

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Биологический факультет
Кафедра биоинженерии

Взаимодействие потенциал-зависимых натриевых
каналов с модулирующими пептидами
Modulation of voltage-gated sodium channels by short peptides

Дипломная работа
студентки V курса
Т.К. Горковец

Научный руководитель:
к.ф.-м.н., А.К. Шайтан

Москва, 2014

Аннотация

Работа посвящена изучению взаимодействия потенциал-зависимого натриевого канала NavAb из бактерии *Arcobacter butzleri* с модулирующими пептидами.

В работе проводится обзор литературных данных по натриевым потенциал-зависимым каналам, описываются теоретические основы компьютерного молекулярного моделирования в рамках классических силовых полей.

Практическая часть работы состоит в применении методов моделирования по гомологии, докинга и классической молекулярной динамики для построения и изучения взаимодействия потенциал-зависимого ионного канала NavAb и модулирующих пептидов. На основе полученных данных были сделаны выводы о положении сайта связывания пептидов, о характере их взаимодействий с каналом и были предложены ключевые аминокислотные остатки, играющие большую роль в образовании контактов.

Содержание

<u>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</u>	<u>4</u>
<u>ВВЕДЕНИЕ</u>	<u>5</u>
<u>ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ</u>	<u>7</u>
<u>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</u>	<u>8</u>
1.1. ОБЪЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ: НАТРИЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫЙ КАНАЛ И МОДУЛИРУЮЩИЕ ПЕПТИДЫ	8
1.1.1. ФУНКЦИИ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА, ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ НАРУШЕНИИ РАБОТЫ КАНАЛОВ	8
1.1.2. ОБЩЕЕ СТРОЕНИЕ ИОННЫХ КАНАЛОВ, КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА NavAb.	12
1.1.3. СОПРЯЖЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОГО ДОМЕНА С ПОРОВЫМ И ПРОЦЕСС ОТКРЫТИЯ/ЗАКРЫТИЯ КАНАЛА (ГЕЙТИНГА). РАЗЛИЧНЫЕ СОСТОЯНИЯ КАНАЛА	20
1.1.4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МОДУЛИРУЮЩИХ ПЕПТИДОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ	23
1.2. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ	27
1.2.1. МОДЕЛИРОВАНИЕ ПО ГОМОЛОГИИ	27
1.2.2. БЕЛОК-ПЕПТИДНЫЙ ДОКИНГ	27
1.2.3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА	28
<u>ГЛАВА 2. СОЗДАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МОДЕЛЕЙ</u>	<u>31</u>
2.1. УДЛИНЕНИЕ СПИРАЛИ S6 КАНАЛА NavAb С ПОМОЩЬЮ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПО ГОМОЛОГИИ	31
2.2. ДОКИНГ ПЕПТИДОВ MGMRKIVSALISVIPGML К КАНАЛУ	32
	2

2.3. ДОБАВЛЕНИЕ МЕМБРАННОГО БИСЛОЯ И РАСТВОРИТЕЛЯ	34
<u>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</u>	<u>35</u>
3.1. ПЕПТИД В ВОДЕ. ДИНАМИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ПЕПТИДА	35
3.2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАНАЛА С МОДУЛИРУЮЩИМИ ПЕПТИДАМИ	40
3.2.1 АНАЛИЗ RMSD	40
3.2.2. АНАЛИЗ КОНТАКТОВ	41
<u>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</u>	<u>45</u>
ВЫВОДЫ	45
<u>БЛАГОДАРНОСТИ</u>	<u>46</u>
<u>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</u>	<u>47</u>
<u>ПРИЛОЖЕНИЕ А.</u>	<u>54</u>
<u>ПРИЛОЖЕНИЕ Б.</u>	<u>55</u>

Список сокращений

АТФ	аденозинтрифосфат
МД	молекулярная динамика
ОФ	оценочная функция
ПД	потенциал действия
ПОФХ	пальмитоилолеилфосфатидилхолин
СФ	селективный фильтр
ТМ	трансмембранный

Введение

Транспорт ионов и многих других веществ через мембрану лежит в основе многих физиологических функций живой клетки. Этот транспорт может осуществляться по градиенту электрохимического потенциала и против. Во втором случае для переноса молекул через мембрану требуются затраты энергии. Перенос ионов по градиенту осуществляется с помощью ионных каналов.

