# Структура грамицидинового канала, его фундаментальное и практическое значение.

# Оглавление

# Введение

# Химическая природа грамицидина А и его общие свойства

1. Биологическая роль грамицидина А
2. Структура грамицидина А

**4.1** Конформации грамицидина А в органических растворителях

**4.2** Структура грамицидина А в липидных мембранах и мембрано- подобных средах

**4.3** Влияние связывания катионов на конформацию грамицидина А

**4.4** Взаимоотношения между конформационными состояниями грамицидина А и проводящими формами.

**4.5** Инженерия грамицидинового канала

1. Фундаментальное и практическое значение грамицидина А
2. Выводы
3. Список использованной литературы

**1. Введение**

Грамицидин А известен уже более 50 лет, но до сих пор остается в центре внимания. Являясь очень простым по своей химической структуре (всего 15 аминокислот) он обладает свойством образовывать ионселективный трансмембранный канал, не уступающий по характеристикам огромным по сравнению с ним белковым каналам, которые представлены, например, в нервной системе. Возможно, он является предшественником этих самых каналов и за время эволюции “оброс” всевозможными сенсорами напряжения, селективными фильтрами и другими регуляторными элементами. Если продолжать такое сравнение, то в плане детальной трехмерной структуры так мы пока не знаем ни один другой ионный канал, и применение грамицидина А для построения всевозможных моделей и теоретических исследований стало одним из путей к детальному пониманию различных молекулярных механизмов и структурно-функциональных взаимодействий. И, пожалуй, грамицидин А является одной из лучших таких моделей.

# 2. Химическая природа грамицидина А и общие свойства

.

Грамицидин А входит в группу линейных полипептидов, продуцируемых бактериями *Bacillus Brevis*, на стадии спорообразования. Выделяют несколько особенностей данной группы пептидных антибиотиков:

1. Все 15 аминокислот входящие в состав последовательности грамицидинов являются гидрофобными;
2. В их последовательности наблюдается чередование L- и D- конфигураций аминокислот;
3. С - и N- конец грамицидинов блокированны с помощью этаноламина и формила соответственно.

Природня смесь (грамицидин D) состоит из трех основных компонентов, отличающихся одной аминокислотой в 11 положении, . Согласно этому отличию грамицидины классифицируют на: грамицидин А - в 11 положении Trp, грамицидин B - в одиннадцатом положении - Phe, и грамицидин С - в одннадцатом положении - Tyr.

Общая последовательность грамицидинов :

HCO-(L)Val-Gly-(L)Ala-(D)Leu-(L)Ala-(D)Val-(L)Val-(D)Val-(L)Trp-(D)Leu-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

X-(D)Leu-(L)Trp-(D)leu-(L)Trp-NH2CH2CH2OH

11 12 13 14 15

где Х= L-Trp для грамицидина А,

L-Phe для грамицидина В,

L-Tyr для грамицидина С.

Грамицидин А, В и С представленны в соотнощении 85:5:15 соответственно. Ко всему прочему имеется некоторая гетерогенность по первой аминокислоте: в природной смеси 90% грамицидинов имеют в первом положении Val, в то время как остальные 10% имеют Ile. Большинство начальных исследований было проведенно на этой 6-ти компонентной смеси.

Грамицидин К – имеющий ковалентно присоеденную жирную кислоту к С-концу так же был выделен в различных соотношениях, в зависимости от метода выделения.

Грамицидин S ( Советский ), так же продуцируется видом *Bacillus Brevis*, но является циклодекапептидом и действует по механизму ионного переносчиика (транспортера), и таким образом эта молекула не имеет отношения к линейным грамицидинам ни структурно, ни функционально.

Благодаря тому, что в последовательности грамицидина А нет ни одной заряженной аминокислоты и блокированны N- и С-конец (таким образом исключается возвожность образования цвиттер-иона при любых значениях рН), эта молекула практически нерастворима в воде ( меньше 10 мг в литре), но за то имеет сильное сродство с гидрофобному региону липидной мембраны. Грамицидин А слабо растворим в углеводородах, за то сильно во многих низших спиртах, органических кислотах и других органических растворителях, таких как: диметилсульфоксид, ацетон, диоксан и трифторэтанол. Он так же может быть растворенн в воде в присутствии лизолецитина, ганглиозидов, додецилсульфата натрия и некоторых других детергентов.

Начальные исследования грамицидина были проделанны на природной смеси, но после выяснения состава данной смеси дальнейшие эксперименты проводились на грамицидине А, как основном компоненте природной смеси.

# 3. Биологическая роль грамицидина А

Грамицидин играет важную роль в процессе спророобразования у *Bacillus brevis*, определяя формирование нормальных спор. Показано, что штаммы, деффекные по синтезу грамицидина формируют споры с повышенной термочуствительностью. Грамицидин А спецефически ингибирует экспрессию отдельных (вегетативных) генов, определяя, таким образом, переход микроорганизма в покоящуюся стадию. Механизм такой регуляции до конца не ясен, но известно, что грамицидин А препятствует образованию комплекса РНК-полимеразы с ДНК, необходимого для инициации транскрипции. Предложенно две мишени связывания грамицидина: 1) грамицидин А специфически связывается с определенным участком ДНК и препядствует транскрипции. Такой механизм похож на действие другого пептидного антибиотика - тироцидина, так же синтезируемоего *Bacillus brevis,* который, связываясь с молекулой ДНК, препятствует образованию комплекса РНК-полимераза/ДНК, и как следствие ингибирует экспрессию определенных генов; 2) грамицидин А связывается с определенным участком РНК-полимеразы, чо приводит к изменению ее конформации и невозможностью связывания с ДНК .

Возможно грамицидин А учавствует в сложном каскаде биохимических процессов вместе с другими антибиотиками (тироцидины−серия циклических пептидов, так же синтезируемых видом *Bacillus brevis* на стадии спорообразования), результатом которых является переход от вегетативного роста к споре.

Линейные грамицидины обладают антибиотическим и спермицидным эффектом направленным против грамположительных бактерий. Антибиотический эффект грамицидина определяется его способностью обрзовывать трансмембранный ионный канал, при чем этот эффект носит бактериостатический характер, что, по-видимому связано с истощением запасов АТФ, в организме на который действует грамицидин, который использует Na-K-АТФаза для востановления ионного градиента .

# 4. Структура грамицидина А

Не смотря на довольно простую первичную последовтельность грамицидина, определение природы его трехмерной структуры, не было стремительным и быстрым. Из-за его небольших размеров и, как следствие, сильной подвижности грамицидин, в зависимости от окружения, может существовать в виде семейства конформаций. Выделяют два основных типа структуры грамицидина: 1) Семейство двойных спиралей, предложенных Витчом (1974, [10] ) и существующих в органических растворителях; 2) Семейство одиночных спиралей, предложенных Урри [11] и существующих в липидных мембранах.

В связи с необычностью химической структуры грамицидина, связаной с чередованием конфигураций входящих в его последовательность аминокислот стандартная номенклатура не может быть применена для данной модели, так как грамицидин не формирует ни одного типа структур, имеющихся в глобулярных белках.

