



УДК 577.352.2

РАЗЛИЧНЫЕ ТИПЫ ИОННЫХ КАНАЛОВ, ИНДУЦИРОВАННЫЕ В ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ ПРОИЗВОДНЫМИ ГРАМИЦИДИНА А, НЕСУЩИМИ НА С-КОНЦЕ КАТИОННУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

© 2007 г. Т. Б. Стоилова^{**}, Е. А. Дуцева^{**}, А. А. Пашковская^{**}, С. В. Сычев^{*},
С. И. Ковальчук^{*}, А. А. Собко^{**}, Н. С. Егорова^{*}, Е. А. Котова^{**}, Ю. Н. Антоненко^{**},
А. Ю. Суровой^{*}, В. Т. Иванов^{*}

^{*}Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Макляя, 16/10;

^{**}Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 16.10.2006 г. Принята к печати 15.01.2007 г.

На плоской бислойной липидной мембране и липосомах изучена каналоформерная активность производных грамицидина А, несущих на С-конце положительно заряженную аминокислотную последовательность. Согласно результатам нашей предыдущей работы (FEBS Lett. 2005. V. 579. P. 5247–5252), данные пептиды в низких концентрациях формируют классические катионселективные поры, характерные для грамицидина А, тогда как при высоких концентрациях они образуют большие неселективные поры. Способность изученных пептидов к формированию неселективных пор, оцененная в настоящей работе по выходу органического красителя карбоксифлуоресцеина из липосом, существенно снижалась при уменьшении длины грамицидиновой последовательности в ряду катионных аналогов. Спектры КД показали, что большие поры могут формироваться пептидами как в $\beta^{6,3}$ -спиральной конформации, так и в конформации двойной $\beta^{5,6}$ -спирали при развернутой С-концевой катионной последовательности. Димеризация пептидов путем окисления концевого цистеина способствовала формированию неселективных пор. Показано, что неселективные поры не формируются в мембране эритроцитов, что может указывать на зависимость каналоформерной способности от вида мембраны. Полученные данные могут представлять интерес для направленного синтеза пептидов, обладающих антибактериальным действием.

Ключевые слова: грамицидин, катионные аналоги; ионные каналы; неселективные поры; транс-мембранные амфипатические пептиды.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы интенсивно изучается взаимодействие пептидов с липидными мембранами и, в частности, их способность образовывать поры в мембранах. Можно выделить пять типов структур пор, которые обсуждаются в литературе: жесткая β -спираль голова-к-голове, формируемая при димеризации грамицидина А [1]; внутримолекулярная пора, образующаяся при формировании стопок циклических пептидов [2]; межмолекулярная пора, формируемая аламетицином при выстраивании не-

скольких α -спиралей по окружности [3]; межмолекулярная высокопроводящая пора в виде β -бочонка, аналогичная по структуре поре, образуемой бактериальными поринами [4]; пептидно-липидная пора, в формировании стенок которой участвуют полярные головки фосфолипидных молекул [5–8].

Недавно мы показали, что производные грамицидина А, имеющие на С-конце положительно заряженную цепь аминокислот, образуют в бислойных липидных мембранах классические катионселективные поры при низких концентрациях пептида и большие неселективные поры при его высоких концентрациях [9]. В настоящей работе с целью выяснения механизма формирования больших неселективных пор была изучена каналоформерная активность нескольких серий пептидов в отношении плоских липидных бислоев, мембран липосом и эритроцитов.

Сокращения: β А, β Ala – β -аланин; CF – карбоксифлуоресцеин; DTT – дитиотреитол; DMPC – димиристоилфосфатидилхолин; DOPC – диолеоилфосфатидилхолин; DPhPC – дифитаноилфосфатидилхолин; DPhPG – дифитаноилфосфатидилглицерин; gA – грамицидин А; MES – 2-(N-морфолин)этансульфоновая кислота; PC – фосфатидилхолин.

[#]Автор для связи (тел.: (495) 335-58-44; эл. почта: stojlova@yahoo.com).

Таблица 1. Выходы и физико-химические характеристики синтезированных пептидов

Обозначение	Последовательность*	Удерживаемый объем, мл	Выход, %**	M (теор.)	M (изм.)
P1C	HCO-(gA)-NHCH ₂ CH ₂ O-Suc-PGRRRRSQS-OH	33.0	15.4	3077.5	3078.1
P10C	Ac-(gA)-βA-GSG-PKKKRKVC-NH ₂	33.6	20.2	3091.8	3092.0
PS2C	VGAIAvVvWI-GSG-PKKKRKVC-NH ₂	23.4	31.9	2193.8	2193.7
PS3C	VGAIAvVvWIW-GSG-PKKKRKVC-NH ₂	23.7	28.1	2379.9	2380.1
PS4C	VGAIAvVvWIWI-GSG-PKKKRKVC-NH ₂	28.8	19.2	2493.2	2493.5
PS5C	VGAIAvVvWIWIW-GSG-PKKKRKVC-NH ₂	29.1	25.8	2679.4	2679.0
PS6C	VGAIAvVvWIWIWI-GSG-PKKKRKVC-NH ₂	30.0	20.7	2792.5	2792.5

* В однобуквенном коде символы аминокислот D-ряда даны строчными буквами.

