

УДК 529.213.29; 541.515. 615.02/14; 615.281; 615.31

**МОЛЕКУЛЯРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ
ВЗАЄМОДІЙ ПРОТИМІКРОБНИХ
СПЛУК З ЕЛЕМЕНТАМИ КЛІТИННОЇ
МЕМБРАНИ: НІСТАТИН-ЕРГОСТЕРИНОВА
МЕМБРАННА ПОРА**

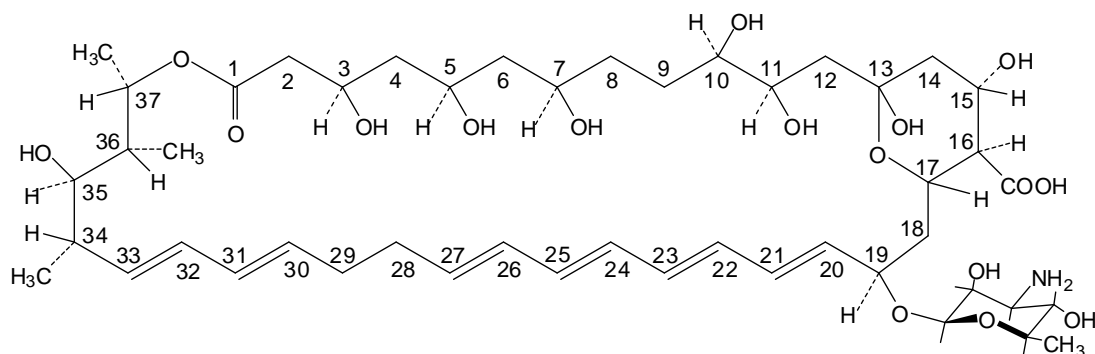
Лісняк Ю. В., Мартинов А. В.

ДУ “Інститут мікробіології та імунології
ім.І.І.Мечникова НАМН України”, Харків

Полієновий антибіотик ністатин (рис. 1), як і амфотерицин В, є мембранотропним агентом. Молекулярний механізм його дії прямо пов'язують із спроможністю формувати гідрофільні пори у гідрофобному мембранному середовищі, впливаючи таким чином на фізіологічний транспорт іонів і сприяючи виходу із клітини низькомолекулярних речовин [1-4]. Вважається, що при взаємодії полієнових антибіотиків (ПА) з мембранами стерини виконують функцію мембранних акцепторів полієнів і приймають участь у

формуванні іонних каналів, а не просто створюють умови для входження антибіотику в мембрану, знижуючи концентрацію стеролів в межах ліпідної фази [5]. Взаємодії ПА з ліпідами були предметом численних експериментальних досліджень [6-16]. Були також спроби пов'язати результати цих спостережень із структурою полієнів і описати структурні особливості молекулярного агрегату, який утворює мембранну пору. В моделях молекулярних агрегатів, що пропонувались, пора сформована молекулами амфотерицину В в кількості від шести до дев'яти [6-7, 17-19]. Найпоширенішою є октамерна модель амфотерицинового каналу. В той же час нам не вдалося знайти в літературі детальних даних про структуру мембранної пори, утвореної молекулами ністатину.

У відсутності експериментальної інформації про побудову цих мембранних пор цінним інструментом вивчення просторової організації супрамолекулярних структур, міжмолекулярних взаємодій, в яких вони задіяні, і відповідно, молекулярних механізмів протимікробної дії



Nystatin A₁

Рис. 1. Хімічна будова полієнового макролідного антибіотику ністатину А₁.

мембранотропних агентів є молекулярне моделювання. **Мета** даної роботи – побудувати молекулярну модель ністатин-ергостеринового мембранного каналу і дослідити особливості його молекулярної архітектури.

Методи

Розрахунки проводили за допомогою пакету програм для молекулярного моделювання HyperChem [20]. Використовувалось силове поле молекулярної механіки ММ⁺. Електростатичні взаємодії оцінювались у монополь-монопольному наближенні ($\epsilon=1.5$).

Заряди на атомах розраховувались полуемпіричним квантовохімічним методом AM-1 [21].

