



УДК 548.737

© 1992 г.

Г. Н. Тищенко, В. И. Андрианов, Б. К. Вайнштейн,  
Э. Добсон\*

ГРАМИЦИДИНОВЫЕ КАНАЛЫ: НОВЫЙ МЕХАНИЗМ  
ТРАНСМЕМБРАННОГО ПЕРЕНОСА ИОНОВ (ПО ДАННЫМ  
РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИБИОТИКА  
С ВЫСОКИМ РАЗРЕШЕНИЕМ)

Институт кристаллографии РАН, Москва;  
\* Йоркский университет, Йорк, Англия

Методом рентгеноструктурного анализа определено строение в кристаллах комплекса мембраноактивного циклодекапептидного антибиотика грамицидина S с мочевиной. Молекула грамицидина имеет в комплексе антипараллельную  $\beta$ -структуру. Ее слегка скрученный 30-членный цикл принимает форму прямоугольника с размерами  $4,8 \times 13,6$  Å, меньшие стороны которого построены из атомов основной цепи остатков D-Phe и Pro. Максимальный размер молекулы 22,9 Å, ее характерная особенность – расположение вытянутых боковых радикалов остатков Orn по одну сторону от молекулярного цикла в виде своеобразных «ног-щупалец», одна из которых «закреплена» с помощью внутримолекулярной H-связи на атоме O ближайшего остатка Phe<sub>4</sub>, другая свободна. Расстояние между концевыми атомами NE остатков Orn 5,7 Å. Боковые радикалы остатков D-Phe и Orn<sub>2</sub> принимают *транс*-, а Val, Orn<sub>7</sub> и Leu – *гош*-ориентации. Для боковых цепей остатков Val<sub>1</sub> и Leu<sub>3</sub> имеет место статистическая неупорядоченность концевых атомов C. Пирролидиновые циклы остатков Pro принимают C<sub>s</sub>-C <sup>$\beta$</sup> -экзо-конформацию. На молекулу антибиотика в структуре приходится одна молекула мочевины и 20 молекул воды, положения трех из них заняты нацело, остальных – с вероятностью 0,56–0,20. Одно из положений воды на  $2/3$  занято водой и на  $1/3$  атомом O молекулы спирта. В структуре имеется сложная система внутри- и межмолекулярных H-связей с участием и без участия молекул воды, спирта и мочевины. Молекулы грамицидина, располагаясь по левой двойной спирали вокруг оси Z<sub>1</sub>, образуют каналы, внешнюю поверхность которых формируют гидрофобные боковые радикалы, а внутреннюю – атомы основной цепи и орнитининовые «хвосты» с незаряженными атомами NE на концах. Внешний диаметр канала 29–43 Å, внутренний (без орнитининовых «хвостов») ~12,7 Å. За счет изменения конформации этих «хвостов» внутренний диаметр канала, заполненного молекулами воды, может изменяться от 3,4 до 6,3 Å. Таким образом, через канал могут проходить ионы и частицы довольно больших размеров. Грамицидиновые каналы обнаружены и описаны впервые. Каналы в структуре плотно упакованы по гексагональному закону. Ионы Cl<sup>-</sup>, в избытке присутствующие в маточном растворе, в кристалле не обнаружены, что косвенно указывает на отсутствие зарядов на концевых атомах NE остатков Orn. Давно объяснение этому необычному факту.

Циклический декапептидный антибиотик грамицидин S *cyclo*[-(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro)<sub>2</sub>-] \* был открыт в 1944 г. Гаузе и Бражниковой [1]. Объектом действия антибиотика являются клеточные мембраны, которые в его присутствии перестают функционировать как барьер проницаемости для ряда веществ и ионов [2]. Со времени открытия антибиотика выдвигались различные модели строения его молекулы, базировавшиеся как на общих принципах укладки пептидных цепей [3], так и на приближенных конформационных расчетах [4–7]. Наиболее распространенной стала  $\beta$ -модель Ходжкин – Оутон [3], согласно которой молекула состоит из двух антипараллельных  $\beta$ -цепей, соединенных пролиновыми

\* Конфигурационный символ в аббревиатуре L-аминокислот опущен.

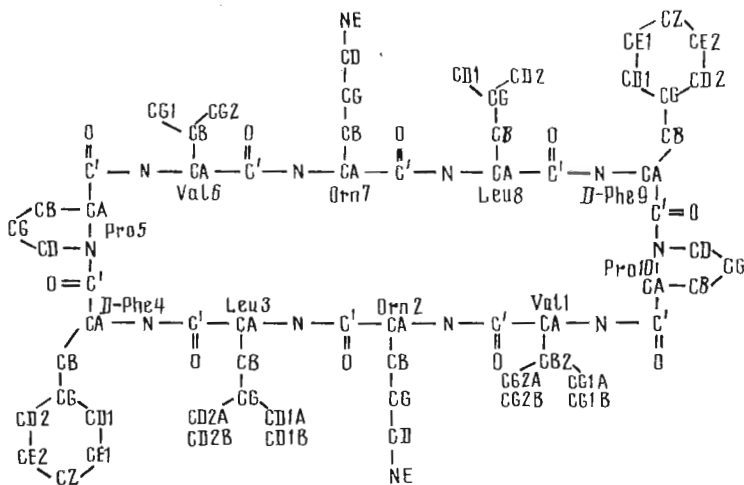


Рис. 1. Химическое строение грамицидина S с принятыми [16] обозначениями атомов; верхние индексы  $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \xi$  в обозначениях атомов заменены буквами А, В, G, D, E, Z соответственно

мостиками, и стабилизирована четырьмя кросс-циклическими Н-связями. Эта модель была подтверждена спектральными исследованиями конформационного состояния грамицидина S и его N,N'-диацетильного производного в различных средах [8]

Тищенко с сотр. [9–12] получила ряд кристаллов тяжелоатомных производных, содержащих две независимые молекулы в базисной части элементарной ячейки. Однако расшифровать синтезы Паттерсона не удалось, вероятно, вследствие равномерного чередования молекул грамицидина и связанных с ними тяжелых атомов, что в сочетании с высокой симметрией элементарной ячейки, большим числом атомов в ее независимой части чрезвычайно усложняло картину паттерсоновских синтезов. Рядом других авторов также предпринимались попытки определить структуру методом тяжелого атома [7, 13]. Тем не менее рентгеноструктурные исследования грамицидина вплоть до 1978 г. не имели успеха.

В 1978 г. появилось сообщение [14] о получении модели структуры грамицидина на физическом факультете Йоркского университета. Успех был обусловлен, с одной стороны, удачной кристаллизацией грамицидина (одна молекула в независимой части элементарной ячейки, характеризующейся пространственной группой P3,21 и параметрами  $a=25,8, c=21,49$  Å) из раствора в этаноле в присутствии мочевины и HCl и, с другой — созданием йоркской группой чрезвычайно мощной версии программы прямых методов MULTAN-78 [15]. Полученная модель структуры была уточнена по 4902 отражениям в сфере разрешения до  $\sim 1$  Å с использованием программы уточнения, основанной на алгоритме быстрого преобразования Фурье [14] до R-фактора 0,247. Однако вследствие нестабильности кристаллов при получении эксперимента пришлось использовать несколько образцов, что отрицательно сказалось на качестве экспериментальных данных. Стандартные отклонения для координат атомов углерода цикла достигали 0,04 Å. Положения целого ряда атомов остались неопределенными.

Кристаллы лучшего качества в близких условиях удалось получить в Институте кристаллографии АН СССР, что в сочетании с разработан-

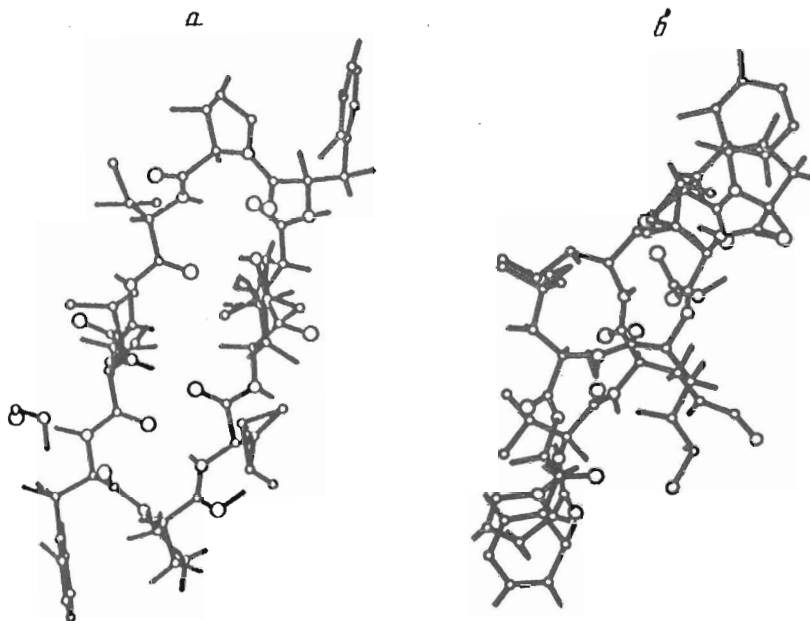


Рис. 2. Конформация молекулы грамицидина S в кристалле: *a* – вид вдоль молекулярной псевдооси второго порядка; *б* – вид перпендикулярно этой оси; видны орнитиновые «хвосты»

ными в институте методиками и программами структурного анализа определило успех исследования.

