

ЯКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.К. АММОСОВА

УДК 577.3

К.В. Шайтан, О.В. Левцова., И.Н. Николаев

**ДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ
С БИОМЕМБРАНАМИ**

Якутск

2008

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список использованных сокращений	4
Введение.....	5
Глава 1. Структура и функции некоторых антимикробных пептидов	6
1.1. Антимикробные пептиды, пептаиболы	6
1.1.2. Биологическая активность пептаиболов.	7
1.1.3. Действие на клетки млекопитающих.....	8
1.1.4. Специфичность действия пептаиболов	9
1.1.5. Биосинтез пептаиболов	10
1.1.6. Структура пептаиболов	11
1.2. Механизм действия.....	15
1.2.1. Модели образования каналов.	15
1.3. Трансмембранные каналы, образуемые пептаиболом.	18
1.3.1. Встраивание в липидный бислой.	18
1.3.2. Потенциал-зависимая активация каналов.	20
1.3.3. Проводимость каналов.	22
1.3.4. Теоретические оценки проводимости пептаиболовых каналов.	25
1.3.5. Селективность каналов.....	27
1.3.6. Теоретические исследования аламетицина.	28
1.4. Зервамицин ПВ, представитель класса пептаиболов	30
1.4.1. Структура молекулы зервамицина ПВ.	30
1.4.2. Проводимость зервамицинового канала.	33
Глава 2. Метод молекулярной динамики.	35
2.1. Физические основы.....	36
2.2. Валентные взаимодействия.....	38
2.3. Невалентные взаимодействия.....	40
2.4. Численное интегрирование	43
2.5. Поддержание постоянной температуры	45
2.5.1. Термостат Берендсена	46
2.5.2. Столкновительный термостат	47
2.5.3. Стохастическая динамика	47
2.6. Поддержание постоянного давления	48
2.7. Неравновесная молекулярная динамика	49
Глава 3. Динамика зервамицина ПВ в воде и в метаноле.	50
3.1. МД-протокол	51
3.2. Влияние аминокислотных замен на динамику спиральной структуры зервамицина ПВ в воде и в метаноле.	52
3.3. Димеризация молекул зервамицина ПВ в воде.....	59
Глава 4. Взаимодействие зервамицина ПВ с липидными бислоями, моделирующими мембрану эукариот и прокариот.	61
4.1. Исследуемые системы и МД-протокол	61
4.2. Взаимодействие зервамицина с поверхностью мембраны.	63
4.2.1. Взаимодействие с ПОФХ.....	63
4.2.2. Взаимодействие с ПОФЭ и ПОФГ	67

4.2.3 Димеризация молекул Zrv-ПВ на поверхности мембраны.....	71
4.3.4 Конформационные изменения молекул зервамицина ПВ в различных системах.	74
4.4. Встраивание зервамицина ПВ в мембрану.....	76
4.4.1. Встраивание в ПОФХ.....	77
4.4.2. Встраивание в ПОФГ и ПОФЭ.....	82
Глава 5. Динамика моделей зервамицинового канала.	88
5.1 Исследуемые системы и МД-протокол.....	89
5.2 Конформационная стабильность каналов.	91
5.3 Внутренний интерьер каналов.....	94
5.4 Прохождение ионов через пору канала N5.....	97
Заключение.....	99
Список литературы.....	1022

Список использованных сокращений

МД – молекулярная динамика;

Alm – аламетицин;

ZrvIIВ – зервамицин IIВ;

Zrv-Leu – зервамицин с заменой Trp1/Leu1;

Zrv-Gly7 – зервамицин с заменой Aib7/Gly7;

Zrv-Gly9 – зервамицин с заменой Aib9/Gly9;

Zrv-Gly8 – зервамицин с добавленным Gly в 8-е положение;

Aib – α -аминоизмасляная кислота;

Hyp – L-4-транс-гидроксипролин;

Iva – D-изовалин;

Phl – L-фенилаланинол;

BS-модель – модель Barrel-stabe;

ДКФХ – дикаприилфосфатидилхолин;

ДОФХ – диолеилфосфатидилхолин;

ПОФХ – пальмитоилолеилфосфатидилхолин;

ПОФЭ – пальмитоилолеилфосфатидилхолин;

ПОФГ – пальмитоилолеилфосфатидилхолин;

RMSD – среднеквадратичное отклонение

Введение

Возрастающая устойчивость патогенных микроорганизмов к используемым антибиотикам является серьезной медицинской проблемой [1]. В связи с этим весьма актуальным становится исследование новых антимикробных агентов, в частности, мембран-активных пептидов с целью создания препаратов нового поколения с заданной активностью и селективностью.

Среди мембран активных пептидов особой популярностью пользуются пептаиболы. Пептаиболы выделяются из почвенных грибов родов *Trichoderma* и *Emericellopsis* и представляют собой спиральные пептиды из 16-22 остатков с целым рядом специфических аминокислот. Они взаимодействуют с клеточной мембраной и образуют ионный каналы, тем самым, нарушая электрохимический баланс клетки. Данные каналы обладают интересными свойствами: несколькими хорошо определенными уровнями проводимости и потенциал-зависимостью. Размеры каналов, образованных молекулами пептаиболов, сравнительно небольшие, что делает их удобным объектом для исследования различных свойств мембранных каналов методами компьютерного моделирования.

Ниже проблема взаимодействия антимикробных пептидов с биомембранами обсуждается на примере одного из ярких представителей класса пептаиболов зервамицина ПВ, выделяемого из *Emericellopsis salmosynnemata*. Приводимые в монографии данные важны для дизайна новых пептидных антибиотиков с заданной селективностью и активностью.

Глава 1. Структура и функции некоторых антимикробных пептидов

1.1. Антимикробные пептиды, пептаиболы

Антимикробные агенты представляют собой широкий спектр химических соединений от небольших молекул до достаточно сложных полипептидов [2, 3]. Структурное разнообразие антибиотиков соответствует разнообразию механизмов действия, их мишенью могут быть различные клеточные структуры: цитоплазматическая мембрана, ДНК, рибосомы, разнообразные ферменты и т.д. У высших организмов антимикробные агенты являются основной составляющей врожденного иммунитета [4]. Большую группу антимикробных агентов составляют мембран-активные пептиды. Выбор мембраны как мишени обладает рядом преимуществ. Расположение ее на поверхности клеток позволяет быстро действовать, а участие во многих жизненно важных и консервативных процессах обеспечивает широкий спектр действия и препятствует образованию резистентных штаммов. Данные пептиды образуются в организме-хозяине двумя способами: у животных и растений они являются продуктами посттрансляционной модификации (рибосомальный синтез), а у грибов продуцируются специальными комплексами – синтетазами (нерибосомальный синтез).

Представителем последних является класс пептаиболов [5, 6]. Пептаиболы продуцируются почвенными грибами родов *Trichoderma* и *Emericellopsis* и родственными им. Некоторые представители паразитируют на других грибах и в связи с этим используются как биозащитные агенты при борьбе с грибковыми заболеваниями растений. Пептаиболы обладают линейной спиральной структурой и богаты нестандартными α,α -диалкилированными аминокислотами, а на С-конце имеют ацетилированный аминоспирт (Рис. 1), благодаря которым и получили свое название (сокращение от английского названия “peptides containing both an Aib residue and a C-terminal amino alcohol”).

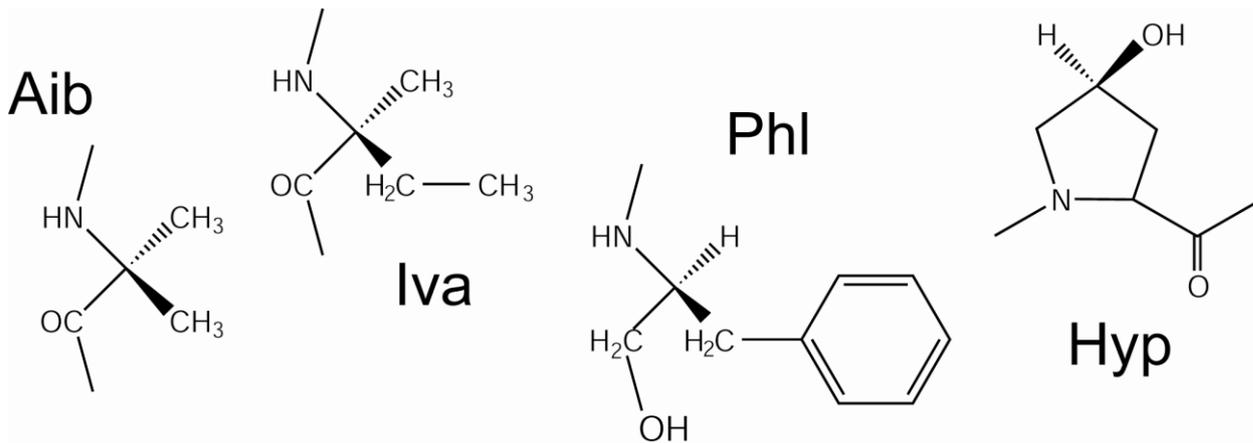


Рис. 1 Нестандартные аминокислотные остатки, встречающиеся в молекулах пептаиболов. Aib: α -аминоизомасляная кислота, Iva: D-изовалин, Phl: L-фенилаланинол, Hyp: L-4-транс-гидроксипролин.

1.1.2. Биологическая активность пептаиболов.

Пептаиболы обладают значительной антибактериальной активностью по отношению к грамположительным бактериям и менее активны против грам-отрицательных бактерий [7–10]. Различные штаммы *Mollicutes* – паразиты человека, животных и растений – чувствительны к большинству природных пептаиболов. Аламетицин ингибирует рост микоплазмы – бактерии, лишенной клеточной стенки [11]. Пептаиболы группы трихорзинов активны против *Mycoplasma*, *Spiroplasma* и *Staphylococcus aureus* [12].

Многие пептаиболы эффективны против эндо- и эктопаразитов (амеб, нематод) [8, 13–16]. Трихорзианин А и В ингибирует рост и вызывает лизис клеток амебы *Distyostelium* в концентрациях порядка 7мкМ, при этом действие пептаиболов уменьшается при встраивании холестерина в клеточную мембрану.

Пептаиболы, продуцируемые *Trichoderma harzianum* используется в борьбе против фитопатогенных грибов как биопестицид при культивировании хозяйственных растений [17–20]. Особенно они активны в смеси с гидролазами клеточной стенки (хитиназа и β -1,3-глюконаза). Гидролазы частично разрушают клеточную стенку и открывают доступ пептаиболам к клеточной мембране [21].

Пептаивирины А и В обладают сильной ингибирующей активностью в отношении к вирусу табачной мозаики.

Во многих случаях действием пептаиболов на эукариотические клетки начинается с митохондрий [22]. Молекулы пептаиболов разрушают внутреннюю мембрану митохондрий и разобщают цепь окислительного фосфорилирования [23–27]. При этом длинные пептаиболы более активны чем короткие. Однако пептаиболы не действуют на мембраны тонопластов растений [28]. Данное свойство пептаиболов используется в экспериментах по изучению внутреннего содержимого митохондрий, как наименее инвазивный метод для увеличения проницаемости митохондриальных мембран [29–31].

1.1.3. Действие на клетки млекопитающих

Некоторые пептаиболы, такие как трихоселлины А-II и В-II индуцируют выделение катехоламинов из клеток надпочечников, вызывая ток Ca^{2+} [32]. Эта активность напрямую связана с канал-формирующим свойством пептаиболов.

Была показана способность пептаиболов активировать аденилат- и гунилат-циклазы. Добавление очень малых концентраций аламетицина в культуру клеток мышинных лимфоцитов вызывало спонтанную проницаемость плазматической мембраны для АТФ и вызывало аденилатциклазную активность в клетке [33].

Трихорзин НА V является антагонистом кальцитонинового рецептора [34]. Также как и пептидный гормон кальцитонин, этот пептаибол повышает уровень цАМФ (циклический аденозинмонофосфат) в клетках экспрессирующих кальцитониновый рецептор в концентрациях от 0,5 мкМ. Трихорзин НА V стимулирует образование цАМФ в клетках экспрессирующих рекомбинантный человеческий кальцитониновый рецептор, но не вызывает на клетках не экспрессирующих данный рецептор,

следовательно он селективно взаимодействует с кальцитониновым рецептором. Для аламетицина подобной активности не было показано.

Трихорзин HA V (Trichorzin HA V)
Ace-Aib-Gly-Ala-Aib-Iva-Gln-Aib-Val-Aib-
-Gly-Leu-Aib-Pro-Leu-Aib-Iva-Gln-Leuol

Аламетицин (Alamethicin)
Ace-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-
-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol

Человеческий кальцитонин
Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-
-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-
-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

Рис. 2 Аминокислотная последовательность трихорзина HA V, аламетицина и человеческого кальцитонина

1.1.4 Специфичность действия пептаиболов

Пептаиболы также проявляют цитотоксическую активность против раковых клеток [9, 35, 36]. При действии на млекопитающих могут вызывать понижение температуры и уменьшение спонтанной двигательной активности при дозах порядка 1 мг/кг [37–40].

Различная специфичность действия антимикробных пептидов на клетки эукариот и прокариот обусловлена липидным составом клеточной мембраны. Цитоплазматическая мембрана млекопитающих в основном состоит из элеткронейтральных липидов (фосфатидилхолины и фосфатидилэтаноламины), а цитоплазматическая мембрана бактериальной клетки, наряду с нейтральными фосфатидилэтаноламинами, содержит большой процент отрицательнозаряженных липидов (фосфатидилглицеролы) и в целом имеет отрицательный заряд [41].

Помимо различного липидного состава, клетки прокариот и эукариот имеют различный трансмембранный потенциал. Для клеток млекопитающих характерно значение трансмембранного потенциала от -90 до -110 мВ, для клеток бактерий это значение обычно выше и составляет от -130 до -150 мВ.

Трансмембранный потенциал играет важную роль при встраивании антимикробных пептидов в мембрану, таким образом, они оказываются эффективнее против клеток прокариот.

Активность пептаиолов зависит от доли холестерина в мембране: при увеличении молярной фракции холестерина от 0 до 0,5 наблюдается уменьшение активности пептаиолов [42, 43].

1.1.5. Биосинтез пептаиолов

Пептаиолы являются продуктом нерибосомального синтеза и синтезируются большими мультиэнзимными комплексами – синтетазами (NRPS) [44–47]. Каждая синтаза может продуцировать только один тип пептида. Комплекс содержит ряд различных предшественников, включая небелковые аминокислоты, гидроксильные и карбоксильные остатки. Каждая аминокислота присоединяется к растущей пептидной цепочки отдельным ферментом. Процесс присоединения состоит из трех стадий, выполняемых отдельными автономными доменами фермента. На первой стадии с помощью А-домена аминокислота активируется за счет энергии АТФ. Далее активированная аминокислота переносится с помощью РСР-домена (Peptidyl carrier protein), к которому прикрепляется тиоэфирной связью. На третьей стадии С-домен образует пептидную связь между аминокислотным остатком, прикрепленным к своему РСР-домену, и растущей пептидной цепью, прикрепленной к предыдущему РСР-домену. На заключительной стадии синтеза пептида присоединяется амино спиртовой С-конец и пептид высвобождается из комплекса. В случае циклических пептидов, последний модуль образует пептидную связь между последним и первым аминокислотными остатками.

Как правило, один грибной штамм продуцирует смесь гомологичных пептидов, различающихся аминокислотными заменами в определенных положениях. Так, например, *Trichoderma viride* продуцирует аламетицин

(Alm), представляющий собой смесь из 23 пептидов. Данные пептиды делятся на 2 основные группы: отрицательно заряженный аламетицин F30 (10 пептидов) и нейтральный аламетицин F50 (13 пептидов). Эти группы различаются заменой Gln/Glu в 18-ом положении. В группе аламетицина F30 выделяются два основных пептида Alm F30/3 (46%) и Alm F30/7 (40%), различающихся заменой Aib/Ala в 6-ом положении. Аналогичные им пептиды из группы Alm F50 представлены в смеси в другом соотношении Alm F50/5 (75%) и AlmF50/7 (10%) [48, 49].

Соотношение различных пептидов в смеси зависит от условий культивации гриба. Так добавление Aib аминокислоты в среде культивирования *Trichoderma longibrachiatum* (продуцирует лонгибрахины, состоящие из 20 остатков) и *Trichoderma harzianum* (продуцирует трихорцин РА из 18 остатков и трихорцин РС из 14 остатков) уменьшает разнообразие смеси продуцируемых пептидов. Добавление Glu увеличивает процент отрицательно заряженных пептидов. Однако добавление положительно заряженных аминокислот, таких как Arg, в среду культивирования не влияет на состав смеси пептидов [50, 51]. Как и в случае с аламетицином, замены происходили только в определенных положениях. Из чего следует, что наличие «мутаций» в пептаиболах определяется разной специфичностью ферментов синтетазы к аминокислотам и иногда возникают «ошибки». Анализ последовательностей различных пептаиболов показал, что в основном встречаются следующие «мутации» Gln/Glu, Aib/Ala, Aib/Val/Leu, Aib/Ala/Gly, Leu/Val, Gly/Ala, Aib/Iva.

1.1.6. Структура пептаиболов

Пептаиболы представляют собой линейные амфипатические полипептиды, содержащие 5-20 аминокислотных остатков с высоким содержанием небелковых α,α -диалкилированных аминокислотных остатков, таких как α -аминоизомасляная кислота (Aib), D-изовалин (Iva) и

иминокислотных остатков пролин (Pro) и L-4-транс-гидроксипролин (Hyp) (Рис. 1).

Чаще всего встречаются отстатки Aib и Gln, Aib составляет порядка 40% от всех аминокислотных остатков. В коротких обычно меньше доля Aib, вероятно, это объясняется тем, что в случае длинных пептаиболов требуется большая доля спиральобразующих остатков, таких как Aib, для стабилизации спиральной структуры. Однако Aib никогда не встречается в позициях 18, 19 и 20 в длинных пептаиболах. Исследование влияния замены Ala/Aib на конформационное поведение полипептида Ace-Glu-Ala-Cys-Ala-Arg-Ala-X-Ala-Ala-Cys-Glu-Ala-Ala-Ala-Arg-Gln-NH₂ показало, что когда X=Ala пептид находится в конформации β-слоя, имеет ограниченную растворимость и склонен к образованию фибрилл. При X=Aib конформация пептида становится спиральной, значительно увеличивается растворимость, и пептид теряет способность образовывать фибриллы [52].

Второй аминокислотный остаток по частоте встречаемости в последовательности пептаиболов – глутамин. Он обычно присутствует в местах последовательности, например, в позиции 6 и 7, в позициях n-1 n-6, где n – количество аминокислотных остатков. Остатки Gln₆ и Gln₇, предположительно, играют важную роль в проведении ионов через пору трансмембранного канала.

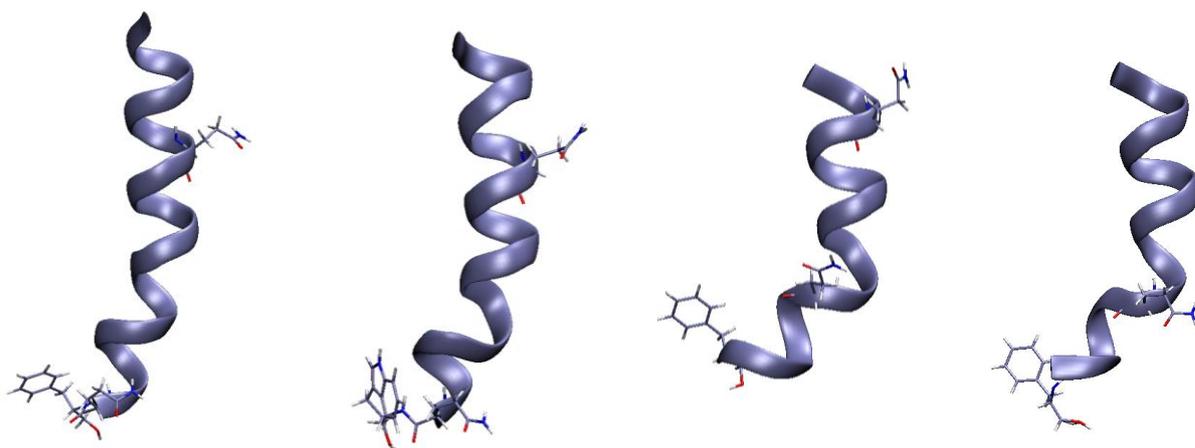
Как у большинства трансмембранных пептидов, ароматические остатки расположены практически исключительно на C- и N-концах, только у семи известных представителей класса пептаиболов ароматические остатки встречаются не на концевых участках. Таким образом, в трансмембранной конформации ароматические остатки располагаются на поверхности мембраны, там же где они чаще всего встречаются в большинстве трансмембранных белках. Предположительно, подобные остатки участвуют в стабилизации трансмембранного состояния за счет взаимодействия с полярными головками мембранных липидов.

Парное распределение аминокислотных остатков в первичной структуре пептаиболов не случайно. Например, перед пролином практически всегда располагается Aib, перед гидроксипролином – один из α,α -диалкилированных аминокислотных остатков (Aib или Iva), а глицин часто предшествует лейцину. Наиболее гидрофобные остатки, такие как валин и лейцин, практически никогда не встречаются после Aib [53].

Наиболее интересно взаимное расположение остатков Gly и Pro, которые могут отвечать за образование изломов в спиральных и β -слоях. Во всех известных пептаиболах Gly и Pro не встречаются рядом или разделенные одной аминокислотой (Gly-Pro, Pro-Gly, Gly-X-Pro, Pro-X-Gly), также не встречается последовательность вида Pro-X-X-Gly. Однако, в 130 из 300 известных пептаиболов есть последовательность Gly-X-X-Pro, которая структурно сопоставима с мотивом излома, но сильно отличается от классического поворота X-Pro-Gly-X [54]. Это может быть связано с тем, что роль пролина в пептаиболах заключается в формировании небольших искажений в спиральных структурах [55].

Некоторые основные аминокислотные остатки, такие как гистидин, аргинин и лизин и отрицательно заряженный аспартат, также как и серосодержащие метионин и цистеин не встречаются в первичной структуре пептаиболов. С-концевой остаток представляет собой аминоспирт, обычно фенилаланинол или лейцинол, на N-конце чаще всего ацетил.

Пептаиболы делятся на 3 группы [56]: длинные, состоящие из 18-20 аминокислотных остатка (например, аламетицин и трихорцианин), короткие из 11-16 аминокислотных остатка (например, зервамицин и харцианин) и липопептаиболы, состоящие из 6 -10 остатков и к N-концу присоединена короткая жирная кислота (например трихогин A IV [57, 58]).



аламетицин-Rf50
(Alamethicin-Rf50)

хризоспермин-А
(Chrysospermin-A)

зервамицин-IIIb
(Zervamicin-IIIb)

сефаибол А
(Cephaibol A)

Рис. 3 Спиральная структура некоторых пептаиболов. Выделены С-концевые аминокислоты и остатки Gln

Липопептаиболы обладают большей лизирующей способностью, чем остальные пептаиболы. С помощью рентгенодифракционного метода было показано, что пептидная часть образует спиральную структуру, подобно другим пептаиболам, а углеводородный хвост расположен перпендикулярно оси спирали [59, 60]. Предположительно, пептидная часть располагается параллельно поверхности мембраны, а гидрофобный хвост встраивается в липидный бислой. Однако такое взаимодействие не подходит для бочковой модели порообразования, с помощью которой объясняют механизм действия пептаиболов. Поэтому предполагается, что липопептаиболы действуют по другому механизму, а именно изменяют кривизну мембраны, что является крайне важным для поддержания гомеостаза. Таким образом, липопептиды не сами образуют мембранные поры, но, взаимодействуя с мембраной, способствуют спонтанному порообразованию [61].

В молекулах пептаиболов чаще всего встречаются 2 типа вторичной структуры: α -спираль, 3_{10} -спираль. Соотношение участков пептида в α -спирали или в 3_{10} -спирали определяется не только аминокислотным составом пептида (особую роль играют размеры боковых радикалов и их положение), но также длиной пептида и окружением [62]. 3_{10} -спираль по сравнению с α -

спиралью более стерически напряженная структура, но имеет большую длину при одинаковом количестве аминокислотных остатков [63], поэтому она чаще встречается у коротких пептаиболов. Направление закрутки спирали (левая или правая спирали) определяется наличием хиральных изомеров [64].

Исследование динамики длинных пептаиболов (аламетицина, трихолонгина) методом ЯМР показало наличие спираль-изгибающих (шарнирных) движений в быстром временном диапазоне (ниже наносекунд) [65, 66]. При попытках определить точную структуру аламетицина в метаноле методом ЯМР был получен набор структур, отличающихся конформацией в месте излома [67]. Эти данные указывают на подвижность пептида в области изгиба. Причем замена Pro/Ala¹⁴ не уменьшает амплитуды шарнирных движений, в то время как одновременная замена Gly/Ala¹¹ и Pro/Ala¹⁴ полностью останавливала шарнирные движения. Молекулярно-динамические расчеты в явно заданном растворителе метаноле также подтвердили наличие шарнирных движений [68, 69].

1.2. Механизм действия

Механизм действия всех антимикробных мембраноактивных пептидов схож. Они образуют мембранные поры, через которые могут передвигаться вода, ионы и содержимое клетки. Для некоторых антибиотиков, например грамицидина А, известно точное строение канала и процесс его формирования. Для большинства антимикробных пептидов таких данных нет. На данный момент существуют модели для описания процесса порообразования для различных классов антимикробных пептидов.

1.2.1. Модели образования каналов.

На сегодняшний день, широко известны 2 модели образования каналов (Рис. 4): бочковая модель (barrel-stabe model) для незаряженных пептидов [70–72] и модель тороидальных пор (toroidal или carpet model) для поликатионных пептидов [73–75].

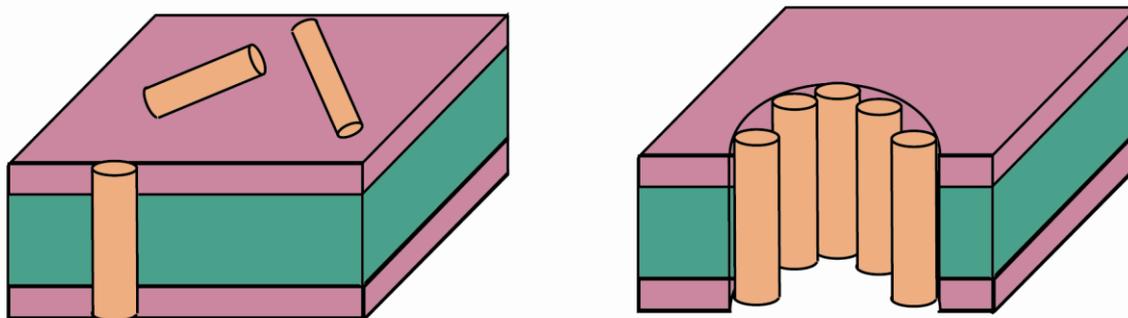
Согласно первой модели, пептид связывается с поверхностью мембраны и формирует спираль. Находясь на поверхности мембраны, пептид не погружается глубоко в гидрофобный слой и не вызывает сильных структурных изменений в липидном бислое. Далее под действием трансмембранного потенциала пептид встраивается в мембрану, переходя в трансмембранное состояние (ТМ). Несколько ТМ пептидов агрегируются и образуют канал. Проводящая форма канала представляет собой связку параллельных α -спиралей, окружающих пору, заполненную молекулами воды. При этом пептид обращен полярной поверхностью в пору, а неполярной к липидным хвостам липидов, окружающих пептиды. Теоретическое исследование данной модели показало хорошее согласование с экспериментальными значениями проводимости для каналов, состоящих из 5-8 мономеров [76–78].

Для катионных пептидов, например магаинина, было показано, что радиус поры канала составляет порядка 14 Å, а количество мономеров 4-7 на один канал. Для построения поры такого радиуса по типу бочковой поры необходимо минимум 11 молекул пептида, таким образом, магаинин образует тороидальные поры, стенки которой сформированы молекулами магаинина и липидными головками. В тороидальной модели пептид играет роль стабилизирующего агента, увеличивающее поверхностное натяжение полярных головок по сравнению с неполярными хвостами [74].

На первой стадии, пептид, как и в первой модели, связывается с поверхностью липидного бислоя и формирует спираль. Предположительно, пептид глубже встраивается в полярные головки, чем в случае первой модели. При связывании с поверхностью мембраны, пептид вызывает латеральное растяжение мембраны и уменьшение ее толщины [79, 80]. В

отличие от предыдущей модели пептид не встраивается в липидный бислой (не переходит в ТМ состояние), т.к. суммарный положительный заряд пептида делает это энергетически невыгодным. В данной модели пептиды при высокой концентрации сильно уменьшают энергию образования тороидальной поры, и делают это процесс спонтанным и энергетически выгодным [81].

А. Модель бочонка (Barrel-stave)



Б. Модель тороидальной поры (Toroidal)

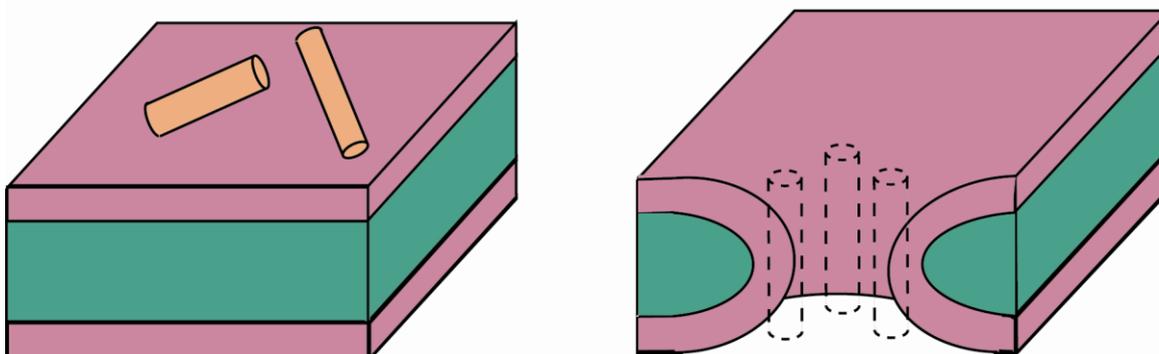


Рис. 4 Модели формирования мембранной поры антимикробными пептидами.

Гидрофобные пептиды, действующие по механизму Barrel-stave (BS-каналы), как правило, более активны и обладают меньшей специфичностью, так как связывается с цвиттерионными липидами лучше, чем катионные пептиды [82]. Каналы, образованные по механизму тороидальной поры, имеют короткое время жизни и не обладают выраженными уровнями проводимости [83]. BS-каналы обладают несколькими четко выраженными уровнями проводимости и относительно длинным временем жизни [84]. Оба типа каналов обладают слабой селективностью, однако селективность BS-

каналов зависит исключительно от свойств пептида, в то время как селективность тороидальных пор зависит также и от полярных головок липидов.

1.3. Трансмембранные каналы, образуемые пептаиболоми.

На данный момент не получена структура каналов, образованных пептаиболоми, но ряд экспериментальных данных косвенно свидетельствует о том, что формирования канала происходит по механизму Barrel stave. Исследуя утечку кальцеина и K^+ из липосом, был оценен радиус пор, образуемых антимикробными пептидами аламетицином и мелитгином, он составил 0,63-0,67 нм и более [85, 86]. Методом рассеяния нейтронов были исследованы размеры каналов. Каналы, образованные молекулами аламетицина имеют внутренний радиус поры 18 Å, а внешний 40 Å, что соответствует толщине стенки ~11 Å и примерно совпадает с диаметром α -спирали [87, 88] (аналогичные исследования для магаинина дали оценку толщины стенки 17 Å [74]). Также каналы, сформированные пептаиболоми, имеют четко выраженные уровни проводимости, что не свойственно для каналов, образованных по механизму тороидальной поры.

Все пептаиболоми, в отличие от катионных антимикробных пептидов, не несут большой суммарный заряд и достаточно гидрофобны, чтобы встраиваться в область углеводородных хвостов липидов. За счет направленности водородных связей все спирали пептаиболомов имеют дипольный момент, благодаря которому они могут встраиваться в мембрану под действием трансмембранного потенциала.

1.3.1. Встраивание в липидный бислой.

В BS-модели образования трансмембранных каналов, пептид переходит в трансмембранное состояние. Для пептаиболомов данный переход

индуцируется действием трансмембранного потенциала на пептид, расположенный на поверхности мембраны. Этим объясняется потенциал-зависимая активация пептаиболивых каналов [89]. Однако методами кругового дихроизма, рамановской спектроскопии и рентгенодифракционного метода было показано, что встраивание пептаиболив в липидный бислой может быть вызвано целым рядом факторов, независимых от трансмембранного потенциала, таких как низкая температура, гидратация и высокая концентрация [90, 91].

Предположительно длинные пептаиболи не обладают выраженной структурой вне мембраны, и образуют спиральные структуры только при связывании с мембранной поверхностью. Методом молекулярной динамики было показано, α -спиральная структура аламетицина в водном окружении разрушается за 300 пс, и среднеквадратичное отклонение (RMSD) C_{α} -атомов от начального положения за 2 нс достигает 0,7 нм. В метаноле спиральная структура аламетицина сохраняется в течение 2 нс, но пептид обладает повышенной подвижностью в области 10-13 аминокислотных остатков и совершает движения, сильно изгибающие спираль, максимальное значение RMSD в метаноле составляет 0,28 нм. В экспериментах, где молекула аламетицина помещалась на поверхность липидного бислоя ПОФХ и была встроена в липидный бислой параллельно нормали мембраны, спиральная структура сохранялась лучше всего и RMSD в обоих случаях не превышало 0,2 нм. Также при исследовании взаимодействия аламетицина с поверхностью мембраны, было показано, что пептид не погружается в область гидрофобных хвостов и взаимодействует с только липидными головками и молекулами воды [92, 93].

