J.M. Schmidt, S. Maurer, H. Rüterjans, Improved measurement of (3)J(H(alpha)(i),N(i+1)) coupling constants in H(2)O dissolved proteins, J. Magn. Reson. 153 (2001) 75–82.
[474] G. Jung, H. Brückner, R. Bosch, W. Winter, H. Schaal, J. Strähle, Ac-L-Ala-Aib-L-Ala-OMe: X-Ray Analysis of a Distorted β-Bend and Magnetic Nonequivalence of Aib-Methyl Groups, Liebigs Ann. Chem. 1983 (1983) 1096–1106.
[475] R.-P. Hummel, C. Toniolo, G. Jung, Conformational Transitions between Enantiomeric 310-Helices, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 26 (1987) 1150–1152.
[476] M. Bellanda, E. Peggion, R. Bürgi, W. van Gunsteren, S. Mammi, Conformational study of an Aib-rich peptide in DMSO by NMR, J. Pept. Res. 57 (2001) 97–106.
[477] S. Aravinda, N. Shamala, P. Balaram, Aib residues in peptaibiotics and synthetic sequences: analysis of nonhelical conformations, Chem. Biodivers. 5 (2008) 1238–1262.
[478] I.L. Karle, P. Balaram, Structural characteristics of alpha-helical peptide molecules containing Aib residues, Biochemistry. 29 (1990) 6747–6756.
[479] A. Bavoso, E. Benedetti, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, C. Toniolo, et al., Long polypeptide 3(10)-helices at atomic resolution, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83 (1986) 1988–1992.
[480] A. Bavoso, E. Benedetti, B. Di Blasio, V. Pavone, C. Pedone, C. Toniolo, et al., Long, chiral polypeptide 3(10)-helices at atomic resolution, J. Biomol. Struct. Dyn. 5 (1988) 803–817.
[481] M. Kubasik, J. Kotz, C. Szabo, T. Furlong, J. Stace, Helix-helix interconversion rates of short 13C-labeled helical peptides as measured by dynamic NMR spectroscopy, Biopolymers. 78 (2005) 87–95.
[482] S. Rebuffat, C. Goulard, S. Hlimi, B. Bodo, Two unprecedented natural Aib-peptides with the (Xaa-Yaa-Aib-Pro) motif and an unusual C-terminus: structures, membrane-modifying and antibacterial properties of pseudokonins KL III and KL VI from the fungus Trichoderma pseudokoningii, J.Pept.Sci. 6 (2000) 519–533.
[483] B. von Freyberg, W. Braun, Efficient search for all low energy conformations of polypeptides by Monte Carlo methods., J.Comp.Chem. 12 (1991) 1065–1076.
[484] G. Nemethy, K.D. Gibson, K.A. Palmer, C.N. Yoon, G. Paterlini, A. Zagari, et al., Energy parameters in polypeptides. 10. Improved geometrical parameters and nonbonded interactions for use in the ECEPP/3 algorithm, with application to proline - containing peptides., J.Phys.Chem. 96 (1992) 6472–6484.
[485] R.G. Efremov, D.E. Nolde, G. Vergoten, A.S. Arseniev, A solvent model for simulations of peptides in bilayers. I. Membrane-promoting alpha-helix formation, Biophys.J. 76 (1999) 2448–2459.
[486] V.Y. Orekhov, D.E. Nolde, A.P. Golovanov, D.M. Korzhnev, A.S. Arseniev, Processing of heteronuclear NMR relaxation data with the new software DASHA, Appl. Magn. Reson. 9 (1995) 581–588.
[487] J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky, S.J. Glaser, et al., A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients, J.Biomol.NMR. 4 (1994) 301–306.

[488] D. Nietlispach, Suppression of anti-TROSY lines in a sensitivity enhanced gradient selection TROSY scheme, J. Biomol. NMR. 31 (2005) 161–166.
[489] A. Holt, J.A. Killian, Orientation and dynamics of transmembrane peptides: the power of simple models, Eur. Biophys. J. EBJ. 39 (2010) 609–621.
[490] D.P. Tieleman, M.S. Sansom, H.J. Berendsen, Alamethicin helices in a bilayer and in solution: molecular dynamics simulations, Biophys.J. 76 (1999) 40–49.
[491] P. Yang, F.-G. Wu, Z. Chen, Dependence of Alamethicin Membrane Orientation on the Solution Concentration, J. Phys. Chem. C. 117 (2013) 3358–3365.
[492] M.S. Sansom, Alamethicin and related peptaibols--model ion channels, Eur.Biophys.J. 22 (1993) 105–124.
[493] M.A. Wilson, C. Wei, P. Bjelkmar, B.A. Wallace, A. Pohorille, Molecular dynamics simulation of the antiamoebin ion channel: linking structure and conductance, Biophys. J. 100 (2011) 2394–2402.
