

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ С МОДЕЛЬНЫМИ МЕМБРАНАМИ¹

Ермакова Е.А., Зуев Ю.Ф.

КИББ КазНЦ РАН

420111, г. Казань, Р.В. 30, e-mail: ermakova@kibb.knc.ru

Антимикробные пептиды (АМП) являются важным компонентом иммунной системы и вызывают значительный интерес как новый потенциальный класс природных антибиотиков и иммунорегуляторных соединений. В то же время механизм действия АМП остается неизвестным. На данный момент существует несколько теорий взаимодействия АМП с мембранами. Согласно первой модели, антимикробные пептиды встраиваются в мембраны, образуют в них поры, что способствует лизису клетки. Согласно второй модели, антимикробные пептиды образуют “ковровое покрытие” на поверхности мембраны, при этом меняется электростатический потенциал мембраны и ее свойства, что также приводит к гибели клетки. В данной работе для исследования взаимодействия представителя катионных антимикробных пептидов - дефензина сосны с модельными мембранами использован метод молекулярной динамики.

Материалы и методы

Дефензин сосны – небольшой катионный белок, структура которого была недавно расшифрована и охарактеризована нами [1,2], состоит из 50 аминокислотных остатков и имеет $\beta_1\alpha\beta_2\beta_3$ структуру, характерную для растительных дефензинов. Дефензин обладает сильным положительным зарядом и сложным распределением заряженных и гидрофобных остатков на поверхности белка [2].

Для моделирования были использованы два типа мембран: мембрана (M1), состоящая из одного типа липидов – 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (ПОФХ), и комбинированная мембрана (M2), содержащая фосфатидилхолин и 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилглицерин (ПОФГ) в молярном соотношении 3:1 (ПОФХ: ПОФГ).

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Республики Татарстан, грант № 15-44-02309а

В мембране M1 512 молекул фосфатидилхолина образовали бислоем, каждый слой которого содержал 256 липидов. Каждый слой модели M2 содержал 192 молекулы фосфатидилхолина и 64 молекулы фосфатидилглицерина. Каждая модельная мембрана была помещена в расчетную ячейку с водой размером 13x13x17 нм. Соответствующее количество противоионов было добавлено в каждую систему для ее нейтрализации. В исходной конфигурации дефензин был расположен на расстоянии 4 нм от поверхности мембраны. На рис. 1 показана мембрана M1 и ориентация белка (показана вторичная структура белка, дефензин представлен в синем цвете) относительно поверхности мембраны в момент времени $t=0$. Молекулы воды и ионы не показаны на рис. 1.

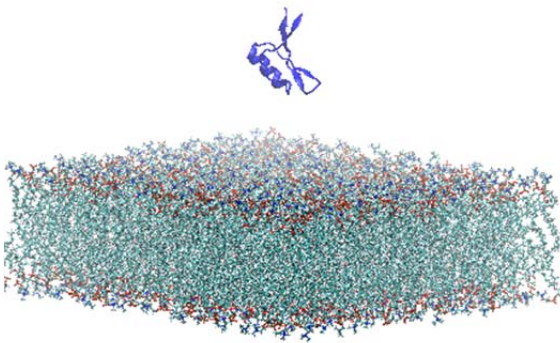


Рис. 1. Структура комплекса дефензин-мембрана M1 в момент времени $t=0$.

Метод молекулярной динамики (coarse-grained md) с использованием силового поля MARTINI [3] был применен для построения траекторий движения и анализа взаимодействия дефензина с модельными мембранами. Расчет выполнен с помощью программы GROMACS [4].

После стандартной процедуры минимизации энергии системы (5000 шагов) и достижения равновесия в течение 2.5 наносекунд была построена траектория длиной 5-6 микросекунд. Моделирование проведено для NPT ансамбля при температуре 303°K, временной шаг интегрирования равен 20 фемтосекунд, между всеми компонентами системы рассчитывалась энергия электростатических взаимодействий и взаимодействий ван-дер-Ваальса.

Результаты и обсуждение

Рис. 2 показывает, как меняется расстояние между дефензином и поверхностью мембран со временем. Дефензин слабо взаимодействует с мембраной ПОФХ (голубая линия), он свободно двигается в водной среде, достаточно часто подходит к поверхности мембраны на расстояние 0.5 нм, но не связывается

с поверхностью мембраны, и расстояние между белком и поверхностью мембраны меняется в диапазоне 0.5 - 5 нм.

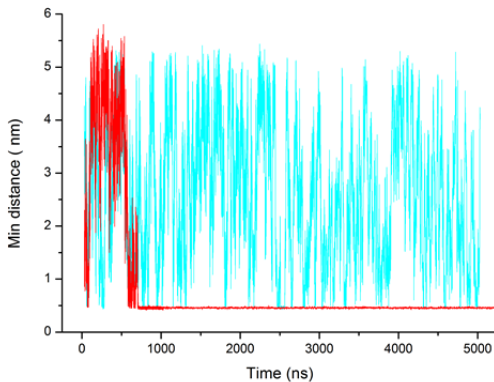


Рис. 2. Изменение минимального расстояния между белком и поверхностью мембраны M1 (голубая линия) и между белком и поверхностью мембраны M2 (красная линия) со временем.