** Выходы рассчитаны исходя из нагрузки первой аминокислоты на смоле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения порообразующей способности пептидов наиболее часто используется методика измерения индуцированного пептидами выхода карбоксифлуоресцеина (CF) из липосом, нагруженных этим красителем. При его выходе наблюдается общее усиление флуоресценции образца вследствие уменьшения внутри липосом концентрации димеров CF, которые являются эффективными тушителями флуоресценции мономеров [10]. В предыдущей работе мы показали, что при добавлении к суспензии липосом пептида P1C, который является конъюгатом грамицидина А (VGAIAvVvWIWI-

WIW-этанолламин)* и пептида PGRRRRSQS, происходит быстрый выход красителя из липосом, тогда как сам грамицидин А или пептид PGRRRRSQS не вызывали такого эффекта [9].

В данной работе были исследованы подобные пептиды, содержащие последовательность грамицидина А или ее фрагменты, поликатионную последовательность (PKKKRKVC) и трипептидную спейсерную группу (GSG) между ними. Последняя была введена с целью пространственного разделения гидрофобной и гидрофильной последовательностей и увеличения подвижности поликатионного участка относительно жесткой грамицидиновой основы. С-Концевой этанолламин грамицидина нами был заменен на β-аланин с целью упрощения процедуры синтеза пептидов. Согласно нашим данным, такая замена не влияет на каналоформерные свойства грамицидина [9].

Для выяснения взаимосвязи между классической грамицидиновой активностью и образованием не-селективных пор мы синтезировали серию аналогов, в структуре которых были использованы укороченные с С-конца фрагменты последовательности gA и удалена формильная группа на N-конце (табл. 1). В силу невозможности образования водородных связей между N-концами мономеров из-за отсутствия формильной группы такие аналоги не должны образовывать в мембране катионселективные спиральные димеры. Действительно, с помощью измерений потенциала на мембране липосом по флуоресценции сафранина О (данные не приве-

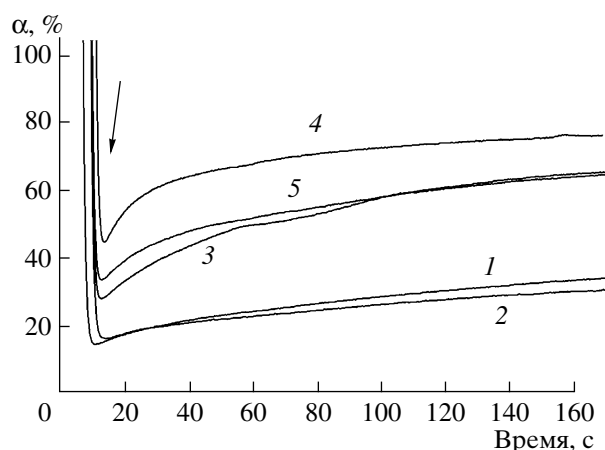


Рис. 1. Динамика выхода CF из липосом под действием пептидов PS2C (1), PS3C (2), PS4C (3), PS5C (4), PS6C (5) (α – доля красителя во внешнем объеме). Пептиды (0.2 мкг/мл) добавляли к суспензии липосом в момент времени, указанный стрелкой.

* D-Аминокислоты в однобуквенном коде изображены строчными буквами.

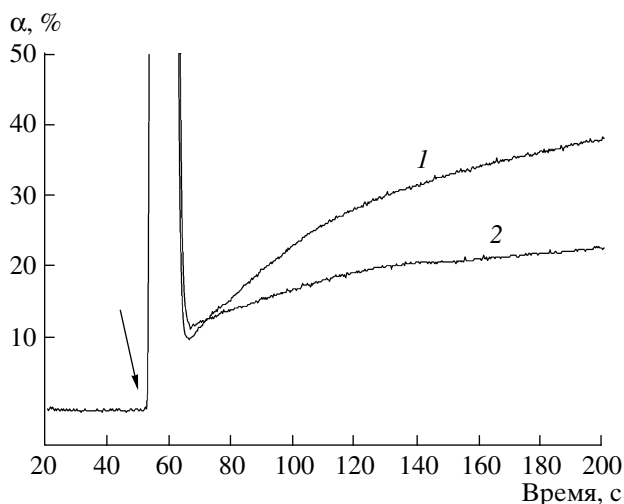


Рис. 2. Динамика выхода CF из липосом под действием пептида P10C (0.5 мкг/мл) в присутствии 10 мМ H_2O_2 (1) и 30 мкМ DTT (2). Пептид добавляли к суспензии липосом в момент времени, указанный стрелкой.

дены) было показано, что пептид PS6C, укороченный на последовательность (L)W-βA по отношению к пептиду P10C, т.е. содержащий три из четырех триптофановых остатков, не способен образовывать классические катионселективные каналы. Этот пептид, однако, был способен индуцировать выход CF из липосом, по-видимому, за счет образования неселективных пор (рис. 1). Изучение серии укороченных аналогов показало, что способность к формированию неселективных пор постепенно падает с уменьшением длины пептидов (рис. 1). Особенно большие различия наблюдаются при переходе от пептида PS4C к пептиду PS3C при укорочении всего лишь на один аминокислотный остаток (D-лейцин).

