

УДК 577.32

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВКЛАДОВ БОКОВЫХ  
АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ  
ПОЛИМИКСИНА В<sub>3</sub> В ЕГО СВЯЗЫВАНИЕ С  
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ ВНЕШЕЙ  
МЕМБРАНЫ *E. COLI* МЕТОДАМИ  
МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

Лисняк Ю. В.

**ГУ “Институт микробиологии и иммунологии им.  
И.И. Мечникова Национальной академии  
медицинских наук Украины”**

**Цель.** Исследовать молекулярные механизмы взаимодействия полимиксина В с липополисахаридом внешней мембраны грамм-отрицательной бактерии.

**Методы.** Комплексы полимиксина В<sub>3</sub> и его аланин-производных с липополисахаридом строились и исследовались методами молекулярного моделирования (минимизация, симулированный отжиг, докинг).

**Результаты.** Проведено аланиновое сканирование молекулы полимиксина В<sub>3</sub> и исследована роль его боковых аминокислотных остатков в создании комплекса с липополисахаридом. Показано, что замена на аланин аминокислотных остатков диаминобутановой кислоты (Dab) в положениях 1, 3, 5, 8 и 9 полимиксина заметно снижает энергию его связывания с липополисахаридом, тогда как аналогичная замена остатков в положениях 2, 6, 7 и 10 оставляет энергию связывания практически неизменной. Проанализированы структурные аспекты противомикробного действия полимиксинов.

**Выводы.** В энергию связывания полимиксина В<sub>3</sub> с липополисахаридом внешней мембраны существенный вклад вносят боковые аминокислотные остатки Dab, в особенности, остатки Dab1, Dab5, Dab8 и Dab9. Вклад остальных остатков полимиксина в энергию связывания комплекса является незначительным. Изменения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) исследованных аланин-производных полимиксина в зависимости от положения аланинового заместителя происходят в целом параллельно изменениям энергии связывания соответствующих комплексов производных полимиксина с липополисахаридом.

**Ключевые слова:** полимиксин, липополисахарид, аланиновое сканирование, энергия связывания

В последнее время при поиске и разработке новых противомикробных средств все большее внимание привлекают катионные антимикробные пептиды (АМП) – группа положительно заряженных полипептидов размером 10-40 аминокислотных остатков [1-9]. Физико-химическая природа их способа действия (нарушение проницаемости мембраны) обуславливает довольно быстрый процесс уничтожения бактерии (порядка нескольких минут) и

осложняет формирование генетической резистентности, что является значительным преимуществом соединений этой группы перед другими антибиотиками. Одними из перспективных соединений группы АМП являются полимиксины – известные антибиотики, которые были открыты еще в 1947 году [10-23]. В 1970-х годах полимиксины были исключены из широкого использования из-за случаев нефротоксичности и использовались только как крайнее средство. Особый интерес к полимиксинам сегодня вызван отсутствием в настоящее время других антибиотиков, к которым были бы чувствительны чрезвычайно полирезистентные штаммы грамм-отрицательных бактерий – возбудителей очень распространенных сегодня нозокомиальных инфекций. В то же время большинство грамм-отрицательных бактерий (включая *P. aeruginosa*) чувствительны к полимиксинам, а формирование резистентности к ним происходит медленно и наблюдается значительно реже по сравнению с другими антибиотиками [8, 16-21]. Хотя в наше время токсичность полимиксинов была критично исследована современными методами (с учетом химической чистоты и гомогенности препаратов, их фармакодинамики и режимов правильного дозирования) и оказалась существенно более низкой, чем считалось в прошлом [17, 19], ее тем не менее все еще нельзя не учитывать. Также, в случае более интенсивного использования полимиксинов вероятно и более интенсивное формирование резистентности к ним. Поэтому существенные усилия вкладываются в исследования структурно-функциональных отношений полимиксинов с целью выявления их аналогов с улучшенными микробиологическими, фармакологическими и токсикологическими свойствами [13, 22-39]. Предпосылкой направленного усовершенствования терапевтических свойств полимиксинов являются детальные сведения о структурных аспектах их противомикробного действия, о молекулярных механизмах их взаимодействия со своими клеточными мишенями, которые в настоящее время являются далеко не полными [10, 22].

Группа полимиксиновых пептидов содержит несколько химически различных соединений (полимиксины А, В, Е, М и др.) [10, 22, 40]. В клинической практике используются лишь полимиксин В и полимиксин Е (известный также как колистин). Полимиксин В (PmB) – это циклический липодекапептид. Семь аминокислот полимиксина (4-10) образуют макроцикл и три аминокислоты (1-3) – линейную часть (рис. 1). Полимиксин содержит шесть остатков α,γ-диаминобутановой кислоты (Dab), пять из которых при физиологических условиях положительно заряжены. N-концевой остаток Dab1 в полимиксине В N<sup>α</sup>-ацилирован жирной кислотой, такой как 6-метилоктановая кислота (PmB<sub>1</sub>), 6-метилгексановая кислота (PmB<sub>2</sub>) или октановая кислота (PmB<sub>3</sub>) (рис. 1). γ-Аминогруппа Dab4 ацилирована C-концевым Thr10 с образованием 23-членного лактамного кольца. Шестой и седьмой

аминокислотами в полимиксине В являются, соответственно, D-Phe та L-Leu. Единственным структурным отличием полимиксина Е (колистина) от полимиксина В является аминокислота D-Leu в позиции 6 вместо D-Phe в полимиксине В (рис. 1).

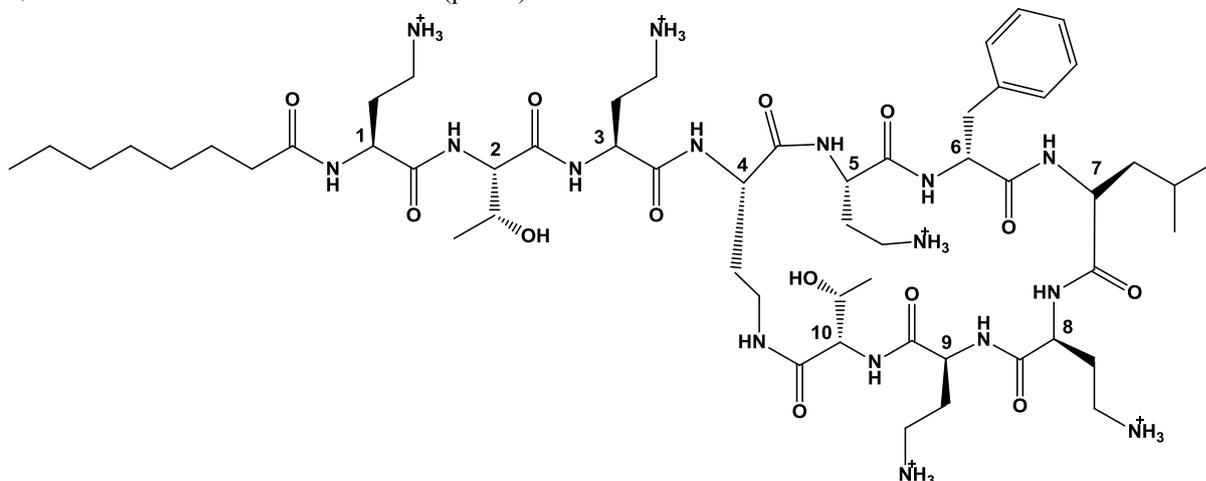


Рис. 1. Химическая структура полимиксина В<sub>3</sub> (PmB<sub>3</sub>)