Анализируя спектры КД грамицидина, а так же основываясь на теоретических расчетах конформационных энергий Урри и сотр. (1971 г. [11]) постулировали существование особой вторичной структуры, названной π4(L,D)-спиралью, являющейся гибридом 4,416 и 4,314 спиралей (4,4 – количество остатков на виток, 16 – количество атомов в витке). Рамачандран и Чандрасекаран [12], базируясь в основном на конформационно-энергетических взаимодействиях независимо обнаружили такую же вторичную структуру. Позже Урри и сотр. [13] предложили другую модель конформации грамицидина - π6(L,D) спираль, имеющую 6,3 остатка на виток и центральную полость размером 4 Ǻ, которая больше подходит для связывания и транспорта катионов, чем полость в 1,4 Ǻ, имеющаяся в π4(L,D) спирали. Димер полипептидных цепей, ассоциированных конец к концу (N-конец к N-концу, С-конец к С-концу или N-конец к С-концу) с конформацией π6(L,D) спираль имеет размер 25-30 Ǻ и, таким образом, может пронизывать липидный бислой и образовывать трансмембранный канал (Рис1А). Каждая спираль стабилизируется 12-ю внутримолекулярныму водородными связями, а димер (при любых способах ассоциации) – при помощи 6-ти межмолекулярных водородных связей.

Альтернативной структурой, предложенной Витчом и сотр в 1974 году [10] , является двойная π - спираль, в которой два мономера закрученны друг на друга. Ассоциация между мономерами в такой спирали может быть как параллельной (↑↑), так и антипараллельной (↑↓). Расположение водородных связей в двойных спиралях грамицидна такое же как и в β-слое, который, как было предположенно, и образуется сначала между двумя молекулами грамицидина, а затем сворачивается в спираль. Витч и сотр. Так же предложили, что такие спирали с 6-7 остатками на виток будут иметь размеры, подходящие для пронизывания липидного бислоя и транспорта ионов. Дальнейшие исследования такого типа моделей показали возможность существования антипараллельных двойных спиралей с 5,6 и 7,2 остатка на виток (рис1Б).

Рисунок 1.

Схематическое изображение спиральных димеров (структура Урри) (**А**) и двухспиральных димеров (структура Витча) (**В**) грамицидина.

Название π-спираль, предложенное вначале для описания конформаций грамицидина было не совсем корректным, так как это название обычно используется для 4,416-спиралей, имеющих типичную ориентацию водородных связей ( все амидные группы пептидного остова в данной структуре обращены в оддну сторону, что в результате дает сильный суммарный диполь) , в то время как спирали предложенные для грамицидина не имеют такую геометрию (аминогруппы пептидного остова имеют различное направление, не образуя, таким образом, диполь). Ко всему прочему значения углов φ и ψ, расчитанные для данных структур, отличаются от таковых в π-спиралях описанных Рамачандраном и Рамакришнаном [14]. Таким образом предложили называть такие структуры β-спиралями, что лучшим образом определяет образование водородных связей.

Не смотря на явные различия двух предложенных структур, спиральные димеры (β-спирали) и двухспиральные димеры (ββспирали) имеют много общего и могут образовывать структуры почти идентичных размеров, и, более того, способ образования водородных связей одинаков в обоих случаях. Первичная последовательность грамицидина не делает жестких ограничений для направления закручивания спиралей, и они могут быть как право- , так и левозакрученными. Этот потенциальный полиморфизм связан с тем, что чередование L- и D-аминокислот не накладывает жестких ограничений на направление закрутки спирали. Так же, в обоих типах предложенных структур, боковые цепи аминокислон располагаются с наружней стороны спирали и ни одной боковой цепи нет во внутренней полости. В результате внутренняя полость (пора ) данных спиралей намного больше таковой для α-спиралей. Это связанно с природой β-слоя: в последовательностях имеющих только L-аминокислоты, при образовании β-слоя боковые цепи обращены поочередно в разные стороны от плоскости слоя, а в случае чередования L- и D-аминокислот все боковые радикалы будут обращены в одну сторону от плоскости β-слоя и , таким образом при сворачивании такой структуры в спираль они все окажутся снаружи, а внутри образуется пора , выстланная карбонильными группами пептидных связей, способная пропускать воду и ионы.

**2.3.Конформация грамицидина А в растворе**

Грамицидин принимает несколько типов конформаций в органических растворителях. Витч и сотр. [10, 15, 16] обнаружили, что диоксане грамицидин существует в виде 4-х различных форм, переходящих друг в друга и находящихся в медленном равновесии (время перехода одной формы в другую измеряется часами). Все четыре формы были разделены методом тонкослойной хроматографии, при чем каждая отдельная форма, выделенная с тонкослойной пластинки и нанесенная заново, опять проявлялась в виде четырех пятен. Различные формы не показали различий в первичной структуре. Данные осмометрии и флуресценции [16], показали, что каждая из четурех форм является димером. Методом ИК-спектроскопии [10] было показанно, что все формы являются двойными спиралями, при чем формы 1,2 и 4 ( пронумерованны согласно их хроматографической подвижноси) являются параллельными двойными спиралями, а форма 3 – антипараллельной двойной спиралью [10]. Каждый из видов имеет характерный КД-спектр, дающий информацию о направлении закручивания спирали. Так как спектры видов 1 и 2 имеют одинаковую форму, Витч и сотр. предложили, что они имеют одинаковое направление закручивания [10]. Формы 1,2 и 3 имеют отрицательную эллиптичность в области 205-240 нм, направление закручивания спиралей является противоположной по сравнению с видом 4, форма спектра которого представляет собой зеркальное отображение видов 1,2 и 3.

Спектр грамицидина, полученный сразу после растворения кристаллов представляет собой спектр формы 3 [10]. Спектр равновесной смеси форм представляет собой наложение спектров отдельных форм, но за счет того, что спектры 1,2 и 4 практически взаимовычитают друг друга, он имеет форму вида 3 , даже если она находиться в незначительном количестве по отношению к другим.

КД спектроскопия не дает детальной информации о конформации каждой структуры, из-за того, что φ и ψ углы в β-спиралях отличаются от таковых в α-спиралях, β-слоях и β-поворотах, что делает сравнение данных спектров со спектрами других белков не эффективным.

Эти структуры были подтвержденны методом двумерного ЯМР [18], и показали что грамицидин в этаноле так же существует в виде 4-х взаимопревращаемых конформаций . Виды 1 и 2 являются левозакрученными параллельными двойными спиралями с 5,6 аминокислотного остатка на виток. Они отличаются взаимным расположением цепей и имеют одинаковый шаг спирали и высоту. Вид 2 имеет менее упорядоченные концы спирали обусловленные сдвигом на три аминокислотных остатка [17].

Вид 4 представляет из себя правозакрученной параллельной двойной спиралью, с таким же взаимным расположением цепей и высотой спирали что и вид 1 (это обуславливает форму его спектра КД, являющуюся зеркальным отображением видов 1 и 2).

Вид 3 (форма, образующаяся сразу после растворения кристаллов грамицидина) является левозакрученной антипараллельной двойной спиральюс 5,6 остатка на виток и сдвигом на три аминокислотных остатка. Эта форма является наиболее термодинамически выгодной в кристаллическом состоянии (рис.2) [19].

Рисунок 2. СРК Изображение левозакрученного антипараллельного двухспирального димера грамицидина с 5,6 остатка на виток (PDB Code: 1ALX). А – вид сверху; Б – вид сбоку. Две молекулы грамицидина в димере показанны разными цветами. Водороды скрыты.

