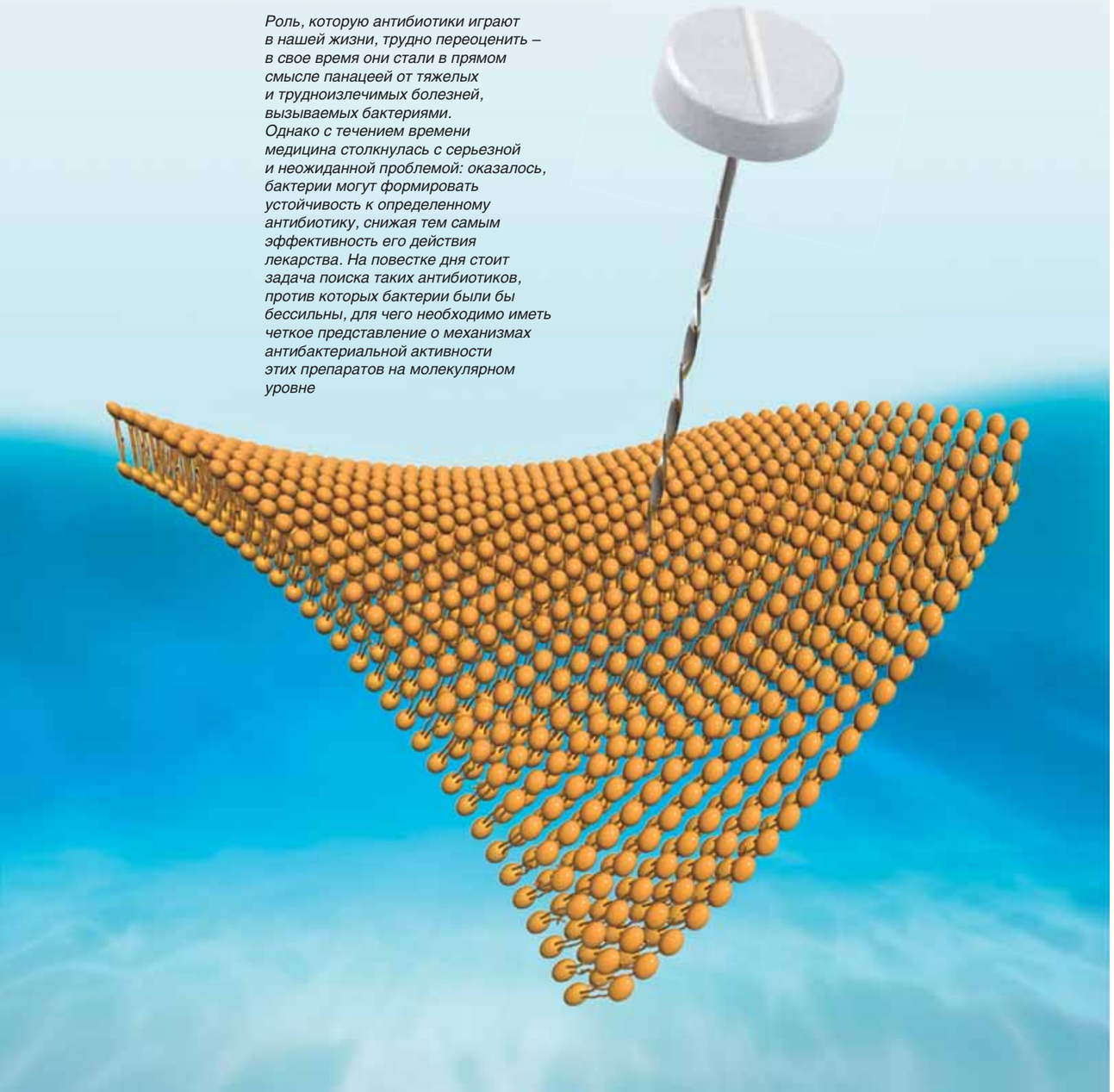
С. А. ДЗЮБА, Ю. Д. ЦВЕТКОВ

«МОЛЕКУЛЯРНОЕ СВЕРЛО» антибиотика

Роль, которую антибиотики играют в нашей жизни, трудно переоценить – в свое время они стали в прямом смысле панацеей от тяжелых и трудноизлечимых болезней, вызываемых бактериями. Однако с течением времени медицина столкнулась с серьезной и неожиданной проблемой: оказалось, бактерии могут формировать устойчивость к определенному антибиотику, снижая тем самым эффективность его действия лекарства. На повестке дня стоит задача поиска таких антибиотиков, против которых бактерии были бы бессильны, для чего необходимо иметь четкое представление о механизмах антибактериальной активности этих препаратов на молекулярном уровне



ДЗЮБА Сергей Андреевич – доктор физико-математических наук, профессор, директор Института химической кинетики и горения СО РАН (Новосибирск), заведующий лабораторией химии и физики свободных радикалов, президент Азиатско-Тихоокеанского общества спектроскопии ЭПР, лауреат Государственной премии СССР (1988). Автор и соавтор 130 научных публикаций