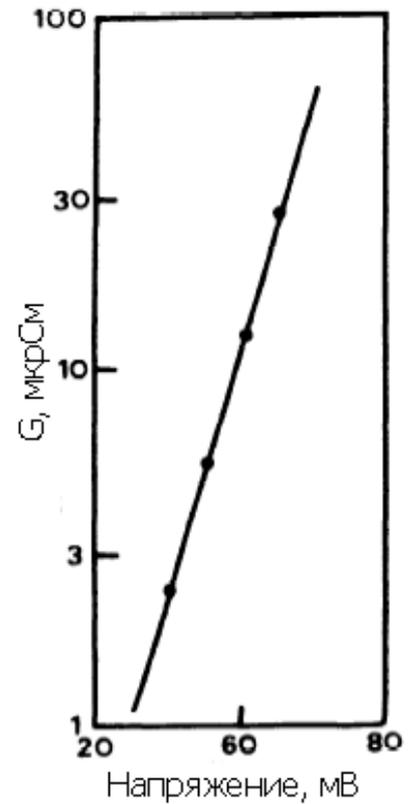
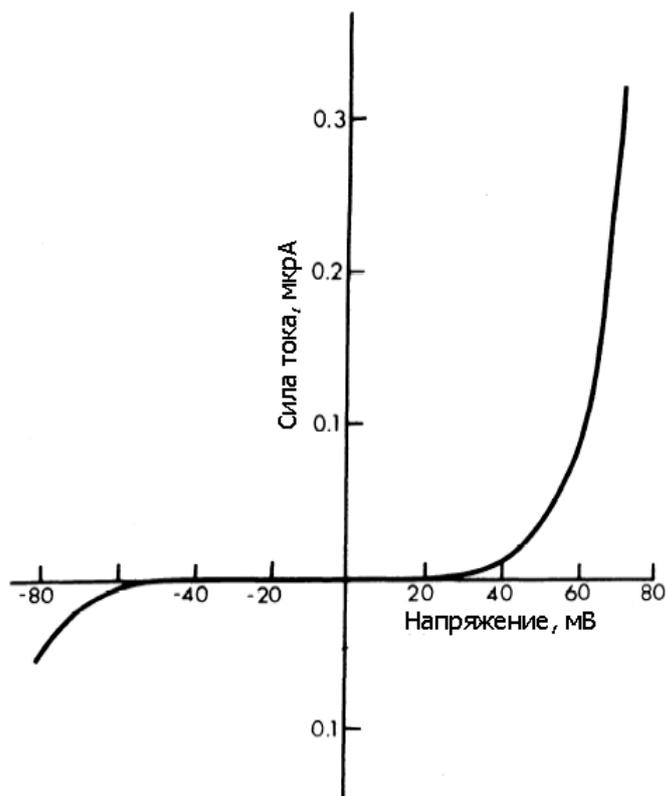
Для аламетицина было изучено потенциал-зависимое встраивание в октановый слой методом молекулярной динамики [94]. Под действием внешнего электростатического поля 0,3 В/нм встраивание происходит в течение 2 нс, между 16 и 18 нс траектории, при внешнем поле 0,5 В/нм – между 7,5 и 8,5 нс. Процесс встраивания происходит в три стадии. На первой

стадии встраивается N-конец пептида до Gln7, который удерживается на границе вода-октан водородными связями бокового радикала и молекул воды, и скорость встраивания снижается. На второй стадии встраивание продолжается до Aib10 и Gly11, атомы основной цепи которых образуют водородные связи с молекулами воды, что также приостанавливает дальнейшее погружение пептида в октановый слой. После разрыва этих водородных связей аламетицин полностью проникает в гидрофобный слой. При встраивании не происходит значительных изменений и изгибов спиральной структуры, а процесс встраивания происходит за счет поворота пептида относительно поверхности мембраны.

Соотношение молекул пептаиболов, находящихся в трансмембранном состоянии и на поверхности мембраны зависит от толщины мембраны. Так методом твердотельного ^{15}N -ЯМР для короткого пептаиболо зервамицина ПВ было показано, что в тонком бислое (ДКФХ (C10:0)) пептид находился преимущественно в трансмембранно состоянии, а в мембранах из длинных липидов (ДОФХ) он в основном располагался на поверхности мембраны. В мембранах с промежуточной толщиной наблюдалось равновесие между этими двумя состояниями [95].

1.3.2. Потенциал-зависимая активация каналов.

В экспериментальных работах было показано, что при отсутствии трансмембранного потенциала при добавлении аламетицина наблюдается слабый ток через мембрану, при включении потенциала (50 мВ) ток значительно увеличивается [96].



А

Б

Рис. 5 А. Вольт-амперная характеристика для глицеромоноолеатной мембраны с добавлением аламетицина. Б. Зависимость проводимости от приложенного напряжения. Аламетицин был добавлен только с одной стороны мембраны в концентрации 10^{-7} г/мл. [97]

Индукцированная аламетицином проводимость мембраны хорошо описывается уравнением

$$G = [\text{salt}]^{\alpha} [\text{Alm}]^{\beta} \exp^{\frac{\gamma e V}{k T}},$$

Где [salt] и [Alm] - концентрации соли и аламетицина в водной фазе соответственно, e - заряд электрона, V - напряжение, k - константа Больцмана, T - абсолютная температура. Параметры α , β и γ - параметры, зависящие от состава мембраны. Для сфингомиелин-токофероловой мембраны, например, все три параметра равны 6 [98]. Параметры $\alpha=4$, $\beta=9$, $\gamma=6$ хорошо описывают проводимость аламетициновых каналов в фосфатидилэтаноламин-декановой [99], глицеромоноолеат-холестерол-гексадекановой [100], диолеилфосфатидилхолин-декановой [101] мембранах. Параметры α , β и γ зависят от температуры, увеличиваясь при уменьшении температуры.

Наличие и форма кривой для асимметричного потенциала при добавлении аламетицина только с одной стороны мембраны зависит от липидного состава мембраны, некоторые липиды позволяют аламетицину проходить через мембрану с большей скоростью, чем скорость диссоциации пептида с поверхности мембраны, в этом случае вольт-амперная характеристика будет практически симметричной. Другие липиды, например бактериальный фосфатидилэтаноламин, не позволяют молекулам аламетицина быстро проникать через мембраны, тогда наблюдается сильно несимметричная вольт-амперная характеристика или полное отсутствие отрицательной ветви [102].

Механизм открытия и закрытия канала под действием трансмембранного потенциала значительно отличается от механизма открытия-закрытия в трансмембранных каналах подобных калиевым, где изменение трансмембранного потенциала вызывает конформационные изменения в белке. В случае с пептаиболами трансмембранный потенциал вызывает встраивание пептида в мембрану и дальнейшее формирование актинового канала [103, 104].

1.3.3. Проводимость каналов.

Увеличение проводимости мембраны при добавлении пептаибола обусловлено током ионов через ионные каналы, образованные несколькими молекулами пептаибола. При наложении потенциала на мембрану в присутствии пептаибола образуются каналы, флуктуации проводимости одиночного канала свидетельствует о периодическом включении и выключении канала, при этом открытое состояние канала характеризуется несколькими уровнями проводимости (Рис. 6).

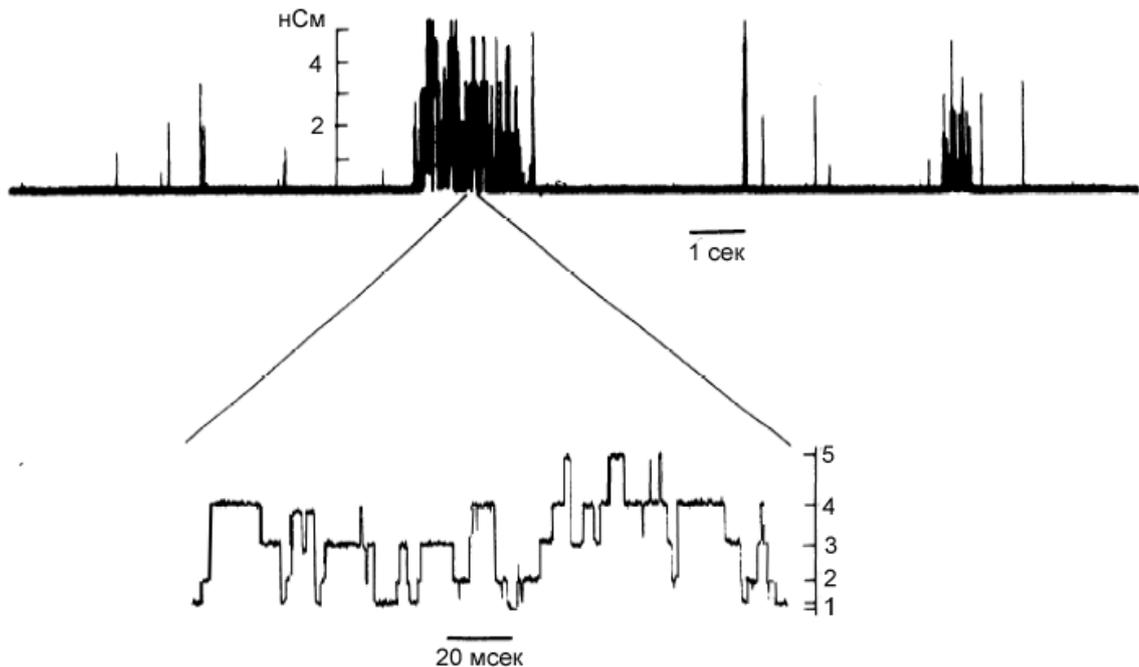


Рис. 6 Ток через единственный аламетициновый канал. Внизу растянутая временная шкала показывает различные уровни проводимости (шкала справа). На верхнем рисунке можно наблюдать до 6 уровней проводимости, не учитывая базовую проводимость мембраны. Глицеролмоноолеат-холестероловая мембрана 1:1. [42]

Данные уровни проводимости имеют следующие главные характеристики: 1) уровни проводимости не суммируются, 2) время жизни канала лежит в секундном диапазоне, а время жизни отдельного уровня проводимости – в миллисекундном, 3) нахождение канала в том или ином уровне проводимости не зависит от внешнего потенциала, 4) открытие и закрытие канала всегда происходит с наименьшего по проводимости уровня.

На динамику межуровневых переходов влияет целый ряд факторов: липидный состав мембраны, ионная сила раствора и т.д. Увеличение ионной силы раствора ведет к стабилизации низких уровней проводимости, за счет экранирования зарядов на атомах пептидов [105].

Добавление холестерина, также как и понижение температуры окружающей среды, значительно замедляет межуровневые переходы, что, видимо, связано с уменьшением подвижности пептидов в мембране за счет увеличения вязкости [106, 107].

Измерение проводимости на биологических мембранах (мембрана мышечных клеток лягушек и крыс) показало, что свойства одиночного

канала в целом такие же как и в искусственных липидных бислоях, однако скорость перехода между разными уровнями проводимости несколько отличается. Скорость перехода для сарколеммы крысы меньше чем для сарколеммы лягушки, которая в свою очередь почти в 14 раз меньше скорости перехода, чем в лецитиновом бислое. Такая разница может быть объяснена различной концентрацией холестерина в исследуемых мембранах [108].

Использование водорастворимых полимеров для изучения ионных каналов позволяет оценить размер поры в различных проводящих состояниях. Когда размер молекул полимера значительно меньше диаметра поры, они входят в канал и, препятствуя току ионов, уменьшают проводимость. Когда молекулы значительно больше поры, они вызывают изменение осмотического давления и увеличивают ток воды с ионами через поры канала, тем самым, увеличивая проводимость. Таким образом, исследуя изменение проводимости ионного канала при добавлении полимеров разного размера можно оценить размер поры канала. Данным методом были исследованы первые три уровня проводимости для аламетицина (за исключением нулевого уровня с самой малой проводимостью, так как ток в этом состоянии и время жизни очень малы), для более высоких уровней данным методом тяжело провести оценки, так как они наблюдаются достаточно редко. Радиусы пор для трех уровней составили $6,3 \pm 0,5 \text{ \AA}$, $10,3 \pm 0,6 \text{ \AA}$ и $11,4 \pm 0,8 \text{ \AA}$ соответственно [109].

Исследуя взаимосвязь концентрации пептида, макроскопической проводимости от внешнего напряжения, можно получить параметры, характеризующие единичный канал, такие как количество мономеров в канале и проведение иона на один мономер [110].

Зависимость макроскопической проводимости (G) от напряжения (V) и концентрации пептида (P) описывается следующим уравнением:

$$G = \Gamma P^{\langle N \rangle} e^{\frac{V}{V_e}}$$

Где G – константа, зависящая от типа пептида и липидного состава мембраны, $\langle N \rangle$ - среднее количество молекул, образующих канал, V_e – перепад напряжения, необходимый чтобы увеличить проводимость в e раз. V_e определяется следующим образом

$$V_e = \frac{kT}{e\langle N \rangle\alpha}$$

Где α - переносимый заряд на одну молекулу пептида в канале. Проанализировав зависимость макроскопической проводимости от напряжения можно оценить N и α . Зная зависимость проводимости от концентрации, выбирается произвольное значением проводимости, например 1 нСм, и для каждой концентрации определяется напряжение, необходимое, чтобы достигнуть данной проводимости, V_c . Затем определяется V_a как сдвиг V_c , получаемый увеличением концентрации в e раз. В итоге рассчитываем среднее количество мономеров в канале:

$$\langle N \rangle = \frac{V_a}{V_e}$$

Подобные оценки для аламетицина показали, что канал в среднем состоит из 8-10 мономеров [111]. В случае с трихотоксином канал состоит из 6 мономеров [112]. Предположительно, это связано с отсутствием излома в спиральной структуре трихотоксина, также это объясняет меньшую его чувствительность к внешнему потенциалу. Для зервамицинового канала количество мономеров порядка 13, и эффективный заряд, переносимый каждым мономером составляет $+0,41e$ [113].

1.3.4. Теоретические оценки проводимости пептаиболовых каналов.

Согласно бочковой модели (Barrel-stave model) образования каналов, n пептидов окружают пору радиуса r . Пептиды представляются в данной модели цилиндрами радиуса R . Тогда радиус поры находится из выражения [114]:

$$r = R \left[\frac{1}{\sin\left(\frac{\pi}{n}\right)} - 1 \right]$$

В ранних моделях для расчета проводимости подобных каналов, пора представлялась как правильный цилиндр с длиной l , заполненный электролитом с удельной сопротивляемостью ρ , в этом случае проводимость канала g_p рассчитывалась следующим образом [70, 115, 116]:

$$g_p = \frac{\pi r^2}{l \rho}$$

В более поздних работах [113] в расчет проводимости поры стали включать электрические свойства электролита снаружи поры, где суммируются токи около входов в пору. Проводимость каждой из этих зон приблизительно равно сумме сопротивления всего объема электролита между входами в пору и бесконечной полусферой. В таком приближении общая проводимость поры равна сумме проводимости поры и областей около двух входов:

$$g_p = \frac{\pi r^2}{\rho \left(l + \frac{\pi r}{2} \right)}$$

Для аламетицина $R=0,5$ нм $l=3$ нм. На Рис. 7 представлено сравнение теоретической оценки с экспериментальными данными. Несмотря на простоту модели, она показывает достаточно хорошие согласие с экспериментальными данными. Однако при большом значении внешнего потенциала, на значение проводимости начинает влиять диффузия ионов в растворе к поре канала, в этом случае экспериментальные данные оказываются меньше, чем теоретические оценки [76].

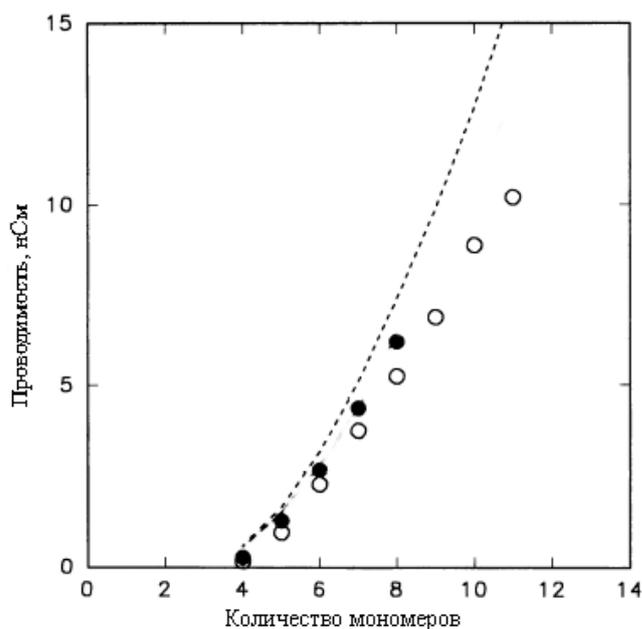


Рис. 7 Проводимость для аламетициновых каналов из разного количества мономеров: (●) экспериментальные данные при внешнем потенциале 100мВ и 1М КСl [70], (○) экспериментальные данные при потенциале 125 мВ и 0,5 М КСl [114]. Данные показаны с учетом концентрации КСl. Пунктирная линия – теоретическая оценка проводимости.

1.3.5. Селективность каналов

Каналы, образуемые пептаиболами, имеют большую селективность к катионам, но проводят и анионы. Из измерений макроскопической проводимости были получены отношения проводимостей катионов к проводимости ионов хлора для аламетицинового канала P_{Ca}/P_{Cl} , P_{Na}/P_{Cl} и P_K/P_{Cl} , которые составили 0.3, 1.6 и 2.7 соответственно [99]. Эти данные свидетельствуют об очень слабой селективности аламетицинового канала. Селективность более высоких уровней проводимости постепенно снижается. Измерения на уровнях с низкой проводимостью в растворе метил замещенного хлоридаммония показали, что эти уровни могут проводить катионы с радиусом не больше 0,28 нм [117]. Следовательно, ни тетраэтиламмоний, ни Трис не могут пройти через канал с низкими уровнями проводимости. Каналы со вторым уровнем проводимости и выше могут пропускать Трис ($r=0.3$ нм) и $HEPES^-$ ($r=0.33$ нм) [115] (Рис. 8).

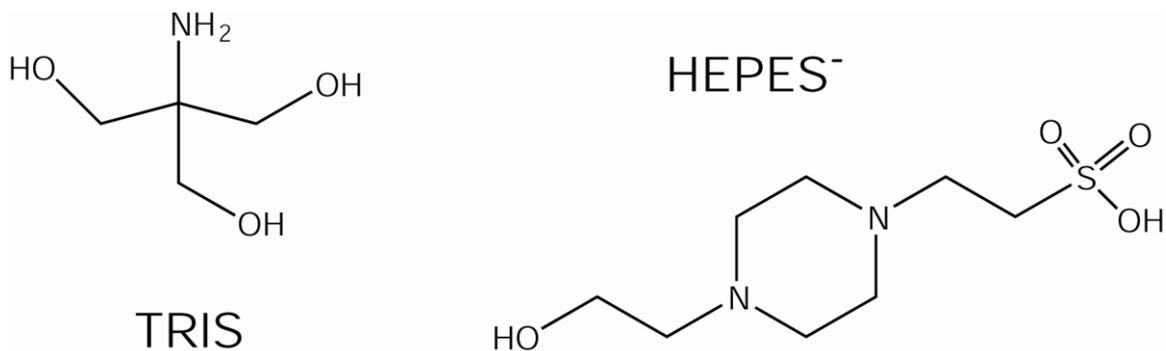


Рис. 8 Структура TRIS и HEPES⁻

Введение заряженных аминокислотных остатков значительно влияет на селективность каналов. Так замена Gln/Glu в середине цепи значительно увеличивает селективность по отношению к катионами [118]. Замена Gln на положительно заряженные остатки (Lys, Arg) делает каналы анион селективными [119].

Короткие пептаиболы часто имеют обратную последовательность селективности, так канал из молекул зервамицина IIВ лучше проводит Na⁺, чем K⁺.

1.3.6. Теоретические исследования аламетицина.

Аламетицин широко используется в теоретических исследованиях как модель мембранных каналов. Методом молекулярной динамики были изучены мембранные каналы, состоящие из 4-8 молекул аламетицина в бислое из пальмитоилолеоилфосфатидилхолиновых липидов [120]. Начальные конформации каналов были собраны с учетом следующих двух условий: в канале спирали направлены параллельно друг другу, боковой радикал Gln7 (и полярные поверхности пептидов) каждой молекулы аламетицина направлены в пору канала (Рис. 9). Стабильность структур каналов была оценена с помощью среднеквадратичного отклонения (RMSD). За первые 500 пс динамики RMSD канала из 4 мономеров (N4) достигла 0,3 нм, в то время как RMSD остальных каналов за 4 нс достигало только 0,2 нм, наименьшее RMSD через 4 нс было у канала из 6 пептидов (N6). Одна из молекул канала N4 потеряла свою спиральную структуру. В каналах N4 и N5

одна из спиралей перешла из α -спирали в 3_{10} -спираль. По данным RMSD и вторичной структуре пептидов канал N4 оказался наименее стабильным, а N6 наиболее стабильным.

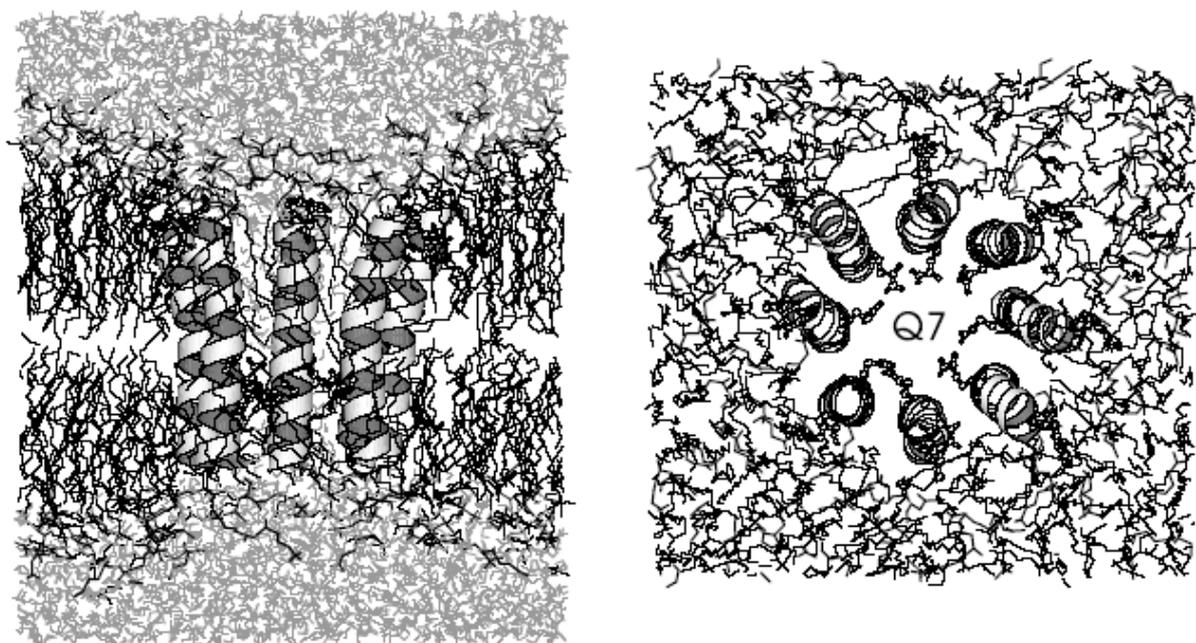


Рис. 9 Структура аламетицинового канала из 8 пептидов, встроенного в липидный бислой, выделены остатки Gln7.

На проводимость канала существенно влияют молекулы воды в поре канала. В канале N4 не наблюдалось непрерывного ряда молекул воды, это свидетельствует о том, что N4 не формирует стабильного канала, и согласно МД-расчетам наименьший уровень проводимости соответствует N5 каналу. В остальных каналах присутствуют хорошо выраженные ряды молекул воды, содержащие ~57 (N5), 63 (N6), 84 (N7) и 95 (N8) молекул.

С помощью программы HOLE в данных моделях каналов были посчитаны радиусы поры вдоль координаты канала. Для канала N4 наименьший радиус составил ~0,01 нм, что слишком мало для проведения ионов. Для канала N5 самая узкая область (0,08 нм) образуется остатками Glu18. Для остальных каналов (N6-N8) узкий участок поры соответствует кольцу из Gln7 и составляет 0,16 нм, 0,37 нм, 0,55 нм соответственно.

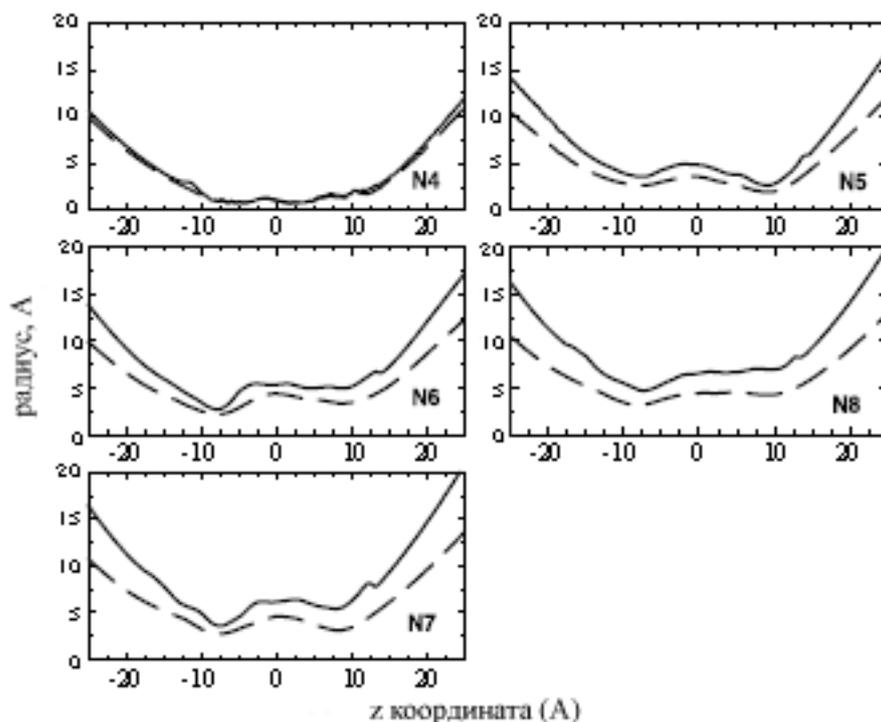
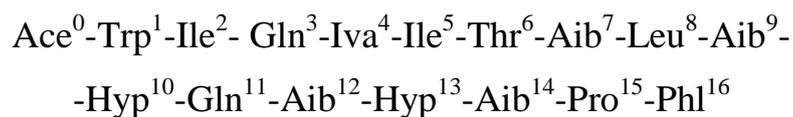


Рис. 10 Зависимость радиуса поры от координаты вдоль оси канала.

1.4. Зервамицин IIВ, представитель класса пептаиболов

Зервамицин IIВ - представитель класса пептаиболов, синтезируется грибом *Emericellopsis salmosynnemata* [121]. Молекула ZrvIIВ состоит из 16 аминокислотных остатков:



Было показано, что зервамицин IIВ обладает нейролептическим действием. Он уменьшает температуру тела и спонтанную двигательную активность у мышей в концентрациях порядка 0,5-12 мг/кг [37, 122].

1.4.1. Структура молекулы зервамицина IIВ.

Методом рентгеноструктурного анализа была определена структура Leu-зервамицина (Zrv-Leu), где Trp1 заменен на Leu [123]. В кристалле пептиды были упакованы в связки, формирующие каналы с молекулами

воды. Боковой радикал Gln11 одного из пептидов в каждой связке был обращен в пору канала. На основе этих данных была предложена модель, согласно которой переход из закрытого в открытое состояние под действием трансмембранного потенциала, происходит за счет движения боковых радикалов остатков Gln11 [123–125]. Однако данная модель не объясняет асимметрию вольтамперной характеристики и высокую потенциал-зависимость.

Методом двумерного ЯМР было показано, что зервамицин ПВ обладает спиральной структурой в растворах различной полярности (от смеси хлороформ/метанол (9:1, v/v) до смеси метанол/вода (1:1, v/v)), а также в растворе мицелл [126, 127]. Пептид формирует спираль длиной 26 Å с изгибом на остатке Nur10 равном ~ 40° в метаноле и ~ 26° в мицеллах ДФХ. N-конец пептида представляет собой α-спираль, а C-конец 3₁₀-спираль (Рис. 11). В отличие от длинных пептаиболов, например аламетицина, ZrvПВ не обладает высокоамплитудными движениями, изгибающими спираль. Вероятно, это связано с тем, что длина молекулы достаточно маленькая, ее уменьшение за счет шарнирных движений может значительно изменить дипольный момент пептида, а эффективной длины мономеров будет недостаточно чтобы образовать трансмембранный канал [128].

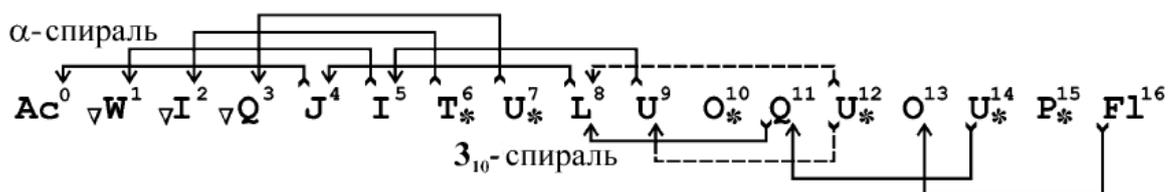


Рис. 11 Водородные связи в молекуле зервамицина ПВ. Пунктирной линией показана бифуркационная водородная связь. Остатки Ace, Aib, Iva, Nur и Phl в однобуквенном коде обозначаются Ac, U, J, O и Fl соответственно.

Молекула зервамицина ПВ представляет собой амфифильную структуру: полярные остатки пептида расположены на выпуклой поверхности изогнутой спирали, в то время как вогнутая сторона является гидрофобной. Помимо боковых радикалов полярных остатков (Thr⁶, Nur¹⁰, Gln¹¹ и Nur¹³) на выпуклой стороне экспонированы карбонильные

кислороды, не участвующие во внутримолекулярных водородных связях, остатков Aib7, Aib9 и Hyp10. При формировании канала из связки параллельных молекул ZrvIIВ, данные карбонильные кислороды могут формировать сайт связывания для моновалентных катионов, заменяя им гидратную оболочку, таким образом, определяя селективность канала. Подобным образом устроены сайты связывания грамицидинового канала и калиевых каналов KcsA, MthK и KvAp [129–132].

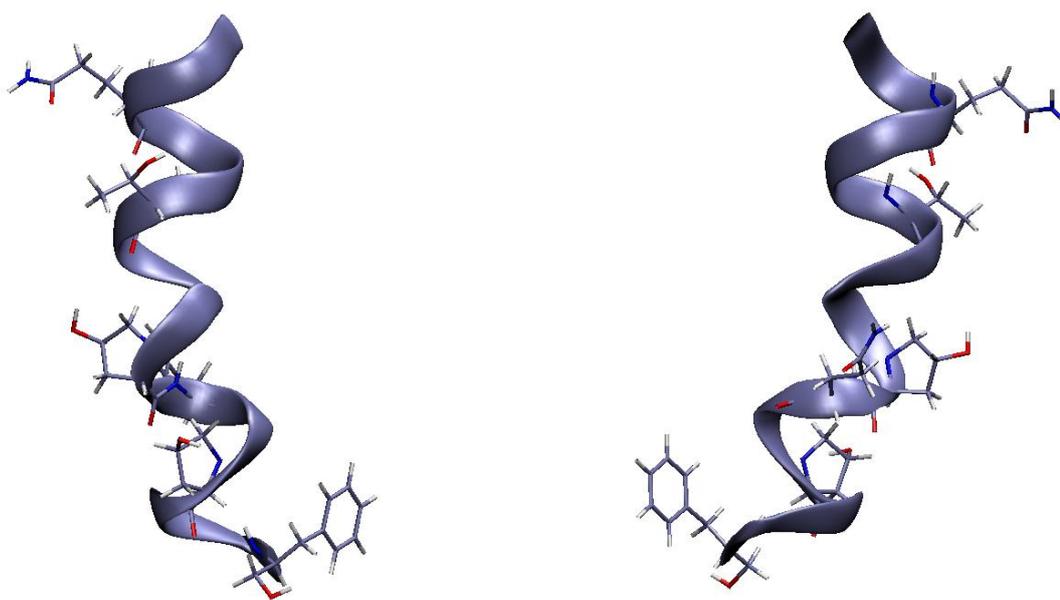


Рис. 12 Расположение полярных остатков в молекуле зервамицина IIВ. Выделены остатки Hyp, Thr, Gln, Phe.

Таким образом, в центральной части спирали на выпуклой стороне молекулы ZrvIIВ боковые радикалы и карбонильные кислороды формируют полярный участок, который значительно больше, чем аналогичная область у молекулы аламетицина. При формировании канала малой проводимости из 4 или 5 молекул, этот участок может значительно изменить селективность зервамицинового канала по отношению к аламетициновому. Каналы низкой проводимости, сформированные молекулами аламетицина в искусственных липидных бислоях, лучше проводят K^+ , чем Na^+ [115], для зервамицина IIВ в везикулах наблюдалась обратная селективность [133]. Поскольку измерения проводились в разных системах, а различия в проводимостях для ионов достаточно малы и из-за сложной структуры каналов могут иметь

статистическую погрешность для определенного уровня проводимости, нельзя с полной достоверностью сравнивать эти экспериментальные данные.

С использованием спин-меченных пептидов было показано, что при связывании с поверхностью ДФХ мицелл пептаибол глубже погружается N-концом. Исследования динамики ^{15}N меченного ZrvPB методом ЯМР в растворе метанола показали наличие в микросекундном диапазоне конформационных изменений на полярной поверхности мембраны [134], однако структура достаточно жесткая на наносекундной временной шкале. Согласно этим данным зервамицин PB обладает спиральной структурой не только на поверхности липидного бислоя.

1.4.2 Проводимость зервамицинового канала.

Проводимость липидных бислоев при добавлении зервамицина PB, так же как и в случае с другими пептаиболами, характеризуется многоуровневостью (Рис. 13А), а максимальная проводимость составляет порядка 12 нСм. На Рис. 13А приведено сравнение кинетики перехода между уровнями проводимости для аламетицина и зервамицина PB, для зервамицина наблюдается большее количество уровней проводимости и более частый переход между ними чем для аламетицина, что может быть связано с меньшим размером пептида и большей его подвижностью в липидном бислое. Замена триптофана (Trp1) на лейцин (Leu1) в последовательности зервамицина PB (Zer-Leu), уменьшает максимальную проводимость до 4 нСм и делает переходы между уровнями проводимости более частыми и менее выраженными. Роль триптофанового остатка заключается в стабилизации трансмембранного состояния пептаиболов благодаря взаимодействию с полярными головками, замена его на другой неполярный аминокислотный остаток уменьшает время жизни трансмембранного состояния отдельной молекулы и увеличивает диффузию

пептида в липидном бислое, что приводит к быстрой смене количества мономеров в мембранном канале.

Для оценки вероятности встречаемости различных уровней проводимости была составлена гистограмма (Рис. 13Б). Для зервамицина ПВ наблюдается 13 различных уровней проводимости с разбросом от 350 пСм (эквивалентно $3,8 \times 10^8$ ионов/сек) до 12 нСм ($1,3 \times 10^{10}$ ионов/сек). Низкие уровни проводимости связаны с образованием ионных трансмембранных каналов, в то время как более высокие уровни, более вероятно, определяются образованием больших пор, заполненных электролитами. Принципиальным различием между каналом и порой в данном случае является роль внутреннего интерфейса поры, образованного молекулами пептида. Для канала, он является определяющим для селективности и скорости проведения ионов. Для большой поры, заполненной электролитом, интерфейс практически не влияет на проведение ионов и небольших молекул.