Первичной мишенью полимиксина, взаимодействие с которой в значительной мере обуславливает его дальнейший антибактериальный эффект, является липополисахарид (ЛПС), или эндотоксин, внешней мембраны грам-отрицательной бактерии [41]. ЛПС – основной компонент внешнего слоя внешней мембраны грам-отрицательной бактерии, который является ключевой молекулой в узнавании бактерии иммунной системой организма.

Типичная молекула ЛПС представляет собой сложный биополимер, состоящий из трех основных частей: внешнего олигосахарида (или О-антигена), центрального олигосахарида и липида А [42]. О-Антиген – это иммуногенный олигосахарид, который заметно варьирует среди грам-отрицательных бактерий и содержит от 1 до 40 структурных единиц. Центральный олигосахарид содержит 6-10 сахаров (глюкоз, галактоз и гептоз) и два кетодезоксиоктулозоната (Kdo), присоединенных к липиду А. Липид А – это глюкозаминный дисахарид (GlcN I, II), фосфорилированный в положениях 1 та 4' и ацелированный 3-гидроксилмиристиновой кислотой. Участком связывания полимиксина на липополисахариде является фрагмент Kdo2-липид А [43-45] (рис. 2).

Взаимодействия связывания полимиксинов с липополисахаридом изучалось различными биофизическими методами [40, 43-48]. В частности, было проведено сравнительное исследование структуры и динамики полимиксина В и полимиксина В наонапептида в водном трифторэтаноле (миметик мембраны) [47], были исследованы структуры полимиксинов В, Е и М, а также полимиксина В наонапептида, в водном растворе как в свободном состоянии, так и в комплексе с липополисахаридом (липидом А), и построены модели молекулярных комплексов полимиксин-липополисахарид [40, 43-45,

48-49]. Результаты этих и других исследований структурно-функциональных отношений полимиксинов [10, 22-32, 35-36, 38-39] указывают на то, что как аффинность полимиксинов к липополисахариду, так и их противомикробная активность определяются уникальной трехмерной архитектурой их молекул, обеспечивающей необходимые межмолекулярные взаимодействия в пространстве. Эффективным инструментом исследования молекулярных механизмов взаимодействия лекарство-мишень (включая стереоспецифические межмолекулярные взаимодействия) является молекулярное моделирование [24, 50-52]. В данной работе методами молекулярного моделирования с помощью аланинового сканирования исследованы особенности межмолекулярных взаимодействий полимиксина В<sub>3</sub> с липополисахаридом внешней мембраны *E. coli*. Аланиновое сканирование – это химическая модификация, широко используемая в исследованиях структурно-функциональных отношений пептидов и заключающаяся в том, что каждая аминокислота исследуемого пептида последовательно заменяется (мутирует) на аланин, нейтральную аминокислоту с небольшой боковой цепью (метильной группой). Замена на аланин как бы “отключает” данную аминокислоту без нарушения целостности структуры пептида, что позволяет изучить вклад отдельной аминокислоты в то или иное его свойство. В нашем исследовании с помощью компьютерного аланинового сканирования исследуется вклад боковых аминокислот полимиксина в его связывание с липополисахаридом. Характеристикой связывания является энергия связывания комплекса полимиксина и его аланин-производных с липополисахаридом, которая рассчитывается методами молекулярного моделирования.