Координати атомів молекули амфотерицину В були взяті із структури кристалічного комплексу N-йодоацетил амфотерицину В моногідрату тетрагідрофурану в Кембриджській базі кристалографічних даних [22-23]. Молекула ністатину [24] будувалась шляхом відповідної хімічної модифікації амфотерицину. Структура молекули ністатину після додавання атомів водню оптимізувалась. Аналогічно оптимізувалась структура молекули ергостерину, яка була побудована на основі структури молекули холестерину (рис. 2). Бімолекулярна взаємодія ністатину з ергостерином

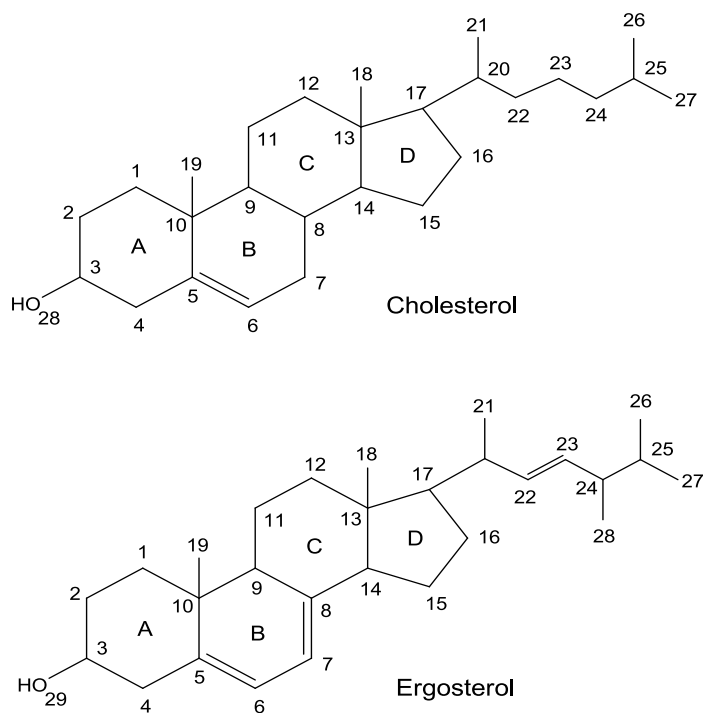


Рис. 2. Хімічна будова стеринів: холестерину та ергостерину

in vacuo досліджувалась шляхом розрахування сумарної потенційної енергії двох молекул при їх різних взаємних розташуваннях. Серед можливих стабільних асоціатів (дімерів) цих молекул була відібрана низькоенергетична структура, яка відповідала даним літератури про взаємне розташування молекул стеринів і фосфоліпідів у фосфатиділхолінових бішарах [25]. Ця структура використовувалась далі як “будівельний блок” при побудові молекулярної моделі ністатин-ергостеринової мембранної пори. Модель представляє собою циліндр (з отвором усередині вздовж його осі). Структура цієї супрамолекулярної системи ретельно оптимізувалась. Поверхні, доступні розчиннику [26]

будували за допомогою програмного пакету для молекулярного моделювання і аналізу Chem 3D® [27].

Результати та обговорення

В рамках нашої моделі ністатин-ергостеринового мембранного каналу вісім дімерів ністатину з ергостеролом укладені в циліндричну структуру, в якій поздовжні осі молекул розташовуються приблизно паралельно. У середині такої структури містяться гідрофільні групи, а зовні – гідрофобні (рис. 3). У результаті утворюється пора, висота якої дорівнює половині