Все описанные спирали стабилизирются 28-ю межмолекулярными водородными связями, не имеют внутримолекулярных водородных связей и совпадают с модельными , предложенными Витчом и сотр [10].

Грамицидин образует такую же смесь конформаций в различных спиртах, этилацетате [6] , и, хотя, время взаимоперехода в этих растворителях меньше

[20] , множественность структур все же удается зарегестрировать методом ЯМР [18].

Исследования грамицидина в растворе DMSO показали, что он находится в виде мономера, и обнаруживается в виде одного пятна на тонкослойной пластинке [16] . Методом ЯМР было показано, что в DMSO грамицидин находится в быстром равновесии между неупорядоченной конформацией и различными спиралями, имеющими другую форму, чем описанные выше [21].

В трифторэтаноле грамицидин представляет собой мономер [22] , а форма спектра КД больше похожа на спектр грамицидина в мембране [23] , и, таким образом, представляет из себя еще один вид трехмерной структуры грамицидина.

Таким образом, грамицидин существует в различных конформациях, в зависимости от растворителя, и даже в виде набора нескольких конформаций в одном растворителе. Такой полиморфизм можно объяснить похожими энергиями стабилизации различных структур, обусловленных различной сетью водородных связей.

**2.4.Структура грамицидина в липидных мембранах и мембрано-подобных средах**

Спектр КД встроенного в липидный бислой грамицидина не похож ни на один спектр, полученный в различных органических растворителях [24]. Более того данный спектр нельзя представить как сумму какой либо комбинации спектров растворов грамицидина, и, следовательно, как комбинацию каких-то конформаций обнаруженных в растворах. Форма КД спектра мембрансвязанного грамицидина остается неизменной в широком диапазоне температур. С другой стороны, основываясь на данных только спектров КД нельзя сказать, существует ли грамицидин в какой-то одной форме, или же имеется набор конформеров.

Изученные методом ЯМР 13С и 19F меченые грамицидины, встроенные в липосомы [25-27] , показали существование одной доминирующей структуры в мембранах.

Спектр КД мембрансвязанного грамицидина в области дальнего ультрафиолета имеет форму похожую на экситонное расщепление, свидетельствующую о стэкинг взаимодействиях триптофанов в данном окружении [28]. Экситонное расщепление так же наблюдается в области ближнего ультрафиолета [18] . что свидетельствует о внутримолекулярных взаимодействиях (Такого экситонного расщепления не наблюдается в растворах, что является еще одним подтверждением разности конформаций в мембране и в растворе). Другие методы [29, 30] так же подтверждают наличе стэкинг вззаимодействий в мембрансвязанной форме. Данные результаты свидетельствуют о различии в конформации как полипептидного остова, так и в ориентации боковых цепей между мембрансвязанной конформацией и формами, существующими в растворах.

Синхронные исследования флуресценции и проводимости в черных липидных мембранах [31] и в липосомах [32] показывают, что проводящая форма грамицидина является димером. В исследованиях с одиночными каналами (при соотношении грамицидин/липид около 1:10000), регистрация открывания и закрывания канала соотносится с равновесием мономер-димер (Рис.3)

Грамицидин так же образует комплексы с такиими детергентами как лизолецитин [33] , и додецилсульфат натрия [34]. Исследования таких комплексом методом электронной микроскопии (метод замораживания-скалывания) свидетельствуют о наличии мультиламелярной фазы детергента, в то время как с другими белками и пептидами эти детергенты формируют типичную мицелярную фазу , более того данные 15Р и 2Н ЯМР, а так же дифракции ренгеновских лучей при малом угле демонстрируют, что амфифильные группы молекул детергента имеют бислой-подобную организацию. Этот пример – хорошая демонстрация влияния грамицидина на организацию окружающих его молекул липида [35]

Так как детергент в комплексе с грамицидином оразует мембраноподобные структуры, можно предположить, что трехмерная структура грамицидина в данной системе такая же, как и в бислойных мембранах, хотя другие небольшие пептиды часто имеют различную структуру в мицеллах и в липидных бислоях.

Мембрансвязанная форма грамицидина представляет собой спиральный димер, что было подтвержденно различными химическими и физическими методами. Данные ЯМР-спектроскопии с использованием 13С и 19F меченных грамицидинов встроенных в липосомы показали наличие структуры в которой N-конец молекулы расположен посередине бислоя , а С-конец ориентирован наружу [25, 26, 27 ]. ЯМР в твердом теле (ориентированные мультиламелярные бислои ) обнаружил такую же структуру [36]. Изучение проводимости аналогов грамицидина в черных липидных мембранах покзали что модифицированные по С-концу аналоги способны образовывать активные каналы только при добавлении их с двух сторон мембраны и не образуют их при добавлении с одной стороны мембраны. Так как заряженные молекулы не могут переходить с одной стороны мембраны на другую – это явилось еще одним подтверждением того, что мембрансвязанная форма является спиральным димером N-конец к N-концу

В спиральном димере N-конец к N-концу каждый мономер стабилизирован 12-ю внутимолекулярными водородными связями, а димер – 6-ю межмолекулярными водородными связями, в образованиии которых принимают участие N-концевые формильные группы. Предложенно, что открывание и закрывание канала связанно с ассоциацией и диссоциацией ( то есть с образованием и разрывом межмолекулярных водородных связей) такого ддимера [37] (РИС).

Рисунок 3.

Схематическое изображение инактивации грамицидинового канала путем диссоциации димера голова к голове (структура Урри – Арсеньева).

Изучения аналогов грамицидина показали, что N-коцевая формильная группа оказывает сильное влияние на стабильность димера [38]. При ее замещении на более объемную ацетильную [39], сукцинильную [40] или при отсутствии вообще время жизни канала уменьшается. Исследования методом КД-спектроскопии показали сильные конформационные различия между нативным грамицидином и его аналогами, что, возможно является причиной дестабилизации канала [41].

Дальнейшие исследования с помощью 13С- и 15N-меченных аналогов в ориентированных мультиламелярных бислоях показали возможность существования праозакрученной конформации канала [24].

Наиболее детальная структурная конформация грамицидина была определенна методом двумерного ЯМР в комплексе грамицидина с додецилсульфатом натрия (Арсеньев и сотр. 1985 г.). Данная структура представляет собой спиральный димер, в котором каждая составляющая спираль имеет 6,3 остатка на виток (β6,3-спиральный димер) (Рис.4.)

### А Б

Рисунок 4.

СРК Изображение правозакрученного спирального димера грамицидина с 6,3 остатка на виток (PDB Code: 1GRM). A – вид сверху; Б – вид сбоку. Две молекулы грамицидина в димере показанны разными цветами. Водороды скрыты.

. Дальнейшие исследования показали что одна пара остатков Trp (9Trp и 15Trp ) могут находиться в стэкинг взаимодействиях [41]. Более того, теоретические расчеты показали, что наиболее энергетически выгодной структурой в мембране является именно β6,3-спиральный димер, в котором остатки триптофана образуют кластеры на границе раздела фазы липид-вода, и их азоты индoльных групп способны взаимодействовать с полярными головками липидов и с молекулами воды. В двухспиральной конформации остатки триптофана расположенны равномерно по внеешней поверхности спирали и только два из них (в отличие от четырех в β6,3спиральном димере) могут взаимодействовать с молекулами липидов или водой. Таким образом, двухспиральная конформация энергетически дестабилизиированна в мембране по отношению к спиральному димеру [41] (рис.5).