Конформация молекулы грамицидина S (рис. 1 и 2, табл. 1) в общих чертах близка к модели, предложенной Ходжкин и Оутон [3], однако отличается от нее скрученностью молекулярного цикла, аналогичной реализующейся в  $\beta$ -участках белковых молекул. Двугранный угол между средними плоскостями полуколец основной цепи C(Orn2) ... C(Orn7) и C(Orn7) ... C(Orn2) составляет  $40,9^\circ$ .

В табл. 2 экспериментальные величины конформационных параметров  $\varphi$  и  $\psi$  (C'–N–CA–C' и N–CA–C'–N) грамицидина S в кристаллическом комплексе с мочевиной (I) сопоставлены с величинами, полученными спектральными методами для растворов (II) и рассчитанными теоретически (III и IV). В случае I и II экспериментальные величины  $\varphi$  хорошо согласуются между собой, а  $\psi$  заметно различаются. Величины  $\psi$  кристаллической структуры I несколько лучше согласуются с данными расчета IV, чем со спектральными данными II.

Молекула грамицидина S в кристалле обладает псевдоосью второго порядка. Ее 30-членный циклический остов, образованный двумя антипараллельными пептидными цепями, имеет приблизительно прямоугольную форму с размерами около  $4,8 \times 13,6$  Å, причем меньшие стороны прямоугольника создают атомы основной цепи остатков D-Phe и Pro; расстояние между концевыми атомами CZ фенильных радикалов составляет 22,9 Å, CG-атомы пролиновых циклов отстоят друг от друга на 16,9 Å.

Плоскости колец D-Phe4 и Pro5 примерно параллельны (двугранный угол  $26,9^\circ$ ), и можно предполагать наличие между ними стэкинг-взаимодействия. Параллельность колец D-Phe9 и Pro10 заметно нарушена (угол  $44^\circ$ ), по-видимому, за счет образования внутримолекулярной водородной связи (ВМВС) между концевым атомом N остатка Orn2 и карбонильным атомом O остатка D-Phe4 (расстояние 2,75 Å). Симметричная

Конформационные углы (град) в молекуле гамицидина S

Углы	Val1	Orn2	Leu3	D-Phe4	Pro5	Val6	Orn7	Leu8	D-Phe9	Pro10
C'-N-CA-C'	-118	-109	-123	61	-79	-125	-105	-140	57	-94
N-CA-C'-N	156	132	92	-125	-4	154	136	120	-134	11
CA-C'-N-CA	172	171	-178	-175	-173	174	179	-172	-177	-172
N-CA-CB1-CG1A	-28	-172	-59	174	13	58	-64	-73	175	39
N-CA-CB1-CG2A	167									
N-CA-CB2-CG1B	60					-67				
N-CA-CB2-CG2B	-44									
CA-CB-CG-CD1		175	-158	-75	-9		174	-67	-87	-37
CA-CB-CG-CD2A			93	107				174	89	
CA-CB-CG-CD2B			-60							
CB-CG-CD1-CE1				-179					176	
CB-CG-CD1-N					2					21
CB-CG-CD1-NE	-173						-178			
CB-CG-CD1-CE2				178					-179	
CG-CD1-CE1-CZ				-1					2	
CG-CD2-CE2-CZ				-5					4	
CG-CD-N-CA					7					3
CD-N-CA-C'					107					94

Таблица 2

Экспериментальные (I, II) и теоретические (III, IV) величины конформационных углов (град) для молекулы гамицидина S

Конформационные параметры	Val (1,6)	Orn (2,7)	Leu (3,8)	Phe (4,9)	Pro (5,10)	Ссылка
I φ	-118, -125	-109, -105	-123, -140	61, 57	-79, -94	Наст. исслед. [2], [17]
ψ	156, 154	132, 136	92, 120	-125, -134	-4, 11	
II φ	-120	-110	-120	55	60	[13]
ψ	120	110	110	-110	-40	
III φ	-82	-132	-143	58	-68	[18]
ψ	137	152	82	-116	-31	
IV φ	-87 ÷ -91	-138 ÷ -148	-138 ÷ -159	64-71	-75	[18]
ψ	122-129	126-130	103-116	-139 ÷ -140	-15 ÷ -18	

BMBC в молекуле не возникает, так как атомы O и N остатка D-Phe9 участвуют в образовании H-связей с молекулой мочевины (табл. 3). Эффект асимметрии проявляется также в величинах двугранных углов между плоскостями колец D-Phe4, D-Phe9, Pro5 и Pro10 и плоскостью соответствующего полуцикла молекулы (114,5, 114,3, 119,4 и 77,4° соответственно).

Характерная особенность молекулы — размещение вытянутых боковых радикалов остатков орнитина по одну сторону от молекулярного цикла в виде своеобразных ног-щупалец. Одна из этих ног, как уже отмечалось, «закреплена» с помощью BMBC, другая свободна (см. рис. 2б). Расстояние между концевыми атомами NE орнитиновых «хвостов» 5,65 Å.

Гидрофобные боковые радикалы остатков валина и лейцина ориентированы в противоположную по отношению к орнитиновым боковым цепям сторону от основного цикла молекулы. В структуре имеет место статистическая неупорядоченность в ориентации боковых радикалов остатков Val1 и Leu3. В первом из них атомы CB, CG1 и CG2 с равной вероят-

Водородные связи А...В ( $r \leq 3,2 \text{ \AA}$ ) в структуре грамицидина S

№	Атом А	Атом В	Позиция В		r, Å	№	Атом А	Атом В	Позиция В		r, Å
			Сим	TZ					Сим	TZ	
1	NVal1	OLeu8	1	0	3,19	21	OW4	OW10	1	0	2,93
2	NLeu8	OVal1	1	0	2,93	22	OW5	OW11	1	0	2,48
3	NVal6	OLeu3	1	0	3,27	23	OW5	OW17	1	0	3,10
4	NLeu3	OVal6	1	0	2,82	24	OW7	OW17	1	0	2,80
5	NEOrn2	OPhe4	1	0	2,75	25	OW8	OW12	1	0	2,57
6	NPhe9	OU	1	0	2,81	26	OW11	OW19	1	0	2,99
7	NU	OPhe9	1	0	2,99	27	OW12	OW16	1	0	2,40
8	NPhe9	OU	5	-1	2,81	28	OPro10	OW2	5	0	2,77
9	OPhe9	OW6	1	0	2,96	29	NEOrn7	OW7	3	-1	3,07
10	NEOrn2	OW10	1	0	3,19	30	NEOrn2	OW7	2	0	3,11
11	NEOrn2	OW14	1	0	2,68	31	NPhe4	OW2	5	0	2,85
12	NOrn7	OW1	1	0	2,92	32	OPro5	OW1	4	-1	2,75
13	OOrn7	OW8	1	0	2,70	33	OW3	OW5	6	0	2,98
14	OOrn7	OW10	1	0	3,15	34	OW4	OW14	3	-1	2,74
15	OPro5	OW4	1	0	3,15	35	OW4	OW10	4	-1	2,93
16	OPro5	OW18	1	0	2,98	36	OW4	OPro5	4	-1	3,15
17	OW2	OW13	1	0	2,98	37	OW6	OW12	5	-1	2,69
18	OW2	OW20	1	0	3,07	38	OW9	OW18	4	-1	2,80
19	OW3	OW5	1	0	2,97	39	OW11	OW12	4	-1	2,98
20	OW4	OW14	1	0	2,74	40	NOrn2	OOrn2	5	0	3,03
						41	NEOrn7	OW10	1	0	3,15

\* TZ — трансляция вдоль оси z; «Сим» — номера преобразований симметрии: 1) x, y, z; 2) -y, x-y, 1/3+z; 3) y-x, -x, 2/3+z; 4) x-y, -y, 2/3-z; 5) -x, y-x, 1/3-z; 6) y, x, -z; OW — кислород воды, NU и OU — азот и кислород мочевины.

ностью занимают две разные позиции — А и В, во втором атомы CD1 и CD2 также находятся в положениях А и В с вероятностью 0,7 и 0,3 соответственно (см. таблицу в «Экспериментальной части»), причем положения CD1А и CD2В совпадают.

Известно [19, 20], что для алифатических боковых цепей (в данном случае Val, Orn, Leu) угол поворота вокруг связи CA—CB  $\chi^1$  (N—CA—CB—CG1) может принимать значения 60, 180 и  $-60^\circ$ . В молекуле грамицидина S для всех алифатических боковых цепей, кроме Orn2 и положения В Val1, величина угла  $\chi^1$  тяготеет к  $-60^\circ$ , а для остатка Orn2 угол  $\chi^1$  принимает значение  $-172^\circ$  (см. табл. 1), т. е. для этого остатка реализуется *транс*-ориентация бокового радикала, для остальных — *гош*. Орнитиновые «хвосты» приобретают вытянутую конформацию (углы  $\chi^2$  и  $\chi^3$  близки к  $180^\circ$ ), ориентация (основная) радикалов Leu3 и Leu8 — *транс* (угол  $\chi^2 \sim 180^\circ$ ).