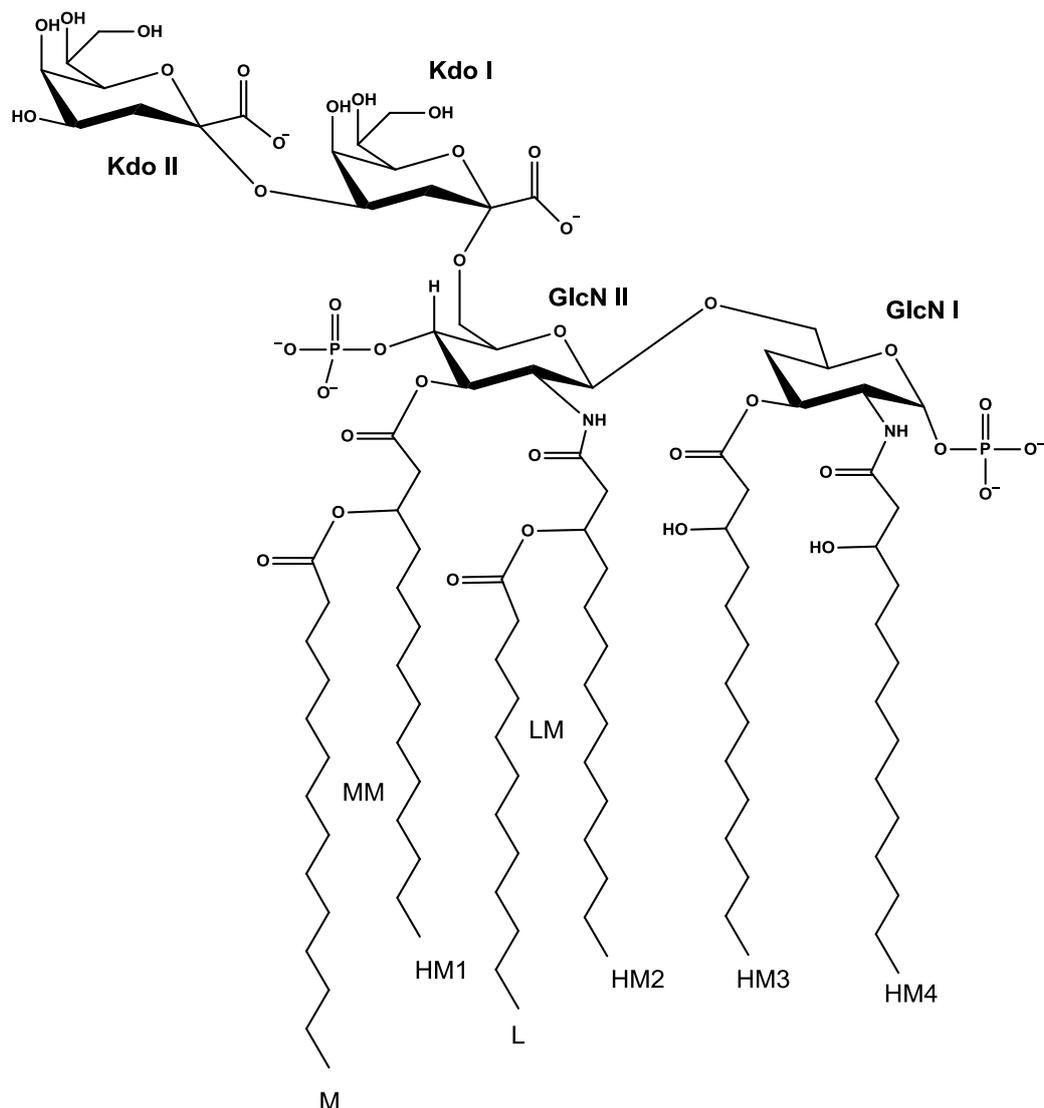


Рис. 2. Химическая структура ЛПС (Kdo2-липид А фрагмент)

Сопоставление результатов расчетов с литературными данными микробиологического тестирования аналогичных производных полимиксина [35] позволяет проследить возможные корреляции между силой связывания полимиксина с липополисахаридом и противомикробной активностью и проанализировать структурные аспекты противомикробной активности полимиксинов.

#### Материалы и методы

Молекулярное моделирование комплексов полимиксина и его производных с липополисахаридом (подготовка исходных структурных моделей, молекулярный докинг, расчеты, анализ и представление результатов) осуществляли с помощью программного комплекса Yasara [53-56].

**Начальные структуры.** Полимиксин В<sub>3</sub> был построен на основе ЯМР структуры полимиксина В<sub>1</sub>, связанного с ЛПС *E. coli* [43]. Координаты ЛПС *E. coli* (фрагмента Kdo2-липид А) были получены из рентгеновской кристаллографической структуры ЛПС в составе комплекса с интегральным белком FhuA внешней мембраны *E. coli* K-12 (код 1QFF в базе данных PDB) [57]. PmВ<sub>3</sub> вручную размещался вблизи Kdo2-липид А таким образом, чтобы максимально воспроизвести структуру комплекса полимиксина с липополисахаридом из ЯМР эксперимента [43-44]. Далее проводилась минимизация полученного комплекса в периодической ячейке, заполненной TIP3P молекулами воды. Границы ячейки располагались не ближе 1 нм от любого атома комплекса. Для нейтрализации зарядов системы и достижения массовой доли ионов 0.9% NaCl добавлялись противоионы Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup>. Использовалось силовое поле AMBER03 [58] с обрезанием несвязанных взаимодействий на расстоянии 1.05 нм. Для учета дальнедействующих электростатических

использовался алгоритм Particle Mesh Ewald (PME method) [59]. После удаления конформационного стресса путем короткой минимизации методом скорейшего спуска проводился симулированный отжиг до достижения сходимости, то есть пока снижение энергии не составляло менее 0.05 кДж/моль на атом в течение 200 шагов.

**Молекулярный докинг (молекулярная стыковка).** Дальнейшее уточнение локализации PmV<sub>3</sub> на ЛПС проводилось путем локального молекулярного докинга (локальной молекулярной стыковки) [60] с помощью программы VINA со стандартными параметрами [61]. Оптимизированный, как описано выше, комплекс PmV<sub>3</sub>-ЛПС располагался в центре ячейки для симулирования размером 0.9x0.9x0.9 нм. Структуры Kdo2-липида A and PmV<sub>3</sub> сохранялись жесткими, тогда как аминокислотные остатки полимиксина Dab 1, Dab 3, Dab 5, Dab 8 та Dab 9 были гибкими. Докинг проводился с помощью модифицированного макроса *dock\_runlocal*. Полученная в результате докинга структура комплекса использовалась далее в качестве стартовой для проведения процедуры аланинового сканирования.

**Аланиновое сканирование.** Комплекс PmV<sub>3</sub> с Kdo2-липидом A, полученный в результате докинга, вначале оптимизировался как описано выше. Молекулы воды, расположенные на расстоянии более 0.6 нм, удалялись, и система снова оптимизировалась по энергии. Далее водная оболочка временно удалялась, и фиксировались все атомы комплекса на расстоянии более 0.8 нм от центра полимиксинового остатка, который будет мутировать. Все боковые аминокислотные остатки полимиксина последовательно заменялись на аланин (Табл. 1), и снова добавлялась водная оболочка. Молекулы воды с недопустимыми стерическими контактами с промутировавшим остатком (то есть молекулы воды на расстоянии менее 0.3 нм от нового мутанта) удалялись. Для того, чтобы мутант мог адаптироваться (снять стерические напряжения), его окружение оптимизировалось по энергии. Затем рассчитывались потенциальная энергия и энергия сольватации для комплекса (PmV<sub>3</sub> – Kdo2-липид A), для рецептора (Kdo2-липид A) и для лиганда (PmV<sub>3</sub>).

**Энергия связывания.** Энергия связывания рассчитывалась как разность потенциальных энергий и энергий сольватации лиганда и рецептора в связанных состояниях (то есть в комплексах) и в несвязанных состояниях (то есть на бесконечном удалении друг от друга). Энергия сольватации включала в себя энергии ван-дер-ваальсовых и кулоновских взаимодействий между молекулами растворенного вещества и молекулами растворителя. Энтропийный компонент энергии сольватации аппроксимировался дополнительным энтропийным вкладом, пропорциональным площади поверхности, доступной растворителю (энтропийная цена экспонирования растворителю 1 Å<sup>2</sup> поверхности бралась равной 0.65 кДж/моль). Энергия сольватации рассчитывалась методом граничного элемента,

реализованным в программе YASARA. Граница между растворителем (диэлектрическая постоянная 78) и растворенным веществом (диэлектрическая постоянная 1) была образована молекулярной поверхностью растворенного вещества, построенной с радиусом пробы растворителя 1.4 Å. Заряды на атомах растворенного вещества приписывались на основе силового поля AMBER03 [57], с использованием GAFF/AM1BCC[62, 63] для фрагмента ЛПС и N-концевой жирнокислотной цепи полимиксина V<sub>3</sub>.