**А Б В**

Рисунок 5 Положение боковых радикалов остатков триптофана в различных конформерах грамицидина. Вид сбоку.

Боковые радикалы триптофанов выделенны синим цветом. А – β6,3-спиральный димер (Структура Урри-Арсеньева, наблюдаемая в мембранах); Б – ββ5,6-двухспиральный димер (Структура Витча, наблюдаемая в органических растворителях); С – β7,2-двухспиральный димер (структура комплекса грамицидина с ионом цезия в органических растворителях и кристаллах)

Спектроскопические исследования грамицидина в различных мембранах показали, что соотношение спиральных и двухспиральных димеров является функцией степени ненасыщенности липидов, образующих мембрану. При увеличении доли ненасыщенных липидов увеличивается доля двухспиральной конформации. Эти результаты говорят о том, что боковые цепи триптофанов могут взаимодействовать с С=С связями [42]. Модельные исследования в кобинации с экспериметами по изучению липид – пептидных взаимодействий так же подтверждают важность этих аминокислот для стабилизации канальной структуры и оказывают влияние на организацию окружающих грамицидин липидов [ 17]

В результате (в 90% случаев) грамицидин образуе активный трансмембранный канал одной единственной структуры, являющейся β6,3-спиральным димером. Эта структура аналогична модели предложенной ранее Урри [12].

**2.5.Влияние связывания ионов на конформацию грамицидина**

Грамицидин способен транспортировать одновалентные катионы через фосфолипидные мембраны [43].Его разная селективность по отношению к различным представителям группы щелочных металов определяется как размером конкретного иона, так и значением его энергии гидратации. Относительные константы афинности с натрием, калием, рубидием, цезием и талием были исследованны с помощью метода регистрации одиночных каналов [44], изучения аналогов грамицидина [45],равновесного диализа [46], ЯМР [47], проводимости воды [48] и показали, что константа связывания талия на порядок меньше чем цезия и на два порядка меньше чем натрия. Дальнейшие исследования показали, что с каналом одновременно могут связываться два иона, причем константа связывания первого катиона больше чем второго [49], что видимо, связано с электростатическим отталкиванием.

Двухвалентные катионы блокируют проведение одновалентных [39] и нетранспортируются грамицидиновым каналом. Последние исследования [49] показали, что частично дегидратированный двухвалентный катион связыватся с грамицидином с большей энтальпией чем одновалентный. Таоке сильное взаимодействие является следствием низкой подвижности двухвалентных катионов в грамицидиновом канале.

Связывание анионов с грамицидиновым каналом не было продемонстрированно, хотя существуют некоторые доказательства их проводимости и влияния на транспорт катионов [44].

Взаимодеиствие грамицидина с одновалентными катионами оказывает слабое влияние (или вовсе не влияет) на форму его спектра КД [50], и, таким образом, на конформацию грамицидина.

Комплексы грамицидина с лизолецитином так же связывают катионы, они были использованны для определения констант связывания [51] и локализации сайтов связывания. В данной системе наблюдается изменение формы спектра КД при связывании катионов (в отличие от комплекса с додецилсульфатом натрия, где такой эффект отсутствует), что свидетельствует об изменении конформации при таком взаимодействии [52].

В органических растворителях наблюдается сильное изменение структуры грамицидина при связывании с катионом , что демонстрируется изменением как формы, так и амплитуды спектра КД.

При исследовании связывания цезия с грамицидином в растворе наблюдается постепенное изменение формы спектра КД, что свидетельствет о плавном переходе из формы свободного грамицидина в ион-связанною. Эти данные были использованны для определения констант связывания цезия, которые составили К1=170 М-1 – для первого (более крепкого )сайта, и К2=20 М-1 – для второго (более слабого ) сайта связывания. Константа связывания для лития, определенная тем же методом имеет величину на порядок меньшую, чем таковая для цезия [28]. Константа связывания для натрия была определенны методом 23Na ЯМР [53] и составила 4 М-1. Константы связывания других ионов не были определенны, в связи с их низкой аффинностью, что делает такие изимерения довольно сложными.

В растворе хлороформ-метанол в присутствии тиоцианата цезия грамицидин (по данным двумерной ЯМР-спектроскопии) представляет собой правозакрученную антипараллельную двойную спираль с 7,2 остатка на виток (β7,2-спиральный димер) и сдвигом в 1,5 остатка, что свидетельствует о том, что 1Val не участвует в образовании водородных связей [54] (рис.6). Кристаллические структуры грамицидина дают дополнительную информацию о его трехмерной структуре и, более того, возможность формирования кристаллов в отсутствии и в присутствии ионов позволяют изучить их влияние. Обе ионсвязанная и ионсвободная кристаллические структуры грамицидина являются левозакрученными антипараллельными двойными спиралями и отличаются от форм в растворе значениями углов φ и ψ, направлением образования водородных связей и регулярностью укладки полипептидного остова. Ионсвободная кристаллическая форма длиннее (31 Ǻ) и уже (внутренняя полость довольно узкая и в некоторых местах не способна связывать ион) чем кристаллическая форма с тиоцианатом цезия (26 Ǻ в длину , 4,9 Ǻ – внутренний диаметр поры, в которой помещается ион цезия) [17].

**А Б**

.Рисунок 6.

СРК Изображение правозакрученного антипараллельного двухспирального димера грамицидина с 7,2 остатка на виток (ββ7,2 -двухспиральный димер) (PDB Code: 1AV2) в компелексе с цезием. А – вид сверху и ион цезия; Б – вид сбоку. Две молекулы грамицидина в димере показанны разными цветами (красный и синий).

Конформация полипептидного остова в ион-связанной форме грамицидина более упорядоченна, хотя и имеются некоторые вариации углов φ и ψ в районах прилегающих к сайтам связывания катионов, а водородные связи направленны почти параллельно оси спрали [55]. Это говорит о том что данная спираль с большей вероятностью имее 6,4 остатка на виток, чем 7,2 .

Сравнение ион-свободных и ион-связанных форм грамицидина показало, что при связывании происходит переупаковка и адаптация трехмерной структуры под конкретный катион. Такая перестройка возможна при реорганизации водородных связей. Так же наблюдается локальное расширение спирали в местах связывания иона и реориентация карбонильных групп пептидного остова, участвующих в связывании ионов [17].

**2.6.Локализация сайтов связывания катионов в различных конформациях грамицидина**

Катион связывающие сайты в двухцепочечных структурах могут быть определенны непосредственно из их кристаллических структур в комплексе с хлоридом цезия [56]. Внутри поры находятся два иона цезия симметрично расположенных на растоянии ~7,2 Ǻ от конца спирали. Сайты связывания сформированны карбонильными группами полипептидного остова, которые, связывая ион ориентируются к оси спирали под углом ~40º. Угловое перераспределение карбонильных групп увеличивает дистанции между группами, образующими водородные связи, и таким образом изменяются значения углов φ и ψ. Карбонильные группы на противоположных сторонах поры, пренадлежащие остаткам 11Trp и 14Leu, являются ближайшими к связанному катиону. В таких кристаллах помимо двух ионов цезия в комплексе с грамицидином так же находятся еще и три иона хлора, два из которых расположенны на противоположных концах спирали, а третий - в её центральной части. Ионы хлора отделены от цезия молекулами растворителя на растояние ~10 Ǻ. Наличие связанных ионов хлора довольно необычно, так как грамицидин не транспортирует анионы, а теоретические расчеты [57] показывают, что энергетический барьер связывания аниона значительно больше чем катиона (что делает вход в канал для аниона менее выгодным). Присутствие аниона внутри поры может быть вызвано высокой концентрацией соли в кристаллах и ионы хлора взаимодействуют с сайтами связывания подобно тому как это делают молекулы растворителя. В кристаллах с тиоцианатом цезия позиция иона цезия отличается от таковой в кристаллах с хлоридом цезия [55]. Исследования показали, что в этих кристаллах сайты связывания находятся ближе к концам спирали.