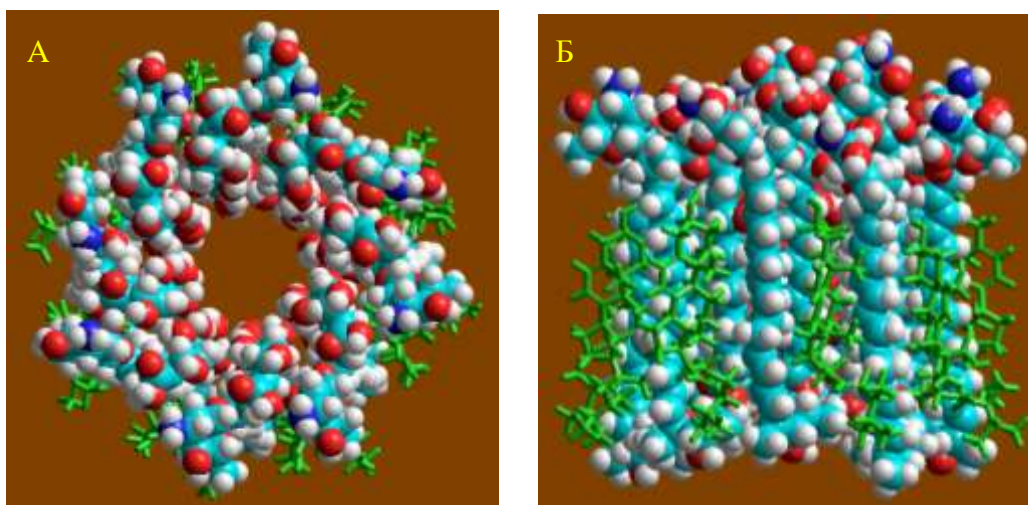


Рис. 3. – Молекулярна модель ністатин-ергостеринової мембранної пори у двох проєкціях (А і Б). Ністатинівий каркас зображений у вигляді просторово-заповненої моделі. Позначення атомів: вуглець – сіан, водень – білий, кисень – червоний, азот – синій. Молекули ергостерину зображені у вигляді стержневої моделі і, для наочності, виділені зеленим кольором.

товщини фосфоліпідної мембрани. Такі структури можуть бути інкорпоровані в мембрану таким чином, що їх поздовжні осі приблизно перпендикулярні площині мембрани, їх полярні голівки повернуті до поверхні мембрани, а ліпофільний зовнішній циліндр поринений у внутрішню ліпідну частину мембрани. Дві

такі структури, укладені неполярними частинами одна до одної, пронизують наскрізь усю мембрану (рис. 4) і можуть забезпечувати її проникливість.

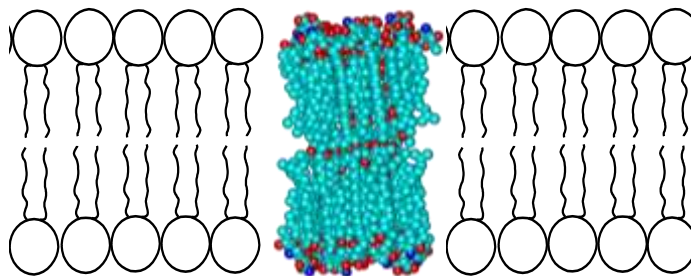


Рис. 4. – Схема молекулярної моделі ністатин-ергостеринової пори, яка інкорпорована у бішарову фосфоліпідну мембрану.

Як показує аналіз міжмолекулярних взаємодій, поряд з вандерваальсовими взаємодіями між хромофорами ністатину, молекулярний агрегат стабілізується і багатьма водневими зв'язками між полярними групами антибіотику (рис. 5). Водневі зв'язки (Н-зв'язки) утворюються за участю атомів кисню (гідроксильного або карбонільного) та азоту в якості акцепторів і водневих атомів в якості донорів Н-зв'язку. Спостерігаються також і біфуркатні Н-зв'язки, в яких один атом кисню виступає акцептором Н-зв'язку від двох водневих донорних. Міжмолекулярні Н-зв'язки

рівномірно розподілені уздовж отвору пори. Окрім сильних Н-зв'язків між субодиницями ністатину за участю гідроксилів при С11, С10 і С7 (рис. 1) (з середньою довжиною $L=2.131 \text{ \AA}$) та Н-зв'язків між ністатином і ергостеролом (з середньою довжиною $L=2.511 \text{ \AA}$), спостерігаються також Н-зв'язки у середній та нижній ділянці каналу за участю гідроксилів С7, С5 і С3 (з середньою довжиною $L = 2.771 \text{ \AA}$). Довжини Н-зв'язків у моделі добре відповідають загально прийнятим параметрам водневого зв'язування [28].