## Результаты и обсуждение

### Энергия связывания полимиксина V<sub>3</sub> и его аланин-производных с липополисахаридом.

На рис. 3А представлен комплекс полимиксин-липополисахарид, полученный в результате молекулярной стыковки (докинга). Эта структура была базовой для осуществления аланиновых мутаций, и ее молекулярные характеристики (энергетические и структурные) брались в качестве эталона при сравнительном анализе комплексов полимиксиновых мутантов с липополисахаридом. Рассчитанная величина константы диссоциации комплекса 0.34 мкМ хорошо соответствует экспериментальной величине 0.37 мкМ для комплекса PmV-липид A [64]. Структура комплекса стабилизирована электростатическими взаимодействиями положительно заряженных аминокислотных остатков Dab1, Dab5 и Dab 8, Dab 9 полимиксина с соответствующими отрицательно заряженными фосфатными группами PO4 липополисахарида, водородными связями полярных групп полимиксина и липополисахарида (рис.3Б и 3В). Дополнительная стабилизация осуществляется посредством гидрофобных взаимодействий жирнокислотных ацильных цепей и неполярных аминокислотных остатков D-Phe6 и Leu7 полимиксина с жирнокислотными ацильными цепями липополисахарида (рис.3А).

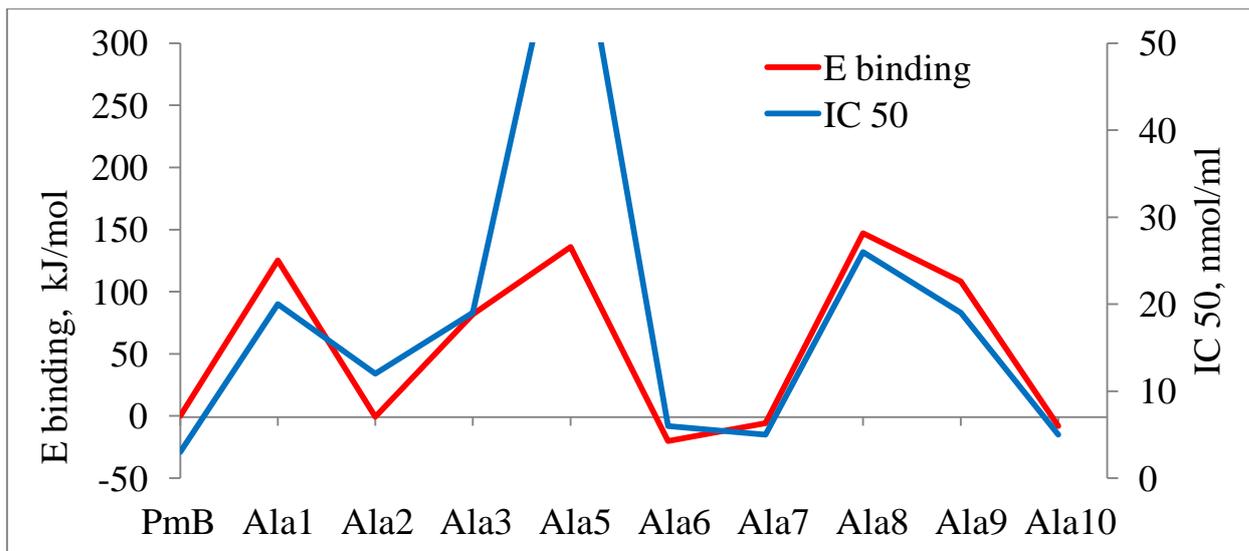
Рассчитанные нами величины изменений энергий связывания аланин-производных полимиксина V<sub>3</sub> с липополисахаридом (относительно энергии комплекса полимиксин V<sub>3</sub> - липополисахарид) приведены на рис. 4. Как видно из рисунка, аланиновые мутации полимиксина по-разному влияют на стабильность комплекса полимиксин-липополисахарид. Замена положительно заряженных аминокислотных остатков Dab в положениях 1, 3, 5, 8 та 9 на нейтральный аланин вызывает существенные положительные приращения энергии связывания, то есть заметно ослабляет связывание полимиксина-мутанта с липополисахаридом (Ala1, Ala3, Ala5, Ala8 и Ala9 производные на графике). Такая дестабилизация комплекса отражает существенную роль электростатических взаимодействий в связывании полимиксина липополисахаридом.

Таблица 1. Структура аланин-производных полимиксина В<sub>3</sub>.

Соединение		Порядковый номер аминокислотного остатка в первичной последовательности									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Polymyxin В <sub>3</sub>	ОА*	-Dab <sup>+</sup>	-Thr	-Dab <sup>+</sup>	-cy[Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-dPhe <sup>+</sup>	-Leu	-Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-Thr]
Ala1-Polymyxin В <sub>3</sub>	ОА	-Ala	-Thr	-Dab <sup>+</sup>	-cy[Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-dPhe <sup>+</sup>	-Leu	-Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-Thr]
Ala2-Polymyxin В <sub>3</sub>	ОА	-Dab <sup>+</sup>	-Ala	-Dab <sup>+</sup>	-cy[Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-dPhe <sup>+</sup>	-Leu	-Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-Thr]
Ala3-Polymyxin В <sub>3</sub>	ОА	-Dab <sup>+</sup>	-Thr	Ala	-cy[Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-dPhe <sup>+</sup>	-Leu	-Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-Thr]
Ala5-Polymyxin В <sub>3</sub>	ОА	-Dab <sup>+</sup>	-Thr	-Dab <sup>+</sup>	-cy[Dab <sup>+</sup>	-Ala	-dPhe <sup>+</sup>	-Leu	-Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-Thr]
Ala6-Polymyxin В <sub>3</sub>	ОА	-Dab <sup>+</sup>	-Thr	-Dab <sup>+</sup>	-cy[Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-Ala	-Leu	-Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-Thr]
Ala7-Polymyxin В <sub>3</sub>	ОА	-Dab <sup>+</sup>	-Thr	-Dab <sup>+</sup>	-cy[Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-dPhe <sup>+</sup>	-Ala	-Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-Thr]
Ala8-Polymyxin В <sub>3</sub>	ОА	-Dab <sup>+</sup>	-Thr	-Dab <sup>+</sup>	-cy[Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-dPhe <sup>+</sup>	-Leu	-Ala	-Dab <sup>+</sup>	-Thr]
Ala9-Polymyxin В <sub>3</sub>	ОА	-Dab <sup>+</sup>	-Thr	-Dab <sup>+</sup>	-cy[Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-dPhe <sup>+</sup>	-Leu	-Dab <sup>+</sup>	-Ala	-Thr]
Ala10-Polymyxin В <sub>3</sub>	ОА	-Dab <sup>+</sup>	-Thr	-Dab <sup>+</sup>	-cy[Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-dPhe <sup>+</sup>	-Leu	-Dab <sup>+</sup>	-Dab <sup>+</sup>	-Ala]

\* – ОА - октанова кислота





**Рис. 4.** Энергия связывания комплекса “аланин-производная полимиксина В<sub>3</sub> - липополисахарид” относительно энергии связывания комплекса “полимиксин В<sub>3</sub> - липополисахарид” (ось ординат слева) и концентрация IC<sub>50</sub> соответствующей аланин-производной полимиксина В<sub>3</sub>, необходимая для 50% гашения интенсивности флуоресценции флуоресцентной метки [35] (ось ординат справа), в зависимости от положения аланинового заместителя на молекуле полимиксина.