ЦВЕТКОВ Юрий Дмитриевич – академик РАН, доктор химических наук, советник РАН, основатель лаборатории химии и физики свободных радикалов Института химической кинетики и горения СО РАН (Новосибирск). Автор и соавтор более 300 научных публикаций и 1 патента

Одними из наиболее перспективных антибиотиков, учитывая феномен бактериальной антибиотикорезистентности, являются препараты на основе пептидов.

Пептиды – это биологические макромолекулы, представляющие собой последовательности аминокислот, тех самых «кирпичиков», из которых состоят белки. От белков пептиды отличаются лишь размерами: число аминокислот в них невелико – от нескольких единиц до нескольких десятков.

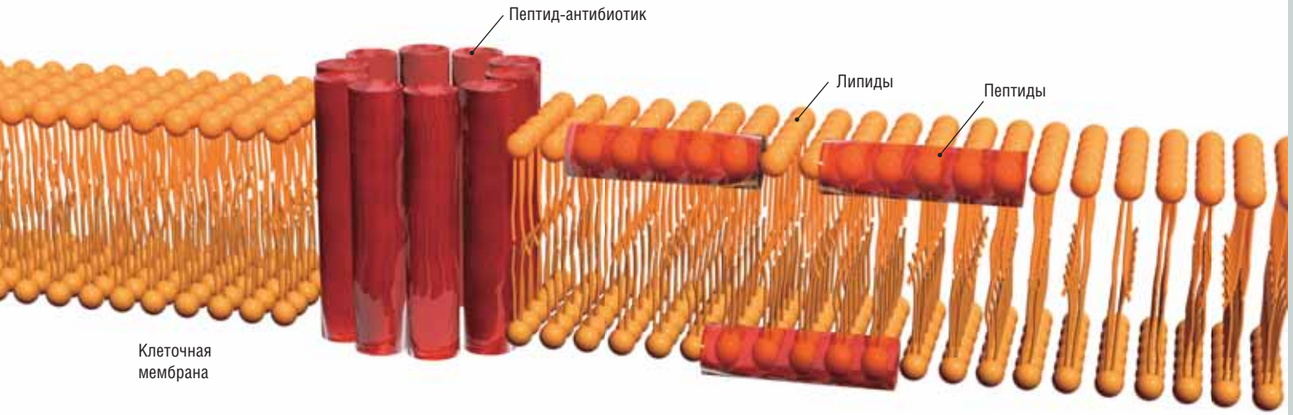
В настоящее время известно несколько сотен пептидов-антибиотиков. И хотя их антибактериальная активность является давно установленным фактом, однако для многих антибиотиков-пептидов детальный механизм их взаимодействия с патогенами изучен недостаточно.