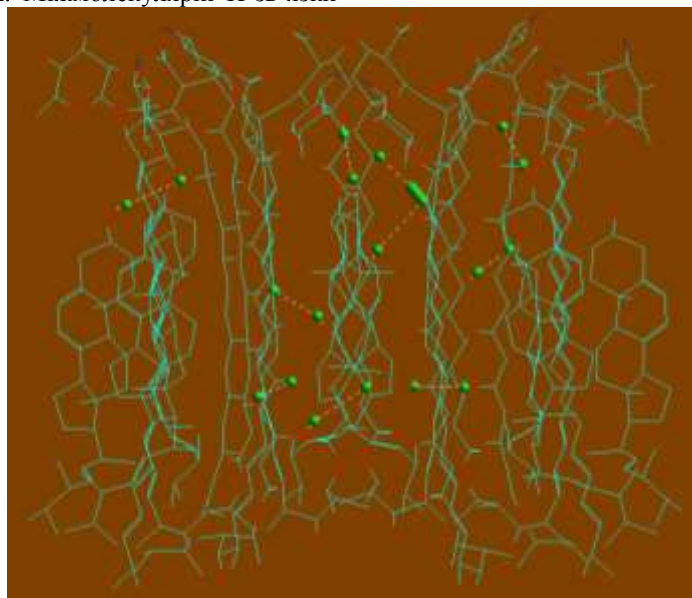


Рис. 5. – Картина водневого зв'язування уздовж отвору ністатин-ергостеринового каналу. Поздовжній розріз каналу показаний у вигляді стержневої моделі. Атоми-донори і атоми-акцептори Н-зв'язків показані зеленими сферами, а Н-зв'язки показані пунктиром.

Це свідчить про достатньо близьке взаємне розташування субодиниць антибіотику в складі пори.

Як видно з рис. 6, де наведена доступна розчиннику поверхня, діаметр ністатинутвореної пори є достатнім для виходу через неї у міжклітинний простір низькомолекулярних сполук розміром, який не перевищує розмір молекули глюкози [29].

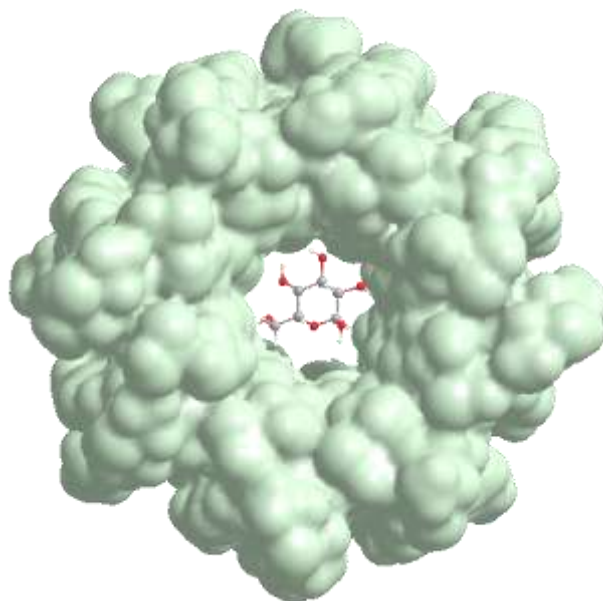


Рис. 6. – Доступна розчиннику поверхня ністатин-ергостеринового каналу, в отворі якого показана молекула глюкози.