Замена же на аланин нейтральных аминокислотных остатков полимиксина в положениях 2, 6, 7 и 10 оставляет практически неизменной энергию связывания производных полимиксина с липополисахаридом, что указывает на вторичную роль этих остатков в связывании полимиксина липополисахаридом. На рис. 4 так же представлены экспериментальные характеристики связывания - величины концентраций IC<sub>50</sub> соответствующих аланин-производных полимиксина В<sub>3</sub> из работы Каназавы К. и др. [35]. Эти характеристики определены по замещению полимиксином В<sub>3</sub> и его аланин-производными флуоресцентно меченого полимиксина В<sub>3</sub> в комплексе с липополисахаридом (IC<sub>50</sub> – концентрация производной полимиксина, необходимая для 50% гашения интенсивности флуоресценции флуоресцентной метки - [Dab(Nγ-dansyl-Gly1)]-polymyxin В<sub>3</sub> [35]). Как видно з рисунка, рассчитанные нами энергии связывания хорошо коррелируют с экспериментальными данными по связыванию производных полимиксина с липополисахаридом, что свидетельствует в пользу адекватности наших модельных представлений. Структурные аспекты противомикробного действия полимиксинов. Насколько изменения антибактериальной активности полимиксинив при исследуемых аланиновых мутациях скоррелированы с их связыванием с липополисахаридом? “Параллельны” ли они изменениям связывания полимиксина с липополисахаридом? На рис. 5 проведено соотнесение минимальных ингибирующих концентраций (МИК/МИС) аланин-мутантов полимиксина в отношении кишечной палочки и сальмонеллы, взятых из работы Каназавы К и др. [35],

с рассчитанными нами изменениями энергии связывания соответствующих комплексов полимиксин-липополисахарид в зависимости от положения аланинового заместителя на молекуле полимиксина. Как видно из рисунка, изменения МИК исследуемых производных полимиксина происходят в целом скоррелировано (параллельно) с изменениями энергии связывания: последствием ослабления связывания является, как правило, снижение антибактериальной активности. Исключение составляет только Ala2-производная полимиксина, антибактериальная активность которой снижается по сравнению с полимиксином, а энергия связывания с липополисахаридом остается практически неизменной. Такая “непараллельность” изменения антибактериальной активности и силы связывания с липополисахаридом наблюдалась также и для некоторых других производных полимиксина в исследованиях Сакуры Н и др. [36, 37, 39]. Авторы этих работ объясняют эффект такой “непараллельности” возможным различием во взаимодействии пептидов с липополисахаридом в изолированном (свободном) состоянии и в связанном состоянии в составе клеточной мембраны [39]. Велков Т. и др., основываясь на построенной ими модели фармакофора полимиксина, предполагают возможность боковых цепей Thr2 и Dab1 функционально замещать друг друга ввиду способности атомов-доноров водородной связи этих соседних остатков располагаться в пространстве недалеко друг от друга [22]. По-видимому, выпадение из общей тенденции Ala2-аналога полимиксина отражает то обстоятельство, что эффективное связывание с мишенью и антибактериальная

активность могут определяться разными участками молекулы полимиксина.

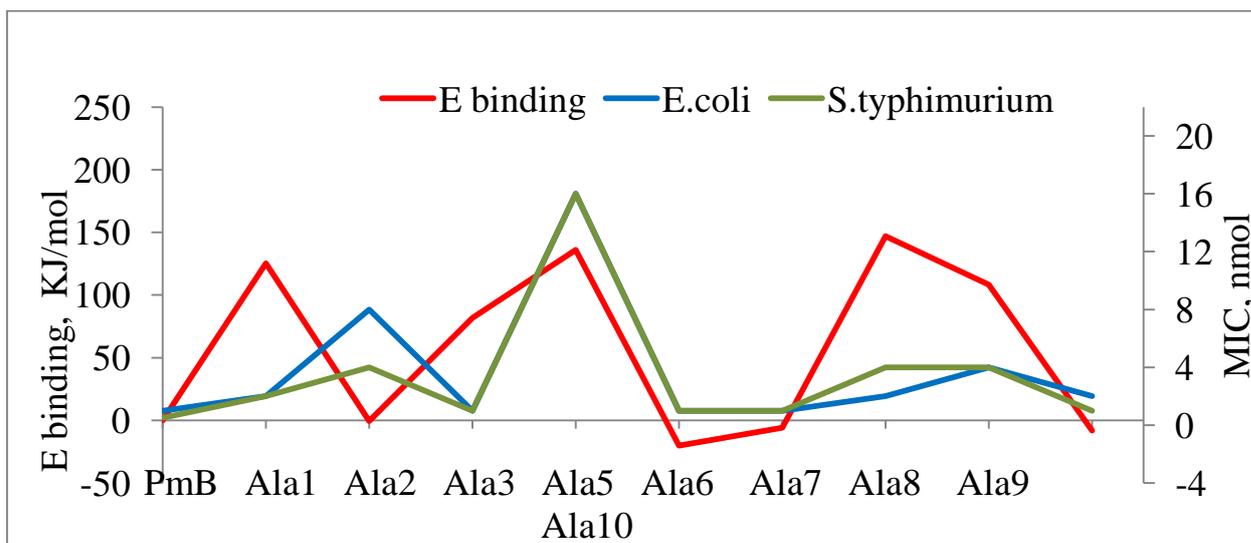


Рис. 5. Энергии связывания ( $E_{\text{binding}}$ ) комплексов “аланин-производная полимиксина В<sub>3</sub> (ось ординат слева) и минимальные ингибирующие концентрации (MIC) соответствующих аланин-производных полимиксина В<sub>3</sub> в отношении кишечной палочки и сальмонеллы [35] (ось ординат справа) в зависимости от положения аланинового заместителя на молекуле полимиксина.