Для остатков D-Phe возможны три конформации бокового радикала [21], характеризующиеся величинами угла  $\chi^1$  (N—CA—CB—CG), близкими к 60, 180 и  $-60^\circ$ , и величинами углов  $\chi^{21}$  (CA—CB—CG—CD1) и  $\chi^{22}$  (CA—CB—CG—CD2), близкими к 90 и  $-90^\circ$  соответственно. Боковые цепи остатка Phe в молекуле грамицидина характеризуются углами  $\chi^1$ , близкими к  $180^\circ$ ,  $\chi^{21}$  и  $\chi^{22}$ , близкими к 90 и  $-90^\circ$  соответственно, при этом плоскость бензольного кольца примерно перпендикулярна плоскости CA—CB—CG.

Пирролидиновые циклы остатков Pro5 и Pro10 в молекуле имеют одинаковые конформации — C<sub>s</sub>—C<sup>β</sup>-экзо (конверт, СВ (C<sup>β</sup>) в отогнутом угле, СВ и C' по разные стороны от плоскости цикла, примерная симметрия которого C<sub>s</sub> [22—23]).

Отклонения атомов (А) от среднеквадратичных плоскостей, приведенных через атомы фенильных и пирролидиновых колец остатков *D*-Phe и Pro  
Уравнения плоскостей  $Ax+By+Cz=D$

Остаток	A	B	C	D
<i>D</i> -Phe4	6,513	-2,822	20,810	2,734
<i>D</i> -Phe9	0,329	2,112	-21,388	7,145
Pro5	-6,484	18,499	-14,882	1,561
Pro10	10,078	2,592	-18,431	5,193

Атом	<i>D</i> -Phe4	<i>D</i> -Phe9	Атом	Pro5	Pro10
CG	0,012	-0,008	N	0,059	-0,090
CD1	0,008	-0,010	CA	-0,074	0,209
CE1	-0,014	0,015	CB	0,066	-0,246
CZ	-0,002	-0,002	CG	-0,031	0,190
CE2	0,028	-0,016	CD	-0,020	-0,062
CD2	-0,027	0,020	C*	-1,390	1,677
CB*	0,017	0,059			

\* Атомы, не используемые при проведении средних плоскостей

Из табл. 4 видно, что выходы атомов из среднеквадратичных плоскостей циклов для *D*-Phe4 и Pro5 больше, чем для *D*-Phe9 и Pro10, т. е. опять проявляет себя уже упоминавшаяся асимметрия молекулы, связанная главным образом с взаимодействием между молекулами грамицидина и мочевины. На каждую молекулу грамицидина в структуре приходится

Таблица 5

Длины связей (А) в молекуле грамицидина S

Связь	Val1	Orn2	Leu3	<i>D</i> -Phe4	Pro5	Val6	Orn7	Leu8	<i>D</i> -Phe9	Pro10
N-CA	1,46	1,46	1,46	1,43	1,47	1,47	1,45	1,45	1,45	1,45
CA-C'	1,52	1,52	1,51	1,53	1,52	1,49	1,49	1,53	1,51	1,52
C'=O	1,22	1,21	1,24	1,24	1,22	1,22	1,24	1,21	1,24	1,22
C'-N	1,31	1,34	1,33	1,33	1,32	1,33	1,34	1,33	1,33	1,32
CA-CB1	1,52	1,53	1,52	1,54	1,48	1,53	1,54	1,51	1,54	1,52
CA-CB2	1,47									
CB1-CG1A	1,49	1,47	1,52	1,48	1,35	1,53	1,47	1,54	1,48	1,53
CB1-CG2A	1,57					1,55				
CB2-CG1B	1,54									
CB2-CG2B	1,69									
CG1-CD1		1,40	1,62	1,35	1,48		1,55	1,48	1,38	1,51
CG1-CD2A			1,63	1,36				1,52	1,35	
CG1-CD2B			1,34							
CD1-CE1				1,39					1,39	
CD2-CE2				1,44					1,42	
CE1-CZ				1,34					1,33	
CE2-CZ				1,33					1,37	
CD-N					1,46					1,48
CD-NE		1,51					1,24			

Примечания. 1. Длины связей в молекуле мочевины: O=C 1,24, C-N 1,34 Å. 2. Расстояние CB1...CB2 для остатка Val1 составляет 0,53 Å. 3. Точность определения длин связей 0,01--0,02 Å.

Валентные углы (град) в структуре грамицидина S

Угол	Val1	Orn2	Leu3	D-Phe4	Pro5	Val6	Orn7	Leu8	D-Phe9	Pro10
N-CA-C'	110	108	107	109	116	111	110	107	109	114
CA-C'-O	123	121	121	119	117	123	121	120	118	118
CA-C'-N	114	114	118	120	120	116	117	116	121	119
O-C'-N	123	125	121	122	123	121	121	123	121	123
C'-N-CA	123	123	123	120	122	121	126	123	117	121
C'-N-CD					126					127
N-CA-CB1	111	113	113	111	102	113	110	113	110	103
N-CA-CB2	126									
CB1-CA-C'	109	110	109	111	112	108	109	109	111	112
CB2-CA-C'	110									
CB1-CA-CB2	20									
CA-CB1-CG1A	118	115	116	111	110	112	112	115	113	102
CA-CB1-CG2A	132					110				
CA-CB2-CG1B	98									
CA-CB2-CG2B	103									
CB-CG-CD1		117	104	121	111		107	111	120	105
CB-CG-CD2A			104	120				105	122	
CB-CG-CD2B			111							
CG-CD-N		111			102		107			104
CD-CD1-CE1				123					122	
CG-CD2-CE2				118					119	
CD1-CE1-CZ				118					117	
CD2-CE2-CZ				121					118	
CE1-CZ-CE2				120					122	
CG1A-CB1-CG2A	108									
CG1B-CB2-CG2B	101									
CD1-CG-CD2A			103	118				109	118	
CD1-CG-CD2B			91							
CD2A-CG-CD2B			134							
CD-N-CA					111					111

Примечание. Валентные углы в молекуле мочевины: O-C-N 121,8°, N-C-N 116,3°. Точность определения углов в основной цепи 0,4–0,7°, в боковых 0,6–1,3°, в статистически неупорядоченных концевых участках боковых цепей Val1 и Leu3 — до 2°.

одна молекула мочевины  $OC(NH_2)_2$ , занимающая частное положение на кристаллографической оси 2-го порядка и связанная с молекулой антибиотика двумя H-связями —  $O(Urea) \dots N(D-Phe9)$  2,81 Å и  $N(Urea) \dots O(D-Phe9)$  2,99 Å. Геометрические параметры молекулы мочевины имеют обычные значения (табл. 5 и 6).

На одну молекулу антибиотика в кристаллической структуре приходится 20 молекул  $H_2O$  (см. «Экспериментальную часть»), положения трех из них заняты нацело, остальных — с вероятностью 0,56–0,20. Одно из положений (OW2) занято на  $2/3$  молекулой  $H_2O$  и на  $1/3$  атомом O молекулы этанола. Локализован также атом C1 молекулы этанола. Молекулы воды OW связаны с молекулами антибиотика и между собой H-связями (см. табл. 3), причем некоторые позиции OW с заполнением меньше единицы не могут быть заняты одновременно, т. е. они относятся к разным молекулам антибиотика.

Поразительной чертой структуры является отсутствие в ней ионов  $Cl^-$ , в избытке присутствовавших в маточной жидкости. Действительно, из данных табл. 3 следует, что на расстояниях 3,07–3,19 Å от атомов NE остатков Orn (расстояния  $N^+ \dots Cl^-$  в структурах аминокислот [24]) составляют обычно 3,18–3,32 Å, хотя в структуре хлоридрата глицина