Діаметр циліндричного отвору ністатин-ергостеринового каналу коливається уздовж каналу і складає у найвужчій його частині 6.4 \AA , що незначно відрізняється від експериментальної оцінки діаметру отвору найвужчої ділянки ністатин-ергостеринової пори, яка складає 6.2 \AA [29]. Діаметр ширшого отвору каналу у нашій моделі складає 7.9 \AA , тоді як за результатами [29] він дорівнює 6.4 \AA . Але необхідно брати до уваги те, що (1) наша модель є статичною, тоді як реальна пора, як і мембрана взагалі, є динамічною системою, структурні параметри якої, в тому числі і діаметр отвору, змінюються в часі, коливаючись біля своїх певних середніх значень. (2) Ці експериментальні результати отримані для пори, яка знаходиться в оточенні фосфоліпідів, тоді як наша модель розглядає ізольовану пору *in vacuo*. В цьому сенсі цікаво, що, за даними спектроскопічного експерименту [16], діаметр амфотерицинового каналу збільшується при переході від ліпідної фази до більш рідкої фази, що є наслідком ослаблення гідрофобних взаємодій амфотерицин-ліпід. Іншими словами, діаметр мембранної пори залежить від фізичних властивостей ліпідної матриці і відповідно до них може змінюватись в певних межах.

Відомо, що біологічний ефект ністатину є вищим по відношенню до мембран, які вміщують ергостерин, на відміну від мембран, які вміщують холестерин [1-2, 30]. Селективність дії антибіотику на еу- та прокаріотичні клітини може бути пов'язана з діаметром пори, який, як відмічалось вище, є залежним від фізичних властивостей ліпідної матриці. Ця залежність може проявлятися не тільки в різній афінності зв'язування ергостерина і холестерина з амфотерициновою порою, а і в добре відомому різному впливі ергостерину і холестерину на розріженість ліпідних мембран [12].

Висновки

1. Методами молекулярної механіки побудована молекулярна модель ністатин-ергостеринового мембранного каналу.
2. Проаналізовані особливості молекулярної структури та міжмолекулярних взаємодій ністатин-ергостеринового мембранного каналу.
3. Проведено порівняння параметрів створеної механістичної моделі з даними експерименту.
4. Запропонована молекулярна модель ністатин-ергостеринового мембранного каналу може бути інкорпорована у бішарову фосфоліпідну мембрану як стартова структура для подальшого детального дослідження у водному оточенні методами молекулярної динаміки.

References

1. Brajtburg, J. Amphotericin B: Current Understanding of Mechanisms of Action [Text] / J. Brajtburg, W. G. Powderly, G. S. Kobayashi, G. Medoff // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1990. – Vol.34. – P. 183-188.
2. De Kruijff, B. Polyene Antibiotic-Sterol Interactions in Membranes of *Acholeplasma laidlawii* Cells and Lecithin Liposomes. II. Temperature Dependence of the Polyene Antibiotic-Sterol Complex Formation [Text] / B. de Kruijff, W. J. Gerritsen, A. Oerlemans, R. A. Demel, L.L.M. van Deenen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1974. – Vol.339. – P.44-56.
3. Bonilla-Marin, M. A microscopic electrostatic model for the amphotericin B channel [Text] / M. Bonilla-Marin, M. Moreno-Bello, L. Ortega-Blake // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1991. – Vol. 1061. – P. 65-77.
4. Fujii, G. The formation of amphotericin B ion channels in lipid bilayers [Text] / G. Fujii, J.-E. Chang, T. Coley, B. Steere // *Biochemistry.* – 1997. – Vol. 36. – P. 4959-4968.
5. Feigin, A. M. The role of sterols in the interaction polyene antibiotics with lipid membranes [Text] / A. M.