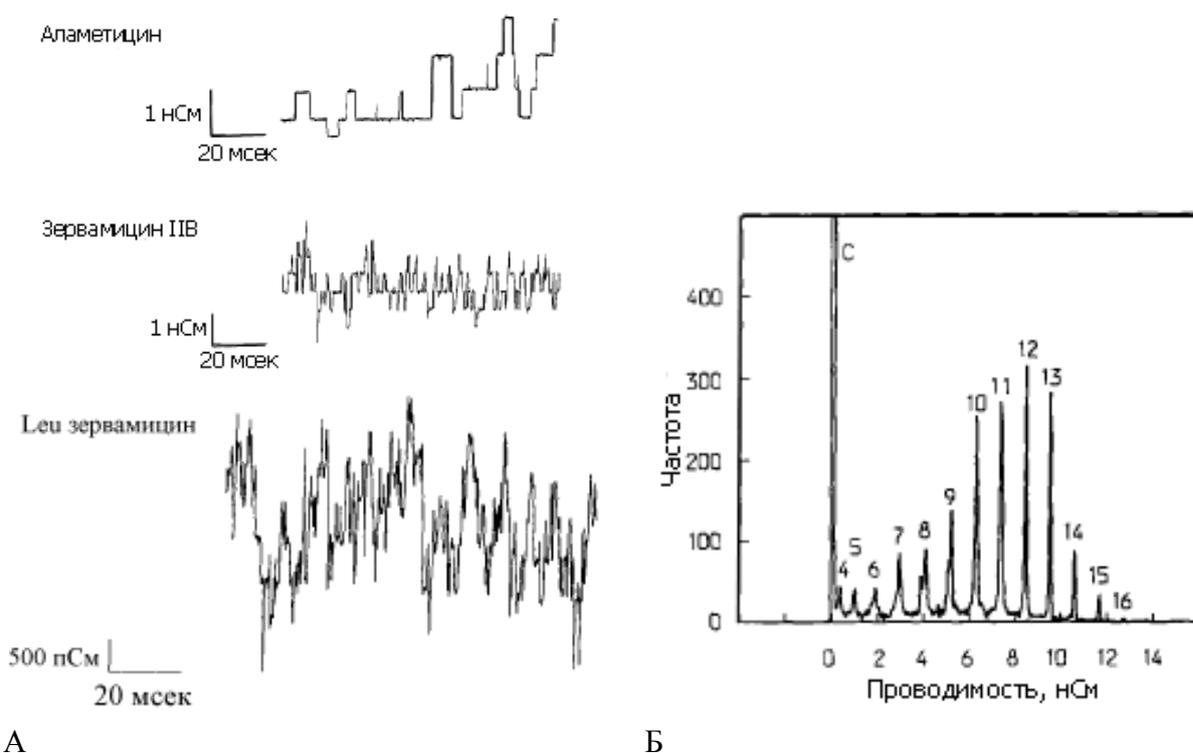


Рис. 13 А. Сравнение кинетики перехода между различными уровнями проводимости для аламетицина, зервамицина ПВ и Leu-зервамицина. Б. Гистограмма проводимости, на рисунке цифрами указано количество мономеров в канале [113].

Наименьший уровень проводимости соответствует каналу, состоящему из 4 молекул пептида, а наибольший – каналу из 16. Согласно гистограмме,

наиболее часто встречается канал из 12 мономеров, этот результат хорошо согласуется с оценками, полученными из анализа макроскопических параметров (13 мономеров) [113].

Теоретическая модель, описанная 1.3.2, при $l=2,4$ нм и $R=0,5$ нм хорошо согласуется с экспериментальными данными по проводимости зернамицина ПВ для каналов из количества мономеров менее 10. При большем количестве мономеров на канал, ток ионов через пору достаточно большой и лимитирующим фактором становится диффузия ионов к поре канала.

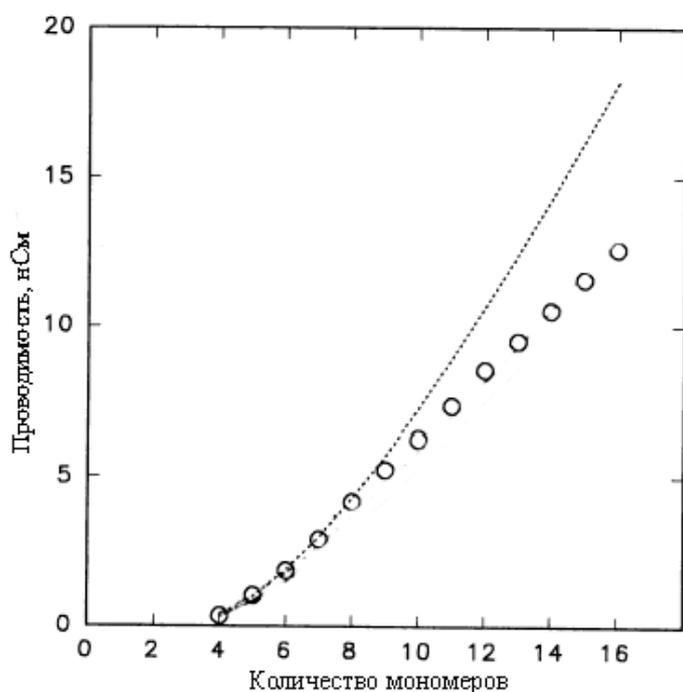


Рис. 14 Проводимость для зернамициновых каналов из разного количества мономеров: (○) экспериментальные данные при потенциале 175 мВ и 0,5 М КСl [113]. Пунктирная линия – теоретическая оценка проводимости.

Глава 2. Метод молекулярной динамики.

В настоящий момент существует целый ряд методов, позволяющих экспериментально изучать структуру и действие антимикробных пептидов, однако детальное представление о динамике и механизме действия с атомарным разрешением они не дают.

Благодаря быстрому развитию методов вычислительного эксперимента сейчас возможно исследование сложных биологических систем, что позволяет изучать отдельные стадии действия антимикробных пептидов на

клеточные мишени. Одним из методов вычислительного эксперимента является метод молекулярной динамики (МД), который широко применяется в прикладных задачах биотехнологии, биоинженерии, фармакологии, нанотехнологии и др [135–137].

Метод молекулярной динамики появился в 1950-х годах, когда Alder В.Ј. и Wainwright Т.Е. с помощью компьютерного моделирования изучали фазовый переход модельной жидкости, состоящей из твердых сфер с упругими соударениями [138]. Группой Алдера была разработана первая программа для расчета молекулярной динамики – STER. Позже, в 1964-ом году, Rahman А. включил в модель потенциал невалентных взаимодействия Леннар-Джонса, соответствующий Ван-дер-ваальсовой энергии взаимодействия атомов. Рахман проводил расчет не на модельных системах, а на системе жидкого аргона. При этом полученные результаты были сопоставимы с экспериментальными [139]. В 1977 году впервые была проведена динамика белковой молекулы в вакууме, что стало настоящим прорывом в использовании МД в биологии [140]. В данной работе динамика проводилась в отсутствие растворителя, температура системы не поддерживалась, а длина траектории составляла лишь несколько пикосекунд. Но уже через 2 года была опубликована статья, в которой длина траектории МД составила 100 пс [141]. Этими же авторами был предложен способ учета растворителя [142, 143], а также исследована функциональная активность некоторых белков [144, 145].

В дальнейшем, с развитием компьютерной техники, стало возможно рассчитывать все более сложные системы. Появился целый ряд программных пакетов и силовых полей для расчета не только пептидных структур, но также и нуклеиновых кислот и липидных бислоев.

2.1. Физические основы.

В основе метода молекулярной динамики лежит представление о многоатомной молекулярной системе, в которой все атомы являются взаимодействующими материальными точками, поведение атомов описывается уравнениями классической механики. Данный метод позволяет исследовать системы порядка 100000 атомов на временном диапазоне 100 нс. Несмотря на некоторые ограничения, такое представление может достаточно хорошо описывать динамику макромолекул на атомной уровне. Однако, данный метод не позволяет рассматривать химические реакции, а также образование и разрыв химических связей. Для этих целей существуют комбинирующие подходы классической и квантовой механики [146].

Поведение каждого атома описывается классическим уравнением движения:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = \vec{F}_i, \quad \vec{F}_i = - \frac{\partial U(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_n)}{\partial \vec{r}_i}$$

Здесь i – номер атома, n – количество атомов в системе, m_i – масса атома, \vec{r}_i - радиус-вектор атома, \vec{F}_i - равнодействующая сил, действующих на атом, U – потенциальная энергия системы.

Равнодействующая сила находится как градиент потенциала, который включает в себя сумму всех взаимодействий атомов в системе. Для пар атомов это валентные связи, кулоновские, ван-дер-ваальсовы взаимодействия и водородные связи. Для троек атомов - валентные углы, а для четверок - торсионные углы.

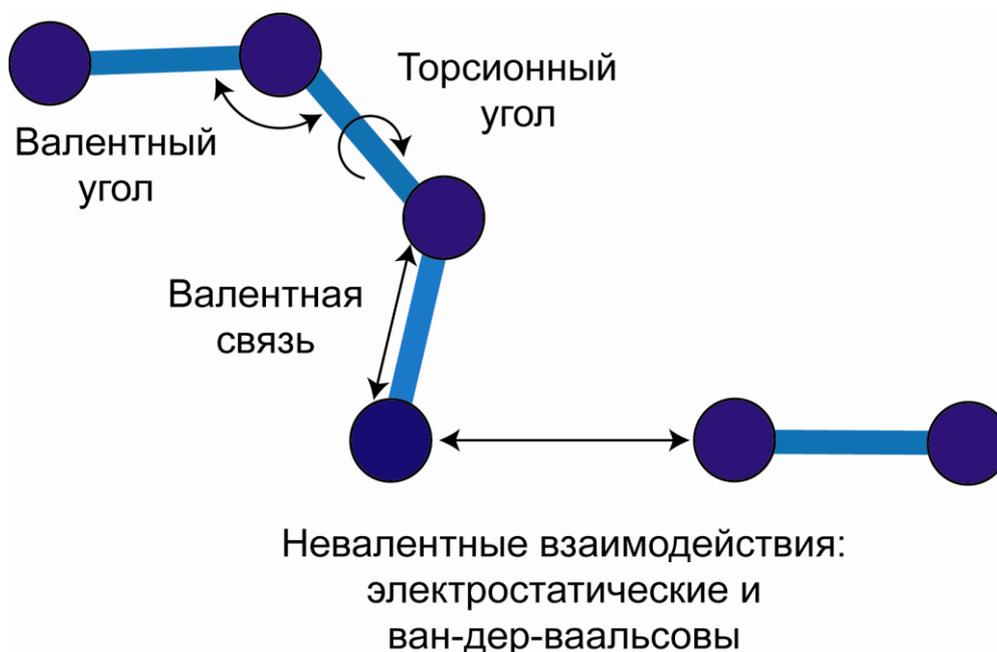


Рис. 15 Типы взаимодействий атомов в методе молекулярной динамики.

Общий вид потенциальной энергии в разных силовых полях практически одинаковый, однако, они могут значительно различаться расчетом отдельных вкладов и параметризацией. В данной работе все расчеты проводились в силовом поле OPLS-AA [147].

2.2 Валентные взаимодействия

Энергия валентных связей аппроксимируется гармоническим потенциалом с жесткостью k_{ij} и равновесной длиной связи b_{ij}^0 :

$$U_{ij}^b(b_{ij}) = \frac{k_{ij}}{2} (b_{ij} - b_{ij}^0)^2,$$

где b_{ij} – фактическая длина связи.

Константа жесткости и равновесная длина связи выбираются таким образом, чтобы воспроизводилась геометрия и колебательные частоты простых модельных соединений. Основной недостаток данного представления валентных связей заключается в том, что при сильном расхождении атомов связь не рвется, а энергия системы резко возрастает, что может привести к артефактам. Большинство программных пакетов по МД

позволяют фиксировать валентные связи при расчете с помощью алгоритмов SHAKE [148] и LINKS [149]. Такой подход позволяет значительно увеличить шаг интегрирования. Шаг интегрирования должен быть меньше характерного времени самых быстрых движений в системе. Для органических молекул – это колебания связи C-H, с характерным временем 10 фс, таким образом, при расчете валентных связей с помощью гармонического потенциала шаг составляет 1 фс. При фиксировании валентных связей шаг можно увеличить до 4-5 фс.

Потенциальная энергия валентных углов также представлена гармоническим потенциалом:

$$U_{i,j,k}^{\theta}(\theta_{i,l,k}) = \frac{k_{i,j,k}^{\theta}}{2} (\theta_{i,j,k} - \theta_{i,j,k}^0)^2,$$

где $k_{i,j,k}^{\theta}$ - константа жесткости, $\theta_{i,j,k}, \theta_{i,j,k}^0$ - фактическое и равновесное значение угла соответственно. Также как и для валентных связей, константа жесткости и равновесное значение угла выбираются таким образом, чтобы воспроизводить равновесную геометрию и колебательные частоты простых молекул.

Торсионный угол для связанных атомов i, j, k и l представляет собой двугранный угол между плоскостями, определяемыми атомами $i j k$ и $j k l$ (Рис. 16). Значение угла 0 соответствует цис-конформации.

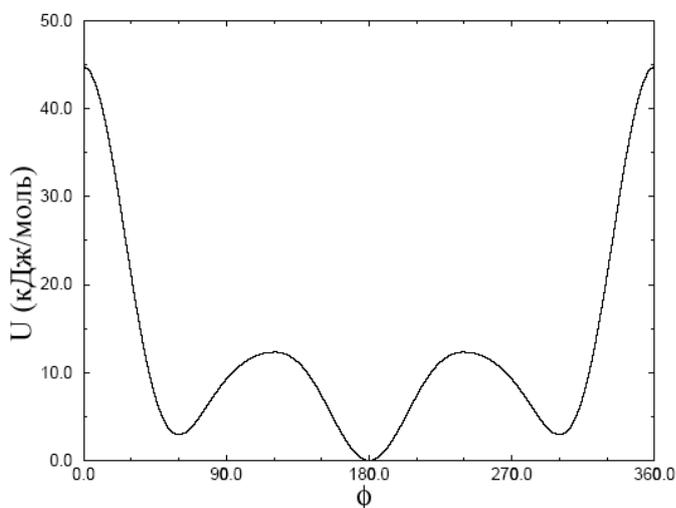
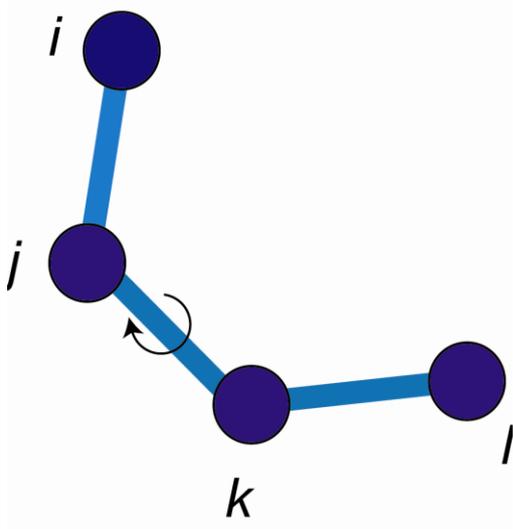


Рис. 16 А. Торсионный угол. В. Потенциал Rysckaert-Bellemans для двугранного угла.

Наиболее распространены два потенциала для расчета энергии двугранного угла: с помощью периодической функции и через степени $\cos\varphi$ (потенциал Rysckaerta-Bellemans).

Для первого случая потенциальная энергия определяется следующим образом:

$$U_{i,j,k,l}^{\varphi}(\varphi_{i,j,k,l}) = k_{i,j,k,l}^{\varphi} (1 + \cos(n\varphi - \varphi^0))$$

Где параметры подобраны таким образом, чтобы воссоздавать энергию цис- и транс-конформаций.

Потенциал Rysckaerta-Bellemans выглядит следующим образом:

$$U_{i,j,k,l}^{\varphi}(\varphi_{i,j,k,l}) = \sum_{n=0}^5 C_n (\cos(\varphi - \pi))^n$$

Оба потенциала могут давать погрешность в случае алифатических углеводородов, где переход между цис- и транс-конформациями может быть стерически затруднен. Поэтому для более точного описания можно вводить поправки в невалентные взаимодействия (кулоновские и Ван-дер-ваальсовы) между крайними атомами торсионного угла («1-4» взаимодействия).

2.3. Невалентные взаимодействия

К невалентным взаимодействиям относятся кулоновские и Ван-дер-ваальсовы взаимодействия. В некоторых силовых полях отдельно вводится потенциал для водородных связей, энергия которых находится в соответствии следующему эмпирическому выражению:

$$U = \varepsilon \left[A \left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} - B \left(\frac{r_0}{r} \right)^{10} \right]$$

В молекулярной динамике атомы являются материальными точками и существование электронов не учитывается явным образом. Однако

распределение электронной плотности в молекуле неравномерно, поэтому для описания распределения электронной плотности в силовых полях используется парциальный заряд для каждого атома. Кулоновская энергия взаимодействия между атомами системы описывается выражением:

$$U_{i,j}^C(r_{ij}) = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r_{ij}},$$

где q_i , q_j – парциальные заряды атомов, ϵ_0 и ϵ – диэлектрическая проницаемость вакуума и среды соответственно, r_{ij} – расстояние между атомами. Обычно диэлектрическая проницаемость среды в МД-расчетах равна 1, так как в системе присутствует явно заданная среда. Однако диэлектрическая проницаемость определяется не только переориентацией молекул среды, а также перераспределением электронной плотности на атомах, которую нельзя учесть в методе молекулярной динамики. Поэтому в задачах, где исследуется взаимодействие заряженных молекул, необходимо корректировать кулоновские взаимодействия за счет изменения диэлектрической проницаемости среды.

Особенно важно при расчете электростатических взаимодействий – расчет парциальных зарядов на атомах. При моделировании углеводородов в некоторых случаях можно пренебречь кулоновскими взаимодействиями. Было показано, что для подобных систем термодинамические величины, рассчитанные с учетом электростатических взаимодействий, могут не сильно отличаться от тех же величин, рассчитанных без их учета [150]. Однако в системах с большим электростатическим компонентом, в частности, системы, содержащие воду и амфифильные молекулы, роль кулоновских взаимодействий крайне существенна [151, 152].

При расчете невалентных взаимодействий потенциальная энергия рассчитывается не для каждой пары атомов системы, а для атомов, находящихся на расстоянии меньше определенного значения – радиуса обрезания.

В структурированных средах, таких как липидные бислои, использование радиуса обрезания может привести к серьезным артефактам, поэтому для подобных систем часто используют методы учета дальних кулоновских взаимодействий.

Наиболее общепринятым подходом является вычисление сил при помощи метода сумм Эвальда [153, 154]. В этом методе суммирование всех парных взаимодействий производится в обратном пространстве Фурье, это позволяет производить суммирование по всему бесконечному периодическому пространству. Вычислительная сложность метода – $O(N^2)$, где N – количество атомов в системе. Это делает затруднительным применение данного метода для полноатомных гидратированных бислоев фосфолипидов. Модифицированный метод Эвальда – PME (Particle Mesh Ewald) имеет сложность $O(N \cdot \log(N))$, и основывается на быстрых преобразованиях Фурье при суммировании в обратном пространстве [155, 156].

Еще одним методом учета дальних кулоновских взаимодействий является метод PPPC (particle-particle and particle-cell [157, 158]), в котором кулоновское взаимодействие разбивается на ближнее и дальнее. Ближние взаимодействия рассчитываются через стандартное выражение для кулоновских взаимодействий, а дальние с отстоящими периодическими ячейками учитываются через общий заряд и дипольный момент ячейки.

Параметризация некоторых моделей производится с учетом использования радиусов обрезания для кулоновских взаимодействий. Примером может являться модель воды TIP3P [159]. Для данной модели воды при использовании вместо радиуса обрезания суммирования по Эвальду требуется репараметризация модели.

Не связанные валентной связью атомы взаимодействуют за счет сил электродинамической природы, так называемое Ван-дер-ваальсово взаимодействие. Оно складывается из ориентационного, индукционного и дисперсионного взаимодействий атомов. В молекулярной динамике Ван-дер-

ваальсовы взаимодействия описываются потенциалом Леннард-Джонса или потенциалом «6-12» следующего вида:

$$U_{i,j}^{LJ}(r_{ij}) = 4\varepsilon_{i,j} \left[\left(\frac{\sigma_{i,j}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{i,j}}{r_{ij}} \right)^6 \right],$$

где член $\left(\frac{\sigma_{i,j}}{r_{ij}} \right)^{12}$ описывает отталкивание электронных орбиталей на

близком расстоянии. Выбор степени эмпирический, поскольку описание межатомного отталкивания лишь качественное. Член $\left(\frac{\sigma_{i,j}}{r_{ij}} \right)^6$ отвечает за

притяжение атомов на большом расстоянии и имеет квантово-механическую природу, связанную с согласованными колебаниями электронной плотности в обоих атомах. Значения ε и σ имеют простую интерпретацию: значение σ соответствует расстоянию, на котором энергия взаимодействия атомов меняет знак, переходя через нулевое значение, фактически этот параметр определяет «размеры» атомов. Значение ε соответствует глубине потенциальной ямы.

Обычно параметры ε и σ в силовом поле задаются для каждого атома. Далее при расчете потенциальной энергии для каждой пары ε_{ij} и σ_{ij} находятся как среднее геометрическое и среднее арифметическое соответственно.

Суммирование потенциальной энергии Ван-дер-ваальсовых взаимодействий проводится по всем парам атомов, разделенных более чем двумя химическими связями и находящимися на расстоянии менее радиуса обрезания. На границе радиуса обрезания могут возникнуть возмущения радиальной функции распределения атомов [160]. Для уменьшения возникающего эффекта применяют сглаживающую функцию, плавно уменьшающую до нуля потенциал взаимодействия.

2.4 Численное интегрирование

Динамическое поведение молекулярной системы описывается системой дифференциальных уравнений второго порядка. Данная система уравнений не может быть решена аналитически и применяются численные методы. Существует целый ряд численных методов решения уравнений, различающихся точностью и скоростью. В методе молекулярной динамики чаще всего используется метод Верле [161]. Алгоритм основан на разложении в ряд Тейлора уравнений движения в окрестности точки, соответствующей данному моменту времени:

$$r_i(t - \Delta t) = r_i(t) - \Delta t \dot{r}_i + \frac{(\Delta t)^2}{2!} \ddot{r}_i - \frac{(\Delta t)^3}{3!} \dddot{r}_i + \underline{O}(\Delta t^4)$$

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + \Delta t \dot{r}_i + \frac{(\Delta t)^2}{2!} \ddot{r}_i + \frac{(\Delta t)^3}{3!} \dddot{r}_i + \underline{O}(\Delta t^4)$$

Комбинируя эти два выражения и подставляя вторую производную радиус вектора из второго закона Ньютона, приходим к выражению для алгоритма Верле:

$$r_i(t + \Delta t) \approx 2r_i(t) - r_i(t - \Delta t) + \frac{F_i(t)}{m_i} \Delta t^2$$

$$v_i(t) \approx \frac{1}{2\Delta t} (r_i(t + \Delta t) - r_i(t - \Delta t))$$

Таким образом, определяются координаты и скорости каждого атома на основании значений координат в два предыдущих момента времени. Отдельное вычисление скорости не нужно для определения траектории, однако, она необходима для расчета кинетической энергии система, температуры и тензора давления. Данный алгоритм имеет порядок точности $\underline{O}(\Delta t^4)$ для координат и $\underline{O}(\Delta t^3)$ для скоростей атомов.

При вычислении скорости производится деление на значение близкое к нулю, для избегания этого используется модифицированный алгоритм Верле – «Leap Frog»

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + v_i(t + \frac{\Delta t}{2}) \Delta t$$

$$v_i(t + \frac{\Delta t}{2}) = v_i(t - \frac{\Delta t}{2}) + \frac{F_i(t)}{m_i} \Delta t$$

Алгоритм имеет тот же порядок точности, что и обычный алгоритм Верле. Недостатком этого метода является то, что координаты и скорости атомов вычисляются в разные моменты времени, различающиеся на $\Delta t/2$. Обычно скорость в момент Δt вычисляется как среднее арифметическое значений скоростей в моменты времени $t + \Delta t$ и $t - \Delta t$.

Принципиальным моментом процедуры интегрирования является выбор величины шага интегрирования. Длина шага должна быть меньше чем период самых быстрых движений системы. Для органических молекул это характерное время осцилляции валентной связи С-Н, которое составляет 10фс. Таким образом, для полноатомных систем обычно выбирается значение шага интегрирования 1-2фс.

Начальные скорости системы обычно выбираются случайным образом в соответствии с распределением Максвелла для заданной температуры.

2.5 Поддержание постоянной температуры

В молекулярной динамике температура молекулярной системы вводится через удельное среднее значение кинетической энергии. Выражение для средней кинетической энергии системы имеет вид:

$$E = \frac{\sum_{i=1}^N m_i v_i^2}{2} = \frac{3}{2} NkT$$

где m_i - молекулярная масса атома, v_i - скорость атома, N - полное число атомов в системе, T - температура по абсолютной шкале Кельвина.

Таким образом, мгновенное значение температуры можно найти из выражения:

$$T = \frac{\sum_{i=1}^N m_i v_i^2}{3Nk}$$

При численном моделировании динамики молекул используется конечная длина шага, за который атомы переместятся на определенное расстояние, рассчитанное из ньютоновских уравнений. Таким образом, в конце шага атомы могут оказаться на слишком маленьком расстоянии (в запрещенной области потенциального поля), и атом на следующем шаге может получить избыточную кинетическую энергию, которая впоследствии приведет к разогреванию системы. Для избегания подобной ситуации используются специальные алгоритмы – термостаты.

2.5.1 Термостат Берендсена

Одним из самых распространенных термостатов является термостат Берендсена или термостат знакопеременного трения. Релаксация температуры к заданному значению рассчитывается по уравнению:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T(t)}{\tau},$$

где T_0 – заданная температура термостата, $T(t)$ – мгновенная температура системы. При этом на каждом шаге интегрирования происходит перерасчет скоростей атомов с учетом следующего коэффициента:

$$\lambda = \left[1 + \frac{\Delta t}{\tau} \left\{ \frac{T_0}{T(t - \frac{\Delta t}{2})} - 1 \right\} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Таким образом, основное уравнение движения приобретает вид:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = \vec{F}_i + \lambda(t) m_i \vec{v}_i$$

Основной недостаток этого метода термостатирования в том, что в системе не соблюдается равномерное распределение энергии по степеням свободы, постепенно энергия переходит во внутренние и поступательные степени свободы [162]. Однако этот метод до сих пор широко применяется для моделирования молекулярной динамики молекул с большим числом

степеней свободы, в частности полипептидов и белков в явно заданном растворителе.

2.5.2 Столкновительный термостат

Столкновительный термостат представляет собой виртуальную среду, в которую помещают систему. Каждый атом системы с заданной частотой упруго соударяется с виртуальной частицей фиксированной массы. Произведение массы частицы на частоту столкновений соответствует эффективному трению виртуальной среды. Так при расчетах системы в вакууме обычно задают следующие параметры термостата: масса частиц – 18 а.е.м. и частота соударений 55 пс^{-1} , такая виртуальная среда по вязкости соответствует воде при н.у. В отличие от термостата Берендсена, столкновительный не вызывает неравномерного перераспределения энергии по степеням свободы [163, 164]. Распределение скоростей частиц виртуальной среды привязано к заданной температуре термостата распределением Максвелла:

$$f(v) = \left(\frac{m_0}{2\pi kT} \right)^{3/2} v^2 \exp\left(-\frac{m_0 v^2}{2kT} \right)$$

где v – скорость виртуальной частицы, $f(v)$ – плотность вероятности распределения частиц по скоростям, m_0 – масса виртуальных частиц, k – константа Больцмана, T – заданная температура термостата.

Изменяя значения частоты столкновений и массы виртуальных частиц можно регулировать энергообмен системы и виртуальной среды.

2.5.3 Стохастическая динамика

Аналогом столкновительного термостата является стохастическая динамика. Уравнения стохастической динамики отличаются от уравнений

Ньютона добавлением теплового шума и трения и выглядит следующим образом:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = -m\gamma \frac{d\vec{r}_i(t)}{dt} + \vec{F}_i(r) + \check{r}$$

где γ - коэффициент трения (1/пс), а \check{r} -случайная сила. Для получения статистически достоверных результатов эти величины должны удовлетворять флуктуационно-диссипативной теореме:

$$\langle \check{r}(t)\check{r}(t+s) \rangle = 2k_B T \gamma \delta(s)$$

Когда γ порядка временной шкалы расчета, то в системе поддерживается постоянная температура.

В случае стохастической динамики при расчете кинетической энергии на каждом шаге используется среднее значение скорости с учетом трения:

$$v_i(t) = \frac{1}{2} (v_i(t - \frac{\Delta t}{2}) + v_i(t + \frac{\Delta t}{2})) (e^{-\gamma \Delta t} + \sqrt{2}(1 - e^{-\gamma t}))$$

2.5.4. Ланжевеновская динамика

Ланжевеновская динамика является частным случаем стохастической динамики, когда коэффициент трения достаточно большой и можно пренебречь инерционным членом, тогда уравнение можно записать в следующем виде:

$$\frac{dr}{dt} = \frac{1}{\gamma} F(r) + \check{r} \quad (*)$$

Интегральная форма этого уравнения выглядит следующим образом:

$$r(t + \Delta t) = r(t) + \frac{\Delta t}{\gamma} F(r(t)) + \sqrt{2k_B T \frac{\Delta t}{\gamma}} \check{r}^G \quad (**)$$

где \check{r}^G тепловой шум распределенный по Гауссу, а γ – обратный коэффициент трения.

2.6. Поддержание постоянного давления

В молекулярно динамических расчетах часто бывает удобно использовать ансамбли с постоянным давлением. В частности это касается систем, где есть раздел фаз. Наиболее распространенным баростатом является баростат Берендсена.

На каждом шаге давление рассчитывается как разница между кинетической энергией и вириалом:

$$P = \frac{2}{V}(E_{kin} - Vi)$$

где V – размер ячейки на каждом шаге, а Vi - вириал. Вириал рассчитывается по следующей формуле:

$$Vi = -\frac{1}{2} \sum_{i \leq j} r_{ij} F_{ij}$$

Баростат Берендсена в конце каждого шага пересчитывает координаты и линейные размеры ячейки, чтобы привести систему к заданному давлению P_0 .

$$x' = x - \frac{\Delta t}{3\tau} \beta \{P_0 - P(t)\}$$

где β – сжимаемость мембраны, τ – коэффициент баростатирования, P_0 – задаваемое давление, $P(t)$ – текущее давление на шаге.

2.7. Неравновесная молекулярная динамика

Для изучения процессов, характерное время которых превышает достижимые методом МД времена траекторий, все чаще используется метод неравновесной (управляемой) молекулярной динамики. При равновесной молекулярной динамике атомы движутся под действием сил взаимодействия с другими атомами системы. В рамках управляемой МД на отдельные атомы системы налагается дополнительный потенциал, который стимулирует молекулярные процессы по определенным степеням свободы.

В молекулярном пакете Gromacs внешняя сила определяется фиксирующим вектором и внешним ускорением. Тогда уравнение для скорости примет вид:

$$v(t + \frac{\Delta t}{2}) = f_g \cdot \lambda \cdot \left[v(t - \frac{\Delta t}{2}) + \frac{F(t)}{m} \Delta t + a_h \Delta t \right];$$

где f_g – фиксирующий вектор, который равен «0», если атом фиксирован или равен «1», если нет, a_h – внешнее ускорение в нм/пс², а λ – коэффициент термостатирования, который рассчитывается в соответствии с используемым термостатом, для ланжевеноской динамики он равен силе, разделенной на коэффициент трения.

В ланжевеноской динамике инерциальный член не учитывается, а координаты на каждом шаге рассчитываются по уравнению (*). Отметим, что внешнее ускорение в ланжевеноской динамике также отсутствует.

Глава 3. Динамика зервамицина ПВ в воде и в метаноле.

В данном разделе проводится сравнительное изучение молекулярной динамики зервамицина ПВ в воде и в метаноле. Исследуется влияние аминокислотных замен на динамическое поведение и стабильность структуры пептида. Определена последовательность аминокислот, отвечающая за отсутствие шарнирных движений у коротких пептаиболов.

Молекула зервамицина ПВ под действием трансмембранного электрического потенциала встраивается в липидный бислой. Таким образом, окружение пептида меняется от полярного (вода) до неполярного и анизотропного (мембрана). Ниже изучаются конформационные изменения, возникающие в молекуле ZrvII и его мутантных формах при изменении полярности растворителя.

Отметим, что зервамицин, в отличие от длинного пептаибола аламетицина, не совершает высокоамплитудных движений, значительно изменяющих длину спирали. Вероятно, жесткость молекулы зервамицина

важна для встраивания в гидрофобную часть мембраны, т.к. его длина составляет порядка 25Å, и уменьшение этой длины может критически сказаться на каналообразовании в мембране. Предположительно, жесткость спирали ZrvIIВ вызвана заменой мотива aib10-gly11-leu12-aib13-pro14, ответственного за спираль-изгибающие движения в аламетицине на мотив aib7-leu8-aib9-hyp14 в зервамицине. В данной главе проводится также сравнительный анализ динамики трех мутантов зервамицина II: с заменой aib-gly в 7-ом (ZrvII-gly7) и 9-ом положениях (ZrvII-gly9), а также с добавленным gly в 8-ое положение (ZrvII-gly8).

Длинные пептаиболы не обладают выраженной спиральной структурой в растворителе. Только при связывании с поверхностью мембраны они способны образовывать спираль. Методом ЯМР в растворителях различной полярности (от смеси хлороформ/метанол (9:1, v/v) до метанол/вода (1:1, v/v)) было показано, что в отличие от длинных пептаиболов, зервамицин II обладает определенной спиральной структурой, которая, вероятно, не меняется при взаимодействии и последующем встраивании в мембрану. Ниже стабильность структуры зервамицина II в растворителях различной полярности дополнительно исследуется в численных экспериментах, а также определяется влияние на структуру и динамику зервамицина II аминокислотных замен в области изгиба спирали: Aib7-Leu8-Aib9-Hyp10.

3.1 МД-протокол

Заряды на атомах для неприродных аминокислотных остатков Aib и Hyp были рассчитаны по Малликену методом Хартри-Фока с базисом 6-31ГФ** с использованием оптимизации геометрии молекулы.

МД расчёты 4-х пептидов (нативный зервамицин II, с заменой aib-gly в 7-ом и 9-ом положениях, а также с добавленным gly в 8-ое положение) проводились в воде и метаноле. Использовалось полноатомное силовое поле, а также стохастическая динамика, не приводящая к нарушению принципа

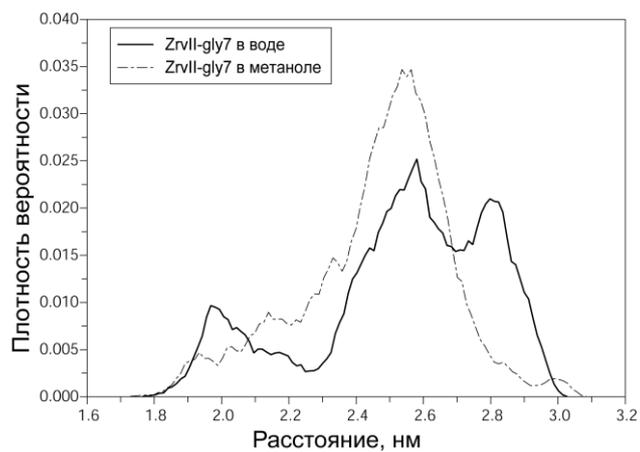
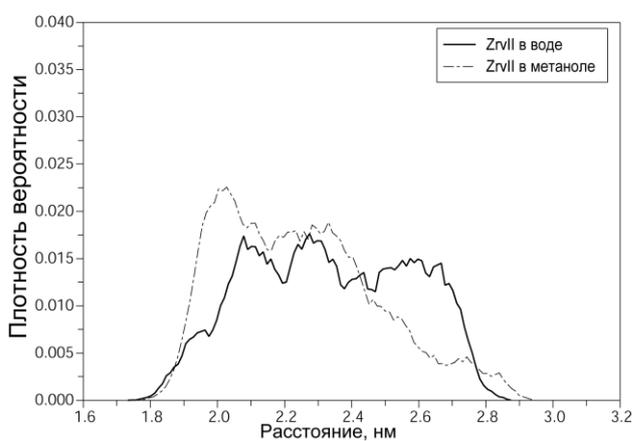
равнораспределения энергии по степеням свободы. Основные параметры МД-протокола:

- Программный пакет Gromacs 3.2.1
- Потенциальное поле OPLS-AA
- Размер ячейки: $47\text{\AA} \times 36\text{\AA} \times 36\text{\AA}$
- Длина траектории 10 нс
- Температура термостата 300K
- Термостат: стохастическая динамика
- Постоянная времени изменения среды $\tau=0,1\text{пс}$
- Радиус обрезания для электростатических взаимодействий $R_{\text{el}}=20\text{\AA}$
- Радиус обрезания для взаимодействия Ван-дер-Ваальса $R_{\text{vdW}}=20\text{\AA}$
- Для численного интегрирования использовался алгоритм Верле. Начальные скорости определялись с помощью генератора случайных чисел по распределению Максвелла.
- Шаг интегрирования 1 фс.
- Шаг записи с траекторный файл 0,1 пс.