Ионные каналы являются макромолекулярными порами в клеточной мембране, зачастую обладающими селективностью к определенному типу ионов. Они играют основную роль в генерации потенциала действия (ПД), что лежит в основе проведения импульса в нервных и мышечных клетках.

Нарушения в работе потенциал-зависимых ионных каналов приводят к весьма серьезным заболеваниям нервной, мышечной и сердечно-сосудистой систем, таким как эпилепсия, миопатия, нейропатическая боль и синдром внезапной детской смерти (George, 2005; Kim, 2014; Schwartz et al., 2000, 2000; Wang et al., 1995). Подавляющее большинство этих заболеваний возникает при неправильном ответе канала на изменение потенциала на мембране. Последние исследования показали, что эти дисфункции являются следствием нарушений в сопряжении между поровой частью канала и потенциал-зависимой. Таким образом, именно правильное взаимодействие этих двух частей канала лежит в основе нормальной физиологии возбудимых тканей.

Для дальнейшего лечения каналопатий – заболеваний, связанных с нарушениями в работе ионных каналов – необходимо понимание механизмов этого взаимодействия. Молекулярное моделирование является полезным инструментом исследования, так как оно позволяет получить данные о работе каналов на молекулярном и атомном уровнях.

Механизм сопряжения до сих пор полностью не изучен и описывается различными гипотезами. Одна из гипотез основывается на образовании

нековалентных взаимодействий между потенциал-зависимой и поровой частями канала. В соответствии с ней участки канала из различных функциональных доменов взаимодействуют друг с другом как рецептор с лигандом. Несколько последних экспериментальных работ в этой области были посвящены изучению такого рода сопряжения с помощью модулирующих пептидов, которые имитировали различные участки канала (Choveau et al., 2011, 2012). Экспериментально было показано, что одни пептиды блокируют канал в закрытом состоянии, а другие в открытом. Важно понять, какого рода взаимодействия возникают при этом и какие аминокислотные остатки играют наибольшую роль.

Изучение структуры натриевых каналов показало, что механизм их сопряжения может быть объяснен вышеописанной гипотезой. Именно поэтому они стали объектом нашего изучения. Нами был выбран канал NavAb из бактерии *Arcobacter butzleri*, так как для него известна кристаллографическая структура с pdb-кодом 4ekw (Payandeh et al., 2011) и находится в закрытом-активированном состоянии.

На основе экспериментальных работ (Choveau et al., 2011) был выбран модулирующий пептид MGMRKIVSALISVIPGML, как оказывающий наибольший эффект на канал.

Постановка задачи

В данной работе была поставлена цель с помощью методов молекулярного моделирования изучить взаимодействие модулирующего пептида MGMRKIVSALISVIPGML с каналом NavAb, а так же предложить изменение последовательности пептида для увеличения его сродства к каналу. Особый интерес представляли получение стабильной структуры комплексов, поиск сайта связывания, поиск наиболее значимых аминокислотных остатков и возможная оптимизация пептида. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

- 1) Анализ траекторий динамики пептидов в водной ячейке
- 2) Создание модели канала NavAb с удлинёнными спиралями S6
- 3) Докинг пептидов к каналу
- 4) Анализ взаимодействия между каналом и пептидами на основе контактных карт

Глава 1. Обзор литературы

В первой части данной главы приведено описание функций и структуры объектов изучения, основанное на теоретических и экспериментальных данных, известных из литературы. Во второй части приводится краткое описание методов моделирования по гомологии, докинга и молекулярной динамики, использованных в работе.

1.1. Объекты изучения: натриевый потенциал-зависимый канал и модулирующие пептиды

В данном разделе приводится описание функций потенциал-зависимых каналов в организме человека, их строение и основы работы. Так же приводится описание экспериментальных данных о взаимодействии каналов с модулирующими пептидами. Семейство натриевых каналов включает в себя каналы прокариот и эукариот. Экспериментальная работа с первыми проще, а благодаря их гомологии с эукариотическими, исследование работы бактериальных каналов позволяет пролить свет на механизмы работы человеческих каналов, которые представляют наибольший практический интерес.