Наблюдение различных сайтов связывания катионов в кристаллах могут моделировать отдельные стадии транспорта катиона через грамицидиновый канал.

Потенциальные взаимодействия катионов с грамицидиновым каналом были изученны с помощью расчетов теоретических энергий и молекулярно-динамических симуляций [58], и показали важность С-концевой этаноламиновой группы для энергетического профиля канала, а точенее, для локализации энергетического минимума и динамики колебаний карбонильных групп полипептидного остова и трансмембранного транспорта катионов [59].

Замещение С-концевой этаноламиновой группы не влияет на свойства проводимости, она возможно играет роль в стабилизации некоторых конформаций грамицидиновой молекулы. При входе в канал катион постепенно обменивает свою гидратную оболочку на карбонильные группы полипептидного остова грамицидина, этаноламин (а точнее его гидроксильная группа) играет роль своеобразного посредника при таком переходе и забирает часть молекул воды гидратированного иона на себя, облегчая таким образом его вход в канал. [60].

Энергетические профили спирального и двухспирального димеров отличаются не очень сильно, за исключением величины энергетического барьера при входе в канал, и за счет этого двухспиральные каналы могут иметь меньшую проводимость чем односпиральные [17].

# 2.7.Взаимоотношения между конформационными состояниями грамицидина и проводящими формами

Грамицидин формирует характерные каналы при исследованиях в черных липидных мембранах. Проводимость одиночных каналов и их время жизни зависит не только от природы липида, формирующего бислой, но и от присутствующих в среде ионов. Проводимость и среднее время жизни грамицидновых каналов находятся в довольно узком диапазоне. В мембранах сформированных из глицерол-моноолеата [43] или из дифитаноилфосфатидилхолина [61] в присутствии 0,1 М NaCl средняя проводимость равна ~5 пикосименс (pS), а время жизни - ~0,5 секунд. При более высоких концентрациях соли проводимость увеличивается, а в более толстых мембранах, полученных при использовании различных растворителей, время жизни канала уменьшается при неизменной проводимости [43]. Симметрия расчитанного энергетического профиля говорит о том, что основная проводящая форма канала представляет собой структуру с центральной симметрией. Соотнося эти данные с остальными результатами можно сказать что основной проводящей структурой является спиральный димер N-конец к N-концу , хотя и нельзя полностью отрицать возможность существования активного канала антипараллельной двухцепочечной спиральной структуры, что было подтвержденно экспериментально [17]. В некоторых экспериментах при различных пропорциях липидов, используемых для формирования бислоя были обнаруженны очень долгоживущие каналы ( время жизни >100 сек.), которые были представленны в соотношении 5-10% по отношению к основной форме. Гибридные аналоги грамицидина, не способные формировать димер N-конец к N-концу, но способные образовывать двойные спирали так же обнаруживали такие же долго живущие каналы [32]. Более того кросс-сшитые аналоги (С-конец к N-концу), так же не способные образовывать димер N-конец к N-концу образовывали долгоживущие каналы в соотношении 80% к основной форме [62].

Помимо основной и долгоживущей форм каналов были обнаруженны еще и “мини” каналы сменьшей средней проводимостью и временем жизни, формирующиеся в различных пропорциях по отношению к основной форме в зависимости от условий образования бислоя [63,64]. Данные каналы предположительно имеют такую же структуру что и основная форма (спиральный димер N-конец к N-концу), но отличаются от нее другой ориентацией карбонильных групп полипептидного остова в сайтах связывания катионов [65].

Изучения синтетических аналогов грамицидина помогают определить молекулярную основу свойств природного грамицидинового канала. Одним из важных наблюдений является корреляция свойств специфической структуры с функцией. Хорошим примером такой корреляции является возможность образования гибридных каналов [66], представляющих собой димеры в которых один мономер представлен каким-либо аналогом, а второй – другим аналогом или же нативным грамицидином.

Одна доминирующая проводящая форма существует в бислоиных мембранах, которая является спиральным димером N-конец к N-концу (голова к голове). Кроме того существуют другие проводящие формы, найденные в различных пропорциях в зависимости от условий эксперимента. Некоторые из них возможно имеют конформацию двойной спирали.

# 2.8.Встраивание в мембрану и стабильность

В исследованиях по проводимости грамицидин может быть добавлен к сформированной мембране в качестве концентрированного спиртового раствора. При встраивании в липосомы грамицидин может быть добавленн таким же образом ( то есть добавление концентрированного спиртового раствора к приготовленным липосомам) [33] или же совместным растворением с липидом перед формированием липосом [26]. Переход грамицидина в активную проводящую форму обычно сопроваждается нагреванием или озвучиванием [67].

Легкость всраивания грамицидина зависит от типа используемого липида и от соотношения липид/грамицидин [23]. В общем липиды с более выской температурой фазового перехода должны нагреваться более сильно для лучшего встраиваия грамицидина. Более того, в образцах, где приходится более 20 молекул липида на молекулу грамицидина нагревания до 30°С достаточно для встраивания грамицидина, а образци имеющие менее 10 молекул липида на молекулу грамицидина необходимо нагревать до 65°С в течение 48 часов для такого же встраивания [17].

Некоторые исследования показывают, что при низких соотношениях грамицидин/липид легкость встраивания зависит от того в каком растворителе до этого находился грамицидин (так называемая история растворения) [68]. Если липид-грамицидиновый комплекс перед образованием липосом был растворен в трифторэтаноле активный канал образуется немедленно вместе с формированием бислоя , если же использовался раствор в смеси хлороформ-метанол, то для встраивания необходимо сильное нагревание. Такая зависимомть исчезает при более высоких соотношениях грамицидин-липид, и не наблюдается никакого эффекта по свойствам проводимости. Это говорит о том, что взаимодействия с липидом играют важную роль в стабилизации активной проводящей структуры а фазовое состояние важно для процесса встраивания . Также природа комплексов грамициди-липид была изученна с помощью метода ЯМР [69], которые показали, что при низком соотношении грамицидин – липид липид образует гексагональную фазу, а не бислой. Это так же может быть причиной трудности встраивания грамицидина в данных условиях. С помощью спектров КД был охарактеризован процесс встраивания грамицидина в липид: до начала встраивания в предварительно приготовленные липосомы, грамицидин присутствует в виде двойной спирали в присутствии ионов [67]. При нагревании грамицидин переходит в одиночную спираль и встраивается в бислой. В промежуточные времена этого процесса спектр представляет собой линейную комбинацию спектров этих двух структур. Такие же процессы наблюдаются и в отсутствии иона. Одна из точек зрения на этот процесс заключается в том, что расплетание двойной спирали происходит до тех пор, пока N- конец c другим N-концом и такая структура будет почти эквивалентна спиральному димеру [17]. Такой процесс требует разрыва всех 28 водородных связей и является очень энергоемким, а затем снова их образования. Разница энергий между двух- и односпиральной конформациями не очень велика, так как они имеют почти одинаковое количество водородных связей. В общем, можно сказать, что детали данного процесса до конца не ясны.