[494] H. Morii, H. Yagi, H. Akutsu, N. Nomura, Y. Sako, Y. Koga, A novel phosphoglycolipid archaetidyl(glucosyl)inositol with two sesterterpanyl chains from the aerobic hyperthermophilic archaeon Aeropyrum pernix K1, Biochim. Biophys. Acta. 1436 (1999) 426–436.
[495] C. Tzitzilonis, C. Eichmann, I. Maslennikov, S. Choe, R. Riek, Detergent/Nanodisc Screening for High-Resolution NMR Studies of an Integral Membrane Protein Containing a Cytoplasmic Domain, PLoS ONE. 8 (2013) e54378.
[496] B.T. Farmer, R.A. Venters, Assignment of aliphatic side-chain 1HN/15N resonances in perdeuterated proteins, J Biomol NMR. 7 (1996) 59–71.
[497] K.H. Gardner, L.E. Kay, The use of 2H, 13C, 15N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins, Annu Rev Biophys Biomol Struct. 27 (1998) 357–406.
[498] E.J. Neale, H. Rong, C.J. Cockcroft, A. Sivaprasadarao, Mapping the membrane-aqueous border for the voltage-sensing domain of a potassium channel, J.Biol.Chem. 282 (2007) 37597–37604.
[499] I.D. Kuntz, P.A. Kosen, E.C. Craig, Amide chemical shifts in many helices in peptides and proteins are periodic, J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 1406–1408.
[500] N.E. Zhou, B.Y. Zhu, B.D. Sykes, R.S. Hodges, Relationship between amide proton chemical shifts and hydrogen bonding in amphipathic .alpha.-helical peptides, J. Am. Chem. Soc. 114 (1992) 4320–4326.
[501] Y. Shen, A. Bax, Protein backbone chemical shifts predicted from searching a database for torsion angle and sequence homology, J Biomol NMR. 38 (2007) 289–302.
[502] J.M. Kneller, M. Lu, C. Bracken, An effective method for the discrimination of motional anisotropy and chemical exchange, J Am Chem Soc. 124 (2002) 1852–1853.
[503] Z.A. Sands, A. Grottesi, M.S. Sansom, The intrinsic flexibility of the Kv voltage sensor and its implications for channel gating, Biophys J. 90 (2006) 1598–1606.
[504] Z.A. Sands, M.S. Sansom, How does a voltage sensor interact with a lipid bilayer? Simulations of a potassium channel domain, Structure. 15 (2007) 235–244.
[505] D.A. Dolgikh, R.I. Gilmanshin, E.V. Brazhnikov, V.E. Bychkova, G.V. Semisotnov, Venyaminov SYu, et al., Alpha-Lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure?, FEBS Lett. 136 (1981) 311–315.
[506] P. Curnow, P.J. Booth, Combined kinetic and thermodynamic analysis of alpha-helical membrane protein unfolding, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104 (2007) 18970–18975.
[507] C. Klammt, I. Maslennikov, M. Bayrhuber, C. Eichmann, N. Vajpai, E.J.C. Chiu, et al., Facile backbone structure determination of human membrane proteins by NMR spectroscopy, Nat. Methods. 9 (2012) 834–839.
[508] I. Maslennikov, C. Klammt, E. Hwang, G. Kefala, M. Okamura, L. Esquivies, et al., Membrane domain structures of three classes of histidine kinase receptors by cell-free expression and rapid NMR analysis, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107 (2010) 10902–10907.

[509] K.S. Mineev, D.M. Lesovoy, D.R. Usmanova, S.A. Goncharuk, M.A. Shulepko, E.N. Lyukmanova, et al., NMR-based approach to measure the free energy of transmembrane helix-helix interactions, Biochim. Biophys. Acta. 1838 (2014) 164–172.
[510] P.J. Booth, A successful change of circumstance: a transition state for membrane protein folding, Curr. Opin. Struct. Biol. 22 (2012) 469–475.
[511] H.J. Jung, J.Y. Lee, S.H. Kim, Y.J. Eu, S.Y. Shin, M. Milescu, et al., Solution structure and lipid membrane partitioning of VSTx1, an inhibitor of the KvAP potassium channel, Biochemistry. 44 (2005) 6015–6023.
[512] E. Redaelli, R.R. Cassulini, D.F. Silva, H. Clement, E. Schiavon, F.Z. Zamudio, et al., Target promiscuity and heterogeneous effects of tarantula venom peptides affecting Na+ and K+ ion channels, J. Biol. Chem. 285 (2010) 4130–4142.
[513] D. Schmidt, S.R. Cross, R. MacKinnon, A gating model for the archeal voltage-dependent K(+) channel KvAP in DPhPC and POPE:POPG decane lipid bilayers, J.Mol.Biol. 390 (2009) 902–912.
[514] C.L. Wee, D. Gavaghan, M.S.P. Sansom, Interactions Between a Voltage Sensor and a Toxin via Multiscale Simulations, Biophys. J. 98 (2010) 1558–1565.