б

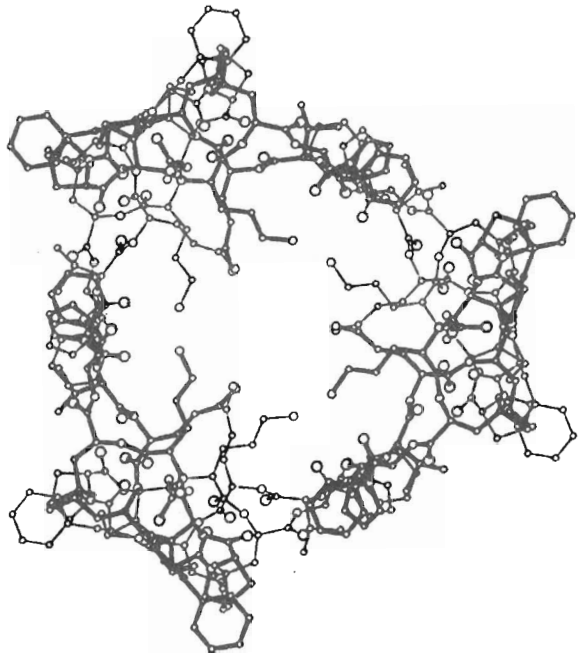
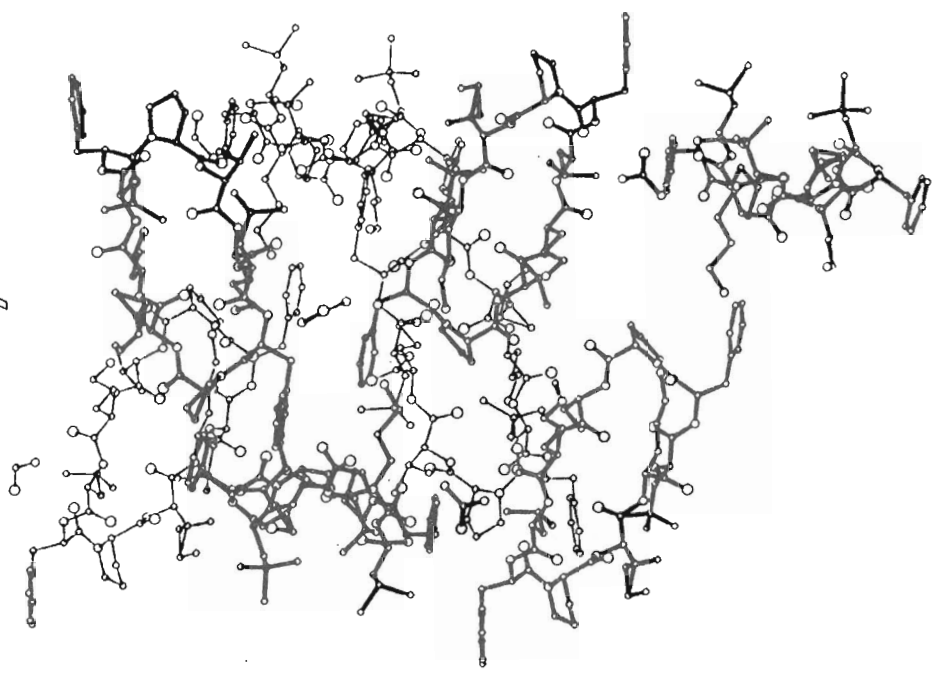


Рис. 3. Структура грацицидинового канала в кристалле: а - вид сверху, вдоль оси  $Z$ ; видны орнитиновое «хвосты», способные регулировать диаметр и полярность, внутренней полости канала, здесь же размещены и молекулы  $H_2O$ ; б - вид сбоку; видны боковые щели, формирующие внешнюю гидрофобную поверхность канала, а также молекулы мочевины



одно из таких расстояний равнялось 3,13 Å) находятся молекулы OW7 и OW10, занятость позиций которых составляет 0,35 и 0,52, причем молекула OW10 примерно одинаково отстоит от атомов NE(Orn2) и NE(Orn7) (3,19 и 3,15 Å соответственно). Кроме того, на расстоянии 3,24 Å от NE(Orn7) находится атом OW9 с занятостью позиции 0,35. Других атомов на расстояниях до 3,5 Å от атомов NE(Orn) в структуре нет. Иными словами, на два атома NE в структуре приходится  $0,52 + 0,35 + 0,20 = 1,07$  атома OW. Поскольку рассеивающая способность иона  $Cl^-$  более чем в 2 раза превосходит таковую атома O, это равносильно возможному присутствию в структуре примерно 0,5 иона  $Cl^-$  вместо необходимых двух. Кроме того, атомы OW7 и OW10 одновременно образуют с другими молекулами воды Н-связи длиной 2,80–2,93 Å, тогда как связи OW... $Cl^-$  обычно имеют длину не менее 3,05–3,07 Å [24]. Таким образом, атомы OW7, OW9 и OW10 не могут рассматриваться как ионы  $Cl^-$  и, следовательно, присутствие этих ионов в кристаллической структуре грамицидина S экспериментально не подтверждается.

В структуре имеется сложная система водородных связей – внутри- и межмолекулярных (ВМВС и ММВС), с участием и без участия молекул  $H_2O$  (см. табл. 3). Прежде всего это четыре кросс-циклические ВМВС, стабилизирующие вытянутую конформацию молекулярного цикла. Связи эти неравноценны: «центральные» более короткие (2,82 и 2,93 Å), а «периферийные» более длинные (3,27 и 3,19 Å) и не вполне параллельны друг другу. На конформацию молекулы в меньшей степени влияет ВМВС между концевым NE-атомом остатка Orn2 и атомом O остатка D-Phe4 длиной 2,75 Å, а также две ММВС с молекулой мочевины. Следует отметить, что непосредственно между атомами соседних молекул грамицидина реализуется лишь одна ММВС, в остальных ММВС участвуют молекулы воды.

Конформационные углы  $\varphi$ ,  $\psi$  и  $\omega$  одинаковых остатков Val1, Orn2, Leu3 и Val6, Orn7, Leu8 соответственно близки; их величины отвечают структуре «складчатого листа» с антипараллельными  $\beta$ -цепями ( $\varphi = -139$ ,  $\psi = +135$ ,  $\omega = -178$  [25]). Углы  $\varphi$  и  $\psi$  для остатков D-Phe и Pro отличаются от углов, характерных для регулярных структур. Угол  $\omega$  для всех остатков близок к  $180^\circ$ , что отвечает транс-пептидной связи. Наибольшие отклонения от этой величины имеют место для 1, 2, 8 и 10 остатков ( $\Delta\omega$  равно соответственно 8, 9, 8 и  $8^\circ$ ), что можно объяснить влиянием выраженной статистической неупорядоченности бокового радикала остатка Val1 и влиянием Н-связи O(Urea)...N(D-Phe9).

Длины связей (см. табл. 5) в транс-пептидных группах всех остатков близки к стандартным величинам – N–CA 1,454, CA–C' 1,520, C'=O 1,228, N–C' 1,334 Å [26]. Длины связей C–C в боковых цепях в ряде случаев заметно отличаются от идеального значения 1,54 Å, что связано с большими тепловыми колебаниями «концевых» атомов и особенно со статистической разупорядоченностью некоторых из них.

Общая картина распределения величин валентных углов (см. табл. 6) основной цепи близка к ожидаемой для пептидных цепей [26], хотя бросается в глаза значительное (на  $3-4^\circ$ ) уменьшение угла CA–C'–O для обоих остатков Pro и остатка D-Phe9, угла O–C'–N для остатков Leu3, Val6, Orn7 и D-Phe9, угла CA–C'–N для остатков Val и Orn, а также угла C'–N–CA для остатков D-Phe4, D-Phe9. Иными словами, «искаженные» валентные углы имеют место в основном в области нерегулярных участков цепи D-Phe9–Pro10 и D-Phe4–Pro5, соединяющих регулярные ее участки. Сокращенные внутри- и межмолекулярные ван-дер-ваальсовы контакты, согласно данным [27], в структуре отсутствуют.

Наибольший интерес представляет упаковка молекул грамицидина, мочевины, воды в кристаллической структуре комплекса. Молекулы гра-

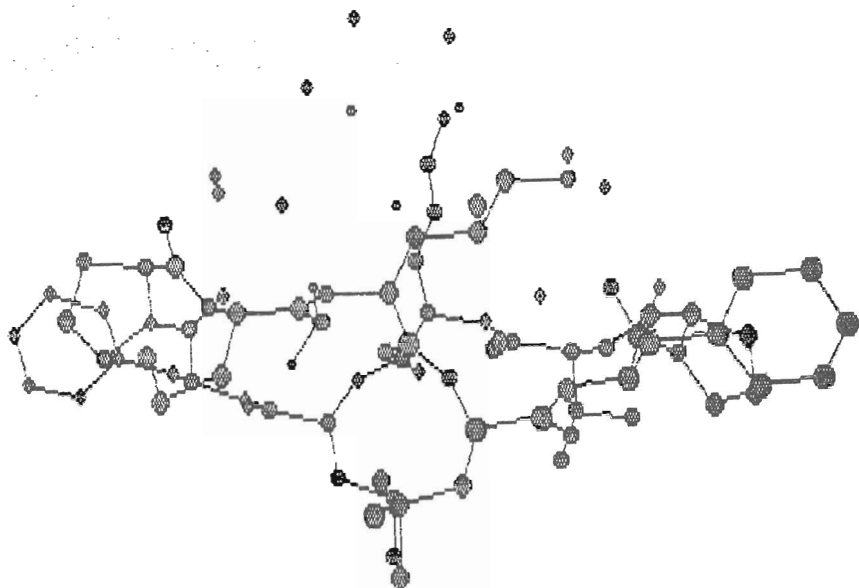


Рис. 4. Расположение молекул воды относительно молекулы грамицидина S (вид вдоль оси  $Z_1$ )

мицидина, располагаясь вокруг оси  $Z_1$  по закону левой двойной спирали, образуют каналы, внешнюю поверхность которых формируют боковые гидрофобные цепи, а внутреннюю — атомы основной цепи, главным образом атомы O и N (рис. 3). Внутри канала обращены орнитиновые «хвосты» с атомами N на концах (рис. 3а и 4). За счет изменения конформации этих «хвостов» внутренний диаметр канала может меняться. Канал заполнен молекулами воды, положения которых отражены на рис. 4. Геометрические характеристики канала — внешний диаметр — от 30 до 35 Å, внутренний (без орнитиновых «хвостов») — около 12 Å. Диаметр канала, ограниченный концевыми атомами N остатков орнитина, может меняться примерно от 3,3 до 6,2 Å. Таким образом, через канал могут проходить ионы и частицы довольно больших размеров. Перемещение ионов и частиц через мембрану может осуществляться под действием трансмембранного потенциала.