Постепенное уменьшение способности к формированию неселективных пор у укороченных аналогов может быть связано с тем, что длина структур, образуемых грамицидином А, примерно соответствует толщине мембраны, в то время как при укороченной грамицидиновой последовательности для образования неселективных пор может потребоваться большее искривление мембраны, чем в случае полной грамицидиновой последовательности,

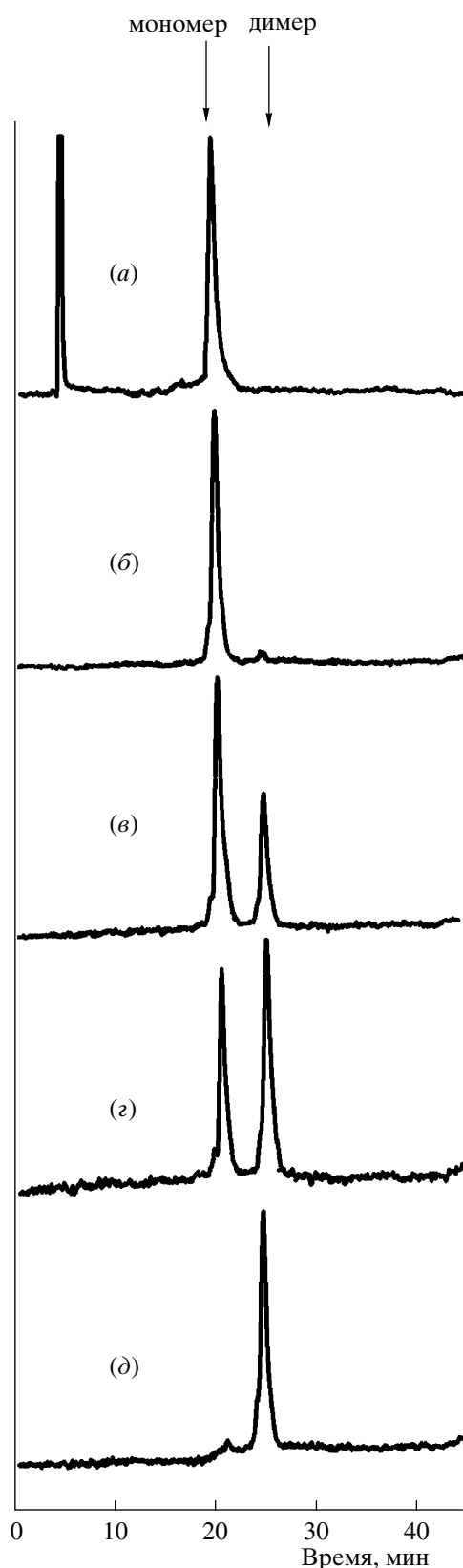


Рис. 3. Формирование димерных структур пептидом P10C. Приведены профили элюции на колонке Hi-Pore (BioRad) 250 × 4.6 мм в линейном градиенте этанол–0.1% TFA–вода от 40 до 75% за 35 мин раствора пептида P10C (0.2 мг/мл), инкубированного в фосфатном буфере при комнатной температуре в течение 2 мин (б), 1 ч (в), 6 ч (г) и 12 ч (д), после 12-часовой инкубации и добавления к образцу 10-кратного избытка DTT (а).

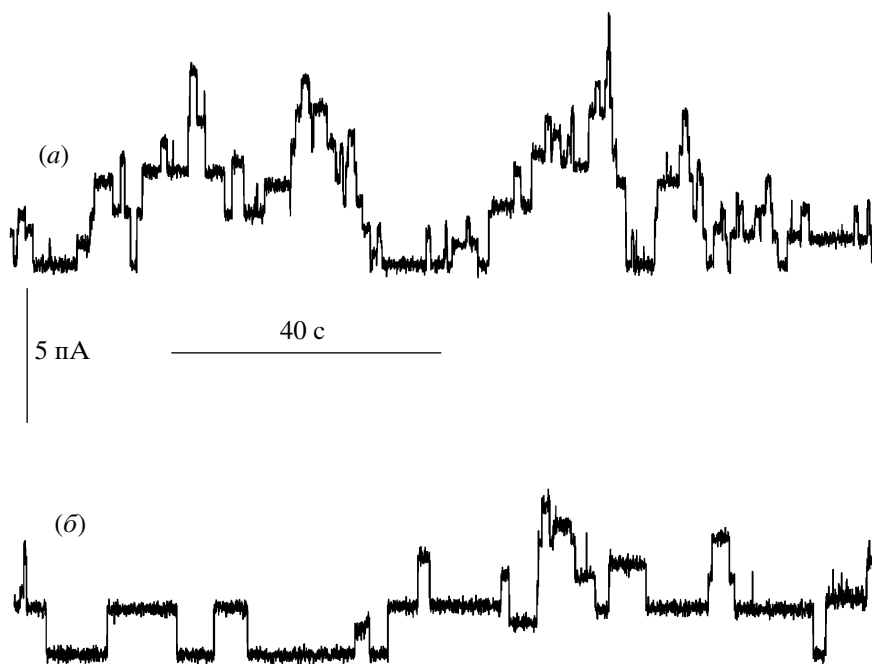


Рис. 4. Записи тока через плоскую бислоюную липидную мембрану в присутствии пептида P10C (0.1 нМ) в восстановительных условиях (30 мкМ DTT) (а) и окислительных условиях (10 мМ H_2O_2) (б) при потенциале на мембране 100 мВ. Состав среды: 1 М КСl, 10 мМ Трис, 10 мМ MES, pH 7. Мембрана сформирована из раствора DPhPC в декане.