#### Выводы

1. Методами молекулярного моделирования проведено аланиновое сканирование молекулы полимиксина В<sub>3</sub> и исследована роль его боковых аминокислотных остатков в создании комплекса с липополисахаридом.
2. Показано, что замена на аланин аминокислотных остатков Dab в положениях 1, 3, 5, 8 та 9 полимиксина заметно снижает энергию его связывания с липополисахаридом, что подтверждает существенную роль электростатических и полярных взаимодействий в связывании полимиксина липополисахаридом. Замена аминокислотных остатков полимиксина в положениях 2, 6, 7 и 10 оставляет практически неизменной энергию связывания производных полимиксина с липополисахаридом, что указывает на вторичную роль этих остатков в связывании полимиксина липополисахаридом.
3. Проанализированы структурные аспекты противомикробного действия полимиксинов. Изменения МИК исследованных производных полимиксина в зависимости от положения аланинового заместителя на молекуле полимиксина происходят в целом коррелировано (параллельно) с изменениями энергии связывания соответствующих комплексов производных полимиксина с липополисахаридом; исключением является только Ala2-производная полимиксина.

#### References

1. Butler, M. S. Antibiotics in the clinical pipeline in 2011 [Text] / M. S. Butler, M. A. Cooper // *J. Antibiot.* – 2011. – Vol. 64, N 6. – P. 413-425.

2. Vlieghe, P. Synthetic therapeutic peptides: science and market [Text] / P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, M. Khrestchatsky // *Drug Discovery Today.* – 2010. – Vol. 15, N 1/2. – P. 40-56.
3. Findlay, B. Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold [Text] / B. Findlay, G. G. Zhanel, F. Schweizer // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54, N 10. – P. 4049-4058.
4. Toke, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections [Text] / *Biopolymers (Peptide Science).* – 2005. – Vol. 80. – P. 717-735.
5. Craik, D. J. Seamless proteins tie up their loose ends [Text] / D. J. Craik // *Science* 2006. – Vol. 311, N 5767. – P. 1563-1567.
6. Visser, P. C. New cationic amphiphilic compounds as potential antibacterial agents [Text] : thesis ... PhD degree in chemistry: defended 23.02.06 / Visser Peter Christian. – Leiden, 2006. – 152 p.
7. Yoneyama, H. Antibiotic resistance in bacteria and its future novel antibiotic development [Text] / H. Yoneyama, R. Katsumata // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2006. – Vol. 70, N 5. – P. 1060-1075.
8. Nicasio, A. M. The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. Insight from the Society of Infectious Diseases Pharmacists [Text] / A. M. Nicasio, J. L. Kuti, D. P. Nicolau // *Pharmacotherapy.* – 2008. – Vol. 28, N 2. – P. 235-249.
9. Yeaman, M. R. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance [Text] / M. R. Yeaman, N. Y. Yount // *Pharmacol. Rev.* – 2003. – Vol. 55, N 1. – P. 27-55.
10. Velkov, T., Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into “old” class of antibiotics [Text] / T. Velkov, K.D.

- Roberts, R. L. Nation, P. E. Thompson, J. Li // *Future Microbiol.* – 2013. – Vol. 8, N6. – P. 711-724.
11. Magee, T. V. Discovery of Dap-3 polymyxin analogues for the treatment of multidrug-resistant gram-negative nosocomial infections [Text] / T. V. Magee, M. F. Brown, J. T. Starr et al. // *J. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 56, N 2. – P. 5079-5093.
12. Yahav, D. Colistin: new lessons on an old antibiotic [Text] / D. Yahav, L. Farbman, L. Leibovici, M. Paul // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – Vol. 18. – P. 18-29.
13. Grau-Campistany, A. Membrane interaction of polymyxin B and synthetic analogues studied in biomimetic systems: implications for antibacterial action [Text] / A. Grau-Campistany, F. Rabanal, M. Pujol, Y. Cajal // In: *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences III* [Text] / D. Munoz-Torrero, A. Cortes, E. L. Marino, Eds. – Transworld Research Network, Kerala, India, 2013. – P. 61-76. – ISBN 978-81-7895-605-3.
14. Conly, J. M. Colistin: the phoenix arises [Text] / J. M. Conly, B. J. // *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* – 2008. – Vol. 17, N 5. – P. 267-269.
15. Arnold, T. M. Polymyxin antibiotics for gram-negative infections [Text] / T. M. Arnold, G. N. Forrest, K. J. Messmer // *Am. J. Health-System Pharmacy.* – 2007. – Vol. 64, N 8. – P. 819-826.
16. Landman, D. Polymyxin revisited [Text] / D. Landman, C. Georgescu, A. M. Martin, J. Quale // *Clin. Microbiol. Reviews.* – 2008. – Vol. 21, N 3. – P. 449-465.
17. Kwa, A. I. Polymyxins: a critical review of the current status including recent developments [Text] / A. L. Kwa, V. H. Tam, M. E. Falagas // *Ann. Acad. Med. Singapore.* – 2008. – Vol. 37. – P. 870-883.
18. Zavascki, A. P. Polymyxin B treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review [Text] / A. P. Zavascki, L. Z. Goldani, J. Li, R. L. Nation // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2007. – Vol. 60. – P. 1206-1215.
19. Fallagas, M. E. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections [Text] / M. E. Fallagas, S. K. Kasiakou // *Clinical Infection Diseases.* – 2005. – Vol. 40. – P. 1333-1341.
20. Gales, A. C. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004) [Text] / A. C. Gales, R. N. Jones, H. S. Sader // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2006. – Vol. 12. – P. 312-321.
21. McGowan, J. E. Resistance in non-fermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum [Text] / J. E. McGowan // *Am. J. Infect. Control.* – 2006. – Vol. 34, N 5 Suppl. 1. – P. S29-37.
22. Velkov, T. Structure-Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics [Text] / T. Velkov, P. E. Thompson, R. L. Nation, J. Li // *J. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 53, N 5. – P. 1898-1916.
23. Powers, J. P. The relationship between peptide structure and antibacterial activity [Text] / J. P. Powers, R. E. Hancock // *Peptides.* – 2003. – Vol. 24. – P. 1681-1691.
24. Clark, G. C. The rational design of bacterial toxin inhibitors [Text] / G. C. Clark, A. K. Basak, R. W. Titball // *Current Computer-Aided Drug Design.* – 2007. – Vol. 3. – P. 1-12.
25. Tsubery, H. Modulation of the hydrophobic domain of polymyxin B nonapeptide: effect on outer-membrane permeabilization and lipopolysaccharide neutralization [Text] / H. Tsubery, I. Ofek, S. Cohen, M. Einstein, M. Fridkin // *Mol. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 62, N 5. – P. 1036-1042.
26. Tsubery, H. The functional association of polymyxin B with bacterial lipopolysaccharide is stereospecific: studies on polymyxin B nonapeptide [Text] / H. Tsubery, I. Ofek, S. Cohen, M. Fridkin // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39, N 39. – P. 11837-11844.
27. Tsubery, H. Structure-function studies of polymyxin B nonapeptide: implications to sensitization of gram-negative bacteria [Text] / H. Tsubery, I. Ofek, S. Cohen, M. Fridkin // *J. Med. Chem.* – 2000. – Vol. 43, N 16. – P. 3085-3092.
28. Tsubery, H. N-terminal modifications of polymyxin B nonapeptide and their effect on antibacterial activity [Text] / H. Tsubery, I. Ofek, S. Cohen, M. Fridkin // *Peptides* – 2001. – Vol. 22, N 10. – P. 1675-1681.
29. Vaara, M. Novel polymyxin derivatives carrying only three positive charges are effective antibacterial agents [Text] / M. Vaara, J. Fox, G. Loidl, O. Siikanen, J. Apajalahti, F. Hansen, N. Frimodt-Moller, J. Nagai, M. Takano, T. Vaara // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2008. – Vol. 52, N 9. – P. 3229-3236.
30. Vaara, M. Structure-activity studies on novel polymyxin derivatives that carry only three positive charges [Text] / M. Vaara, T. Vaara // *Peptides.* – 2010. – Vol. 31, N 12. – P. 2318-2321.
31. Bai, Y. Structure-Dependent Charge Density as a Determinant of Antimicrobial Activity of Peptide Analogues of Defensin [Text] / Y. Bai, S. Liu, P. Jiang, L. Zhou, J. Li, C. Tang, C. Verma, Y. Mu, R. W. Beuerman, K. Pervushin // *Biochemistry.* – 2009. – Vol. 48, N 30. – P. 7229-7239.
32. Vaara, M. A novel polymyxin derivative that lacks fatty acid tail and carries only three carrying only three positive charges has strong synergism with agents excluded by the intact outer membrane / [Text] M. Vaara, O. Silikanen, J. Apajalahti, J. Fox, N. Frimodt-Moller, H. He, A. Poudyal, J. Li, R. L. Nation, T. Vaara // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2010. – Vol. 54, N 8. – P. 3341-3246.
33. Ali, F. E. A. Pharmacokinetics of novel antimicrobial cationic peptides NAB 7061 and NAB 739 in rats following intravenous administration [Text] / F. E. A. Ali, G. Cao, A. Poudyal, T. Vaara, R. L. Nation, M. Vaara, J. Li // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2009. – Vol. 64. – P. 1061-1064.
34. Lundberg, C. V. Novel polymyxin derivatives are effective in treating experimental *Escherichia coli* peritoneal infection in mice [Text] / C. V. Lundberg, T. Vaara, N. Frimodt-Moller, M. Vaara // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2010. – Vol. 65. – P. 981-985.
35. Kanazawa, K. Contribution of each amino acid residue in polymyxin B<sub>3</sub> to antimicrobial and