Следует отметить очень плотную упаковку грамицидиновых каналов в структуре (рис. 5). Важной особенностью исследованной структуры является отсутствие заряда на концевых атомах NE остатков орнитина, как это обычно имеет место в молекуле грамицидина S: при наличии положительного заряда на атоме NE к нему на воздухе присоединяется  $\text{CO}_2$  с образованием карбоната. Изученные нами кристаллы были получены из хлоридрата грамицидина S при добавлении небольших количеств соляной кислоты и мочевины. Таким образом, присутствие ионов  $\text{Cl}^-$  в маточном растворе не подлежит сомнению, как и их отсутствие в образовавшихся кристаллах, хотя грамицидин S обычно существует в виде соли с положительными зарядами на концевых атомах N остатков орнитина с обязательным присутствием противоиона, например  $\text{Cl}^-$ -иона. Могут быть названы три причины возникновения такой крайне необычной ситуации: 1) энергетический выигрыш за счет образования каналов, сопровождающийся переходом от четырехвалентного однозарядного состояния атомов NE остатков орнитина к трехвалентному

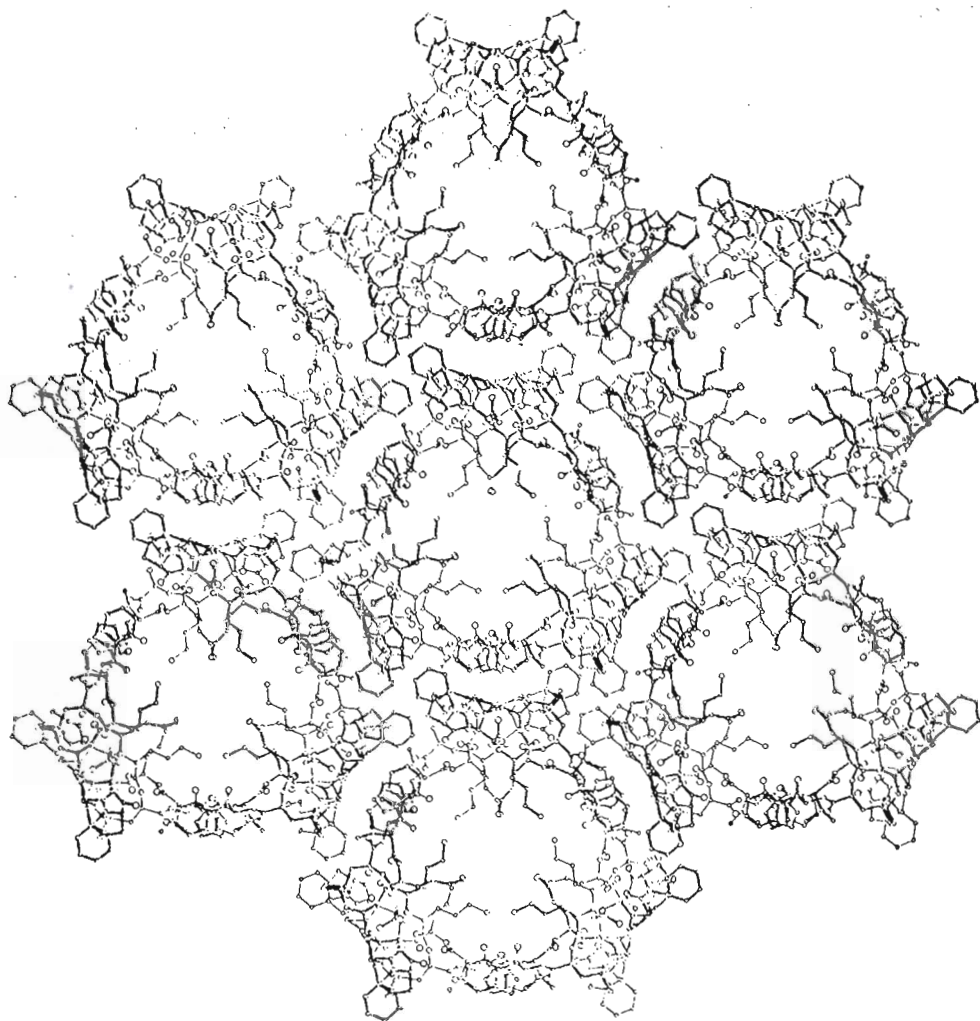


Рис. 5. Упаковка каналов в кристаллической структуре (вид вдоль оси  $Z_1$ )

с активным участием этих атомов в Н-связях (см. табл. 3); 2) энергетический выигрыш за счет плотной укладки возникших каналов; 3) связывание  $Cl^-$ -ионов молекулами мочевины в маточном растворе.

Следует отметить, что до сих пор механизм переноса ионов под действием грамицидина S оставался неясным. В работе [2] на основе спектральных данных отмечалась лишь близость расстояния между атомами NE двух остатков орнитина в молекуле грамицидина S к расстоянию между отрицательными зарядами на фосфатных группах в фосфолипидных мембранах. Возможность образования каналов грамицидином S отмечалась сотрудниками Института биохимии им. Баха АН СССР [28–30], изучавшими действие этого антибиотика на митохондриальные мембраны, хотя относительно строения этих каналов никаких предположений высказано не было. По данным этих авторов, каналы пропускали некоторые катионы (например,  $K^+$ ,  $Na^+$ ), а проникающие анионы (фосфат, ацетат) усиливали действие грамицидина S на мембраны.

Авторы признательны В. Т. Иванову за полезное обсуждение результатов исследования.

Координаты ( $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ , в долях ячейки), эквивалентные изотропные тепловые параметры ( $B_{\text{экв}}$ ,  $\text{Å}^2$ ) и коэффициенты заполнения атомов ( $q$ )