[515] D.S. Wishart, C.G. Bigam, J. Yao, F. Abildgaard, H.J. Dyson, E. Oldfield, et al., 1H, 13C and 15N chemical shift referencing in biomolecular NMR, J.Biomol.NMR. 6 (1995) 135–140.
[516] N. Sreerama, R.W. Woody, Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set, Anal. Biochem. 287 (2000) 252–260.
[517] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar, Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions, J.Biomol.NMR. 2 (1992) 661–665.
[518] G. Lippens, C. Dhalluin, J.M. Wieruszeski, Use of a water flip-back pulse in the homonuclear NOESY experiment, J.Biomol.NMR. 5 (1995) 327–331.
[519] T.L. Hwang, A.J. Shaka, Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients, J. Magn. Reson. A. 112 (1995) 275–279.
[520] C. Bartels, T. Xia, M. Billiter, P. Guntert, K. Wuthrich, The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules, J.Biomol.NMR. 6 (1995) 1–10.
[521] J.E. Masse, R. Keller, AutoLink: automated sequential resonance assignment of biopolymers from NMR data by relative-hypothesis-prioritization-based simulated logic, J Magn Reson. 174 (2005) 133–151.
[522] H. Geen, R. Freeman, Band-selective radiofrequency pulses, J. Magn. Reson. 1969. 93 (1991) 93–141.
[523] G.T. Montelione, M.E. Winkler, P. Rauenbuehler, G. Wagner, Accurate measurements of long-range heteronuclear coupling constants from homonuclear 2D NMR spectra of isotope-enriched proteins, JMagn Reson. 82 (1989) 198–204.
[524] S. Heikkinen, P. Permi, I. Kilpelainen, Methods for the measurement of (1)J(NCalpha) and (2)J(NCalpha) from a simplified 2D (13)C(alpha)-coupled (15)N SE-HSQC spectrum, JMagn Reson. 148 (2001) 53–60.
[525] F. Delaglio, Z. Wu, A. Bax, Measurement of homonuclear proton couplings from regular 2D COSY spectra, J.Magn.Reson. 149 (2001) 276–281.
[526] C. Pérez, F. Löhr, H. Rüterjans, J.M. Schmidt, Self-consistent Karplus parametrization of 3J couplings depending on the polypeptide side-chain torsion chi1, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 7081–7093.
[527] T.L. Hwang, P.C. van Zijl, S. Mori, Accurate quantitation of water-amide proton exchange rates using the phase-modulated CLEAN chemical EXchange (CLEANEX-PM) approach with a Fast-HSQC (FHSQC) detection scheme, J. Biomol. NMR. 11 (1998) 221–226.

[528] P. Guntert, C. Mumenthaler, K. Wuthrich, Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA, J.Mol.Biol. 273 (1997) 283–298.
[529] G. Larsson, G. Martinez, J. Schleucher, S.S. Wijmenga, Detection of nano-second internal motion and determination of overall tumbling times independent of the time scale of internal motion in proteins from NMR relaxation data, J Biomol NMR. 27 (2003) 291–312.
[530] P. Dosset, J.C. Hus, M. Blackledge, D. Marion, Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data, J Biomol NMR. 16 (2000) 23–28.
[531] D.H. Wu, A.D. Chen, C.S. Johnson, An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses, J Magn Reson. 115 (1995) 260–264.
[532] C.S. Johnson, Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications, Prog NMR Spect. 34 (1999) 203–256.
[533] J.J. Chou, J.L. Baber, A. Bax, Characterization of phospholipid mixed micelles by translational diffusion, J Biomol NMR. 29 (2004) 299–308.
[534] J.H. Chill, J.M. Louis, J.L. Baber, A. Bax, Measurement of 15N relaxation in the detergent-solubilized tetrameric KcsA potassium channel, J.Biomol.NMR. 36 (2006) 123–136.
[535] R.A. Dwek, Nuclear magnetic resonance (N.M.R.) in biochemistry: applications to enzyme systems, Clarendon Press, 1973.
[536] H. Hong, N.H. Joh, J.U. Bowie, L.K. Tamm, Methods for measuring the thermodynamic stability of membrane proteins, Methods Enzymol. 455 (2009) 213–236.
[537] G. Nemethy, M.S. Pottle, H.A. Scheraga, Energy parameters in polypeptides. 9. Updating of geometrical parameters, nonbonded interactions, and hydrogen bond interactions for the naturally occurring amino acids, J.Phys.Chem. 87 (1983) 1883–1887.
[538] R. Koradi, M. Billeter, K. Wuthrich, MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, J.Mol.Graph. 14 (1996) 51–55.
[539] D. Frishman, P. Argos, Knowledge-based protein secondary structure assignment, Proteins. 23 (1995) 566–579.
[540] P. Dauber-Osguthorpe, V.A. Roberts, D.J. Osguthorpe, J. Wolff, M. Genest, A.T. Hagler, Structure and energetics of ligand binding to proteins: Escherichia coli dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system, Proteins StructFunctGenet. 4 (1988) 31–47.