- lipopolysaccharide binding activity [Text] / K. Kanazawa, Y. Sato, K. Ohki, K. Okimura, Y. Uchida, M. Shindo, N. Sakura // *Chem. Pharm. Bull.* – 2009. – Vol. 57, N 3. – P. 240-244.
36. Kasuma, N. Development of des-fatty acyl-polymyxin decapeptide analogs with *Pseudomonas aeruginosa*-specific antimicrobial activity [Text] / N. Kasuma, Y. Sato, K. Ohki, K. Okimura, K. Ohnishi, N. Sakura // *Chem. Pharm. Bull.* – 2009. – Vol. 57, N 4. – P. 332-336.
37. Okimura, K. Semi-synthesis of polymyxin B (2-10) and colistin (2-10) analogs employing the trichloroethoxycarbonyl (Troc) group for side chain protection of  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyric acid residues [Text] / K. Okimura, K. Ohki, Y. Sato, K. Ohnishi, N. Sakura // *Chem. Pharm. Bull.* – 2007. – Vol. 55, N 12. – P. 1724-1730.
38. Sakura, N. The contribution of the N-terminal structure of polymyxin B peptides to antimicrobial and lipopolysaccharide binding activity [Text] / N. Sakura, T. Itoh, Y. Uchida, K. Ohki, K. Okimura, K. Chiba, Y. Sato, H. Sawanishi // *Bull. Chem. Soc. Jap.* – 2004. – 77, N 10. – P. 1915-1924.
39. Sato, Y. Novel des-fatty acyl-polymyxin B derivatives with *Pseudomonas aeruginosa*-specific antimicrobial activity [Text] / Y. Sato, M. Shindo, N. Sakura, Y. Uchida, I. Kato // *Chem. Pharm. Bull.* – 2011. – Vol. 59, N 5. – P. 597-602.
40. Martin N. L. Isolation, structural characterization, and properties of mactacin (polymyxin M), a cyclic peptide antibiotic produced by *Paenibacillus kobensis* M [Text] / N. L. Martin, H. Hu, M. M. Moake, J. J. Churey, R. Whittal, R. W. Worobo, J. C. Vederas // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2003. – Vol. 278, N 15. – P. 13124-13132.
41. Hancock, R. E. W. Peptide antibiotics [Text] / R. E. W. Hancock, D. S. Chapple // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 1999. – Vol. 43, N 6. – P. 1317-1323.
42. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited [Text] / H. Nikaido // *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* – 2003. – Vol. 67. – P. 593-656.
43. Pristovsek, P. Solution structure of polymyxin B and E and effect of binding to lipopolysaccharide: an NMR and molecular dynamics study [Text] / P. Pristovsek, J. Kidric // *J. Med. Chem.* – 1999. – Vol. 42. – P. 4604-4613.
44. Pristovsek, P. The search for molecular determinants of LPS inhibition by proteins and peptides [Text] / P. Pristovsek, J. Kidric // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 4. – P. 1185-1201.
45. Mares, J. Interactions of lipopolysaccharide and polymyxin studied by NMR spectroscopy [Text] / J. Mares, S. Kumaran, M. Gobbo, O. Zerbe // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, N 17. – P. 11498-11506.
46. Soon, R. L. Design, synthesis and evaluation of a new fluorescent probe for measuring polymyxin-lipopolysaccharide binding interactions [Text] / R. L. Soon, T. Velkov, F. Chui, P. E. Thompson, R. Kancharla, K. Roberts, I. Larson, R. L. Nation, J. Li // *Anal. Biochem.* – 2011. – Vol. 409, N 2. – P. 273-283.
47. Meredith, J. J. Comparison of the structure and dynamics of the antibiotic peptide polymyxin B and the inactive nonapeptide in aqueous trifluoroethanol by NMR spectroscopy [Text] / J. J. Meredith, A. Dufour, M. D. Bruch // *J. Chem. Phys.* – 2009. – Vol. 113, N 2. – P. 544-551.
48. Bhattacharjya, S. Polymyxin B nonapeptide: conformations in water and in the lipopolysaccharide-bound state determined by two-dimensional NMR and molecular dynamics [Text] / S. Bhattacharjya, S. A. David, V. I. Mathan, P. Balaram // *Biopolymers.* – 1997. – Vol. 41, N 3. – P. 251-265.
49. Bhunia, A. Mapping residue-specific contacts of polymyxin B with lipopolysaccharide by saturation transfer difference NMR: insights into outer-membrane disruption and endotoxin neutralization [Text] / A. Bhunia, S. Bhattacharjya // *Biopolymers.* – 2011. – Vol. 96, N 3. – P. 273-287.
50. Leach, A. R. *Molecular Modelling/Principles and Applications* [Text] / A. R. Leach. – Essex: Addison Wesley Longman Ltd. – 1996. – 597 p. – ISBN 0-582-23933-8.
51. Lu, D. The role of molecular modeling in the biotechnology [Text] / D. Lu, A. Aksimentiev, A. Y. Shin, E. Cruz-Chu, et al. // *Phys. Biol.* – 2006. – Vol. 3. – P. S40-S53.
52. Zhong, S. Computational identification of inhibitors of protein-protein interactions [Text] / S. Zhong, A. T. Macias, A. D. MacKerrel Jr. // *Current Topics in Medicinal Chemistry.* – 2007. – Vol. 7. – P. 63-83.
53. Krieger, E. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA - a self-parameterizing force field [Text] / E. Krieger, G. Koraimann, G. Vriend // *Proteins.* – 2002. – Vol. 47. – P. 393-402.
54. Krieger, E. Making optimal use of empirical energy functions: force field parameterization in crystal space [Text] / E. Krieger, T. Darden, S. Nabuurs, A. Finkelstein, G. Vriend // *Proteins.* – 2004. – Vol. 57. – P. 678-683.
55. Kreiger, E. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modelling: four approaches that performed well in CASP8 [Text] / E. Kreiger, K. Joo, J. Lee, J. Lee, S. Raman, J. Thompson, M. Tyka, D. Baker, K. Karplus // *Proteins.* – 2009. – Vol. 77, Suppl. 9. – P. 114-122.
56. Krieger E, Dunbrack RL Jr, Hooft RW, Krieger B (2012) *Methods Mol Biol.* 819, 405-421.
57. Ferguson, A. D. A conserved structural motif for lipopolysaccharide recognition by procaryotic and eucaryotic proteins [Text] / A. D. Ferguson, W. Welte, E. Hofmann, B. Lindner, O. Holst, J. W. Coulton, K. Diederichs // *Structure.* – 2000. – Vol. 8. – P. 585-592.
58. Duan, Y. A Point-Charge Force Field for Molecular Mechanics Simulations of Proteins [Text] / Y. Duan, C. Wu, S. Chowdhury, M. C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee // *J. Comput. Chem.* 2003. – Vol. 24. – P. 1999-2012.
59. Essman, U. A smooth particle mesh Ewald method [Text] / Essman U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG // *J. Chem. Phys. B.* – 1995. – Vol. 103. – P. 8577-8593.