что, соответственно, снижает вероятность их образования и приводит к повышению минимальной необходимой для этого концентрации аналога.

На рис. 2 приведены данные по выходу CF из липосом в случае пептида P10C, имеющего ацетилированный *N*-конец и полную грамицидиновую последовательность. Для этого пептида была обнаружена зависимость порообразующей активности от редокс-потенциала среды (т.е. от присутствия в ней восстановителя DTT (кривая 2) или окислителя H_2O_2 (кривая 1)). По всей вероятности, это связано с наличием *C*-концевого остатка цистеина, окисление которого приводит к образованию ковалентных димеров этого пептида и существенному повышению его способности индуцировать выход CF из липосом. Окисление может происходить как при добавлении в среду окислителя (например, H_2O_2 в наших экспериментах), так и под действием кислорода воздуха в случае инкубации пептида в водном буферном растворе. Процесс образования ковалентных димеров наблюдался с помощью оФВЭЖХ (рис. 3) через 2 мин, 1, 6 и 12 ч. Через 12 ч инкубации весь пептид в растворе переходил в димерную форму (рис. 3д), а последующее добавление DTT приводило к восстановлению дисульфидных связей и появлению мономеров (рис. 3а).

Ковалентная димеризация пептидов не только повышала их способность образовывать неселективные поры, но и изменяла свойства образуемых ими одиночных каналов. На рис. 4 приведены записи

тока через плоскую бислоюную липидную мембрану в присутствии пептида P10C. Запись (а) соответствует мономерной форме этого пептида в присутствии DTT, а запись (б) – его димерам, образующимся после добавления H_2O_2 . Для мономерной формы пептида средняя амплитуда канала составила 12 пС, а время жизни 1.0 с, для димера – 15 пС и 4.5 с соответственно. Таким образом, димеризация пептида приводила к существенному возрастанию времени жизни каналов. Как амплитуда каналов, так и время жизни были близки к этим параметрам, измеренным для немодифицированного грамицидина А в таких же условиях, а именно, 16 пС и 2 с соответственно [11].

Ввиду выявленных существенных различий в свойствах грамицидина А и его поликатионных аналогов было изучено влияние модификации липидного окружения на соотношение равновесных структур этих пептидов в мембране. Были измерены спектры КД для пептида P10C (рис. 5а) и грамицидина А (рис. 5б) в липосомах, приготовленных из DMPC, DOPC, DPhPC и соевого фосфатидилхолина S-100, после тепловой инкубации образцов (см. “Эксперимент. часть”). Как известно, начальная конформация грамицидина А при встраивании в липидную мембрану определяется предысторией его реконструкции [12–17], в то время как равновесная конформация пептида после тепловой инкубации зависит исключительно от липидного состава мембраны.

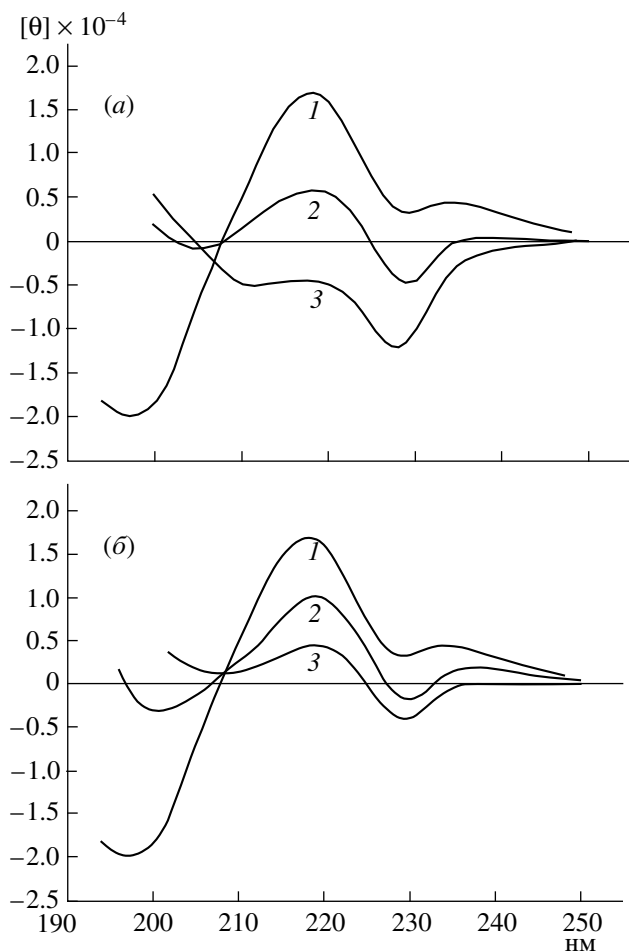


Рис. 5. Спектры КД пептида P10C (a) и грамицидина А (б) в липосомах, приготовленных из DMPC (1), DOPC (2) и соевого PC S-100 (3).