3.2 Влияние аминокислотных замен на динамику спиральной структуры зервамицина IIВ в воде и в метаноле.

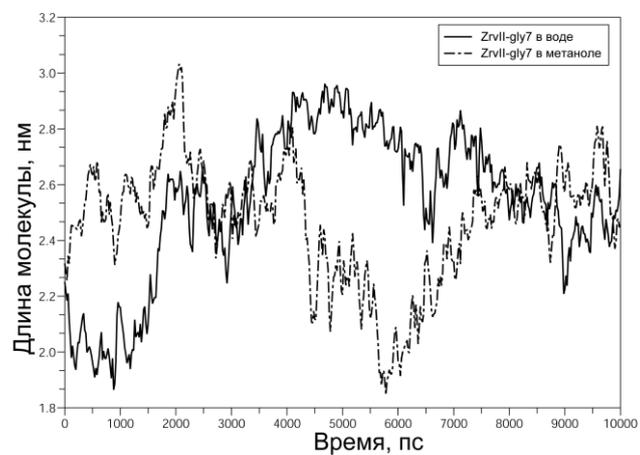
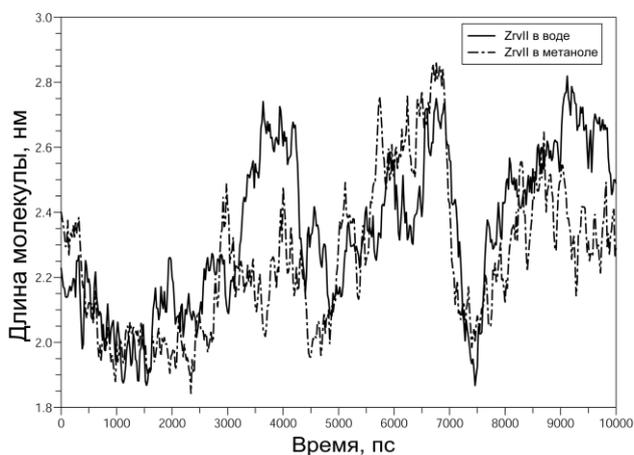
Исследовались 3 мутанта ZrvII: с заменой aib-gly в 7-ом и 9-ом положениях (ZrvII-gly7, ZrvII-gly9), а также с добавленным gly в 8-ое положение (ZrvII-gly8). Для оценки динамики изменения длины молекулы и наличия шарнирных движений рассчитывались распределения для расстояний между C_{α} -атомами первого и последнего остатков.

Нативный зервамицин II в отличие от аламетицина сохраняет спиральную структуру в течение 10нс и среднеквадратичное отклонение (RMSD) C_{α} -атомов составляет порядка $1,4\text{\AA}$, что хорошо согласуется с данными ЯМР.



А

Б



В

Г

Рис. 17 Распределение расстояний между C_{α} -атомами первого и последнего остатка молекулы нативного зервамицина II (А) с заменой aib7-gly7 (Б) в воде и в метаноле. Зависимость длины молекулы для ZrvII (В) и ZrvII-gly7 (Г) от времени.

Как видно из Рис. 17А изменение длины молекулы нативного зервамицина II составляет порядка 35% в воде и в метаноле. Структура ZrvII-gly7 является более жесткой. При этом значительных структурных изменений не наблюдается, так как 7-ой аминокислотный остаток находится в α -спиральной части пептида. Замена стерически ограниченного остатка Aib на лабильный Gly могла бы привести к увеличению конформационной подвижности и возможности излома спирали. Однако в случае с зервамицином II, наоборот, данная замена в 7-ом положении несколько уменьшила интенсивность шарнирных движений молекулы (Рис. 17Б). Это

связано с образованием водородной связи между атомом водорода Aib9 и карбонильным кислородом Ile5 (

Рис. 18). В результате, уменьшается подвижность в области изгиба спиральной структуры ZrvII-gly7. Стерические ограничения aib в 7-ом положении препятствуют образованию этих водородных связей, а замена aib на Gly делает замыкание водородных связей более вероятным.

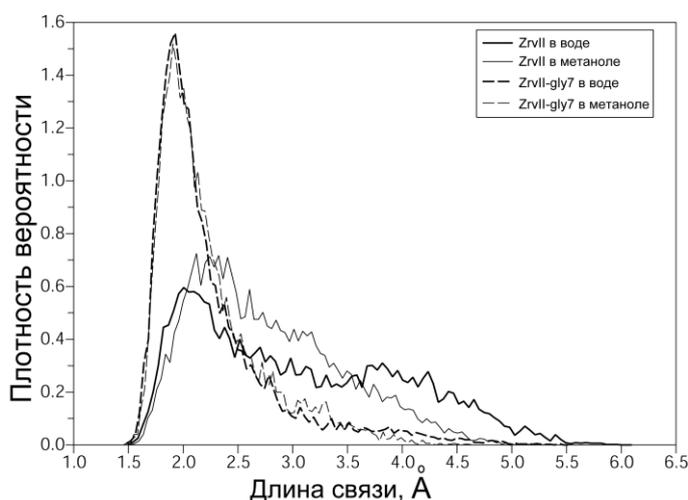


Рис. 18 Распределение расстояний между атомом водорода Aib9 и карбонильным атомом кислорода Ile5.

Замена Aib-Gly в 9-ом положении также вызывает структурные изменения в спиральной структуре пептида (Рис. 19). Как и в случае замены в положении 7, наблюдалось уменьшение интенсивности флуктуаций длины молекулы в обоих растворителях. Причем средняя длина молекулы зервамицина в метаноле составила 24Å в воде и 19Å в метаноле. На Рис. 19Б видно уменьшение длины ZrvII-gly9 в метаноле относительно нативного зервамицина.

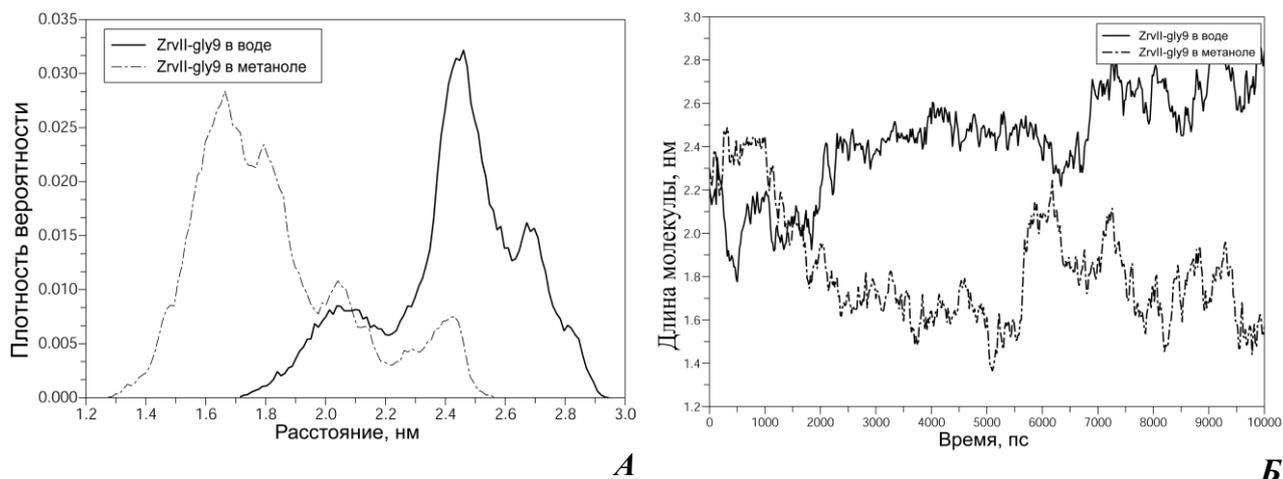


Рис. 19 А. Распределение расстояний между C_{α} -атомами первого и последнего остатков для молекулы зервамицина II (при замене aib9 на gly9) в воде и в метаноле. Б. Зависимость длины молекулы от времени.

Как видно из Рис. 20 молекула зервамицина ZrvII-gly9 (с заменой Aib на Gly в 9-ом положении) сохраняет спиральную структуру в обоих растворителях, но в метаноле структура выглядит более компактной и наблюдается более сильный изгиб спирали в области Gly9-Hyp10.

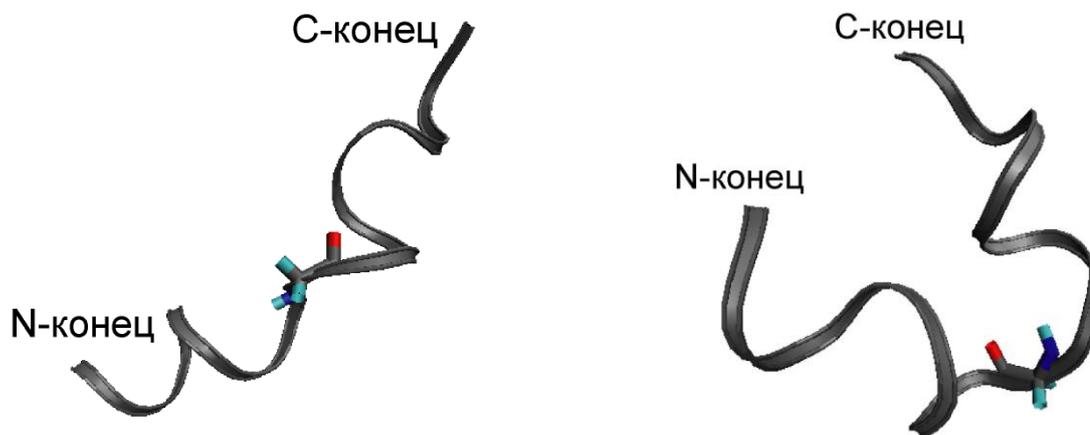


Рис. 20 Структура зервамицина II с заменой aib9-gly9 в воде (А) и в метаноле (Б). (выделен Gly9)

Отметим, что аминокислотный остаток Gly9 находится на границе α -спиральной части пептида, непосредственно перед Hyp10, создающим изгиб спирали. Поэтому замена Aib на более лабильный остаток Gly вызывает в данном положении дополнительную подвижность в области изгиба, что

приводит к реорганизации внутримолекулярных водородных связей пептида в метаноле (Рис. 21). Молекулы воды более активно конкурируют с атомами аминокислотных остатков за образование водородных связей и поэтому в воде данные структурные изменения практически отсутствуют.

Для пептида в воде наблюдается образование водородной связи также между кислородом Leu8 и водородом Aib12, что свойственно α -спирали. Это соответствует более вытянутой структуре пептида. В метаноле водород Aib12 образует водородную связь с Aib9, что свойственно спирали 3_{10} и, соответственно, вызывает изгиб пептида.

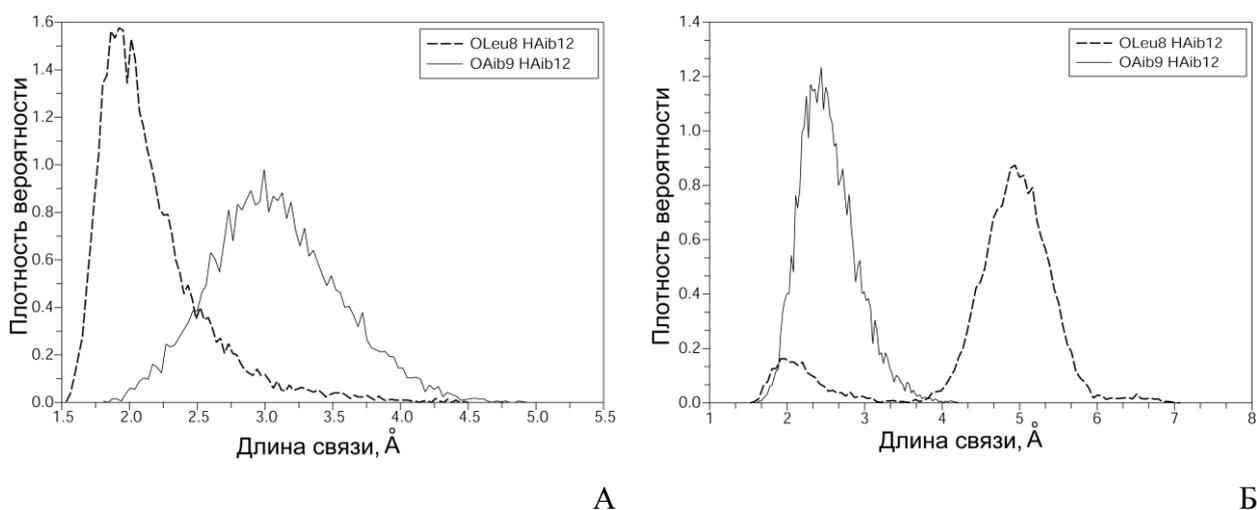


Рис. 21 Распределения длины водородной связи для ZrvII-gly9 в воде (А) и в метаноле (Б)

Обсуждаемая замена должна, предположительно, негативно сказаться на активности зервамицина, так как уменьшает эффективную длину молекулы до 17Å. Пептидная связь имеет дипольный момент равный 3,5 D, направленный параллельно связям C=O и N=H. В конформации спирали эти связи ориентированы практически в одном направлении, что создает дипольный момент на молекуле зервамицина порядка 50 D. Внешнее электрическое поле мембраны действует на дипольный момент и дополнительно стабилизирует трансмембранное положение пептида. Уменьшение эффективной длины молекулы и изгиб спирали сильно уменьшает дипольный момент и должно крайне негативно сказываться на

стабилизации трансмембранного состояния и агрегации с последующим формированием ионного канала.

Добавление Gly в восьмое положение полностью воссоздает консервативную последовательность Aib-Gly-Leu-Aib-Pro, ответственную за высокоамплитудные движения в длинных пептаиболах.

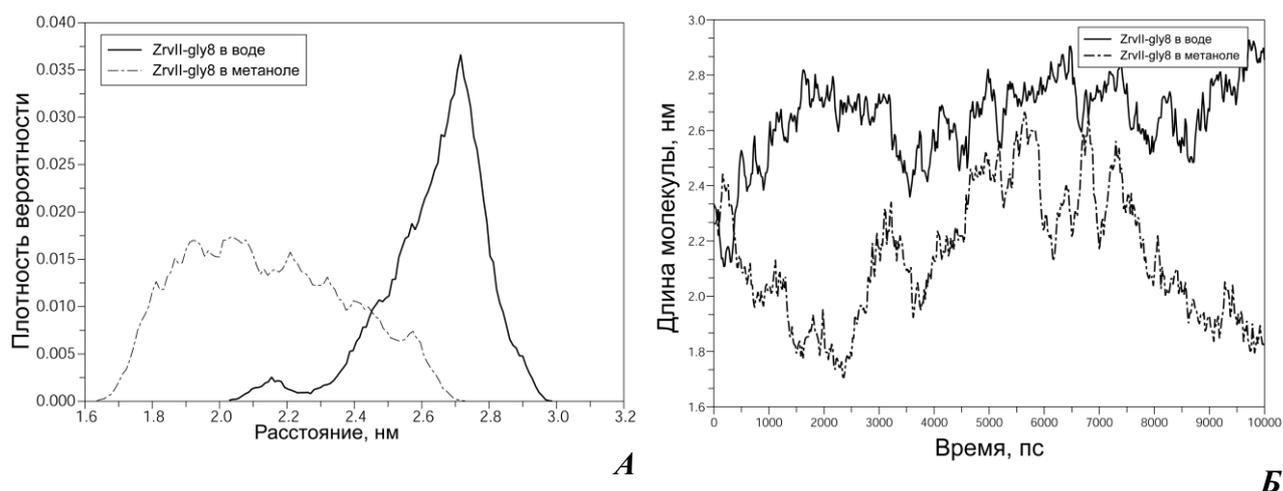


Рис. 22 А. Распределение плотности вероятности расстояния между С атомами первого и последнего остатка молекулы зервамицина II с добавленным остатком gly в 8-е положение в воде и в метаноле. **Б.** Длина молекулы от времени.

На Рис. 22 видно, что у молекулы пептида в обоих растворителях наблюдаются флуктуации длины с периодом порядка бнс, однако эти флуктуации сильно различаются по амплитуде: для зервамицина в воде они составляют 0,3нм, а в метаноле около 0,7нм. Таким образом, амплитуда флуктуаций возрастает при уменьшении полярности растворителя. Это может быть объяснено периодическим разрывом и образованием водородных связей (Рис. 23). В нативном зервамицине II нет водородной связи между остатками Trh6 и Leu9, а для ZrvII-gly9 она с небольшой вероятностью образуется в воде и с большей - в метаноле. Для водородной связи между Leu9 Aib13 для ZrvII-gly9 в метаноле появляется второй пик, вероятно, разрыв этой водородной связи способствует увеличению амплитуды движений, изгибающих спираль.

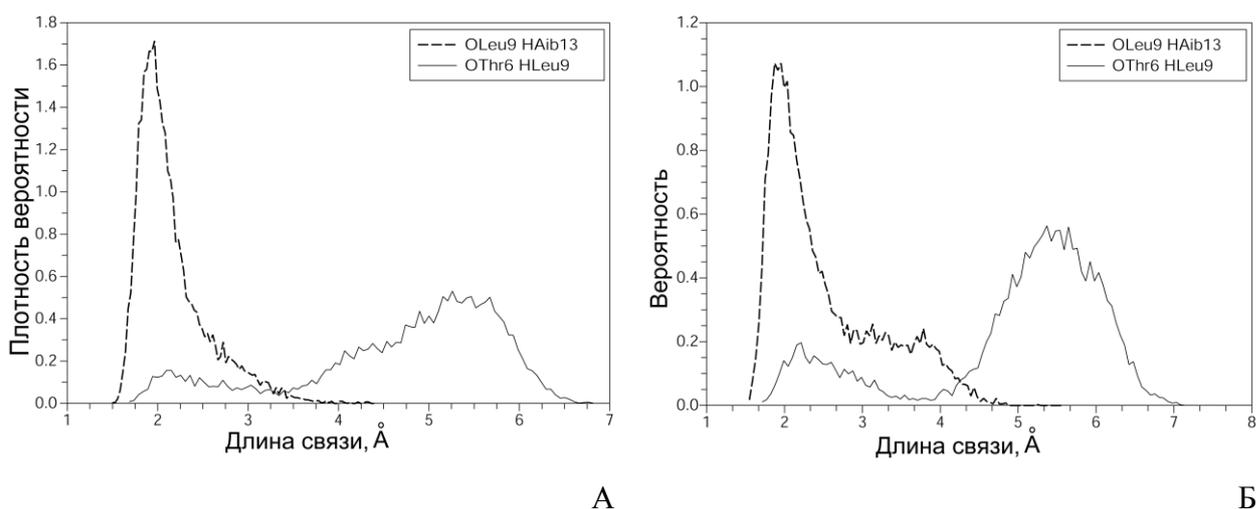


Рис. 23 Распределение расстояний между атомами кислорода Leu9 и водорода Aib13 (---) и - кислорода Thr6 и водорода Leu9 (—) для ZrvII-Gly8 в воде (А) и в метаноле (Б).

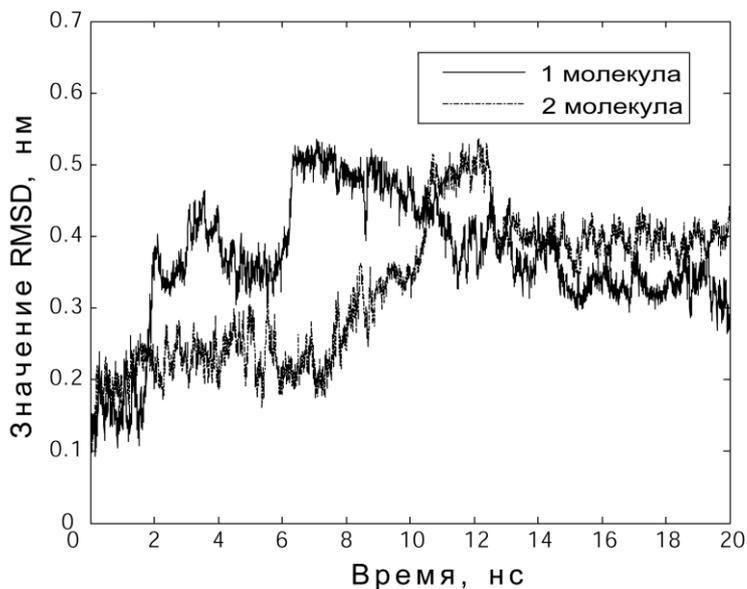
Молекула зервамицина II в отличие от аламетицина сохраняет спиральную структуру в воде (в течение не менее 10нс). В нативном зервамицине и зервамицине с заменой Aib-Gly в 7-ом и 9-ом положениях не наблюдается высокоамплитудных шарнирных движений изгибающих спираль. Однако ZrvII-gly9 в метаноле компактизуется за счет изгиба в области Gly9 за счет реорганизации водородных связей, в воде подобных структурных изменений не наблюдается. Добавление Gly в 8-е положение вызывает появление значительных флуктуаций длины пептида в метаноле, в воде амплитуда колебаний значительно меньше. Таким образом, в мутантах ZrvII-gly9 ZrvII-gly8 наблюдаются структурные изменения при уменьшении полярности растворителя. Это может критически повлиять на активность зервамицина II, так как длина молекулы ZrvII составляет около 24Å, при наличии шарнирных движений длина молекулы может уменьшаться до 16Å, как в случае с ZrvII-gly9, что недостаточно для образования мембранного канала.

Длинные пептаиболы, в отличие от зервамицина II, обладают шарнирными движениями, которые в значительной степени способны изменять длину молекулы. Это изменение длины не уменьшает активность длинных пептаиболов, а, предположительно, способствует агрегации молекул и формированию канала.

Таким образом, замены в области изгиба спирали Aib7-Leu8-Aib9-Nup10 способны не только изменить структуру и динамику молекулы зервамицина II и сделать его чувствительным к растворителю, а также могут в значительной степени сказаться на мембранной активности пептида.

3.3 Димеризация молекул зервамицина II в воде

Для исследования способности молекул зервамицина II была изучена динамика 2-х молекул зервамицина II в водном окружении. В начальной системе молекулы пептида были расположены взаимоперпендикулярно на расстоянии 1,5 нм между центрами масс в кубической ячейке воды (5,6 нм × 5,6 нм × 5,6 нм), что соответствует концентрации 0,02М. За 20 нс равновесной молекулярной динамики молекулы не образуют больше одной водородной связи.



А

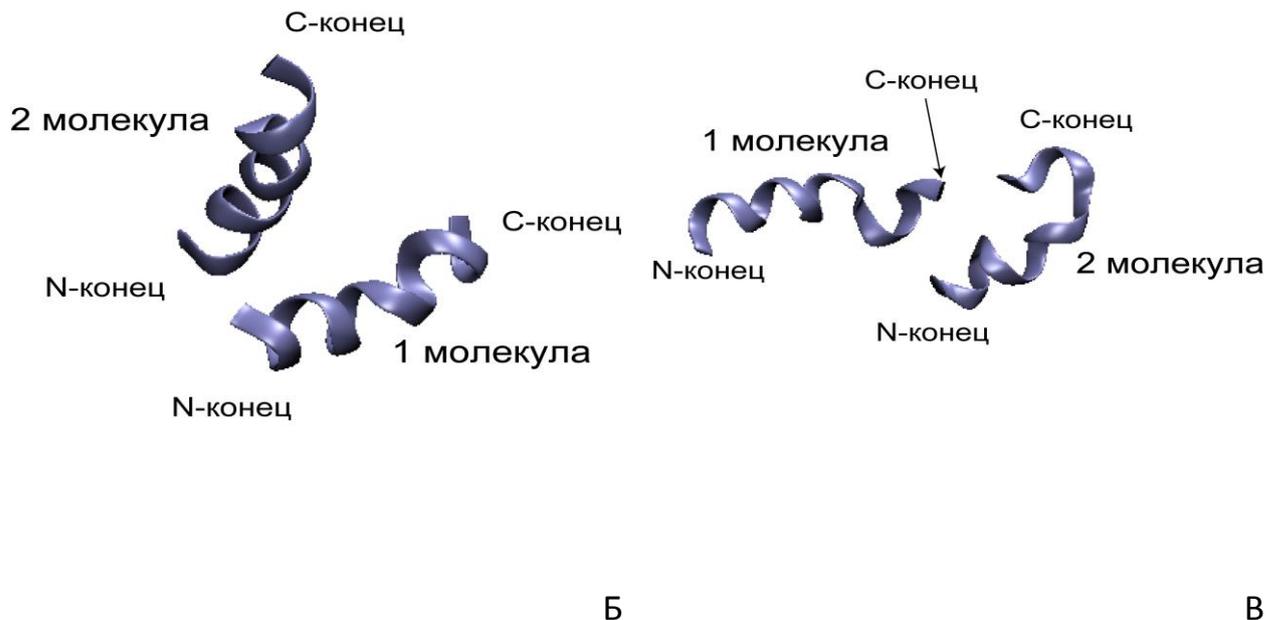


Рис. 24 А. Среднеквадратичное отклонение (RMSD) для α -атомов молекул зервамицина IIВ относительно начального положения. Взаиморасположение молекул зервамицина IIВ в начале динамики (Б) и через 20 нс релаксации (В).

Как видно из Рис. 24 (А, Б) молекулы зервамицина IIВ не образуют комплекс, а находятся на расстоянии друг от друга, таким образом, даже начальное достаточно близкое взаиморасположение ZrvIIВ не приводит к комплексообразованию в водном окружении, что хорошо согласуется с данными ЯМР [128]. Значение RMSD для каждой из молекул зервамицина IIВ за 10 нс динамики достигает 0,4 нм (Рис. 24А) и дальнейшие 10 нс остается на этом уровне, что значительно больше аналогичного значение для одиночной молекулы в воде, которое составляет порядка 0,15 нм (Рис. 33). Подобное увеличение значения RMSD свидетельствует о нестабильности структуры молекулы ZrvIIВ при высокой концентрации пептида в растворе и дестабилизирующем взаимовлиянии молекул зервамицина. Вероятно, причина дестабилизации спиральной структуры – гидрофобный эффект, возникающей между неполярными аминокислотными остатками.

Глава 4. Взаимодействие зервамицина ПВ с липидными бислоями, моделирующими мембрану эукариот и прокариот.

Согласно BS-модели действия пептаиболов на первом этапе пептид адсорбируется на поверхность мембраны, на втором встраивается в липидный бислой под действием трансмембранного потенциала, и на заключительном несколько молекул олигомеризуются и образуют ионный канал. В данной главе методом МД изучается взаимодействие молекулы зервамицина ПВ с модельными мембранами эукариотических и прокариотических клеток. В качестве модели мембраны эукариотической клетки использовался липидный бислой состоящий из молекул пальмитоилолеоилфосфатидилхолина (ПОФХ), а для моделирования мембраны бактериальной клетки липидный бислой из пальмитоилолеоилфосфатидилглицерол (ПОФГ) и пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (ПОФЭ) в соотношении 1:4. Была исследована способность к агрегации молекул зервамицина ПВ на поверхности мембраны, а также взаимовлияние пептидов на процесс связывания и встраивания в мембрану.

4.1 Исследуемые системы и МД-протокол

Проводились 2 эксперимента: равновесная МД для изучения связывания зервамицина ПВ с поверхностью мембраны и управляемая МД для изучения процесса встраивания пептида в липидный бислой, где внешнее ускорение прикладывалось к различным атомам пептида.

Стартовые системы липидных бислоев собирались с помощью молекулярного конструктора так, чтобы плотность липидов соответствовала экспериментальным данным и составляла порядка 64 \AA^2 . При сборке структуры для избегания излишней симметрии липидов, каждая молекула поворачивалась вокруг своей оси на случайный угол. Полученные липидные

бислои были подвергнуты релаксации в NVT ансамбле, при температуре 500K с фиксированными атомами фосфора в течение 100 пс, с целью уменьшить упорядоченность алкильных хвостов. Затем бислои гидратировались, так чтобы на один липид приходилось минимум 32 молекулы воды. Далее в систему с отрицательно заряженными липидами ПОФГ были добавлены ионы Na⁺ для нейтрализации заряда. Состав систем приведен в Таблица 1.

Таблица 1

мембрана	липиды	Кол-во мол. воды	противоионы
Эукариотическая	64 ПОФХ	2404	0
прокариотическая	53 ПОФЭ 13 ПОФГ	2796	13 Na ⁺

На последнем этапе в системы были добавлены молекулы зервамицина ПВ выпуклой (полярной) стороной к липидными головкам на расстоянии около 0,7 нм от поверхности мембраны. После релаксации системы в течение 200 пс с фиксированными связями без внешнего электрического поля, производится расчет рабочей траектории не менее 10нс методом равновесной молекулярной динамики с внешнем электрическом полем 0,01В/нм для имитации трансмембранного потенциала со следующим протоколом:

- Программный пакет Gromacs 3.2.1
- Потенциальное поле OPLS-AA
- Длина траектории 10 нс -16 нс
- Температура термостата 300K
- Термостат: стохастическая динамика
- Постоянная термостатирования $\tau = 0,2$ пс
- Баростат – Берендсена
- Постоянная баростатирования – 10 пс
- Давление баростата вдоль нормали мембраны: 1 бар
- Давление баростата перпендикулярно нормали мембраны: -50 бар

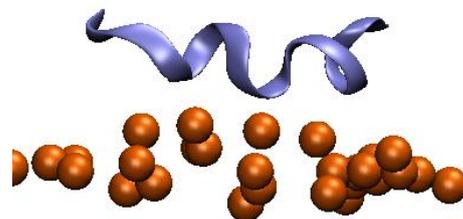
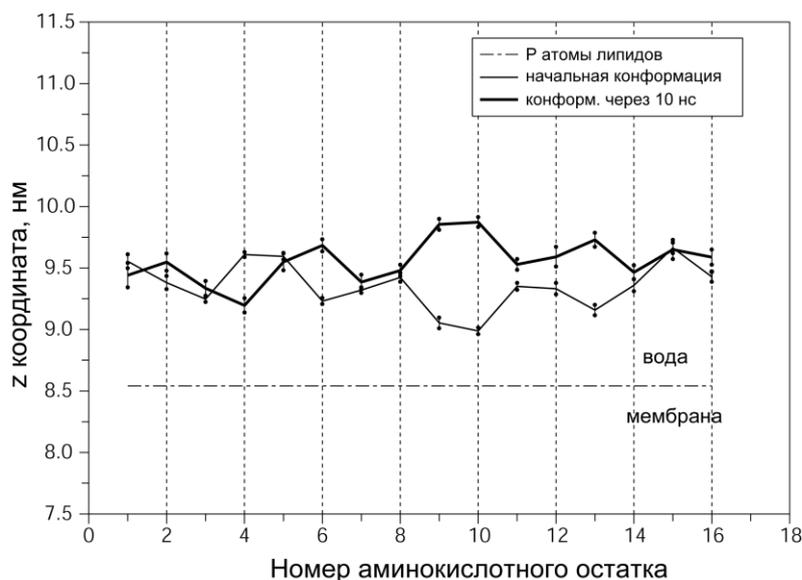
- Радиус обрезания для электростатических взаимодействий $R_{el} = 20 \text{ \AA}$
- Радиус обрезания для взаимодействия Ван-дер-Ваальса $R_{vdw} = 20 \text{ \AA}$
- Внешнее электрическое поле – 0,01 В/нм
- Для численного интегрирования использовался алгоритм Leap-frog.
- Начальные скорости определялись с помощью генератора случайных чисел по распределению Максвелла.
- Шаг интегрирования 1 фс.
- Шаг записи с траекторный файл 1 пс.

4.2. Взаимодействие зервамицина с поверхностью мембраны.

При изучении поверхностного связывания молекулы зервамицина с мембраной особое внимание уделялось ориентации пептида относительно поверхности, стабильности спиральной структуры и образованию водородных связей между аминокислотными остатками и липидными головками.

4.2.1. Взаимодействие с ПОФХ

Согласно BS-модели действия при взаимодействии с поверхностью мембраны пептид не должен проникать глубоко в область липидных голов. Во время расчета рабочей траектории отслеживалось положение и ориентация пептида относительно поверхности липидного бислоя. Для этого в первые и последние 500 пс динамики было определено среднее положение $C\alpha$ -атомов за этот период для каждого аминокислотного остатка молекулы зервамицина ПВ относительно поверхности мембраны. Граница мембраны определялась как z координата (вдоль оси нормали мембраны) центра масс атомов фосфора.



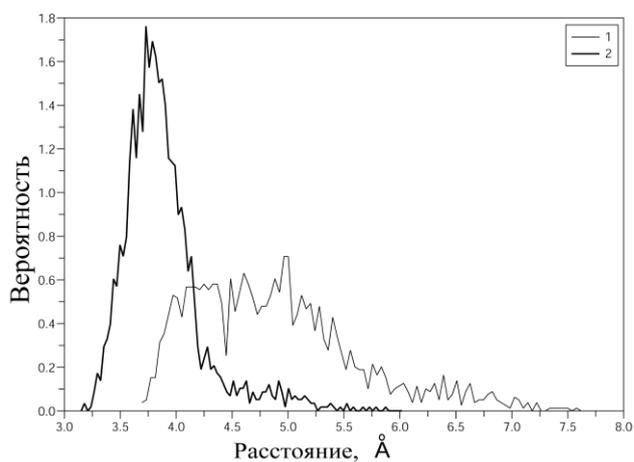
Б

Рис. 25 А. Положение α -атомов относительно атомов атомов фосфора липидных головок бислоя. Зервамицин IIВ на поверхности мембраны после 10 нс равновесной молекулярной динамик, ван-дер-ваальсовыми радиусами показаны атомы фосфора липидных головок.