в структуре грамицидина S

В скобках даны стандартные отклонения \*

АТОМ	Остаток	$B_{\text{экв}}$	$X$	$Y$	$Z$	$q$
N	Val1	6,5(2)	0,0987(2)	0,4478(2)	-0,0303(2)	1,00
HN	Val1	5(1)	0,082(2)	0,460(2)	-0,050(2)	1,00
CA	Val1	8,1(3)	0,0683(3)	0,4206(2)	0,0279(2)	1,00
HA	Val1	6(1)	0,103(2)	0,419(2)	0,061(2)	1,00
C'	Val1	6,9(2)	0,0154(3)	0,3589(2)	0,0157(3)	1,00
O	Val1	10,6(3)	-0,0106(2)	0,3445(2)	-0,0338(2)	1,00
CB1	Val1	12,7(4)	0,0470(0)	0,4586(1)	0,0598(1)	0,50(2)
CB2	Val1	25,5(7)	0,0540(8)	0,4500(8)	0,0780(7)	0,50(3)
CG1A	Val1	13,6(5)	0,0825(9)	0,5279(7)	0,0482(9)	0,50(2)
CG2A	Val1	13,0(5)	-0,0006(9)	0,4446(9)	0,1068(8)	0,50(2)
CG1B	Val1	9,7(1)	0,0147(8)	0,4672(8)	0,0393(6)	0,50(2)
CG2B	Val1	9,9(4)	0,1172(8)	0,5164(6)	0,0849(7)	0,50(2)
N	Orn2	6,5(2)	-0,0010(2)	0,3234(2)	0,0642(2)	1,00
HN	Orn2	9(2)	0,021(3)	0,349(3)	0,104(3)	1,00
CA	Orn2	6,7(2)	-0,0556(2)	0,2655(2)	0,0650(2)	1,00
HA	Orn2	3(1)	-0,073(2)	0,258(2)	0,018(2)	1,00
C'	Orn2	6,1(2)	-0,0995(2)	0,2693(2)	0,1093(2)	1,00
O	Orn2	7,9(2)	-0,0842(1)	0,2906(2)	0,1607(1)	1,00
CB	Orn2	9,5(4)	-0,0448(3)	0,2152(3)	0,0858(4)	1,00
1HB	Orn2	9(2)	-0,039(3)	0,227(3)	0,131(3)	1,00
2HB	Orn2	15(4)	-0,016(5)	0,205(5)	0,039(5)	1,00
CG	Orn2	15,2(6)	-0,0967(5)	0,1548(4)	0,0789(7)	1,00
1HG	Orn2	9(2)	-0,128(3)	0,155(3)	0,105(3)	1,00
2HG	Orn2	14(3)	-0,114(5)	0,140(5)	0,033(4)	1,00
CD	Orn2	20(1)	-0,0888(7)	0,1065(6)	0,0924(9)	1,00
1HD	Orn2	13(2)	-0,080(5)	0,106(5)	0,137(5)	1,00
2HD	Orn2	13(2)	-0,054(5)	0,110(5)	0,067(5)	1,00
NE	Orn2	27,1(8)	-0,1439(5)	0,0483(4)	0,0760(9)	1,00
N	Leu3	6,4(2)	-0,1543(2)	0,2478(2)	0,0859(2)	1,00
HN	Leu3	9(2)	-0,169(3)	0,246(3)	0,037(3)	1,00
CA	Leu3	6,2(2)	-0,2040(2)	0,2444(2)	0,1214(2)	1,00
HA	Leu3	5(1)	-0,190(2)	0,253(2)	0,164(2)	1,00
C'	Leu3	6,8(2)	-0,2530(3)	0,1802(3)	0,1218(3)	1,00
O	Leu3	7,9(2)	-0,2894(2)	0,1594(2)	0,0787(2)	1,00
CB	Leu3	8,3(3)	-0,2277(3)	0,2824(3)	0,0939(3)	1,00
1HB	Leu3	11(2)	-0,253(4)	0,281(4)	0,128(4)	1,00
2HB	Leu3	14(3)	-0,233(4)	0,270(5)	0,049(4)	1,00
CG	Leu3	12,5(5)	-0,1837(5)	0,3486(4)	0,0885(5)	1,00
CD1A (CD2B)	Leu3	21(1)	-0,2254(8)	0,3789(6)	0,0849(9)	1,00
CD2A	Leu3	17,2(8)	-0,1561(9)	0,3574(9)	0,0187(9)	0,70(3)
CD1B	Leu3	21(1)	-0,162(2)	0,373(1)	0,144(3)	0,30(2)
N	Phe4	7,4(2)	-0,2550(2)	0,1459(2)	0,1688(2)	1,00
HN	Phe4	14(3)	-0,224(4)	0,155(4)	0,197(4)	1,00
CA	Phe4	7,4(2)	-0,2992(3)	0,0843(3)	0,1698(3)	1,00
HA	Phe4	4(1)	-0,341(2)	0,077(2)	0,168(2)	1,00
C'	Phe4	7,5(3)	-0,2911(3)	0,0538(3)	0,1128(3)	1,00
O	Phe4	9,9(2)	-0,2417(2)	0,0586(2)	0,1036(2)	1,00
CB	Phe4	9,4(4)	-0,2951(3)	0,0545(3)	0,2303(3)	1,00
1HB	Phe4	5(1)	-0,263(2)	0,060(2)	0,230(2)	1,00
2HB	Phe4	4(1)	-0,295(2)	0,083(2)	0,268(2)	1,00
CG	Phe4	9,1(3)	-0,3439(4)	-0,0080(3)	0,2373(3)	1,00
CD1	Phe4	10,0(5)	-0,3996(5)	-0,0212(4)	0,2532(3)	1,00
HD1	Phe4	6(1)	-0,405(2)	0,014(2)	0,264(2)	1,00
CE1	Phe4	12,0(5)	-0,4465(5)	-0,0790(5)	0,2611(4)	1,00
HE1	Phe4	10(2)	-0,488(3)	-0,086(3)	0,283(3)	1,00
CZ	Phe4	15,3(6)	-0,4365(7)	-0,1243(5)	0,2512(7)	1,00
HZ	Phe4	10(2)	-0,475(3)	-0,157(3)	0,268(3)	1,00
CE2	Phe4	18(1)	-0,3827(8)	-0,1138(6)	0,2347(9)	1,00
HE2	Phe4	12(2)	-0,375(4)	-0,149(4)	0,256(4)	1,00

Таблица 7 (продолжение)

АТОМ	Остаток	$B_{\text{экв}}$	X	Y	Z	$q$
CD2	Pre4	15,3 (7)	-0,3331 (6)	-0,0538 (5)	0,2296 (7)	1,00
HD2	Pre4	11 (2)	-0,288 (4)	-0,041 (4)	0,201 (4)	1,00
N	Pro5	7,5 (2)	-0,3364 (2)	0,0231 (2)	0,0744 (2)	1,00
CA	Pro5	8,3 (3)	-0,3322 (3)	-0,0107 (3)	0,0217 (3)	1,00
HA	Pro5	8 (2)	-0,301 (3)	-0,016 (3)	0,033 (3)	1,00
C'	Pro5	7,8 (3)	-0,3004 (3)	0,0254 (3)	-0,0358 (3)	1,00
O	Pro5	11,1 (3)	-0,2965 (3)	-0,0019 (2)	-0,0802 (2)	1,00
CB	Pro5	15,4 (6)	-0,3957 (5)	-0,0525 (5)	0,0068 (5)	1,00
IHB	Pro5	10 (2)	-0,413 (3)	-0,064 (3)	-0,036 (3)	1,00
2HB	Pro5	10 (2)	-0,401 (3)	-0,081 (3)	0,020 (3)	1,00
CG	Pro5	17,3 (8)	-0,4313 (5)	-0,0361 (6)	0,0362 (7)	1,00
IHG	Pro5	14 (3)	-0,437 (4)	-0,016 (5)	0,004 (4)	1,00
2HG	Pro5	10 (2)	-0,478 (3)	-0,063 (3)	0,043 (3)	1,00
CD	Pro5	8,5 (3)	-0,3973 (3)	0,0120 (3)	0,0819 (3)	1,00
IHD	Pro5	10 (2)	-0,408 (3)	-0,007 (3)	0,125 (3)	1,00
2HD	Pro5	10 (2)	-0,403 (3)	0,051 (3)	0,070 (3)	1,00
N	Val6	7,1 (2)	-0,2815 (2)	0,0829 (2)	-0,0376 (2)	1,00
HN	Val6	5 (1)	-0,277 (2)	0,102 (2)	-0,000 (2)	1,00
CA	Val6	7,0 (2)	-0,2561 (3)	0,1172 (3)	-0,0948 (2)	1,00
HA	Val6	4 (1)	-0,251 (2)	0,094 (2)	-0,119 (1)	1,00
C'	Val6	6,3 (2)	-0,1958 (2)	0,1691 (2)	-0,0828 (3)	1,00
O	Val6	9,2 (2)	-0,1799 (2)	0,1929 (2)	-0,0321 (2)	1,00
CB	Val6	8,7 (4)	-0,2959 (3)	0,1386 (3)	-0,1244 (3)	1,00
HB	Val6	5 (1)	-0,285 (2)	0,159 (2)	-0,180 (2)	1,00
CG1	Val6	11,1 (4)	-0,3084 (4)	0,1773 (4)	-0,0803 (4)	1,00
CG2	Val6	12,5 (5)	-0,3544 (4)	0,0847 (5)	-0,1492 (5)	1,00
N	Orn7	7,2 (2)	-0,1596 (2)	0,1887 (2)	-0,1315 (2)	1,00
HN	Orn7	8 (2)	-0,174 (3)	0,167 (3)	-0,157 (3)	1,00
CA	Orn7	7,5 (3)	-0,1014 (3)	0,2415 (3)	-0,1337 (3)	1,00
HA	Orn7	4 (1)	-0,086 (2)	0,256 (2)	-0,097 (2)	1,00
C'	Orn7	7,3 (2)	-0,1044 (3)	0,2893 (3)	-0,1691 (3)	1,00
O	Orn7	10,5 (3)	-0,1304 (2)	0,2791 (2)	-0,2196 (2)	1,00
CB	Orn7	10,6 (4)	-0,0569 (3)	0,2272 (4)	-0,1661 (4)	1,00
IHB	Orn7	8 (2)	-0,011 (3)	0,275 (3)	-0,178 (3)	1,00
2HB	Orn7	12 (3)	-0,079 (4)	0,224 (4)	-0,213 (4)	1,00
CG	Orn7	15,2 (7)	-0,0483 (6)	0,1833 (6)	-0,1308 (7)	1,00
IHG	Orn7	12 (3)	-0,045 (4)	0,187 (4)	-0,081 (4)	1,00
2HG	Orn7	10 (2)	-0,090 (3)	0,140 (3)	-0,123 (3)	1,00
CD	Orn7	29 (1)	-0,008 (1)	0,167 (1)	-0,1703 (9)	1,00
IHD	Orn7	24 (6)	0,031 (9)	0,203 (9)	-0,177 (9)	1,00
2HD	Orn7	24 (6)	-0,027 (9)	0,150 (9)	-0,211 (9)	1,00
NE	Orn7	33 (2)	-0,002 (2)	0,129 (2)	-0,1408 (9)	1,00
N	Leu8	6,8 (2)	-0,0761 (2)	0,3444 (2)	-0,1450 (2)	1,00
HN	Leu8	4 (1)	-0,058 (2)	0,347 (2)	-0,107 (2)	1,00
CA	Leu8	7,0 (2)	-0,0744 (2)	0,3954 (3)	-0,1752 (2)	1,00
HA	Leu8	5 (1)	-0,079 (2)	0,386 (2)	-0,228 (2)	1,00
C'	Leu8	6,0 (2)	-0,0118 (2)	0,4482 (2)	-0,1665 (2)	1,00
O	Leu8	7,3 (1)	0,0077 (1)	0,4654 (1)	-0,1146 (1)	1,00
CB	Leu8	9,6 (4)	-0,1187 (3)	0,4107 (4)	-0,1484 (3)	1,00
IHB	Leu8	6 (1)	-0,108 (2)	0,418 (2)	-0,099 (2)	1,00
2HB	Leu8	4 (1)	-0,138 (2)	0,441 (2)	-0,169 (2)	1,00
CG	Leu8	14,4 (6)	-0,1843 (5)	0,3675 (6)	-0,1654 (6)	1,00
HG	Leu8	10 (2)	-0,196 (3)	0,323 (3)	-0,144 (3)	1,00
CD1	Leu8	16 (4)	-0,1954 (5)	0,3700 (7)	-0,2328 (5)	1,00
CD2	Leu8	25 (1)	-0,2202 (7)	0,388 (1)	-0,1277 (7)	1,00
N	Phe9	6,3 (2)	0,0188 (2)	0,4732 (2)	-0,2183 (1)	1,00
HN	Phe9	6 (1)	0,013 (2)	0,456 (2)	-0,268 (2)	1,00
CA	Phe9	6,6 (2)	0,0809 (3)	0,5181 (3)	-0,2116 (2)	1,00
HA	Phe9	4 (1)	0,084 (2)	0,549 (2)	-0,190 (2)	1,00
C'	Phe9	6,4 (2)	0,1135 (2)	0,4920 (3)	-0,1770 (2)	1,00
O	Phe9	7,6 (2)	0,1031 (2)	0,4417 (2)	-0,1926 (1)	1,00
CB	Phe9	7,6 (3)	0,1086 (3)	0,5418 (3)	-0,2761 (2)	1,00
IHB	Phe9	8 (2)	0,103 (3)	0,507 (3)	-0,298 (3)	1,00