Компьютерный анализ полученных спектров с использованием реперных спектров КД показал, что набор структур идентичен для обоих изученных

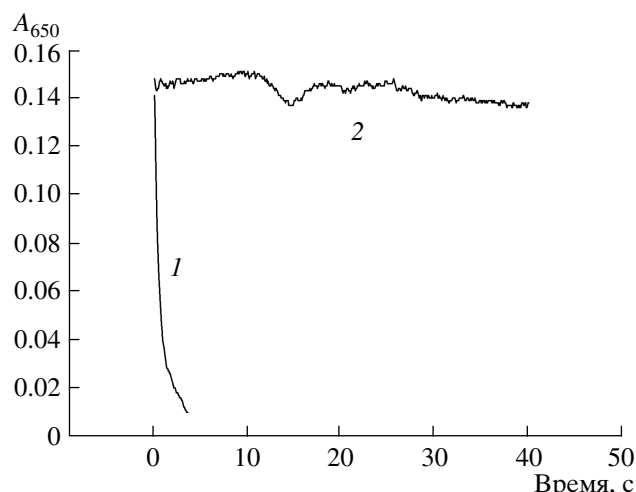


Рис. 6. Кинетика изменения оптической плотности суспензии эритроцитов под действием мелиттина (1) и пептида P10C (2). Концентрация пептидов 1 мкг/мл.

пептидов. Однако существенные различия между P10C и грамицидином А наблюдались в относительном содержании одиночных и двойных спиралей (табл. 2). При переходе от насыщенных липидов (DMPC и DPhPC) к ненасыщенным (DOPC и соевый фосфатидилхолин S-100) содержание двуспиральных структур повышается как для природного грамицидина А, так и для аналога P10C. Однако, если в соевом фосфатидилхолине S-100 (где содержание ненасыщенных жирнокислотных цепей с более чем двумя двойными связями составляет ~50%) доля двойных спиралей в случае грамицидина А составляет только 40%, то в случае P10C она равна 70%. Согласно данным компьютерного анализа, положительно заряженная последовательность на С-конце пептида P10C не дает вклада в общий спектр КД, что говорит о развернутой конформации этого фрагмента молекулы P10C.

Таблица 2. Доля равновесных конформаций пептида P10C и gA в мембранах, вычисленная по данным спектров КД*

Пептид	Липид	Левозакрученная параллельная β ^{5,6} -двойная спираль	Левозакрученная антипараллельная β ^{5,6} -двойная спираль	β ^{6,3} -спиральный димер
P10C	DMPC	0.05	0.05	0.9
P10C	DOPC	0.15	0.25	0.6
P10C	DPhPC	0.20	0.10	0.70
P10C	соевый PC S-100	0.30	0.40	0.30
gA	DMPC	0.05	0.10	0.85
gA	DOPC	0.10	0.15	0.75
gA	DPhPC	0.00	0.25	0.75
gA	соевый PC S-100	0.10	0.30	0.60

* Расчет произведен по методикам [16, 17].

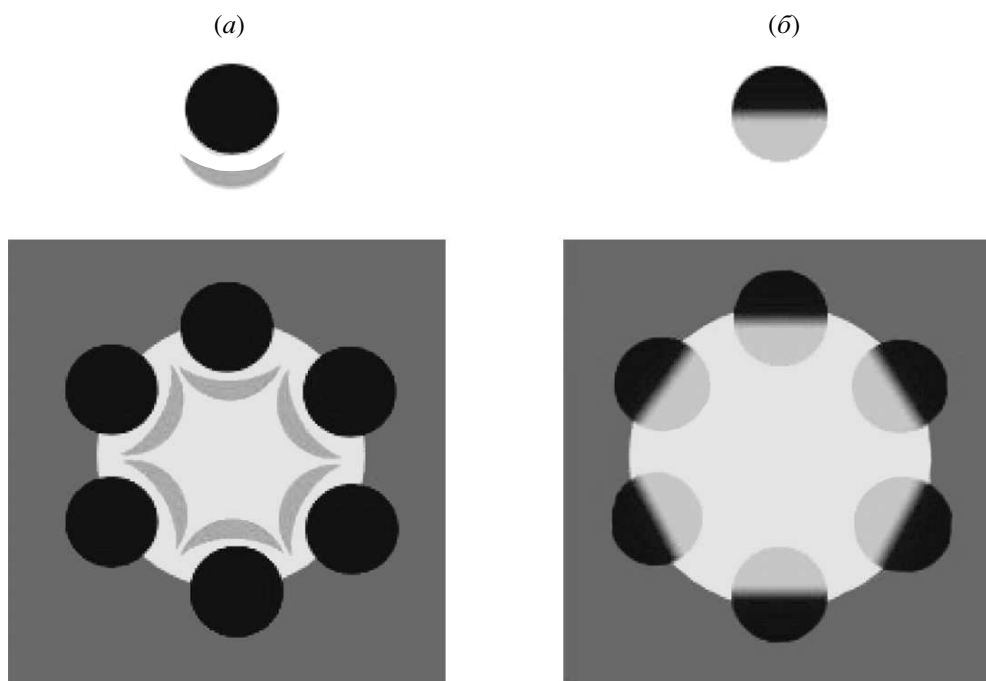


Рис. 7. Гипотетическая схема (вид сверху) строения неселективной поры, формируемой производными грамицидина А (а): в молекуле пептида серым цветом показана поликатионная последовательность, расположенная вдоль гидрофобной двойной спирали gA, обозначенной черным цветом; темно-серым цветом показана поверхность мембраны. Принятая схема barrel-stave для структуры аламетицина, образованной амфипатическими α -спиралями (б): черным цветом обозначены гидрофобные участки спиралей, серым – гидрофильные.