комплекс.

Для того чтобы охарактеризовать движение белка относительно поверхности мембраны, были рассчитаны главные моменты инерции белка и проанализировано изменение их ориентации во времени. Анализ ориентации молекулы дефензина относительно поверхности мембраны показывает, что в течение первых 700 нс дефензин свободно вращается в водном растворе, а при взаимодействии с поверхностью мембраны дефензин имеет две преимущественные ориентации с разным временем жизни. Первая ориентация характеризуется почти параллельной ориентацией главного момента инерции белка относительно поверхности мембраны со средним временем жизни порядка 1 мс (комплекс типа 1). Во второй ориентации главный момент инерции дефензина расположен почти параллельно нормали к плоскости мембраны и перпендикулярно плоскости мембраны (комплекс 2). Среднее время жизни комплекса 2 составляет 1.5 - 2.5 мс.

Красная линия на рис. 2 показывает минимальное расстояние между дефензином и комбинированной мембраной ПОФХ:ПОФГ. В течение примерно 700 нс дефензин свободно двигается в ячейке с водой, затем связывается с поверхностью мембраны M2 и скользит по поверхности мембраны в течение нескольких микросекунд, при этом он не встраивается глубоко в мембрану, но образует с ней устойчивый

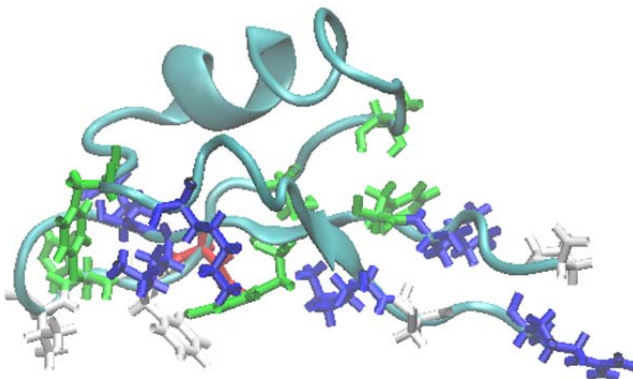


Рис. 3. Аминокислотные остатки дефензина, взаимодействующие с мембраной M2 в комплексе типа 1.

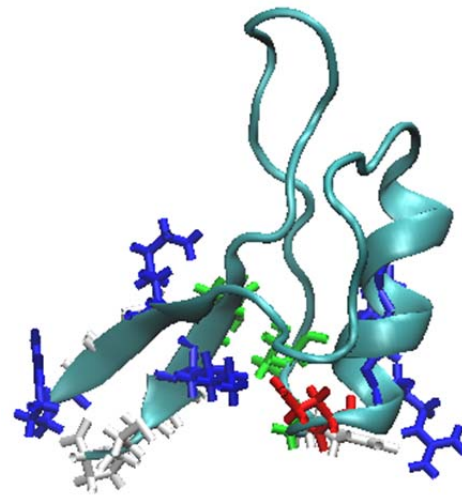


Рис.4. Аминокислотные остатки дефензина, взаимодействующие с мембраной M2 в комплексе типа 2.

Анализ энергии взаимодействия аминокислотных остатков белка с мембраной M2 показал, что для комплекса типа 1 аминокислотные остатки дефензина Arg1, Met2, Cys3, Lys4, Lys11, Tyr13, Gly17, Phe21, Thr31, Ser33, Asp35, Phe36, His37, Val38, Ala39, Arg41, Lys42, Tyr44, Tyr46, Lys47, Cys49, Pro50 дают наибольший вклад в энергию взаимодействия с мембраной. Рис. 3 показывает аминокислотные остатки дефензина, взаимодействующие с мембраной M2 в комплексе типа 1, положительно заряженные аминокислотные остатки показаны синим цветом, отрицательно заряженные остатки – красным цветом, полярные и гидрофобные остатки – зеленым и белым цветом, соответственно. Дефензин имеет 9 положительно заряженных остатков, 6 из которых взаимодействуют с мембраной в комплексе 1.

В комплексе типа 2 аминокислотные остатки дефензина Arg1, Met2, Lys4, Lys 21, Arg25, Thr26, Phe29, Pro30, Thr31, Tyr46, Lys47, Pro48, Cys49, Pro50 дают наибольший вклад в энергию взаимодействия с мембраной (рис.4, цвета аминокислотных остатков соответствуют рис.3). Пять положительно заряженных остатков участвуют в образовании комплекса 2.