- Feigin, T. Gianik, V.V. Pasechnik et al. // Antibiotics. - 1981. - T.26, № 6.- C. 522-526 (USSR).
6. Cotero, B.V. On the role of sterol in the formation of the amphotericin B channel [Text] / B. V. Cotero. S. Rebolledo-Antunez, I. Ortega-Blake // Biochim. Biophys. Acta. - 1998. - Vol. 1375. - P. 43-51.
7. Gruda I. // Application of differential spectra in the ultraviolet-visible region to study the formation of amphotericin B - sterol complexes [Text] / I. Gruda, P. Nadeau, J. Brajtborg, G. Medoff // Biochim. Biophys. Acta. - 1980. - Vol. 602. - P. 260-268.
8. Aracava, Y. Effects of amphotericin B on membranes: a spin probe study [Text] / Y. Aracava, I. C. P. Smith, S. Schreier // Biophys. Chem. - 1981. - Vol. 20. - P. 5702-5707.
9. Grant, Ch.W. M. Physical biochemistry of a liposomal amphotericin B mixture used for patient treatment [Text] / Ch. W. M. Grant, K. S. Hamilton, K. D. Hamilton, K. R. Barber // Biochim. Biophys. Acta. - 1989. - Vol.984. - P.11-20.
10. Hamilton, K.S. Phase behaviour of amphotericin B multilamellar vesicles [Text] / K. S. Hamilton, K. R. Barber, J. H. Davis, K. Neil, Ch.W. M. Grant // Biochim. Biophys. Acta. - 1991. - Vol. 1062. - P. 220-226.
11. Wojtowicz, K. Effect of amphotericin B on dipalmitoylphosphatidylcholine membranes: calorimetry, ultrasound absorption and monolayer technique studies [Text] / K. Wojtowicz, W. I. Gruszecki, M. Walicka, J. Barwicz // Biochim. Biophys. Acta. - 1998. Vol. 1373. - P. 220-226.
12. Fournier, I. The structuring effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: a differential scanning calorimetry study [Text] / I. Fournier, J. Barwicz, P. Tancrede // Biochim. Biophys. Acta. - 1998. - Vol. 1373. - P. 76-86.
13. Lance, M. R. Evidence for the formation of amphotericin B-phospholipid complexes in Langmuir monolayers [Text] / M. R. Lance, C. Washington, S. S. Davis // Pharm. Res. - 1996. - Vol. 13. - P. 1008-1014.
14. Tancrede, P. The effect of surfactants on the aggregation state of amphotericin B [Text] / P. Tancrede, J. Barwicz, S. Jutras, I. Gruda // Biochim. Biophys. Acta. - 1990. - Vol. 1030. - P. 289-295.
15. Barwicz, J. Spontaneous organization of amphotericin B in aqueous medium [Text] / J. Barwicz, W. I. Gruszecki, I. Gruda // J. Colloid Interface Sci. - 1993. - Vol.158. - P. 71-76.
16. Gagos, M. Spectrophotometric analysis of organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers containing the polyene antibiotic amphotericin B [Text] / M. Gagos, R. Koper, W. I. Gruszecki // Biochim. Biophys. Acta. - 2001. - V. 1511. - P. 90-98.
17. Khutorsky, V. Ion coordination in the amphotericin B channel [Text] / V. Khutorsky // Biophys. J. - 1996. - V. 71. - P. 2984-2995.
18. Baginski, M. Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation [Text] / M. Baginski, H. Resat, J.A. McCammon // Mol. Pharmacol. - 1997. - V. 52. - P. 560-570.
19. Baginski, M. Interaction of amphotericin B and its selected derivatives with membranes: molecular modeling study [Text] / M. Baginski, J. Czub, K. Sternal // Chem. Rec. - 2007. - Vol. 6, №6. - P. 320-332.
20. HyperChem™, Release 8.0.10 for Windows, Molecular Modeling System.
21. Dewar M.J.S., Zoebisch E.G., Healy E.F. and Stewart J.J.P. // J. Am. Chem. Soc. - 1985. - Vol.107.- P. 3902.
22. Mechlinski, W. Structure and absolute configuration of the polyene macrolide antibiotic amphotericin B [Text] / W. Mechlinski, C. P. Schaffner, P. Ganis, G. Avitable // Tetrahedron Lett. - 1970. - № 44. - P. 3873-3876.
23. Ganis, P. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl Derivative [Text] / P. Ganis, G. Avitable, W. Mechlinski, C. P. Schaffner // J. Amer. Chem. Soc. - 1971. - Vol. 93, N18. - P.4560-4564.
24. Chong, C.N. Macrolide antibiotic studies. XVI. The structure of nystatin [Text] / C. N. Chong, R. W. Rickards // Tetrahedron Lett. - 1970. - N 59. - P.5145-5148.
25. Vanderkooi, G. Computation of Mixed Phosphatidylcholine-Cholesterol Bilayer Structures by Energy Minimization [Text] / G. Vanderkooi // Biophys. J. - 1994. - Vol. 66. - P. 1457-1468.
26. Lee, B. The Interpretation of Protein Structures: Estimation of Static Accessibility [Text] / B. Lee, F. M. Richards // J. Mol. Biol. - 1971. - Vol. 55. - P. 379.
27. Chem 3D ® Ultra Version 8.0, Molecular Modeling and Analysis, Cambridge Soft Corporation.
28. Jeffrey G.A. An Introduction to Hydrogen Bonding, Oxford University Press, New York. - 1997. - P.12.
29. Shatursky, O. Ya. Effect of 3-decyloxy carbonylmethyl-4-methyl-5-(β -hydroxyethyl)thiazole chloride on nystatin-created K⁺-current across bilayer lipid membrane [Text] / O. Ya. Shatursky, O. V. Romanenko, N. H. Himmelreich // Ukr. Biochem. J. - 2010. - T. 82, № 1. - C. 42-51.
30. Lambing, H.E. Temperature effects on the aggregation state and activity of amphotericin B [Text] / H. E. Lambing, B. D. Wolf, S. C. Hartsel // Biochim. Biophys. Acta. - 1993. - Vol. 1152. - P. 185-188.