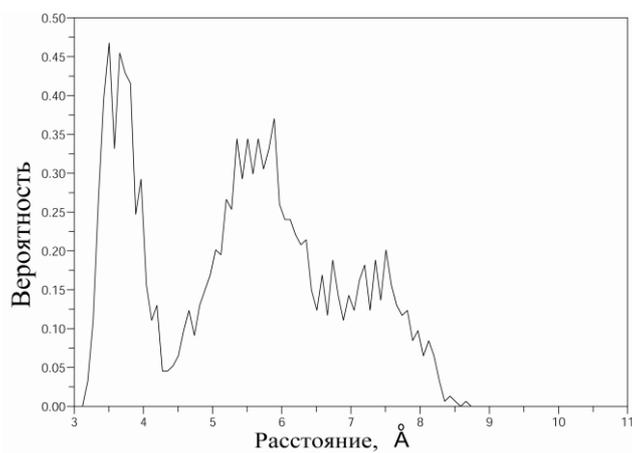
Как видно из Рис. 25, зервамицин II лишь незначительно приблизился к поверхности мембраны, повернувшись на 180° вокруг своей оси, так что вогнутая сторона стала обращена к поверхности мембраны, при этом N-конец стал расположен несколько ближе к липидным головкам чем C-конец, вероятно, этому способствует взаимодействие собственного дипольного момента пептида с внешним электрическое поле. Молекула Zrv-IIВ не взаимодействует с гидрофобными хвостами липидов, а остается в водном окружении, взаимодействуя с полярными головками липидов. Особую роль в стабилизации данной конформации пептида относительно мембраны играют остатки Gln3 и Gln11, которые взаимодействуют с полярными головками липидов. Остальные полярные аминокислотные остатки Thr6, Nup10 и Nup13 обращены в воду. Вероятно, это связано с тем, что гидроксильные группы остатков Thr и Nup, по длине связи и зарядам подобны атомам и связям в молекулах воды и не вносят сильные дефекты в сеть водородных связей водного окружения. Полярные группы Gln при взаимодействии с водой должны искажать сеть водородных связей, переориентируя ближние к ним

молекулы. Таким образом, остаткам Gln более выгодно взаимодействовать с полярными частями липидов, так как там нет структурированной сети водородных связей.

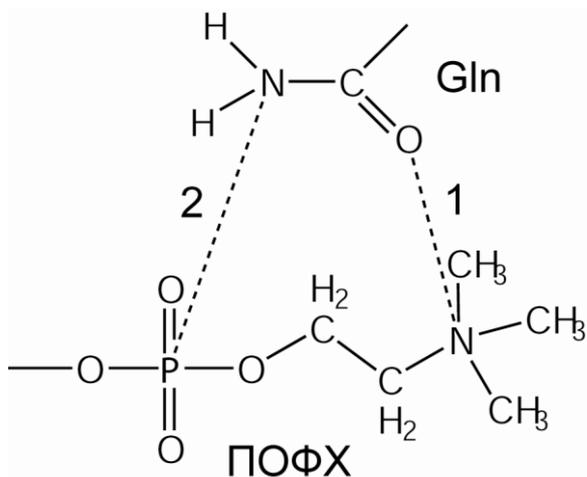
Как видно из Рис. 2, карбоксильный кислород бокового радикала Gln11 взаимодействует с положительно заряженной группой $N(CH_3)_3$. В группе $N(CH_3)_3$ атом азота несет парциальный отрицательный заряд, а атомы алкильных групп заряжены положительно, так как алкильные группы эквиваленты, они с равной вероятностью способны взаимодействовать с карбоксильным кислородом остатка Gln, поэтому при оценке наличия взаимодействия оценивалось расстояние между атомом кислорода и атомом углерода группы $N(CH_3)_3$. Атомы водорода амминой группы Gln11 взаимодействуют с отрицательно заряженными кислородами фосфатной группы ПОФХ липида, так как потенциально все 4 кислорода фосфатной группы могут образовывать водородные связи с атомами водорода, оценивалось расстояние между атомом азота остатка Gln и фосфора липидной головки. Распределение вероятности для данного расстояния имеет широкий пик, что соответствует различным комбинациям водородных связей (Рис. 26А). Карбоксильный кислород бокового радикала Gln3 образует внутримолекулярную водородную связь, а атомы водорода амминой группы взаимодействуют с атомами кислорода фосфатной группы липидной головки. В случае Gln3 распределение вероятности расстояния между атомом азота бокового радикала и атомом фосфора липида имеет более выраженные два максимума, чем для Gln11, благодаря тому, что атомом кислорода участвует во внутримолекулярной водородной связи и частично препятствует свободному вращению амминой группы. Разрыв и образование водородных связей происходит медленнее. Таким образом, взаимодействие Zrv-ПВ с модельной эукариотической мембраной стабилизируется тремя водородными связями.



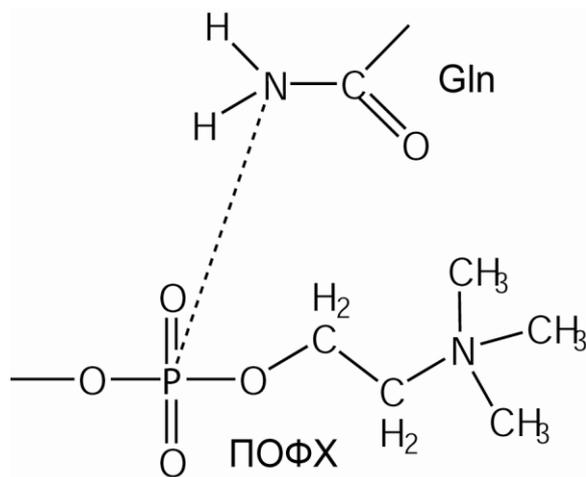
A



B



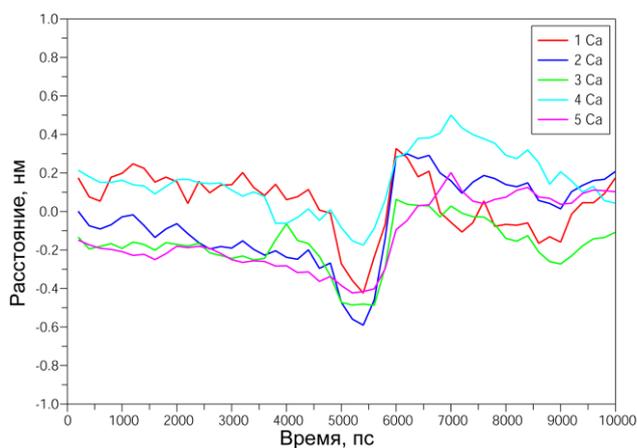
B



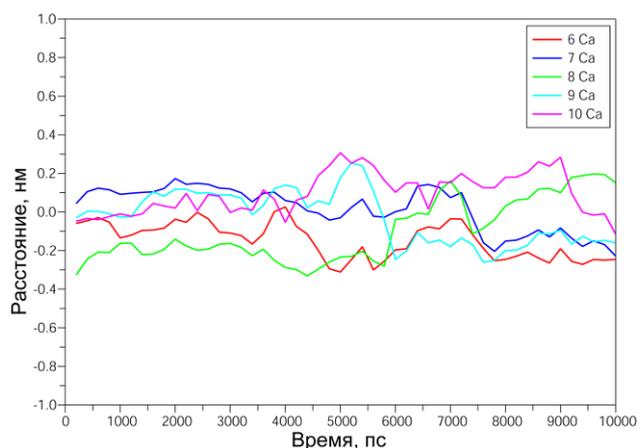
Г

Рис. 26 А. Расстояние между карбонильным кислородом бокового радикала остатка Gln11 и атомом азота липида ПОФХ (1) и атомом азота радикала Gln11 и фосфатом ПОФХ (2). Б Расстояние между азотом бокового радикала остатка Gln3 и атомом фосфата липида ПОФХ. Схематическое изображение водородных связей для Gln11 (В) Gln3 (Г).

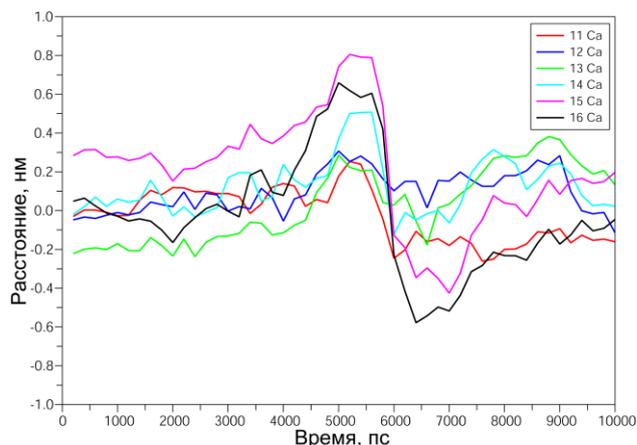
На Рис. 3 отображено изменение z координаты $\text{C}\alpha$ -атомов аминокислотных остатков относительно центра масс пептида. Молекула зервамицина ПВ повернулась вокруг своей оси на 5-ой нс динамики, при этом N-конец двигался по направлению к мембране, а С-конец от мембраны. Такая динамика поворота объясняется действием внешнего электрического поля на дипольный момент пептида. На Рис. 3В видно, что Gln11 принимает свое окончательное положение в течение 6нс динамики, в то время как остальные аминокислотные остатки, продолжают двигаться относительно центра масс. Вероятно, в данном случае Gln11 выполняет роль своеобразного якоря, взаимодействуя с липидными головками.



А



Б



В

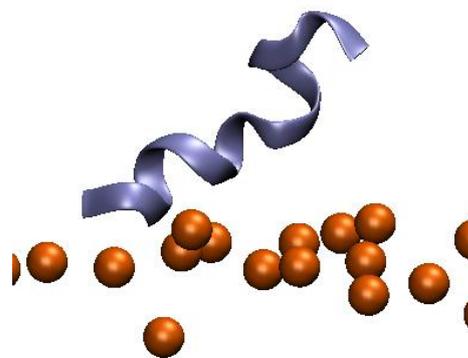
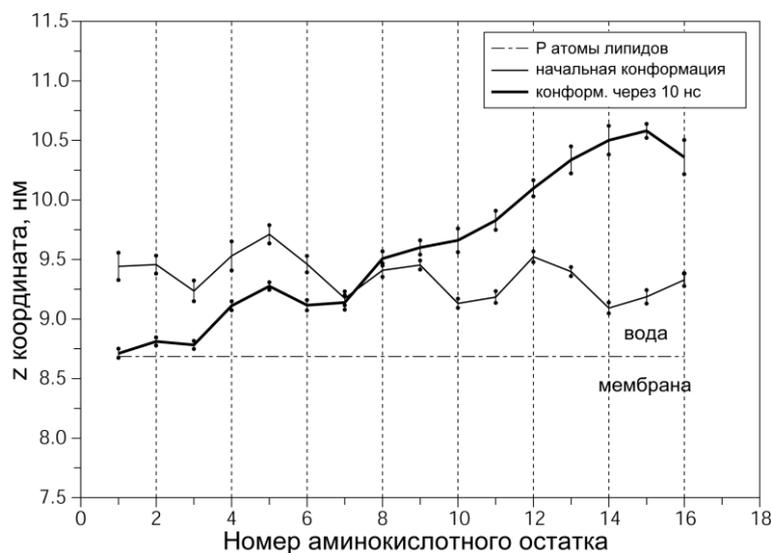
Рис. 27 Изменение z координаты Ca-атомов аминокислотных остатков молекулы зервамицина ПВ относительно центра масс пептида.

Таким образом, при взаимодействии с модельной эукариотической мембраной молекула зервамицина ПВ ориентируется параллельно поверхности мембраны вогнутой стороной на расстоянии порядка 5\AA , то есть не погружается в область липидных головок, а остается в водном окружении, что согласуется с BS-моделью действия мембран-активных пептидов. Остатки Gln3 и Gln11 образуют 3 водородные связи с полярными головками липидов, тем самым стабилизируя положение пептида относительно поверхности бислоя.

4.2.2 Взаимодействие с ПОФЭ и ПОФГ

Для оценки взаимодействия зервамицина ПВ с модельной мембраной прокариотической клетки также как и в предыдущем эксперименте было

посчитано среднее положение $\text{C}\alpha$ -атомов пептида относительно поверхности мембраны за первые и последние 500 пс рабочей траектории.



А

Б

Рис. 28 А. Положение $\text{C}\alpha$ -атомов относительно атомов фосфора липидных головок бислоя в начальной конформации и после 10нс равновесной динамики. **Б.** Положение пептида относительно поверхности мембраны (синим показан зервамицин ПВ, оранжевым атомы фосфора)

Молекула зервамицина ПВ за счет направления внутримолекулярных водородных связей, стабилизирующих спираль, обладает дипольным моментом, направленным от С-конца к N-концу и приблизительно равным 50D, что эквивалентно зарядам $+0,4e$ и $-0,4e$ на N- и С-концах. Фосфатидилглицероловые липиды придают поверхности мембраны суммарный отрицательный заряд. Таким образом, N-конец молекулы ZrvПВ, несущий локальный положительный заряд, притягивается к поверхности мембраны, а С-конец удаляется от поверхности мембраны на расстояние $\sim 1,7$ нм. Внешнее электрическое поле также способствует такой ориентации пептида. Также как и в случае с мембраной ПОФХ, пептид взаимодействует исключительно с полярной частью мембраны, но в данном эксперименте N-конец входит в область липидных головок и образует как минимум четыре водородные связи с молекулами липидов. Карбонильный кислород остатка $\text{As}\epsilon 0$ взаимодействует с положительно заряженной группой NH_3^+ липида ПОФЭ. Так как все атомы водорода эквивалентны, наличие водородной связи оценивалось по расстоянию между атомом кислорода $\text{As}\epsilon 0$ и атомом азота

ПОФЭ. Водороды атомов азота (основной цепи и бокового радикала) остатка Gln3 и гидроксильная группа остатка Thr6 взаимодействуют с атомами кислорода фосфатных групп липидов ПОФЭ, в данном случае исследовалось расстояние между атомами азота и фосфора. Как видно из Рис. 29, распределения плотности вероятности расстояний между атомами, участвующими в образовании водородной связи, имеют один ярко выраженный максимум, в отличие от аналогичных распределений для мембраны ПОФХ, где наблюдалось несколько широких максимумов. Это свидетельствует о более прочном взаимодействии Zrv-ПВ с бактериальной мембраной, чем с эукариотической.

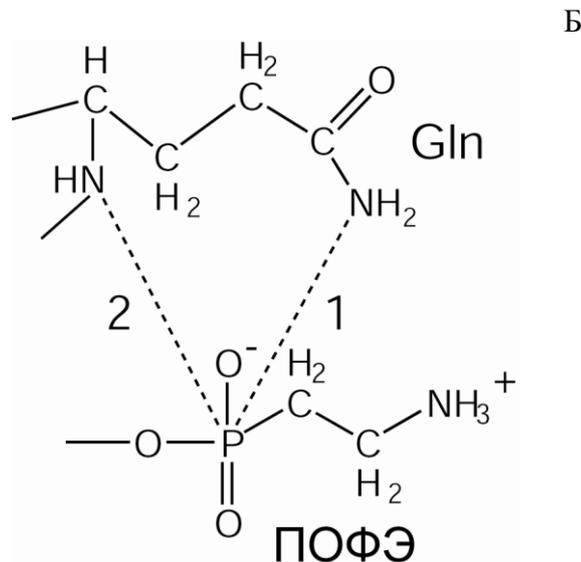
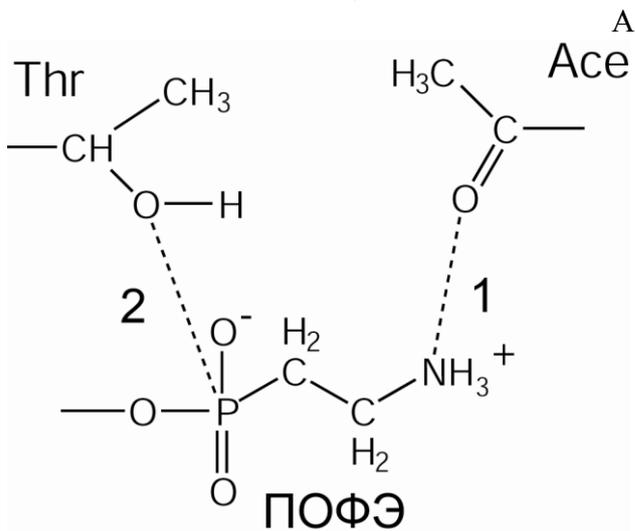
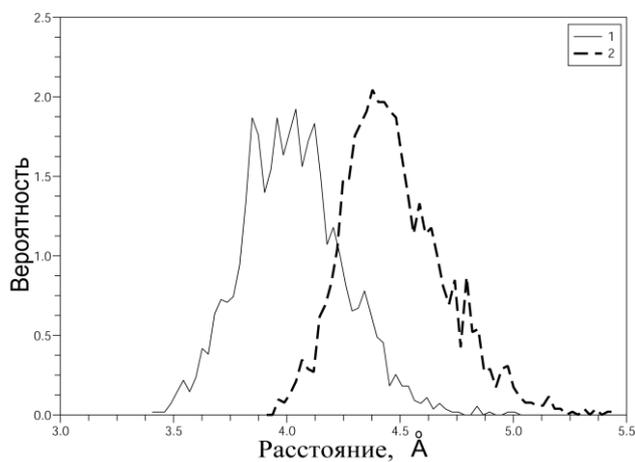
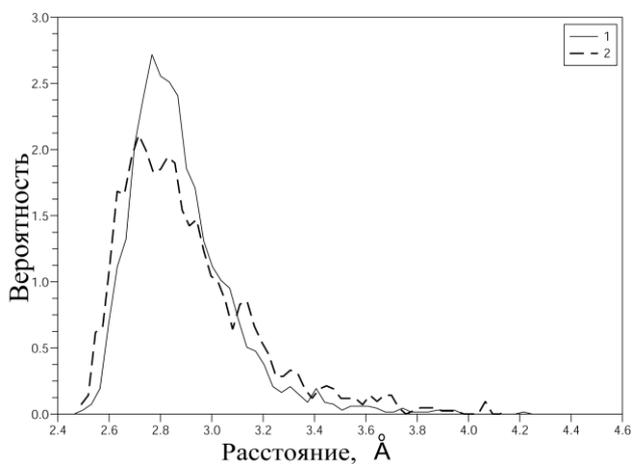


Рис. 29 А. Расстояние между карбонильным кислородом остатка Ace0 и атомом азота липида ПОФЭ (1), расстояние между гидроксильным кислородом остатка Thr6 и кислорода фосфатной группы липида ПОФЭ (2). Б. Расстояние между атомом азота бокового радикала остатка Gln3 и атомом фосфора липида ПОФЭ (1) и между атомом азота пептидной связи остатка Gln3 и атомом фосфора липида ПОФЭ (2). Схематическое изображение связей для Thr, Ace (В) и Gln (Г).

При взаимодействии молекулы зервамицина ПВ с мембраной, состоящий из ПОФЭ и ПОФГ липидов, не наблюдается поворот на 180° вокруг своей оси. Из Рис. 28А можно видеть, что пептид повернулся на угол $\sim 40^\circ$ относительно поверхности мембраны. На Рис. 30 представлена динамика движения $C\alpha$ -атомов аминокислотных остатков относительно центра масс пептида. Молекула Zrv-ПВ развернулась N-концом к мембране за первые 6 нс динамики и далее аминокислотные остатки на N-конце лишь незначительно изменяли свое положение относительно центра масс пептида, при этом в течение динамики движение данных остатков было согласовано (Рис. 30 А). Движение аминокислотных остатков на С-конце менее согласовано, это связано с тем, что остатки на N-конце взаимодействуют с поверхностью мембраны, что фиксирует их относительно друг друга, остатки на С-конце взаимодействуют в основном с молекулами воды, что делает их подвижнее относительно друг друга.

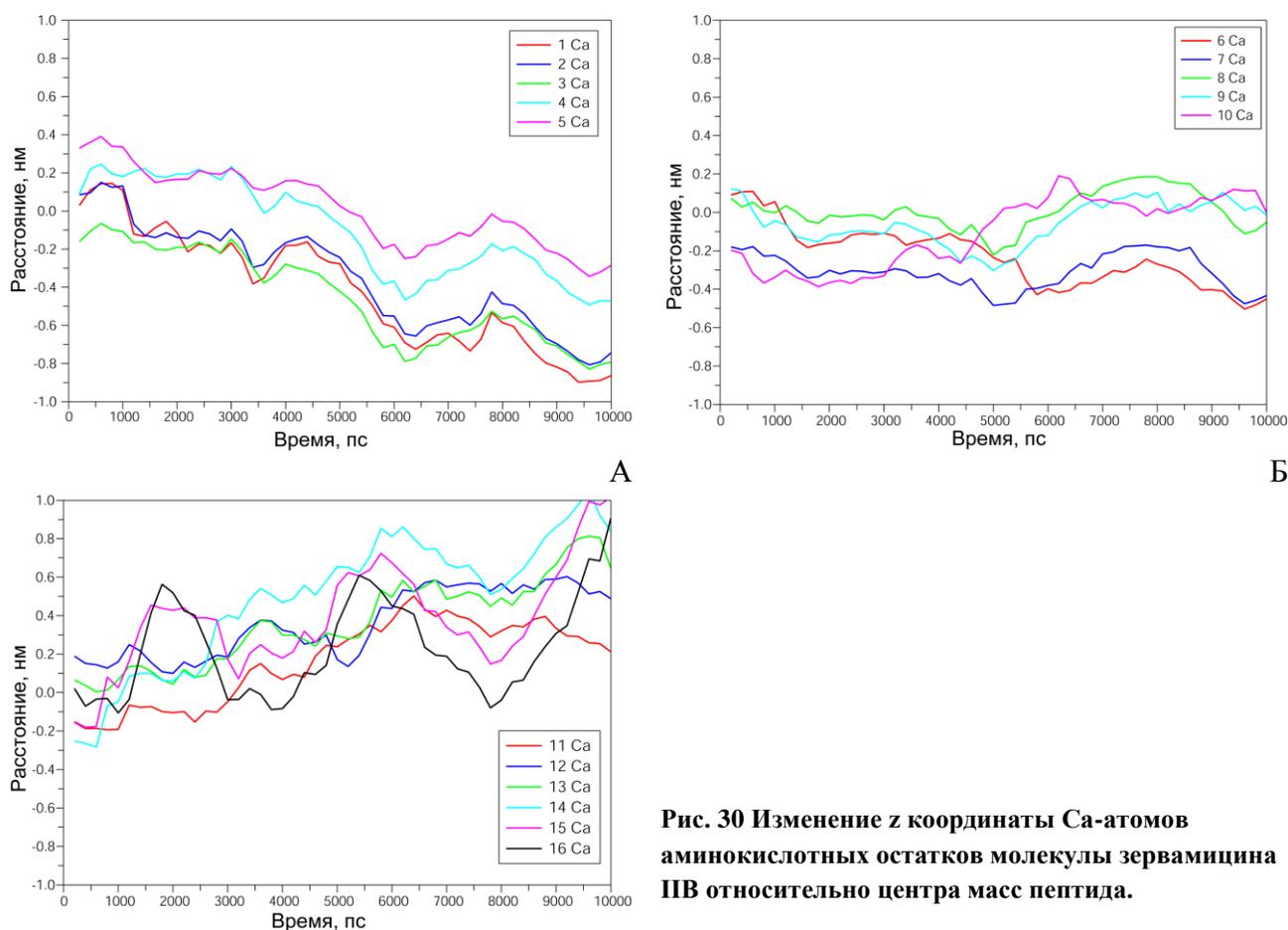


Рис. 30 Изменение z координаты Ca-атомов аминокислотных остатков молекулы зервамицина ПВ относительно центра масс пептида.

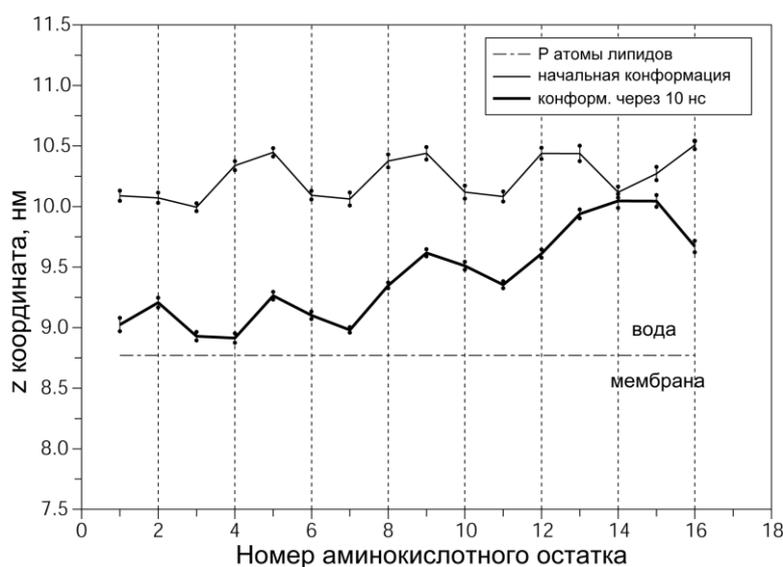
Таким образом, при взаимодействии с бактериальной мембраной зервамицин ПВ ориентирует N-концом к поверхности мембраны за 6 нс равновесной динамики под действием внешнего электрического поля. При этом первые три аминокислотных остатка входят в область полярных головок, а остальная часть пептида остается в водном окружении. Данное положение пептида стабилизируется 4-мя водородными связями между остатками Ace0, Gln3, Thr6 и полярными головками липидов.

4.2.3 Димеризация молекул Zrv-ПВ на поверхности мембраны.

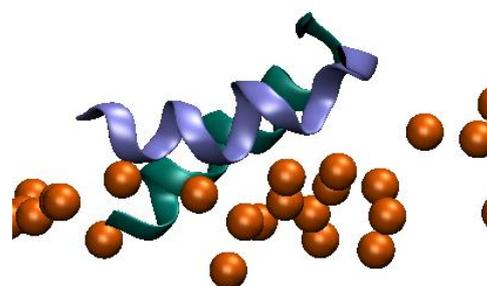
В экспериментальных работах было показано, что ковалентное связывание молекул аламетицина N-концами приводит к увеличению времени жизни канала до 100 мс [165, 166]. Взаимовлияние молекул Zrv-ПВ может сказаться не только на стадии образования канала, но также и на взаимодействии с мембраной. В данной работе изучалась динамика двух молекул зервамицина ПВ на поверхности липидного бислоя, состоящего из липидов ПОФЭ и ПОФГ. В начальной конформации пептиды располагались параллельно друг другу на расстоянии 2,4 нм между центрами масс. Каждая молекула пептида была повернута выпуклой (полярной) стороной к поверхности мембраны. После предварительной релаксации системы была рассчитана равновесная динамика в течение 10 нс под действием внешнего электрического поля.

Расстояние между молекулами зервамицина ПВ сократилось за первые 6 нс с 2,4 нм до 1 нм. При этом молекулы образовали димер (Рис. 31 Г). В димере пептиды расположены параллельно друг другу. Как было показано выше, в водном окружении молекулы Zrv-ПВ не образуют димер, а близкое расположение молекул пептидов вызывает дестабилизацию спиральной структуры. Когда пептиды взаимодействуют на поверхности мембраны, они ориентируются по внешнему электрическому полю и притягиваются

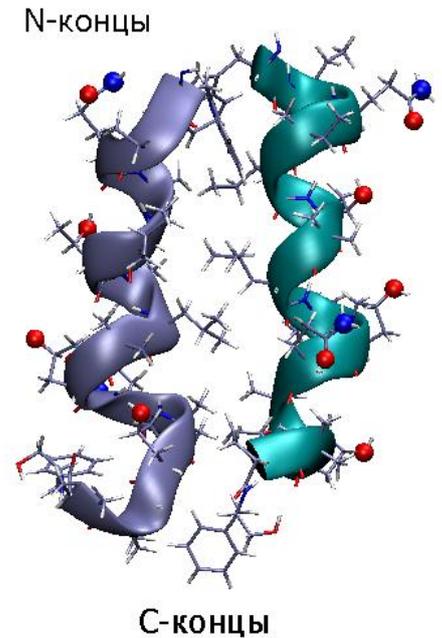
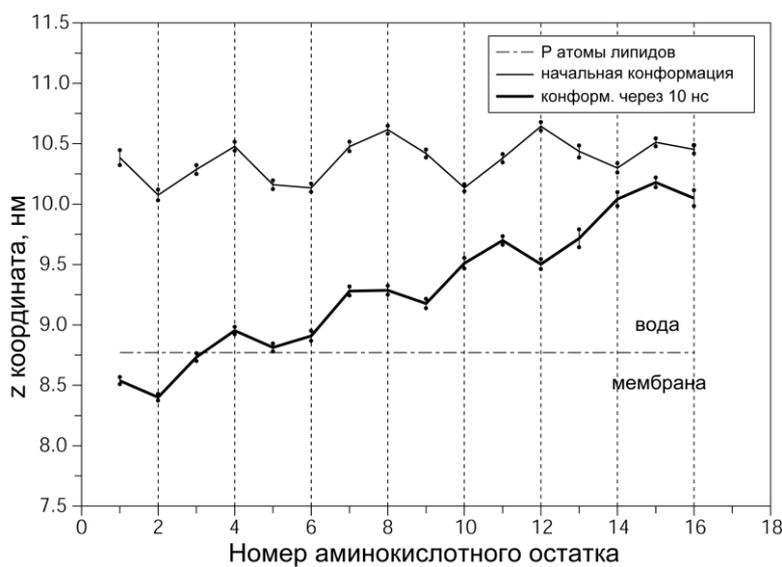
положительно заряженным N-концом к липидным головкам. Поэтому на поверхности мембраны образуется параллельный димер. Две молекулы зеррамицина ПВ взаимодействуют гидрофобными областями, изолируя тем самым неполярные аминокислотные остатки от молекул воды и полярных головок липидов. Предположительно, образование такого димера должно облегчить прохождение молекул через область липидных головок. Как видно из Рис. 31А, В, взаимодействие молекул зеррамицина ПВ в данном эксперименте с мембраной сильнее, чем в случае одиночной молекулы. Обе молекулы приблизились N-концами к липидам и расположены под углом $\sim 20^\circ$ к поверхности мембраны. N-конец основной цепи одной молекулы димера вошел в область липидных голов ниже плоскости атомов фосфора. У второй молекулы основная цепь находится в водном окружении, но боковые радикалы 4-рех аминокислотных остатков находятся в области липидных голов. Вероятно, для дальнейшего встраивания в мембрану димер должен претерпеть конформационные изменения, чтобы гидрофобные аминокислотные остатки оказались снаружи и могли взаимодействовать с гидрофобными хвостами жирных кислот.



А



Б



В

Г

Рис. 31 Положение α -атомов относительно атомов фосфора липидных головок бислоя в начальной конформации и после 10нс равновесной динамики отдельно для каждой молекулы (А, В). Б. Положение пептида относительно поверхности мембраны (синим и зеленым показаны молекулы зервамицина ПВ, оранжевым атомы фосфора). Г. Структура димера, образованного двумя молекулами зервамицина ПВ на поверхности липидного бислоя, сферами отмечены акцепторы водородных связей боковых радикалов полярных остатков.

При взаимодействии с липидными головками молекулы зервамицина ПВ образуют порядка 8 водородных связей. Молекула, которая глубже проникла в липидный бислой образует 3 водородные связи с участием боковых радикалов остатков Gln3 и Thr6, причем водородная связь между Thr и фосфатной группой менее стабильна. Второй пептид образует 5 связей с участием Ace0, Gln3, Thr6 и Gln11. Первая молекула, проникая в область липидных головок, стерически расталкивает молекулы липидов, тем самым, удаляя потенциальных доноров и акцепторов водородных связей. Поэтому образовывать стабильные связи могут только полярные остатки с длинными боковыми радикалами, например Gln. Вероятно, подобное расталкивание делает доступными липидные хвосты для гидрофобного взаимодействия с неполярными аминокислотными остатками, что должно способствовать дальнейшему встраиванию пептида. Вторая молекула не вызывает таких сильных структурных изменения в бислое, поэтому потенциально может образовать больше водородных связей.

Таким образом, две молекулы зервамицина ПВ образуют параллельный димер и проникают N-концами в липидный бислой глубже, чем одиночная молекула.

Для оценки влияния взаимодействия пептидов на спиральную структуру, было посчитано RMSD C α -атомов для обеих молекул. Для молекулы, не взаимодействующей с гидрофобной областью липидного бислоя, значение RMSD составило 0,15 нм, что соответствует RMSD молекулы ZrvПВ в воде. Для молекулы пептида, погруженного N-концом в липидный бислой, аналогичное значение выше и составляет 0,3 нм, при чем рост резкий. Рост RMSD соответствует встраиванию пептида в гидрофобную область. Следовательно, в данном случае нестабильность структуры вызвана взаимодействием N-конца с молекулами липидов.

Так как начальное положение молекул зервамицина могло в значительной степени повлиять на образование димера, был проведен дополнительный эксперимент, в котором в начальной структуре пептиды располагались взаимоперпендикулярно (как было описано в пункте 3.3). В данном случае через 14 нс наметилась четкая тенденция к образованию параллельного димера, вероятно на полное его формирование необходимо значительно большее время. Таким образом, ZrvПВ способен образовывать димеры на поверхности липидного бислоя, что не наблюдается в водном окружении.

4.3.4 Конформационные изменения молекул зервамицина ПВ в различных системах.

Конформационная стабильность молекул зервамицина ПВ оценивалась путем вычисления среднего квадратичного отклонения C α -атомов аминокислотных остатков относительно начального положения. При расчете RMSD не учитывалось движение пептида как целого. В отличие от длинных пептидов, структура зервамицина достаточно жесткая и во всех

исследуемых системах в течение 10 нс претерпевала лишь незначительные изменения. В водном окружении спиральная структура пептида сохраняется, но увеличивает изгиб спирали. Также небольшое изменение структуры наблюдается на поверхности бислоя, состоящего из ПОФХ, боковой радикал Gln3 поворачивается на вогнутую сторону, что обусловлено взаимодействием с липидными головками.

При взаимодействии с обоими липидными бислоями наблюдаются небольшие конформационные изменения последних трех аминокислотных остатков. Начальная структура ZrvIIВ получена методом ЯМР на мицеллах, где не учитывалось влияние трансмембранного потенциала, следовательно, можно предположить, что это вызвано действием внешнего электрического поля.

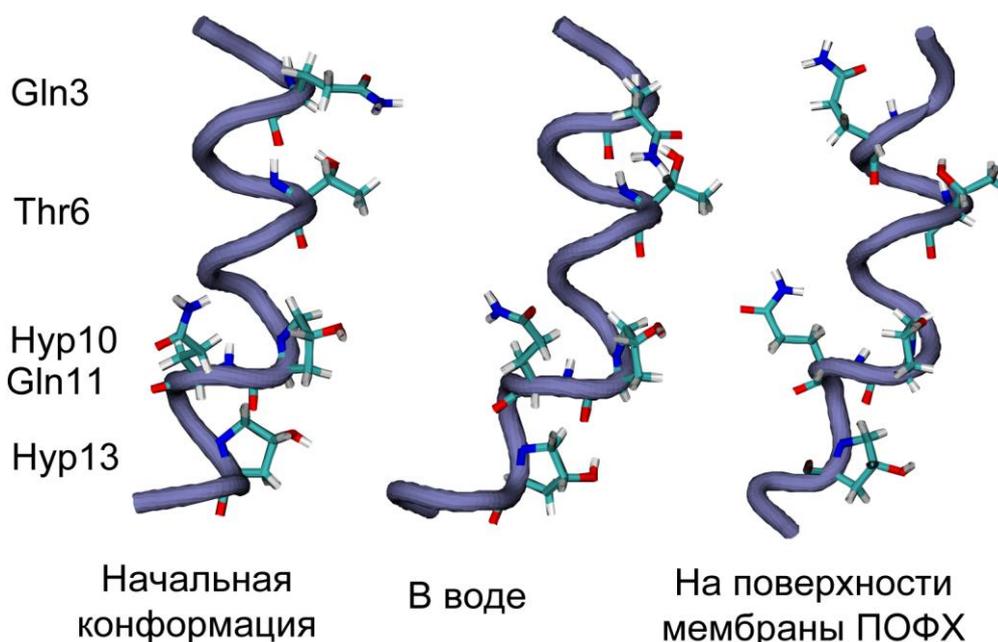


Рис. 32 Конформации зервамицина в различных системах после 10 нс равновесной молекулярной динамики.