1.1.1. Функции в организме человека, заболевания, возникающие при нарушении работы каналов

Как барьер отделяющий клетку от окружающей среды, плазматическая мембрана позволяет создать разность концентраций ионов по обе стороны. Эта разность создает градиент концентраций по обеим сторонам мембраны, выливающийся в итоге в электрохимический градиент для каждого иона. Нервные и мышечные клетки, в частности, используют этот градиент для генерации ПД и его распространения (Denac et al., 2000).

Важную роль в этом процессе играют именно ионные каналы. Эти интегральные мембранные белки отвечают за перенос ионов через мембрану.

К настоящему моменту известно большое количество разнообразных каналов, и это число продолжает расти. Их разнообразие усложняет классификацию и номенклатуру. Если отталкиваться от селективности и процесса открытия/закрытия канала (гейтинга), то можно разделить их на несколько групп. В одну из них попадают каналы, активируемые изменениями потенциала на мембране, т.н. потенциал-зависимые каналы. К другим группам относятся, например, лиганд-зависимые каналы, активируемые внеклеточными или внутриклеточными мессенджерами (Denac et al., 2000).

Ионные каналы благодаря своему разнообразию вовлечены в огромное количество жизненно важных процессов. Потенциал-зависимые ионные каналы играют основную роль в физиологии: именно они делают возможными генерацию и распространение нервных импульсов, тем самым осуществляя координацию гораздо более сложных процессов – от простой локомоции до мышления.

В различных тканях нарушения работы ионных каналов приводят к большому числу нарушений, так называемым каналопатиям.

Каналопатии можно разделить на два типа: наследственные и вызванные воздействием различных химических веществ (Kim, 2014).

Дисфункция натриевых каналов в мышечных клетках оказывает влияние на способность волокон сокращаться и расслабляться. Двумя основными симптомами нарушений в работе каналов, находящихся в сарколемме, являются миотония и периодический паралич (Cannon, 1996).

Миотония характеризуется пониженной способностью мышцы к расслаблению с сопутствующим сильным напряжением, вызванным многократно повторяющимися потенциалами действия (ПД) и гипервозбудимостью сарколеммы. Периодический паралич же наоборот представляет собой временную гиповозбудимость мембраны мышечной клетки, при которой ПД не может генерироваться и распространяться (George, 2005).

Как было показано, мутация в гене SCN4A, кодирующем альфа-субъединицу распространенного в мышечных клетках натриевого канала, обуславливает неполное закрытие канала при инактивации, что увеличивает ток ионов через него и приводит к длительной деполяризации мембраны. При этом большая часть натриевых каналов будет инактивирована, что объясняет нарушение проводимости и невозбудимость мышечных клеток при периодическом параличе (Cannon, 1997; Lerche et al., 1993; Mitrović et al., 1995).

В сердце натриевые каналы лежат в основе генерации и распространения ПД от сино-атриального узла к атриовентрикулярному и далее по волокнам Пуркинье. Эти образования относятся к проводящей системе сердца и обуславливают его ритмические сокращения.

Мутация в гене SCN5A, кодирующем альфа-субъединицу одного из основных натриевых каналов, экспрессирующихся в сердечной мышце, приводит наследственной предрасположенности к желудочковой аритмии (врожденный синдром удлиненного QT, идиопатическая фибрилляция желудочков), нарушенной сердечной проводимости (нарушение в проведении нервного импульса по проводящей системе сердца) или к обоим. Так же мутация в SCN5A может приводить к аритмии и синдрому внезапной детской смерти (Grant et al., 2002; Schott et al., 1999; Schwartz et al., 2000; Tan et al., 2001; Wang et al., 1995).

Большинство мутаций приводят к нарушению ответа каналов на изменение потенциала на мембране, что приводит к нарушению проводимости, которое вызывает изменения в работе сердца, в частности, к нарушению ритма сердечных сокращений.