Возможно двухспиральная конформация имеет некоторую стабильность в бислое, но когда грамицидин становится ориентирован таким образом, что способен сформировать одиночную спираль, эта конформация становится предпочтительной, и, таким образом можно предположить, что спиральная конформация явлвется результатом специфического взаимодействия и ориентации грамицидина и липида. Теоретические [70] и экспериметальные [71] данные исследований с использованием липидов, в которых кислород карбонильной группы замещен на водород ( имитируя таким образом простую эфирную связь) показали, что одиночная спираль грамицидина дестабилизированна в этих условиях. Таким образом взаимодействия между карбонильными группами липидов и определенными регионами молекулы грамицидина необходимы для формирования канальой структуры (одиночной спирали).

# 2.9.Инженерия грамицидинового канала

Грамицидин в 90% случаев образует трансмембранный канал одной структуры, такая функциональная и химическая простота делает его уникальной моделью для изучения мембраноактивных пептидов и использования для понимания принципов пространственной организации и функционирования мембранных белков в общем и ионных каналов в частности.

Различные еденичные аминокислотные замены могут быть произведенны в грамиицидине без сильного эффекта на структуру и функцию канала [72], что позволяет проводить эксперименты по выяснению влияния конкретных аминокислотных остатков на свойства грамицидинового канала. Так же можноизучать влияние непротеиногенных (не кодируемых генетически) аминокислот [73].Более того некоторые изменения в первичной последовательности грамицидина дают каналы с качественно новыми функциями или конформациями [41].

Было показанно, что, изменяя первичную последовательность грамицидина, можно сдвигать конформационное равновесие в мембране, получая активные каналы, образованные приемущественно двухспиральными димерами. Так же, модификация первичной последовательности сильно влияет на электрофизиологические характеристики грамицидинового канала и дает возможность варьировать время жизни и проводимость канала[41].

Дальнейшие исследования различных аналогов грамицидина с измененной аминокислотной последовательностью открыли возможность получать потенциалзависимые грамицидиновые каналы. Существет два возможных пути получения каналов с такими свойствами. Первое: образование ассиметричных каналов (гетеродимеров), что влияет на энергетический профиль трансмембранного движения иона, делая его ассимметричным. Такая ассимметрия увеличивается при изменении первичной последовательности от центра канала к его входу (то есть от N- к C-концу молекулы грамицидина.

Вторым способом получения потенциалзависимого поведения грамицидинового канала является введение в его последовательность сенсора напряжения, только в данном случае эти сенсоры имеют намного меньшие размеры (одна аминокислота) чем в “больших” ионных каналах, а принцип их действия остается неизменным.

Вышеописанные исследования говорят с одной стороны о важности практически всех аминокислот, входящих в последовательность грамицидина (а не только остатков триптофана), и, с другой стороны открывают новые возможности для моделирования структуры и функции канала [41].

# 2.11.Общее применение в качестве модельной системы

## Данные последних исследований методами дифракции ренгеновских лучей, ЯМР-, КД- и ИК – спектроскопии, а так же компьютерное моделирование и исследование химически модифицированных аналогов позволяют детально понять природу структуры грамицидинового канала и его конформационных переходов. Результатом использования такого широкого набора методов является возможность по-новому взглянуть на конформационные взамиоотношения в молекуле грамицидина и сравнить их с существующими моделями.

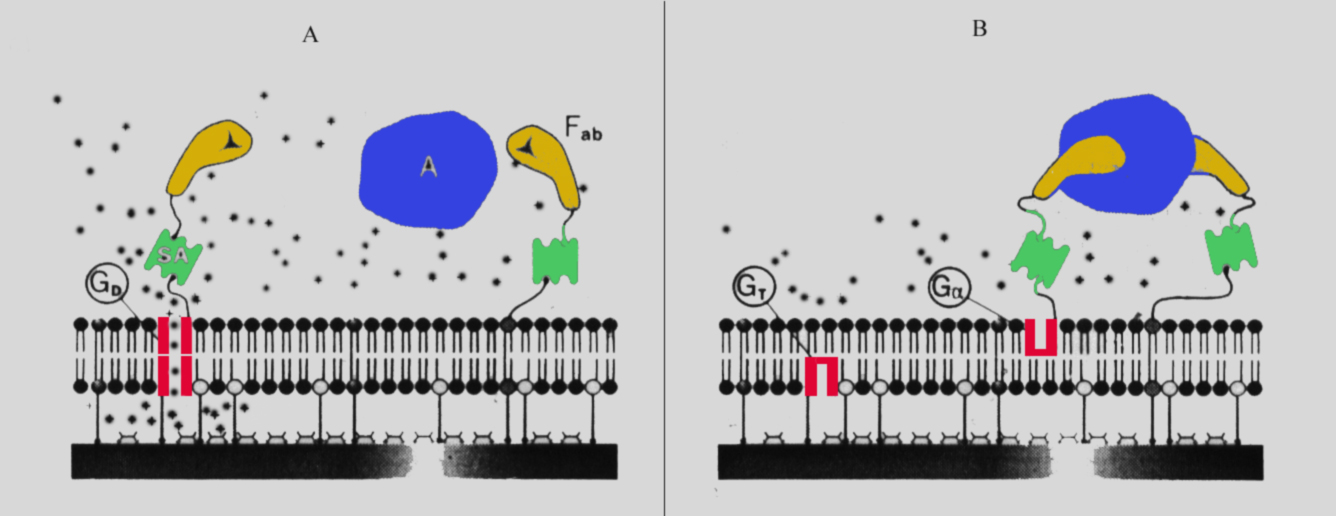
## Оглядываясь назад, мы видим что все предложенные изначально конформационные модели являются корректными, отображают общие принципы упаковки полипептидного остова и не противоречат экспериментальным данным, что очень важно для применения в исследовании других молекул.

В качестве модели грамицидин был использован для изучения липид – белковых взаимодействий [77], ионной проводимости [78], влияния трехмерной структуры на функцию [17]. Но применять эту модель нужно очень осторожно, из-за маленьих размеров, молекула грамицидина очень подвижна и принмает множество конформаций в зависимости от внешних условий, в то время как “большие” ионные каналы, состоящие из длинных полипептидных цепей, а иногда и нескольких субъедениц, имеют довольно стабильную пространственную структуру в условиях, близких к физиологическим (или же имеют небольшие вариации прис охранении общего способа укладки полипептидной цепи). Таким образом, определяя еденичную трехмерную структуру “большого” канала мы с большой вероятностью можем сказать что эта конформация и представляет из себя активный канал.

Сначала было предположенно, что структурно функциональные отношения в грамицидине более просты для понимания, в связи с тем, что ионсвязывающие сайты образованны только карбонильными группами полипептидного остова, а не боковыми радикалами аминокислот, и было предположенно, что на связывание ионя влияет только конформация полипептидного остова. При более детальном исследованиии аналогов с измененной первичной последовательностью выяснилось, что даже находясь на внешней стороне канала и далеко от сайтов связывания боковые радикалы аминокислот оказывают сильное влияние на свойства проводимости и конформационной стабильности, что так же должно быть учтено в модельных исследованиях.