Ключевые слова: пептидные антибиотики, клеточные мембраны, проницаемость мембран, спиновые метки, ЭПР, электронное спиновое эхо.
Key words: peptide antibiotics, cell membranes, membrane permeability, spin labels, EPR, electron spin echo

Ковер или бочонок?

Известно, что антибактериальная активность ряда пептидов-антибиотиков обусловлена их воздействием на оболочку бактериальной клетки – клеточную мембрану. Внедряясь в мембрану, антибиотики делают ее неизбирательно проницаемой как для молекул внешней среды, так и для собственного клеточного содержимого. В результате клетка не может поддерживать необходимый для жизнедеятельности состав внутриклеточного вещества, и бактерия погибает.

Название антибиотики (от греч. ἀντί – против, и βίος – жизнь) говорит само за себя. Это огромная группа природных и искусственно созданных веществ, избирательно подавляющих патогенные микроорганизмы, включает в себя химические соединения самых разных классов, от аминосахаров и гликозидов до пептидов. Возбудители инфекций могут приобретать устойчивость к действию одного или нескольких антибактериальных препаратов в результате естественного отбора. Кроме того, генетические мутации, обеспечивающие эту устойчивость, могут напрямую «передаваться» другим микроорганизмам путем горизонтального переноса генов



В настоящее время наиболее часто обсуждаются два возможных механизма нарушения целостности мембраны. Напомним, что клеточные мембраны построены в основном из липидов – молекул, состоящих из полярной «головки» и длинного углеводородного «хвоста». В мембране липиды, самоорганизуясь, образуют двойной слой, в котором гидрофобные хвосты молекул расположены внутри мембраны, а на поверхности находятся гидрофильные головки. В мембранах клеток живых организмов обычно присутствуют липиды разных типов, а в научных исследованиях чаще используются искусственные модельные мембраны из липидов одного определенного типа.

Согласно первой гипотезе о механизме взаимодействия пептида-антибиотика и бактериальной клетки, молекулы антибиотика располагаются параллельно поверхности клеточной мембраны, покрывая ее как ковер (*ковровый* механизм). Это приводит к нарушению самоорганизации липидного слоя и разрушению, «выкусыванию» участка мембраны.

Согласно второй гипотезе, молекулы антибиотика проникают в мембрану, располагаясь перпендикулярно поверхности. Несколько внедрившихся ассоциированных молекул формируют своеобразный, открытый с двух сторон «бочонок» (*бочоночный* механизм). Канал, формируемый «стенками» бочонка, приводит к нарушению целостности мембраны.

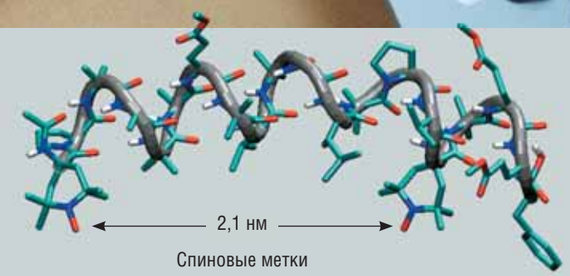
Чтобы понять, какой именно молекулярный механизм воздействия на клетку бактерии реализуется в случае конкретного антибиотика, в первую очередь нужно иметь точную информацию о пространственном расположении молекул пептидов относительно клеточной мембраны, т. е. о надмолекулярной (иначе – супрамолекулярной) структуре системы пептид–мембрана. Подобные исследования ведутся в Институте химической кинетики и горения СО РАН (Новосибирск), где для изучения супрамолекулярных структур широко привлекаются методы *электронного парамагнитного резонанса* (ЭПР).