На Рис. 33 приведены среднеквадратичные отклонения C α -атомов относительно начального положения для молекулы зервамицина IIВ в различных системах. RMSD для Zrv-IIВ в воде и в метаноле одинаково и составляет порядка 0,14 нм. RMSD для аламетицина в воде составляет 0,75 нм. На поверхности мембраны RMSD для аламетицина уменьшается до 0,25

нм, что свидетельствует о стабилизирующем влиянии липидного бислоя на спиральную структуру аламитецина. В случае зервамицина ПВ начальная конформация в воде и метаноле сохраняется стабильной в течение как минимум 10 нс, а на поверхности мембраны претерпевает быстрые изменения. Как видно из Рис. 33, RMSD для Zrv-ПВ на поверхности ПОФХ бислоя в первые 4 нс соответствует RMSD в воде и метаноле, после чего пептид разворачивается вокруг своей оси и образует водородные связи с липидными головками. При этом структура немного искажается и после поворота RMSD составляет 0,33 нм. Изменение конформации С-концевых аминокислотных остатков также вносит вклад в RMSD.

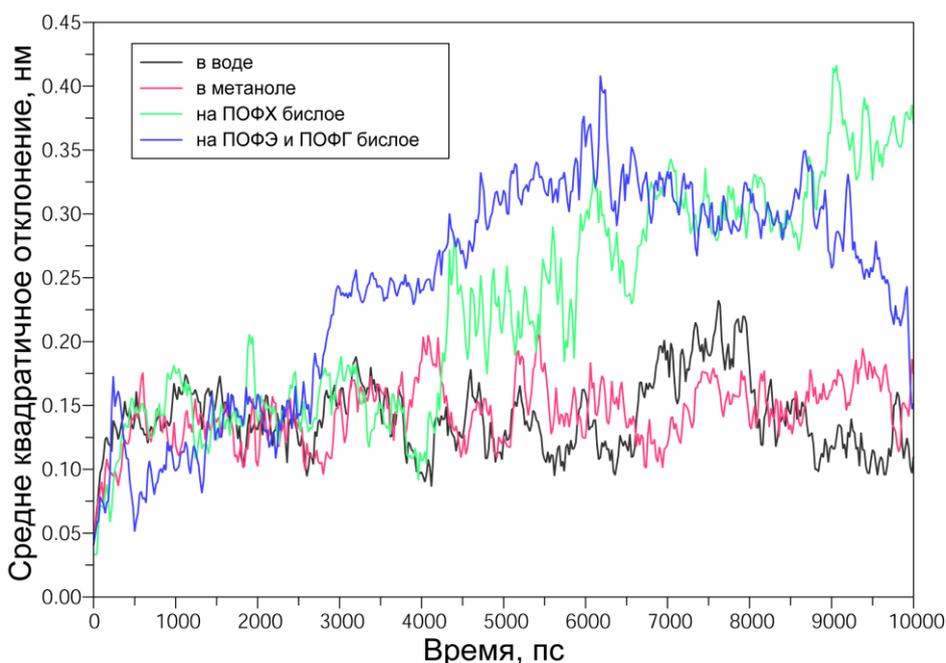


Рис. 33 Среднеквадратичные отклонения положения C α -атомов молекулы зервамицина ПВ от начального положения в различных системах.

При взаимодействии Zrv-ПВ с липидами ПОФЭ и ПОФГ при повороте пептида относительно поверхности мембраны RMSD увеличивается до 0,33 нм. Рост RMSD вызван попеременным образованием и разрывом водородных связей между аминокислотными остатками и липидами. За 10 нс конформация пептида в значительной степени возвращается к начальной конформации, о чем свидетельствует падение RMSD.

4.4. Встраивание зервамицина ПВ в мембрану

Для исследования динамики встраивания зервамицина в липидный бислой с помощью метода управляемой динамики был проведен ряд численных экспериментов, в которых внешняя сила прикладывалась отдельно к С и N-концам и к C α -атомам. В качестве начальной структуры использовались системы, состоящие из липидного бислоя и молекулы зервамицина после 10нс релаксации на поверхности мембраны (пункт 4.3).

4.4.1. Встраивание в ПОФХ

Под действием силы 4,3 ккал/(моль·Å), приложенной к С-концу ZrvIIВ в течение 10нс развернулся С-концом к мембране, но не углубился в область гидрофобных хвостов. Вероятно, это связано с торможением за счет образования водородных связей между остатками Нур10, Gln11, Нур13, Phl16 и липидными головками. В эксперименте, где сила 0,27 ккал/(моль·Å) была приложена ко всем C α -атомам пептида ZrvIIВ в течение 10 нс оставался в области липидных головок параллельно поверхности бислоя. Когда сила была приложена к N-концу, пептид за 10 нс вошел в область липидных головок, не вызвав при этом структурных изменений в липидном бислое. Таким образом, данные эксперименты подтверждают гипотезу, что встраивание в мембрану происходит N-концом. Так как приложение силы ко всем C α -атомам не привело к встраиванию пептида, можно сделать вывод, что воздействие на пептид, переводящее его из поверхностного состояния в трансмембранное, в основном направлено на N-конец молекулы, что хорошо согласуется с моделью потенциал-зависимой активации канала, согласно которой трансмембранный потенциал разворачивает дипольный момент молекулы, то есть «тянет» несущий локальный положительный заряд N-конец внутрь мембраны.

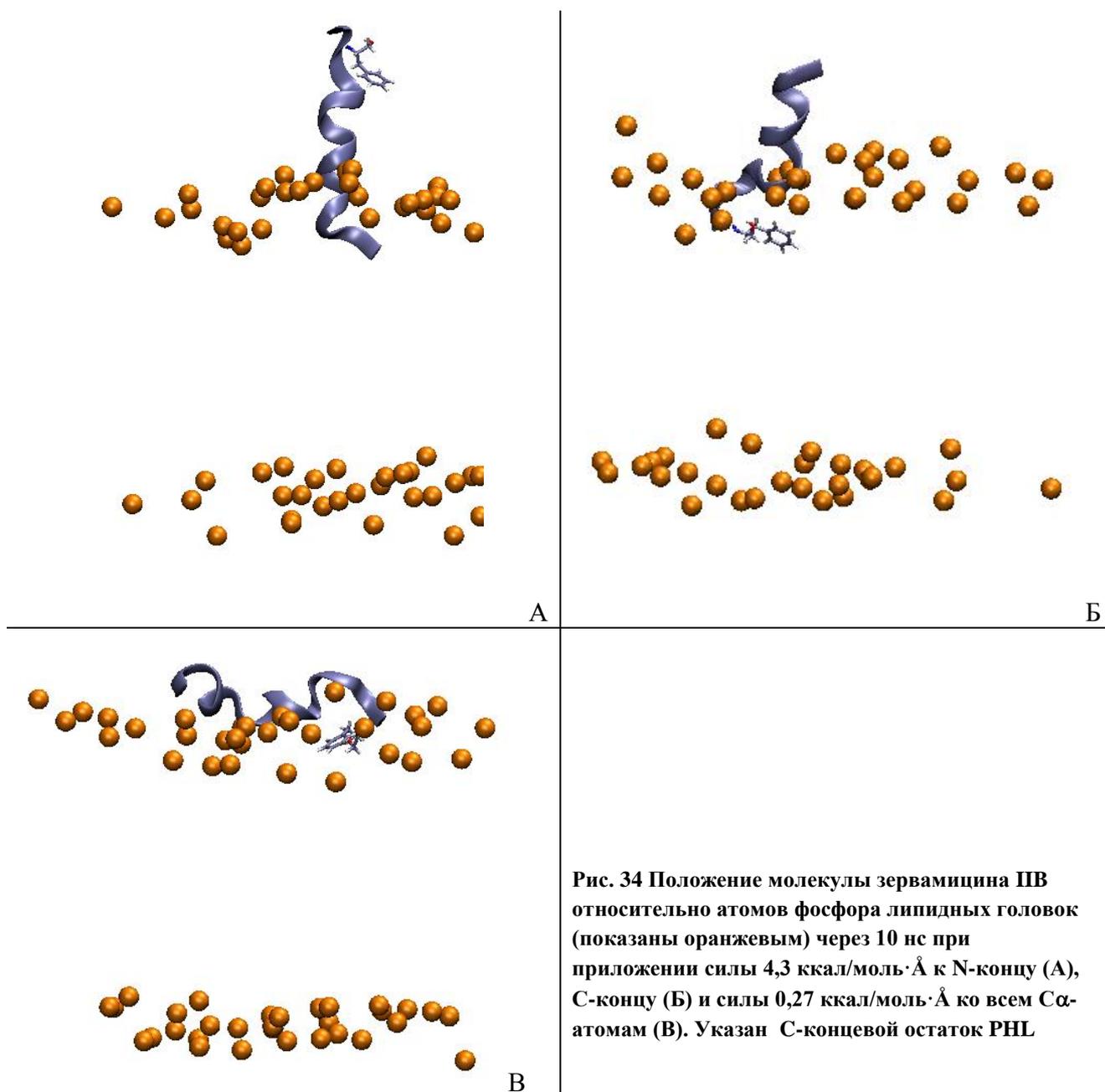


Рис. 34 Положение молекулы зервамицина ПВ относительно атомов фосфора липидных головок (показаны оранжевым) через 10 нс при приложении силы 4,3 ккал/моль·Å к N-концу (А), С-концу (Б) и силы 0,27 ккал/моль·Å ко всем С α -атомам (В). Указан С-концевой остаток PHL

На следующем этапе работы более детально был исследован процесс встраивания молекулы зервамицина ПВ в липидный бислой. Для этого были рассчитаны три траектории, в которых к N-концу (к С α -атому остатка ACE0) была приложена сила, равная 4,3; 5,7 и 8,6 ккал/(моль·Å), с целью определить оптимальное значение внешней силы для дальнейшего исследования.

На Рис. 35 показано изменение z координаты остатка ACE под действием внешнего ускорения. При ускорении эквивалентном 4,3 ккал/(моль·Å) встраивание происходит медленно, и за 10 нс N-конец преодолел только верхний монослой. Под действием 5,7 ккал/(моль·Å) Zrv-

ПВ полностью встраивается за 7 нс и остается в трансмембранной конформации. При силе 8,6 ккал/(моль·Å) пептид проходит сквозь мембрану и выходит в водное окружение не испытывая значительного торможения от энергетических барьеров. Таким образом, для изучения динамики встраивания Zrv-ПВ в липидный бислои нужно использовать значение внешней силы 5,7 (ккал/моль·Å).

Динамика встраивания пептида происходит неравномерно. Можно выделить три стадии. В начале, N-конец движется в водном окружении, приближаясь к липидным головкам. На первой стадии аминокислотные остатки Ace0-Trp1-Phe2 входят в гидрофобную область мембраны. Далее Gln3 и Thr6 образуют водородные связи с полярными головками липидов и тем самым замедляют дальнейшее встраивание пептида. На второй стадии в гидрофобную область входят остатки Gln3-Dva4-Phe5-Thr6-Aib7-Leu8-Aib9, а Asp10 и Gln11 взаимодействуют с полярной областью мембраны и вызывают замедление динамики встраивания. На третьей (заключительной) стадии весь пептид встраивается в липидный бислои.

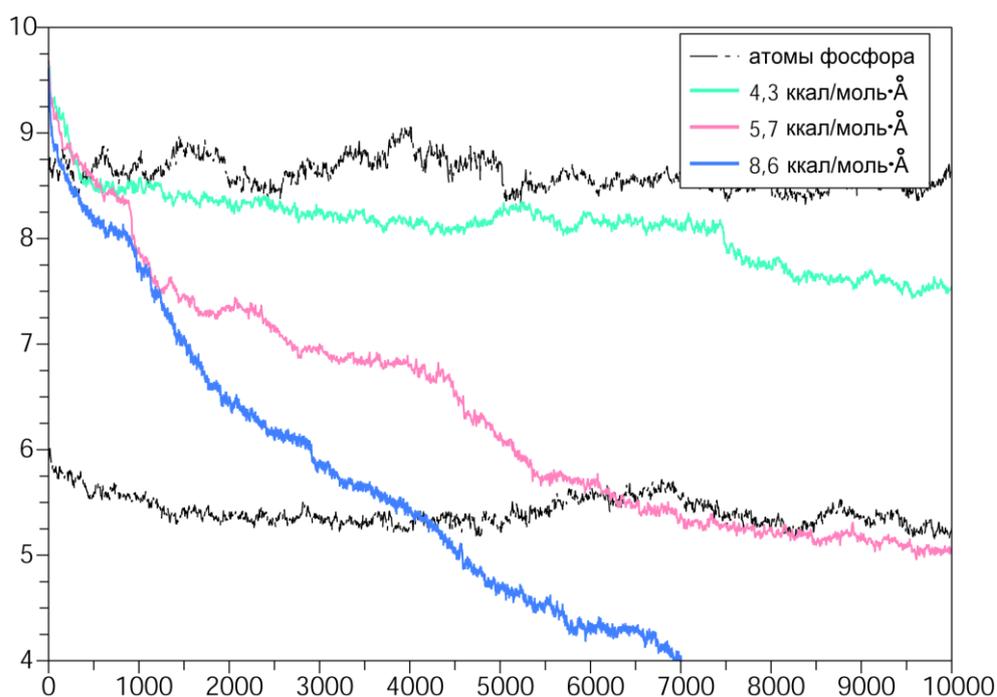


Рис. 35 Изменение z-координаты N-конца зервамина под действием внешней силы.

Таким образом, при встраивании в мембрану пептид преодолевает 3 существенных энергетических барьера. Первый барьер соответствует

прохождению остатка Ace0 через область липидных головок, второй прохождению Gln3 и Thr6 и третий прохождению Hyp10, Gln11 и Hyp13 через полярную часть мембраны.

При встраивании ZrvIIВ N-концом в липидный бислой поочередно образуются водородные связи между аминокислотными остатками и липидными головками, однако в этом взаимодействии не участвуют более 2 остатков одновременно. При встраивании С-концом, как было описано выше, 4 аминокислотных остатка (Hyp10, Gln11, Hyp13, Phe16) одновременно образуют водородные связи с полярными головками липидов, что создает большой потенциальный барьер и препятствует дальнейшему встраиванию. Таким образом, наличие на С-конце большего количества полярных остатков не позволяет пептиду встраиваться в липидный бислой С-концом. В противном случае активность зервамицина IIВ проявлялась бы не только при «цисс»-трансмембранном потенциале (когда пептиды находятся с той же стороны мембраны что и катод).

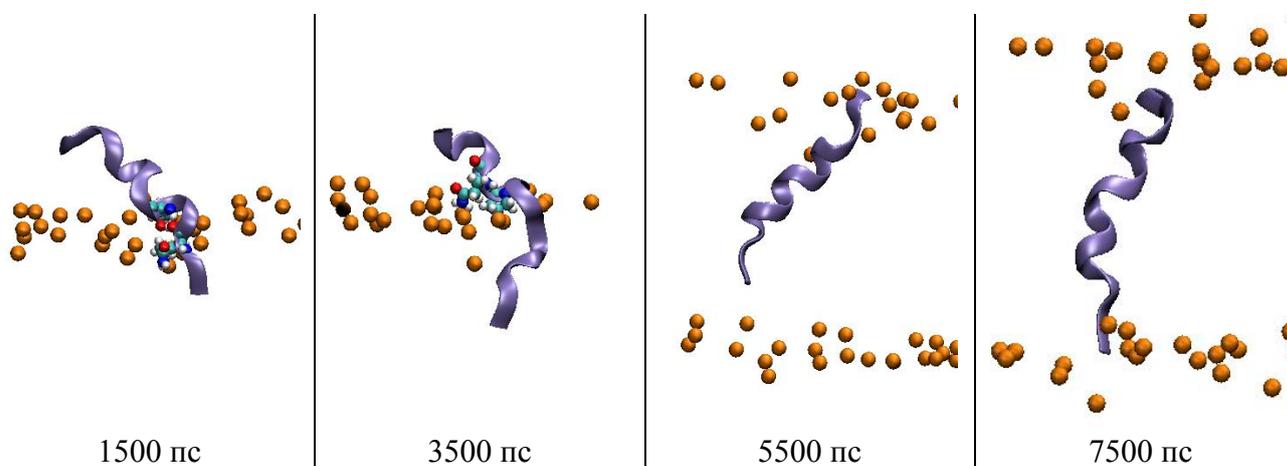


Рис. 36 Положение Zrv-IIВ относительно атомов фосфора липидов ПОФХ в различные моменты траектории. Ван-дер-ваальсовыми сферами отмечены атомы фосфора и остатки Gln3, Thr6 (1500 пс) и Hyp10, Gln11 (3500 пс)

На Рис. 36 представлены конформации молекулы зервамина IIВ в различные моменты траектории. Время 1500 пс и 3500 пс соответствует положению пептида в двух потенциальных ямах. На картинке 1500 пс Ван-дер-ваальсовыми сферами показаны остатки Gln3 и Thr6, которые

взаимодействуют с полярными головками липидов. На картинке 3500 пс отмечены остатки Nup10 и Gln11, которые также вызывают замедление встраивания пептида в липидный бислой. Также видно, что на этой стадии спиральная структура пептида искажается за счет того, что Gln3 продолжает притягиваться к липидным головкам.

Через 5500 пс управляемой молекулярной динамики пептид полностью встраивается в липидный бислой. Сначала пептид располагается под углом к поверхности мембраны, что может быть объяснено взаимодействием полярных аминокислотных остатков с липидными головками мембраны, так как полярные остатки расположены преимущественно на выпуклой стороне мембраны. Это приводит к повороту пептида относительно поверхности бислоя. После разрыва водородных связей пептид разворачивается перпендикулярно поверхности мембраны и остается в таком положении при дальнейшем действии силы, а также после ее отключения. За следующие 2 нс пептид ориентируется перпендикулярно поверхности мембраны и далее не меняет своего положения.

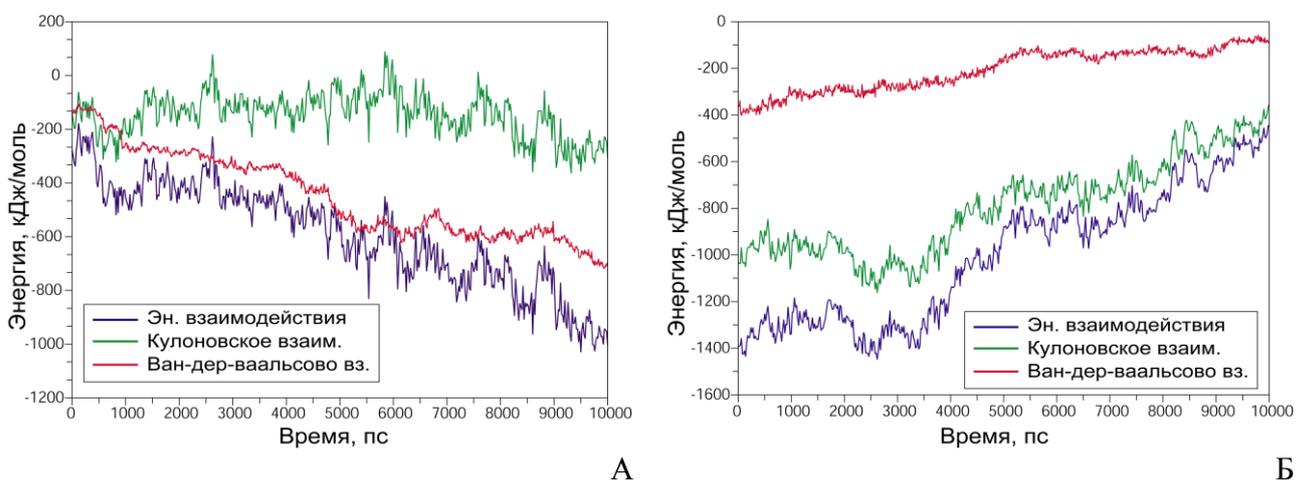


Рис. 37 Кулоновская, ван-дер-ваальсовская энергии взаимодействия и их сумма (энергия взаимодействия) для молекулы зеррамицина ПВ с липидами (А) и водой (Б)

При встраивании молекулы ZrvПВ в липидный бислой энергия взаимодействия пептида с липидами, рассчитанная как сумма кулоновских и ван-дер-ваальсовских взаимодействий, уменьшилась на 800 кДж/моль (Рис.

37). А энергия взаимодействия пептида с водой возросла на 800 кДж/моль. Как видно из графиков, основная составляющая энергии взаимодействия пептида с водой является кулоновское взаимодействие, а пептида с липидами – ван-дер-ваальсовское. Однако в сумме они дают примерно одинаковые вклады в изменение энергии при встраивании. Таким образом, потенциальная энергия взаимодействия зервамицина ПВ с окружением при встраивании в липидный бислой практически не изменяется. На графике зависимости энергии взаимодействия от времени видно изменение энергии на каждой стадии процесса встраивания. Так на первой стадии энергия падает на 200 кДж/моль, на второй стадии на 370 кДж/моль и на третьей - на 230 кДж/моль. Изменение энергии на каждой стадии пропорционально количеству аминокислотных остатков, вошедших в липидный бислой на данной стадии.

Локальные минимумы кулоновской составляющей энергии взаимодействия пептида с липидами соответствуют образованию водородных связей. Как видно, после встраивания пептида в бислой, происходит небольшое понижение энергии кулоновского взаимодействия, это связано со взаимодействием остатков Trp1 и Ph16 с полярными участками мембраны. Эти два остатка служат своеобразными якорями, фиксирующими трансмембранное положение пептида.

4.4.2. Встраивание в ПОФГ и ПОФЭ

Под действием силы 4,3 ккал/(моль·Å), приложенной к С-концу ZrvПВ в течение 14 нс, развернулся параллельно поверхности мембраны. Видимо, взаимное отталкивание отрицательно заряженной поверхности мембраны и С-конца пептида препятствует встраиванию даже в область полярных головок, что можно было наблюдать для ПОФХ бислоя. В экспериментах, где такая же сила была приложена к N-концу, а сила 0,27 ккал/(моль·Å) была приложена ко всем С α -атомам аминокислотных остатков встраивание

пептида в мембране происходило также как и в случае с ПОФХ мембраной (Рис. 38).

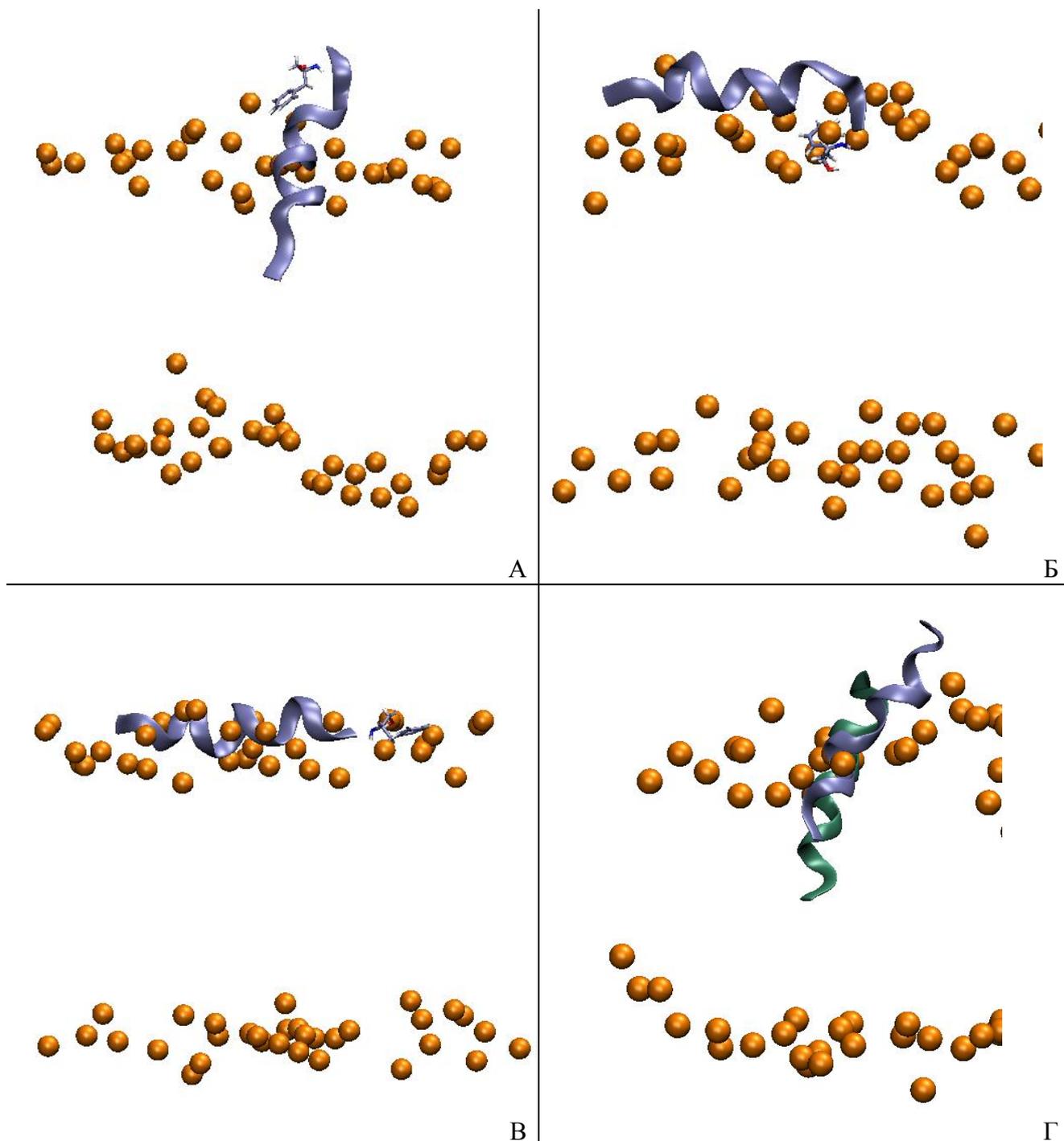


Рис. 38 Положение молекулы зервамицина IIВ относительно атомов фосфора липидных головок (показаны оранжевым) через 10 нс при приложении силы 4,3 ккал/(моль·Å) к N-концу (А), С-концу (Б) и силы 0,27 ккал/(моль·Å) ко всем С α -атомам (В). Указан С-концевой остаток РНL

Для модельной мембраны эукариот также было изучено встраивание димера из двух молекул ZrvIIIB под действием силы 4,3 ккал/(моль·Å), приложенной к N-концам пептида. Как видно из Рис. 38Г за 10 нс одна из

молекул димера погрузилась значительно глубже в гидрофобную область мембраны, чем одиночный пептид, следовательно, можно сделать вывод, что взаимодействие молекул зервамицина ПВ на поверхности мембраны и образование параллельного димера способствует дальнейшему встраиванию пептида. Не смотря на это, образование димера не является обязательным при взаимодействии пептидов с поверхностью мембраны, т.к. время образования комплекса может превышать время встраивания пептида в мембрану.

В случае с бактериальной мембраной ее отрицательный заряд увеличивает первый потенциальный барьер. Время, требуемое на полное встраивание пептида в мембрану под действием внешней силы значительно больше, чем в случае с эукариотической мембраной. Предположительно, селективность действия зервамицина определяется стадией взаимодействия с поверхностью мембраны, т.к. вероятность адсорбции на поверхность эукариотической клеткой оказывается меньше.

Так же как и в эксперименте с мембраной из липидов ПОФХ наиболее достоверные результаты можно получить, прикладывая силу $5,7$ ккал/(моль·Å) к N-концу (Рис. 39). В данном эксперименте динамика встраивания более линейна и стадийность не так ярко выражена.

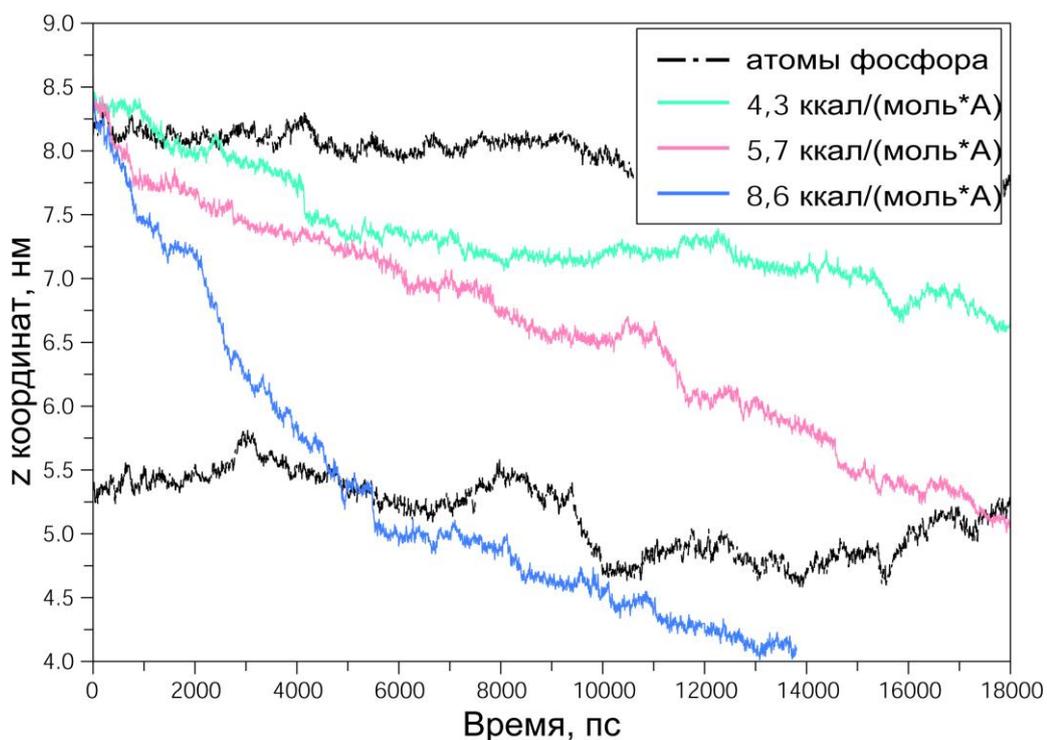


Рис. 39 Изменение z-координаты N-конца зервамицина под действием внешнего ускорения

На первой стадии Zrv-ПВ погружается в липидный бислои до Gln3, который, образуя водородные связи с липидными головками, удерживает пептид на поверхности. При этом пептид ориентируется перпендикулярно поверхности мембраны, так как сила дополнительно разворачивает пептид вдоль действия поля. В случае с ПОФХ мембраны из липидов такой сильный разворот не наблюдался, так как отрицательно заряженный С-конец не отталкивался от поверхности мембраны. Дальнейшее продвижение пептида вызывает деформацию мембраны и изгиб спирали пептида за счет сильного взаимодействия положительного N-конца с отрицательно заряженной поверхностью мембраны. Липидные головки, находящиеся рядом с пептидом, двигаются вместе с ним в гидрофобную область мембраны. Через 7 нс Нур10 образует водородные связи с липидными головками и частично разворачивает пептид к поверхности бислоя. В течение следующих 2-х нс разрываются водородные связи между Gln3 и липидными головками, и структура бислоя нормализуется. Пептид встраивается до Нур10, который вместе с Gln11 взаимодействует с липидными головками. Последующие 5 нс продвижение N-конца в гидрофобную область мембраны вызывается

распрямлением спирали пептида. Все это время Нур10 и Gln11 находятся в области липидных головок. На последней стадии Нур10 и Gln11 разрывают водородные связи с полярными головками и пептид полностью встраивается в липидный бислой.

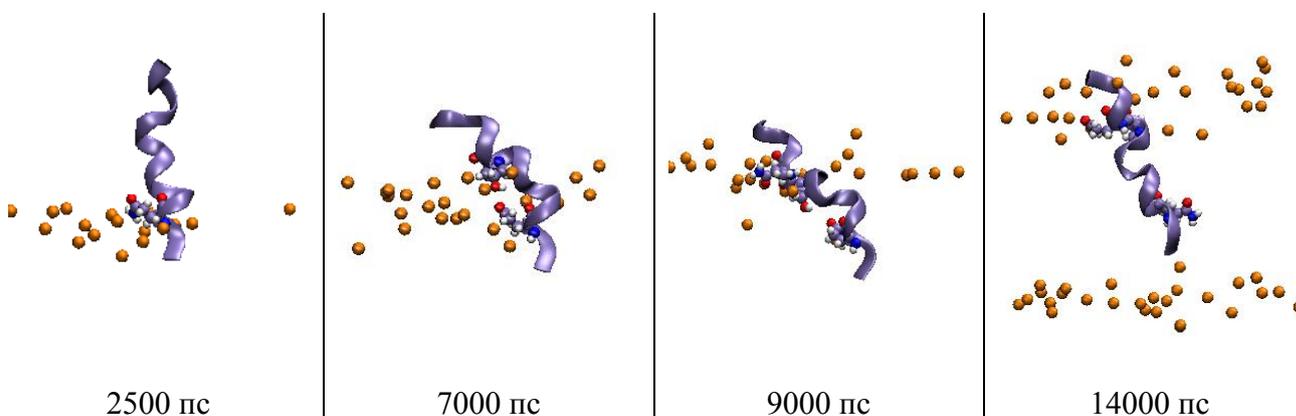


Рис. 40 Положение Zrv-IIВ относительно атомов фосфора липидов ПОФГ и ПОФЭ в различные моменты траектории. Ван-дер-ваальсовыми сферами отмечены атомы фосфора и остатки Gln3 (2500 пс) и Нур10, Gln11 (7000 пс, 9000 пс и 14000пс)

Процесс встраивания ZrvIIВ в мембрану ПОФЭ/ПОФГ, также как и в случае с мембраной РОРС, имеет три стадии: встраивание N-конца до Gln3, встраивание остатков до Нур10 и встраивание С-конца. При встраивании пептид преодолевает 3 энергетических барьера: прохождение Ace0 в гидрофобную область, разрыв водородных связей между Gln3 и липидными головками и разрыв водородных связей между Нур10, Gln11 и липидными головками. На Рис. 40 показаны конформации молекулы ZrvIIВ в разные моменты времени. Видно, что основным различием в процессе встраивания в мембрану ПОФЭ/ПОФГ является то, что липидные головки начинают взаимодействовать с Нур10 и Gln11, до того, как Gln3 входит в гидрофобную область, что вызывает не только изгиб спирали пептида, но и деформацию липидного бислоя.