О способности пептидов формировать поры большого диаметра в клеточной мембране можно судить по их гемолитической активности [18]. Известно, что светорассеяние суспензии эритроцитов существенно зависит от их размера и осмотической силы окружающего раствора. Как видно из рис. 6, пептид P1C не влияет на размер эритроцитов, в отличие от мелиттина, который в субмикромольных концентрациях приводит к их гемолизу [19].

В предыдущей работе мы показали, что поликатионные аналоги грамицидина А формируют большие неселективные поры в мембране липосом [9]. Из приведенных выше данных очевидно, что действие пептида P1C на мембрану зависит от ее природы: порообразующая активность пептида существенно различается на модельных мембранах (рис. 1, 2) и природных мембранах эритроцитов (рис. 6). Такая избирательность в действии на мембраны известна и для других пептидов. Например, магаинин вызывает формирование пор в мембранах бактерий, но практически нетоксичен для эукариотических клеток и не нарушает целостности их мембран [20].

Результаты настоящей работы показывают, что формирование пор большого диаметра под действием пептидов, содержащих последовательность грамицидина А, существенно зависит от свойств как

самого пептида, так и мембраны. Ранее было показано, что наличие положительно заряженной последовательности на С-конце грамицидина является необходимым условием формирования неселективных пор [9]. В настоящей работе был установлен размер участка последовательности грамицидина, который необходим для формирования пор такого типа в мембранах. В том случае, если пептид содержит участок более короткий, чем начальный додекапептидный фрагмент последовательности природного gA, формирование таких пор резко затрудняется.

Согласно нашим данным [9], большие неселективные поры образуются лишь при сравнительно высоких концентрациях пептидов (около 1 мкМ), тогда как для формирования катионселективных пор требуются на два порядка меньшие концентрации. Эти данные указывают на связь между образованием больших пор и агрегацией пептидов в мембране, что согласуется также с данными по усилению порообразующей активности при димеризации пептида P10C (рис. 2). В то же время способность пептидов к образованию $\beta^{6,3}$ -димеров типа голова-к-голове, по-видимому, не важна для формирования больших пор, поскольку пептиды со свободным N-концом также были эффективными порообразователями (рис. 1).

На рис. 7 показана схема образования больших пор с участием пептида P10C и других пептидов такого типа. Согласно данным спектроскопии КД, в формировании больших пор могут принимать участие пептиды, находящиеся как в $\beta^{6,3}$ -спиральной конформации, так и в конформации двойной $\beta^{5,6}$ -спирали. Мы предполагаем, что стенки больших пор формируются олигомерами пептидов, причем катионные последовательности могут выстилать стенки поры, тогда как гидрофобные спирали грамицидина располагаются за ними и находятся в контакте с липидами мембранного бислоя. Такая модель является вариантом структуры типа barrel-stave, описанной для поры, формируемой аламетицином [3]; роль α -спиралей аламетицина здесь выполняют β -спирали грамицидина. Нельзя исключить, что полярные головки липидных молекул также участвуют в формировании стенок такой поры, как это имеет место в случае тороидальной поры, формируемой магаицином и некоторыми другими пептидами [21–25].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез пептидов. Пептиды синтезировали путем последовательного наращивания полипептидной цепи с С-конца с помощью твердофазного метода в ручном варианте с использованием Fmoc-стратегии на 4-(2',4'-диметоксифенил-Fmoc-аминометил)-фенокси-полистироле (Rink-amide resin). Активацию карбоксильных групп проводили карбодиимидным методом с добавкой 1-гидроксибензотриазола. Временные защитные Fmoc-группы на каждой стадии удаляли 50%-ным раствором пиперидина в DMF. Ацетилирование концевой аминогруппы пептида P10C осуществляли обработкой 10-кратным избытком уксусного ангидрида в присутствии *N*-этилдиизопропиламина. Снятие пептидов со смолы и конечное деблокирование проводили смесью TFA–вода–1,2-этандитиол (95 : 2.5 : 2.5) с последующим высаживанием продукта холодным (4°C) диэтиловым эфиром. Полученную смесь центрифугировали, надосадочную жидкость сливали, осадок промывали холодным (4°C) диэтиловым эфиром и сушили под вакуумом. Выделение целевого продукта проводили методом ВЭЖХ с градиентной элюцией смесью этанол–0.1% TFA–вода. Конечные продукты были охарактеризованы методами аналитической ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

Аналитическую офВЭЖХ проводили на колонке Hi-Pore C4 250 × 4.6 мм (BioRad, США) градиентной элюцией смесью этанол–0.1% TFA–вода (от 5 до 100% этанола за 95 мин) при скорости потока 0.6 мл/мин. Оптическое поглощение регистрировали при длинах волн 220 и 280 нм. Для всех полученных пептидов чистота составляла $\geq 95\%$. В

табл. 1 приведены выходы и физико-химические параметры синтезированных пептидов.

Масс-спектры снимали на установке Ultraflex MALDI TOF/TOF Bruker. В качестве матрицы использовали α -циан-4-гидроксикоричную кислоту.