Выдвинуто несколько предположений относительно механизмов взаимодействия пептидов-антибиотиков с клеточной мембраной бактерий. В случае «бочоночного» механизма молекулы пептида встраиваются в мембрану, формируя трансмембранные каналы *(слева)*. «Ковровый» механизм подразумевает, что пептиды образуют добавочный слой на участке поверхности мембраны, в конечном итоге разрушая его *(справа)*. В любом случае происходит нарушение целостности мембраны бактериальной клетки, что приводит к ее гибели

МАГНИТНАЯ МЕТКА ДЛЯ МОЛЕКУЛЫ

Одним из полезных методических инструментов, с помощью которых изучают супрамолекулярные структуры, являются так называемые спиновые метки. Такая метка представляет собой стабильный свободный радикал (обычно нитроксильный), химически внедряемый в изучаемые молекулы (те же пептидные антибиотики) антибиотики в определенных местах. Благодаря наличию в радикале атома с ненулевым спиновым магнитным моментом, помеченные таким образом молекулы можно исследовать методами спектроскопии электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР), новые варианты которых продолжают появляться и в наши дни.

Так, относительно недавно в Институте химической кинетики и горения СО РАН была разработана группа высокочувствительных методов импульсной спектроскопии ЭПР, основанных на исследовании сигнала электронного спинового эха (ЭСЭ). В этом случае на образец с меткой воздействуют специальной последовательностью импульсов переменного магнитного



Спиновые метки

Аламетицин – один из природных пептидов-антибиотиков, способных образовывать каналы в бактериальной мембране. Спиновые метки, внедренные в аминокислотную последовательность пептида в определенных местах, позволяют проследить за его взаимодействием с бактериальной клеткой

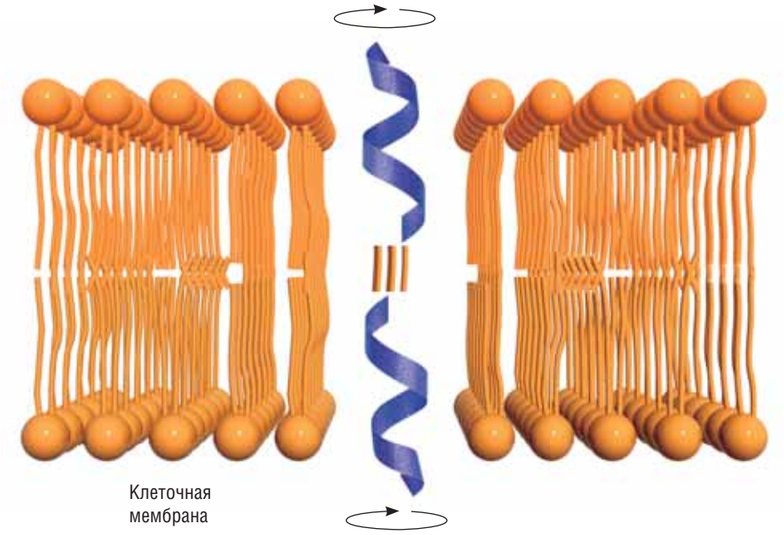
поля, меняющей направление магнитного момента электронов. После этого регистрируется эхо-сигнал ЭПР, обусловленный постепенной релаксацией системы в исходное положение. По изменению формы сигнала ЭСЭ со временем можно получить уникальную информацию о конфигурации отдельных биомолекул и их окружении, о супрамолекулярных структурах, организованных из нескольких макромолекул и о характере их молекулярных движений.

На сегодня имеется много различных вариантов импульсного ЭПР. Для изучения спин-меченых биологических систем широко используется так называемый импульсный двойной электрон-электронный резонанс (PELDOR). Применяя этот метод, можно с высокой точностью получить информацию о расстоянии между двумя спиновыми метками (для расстояний около 3 нм точность составляет примерно 0,1 нм). А зная расстояние между метками, можно делать выводы о взаимном расположении исследуемых молекул.

Еще один метод, основанный на изучении осцилляций огибающей спада сигнала ЭСЭ (ESEEM), дает возможность определить расстояние от спиновой метки до атомных ядер, обладающих магнитным моментом. В качестве последних могут выступать, например, ядра дейтерия, входящие в состав тяжелой воды.