# 2.12.Практическое применение грамицидина

Помимо большого фундаментального значения молекулы грамицидина для понимания структурно-функциональных взаимоотношений в мембраноактивных белках, он так же нашел и практическое приминение, опять же основанно на каналобразующем свойстве этой молекулы. Приведем лишь два самых ярких примера такого использования. Превое: был разработан метод пэтч калмп регистрации с использованием грамицидин перфорированных мембран, что дает возможность изучать анион проводящие каналы (такие как GABA- и глициновые рецепторы) в условиях, не затрагивющих их функции [81]. Второе использование, основанное на современных достижениях органического синтеза относится к разряду молекулярных нанотехноогий и является создание на основе грамицидинового канала мембрансопряженного биосенсора [82]. Принцип действя такой наномашины основан на преобладающей структуре грамицидина в мембране (β6,3-спиральный димер). Основным элементом такого биосенсора является прикрепленная к электроду мембрана, в которую встроен грамицидин. Один из мономеров грамицидина закрепленн в нижнем слое мембраны и, таким образом является неподвижным. Вторая часть грамицидинового канала модифицирована “связывающим агентом” (антиген, антитело, лиганд) и свободно диффундирует в верхнем слое мембраны. При добавлении анализируемого раствора, и наличии в нем веществ имеющих сродство к “связывающему агенту”, происходит спецефическое взаимодействие, приводящее к инактивации грамицидинового канала. Таим образом, детекция наличия каких-либо веществ в анализируемогом растворе происходит путем измерения проводимости грамицидинового канала. Помимо большого практического применения данная система может иметь большое фундаментальное значение при понимании принципов передачи сигнала через мембрану (как это происходит например в рецепторах сопряженных с G-белками).



**Рисунок 7.** Схема мембрансвязанного биосенсора на основе грамицидинового канала. А – грамицидиновый канал открыт , спецефическое связывание отсутствует. В – произошло спецефическое связывание произошло, грамицидиновый канал закрылся. Мономеры грамицидинового канала показаны красным цветом; зеленым цветом показана спейсерная группа; коричневым цветом показан “связывающий агент”; синим цветом показан аналит, спецефически взаимодействующий со “связывающим агентом”.

# Список литературы

1. Hotchkiss R.D., Dubos R.J. 1940, Journal of Biological Chemistry: v.132 p.791
2. Sarges R., Witkop B.,1964 Journal of American Chemical Society, vol.86, p.1862
3. Sarges R., Witkop B., 1965 Journal of American Chemical Society, vol 87, p.2011
4. Sarges R., Witkop B., 1965 Journal of American Chemical Society, vol 87, p.2027
5. Sarges R., Witkop B, 1965 Biochemistry, vol. 4, p.2491
6. Weinshtein S., Wallace B., et.al., 1980 Journal of Molecular Biology, vol 143, p1
7. Gross E., Witkop B., 1965 Biochemistry, vol. 4, p:2495
8. Koeppe R.E. II, Paczkovski J.A., Whaley W.L., 1985 Biochemistry, vol. 24, p.:2822
9. Gause G.F., Brazhnikova M.G., 1944 Lancet, vol. 247, p.:715
10. Veatch W.R., Fossel E.T., Boult E.R., 1974 Biochemistry, vol. 13, p.5249
11. Urry D.W., 1971 Proc Natl Acad Sci U S A, vol.68, p672
12. Ramachandran G.N., Chandrasekaran R, 1972 Ind. J. Biochem. Biophys., vol.9, p.1
13. Urry D.W., 1971 Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, vol 68, p.1907
14. Ramakrishnan G.N., Ramachandran G.N., 1965 Biophys. J., v.5, p909
15. Fossel E.T , Veatch W.R, Ovchinnikov Y.A., Buolt E.R., 1974 Biochemistry, vol.13, p5264
16. Veatch W.R, Boult E.R., 1974 Biochemistry, vol.13, p5257
17. Wallace B.A., 1990 Annu. Rev.Biophys. Biophys Chem., vol.19, p.127
18. Bystrov V.F., Arseniev A.S., 1988. Tetrahedron, vol.44, p.925
19. Langs D.A., 1988 Science, vol.241, p.188
20. Сычев С.В., Невская Н.А., Иорданов С., Мирошников А.И., Иванов В.Т. 1980, Биоорганическая химия, том 9, стр.121
21. Hawkes G.E., Lian L.-Y., Randall E.W. 1987, Eur. J. Biochem., vol.166, p. 437
22. Isbell B.E., Rice-Evans C, et.al. 1972 FEBS Lett., vol 25, p. 192
23. Killian J.A., Prasad K.U., et.al. 1988 Biochemistry, vol.27, p.4848
24. Wallace B.A., Veatch W.R., Boult E.R. 1981 Biochemistry, vol. 20., p. 5754
25. Weinstein S., Durkin J.T., et.al. 1985 Biochemistry, vol.24, p. 4374
26. Weinstein S., Wallace B.A., Boult E.R, et.al 1979 Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, vol. 76, p.4230
27. Weinstein S., Wallace B.A, et.al 1980 J. Mol.Biol., vol.143, p.1
28. Wallace B.A. 1986 Biophys. J., vol. 49, p.295
29. Kleinfeld A.M., 1987 Curr. Top. Membr. Tansp., vol.29, p.1
30. Scarlata S.F., 1988 Biophys.J., vol.54, p.1149
31. Veatch W.R, Mathies R., et.al. 1975 J.Mol.Biol., vol.99, p.75
32. Veatch W.R, Styer L. 1977 J.Mol.Biol, vol.113, p.89
33. Masotti L., Spisni A., et.al. 1980 Cell Biopys., vol.2, p.241
34. Bamberg E., Lauger P., 1977 J.Membr. Biol., vol.35, p.351
35. Killian J.A., de Kruijff B., et.al. 1983 Biochim. Biophys. Acta., vol.78, p. 141
36. Cornell B., Separovic F., et.al. 1988 Biophys.J., vol. 53, p. 67
37. Arseniev A. S Ovchinnikov Yu, A.., Barsukov, I. L.Bystrov, V. F,.Lomize, A. L. 1985 FEBS Lett., vol.186, p.168
38. Durkin J.T., Andersen O.S., et.al. 1986 Biophys.J., vol.49, p.118
39. Szabo G., Urry D. W. 1979 Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, vol.68., p.672
40. Bradley R.J., Urry D.W., et.al. 1978 Science, vol.200, p.435
41. Koeppe R.E. & Andersen O.S. 1996 Annu. Rev. Biophys.Biomol. Struct., vol. 25, p.231-258
42. Sychev, S. V.Barsukov, L. I.Ivanov, V. T. 1993 Eur Biophys J, vol.22, p. 279-88.The double pi pi 5.6 helix of gramicidin A predominates in unsaturated lipid membranes
43. Hladky S.B., Haydon D.A., 1972 Biochim. Biophys. Acta., vol.274, p.294
44. Eisenman G., Sandblom J.P., Neher E. 1978 Biophys.J., vol.22, p.307
45. Mazet J.-L., Andersen O.S.,Koeppe R.E. 1984 Biophys.J., vol.45, p. 263
46. Veatch W. R., Durkin J.T. 1980 J.Mol.Biol., vol.14, p.411
47. Hinton J.F., Whaley W.L., et.al. 1986 Biophys.J., vol.50, p. 539
48. Dani. J.A., Levitt D.G. 1981 Biophys.J., vol.35, p.501
49. Hinton J.F., Fernandez J.Q., et.al. 1989 Biophys.J., vol.55, p.327
50. Wallace B.A. 1983 Biopolymers, vol.22, p. 397
51. Hinton J.F., Koeppe R.E. II, et.al. 1986 Biophys.J., vol.49, p.571
52. Urry D.W., Trapane T.L., et.al. 1983 Science , vol.221, p.1064
53. Cornelis A., Laszlo P., 1989 Biochemistry, vol.18, p.2004
54. Arseniev A.S., Barsukov I.L., Bystrov V.F. 1985 FEBS Lett., vol.180, p.33
55. Koeppe R.E.II, Berg J.M., et.al. 1979 Nature, vol.279, p.723
56. Wallace B.A., Ravikumar K. 1988 Science, vol.241, p.182
57. Sung S. –S., Jordan P. C. 198 Biophys.J., vol.54, p. 519
58. Lee W.K., Jordan P. C.1984 Biophys.J., vol.46, p.805
59. Urry D.W., Alonso-Romanovsky S., et.al. 1984 J.Membr.Biol., vol. 71, p.205
60. Trudelle Y., Daumas P., et.al. 1987 FEBS Lett., vol.216, p.11
61. Barret Russel E.W., Weiss L.B., et.al. 1986 Biophys.J., vol.49, p.673
62. Ovchinnikov Y.A., Ivanov V.T. 1983 In Conformation in Biology, ed. R. Srinivasan, R.H. Sarma, p.155, New York: Academic
63. Busath D.D., Andersen O.S., Koeppe R.E.II., 1987 Biophys.J., vol.51, p.79
64. Busath D.D., Szabo G. 1981 Nature vol.294, p.371
65. Busath D.D., Szabo G. 1988 Biophys.J., vol.53, p.689
66. Andersen O.S., Koeppe R.E., et.al. 1987 In Transport through membranes, ed. K.Ygi, B.Pullman, p.295. Tokyo: Academic
67. Wallace B.A. 1985 Biophys.J., vol.45, p.114
68. LoGrasso P.V., Moll F.III, Cross T.A., 1988 Biophys.J., vol.54, p.259
69. Killian J.A., de Kruijff B., 1985 Biochemistry vol.24, p.7881
70. Meulendijks G. Sonderkamp T., et.al., 1989 Biochim. Biopphys. Acta vol.979, p.321
71. Waalace B.A., Veatch W.R., Boult E.R. 1981 Biochemistry vol.20, p.5754
72. Durkin J.T., Koeppe RE II, Andersen O.S. 1990 J.Mol.Biol. vol.211, p.221
73. Fonseca V., Daumas P., et.al. 1992 Biochemistry vol.31, p.5340
74. Mukherjee P.K. & Paulus H. 1974 Proc. Natl. Acad. Sci USA, vol.74, no.2
75. .Sarcar. N et al., 1974 Proc. Natl. Acad. Sci USA, vol.74, no.4, pp.1478-1482,
76. Langs D.A. 1989 Biopolymers vol.28(1), p.259
77. Killian J.A., Taylor MJ, Koeppe DE II. 1992 Biochemistry vol.31, p.11283
78. Finkelstein A, Andersen OS. 1981. J.Membr. Biol. vol.59, p.155
79. Hodges RS, Merrifield RB, 1975 Anal. Biochem. vol.65, p.241
80. Paul BW, Ten Kortenaar, et.al. 1986 Int. J.Pep. Pro. Res., vol.27, p.398