Бислойные липидные мембраны формировали из 2%-ного раствора DPhPC (Avanti Polar Lipids) в декане по методике Мюллера на отверстиях (0.2 мм) в тефлоновой перегородке, разделяющей два отсека ячейки, содержащей буферный раствор (1 M KCl, 10 mM Трис, 10 mM MES, pH 7). Измерение тока проводили с помощью усилителя BC-525C (Warner Instruments) с оцифровыванием платой Lab-PC 1200 (National Instruments, Austin, TX) и анализировали на персональном компьютере с помощью программы WinWCP Strathclyde Electrophysiology Software, разработанной J. Dempster (University of Strathclyde, UK). Ag-AgCl электроды погружали непосредственно в ячейку. Пептиды добавляли с двух сторон мембраны.

Выход CF из липосом под действием пептидов. Для приготовления липосом использовали DPhPC и DPhPG в соотношении 70 : 30 (моль/моль). Липиды смешивали в виде растворов в хлороформе. После упаривания хлороформа в токе азота добавляли 1 мл буферного раствора, содержащего 100 mM CF, встряхивали 2 мин и подвергали двум циклам замораживания-оттаивания, встряхивая смесь после каждого цикла. Полученную смесь мультислабляемых липосом продавливали через поликарбонатный фильтр с порами диаметром 0.1 мкм, используя мини-экструдер (Avanti Polar Lipids). Не включившийся в липосомы CF отделяли гель-хроматографией на сефадексе G-50 (coarse). Сефадексы, залитый дистиллированной водой, оставляли на ночь для набухания. Колонку объемом 3 мл заполняли набухшим сефадексом, после чего уравнивали 10 мл буфера А (10 mM Трис, 10 mM MES, 100 mM KCl, pH 7, 10 мл). Для устранения неспецифического связывания через колонку пропускали 500 мкл липосом (концентрация липида 10 мг/мл), приготовленных из яичного фосфатидилхолина, и затем еще 10 мл буфера А. Объем суспензии липосом, содержащих CF, составлял 300 мкл (концентрация липидов 10 мг/мл). К полученной суспензии липосом добавляли раствор пептида. Динамику выхода CF контролировали на флуориметре Hitachi F-4000 (Токио, Япония) с длинами волн возбуждения и испускания 490 и 520 нм, соответственно (ширина обеих щелей 5 нм), и долю вышедшего красителя в конкретный момент времени рассчитывали по формуле:

$$\alpha (\%) = 100(F_f - F_0)/(F_{100} - F_0),$$

где F_0 и F_f являются уровнем флуоресценции до и после добавления пептида соответственно, а F_{100} – значение флуоресценции после полного разруше-

ния липосом детергентом LDAO (лаурилдиметил-амин-*N*-оксид), добавленным до конечной концентрации 2.4% (по весу).

Спектры КД. Липосомы для КД-спектроскопии готовили из этанольного раствора липидов как описано в работе [17]. Использовали DMPC (Sigma), DOPC (Sigma), DPhPC (Avanti) и соевый фосфатидилхолин S-100 (Lipoid). Спектры КД измеряли при 20°C при соотношении пептид-липид, 1 : 40, после заполнения колбы аргоном и тепловой инкубации при 68°C в течение 7–8 ч на дихрографе Jasco 500 C с использованием разборных кювет (Hellma) с длиной оптического пути 10⁻² см. Представленные спектры являются усредненными по результатам трех сканирований. В качестве базовой линии использованы спектры соответствующих липосомальных суспензий без пептидов. Компьютерный анализ КД-спектров осуществлен как описано ранее [16, 17].

Электрический потенциал на мембранах липосом измеряли по флуоресценции красителя сафранина О (Aldrich) согласно [26]. Моноламеллярные липосомы из яичного фосфатидилхолина (Avanti Polar Lipids) приготавливали, как описано выше, в растворе 5 мМ фосфатного буфера (рН 7), содержащего 200 мМ КСl. Липосомы в концентрации 0.2 мг/мл суспендировали в бескальциевой среде, содержащей 340 мМ сахарозу, 10 мМ Трис, 10 мМ MES, рН 7, в присутствии 1 мкМ сафранина О. Флуоресценцию красителя возбуждали при 521 нм, флуоресценцию регистрировали при 581 нм. Как было показано ранее, в этих условиях добавление грамицидина приводит к существенному росту флуоресценции благодаря развитию диффузионного потенциала ионов калия [27].