Из-за гидрофобных свойств фрагментов липидов, формирующих сердцевину клеточной мембраны, полярные гидрофильные молекулы, такие как вода, не могут проникнуть внутрь мембраны. И если последнюю поместить не в обычную воду, а в тяжелую, то по сигналу от ядер дейтерия можно судить о глубине погружения метки внутрь мембраны. В результате можно делать выводы о расположение спин-меченого пептида в мембране, т. е. о топологии системы мембрана–пептид.

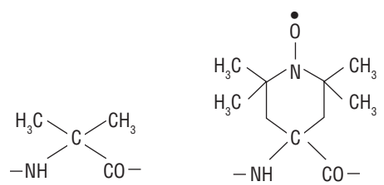
Изучение общего времени затухания сигнала ЭСЭ дает информацию о движении спиновых меток. По времени затухания спинового эха можно определить скорость, а в ряде случаев и направление движения молекул



Две молекулы антибиотика трихогина, встраиваясь в клеточную мембрану, связываются между собой в димер за счет двух октаноильных групп на концах пептида. Вращение димера вокруг своей оси способствует транспорту молекул через мембрану по механизму «молекулярного сверла». В результате избирательная проницаемость мембраны нарушается

Дважды меченые

Новосибирским исследователям удалось достигнуть значительного прогресса при изучении пептидов двух типов, использующихся в качестве антибиотиков, – *трихогина* и *аламетицина*. Оба эти антибиотика, представляющие из себя достаточно длинные цепочки (трихогин состоит из десяти аминокислот, аламитицин – из двадцати), содержат в своем составе значительную долю аминоизомасляной кислоты. Чтобы пептиды можно было исследовать методами ЭПР, аминоизомасляная кислота в определенных участках их аминокислотной последовательности заменялась близкой по химическому строению спиновой меткой ТОАС:



Аминоизомасляная кислота

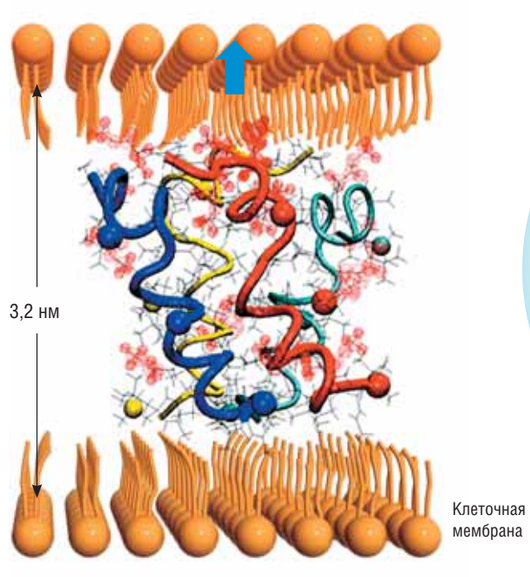
ТОАС

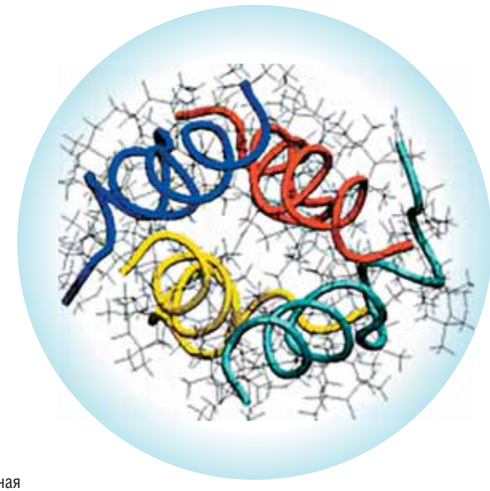
Данные об изменениях пространственной организации дважды спин-меченых пептидов показали, что в биологических мембранах трихогин и аламетицин сворачиваются в спираль, приобретая так называемую конформацию α-спирали.