60. Anderson, A. C. Structure-based functional design of drugs: from target to lead compound [Text] / A. C. Anderson // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 823. – P. 359-366.
61. Trott, O. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading [Text] / *J. Comput. Chem.* – 2010. – Vol. 31, N 2. – P. 455-461.
62. Wang, J. Development and testing of a general amber force field [Text] / J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case // *J. Comput. Chem.* – 2004. – Vol. 25, N 9. – P. 1157-1174
63. Jakalian, A. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation [text] / A. Jakalian, D. B. Jack, C. I. Bayly // *J. Comput. Chem.* – 2002. – Vol. 23, N 15. – P. 1623-1641.
64. David, S. A. Towards a rational development of anti-endotoxin agents: novel approaches to sequestration of bacterial endotoxins with small molecules. *J. Mol. Recognit.* – 2001. – Vol. 14, N6. – P. 370-387.

**MOLECULAR MODELING STUDY OF THE CONTRIBUTIONS OF SIDE AMINO ACID RESIDUES OF POLYMYXIN B<sub>3</sub> TO ITS BINDING WITH *E. COLI* OUTER MEMBRANE LIPOPOLYSACCHARIDE**

**Lisnyak Yu. V.**

**Introduction**

Last decades, antimicrobial peptides (AMPs) are the subject of intense investigations aimed to develop effective drugs against extremely resistant nosocomial bacterial pathogens (especially Gram-negative bacteria). In particular, there has been greatly renewed interest to polymyxins, the representatives of AMPs which are specific and highly potent against Gram-negative bacteria, but have potential nephrotoxic side effect. A prerequisite of purposeful enhancement of therapeutic properties of polymyxins is a detailed knowledge of the molecular mechanisms of their interactions with cell targets. Lipopolysaccharide (LPS), the main component of the outer leaflet of outer membrane of gram-negative bacteria, is a primary cell target of polymyxins. The aim of the paper was to study the peculiarities of molecular interactions of polymyxin B<sub>3</sub> with lipopolysaccharide of the outer membrane of gram-negative bacterium.

**Materials and methods**

The complexes of polymyxin B<sub>3</sub> (PmB<sub>3</sub>) and its alanine-derivatives with *E. coli* outer membrane lipopolysaccharide were built and studied by molecular modeling methods (minimization, simulated annealing, docking). Atom coordinates of polymyxin B<sub>3</sub> and LPS structures were taken from nuclear magnetic resonance and X-ray crystallography experiments, respectively. The AMBER03 force field was used with a 1.05 nm force cutoff. Longrange electrostatic interactions were treated by the Particle Mesh Ewald method.

**Results and discussion**

Alanine scanning of PmB<sub>3</sub> molecule has been carried out and the role of its side amino acid residues in the formation of complex with lipopolysaccharide has been

investigated. It has been shown that substitutions of polymyxin's Dab residues in positions 1, 3, 5, 8 and 9 for alanine markedly reduce the binding energy of PmB<sub>3</sub>-LPS complex, whereas the similar substitutions of residues in positions 2, 6, 7 and 10 leave the binding energy virtually unchanged. Structural aspects of antimicrobial action of polymyxins have been analyzed. Changes of minimal inhibitory concentrations (MIC) of alanine-derivatives of polymyxin and binding energies in dependence on the alanine substituent position were parallel, except Ala2-PmB<sub>3</sub> mutant.

**Conclusions**

Polymyxin's side Dab residues, especially Dab1, Dab5, Dab 8 and Dab9, essentially contribute to the energy of polymyxin B<sub>3</sub> binding with LPS of the outer membrane. Contribution of the others polymyxin's side residues to the binding energy of the complex of polymyxin B<sub>3</sub> with LPS was insignificant.

**Key words:** polymyxin, lipopolysaccharide, alanine scanning, binding energy