Натриевые каналы играют ключевую роль в нервных клетках, обеспечивая генерацию и распространение потенциала в центрально и периферической нервной системе. Большая часть генов, кодирующих натриевые каналы, экспрессируется именно в клетках нервной системы. И как следствие важности их физиологических функций, именно натриевые

каналы являются основными мишенями для противоэpileптических и обезболивающих препаратов (George, 2005).

Эpileпсия – достаточно распространенное заболевание, поражающее около 0,5-1% от населения земного шара. Его этиология может быть весьма разнообразной: от опухолей, инфекций и травм до криптогенетических форм. С помощью модельных экспериментов было показано, что ионные каналы играют важную роль в развитии этого заболевания. Некоторые мутации в их генах приводят к появлению непрерывного тока натрия через каналы, что вызывает гипervозбудимость нейронов. Однако есть ряд мутаций, влияющих на чувствительность ионных каналов к потенциалу на мембране клеток. Это приводит к замедлению инактивации каналов, нарушая правильный цикл работы ионных каналов (Köhling, 2002; Lossin et al., 2002; Spampanato et al., 2004).

Еще одним заболеванием, в котором натриевые ионные каналы играют непосредственную роль, является нейропатическая боль. Этот вид боли характеризуется спонтанностью и отсутствием какого-либо внешнего раздражителя. Как правило, нейропатическую боль вызывает физическое или химическое поражение непосредственно нервного волокна или же нарушение в нормальном функционировании нервных клеток. В отличие от ноцирецепции и болезненных ощущений, возникающих при воспалении, нейропатическая боль не является защитным механизмом (Ogata and Ohishi, 2002).

Исследования показали, что мутации в гене SCN9A, кодирующем субъединицы изоформ натриевых ионных каналов, экспрессируемых в чувствительных и периферических нейронах, приводят к гипervозбудимости нервных клеток вследствие нарушения потенциал-зависимости каналов и замедлению их деактивации (George, 2005).

Таким образом, мы видим, что ионные каналы являются важным объектом исследования, поскольку именно они лежат в основе нормального

функционирования наших нервной, сердечно-сосудистой и опорно-двигательной систем.

1.1.2. Общее строение ионных каналов, кристаллическая структура NavAb.

Долгое время четвертичная структура ионных каналов была неизвестна. Только в 1998 году удалось закристаллизовать и получить с помощью рентгеноструктурного анализа структуру бактериального pH-зависимого канала KcsA, полученного из *Streptomyces lividans* (Doyle et al., 1998).

Потенциал-зависимые ионные каналы имеют консервативную структуру (рис .1) : четыре субъединицы или гомологичные домены образуют центральную пору, через которую проходит ион и окруженную четырьмя потенциал-зависимыми доменами. Потенциал-зависимые домены состоят из S1-S4 трансмембранных альфа-спиралей, пора образована трансмембранными альфа-спиралями S5 и S6 с P-петлями между ними. Спираль S4 содержит заряженные аминокислоты, которые смещаются при изменении потенциала на мембране, тем самым инициируя открытие центральной поры.

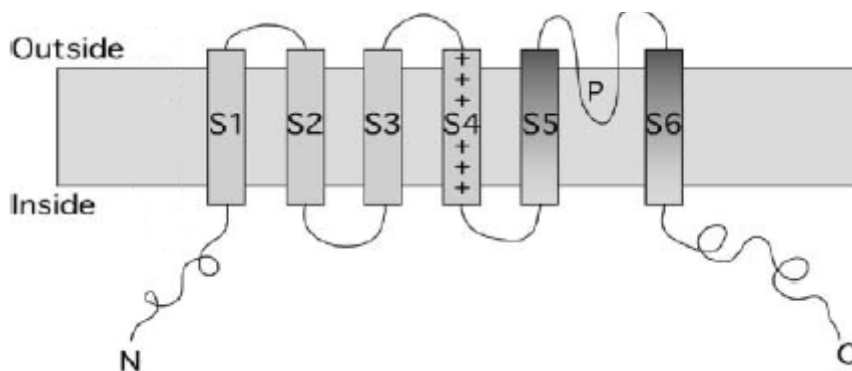


Рисунок 1. Схематичный вид субъединицы потенциал-зависимого канала.