Выяснилось, что при низких концентрациях трихогин располагается параллельно поверхности мембраны. Если же его концентрацию повысить до терапевтически значимой, то антибиотик начинает проникать в мембрану, встраиваясь в нее перпендикулярно поверхности. Его молекулы, соединяясь попарно концевыми группами, образуют димеры, которые пронизывают мембрану практически насквозь.

Но поскольку внутри свернутых в спирали молекул трихогина недостаточно места для проникновения даже молекул воды, возникает вопрос: каким образом происходит нарушение избирательной проницаемости мембраны? Ответ пришел с неожиданной стороны: оказалось, что димеры трихогина могут довольно быстро вращаться вокруг своей оси. И такое вращение вполне может приводить к тому, что молекул воды будут проталкиваться вдоль спирали. Здесь можно провести достаточно близкую аналогию с работой дрели: известно, что под действием вращения сверла (а наш пептид очень на него похож) частицы материала выносятся наружу. Поэтому новый механизм взаимодействия антибиотика и мембраны с полным правом можно назвать механизмом *молекулярного сверла*.

Для аламетицина сделать выводы о положении его молекул в мембране оказалось намного сложнее. Выяснилось, что его молекулы собираются в группы по четыре – образуют тетрамеры. При этом сигнал ЭПР, который складывается из сигналов большого числа расположенных рядом спиновых меток, трудно расшифровать. Определить структуру тетрамера и его положение в мембране удалось, сочетая результаты, полученные с помощью методов ЭПР, с данными рентгеновского рассеяния в кристаллах аламетицина. Так удалось установить, что расположение молекул аламетицина в мембране соответствует бочоночному типу.





Четыре молекулы антибиотика аламетицина формируют в клеточной мембране канал по «бочоночному» механизму.
Слева – супрамолекулярная структура тетрамера аламетицина в мембране, вид вдоль мембраны;
справа – вид сверху, на котором хорошо заметно отверстие трансмембранного канала

Поля исследования молекулярных механизмов действия антибиотиков с помощью импульсного ЭПР спин-меченых молекул проведены только для двух представителей класса пептидов-антибиотиков – трихогина и аламетицина. Но и эти примеры убедительно показывают, что разнообразие механизмов действия этих антибактериальных средств может оказаться значительно больше, чем предполагалось ранее.

Дальнейшие исследования других пептидных антибиотиков – а их на сегодняшний день известно несколько сотен – наверняка принесут новые открытия, которые могут оказаться настолько же удивительными, как обнаруженный для трихогина механизм «молекулярного сверла».

Перед исследователями пептидных антибиотиков встает ряд и других важных вопросов: почему антибиотики уничтожают клетки бактерий и не трогают клетки самого организма, как может измениться механизм их действия при изменении липидного состава мембраны и т.д. В конечном итоге детальное знание молекулярных механизмов позволит создать новые эффективные лекарства для лечения бактериальных инфекций и выработать рекомендации по наиболее эффективному применению уже известных.

Литература

Цветков Ю.Д. , Милов А.Д., Марьясов А.Г. Импульсный двойной электрон-электронный резонанс (PELDOR) – спектроскопия ЭПР в нанометровом диапазоне расстояний // Успехи химии. № 6. С. 515–551 (2008)

Milov A.D., Samoilova R.I., Tsvetkov Yu.D., et al. Structure of self-aggregated alamethicin in ePC membranes detected by pulsed electron-electron double resonance and electron spin echo envelope modulation spectroscopies // Biophys. J. 2009. Vol. 96, P. 3197–3209.

Salnikov E.S., Erilov D.A., Milov A.D., et al. Location and aggregation of the spin-labeled peptide trichogin GA IV in a phospholipid membrane as revealed by pulsed EPR // Biophys. J. 2006. Vol. 91. P. 1532–1540.

Syryamina V.N. , Isaev N.P., Peggion C., et al. Small-amplitude backbone motions of the spin-labeled lipopeptide trichogin GA IV in a lipid membrane as revealed by electron spin echo // J. Phys. Chem. B. 2010. Vol. 114. P. 12277–12283.