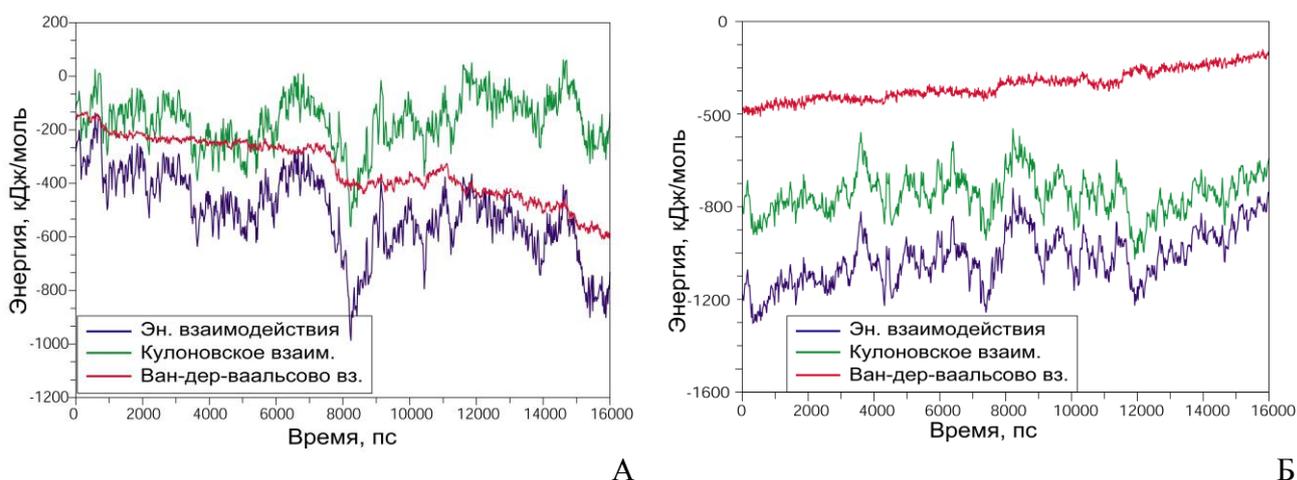


Рис. 41 Кулоновская, Ван-дер-Ваальсова энергии взаимодействия и их сумма (энергия взаимодействия) для молекулы зервамицина ПВ с липидами (А) и водой (Б)

На Рис. 41 видно, что энергия взаимодействия пептида с липидами при встраивании уменьшилась на 600 кДж/моль, а энергия взаимодействия с молекулами воды увеличилась на 400 кДж/моль. Следовательно, в процессе встраивания потенциальная энергия взаимодействия пептида с окружением уменьшается на ~200 кДж/моль. Потенциальная энергия трансмембранного состояния в случае с мембраной ПОФЭ/ПОФГ меньше, чем для пептида, связанного с поверхностью бислоя. Однако, при одинаковой внешней силе времени на встраивание пептида в ПОФЭ/ПОФГ мембрану требуется больше, чем в случае с мембраной ПОФХ, что свидетельствует о том, что пептиду необходимо преодолеть более высокий энергетический барьер. При сравнении Рис. 37А и Рис. 41А видно, что во втором случае минимумы кулоновской энергии более выражены, что свидетельствует о более сильном взаимодействии полярных остатков с липидными головками. На суммарной энергии взаимодействия также видны энергетические барьеры соответствующие образованию водородных связей остатков Gln3, Nyr10, Gln11 с липидными головками.

При взаимодействии молекулы ZrvPВ с модельной мембраной прокариот пептид ориентируется под углом к поверхности мембраны и направлен N-концом к ней, данное положение стабилизируется водородными

между остатками Ace0, Gln3 и фосфатными и аминными группами липидов. В случае с модельной мембраной эукариот, ZrvIIВ не входит глубоко в липидный бислой, а располагается параллельно поверхности. При этом Gln3 и Gln11 образуют водородные связи с полярными головками липидов. Димеризация молекул зервамицина на поверхности мембраны способствуют более глубокому проникновению пептидов в полярную область бислоя.

Процесс встраивания ZrvIIВ под действием внешней силы, приложенной к N-концу, имеет стадийный характер. Сам процесс встраивания происходит в три стадии: встраивание N-конца до Gln3, далее разрыв водородных связей между Gln3 и полярными головками и встраивание остатков до Hup10 и на заключительной стадии – разрыв водородных связей между липидными головками и Hup10, Gln11 и встраивание С-конца.

Как было показано выше, сам процесс встраивания быстрее протекает для модельной мембраны прокариот, однако в случае с модельной мембраной эукариот взаимодействие пептида с поверхностью липидного бислоя сильнее. Таким образом, можно сделать вывод, что селективность действия зервамицина IIВ осуществляется не на стадии встраивания в мембрану, а на стадии адсорбции пептида на поверхность мембраны. Вероятно, что на сам процесс встраивания в большей мере влияет насыщенность и длина гидрофобных хвостов липидов, а не их заряд. Потенциальная энергия взаимодействия ZrvIIВ с окружением при встраивании в мембрану ПОФХ не изменяется, а при встраивании в мембрану ПОФЭ/ПОФГ уменьшается на ~200 кДж/моль, однако пептиду надо преодолеть более высокий энергетический барьер.

Глава 5. Динамика моделей зервамицинового канала.

Молекулы зервамицина, двигаясь в плоскости мембраны, олигомеризуются и образуют трансмембранные ионные каналы. Структура канала на данный момент неизвестна. Неизвестно также точное количество

молекул зервамицина IIВ, формирующих каналы с разными уровнями проводимости. Предположительно, минимальный уровень проводимости соответствует каналу из 4 субъединиц, а максимальный - 16. В данной главе проведено моделирование и сравнительное изучение трех моделей зервамицинового канала в мембране ПОФЭ/ПОФГ. Модели каналов собирались согласно BS-модели действия антимицробных пептидов и состояли из четырех (N4), пяти (N5) и шести (N6) молекул пептида.

Особое внимание было уделено конформационной стабильности и относительному движению молекул зервамицина в связке, динамике молекул воды в полости канала и аминокислотным остаткам, образующим внутренний интерьер поры. Для пентамера была отдельно изучена динамика прохождения иона Na^+ через пору канала под действием внешней силы.

5.1 Исследуемые системы и МД-протокол

Начальные структуры каналов собирались так, чтобы пептиды были расположены параллельно друг другу и остаток Gln11, предположительно участвующий в проведении ионов [125], был обращен в пору канала. Начальная структура липидного бислоя ПОФЭ/ПОФГ была собрана и отрелаксирована также как описано в главе 4. Далее структуры каналов были помещены в липидный бислой. В Таблица 2 приведены составы всех исследуемых систем. Полученные системы подвергались многоступенчатой релаксации. На первом этапе проводилась равновесная МД в течение 2нс при температуре 10К для атомов молекул зервамицина и 300К для остальных атомов системы, так чтобы молекулы липидов могли организовать вокруг пептидных молекул. На втором этапе (2 нс) температура всей системы составляла 300К. На заключительном этапе на систему накладывалось внешнее электрическое поле. После процесса релаксации рассчитывалась рабочая траектория в течение не менее 10нс с целью, чтобы молекулы ZrvIIВ

в канале имели возможность переориентироваться относительно друг друга и липидного окружения.

Таблица 2

Система	Кол-во пептидов	Кол-во липидов	Кол-во молекул воды	Кол-во противоионов
Тетрамер (N4)	4	122 POPE 31 POPG	10193	31 Na+
Пентамер (N5)	5	122 POPE 31 POPG	10425	31 Na+
Гексамер (N6)	6	114 POPE 31 POPG	10513	31 Na+

При расчете траекторий использовался следующий МД-протоколом:

- Программный пакет Gromacs 3.2.1
- Потенциальное поле OPLS-AA
- Длина рабочей траектории 10 нс
- Температура термостата 300К
- Термостат: стохастическая динамика
- Постоянная термостатирования $\tau = 0,2$ пс
- Баростат – Берендсена
- Постоянная баростатирования – 10 пс
- Давление баростата вдоль нормали мембраны: 1 бар
- Давление баростата перпендикулярно нормали мембраны: -50 бар
- Радиус обрезания для электростатических взаимодействий $R_{el}=20\text{\AA}$
- Радиус обрезания для взаимодействия Ван-дер-Ваальса $R_{vdw}=20\text{\AA}$
- Внешнее электрическое поле – 0,01 В/нм
- Для численного интегрирования использовался алгоритм Leap-frog.
- Начальные скорости определялись с помощью генератора случайных чисел по распределению Максвелла.
- Шаг интегрирования 1 фс.
- Шаг записи в траекторный файл 1 пс.

5.2 Конформационная стабильность каналов.

Конформационная стабильность молекул ZrvIIВ в каналах была оценена с помощью среднеквадратичного отклонения (RMSD) относительно начального положения C α -атомов пептидов в течение первых 2 нс динамики (Рис. 42).

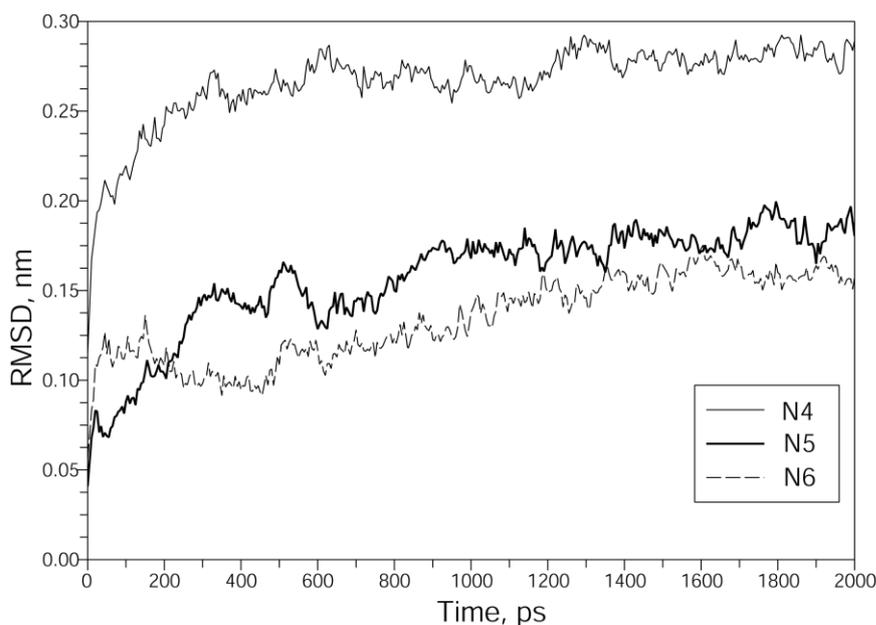


Рис. 42 Среднеквадратичное отклонение от начальной положения для C α -атомов молекул ZrvIIВ.

За 2 нс RMSD для тетрамера выросло до 0,27 нм, в то время как RMSD для N5 и N6 каналов составило 0,17 нм и 0,16 нм соответственно.

В начальной конформации каналов молекулы ZrvIIВ были параллельны оси канала, после 10 нс в N5 канале пептиды повернулись под небольшим углом к оси канала и сформировали суперспираль (Рис. 43А, Б). Рост RMSD для пентамера в первые 500 пс до значения 0,14 нм связан с поворотом пептидов относительно оси канала. Дальнейший более медленный рост обусловлен поворотом пептидов вокруг своей оси. В N6 канале молекулы ZrvIIВ остались параллельно оси канала (Рис. 43В, Г) что приводит к разной динамике изменения RMSD для N5 и N6 каналов. В этом случае присутствует только фаза медленного роста RMSD соответствующая повороту пептидов вокруг своей оси. Вероятно, что формирование

суперспирали стабилизирует канал и увеличивает время жизни. Предположительно, не только пентамер способен формировать суперспираль, но и каналы, состоящие из большего количества субъединиц. Но на такой процесс требуется больше времени, так как в согласованном повороте участвует большее количество молекул.

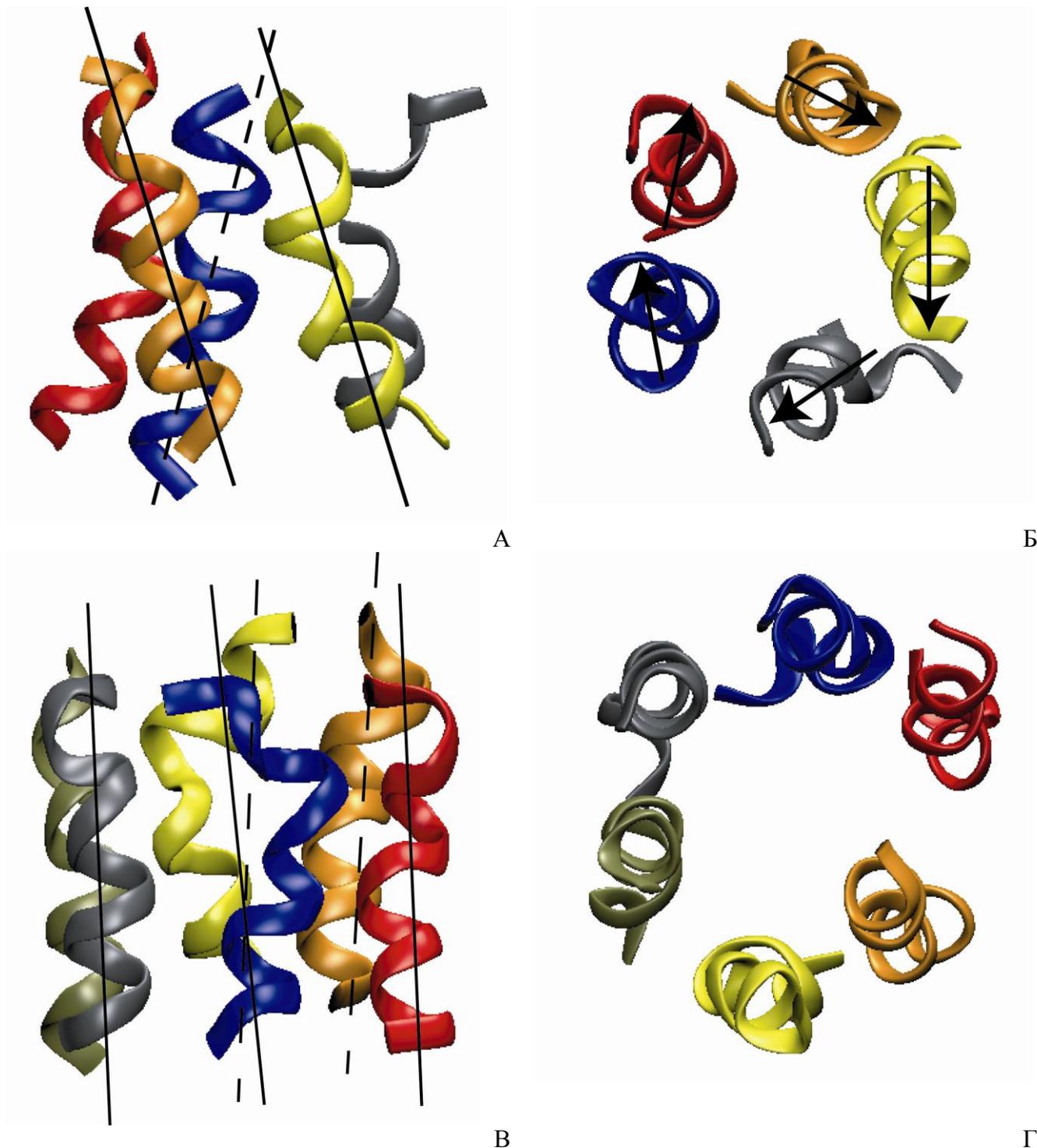


Рис. 43 Положение молекул зервамицина II в канале N5 (А - вид сбоку, Б - вид сверху) и в канале N6 (В - вид сбоку, Г - вид сверху). Прямыми и стрелками указаны направления молекул пептидов от N-конца к С-концу.

Большее по сравнению с N5 и N6 каналами значение RMSD для тетрамера обусловлено отсутствием непрерывного ряда молекул воды в полости канала (Рис. 44А).

Водородные связи, образованные молекулами воды в поре и гидрофильными аминокислотными остатками, стабилизируют положение пептидов в связке относительно друг друга. При отсутствии непрерывного ряда молекул воды, между пептидами могут образовываться полости, которые будучи изолированными от водного окружения вызывают дополнительную подвижность аминокислотных остатков. По этой причине, как видно из Рис. 44А, одна из субъединиц тетрамера утратила спиральную структуру на С-конце. В случае каналов N5 и N6 непрерывная колонна молекул воды хорошо выражена (Рис. 44Б, В). В узких областях N5 канала количество молекул воды недостаточно для формирования гидратной «шубы» проводимых ионов. На данных участках, вероятнее всего роль молекул воды гидратной оболочки выполняют атомы кислорода полярных остатков. В полости канала N6 молекул воды достаточно, чтобы проводимые ионы могли двигаться сквозь него, не нарушая целостность гидратной оболочки. Так как молекулы воды существенно влияют на движение ионов через пору канала, N4 не может формировать ионный канал и, вероятно, наименьший уровень проводимости зервамицинового канала соответствует пентамеру. При этом структура тетрамера достаточно стабильна и может являться «предшественником» проводящей формы каналов.

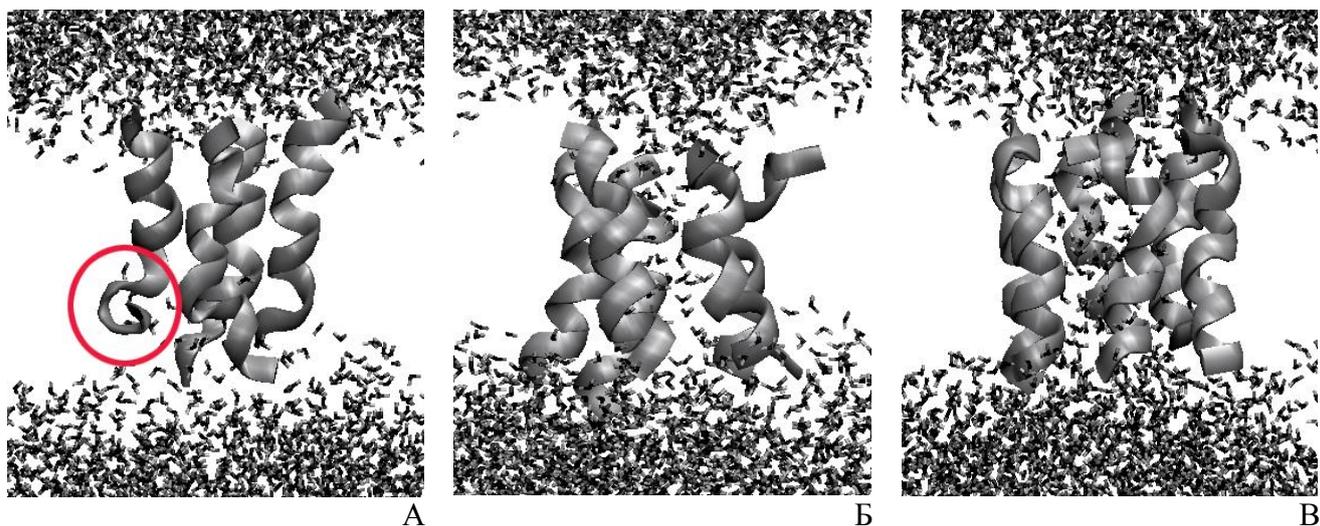


Рис. 44 Положение молекул воды в поре каналов N4 (А), N5 (Б) и N6 (В). Красным выделена область молекулы зервамицина, утратившая начальную спиральную структуру.

5.3 Внутренний интерьер каналов

Профили радиусов для исследуемых каналов были определены с помощью программы HOLE [167, 168], которая использует алгоритм Монте-Карло для нахождения максимального радиуса пробной сферы, способной пройти через пору канала. На Рис. 45 представлены профили радиусов для каналов N4, N5 и N6 после 10 нс динамики.

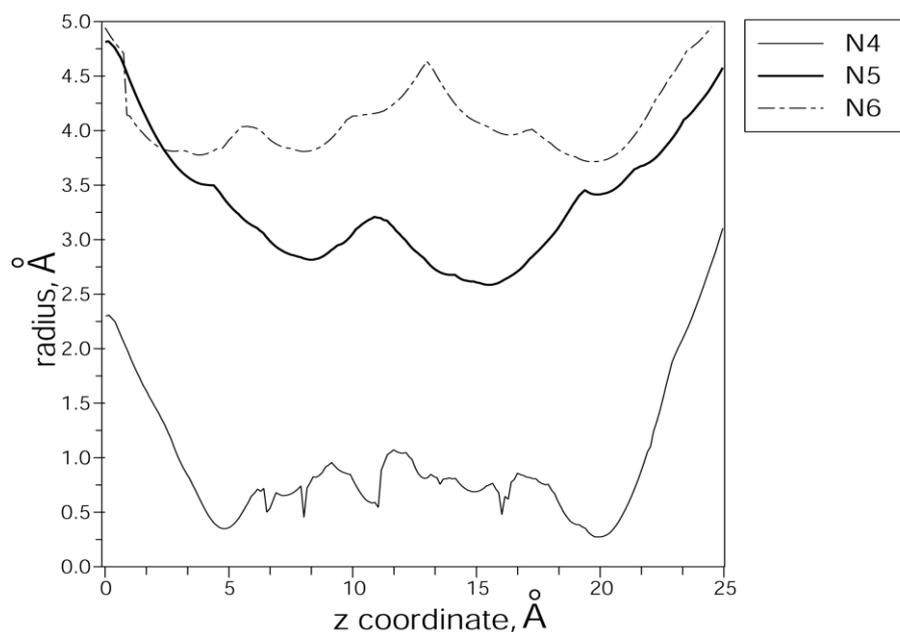
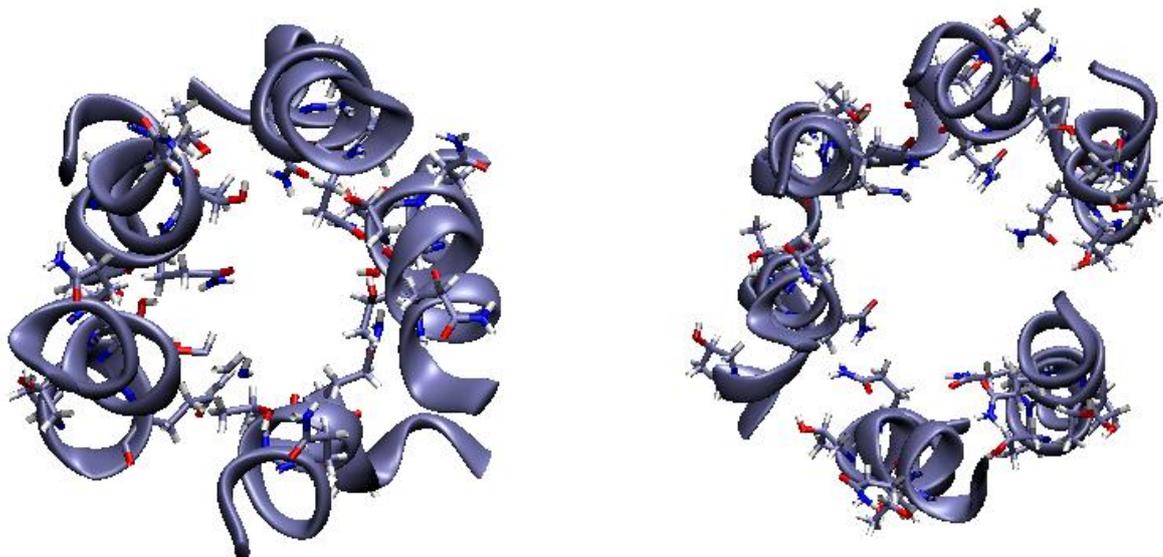


Рис. 45 Профили радиусов для каналов N4, N5 и N6 после релаксации.

N4 канал имеет радиус поры $\sim 0,2\text{\AA}$, что слишком мало для прохождения иона. Это так же подтверждает факт, что тетрамер не может формировать проводящий ионный канал. N5 и N6 каналы после 10 нс релаксации имеют по две области с минимальным радиусом (2.7 \AA и 2.5 \AA у N5; 3.8 \AA и 3.7 \AA у N6) обе эти области сформированы глутаминовыми кольцами (Gln3 и Gln11). Гомологичные остатки в аламетицине (Gln7, Gln18 и Glu18), направленные вдоль радиуса в пору канала, предположительно формируют кольца водородных связей и играют ключевую роль в поддержании стабильности структуры канала и в проведении ионов [169]. В канале N5 боковые радикалы аминокислотных остатков Gln11 направлены в полость канала и образуют самую узкую область – 2.5 \AA . Боковые радикалы Gln3 направлены под углом к радиусу поры, в сторону соседнего пептида и формируют локальное сужение – 2,7 \AA .

В случае N6 канала первый локальный минимум на профиле радиуса поры состоит из двух областей, первая образуется гидрофобными остатками Div4, а вторая полярными остатками Gln3. Благодаря тому, что в N5 канале пептиды повернуты относительно друг друга, так, чтобы образовывать суперспираль, неполярные остатки Div4 обращены в сторону соседнего пептида и не взаимодействуют с молекулами воды в поре. Самую узкую область канала, как и в случае канала N5, формируют боковые радикалы остатков Gln11. Минимальный радиус поры канала N6 составляет 3.7 \AA . Такого размера поры достаточно для проведения иона вместе с гидратной оболочкой.



А

Б

Рис. 46 Положение полярных аминокислотных остатков в каналах N5 (А) и N6 (Б). Выделены полярные аминокислотные остатки: Gln, Nup, Thr.

Согласно теоретическим представлениям о структуре зеррамициновых каналов, молекулы пептидов должны быть обращены полярной (выпуклой) стороной в полость канала, а гидрофобной (вогнутой) в область гидрофобных хвостов. На Рис. 46 показано положение полярных остатков в каналах N5 и N6 после 10 нс динамики. В молекуле зеррамицина есть три типа полярных остатков: Gln, Nup и Thr. В пентамере все полярные аминокислотные остатки обращены в полость канала или к соседним пептидам. К липидным хвостам направлены только боковые радикалы гидрофобных аминокислотных остатков. Положение двух остатков Gln было описаны выше. Остаток Thr повернут в сторону соседнего пептида так, что ОН группа взаимодействует с молекулами воды в канале, а СН₃ с боковыми радикалами аминокислотных остатков другого пептида. Nup10 как и Gln11 направлен в пору канала. Ближе всего из полярных остатков к липидным хвостам расположен остаток Nup13.

В канале N6 нет такого четкого как в N5 разделения аминокислотных остатков: полярные остатки направлены в пору, а неполярные к липидным хвостам. Nup13 и Thr6 взаимодействуют с гидрофобными липидными

хвостами. Из полярных остатков только Gln11 направлен непосредственно в пору канала и взаимодействует с молекулами воды внутри поры.

5.4 Прохождение ионов через пору канала N5

Так как тетрамер не формирует проводящий канал, а радиус поры N6 канала достаточно большой и внутренний «интерьер» канала не так сильно влияет на движение иона, был выбран канал N5 для исследования прохождения иона. Исследования проводились с помощью метода управляемой молекулярной динамики. К иону Na^+ прикладывалась внешняя сила равная $4.38 \text{ ккал}/(\text{моль} \cdot \text{Å})$. Ион под ее действием двигался от С-конца к N-концу пептидов.

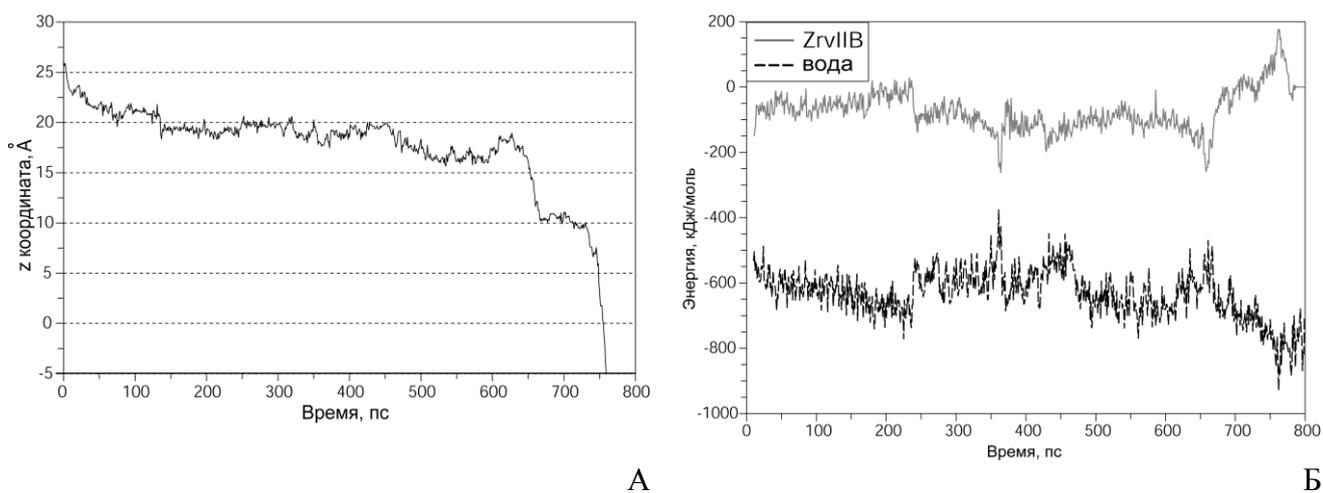


Рис. 47 А. Изменение z координаты (вдоль оси канала) иона Na^+ от времени. **Б.** Зависимость энергии взаимодействия иона Na^+ с молекулами зервамицина и воды от z -координаты.

На Рис. 47А представлена динамика изменения z координаты (вдоль оси канала). Как видно, динамика движения не линейна, есть области, где скорость движения иона падает до нуля. Первая область соответствует самому узкому месту канала – кольцу Gln11, в этой области ион теряет часть молекул воды своей гидратной оболочки, и их место занимают атомы кислорода бокового радикала остатка Gln. Изменение энергии взаимодействия иона Na^+ с молекулами зервамицина ПВ и молекулами воды

показано на Рис. 47Б. Энергия взаимодействия иона с окружением рассчитывалась как сумма Ван-дер-ваальсовых и кулоновских взаимодействий иона со всеми атомами окружения. Через 250 пс энергия взаимодействия с молекулами воды выросла на ~ 100 кДж/моль, что свидетельствует о потере молекул воды в гидратной оболочке. Далее на 450 пс траектории ион преодолевает кольцо Gln11 и переходит в более широкую область канала, где восстанавливает гидратную оболочку, о чем свидетельствует уменьшение энергии взаимодействия иона с водой. На 660 пс траектории ион попадает в зону второго глутаминового кольца, где также происходит частичная потеря гидратной оболочки, и в этой области снова наблюдается увеличение энергии взаимодействия с молекулами воды. Изменения энергии взаимодействия иона с молекулами ZrvПВ противоположны изменениям энергии взаимодействия с водой, что свидетельствует о том, что атомы ZrvПВ замещают утерянные молекулы воды гидратной оболочки. Каждая реорганизация гидратной «шубы» является потенциальным барьером для движения иона через пору канала. Поэтому в этих областях наблюдается замедление движения.

Таким образом, согласно полученным данным четыре молекулы зервамицина ПВ не формируют устойчивый проводящий канал, но служат «предшественником» для формирования каналов из большего числа субъединиц. Пентамер и гексамер формируют ионные каналы с минимальным радиусом пор 2.5 \AA и 3.7 \AA соответственно. Поры обоих каналов заполнены молекулами воды, однако в пентамере их количество не достаточно для проведения ионов без нарушения целостности гидратной оболочки. В случае гексамера одновалентные ионы могут проходить через пору канала без потери молекул воды в гидратной оболочке. Молекулы зервамицина ПВ в пентамере поворачиваются относительно оси канала и формируют суперспираль, которая предположительно дополнительно стабилизирует канал. В гексамере все молекулы пептидов остаются параллельно оси канала.

Вероятно, что в природе каналы из большего числа субъединиц также образуют суперспираль, однако на это требуется значительно большее время. При формировании суперспирали в пентамере все боковые радикалы полярных аминокислотных остатков направлены в полость канала или в сторону соседнего пептида, а неполярные остатки в область липидных хвостов. В случае гексамера такого четкого разделения полярных и неполярных аминокислотных остатков не наблюдается, вероятно, для этого необходим поворот пептидов относительно оси канала с формированием суперспирали.

При прохождении иона через пору канала, образованного пятью субъединицами, происходит реорганизация гидратной оболочки в областях глутаминовых колец. В этих зонах движение иона значительно заменяется. Атомы кислорода боковых радикалов остатков Gln замещают потерянные молекулы воды гидратной оболочки.

Заключение

На примере зервамицина II можно продемонстрировать особенности действия ряда антимикробных пептидов, которые встраиваясь в мембрану вызывают, в конечном счете, гибель клеток. При этом у данного класса пептидов присутствует определенная селективность по отношению к липидному составу мембраны, что делает бактерии наиболее чувствительными к воздействию.

Молекула зервамицина II в отличие от аламетицина сохраняет спиральную структуру в воде (в течение не менее 10нс). В нативном зервамицине и зервамицине с заменой Aib-Gly в 7-ом и 9-ом положениях не наблюдается высокоамплитудных шарнирных движений изгибающих спираль. Однако ZrvII-gly9 в метаноле компактизуется за счет изгиба в области Gly9 за счет реорганизации водородных связей. В воде подобных структурных изменений не наблюдается. Добавление Gly в 8-е положение вызывает появление значительных флуктуаций длины пептида в метаноле. В

воде амплитуда колебаний значительно меньше. Таким образом, в мутантах ZrvII-gly9 ZrvII-gly8 наблюдаются структурные изменения при уменьшении полярности растворителя. Это может критически повлиять на активность зервамицина II, так как длина молекулы ZrvII составляет около 24Å. При наличии шарнирных движений длина молекулы может уменьшаться до 16Å, как в случае с ZrvII-gly9, что недостаточно для образования мембранного канала.

Длинные пептаиболы, в отличие от зервамицина II, обладают шарнирными движениями, которые в значительной степени способны изменять длину молекулы. Это изменение длины не уменьшает активность длинных пептаиболов, а, предположительно, способствует агрегации молекул и формированию канала.

Таким образом, замены в области изгиба спирали Aib7-Leu8-Aib9-Hyp10 способны не только изменить структуру и динамику молекулы зервамицина II и сделать его чувствительным к растворителю, а также могут в значительной степени сказаться на мембранной активности пептида.

При взаимодействии молекулы ZrvIIВ с модельной мембраной прокариот пептид ориентируется под углом к поверхности мембраны и направлен N-концом к ней. Данное положение стабилизируется водородными между остатками Ace0, Gln3 и фосфатными и аминными группами липидов. В случае с модельной мембраной эукариот, ZrvIIВ не входит глубоко в липидный бислой, а располагается параллельно поверхности. При этом Gln3 и Gln11 образуют водородные связи с полярными головками липидов. Димеризация молекул зервамицина на поверхности мембраны способствуют более глубокому проникновению пептидов в полярную область бислоя.