Натриевые каналы позвоночных состоят из двух субъединиц: альфа и бета. Альфа-субъединица состоит примерно из 2000 аминокислотных

остатков, формирующих четыре гомологичных домена, каждый из которых включает шесть трансмембранных спиралей S1-S6 (Catterall, 2014).

Бета-субъединица имеет иммуноглобулин-подобный N-конец, лежащий вне клетки, одну трансмембранную спираль и короткий внутриклеточный сегмент.(Isom et al., 1992, 1995).

Эти субъединицы образует гетеродимер или гетеротример, состоящий из одной альфа-субъединицы и одной или двух бета-субъединиц. Коэкспрессия бета-субъединиц позволяет модулировать кинетику работы канала, а так же реакцию канала на изменение потенциала. Так же внеклеточный иммуноглобулин-подобный участок бета-субъединиц участвует в клеточной адгезии (Brackenbury and Isom, 2011; Kazarinova-Noyes et al., 2001; Malhotra et al., 2000; Ratcliffe et al., 2000; Srinivasan et al., 1998).

Анализ человеческого генома показал, что в нашем теле есть 143 ионных канала, чей порообразующий сегмент сходен с альфа-субъединицей натриевых каналов. Таким образом, потенциал-зависимые каналы и родственные им молекулы образуют одно из самых больших суперсемейств белков и являются частой мишенью для различных лекарств. Удивительно, но именно семейство натриевых каналов является древнейшим в эволюционном плане. Бактериальный натриевый канала NaChBac и ряд других прокариотических каналов являются гомотетрамерами, субъединица которых структурно похожа на домен натриевых каналов млекопитающих. (Koishi et al., 2004; Ren et al., 2001). Это говорит о том, что эти бактериальные натриевые каналы являются эволюционными предками более больших и сложных четырехдоменных каналов эукариот (Yu and Catterall, 2004).

Архитектура натриевых каналов была тщательно изучена после получения трехмерной структуры (pdb-код 4ekw) в высоком разрешении бактериального натриевого потенциал-зависимого канала NavAb, выделенного из *Arcobacter butzleri* (Payandeh et al., 2011). Эта структура помогла обнаружить новую информацию о структурных особенностях потенциал-зависимой активации и инактивации канала, открывании поры,

селективности и проводимости натрия, а так же о механизмах блокирования канала под воздействием лекарственных препаратов.

Данная структура представляет канал, чьи потенциал-зависимые домены активированы, но пока еще закрыта.

Как говорилось выше, спираль S4 потенциал-зависимого домена содержит повторяющиеся мотивы из положительно-заряженных аминокислотных остатков, обычно аргининов, за которыми следуют два гидрофобных остатка. Такая последовательность необходима, чтобы при образовании вторичной структуры все заряженные аминокислоты были на одной стороне поверхности альфа-спирали друг над другом.