Таблица 7 (окончание)

АТОМ	ОСТАТОК	$B_{экв}$	X	Y	Z	$q$
2HB	Phe9	6(1)	0,084(2)	0,552(2)	-0,307(2)	1,00
CG	Phe9	7,4(3)	0,1706(3)	0,5913(3)	-0,2734(2)	1,00
CD1	Phe9	9,1(4)	0,1819(4)	0,6490(4)	-0,2677(3)	1,00
HD1	Phe9	9(2)	0,130(3)	0,636(3)	-0,267(3)	1,00
CE1	Phe9	11,9(5)	0,2389(7)	0,6973(5)	-0,2609(4)	1,00
HE1	Phe9	12(3)	0,249(4)	0,749(4)	-0,266(4)	1,00
CZ	Phe9	13,1(5)	0,2842(6)	0,6866(7)	-0,2620(5)	1,00
HZ	Phe9	8(2)	0,318(3)	0,725(3)	-0,258(3)	1,00
CD2	Phe9	10,1(4)	0,2172(4)	0,5816(4)	-0,2723(3)	1,00
HD2	Phe9	7(2)	0,211(3)	0,541(3)	-0,292(3)	1,00
CE2	Phe9	12,5(6)	0,2763(5)	0,6306(8)	-0,2683(5)	1,00
HE2	Phe9	13(3)	0,287(4)	0,592(4)	-0,287(4)	1,00
N	Pro10	6,1(2)	0,1508(2)	0,5215(2)	-0,1309(2)	1,00
CA	Pro10	6,7(2)	0,1846(2)	0,4983(3)	-0,0994(2)	1,00
HA	Pro10	8(2)	0,193(3)	0,473(3)	-0,124(3)	1,00
C'	Pro10	7,1(3)	0,1545(3)	0,4629(2)	-0,0412(3)	1,00
O	Pro10	11,0(3)	0,1840(2)	0,4509(2)	-0,0061(2)	1,00
CB	Pro10	8,3(3)	0,2429(3)	0,5542(3)	-0,0844(3)	1,00
1HB	Pro10	4(1)	0,269(2)	0,548(2)	-0,049(2)	1,00
2HB	Pro10	7(2)	0,272(3)	0,567(3)	-0,121(3)	1,00
CG	Pro10	9,5(4)	0,2215(3)	0,5975(3)	-0,0663(3)	1,00
1HG	Pro10	5(1)	0,257(2)	0,648(2)	-0,069(2)	1,00
2HG	Pro10	7(2)	0,200(2)	0,588(3)	-0,020(2)	1,00
CD	Pro10	7,6(3)	0,1703(3)	0,5829(3)	-0,1101(2)	1,00
1HD	Pro10	8(2)	0,124(3)	0,584(3)	-0,097(3)	1,00
2HD	Pro10	8(2)	0,177(3)	0,604(3)	-0,141(3)	1,00
OU	Ure11	8,1(3)	0,0003(0)	0,4150(3)	-0,3333(1)	1,00
CU	Ure11	7,9(4)	0,0000(0)	0,3669(5)	-0,3333(1)	1,00
NU	Ure11	9,3(3)	0,0263(3)	0,3527(3)	-0,2881(2)	1,00
1HNU	Ure11	10(2)	0,057(3)	0,377(3)	-0,270(3)	1,00
OW1	Wat21	14,8(2)	-0,2003(3)	0,1164(3)	-0,2443(2)	1,00
OW2	Wat21	14,7(2)	-0,1699(4)	0,1866(3)	0,2669(3)	1,00
O	Alc22					
C1	Alc22	22(2)	-0,147(2)	0,157(2)	0,290(3)	0,32(3)
OW3	Wat23	15,4(4)	-0,2228(3)	-0,2228(3)	0,0000(0)	1,00
OW4	Wat24	21(2)	-0,197(1)	0,0000(0)	-0,1667(1)	0,52(4)
OW5	Wat25	31(1)	-0,223(1)	-0,108(1)	-0,000(2)	0,53(3)
OW6	Wat26	18,8(6)	0,0998(7)	0,3379(6)	-0,131(1)	0,56(2)
OW7	Wat27	32(2)	-0,081(2)	-0,024(2)	0,104(3)	0,35(3)
OW8	Wat28	23,5(7)	-0,201(2)	0,204(1)	-0,309(2)	0,40(2)
OW9	Wat29	21(2)	-0,128(3)	0,005(3)	-0,131(3)	0,20(2)
OW10	Wat30	20(1)	-0,112(1)	0,032(1)	-0,063(1)	0,52(3)
OW11	Wat31	32(1)	-0,255(3)	-0,099(3)	0,106(2)	0,30(2)
OW12	Wat32	43(2)	-0,177(5)	0,201(2)	-0,425(3)	0,20(2)
OW13	Wat33	21(1)	-0,098(2)	0,152(2)	0,347(2)	0,34(2)
OW14	Wat34	24(2)	-0,157(2)	0,028(3)	-0,046(2)	0,32(3)
OW15	Wat35	21(1)	-0,180(2)	0,240(2)	-0,344(2)	0,34(2)
OW16	Wat36	26(1)	-0,227(3)	0,218(1)	-0,336(3)	0,32(2)
OW17	Wat38	35(5)	-0,097(6)	-0,097(6)	0,000(0)	0,20(4)
OW18	Wat39	25(2)	-0,170(2)	0,028(3)	-0,094(3)	0,30(3)
OW19	Wat40	23(2)	-0,171(2)	-0,022(2)	0,206(3)	0,20(2)
OW20	Wat41	22(1)	-0,111(3)	0,117(3)	0,315(3)	0,33(3)

\* Alc — спирт, Wat — вода, Ure — мочеви́на.

### Экспериментальная часть

Монокристаллы комплекса грамицидина S с мочевиной, пригодные для рентгеноструктурного анализа, выращены из водно-спиртового раствора антибиотика в форме хлоргидрата в присутствии HCl и мочевины.

Параметры элементарной ячейки ( $a=26,0$ ,  $c=21,5$  Å, пр. гр.  $P3_121$ ) были очень близки к указанным в работе [15]. Поскольку на воздухе кристаллы были нестабильны, для проведения эксперимента их запаковывали в кварцевый капилляр в присутствии маточной жидкости. Съемка проводилась на дифрактометре «Syntex-P2<sub>1</sub>»  $\omega/2\theta$ -методом, интервал  $\Delta\omega$ -сканирования  $0,32-0,45^\circ$ . Зарегистрировано около 4918 отражений в сфере разрешения до  $0,98$  Å. Для определения структуры использовано 4028 отражений.

Использованная нами исходная модель [15] включала 81 неводородный атом молекулы грамицидина S. Автоматическим методом последовательных приближений [31] выявлены позиции еще пяти пиков, которые были интерпретированы как две молекулы воды и одна молекула мочевины. Кроме того, последний синтез электронной плотности содержал много дополнительных пиков, интерпретация которых была затруднительна. Последовательное изотропно-анизотропное уточнение найденных атомов, построение разностных синтезов, выбор новых пиков по кристаллохимическим критериям с учетом возможного статистического заполнения позиций атомами воды и концевыми атомами S некоторых боковых радикалов и т. д. позволили определить параметры еще 18 атомов, в том числе и атомов растворителя (воды и этанола). Однако ионов хлора, присутствие которых можно было предположить исходя из условий кристаллизации, выявлено не было. Помимо атомов C, N и O на разностных синтезах были локализованы также 47 атомов H. Положения еще 26 атомов H рассчитаны геометрически. Все атомы H были уточнены изотропно. Заключительная величина  $R$ -фактора  $6,2\%$ .