Процесс встраивания ZrvIIВ под действием внешней силы, приложенной к N-концу, имеет стадийный характер. Сам процесс встраивания происходит в три стадии: встраивание N-конца до Gln3, далее разрыв водородных связей между Gln3 и полярными головками и

встраивание остатков до Nup10, а на заключительной стадии – разрыв водородных связей между липидными головками и Nup10, Gln11 и встраивание С-конца.

Как было показано выше, сам процесс встраивания быстрее протекает для модельной мембраны прокариот, однако в случае с модельной мембраной эукариот взаимодействие пептида с поверхностью липидного бислоя сильнее. Таким образом, можно сделать вывод, что селективность действия зервамицина ПВ происходит не на стадии встраивания в мембрану, а на стадии адсорбции пептида на поверхность мембраны. Вероятно, что на сам процесс встраивания в большей мере влияет насыщенность и длина гидрофобных хвостов липидов, а не заряд. Энергия взаимодействия ZrvПВ с окружением при встраивании в мембрану ПОФЭ не изменяется, а при встраивании в мембрану ПОФЭ/ПОФГ уменьшается на ~200 кДж/моль. Однако в этом случае пептиду надо преодолеть более высокий энергетический барьер.

Таким образом, согласно полученным данным четыре молекулы зервамицина ПВ не формируют устойчивый проводящий канал, но служат «предшественником» для формирования каналов из большего числа субъединиц. Пентамер и гексамер формируют ионные каналы с минимальным радиусом пор 2.5 Å и 3.7 Å соответственно. Поры обоих каналов заполнены молекулами воды, однако в пентамере их количество не достаточно для проведения ионов без нарушения целостности гидратной оболочки. В случае гексамера одновалентные ионы могут проходить через пору канала без потери молекул воды в гидратной оболочке. Молекулы зервамицина ПВ в пентамере поворачиваются относительно оси канала и формируют суперспираль, которая предположительно дополнительно стабилизирует канал. В гексамере все молекулы пептидов остаются параллельно оси канала. Вероятно, что в природе каналы из большего числа субъединиц также образуют суперспираль, однако на это требуется значительно больше времени. При формировании суперспирали в пентамере все боковые

радикалы полярных аминокислотных остатков направлены в полость канала или в сторону соседнего пептида, а неполярные остатки в область липидных хвостов. В случае гексамера такого четкого разделения полярных и неполярных аминокислотных остатков не наблюдается. Вероятно, для этого необходим поворот пептидов относительно оси канала с формированием суперспирали.

При прохождении иона через пору канала, образованного пятью субъединицами, происходит реорганизация гидратной оболочки в областях глутаминовых колец. В этих зонах движение иона значительно заменяется. Атомы кислорода боковых радикалов остатков Gln замещают потерянные молекулы воды гидратной оболочки.

Список литературы

1. Chastre J. Evolving problems with resistant pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14 Suppl 3, 2008, 3–14.
2. Baron S. *Medical Microbiology*. The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, ed. 4, 1996,–616.
3. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. Издательство МГУ им.М.В.Ломоносова, Москва, 2004,–528.
4. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 2003, 710–720.
5. L.Whitmore, B.A.Wallace. The Peptaibol Database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. *Nucleic Acids Research*, 32, 2004, 593–594.
6. L.Whitmore, J.K.Chugh, C.F.Snook, B.A.Wallace. The peptaibol database: a sequence and structure resource. *Journal Peptide Science*, 9, 2003, 663–665.
7. Jen W.C., Jones G.A., Brewer D., Parkinson V.O., Taylor A. The antibacterial activity of alamethicins and zervamicins. *J. Appl. Bacteriol.*, 63, 1987, 293–298.
8. Summers M.Y., Kong F., Feng X., Siegel M.M., Janso J.E., Graziani E.I., Carter G.T. Septocylindrins A and B: peptaibols produced by the terrestrial fungus *Septocylindrium* sp. LL-Z1518. *J. Nat. Prod.*, 70, 2007, 391–396.

9. Oh S.U., Yun B.S., Lee S.J., Kim J.H., Yoo I.D. Atroviridins A-C and neoatroviridins A-D, novel peptaibol antibiotics produced by *Trichoderma atroviride* F80317. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 55, 2002, 557–564.
10. Lee S.J., Yeo W.H., Yun B.S., Yoo I.D. Isolation and sequence analysis of new peptaibol, boletusin, from *Boletus* spp. *J. Pept. Sci.*, 5, 1999, 374–378.
11. Fassi F.L., Wroblewski H., Blanchard A. Activities of antimicrobial peptides and synergy with enrofloxacin against *Mycoplasma pulmonis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 2007, 468–474.
12. Beven L., Duval D., Rebuffat S., Riddell F.G., Bodo B., Wroblewski H. Membrane permeabilisation and antimycoplasmic activity of the 18-residue peptaibols, trichorzins PA. *Biochim. Biophys. Acta*, 1372, 1998, 78–90.
13. el H.M., Rebuffat S., Le D.T., Klein G., Satre M., Bodo B. Interaction of trichorzianines A and B with model membranes and with the amoeba *Dictyostelium*. *Biochim. Biophys. Acta*, 978, 1989, 97–104.
14. Schirmbock M., Lorito M., Wang Y.L., Hayes C.K., risan-Atac I., Scala F., Harman G.E., Kubicek C.P. 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.
15. Grigoriev P.A., Schlegel B., Kronen M., Berg A., Hartl A., Grafe U. Differences in membrane pore formation by peptaibols. *J. Pept. Sci.*, 9, 2003, 763–768.
16. Schiell M., Hofmann J., Kurz M., Schmidt F.R., Vertesy L., Vogel M., Wink J., Seibert G. Cephaibols, new peptaibol antibiotics with anthelmintic properties from *Acremonium tubakii* DSM 12774. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 54, 2001, 220–233.
17. Degenkolb T., von D.H., Nielsen K.F., Samuels G.J., Bruckner H. Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Chem. Biodivers.*, 5, 2008, 671–680.
18. Reithner B., Schuhmacher R., Stoppacher N., Pucher M., Brunner K., Zeilinger S. Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk 1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal. Genet. Biol.*, 44, 2007, 1123–1133.
19. Montesinos E. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiol. Lett.*, 270, 2007, 1–11.

20. Schirmbock M., Lorito M., Wang Y.L., Hayes C.K., risan-Atac I., Scala F., Harman G.E., Kubicek C.P. 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.
21. Lorito M., Farkas V., Rebuffat S., Bodo B., Kubicek C.P. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol.*, 178, 1996, 6382–6385.
22. Matha V., Jegorov A., Kiess M., Bruckner H. Morphological alterations accompanying the effect of peptaibiotics, alpha-aminoisobutyric acid-rich secondary metabolites of filamentous fungi, on *Culex pipiens* larvae. *Tissue Cell*, 24, 1992, 559–564.
23. Broekemeier K.M., Iben J.R., LeVan E.G., Crouser E.D., Pfeiffer D.R. Pore formation and uncoupling initiate a Ca²⁺-independent degradation of mitochondrial phospholipids. *Biochemistry*, 41, 2002, 7771–7780.
24. Panov A.V., Andreeva L., Greenamyre J.T. Quantitative evaluation of the effects of mitochondrial permeability transition pore modifiers on accumulation of calcium phosphate: comparison of rat liver and brain mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 424, 2004, 44–52.
25. Das M.K., Basu A., Balaram P. Effects of membrane channel-forming polypeptides on mitochondrial oxidative phosphorylation. A comparison of alamethicin, gramicidin A, melittin and tetraacetyl melittin. *Biochem. Int.*, 11, 1985, 357–363.
26. Mathew M.K., Nagaraj R., Balaram P. Alamethicin and synthetic peptide fragments as uncouplers of mitochondrial oxidative phosphorylation. Effect of chain length and charge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 98, 1981, 548–555.
27. Takaishi Y., Terada H., Fujita T. The effect of two new peptide antibiotics, the hypelcins, on mitochondrial function. *Experientia*, 36, 1980, 550–552.
28. Matic S., Geisler D.A., Moller I.M., Widell S., Rasmusson A.G. Alamethicin permeabilizes the plasma membrane and mitochondria but not the tonoplast in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow) suspension cells. *Biochem. J.*, 389, 2005, 695–704.
29. Johansson F.I., Michalecka A.M., Moller I.M., Rasmusson A.G. Oxidation and reduction of pyridine nucleotides in alamethicin-permeabilized plant mitochondria. *Biochem. J.*, 380, 2004, 193–202.

30. Kotlyar A.B., Maklashina E., Cecchini G. Absence of NADH channeling in coupled reaction of mitochondrial malate dehydrogenase and complex I in alamethicin-permeabilized rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 318, 2004, 987–991.
31. Gostimskaya I.S., Grivennikova V.G., Zharova T.V., Bakeeva L.E., Vinogradov A.D. In situ assay of the intramitochondrial enzymes: use of alamethicin for permeabilization of mitochondria. *Anal. Biochem.*, 313, 2003, 46–52.
32. Wada S., Iida A., Asami K., Tachikawa E., Fujita T. Role of the Gln/Glu residues of trichocellins A-II/B-II in ion-channel formation in lipid membranes and catecholamine secretion from chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1325, 1997, 209–214.
33. Bonnafous J.C., Dornand J., Mani J.C. Alamethicin or detergent permeabilization of the cell membrane as a tool for adenylate cyclase determination. *Biochim. Biophys. Acta*, 720, 1982, 235–241.
34. Katayama T., Miyagawa K., Kodama T., Oikawa S. Trichorzin HA V, a member of the peptaibol family, stimulates intracellular cAMP formation in cells expressing the calcitonin receptor. *Biol. Pharm. Bull.*, 24, 2001, 1420–1422.
35. He H., Janso J.E., Yang H.Y., Bernan V.S., Lin S.L., Yu K. Culicinin D, an antitumor peptaibol produced by the fungus *Culicinomyces clavisporus*, strain LL-12I252. *J. Nat. Prod.*, 69, 2006, 736–741.
36. Ruiz N., Wielgosz-Collin G., Poirier L., Grovel O., Petit K.E., Mohamed-Benkada M., du Pont T.R., Bissett J., Verite P., Barnathan G., Pouchus Y.F. New Trichobrachins, 11-residue peptaibols from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*. *Peptides*, 28, 2007, 1351–1358.
37. Ovchinnikova T.V., Levitskaya N.G., Voskresenskaya O.G., Yakimenko Z.A., Tagaev A.A., Ovchinnikova A.Y., Murashev A.N., Kamenskii A.A. Neuroleptic properties of the ion-channel-forming peptaibol zervamicin: locomotor activity and behavioral effects. *Chem. Biodivers.*, 4, 2007, 1374–1387.
38. Krugel H., Becker A., Polten A., Grecksch G., Singh R., Berg A., Seidenbecher C., Saluz H.P. Transcriptional response to the neuroleptic-like compound Ampullosporin A in the rat ketamine model. *J. Neurochem.*, 97 Suppl 1, 2006, 74–81.
39. Nguyen H.H., Imhof D., Kronen M., Schlegel B., Hartl A., Grafe U., Gera L., Reissmann S. Synthesis and biological evaluation of analogues of the peptaibol ampullosporin A. *J. Med. Chem.*, 45, 2002, 2781–2787.

40. Ritzau M., Heinze S., Dornberger K., Berg A., Fleck W., Schlegel B., Hartl A., Grafe U. Ampullosporin, a new peptaibol-type antibiotic from *Sepedonium ampullosporum* HKI-0053 with neuroleptic activity in mice. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 50, 1997, 722–728.
41. Геннис Р.Б. Биомембраны. Молекулярная структура и функции. "МИР", Москва, 1997, 1–624.
42. Latorre R., Donovan J.J. Modulation of alamethicin-induced conductance by membrane composition. *Acta Physiol Scand. Suppl.*, 481, 1980, 37–45.
43. Stankowski S., Schwarz U.D., Schwarz G. Voltage-dependent pore activity of the peptide alamethicin correlated with incorporation in the membrane: salt and cholesterol effects. *Biochim. Biophys. Acta*, 941, 1988, 11–18.
44. Chutrakul C., Peberdy J.F. Isolation and characterisation of a partial peptide synthetase gene from *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 252, 2005, 257–265.
45. Reiber K., Neuhof T., Ozegowski J.H., von D.H., Schwecke T. A nonribosomal peptide synthetase involved in the biosynthesis of ampullosporins in *Sepedonium ampullosporum*. *J. Pept. Sci.*, 9, 2003, 701–713.
46. Wiest A., Grzegorski D., Xu B.W., Goulard C., Rebuffat S., Ebbole D.J., Bodo B., Kenerley C. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J. Biol. Chem.*, 277, 2002, 20862–20868.
47. Wei X., Yang F., Straney D.C. Multiple non-ribosomal peptide synthetase genes determine peptaibol synthesis in *Trichoderma virens*. *Can. J. Microbiol.*, 51, 2005, 423–429.
48. Kirschbaum J., Krause C., Winzheimer R.K., Bruckner H. Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled. *J. Pept. Sci.*, 9, 2003, 799–809.
49. Krause C., Kirschbaum J., Jung G., Bruckner H. Sequence diversity of the peptaibol antibiotic suzukacillin-A from the mold *Trichoderma viride*. *J. Pept. Sci.*, 12, 2006, 321–327.
50. Leclerc G., Rebuffat S., Bodo B. Directed biosynthesis of peptaibol antibiotics in two *Trichoderma* strains. II. Structure elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 51, 1998, 178–183.
51. Leclerc G., Rebuffat S., Goulard C., Bodo B. Directed biosynthesis of peptaibol antibiotics in two *Trichoderma* strains. I. Fermentation and isolation. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 51, 1998, 170–177.

52. Kumita J.R., Weston C.J., Choo-Smith L.P., Woolley G.A., Smart O.S. Prevention of peptide fibril formation in an aqueous environment by mutation of a single residue to Aib. *Biochemistry*, 42, 2003, 4492–4498.
53. Whitmore L., Wallace B.A. Analysis of peptaibol sequence composition: implications for in vivo synthesis and channel formation. *Eur. Biophys. J.*, 33, 2004, 233–237.
54. Jacob J., Duclouhier H., Cafiso D.S. The role of proline and glycine in determining the backbone flexibility of a channel-forming peptide. *Biophys. J.*, 76, 1999, 1367–1376.
55. Nagaoka Y., Iida A., Tachikawa E., Fujita T. Fungal metabolites. XX. Effect of proline residue on the structure of ion-channel-forming peptide, trichosporin B-VIa. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 43, 1995, 1119–1124.
56. Daniel J.F., Filho E.R. Peptaibols of trichoderma. *Nat. Prod. Rep.*, 24, 2007, 1128–1141.
57. Locardi E., Mammi S., Peggion E., Monaco V., Formaggio F., Crisma M., Toniolo C., Bodo B., Rebuffat S., Kamphuis J., Broxterman Q.B. Conformation and membrane activity of an analogue of the peptaibol antibiotic trichogin GA IV with a lipophilic amino acid at the N-terminus. *J. Pept. Sci.*, 4, 1998, 389–399.
58. Monaco V., Formaggio F., Crisma M., Toniolo C., Shui X., Eggleston D.S. Crystallographic structure of a multiple beta-turn containing, glycine-rich heptapeptide: a synthetic precursor of the lipopeptaibol antibiotic trichodecenin I. *Biopolymers*, 39, 1996, 31–42.
59. Locardi E., Mammi S., Peggion E., Monaco V., Formaggio F., Crisma M., Toniolo C., Bodo B., Rebuffat S., Kamphuis J., Broxterman Q.B. Conformation and membrane activity of an analogue of the peptaibol antibiotic trichogin GA IV with a lipophilic amino acid at the N-terminus. *J. Pept. Sci.*, 4, 1998, 389–399.
60. Toniolo C., Peggion C., Crisma M., Formaggio F., Shui X., Eggleston D.S. Structure determination of racemic trichogin A IV using centrosymmetric crystals. *Nat. Struct. Biol.*, 1, 1994, 908–914.
61. Toniolo C., Crisma M., Formaggio F., Peggion C., Epanand R.F., Epanand R.M. Lipopeptaibols, a novel family of membrane active, antimicrobial peptides. *Cell Mol. Life Sci.*, 58, 2001, 1179–1188.
62. Marshall G.R., Hodgkin E.E., Langs D.A., Smith G.D., Zabrocki J., Leplawy M.T. Factors governing helical preference of peptides containing

- multiple alpha,alpha-dialkyl amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87, 1990, 487–491.
63. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. *Физика белка*. Книжный дом "Университет", Москва, 2008, 1–376.
 64. Bavoso A., Benedetti E., Di B.B., Pavone V., Pedone C., Toniolo C., Bonora G.M., Formaggio F., Crisman M. Long, chiral polypeptide 3(10)-helices at atomic resolution. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 5, 1988, 803–817.
 65. Kelsh L.P., Ellena J.F., Cafiso D.S. Determination of the molecular dynamics of alamethicin using ¹³C NMR: implications for the mechanism of gating of a voltage-dependent channel. *Biochemistry*, 31, 1992, 5136–5144.
 66. Yee A.A., O'Neil J.D. Uniform ¹⁵N labeling of a fungal peptide: the structure and dynamics of an alamethicin by ¹⁵N and ¹H NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 31, 1992, 3135–3143.
 67. Franklin J.C., Ellena J.F., Jayasinghe S., Kelsh L.P., Cafiso D.S. Structure of micelle-associated alamethicin from ¹H NMR. Evidence for conformational heterogeneity in a voltage-gated peptide. *Biochemistry*, 33, 1994, 4036–4045.
 68. Sessions R.B., Gibbs N., Dempsey C.E. Hydrogen bonding in helical polypeptides from molecular dynamics simulations and amide hydrogen exchange analysis: alamethicin and melittin in methanol. *Biophys. J.*, 74, 1998, 138–152.
 69. Gibbs N., Sessions R.B., Williams P.B., Dempsey C.E. Helix bending in alamethicin: molecular dynamics simulations and amide hydrogen exchange in methanol. *Biophys. J.*, 72, 1997, 2490–2495.
 70. Boheim G. Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes. *J. Membr. Biol.*, 19, 1974, 277–303.
 71. Boheim G., Janko K., Leibfritz D., Ooka T., Konig W.A., Jung G. Structural and membrane modifying properties of suzukacillin, a peptide antibiotic related to alamethicin. Part B. Pore formation in black lipid films. *Biochim. Biophys. Acta*, 433, 1976, 182–199.
 72. Jung G., Konig W.A., Leibfritz D., Ooka T., Janko K., Boheim G. Structural and membrane modifying properties of suzukacillin, a peptide antibiotic related to alamethicin. Part A. Sequence and conformation. *Biochim. Biophys. Acta*, 433, 1976, 164–181.
 73. Oren Z., Shai Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 47, 1998, 451–463.

74. Ludtke S.J., He K., Heller W.T., Harroun T.A., Yang L., Huang H.W. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*, 35, 1996, 13723–13728.
75. Kobayashi S., Chikushi A., Tougu S., Imura Y., Nishida M., Yano Y., Matsuzaki K. Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2. *Biochemistry*, 43, 2004, 15610–15616.
76. Laver D.R. The barrel-stave model as applied to alamethicin and its analogs reevaluated. *Biophys. J.*, 66, 1994, 355–359.
77. Breed J., Sansom M.S. Alamethicin channels modelled by simulated annealing and molecular dynamics. *Biochem. Soc. Trans.*, 22, 1994, 157S.
78. Sansom M.S. Alamethicin and related peptaibols--model ion channels. *Eur. Biophys. J.*, 22, 1993, 105–124.
79. Matsuzaki K., Sugishita K., Ishibe N., Ueha M., Nakata S., Miyajima K., Epanand R.M. Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry*, 37, 1998, 11856–11863.
80. Ludtke S., He K., Huang H. Membrane thinning caused by magainin 2. *Biochemistry*, 34, 1995, 16764–16769.
81. Ludtke S.J., He K., Wu Y., Huang H.W. Cooperative membrane insertion of magainin correlated with its cytolytic activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1190, 1994, 181–184.
82. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 66, 2002, 236–248.
83. Duclohier H., Molle G., Spach G. Antimicrobial peptide magainin I from *Xenopus* skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers. *Biophys. J.*, 56, 1989, 1017–1021.
84. Molle G., Duclohier H., Spach G. Voltage-dependent and multi-state ionic channels induced by trichorzianines, anti-fungal peptides related to alamethicin. *FEBS Lett.*, 224, 1987, 208–212.
85. Katsu T., Imamura T., Komagoe K., Masuda K., Mizushima T. Simultaneous measurements of K⁺ and calcein release from liposomes and the determination of pore size formed in a membrane. *Anal. Sci.*, 23, 2007, 517–522.
86. Katsu T. Application of calcein-loaded liposomes for the determination of membrane channel size. *Biol. Pharm. Bull.*, 22, 1999, 978–980.

87. He K., Ludtke S.J., Huang H.W., Worcester D.L. Antimicrobial peptide pores in membranes detected by neutron in-plane scattering. *Biochemistry*, 34, 1995, 15614–15618.
88. He K., Ludtke S.J., Worcester D.L., Huang H.W. Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophys. J.*, 70, 1996, 2659–2666.
89. Cafiso D.S. Alamethicin: a peptide model for voltage gating and protein-membrane interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23, 1994, 141–165.
90. Vogel H. Comparison of the conformation and orientation of alamethicin and melittin in lipid membranes. *Biochemistry*, 26, 1987, 4562–4572.
91. Wu Y., He K., Ludtke S.J., Huang H.W. X-ray diffraction study of lipid bilayer membranes interacting with amphiphilic helical peptides: diphytanoyl phosphatidylcholine with alamethicin at low concentrations. *Biophys. J.*, 68, 1995, 2361–2369.
92. Tieleman D.P., Berendsen H.J., Sansom M.S. Surface binding of alamethicin stabilizes its helical structure: molecular dynamics simulations. *Biophys. J.*, 76, 1999, 3186–3191.
93. Tieleman D.P., Sansom M.S., Berendsen H.J. Alamethicin helices in a bilayer and in solution: molecular dynamics simulations. *Biophys. J.*, 76, 1999, 40–49.
94. Tieleman D.P., Berendsen H.J., Sansom M.S. Voltage-dependent insertion of alamethicin at phospholipid/water and octane/water interfaces. *Biophys. J.*, 80, 2001, 331–346.
95. Bechinger B., Skladnev D.A., Ogrel A., Li X., Rogozhkina E.V., Ovchinnikova T.V., O'Neil J.D., Raap J. ¹⁵N and ³¹P solid-state NMR investigations on the orientation of zervamicin II and alamethicin in phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry*, 40, 2001, 9428–9437.
96. Wilburn J.P., Wright D.W., Cliffler D.E. Imaging of voltage-gated alamethicin pores in a reconstituted bilayer lipid membrane via scanning electrochemical microscopy. *Analyst*, 131, 2006, 311–316.
97. Latorre R., Alvarez O. Voltage-dependent channels in planar lipid bilayer membranes. *Physiol Rev.*, 61, 1981, 77–150.
98. Mueller P., Rudin D.O. Action potentials induced in biomolecular lipid membranes. *Nature*, 217, 1968, 713–719.

99. Eisenberg M., Hall J.E., Mead C.A. The nature of the voltage-dependent conductance induced by alamethicin in black lipid membranes. *J. Membr. Biol.*, 14, 1973, 143–176.
100. Gordon L.G., Haydon D.A. Potential-dependent conductances in lipid membranes containing alamethicin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, 270, 1975, 433–447.
101. Boheim G. Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes. *J. Membr. Biol.*, 19, 1974, 277–303.
102. Vodyanoy I., Hall J.E., Balasubramanian T.M. Alamethicin-induced current-voltage curve asymmetry in lipid bilayers. *Biophys. J.*, 42, 1983, 71–82.
103. Mottamal M., Lazaridis T. Voltage-dependent energetics of alamethicin monomers in the membrane. *Biophys. Chem.*, 122, 2006, 50–57.
104. Tieleman D.P., Berendsen H.J., Sansom M.S. Voltage-dependent insertion of alamethicin at phospholipid/water and octane/water interfaces. *Biophys. J.*, 80, 2001, 331–346.
105. Rink T., Bartel H., Jung G., Bannwarth W., Boheim G. Effects of polycations on ion channels formed by neutral and negatively charged alamethicins. *Eur. Biophys. J.*, 23, 1994, 155–165.
106. Boheim G., Hanke W., Eibl H. Lipid phase transition in planar bilayer membrane and its effect on carrier- and pore-mediated ion transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77, 1980, 3403–3407.
107. Taylor R.J., de L.R. "Reversed" alamethicin conductance in lipid bilayers. *Biophys. J.*, 59, 1991, 873–879.
108. Sakmann B., Boheim G. Alamethicin-induced single channel conductance fluctuations in biological membranes. *Nature*, 282, 1979, 336–339.
109. Bezrukov S.M., Vodyanoy I. Probing alamethicin channels with water-soluble polymers. Effect on conductance of channel states. *Biophys. J.*, 64, 1993, 16–25.
110. Hall J.E., Vodyanoy I., Balasubramanian T.M., Marshall G.R. Alamethicin. A rich model for channel behavior. *Biophys. J.*, 45, 1984, 233–247.
111. Beven L., Helluin O., Molle G., Duclouhier H., Wroblewski H. Correlation between anti-bacterial activity and pore sizes of two classes of voltage-dependent channel-forming peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1421, 1999, 53–63.

112. Duclohier H., Alder G.M., Bashford C.L., Bruckner H., Chugh J.K., Wallace B.A. Conductance studies on trichotoxin_A50E and implications for channel structure. *Biophys. J.*, 87, 2004, 1705–1710.
113. Balaram P., Krishna K., Sukumar M., Mellor I.R., Sansom M.S. The properties of ion channels formed by zervamicins. *Eur. Biophys. J.*, 21, 1992, 117–128.
114. Sansom M.S. The biophysics of peptide models of ion channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 55, 1991, 139–235.
115. Hanke W., Boheim G. The lowest conductance state of the alamethicin pore. *Biochim. Biophys. Acta*, 596, 1980, 456–462.
116. Menestrina G., Voges K.P., Jung G., Boheim G. Voltage-dependent channel formation by rods of helical polypeptides. *J. Membr. Biol.*, 93, 1986, 111–132.
117. Gordon L.G., Haydon D.A. Kinetics and stability of alamethicin conducting channels in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 436, 1976, 541–556.
118. Asami K., Okazaki T., Nagai Y., Nagaoka Y. Modifications of alamethicin ion channels by substitution of Glu-7 for Gln-7. *Biophys. J.*, 83, 2002, 219–228.
119. Starostin A.V., Butan R., Borisenko V., James D.A., Wenschuh H., Sansom M.S., Woolley G.A. An anion-selective analogue of the channel-forming peptide alamethicin. *Biochemistry*, 38, 1999, 6144–6150.
120. D.P.Tieleman, B.Hess, M.S.P.Sansom. Analysis and evaluation of channel models: simulations of alamethicin. *Biophysical Journal*, 83, 2002, 2393–2407.
121. Argoudelis A.D., Dietz A., Johnson L.E. Zervamicins I and II, polypeptide antibiotics produced by *emericellopsis salmosynnemata*. *J. Antibiot.* (Tokyo), 27, 1974, 321–328.
122. Ovchinnikova T.V., Murashev A.N. The peptaibol antibiotic zervamicin displays neurotropic activity. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 414, 2007, 146–148.
123. Karle I.L., Flippen-Anderson J.L., Agarwalla S., Balaram P. 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.
124. Karle I.L., Flippen-Anderson J.L., Agarwalla S., Balaram P. 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.

125. Agarwalla S., Mellor I.R., Sansom M.S., Karle I.L., Flippen-Anderson J.L., Uma K., Krishna K., Sukumar M., Balaram P. Zervamicins, a structurally characterised peptide model for membrane ion channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186, 1992, 8–15.
126. Z.O.Shenkarev, T.A.Balashova, R.G.Efremov, Z.A.Yakimenko, T.V.Ovchinnikova, J.Raap, A.S.Arseniev. Spatial structure of zervamicin IIB bound to DPC micelles: implications for voltage-gating. *Biophysical Journal*, 82, 2002, 762–771.
127. T.A.Balashova, Z.O.Shenkarev, A.A.Tagayev, T.V.Ovchinnikova, J.Raap, A.S.Arseniev. NMR structure of the channel-former zervamicin IIB in isotropic solvents. *FEBS Letters*, 466, 2000, 333–336.
128. Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Balashova T.A., Yakimenko Z.A., Baru M.B., Mustaeva L.G., Raap J., Ovchinnikova T.V., Arseniev A.S. High stability of the hinge region in the membrane-active peptide helix of zervamicin: paramagnetic relaxation enhancement studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325, 2004, 1099–1105.
129. Golovanov A.P., Barsukov I.L., Arseniev A.S., Bystrov V.F., Sukhanov S.V., Barsukov L.I. The divalent cation-binding sites of gramicidin A transmembrane ion-channel. *Biopolymers*, 31, 1991, 425–434.
130. Doyle D.A., Morais C.J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280, 1998, 69–77.
131. Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels. *Nature*, 417, 2002, 523–526.
132. Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, 417, 2002, 515–522.
133. Kropacheva T.N., Raap J. Voltage-dependent interaction of the peptaibol antibiotic zervamicin II with phospholipid vesicles. *FEBS Lett.*, 460, 1999, 500–504.
134. Korzhnev D.M., Bocharov E.V., Zhuravlyova A.V., Orekhov V.Y., Ovchinnikova T.V., Billeter M., Arseniev A.S. Backbone dynamics of the channel-forming antibiotic zervamicin IIB studied by ¹⁵N NMR relaxation. *FEBS Lett.*, 495, 2001, 52–55.

135. Lu D., Aksimentiev A., Shih A.Y., Cruz-Chu E., Freddolino P.L., Arkhipov A., Schulten K. The role of molecular modeling in bionanotechnology. *Phys. Biol.*, 3, 2006, S40–S53.
136. Martini J., Hellmich W., Greif D., Becker A., Merkle T., Ros R., Ros A., Toensing K., Anselmetti D. Systems nanobiology: from quantitative single molecule biophysics to microfluidic-based single cell analysis. *Subcell. Biochem.*, 43, 2007, 301–321.
137. Scholes G.D., Rumbles G. Excitons in nanoscale systems. *Nat. Mater.*, 5, 2006, 683–696.
138. Alder B.J., Wainwright T.E. Phase Transition for a Hard Sphere System. *J. Chem. Phys.*, 27, 1957, 1208–1209.
139. Rahman A. **Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon.** *Phys. Rev.*, 136, 1964, 405–411.
140. McCammon J.A., Celin B.R., Karplus G.M. **Dynamics of folded proteins.** *Nature*, 267, 1977, 585–590.
141. Karplus M., McCammon J.A. Protein structural fluctuations during a period of 100 ps. *Nature*, 277, 1979, 578.
142. Rossky P.J., Karplus M. Solvation. A molecular dynamics study of a dipeptide in water. *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 1979, 1913–1937.
143. Gelin B.R., Karplus M. Side-chain torsional potentials: effect of dipeptide, protein, and solvent environment. *Biochemistry*, 18, 1979, 1256–1268.
144. McCammon J.A., Karplus M. Dynamics of activated processes in globular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76, 1979, 3585–3589.
145. Case D.A., Karplus M. Dynamics of ligand binding to heme proteins. *J. Mol. Biol.*, 132, 1979, 343–368.
146. Lesyng B., McCammon J.A. Molecular modeling methods. Basic techniques and challenging problems. *Pharmacol. Ther.*, 60, 1993, 149–167.
147. Jorgensen W.L., Maxwell D.S., Tirado-Rivers J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 1996, 11225–11236.
148. Miyamoto S., Komagoe K. Settle: An analytical version of the shake and rattle algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.*, 13, 1992, 952–962.

149. Hess B., Bekker H., Berendsen H.J., Fraaije J.G.E.M. Lincs: A linear constraint solver for molecular simulation. *J. Comput. Chem.*, 18, 1997, 1463–1472.
150. Симонетта М., Гавезотти А., Кучицу К. Молекулярные структуры. Прецизионные методы исследования. Мир, Москва, 1997,–671.
151. Seelig J., Macdonald P.M., Scherer P.G. Phospholipid head groups as sensors of electric charge in membranes. *Biochemistry*, 26, 1987, 7535–7541.
152. Pasenkiewicz-Gierula M., Takaoka Y., Miyagawa H., Kitamura K., Kusumi A. Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes: A molecular dynamics simulation study. *Biophys. J.*, 76, 1999, 1228–1240.
153. Tu K., Tobias D.J., Blasie J.K., Klein M.L. Molecular dynamics investigation of the structure of a fully hydrated gel-phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer. *Biophys. J.*, 70, 1996, 595–608.
154. Allen M.P., Tildesley D.J. Computer simulation of liquids. Oxford University Press, Oxford, New York, 1989,–408.
155. Darden T., York D., Pedersen L.G. Particle mesh ewald: An $n \log(n)$ method for ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, 98, 1993, 10089–10092.
156. Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T. A smooth particle mesh ewald method. *J. Chem. Phys.*, 103, 1995, 8577–8593.
157. Saito M. Molecular dynamics simulation of proteins in solution: Artifacts caused by the cut-off approximation. *J. Chem. Phys.*, 101, 1994, 4055–5061.
158. Saito M. Molecular dynamics simulations of proteins in water without the truncation of long-range Coulomb interaction. *Mol. Simul.*, 8, 1992, 321–333.
159. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. Comparison of simple potential function for simulation liquid water. *J. Chem. Phys.*, 79, 1983, 926–935.
160. Patra M., Karttunen M., Hyvonen M.T., Falck E., Lindqvist P., Vattulainen I. Molecular dynamics simulations of lipid bilayers: major artifacts due to truncating electrostatic interactions. *Biophys. J.*, 84, 2003, 3636–3645.
161. Verlet L. Computer "experiments" on classical fluids. i.thermodynamical properties of lennard-jones molecules. *Phys. Rev.*, 159, 1967, 98–103.

162. Голо В.Л., Шайтан К.В. Динамический аттрактор в термостате Берендсена и медленная динамика биомакромолекул. *Биофизика*, 47, 2002, 611–617.
163. Lemak A.S., Balabaev N.K. A comparison between collisional dynamics and Brownian dynamics. *Mol. Simul.*, 15, 1995, 223–231.
164. Lemak A.S., Balabaev N.K. Molecular dynamics simulation of a polymer chain in solution by collisional dynamics method. *J. Comput. Chem.*, 17, 1996, 1685–1695.
165. Okazaki T., Sakoh M., Nagaoka Y., Asami K. Ion channels of alamethicin dimer N-terminally linked by disulfide bond. *Biophys. J.*, 85, 2003, 267–273.
166. Sakoh M., Okazaki T., Nagaoka Y., Asami K. N-terminal insertion of alamethicin in channel formation studied using its covalent dimer N-terminally linked by disulfide bond. *Biochim. Biophys. Acta*, 1612, 2003, 117–121.
167. Smart O.S., Goodfellow J.M., Wallace B.A. The pore dimensions of gramicidin A. *Biophys. J.*, 65, 1993, 2455–2460.
168. Smart O.S., Neduvilil J.G., Wang X., Wallace B.A., Sansom M.S. HOLE: a program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J. Mol. Graph.*, 14, 1996, 354–60, 376.
169. Fox R.O., Jr., Richards F.M. A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-Å resolution. *Nature*, 300, 1982, 325–330.