УДК 529.213.29; 541.515. 615.02/14; 615.281; 615.31
МОЛЕКУЛЯРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ВЗАЄМО-
ДІЙ ПРОТИМІКРОБНИХ СПОЛУК З ЕЛЕМЕН-
ТАМИ КЛІТИННОЇ МЕМБРАНИ: НІСТАТИН-
ЕРГОСТЕРИНОВА МЕМБРАННА ПОРА
Лісняк Ю. В., Мартинов А. В.

Методами молекулярного моделювання побудована модель ністатин-ергостеринового мембранного каналу. Проаналізовані особливості молекулярної структури та міжмолекулярних взаємодій цього супрамолекулярного агрегату. Проведено порівняння параметрів нашої моделі з даними експерименту. Запропонована модель ністатин-ергостеринового мембранного каналу може бути інкорпорована у бішарову фосфоліпідну мембрану як стартова структура для подальшого детальшого дослідження методами молекулярної динаміки з урахуванням ліпідного і водного оточення.

УДК 529.213.29; 541.515. 615.02/14; 615.281; 615.31
МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИ-
МОДЕЙСТВИЙ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ СО-
ЕДИНЕНИЙ С ЭЛЕМЕНТАМИ КЛЕТОЧНОЙ
МЕМБРАНЫ: НИСТАТИН-ЭРГОСТЕРИНОВАЯ
МЕМБРАННАЯ ПОРА

Лисняк Ю. В., Мартынов А. В.

Методами молекулярного моделирования построена модель нистатин-эргостеринового мембранного канала. Проанализированы особенности молекулярной структуры и межмолекулярных взаимодействий этого супрамолекулярного агрегата. Проведено сравнение параметров нашей модели с данными эксперимента. Предложенная модель нистатин-эргостеринового мембранного канала может быть инкорпорирована в двухслойную фосфолипидную мембрану как стартовая структура для дальнейшего детального исследования методами молекулярной динамики с учетом липидного и водного окружения.

UDC 529.213.29; 541.515. 615.02/14; 615.281; 615.31
MOLECULAR MODELING OF INTERACTIONS
OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS WITH CELL
MEMBRANE COMPONENTS: NYSTATIN-
ERGOSTEROL MEMBRANE PORE

Lisnyak Yu.V., Martynov A.V.

Model of nystatin-ergosterol membrane channel has been built by molecular modeling methods. Peculiarities of molecular structure and intermolecular interactions of this supramolecular aggregate have been analyzed. Parameters of our model have been compared with experimental data. The presented model of nystatin-ergosterol membrane channel can be incorporated into phospholipid bilayer membrane to serve as a starting structure in further comprehensive molecular dynamics simulations of these systems in lipid and aqueous environment.