Размер эритроцитов оценивали по оптической плотности суспензии клеток при 650 нм на спектрофотометре Amersham Ultraspec 1100. Эритроциты выделяли из крови доноров путем центрифугирования в среде 10 мМ Трис, 140 мМ NaCl, 0.2 мМ EDTA, рН 7.4. После добавления пептидов измеряли динамику изменения светорассеяния суспензии эритроцитов (начальный уровень составлял около 0.15 ОЕ₆₅₀). Для контроля использовали мелиттин (Sigma), добавление которого в субмикромольных концентрациях приводило к лизису эритроцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 06-04-48523).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andersen O.S., Apell H.J., Bamberg E., Busath D.D., Koeppe R.E., Sigworth F.J., Szabo G., Urry D.W., Woolley A. // *Nat. Struct. Biol.* 1999. V. 6. P. 609–612.
2. Fernandez-Lopez S., Kim H.S., Choi E.C., Delgado M., Granja J.R., Khasanov A., Kraehenbuehl K., Long G., Weinberger D.A., Wilcoxon K.M., Ghadiri M.R. // *Nature*. 2001. V. 412. P. 452–455.
3. Sansom M.S. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1991. V. 55. P. 139–235.
4. Thundimadathil J., Roeske R.W., Guo L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 330. P. 585–590.
5. Zemel A., Fattal D.R., Ben Shaul A. // *Biophys. J.* 2003. V. 84. P. 2242–2255.
6. Zakharov S.D., Kotova E.A., Antonenko Y.N., Cramer W.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. V. 1666. P. 239–249.
7. Allende D., Simon S.A., Mcintosh T.J. // *Biophys. J.* 2005. V. 88. P. 1828–1837.
8. Sobko A.A., Kotova E.A., Antonenko Y.N., Zakharov S.D., Cramer W.A. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 14408–14416.
9. Antonenko Y.N., Stoilova T.B., Kovalchuk S.I., Egorova N.S., Pashkovskaya A.A., Sobko A.A., Kotova E.A., Sychev S.V., Surovoy A.Y. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. P. 5247–5252.
10. Chen R.F., Knutson J.R. // *Anal. Biochem.* 1988. V. 172. P. 61–77.
11. Rokitskaya T.I., Antonenko Y.N., Kotova E.A. // *Biophys. J.* 1997. V. 73. P. 850–854.
12. Killian J.A., Prasad K.U., Hains D., Urry D.W. // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 4848–4855.
13. Bano M.C., Braco L., Abad C. // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 886–894.
14. Cox K.J., Ho C., Lombardi J.V., Stubbs C.D. // *Biochemistry*. 1992. V. 31. P. 1112–1117.
15. Greathouse D.V., Hinton J.F., Kim K.S., Koeppe R.E. 2. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 4291–4299.
16. Sychev S.V., Barsukov L.I., Ivanov V.T. // *Eur. Biophys. J.* 1993. V. 22. P. 279–288.
17. Sychev S.V., Sukhanov S.V., Barsukov L.I., Ivanov V.T. // *J. Peptide Sci.* 1996. V. 2. P. 141–156.
18. Tejuca M., Dalla S.M., Potrich C., Alvarez C., Menestrina G. // *J. Membr. Biol.* 2001. V. 183. P. 125–135.
19. Sessa G., Freer J.H., Colacicco G., Weissmann G. // *J. Biol. Chem.* 1969. V. 244. P. 3575–3582.
20. Matsuzaki K. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1462. P. 1–10.
21. Ludtke S.J., He K., Heller W.T., Harroun T.A., Yang L., Huang H.W. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 13723–13728.
22. Matsuzaki K., Sugishita K., Ishibe N., Ueha M., Nakata S., Miyajima K., Epand R.M. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 11856–11863.
23. Epand R.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1376. P. 353–368.
24. Shai Y. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1462. P. 55–70.
25. Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. // *Biophys. J.* 2001. V. 81. P. 1475–1485.

26. Loughheed T., Borisenko V., Hand C.E., Woolley G.A. // 27. Woolley G.A., Kapral M.K., Deber C.M. // FEBS Lett. Bioconjug. Chem. 2001. V. 12. P. 594–602. 1987. V. 224. P. 337–342.

Ion Channels of Various Types Induced in Lipid Membranes by Gramicidin A Derivatives Carrying a Cationic Sequence at Their C-Termini

T. B. Stoilova^{a, #}, E. A. Dutseva^b, A. A. Pashkovskaya^b, S. V. Sychev^a, S. I. Koval'chuk^a, A. A. Sobko^b, N. S. Egorova^a, E. A. Kotova^b, Yu. N. Antonenko^b, A. Yu. Surovoi^{a, †}, and V. T. Ivanov^a

[#] Phone: +7 (495) 335-5844; e-mail: stojlova@yahoo.com

^a Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^b Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

The channel-forming activity of gramicidin A derivatives carrying positively charged amino acid sequences at their C-termini was studied on planar bilayer lipid membranes and liposomes. We showed previously (*FEBS Lett.*, 2005, vol. 579, pp. 5247–5252) that, at low concentrations, these peptides form classical cation-selective pores typical of gramicidin A, whereas, at high concentrations, they form large nonselective pores. The ability of the peptides to form nonselective pores, which was determined by the efflux of carboxyfluorescein, an organic dye, from liposomes, decreased substantially as the length of the gramicidin fragment in the series of cationic analogues was truncated. CD spectra showed that large pores are formed by peptides having both $\beta^{6.3}$ single-stranded and $\beta^{5.6}$ double-stranded helical conformations of the gramicidin fragment, with the C-terminal cationic sequence being extended. The dimerization of the peptides by the oxidation of the terminal cysteine promoted the formation of nonselective pores. It was shown that nonselective pores are not formed in membranes of erythrocytes, which may indicate a dependence of the channel-forming ability on the membrane type. The results may be of interest for the directed synthesis of peptides with antibacterial activity. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2007, vol. 33, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: gramicidin, cationic analogues; ion channels, nonselective pores; transmembrane amphipathic peptides