Комплекс 1 энергетически более выгоден, чем комплекс 2. В обоих типах комплексов N- и C- терминальные остатки дефензина взаимодействуют с мембраной. В комплексе 2 аминокислотные остатки петли, соединяющей бета2 и бета3 стренды, не взаимодействуют с мембраной. Известно [5], что для многих

растительных дефензинов аминокислотные остатки, расположенные на этой петле, определяют антимикробную и фунгицидную активность дефензинов.

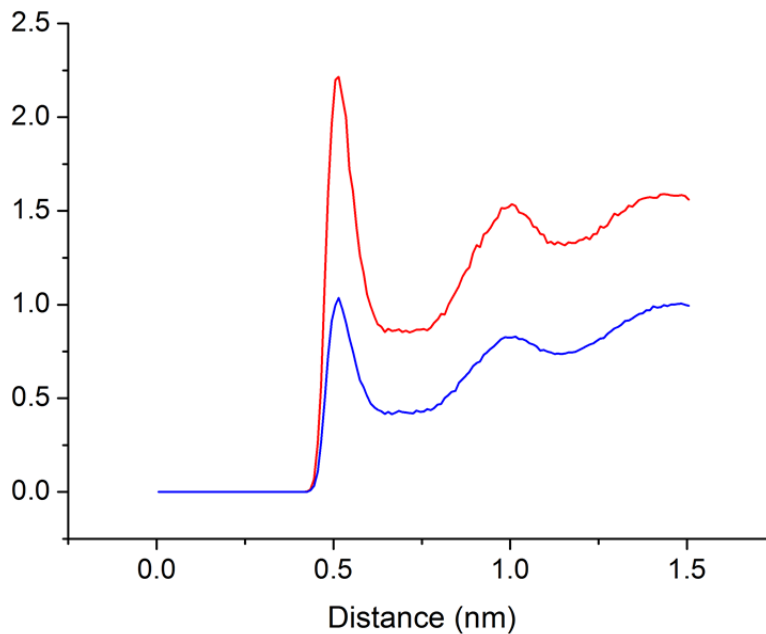


Рис. 5. Функция радиального распределения липидов (ПОФГ – красная линия, ПОФХ – синяя) относительно молекулы дефензина.

Анализ энергии взаимодействия белка с различными компонентами мембраны M2 показывает, что дефензин сильнее взаимодействует с молекулами фосфадитилглицерина, чем с молекулами фосфатидилхолина, несмотря на то, что электростатическое взаимодействие дает относительно небольшой вклад в энергию липид-белкового взаимодействия и количество молекул ПОФХ в мембране в три раза превышает количество молекул ПОФГ. Функция радиального распределения липидов относительно молекулы белка (рис.5) показывает, что вероятность обнаружить молекулу фосфатидилглицерина вблизи молекулы белка (на расстоянии примерно 0.5 нм) выше, чем молекулу фосфатидилхолина. Несмотря на то, что дефензин не встраивается глубоко в мембрану, он меняет структуру мембраны, делает ее менее однородной, создавая зоны с различным электростатическим потенциалом.

Заключение

Метод молекулярной динамики применен для исследования взаимодействия антимикробного пептида – дефензина сосны с двумя модельными мембранами. Показано, что дефензин не взаимодействует с мембраной из фосфати-

дилхолина, но образует устойчивый комплекс с комбинированной мембраной, состоящей из фосфатидилхолина и фосфатидилглицерина. Анализ молекулярно-динамической траектории продолжительностью несколько микросекунд показал, что при температуре 303K° дефензин не образует пор в комбинированной мембране (ПОФХ:ПОФГ) и не встраивается в мембрану, а находится на ее поверхности, при этом меняется структура мембраны.

Литература

1. B.I. Khairutdinov, E.K. Bessolicina, S.V. Efimov, Y.Y. Toporkova, N.B. Tarasova, E.A. Ermakova, Y.F. Zuev, Investigation of structural-dynamics properties of scots pine defensin 1 by NMR spectroscopy, International symposium «Magnetic resonance: from fundamental research to practical applications», Book of abstracts, Kazan, 2016, p.186.
2. E.A. Ermakova, D.A. Faizullin, B.Z. Idiyatullin, B.I. Khairutdinov, L.N. Mukhamedova, N.B. Tarasova, Y.Y. Toporkova, E.V. Osipova, Y.V. Gogolev, Y.F. Zuev, I.V. Nesmelova (2016) Structure of scots pine defensin 1 by spectroscopic methods and computational modeling, Intern. J. Biol. Macromol. 84:142-152.
3. Y. Qi, H.I. Ingólfsson, X. Cheng, J. Lee, S.J. Marrink, W. Im (2015) CHARMM-GUI Martini Maker for Coarse-Grained Simulations with the Martini Force Field. J. Chem. Theory Comput. 11:4486-4494.
4. B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Lindahl (2008) GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation, J. Chem. Theory Comput. 4:435-447.
5. N.Y. Yount, M.R. Yeaman (2004) Multidimensional signatures in antimicrobial peptides, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 7363-7368.