Координаты атомов структуры и их тепловые параметры приведены в табл. 7.

Изучению тонких деталей структуры существенно помогло уточнение экстинкционного параметра. Это привело не только к снижению  $R$ -фактора (особенно для отражений с малыми  $\sin \theta/\lambda$ ), но и к значительному улучшению качества карты электронной плотности.

Для данной структуры особенно полезной оказалось использование процедуры полноматричного «каскадного» метода наименьших квадратов [32], реализованной в комплексе программ AREN. Суть ее состоит в следующем. Перед началом процесса уточнения программа вычисляет и запоминает в памяти ЭВМ  $F_{\text{выч}}$  по всем атомам структуры. Вследствие ограничений оперативной памяти ЭВМ процесс уточнения разбивается на этапы, в каждом из которых одновременно уточняется до 170 атомных параметров. В начале каждого этапа из предыдущих значений  $F_{\text{выч}}$  вычитаются вклады уточняемых атомов и добавляются вклады атомов, уточненных на предыдущем этапе. Затем в итерационном процессе вычисляются только величины, зависящие от атомов, уточняемых на данном этапе. Такая процедура позволяет уточнять полноматричными блоками многоатомные структуры на обычных персональных ЭВМ за разумное вычислительное время.

Все расчеты выполнялись с использованием комплекса программ AREN и ARENPC на ЭВМ EC-1045 и IBM-PC/AT соответственно [33].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gause G. F., Brazhnikova M. G. // Nature. 1944. V. 154. P. 703.
2. Ouchinnikov Yu. A., Ivanov V. T. // Conformational States and Biological Activity of Cyclic Peptides. Tetrahedron Report. Pergamon Press, 1976. № 1. P. 13-14.
3. Hodgkin D. C., Oughton B. M. // Biochem. J. 1957. V. 65. P. 752-756.
4. Warner D. T. // Nature. 1961. V. 190. P. 120-128.
5. Vanderkori G., Leach S. J., Nemethy G., Scott R. A., Scheraga H. A. // Biochemistry. 1966. V. 5. P. 2991-2997.

6. *Liquori A. M., DeSantis P., Kovacs A., Mazzarella L.* // *Nature*. 1966. V. 211. P. 1039-1041.
7. *Schmidt G. M. J., Hodgkin D. C., Oughton B. M.* // *Biochem. J.* 1957. V. 65. P. 744-752.
8. *Кокорин А. И., Замаараев К. И., Григорян Г. Л., Иванов В. Т., Розанцев Э. Г.* // *Биофизика*. 1972. Т. 17. С. 34-41.
9. *Тищенко Г. Н., Зыкалова К. А.* // *Кристаллография*. 1963. Т. 8. С. 561-569.
10. *Тищенко Г. Н., Зыкалова К. А., Силантьева Н. А.* // *Кристаллография*. 1964. Т. 9. С. 37-43.
11. *Тищенко Г. Н., Зыкалова К. А., Гребенко А. И.* // *Кристаллография*. 1967. Т. 12. С. 868-870.
12. *Тищенко Г. Н., Зыкалова К. А.* // *Кристаллография*. 1969. Т. 14. С. 270-274.
13. *De Santis P., Liquori A. M.* // *Biopolymers*. 1971. V. 10. P. 699-710.
14. *Hull S. E., Karlsson R., Main P., Dodson E. J., Woolfson M. M.* // *Nature*. 1978. V. 275. P. 206-207.
15. *MULTAN-78*. Main P., Hull S. E., Lessinger L., Germain G., Declercq J.-P., Woolfson M. M. // University of York, England, 1978.
16. *IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclature*. *Eur. J. Biochem.* 1970. V. 17. P. 193-201.
17. *Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T.* // *Proteins*. 1982. V. 5. P. 548.
18. *Dygert M., Go N., Scheraga H. A.* // *Macromolecules*. 1975. V. 8. P. 750-761.
19. *Lakshminarayanan A. V., Sasisekharan V., Ramachandran G. N.* // *Conformation of Biopolymers*. V. 1. London, New York: Acad. Press, 1967. P. 61-82.
20. *Stenkamp R. E., Jensen L. N.* // *Acta cryst.* 1975. V. B31. P. 857-865.
21. *Harada Y., Itaka Y.* // *Acta cryst.* 1977. V. B33. P. 247-249.
22. *Balasubramanian R., Lakshminarayan A. V., Sabesan M. N., Tegoni G., Venkatesan K., Ramachandran G. N.* // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1971. V. 3. P. 25-33.
23. *Ashida T., Kakudo M.* // *Bull. Chem. Soc. Japan*. 1974. V. 47. P. 1129-1133.
24. *Gurskaya G. V.* *The Molecular Structure of Amino Acides. Determination by X-Ray Diffraction Analysis*. Consultants Bureau, New York, 1968.
25. *Arnott S., Dover S. D., Elliott A. J.* // *J. Mol. Biol.* 1967. V. B30. P. 201-209.
26. *Тищенко Г. Н.* // *Итоги науки и техники. Кристаллохимия*. Т. 13. М., 1979. ВИНТИ, С. 194.
27. *Зефиоров Ю. В., Зоркий П. М.* // *Журн. структур. химии*. 1976. Т. 17. С. 994-998.
28. *Sholtz K. F., Solovjeva N. A., Kotelnikova A. V. et al.* // *FEBS Lett.* 1975. V. 58. № 1. P. 141-144.
29. *Шольц К. Ф.* // *Тез. докл. I Советско-Швейцарский симпозиум «Биологические мембраны. Структура и функции»*. Тбилиси, 1979. С. 87.
30. *Резник Г. И.* Действие меллитина и других мембраноактивных полипептидов на митохондрии печени крыс. Дис. канд. биол. наук. М., 1982.
31. *Андрянов В. И., Шибанова Т. А., Симонов В. Н.* // *Кристаллография*. 1987. Т. 32. С. 41-44.
32. *Андрянов В. И.* // *Кристаллография*. 1989. Т. 34. С. 1387-1391.
33. *Андрянов В. И.* // *Кристаллография*. 1987. Т. 32. С. 228-231.

Поступила в редакцию  
9.VIII.1991

G. N. TISHCHENKO, V. I. ANDRIANOV, B. K. VAINSHTEIN, E. DODSON\*

**GRAMICIDIN S CHANNELS: A NEW MECHANISM OF THE ION  
TRANSMEMBRANE TRANSFER (BASED ON THE HIGH RESOLUTION  
X-RAY STUDY OF THE ANTIBIOTIC)**

*Institute of Crystallography, Russian Academy of Sciences, Moscow;  
\* York University, York, England*

The crystal structure of the membrane-active antibiotic-cyclopeptide gramicidin S complex with urea was determined by the X-ray structure analysis. The gramicidin S molecule possesses an antiparallel  $\beta$ -structure, its slightly twisted, 30-membered cycle has a roughly rectangular form about  $4.8 \times 13.6$  Å in size, with the lesser side being formed by the main chain atoms of Phe and Pro residues. The maximum size of the molecule is 22.9 Å. A characteristic feature of the molecule is the position of the extended side chains of the Orn residues on one side of the molecular cycle in the form of



peculiar «legs -- tentacles». One of these legs is «fastened» by the intramolecular H-bond to O atom of the nearer Phe4 residue, the other being free. The distance between the terminal NE atoms of the Orn residues is 5.7 Å. The side chains of the Phe and Orn2 residues have *trans*-orientation, those of the Val, Orn7, Leu residues *gauche*-orientation. For Val1 and Leu3 side chains statistical disorder of the terminal C atoms is realized. The pyrrolidine rings of the Pro residues adopt  $C_s$ - $C^\beta$ -*exo* conformation. There are one urea and 20 water molecules per one antibiotic molecule in the structure. The positions of three water molecules are fully occupied, the others with the probability of 0.56–0.20. One of the «water» positions is occupied on 2/3 by water, and on 1/3 by the O atom of the alcohol. There is a complicated system of intra- and intermolecular H-bonds in the structure, with and without the participation of water, alcohol and urea molecules. The gramicidin S molecules, collecting around  $3_1$  axis according to the left-handed double helix, form the channels whose outside hydrophobic surface is built of the side uncharged radicals, the inside surface being built of the main chain atoms, mainly of the O and N atoms and of the ornithine «tails» with uncharged NE atoms at the termini. The outer diameter of the channel is 29–43 Å, inner (without ornithine «tails») is about 12.7 Å. At the expense of the change of these «tails» conformation, the inner diameter of the channel filled with water molecules may change from 3.4 up to 6.3 Å. Thus, the ions and particles of a rather large size may pass through the channel. The gramicidin channels are discovered and described for the first time. The channels in the crystal structure are close-packed under the hexagonal law. The  $Cl^-$  ions, present in the mother solution in a large amount, are not found in crystals, which points to the absence of charges on the terminal NE atoms of the Orn residues. The explanation to this unusual phenomenon is given.