1. Овчинников Ю.А., Иванов В.Т, Шкроб А.М.; ''Мембрано-активные комплексоны", Москва , "Наука", 1974, стр.40-47, 174.

2. N.Sarcar et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, vol.74, no.4, pp.1478-1482, 1974

3. P.K. Mukherjee & H. Paulus Proc. Natl. Acad. Sci USA, vol.74, no.2 , 1974

4. Hladky & Haydon , Nature, vol.255, pp. 451-453, 1970

5. W.R Veatch & E.R. Boult, Biochemistry vol.13 no. 26, 1974, pp.5257-5261

6. D.W. Urry, Proc. Natl. Acad. Sci USA, vol.68 pp.672-676

7. Ramachandran & Chandrasekaran, Ind. J. Biochem. Biophys., vol.9, pp1-11, 1972

8. E. Fossel, W. R. Veatch, Y. A. Ovchinnikov , E. Boult, Biochemistry vol.13 no. 26,

1974, pp 5264-5275

9. Шепель Е.Н. и др., Биоорг. химия, 2, 581-593 (1976)

10. Cычев С.В., Фонина Л. А., Иванов В.Т., Биоорг. химия, 8, 1080-1088 (1984)

11. Ivanov V.T., "From structure towards the molecular mechanism of action", in

Peptides 1982

12. D.W. Urry, in "Spectroscopy of Biological Molecules", 487-510

13. Wallace B.A. & Boult E.R. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci USA, vol.75, 1775-1779

14. Wallace B.A., W.R. Veatch & E.R.Boult (1981), Biochemistry,20: 5754-5760.

15. Сычев С.В., Невская , Иорданов С.Т. и др. (1980), Биоорг. химия, 9: 121-151

16. Arseniev A.S., Bystrov V.F., V.T.Ivanov & Yu.A. Ovchinnikov (1984), FEBS

(Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett. 165:51-56.

17. Arseniev A.S., Barsukov I.L., Bystrov V.F., A.L.Lomize & Yu.A. Ovchinnikov

(1985), FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.186: 168-174.

18. Urry D.W., J.T. Walker, & T.L. Trapane (1980), J. Membr. Biol. 69: 225-231.

19. Arseniev A.S., Barsukov I.L. & Bystrov V.F (1985) FEBS (Fed. Eur. Biochem

. Soc.) Lett. 180: 33-39.

20. S.V.Sychev, S.V. Sukhanov, L.I. Barsukov & V.T. Ivanov (1996), J. Pep. Sci.

2:141-156.

21. N. Mobashery, C. Nielsen, O.S. Andersen (1997), FEBS (Fed. Eur. Biochem.

Soc.) Lett. 412: 15-20.

22. Cornell B.A.,& M.A. Keniry (1983), Biochim. Biophys. Acta. 732: 705-710.

23. P. Daumas, D. Benamar & other., (1991) Int. J. Peptide Protein Res. 38: 218-228.

24. Wallace B.A, (1986), Biophys. J. 49: 295-306.

25. V. Krchnak, J. Vagner, P. Safar & M. Lebl (1988), Collection Czechoslovak

Chem. Commun. 53: 142-148.

26. K. U. Prasad, S. Alonso-Romanovski & other, (1986) Biochemstry , 25: 456-463

27. K. Bauer, R. Roskoski, H. Kleinkauf & F. Lipmann (1972) Biochemistry, 11: 3266-3270.

28. C.G Fields, G.B. Fields & other, (1989) Int. J. Peptide Protein Res., 33: 298-303.