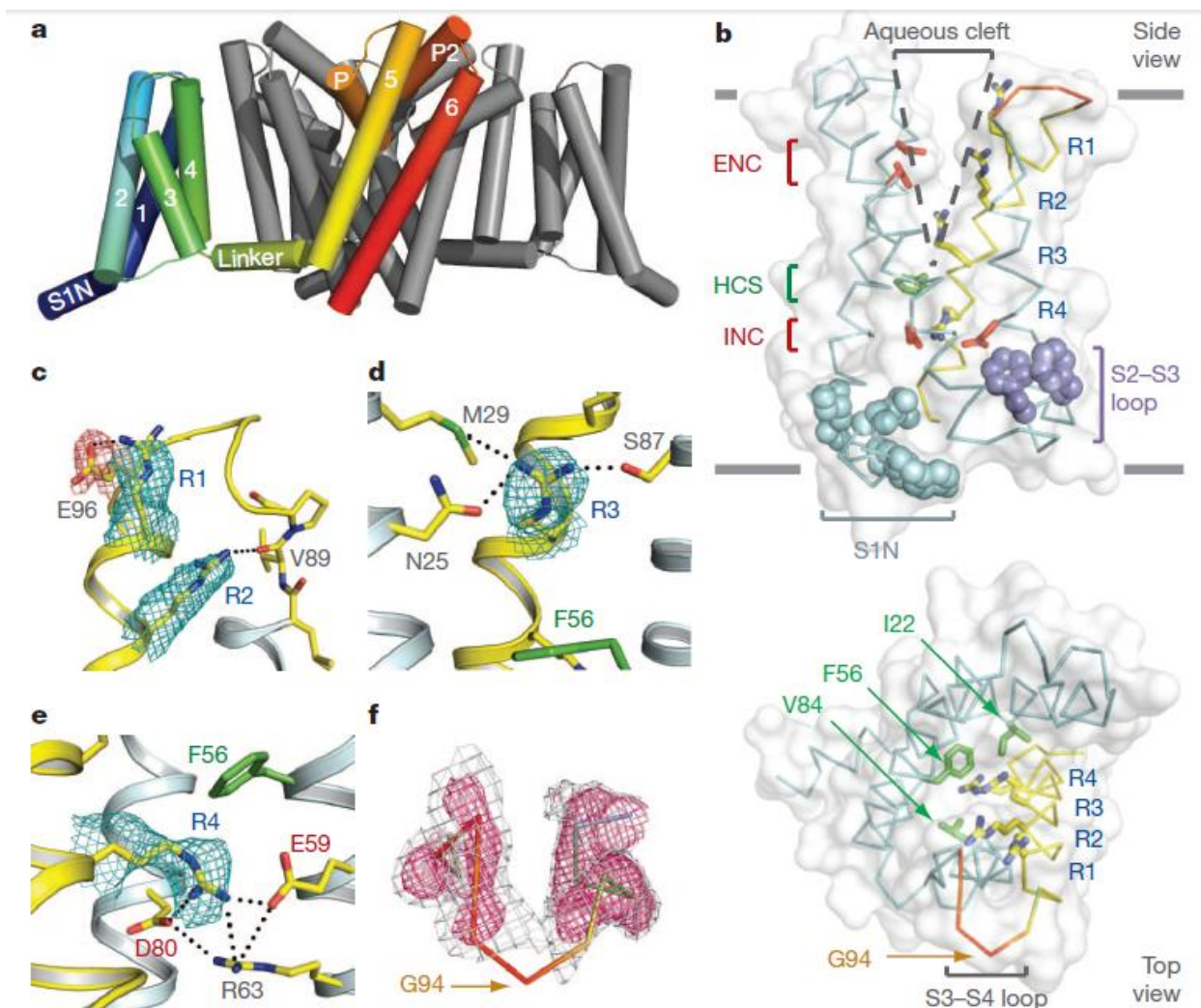


Рисунок 2. Структура NavAb и активированного потенциал-зависимого домена. а – структурные элементы канала (одна субъединица выделена цветом, 1-6 соответствуют трансмембранным спиралям S1-S6). б – Вид сверху и вид сбоку на потенциал-зависимый домен, демонстрирующие ENC (красный), INC (красный), HCS (зеленый), остатки S1 спирали показаны голубым, остатки S2-S3 петли фиолетовым, остатки S4 спирали – желтым. **с-е** – гидрофобные связи, образованные воротными зарядами (показаны пунктиром). **ф** – S3-S4 петля. (Payandeh et al., 2011)

Воротные заряды R2 и R3 располагаются таким образом, чтобы взаимодействовать с консервативным внеклеточным кластером отрицательных зарядов (ENC, рис 2b), тогда как воротный заряд R4, расположенные ниже, образует контакты с консервативным внутриклеточным кластером отрицательных зарядов (INC, рис 2b). Предполагается, что эти взаимодействия стабилизируют и катализируют движения спирали S4 в поле мембранного потенциала.

Высококонсервативный Arg 63 спирали S2 так же взаимодействует с R4 и INC (Рис 2e) (20). Так же NavAb имеет ряд дополнительных контактов

воротных зарядов: R1 взаимодействует с Gly 96, R2 образует водородные связи с карбонильной группой основной цепи Val 89 спирали S3, а R3 образует водородные связи с Asn 25 и Met 29 спирали S1 и Ser 87 спирали S3 (Рис. 2с-е). Эта консервативная сеть водородных связей обеспечивает комплементарную замену участников в парах, что создает низкоэнергетический путь для движения спирали S4 (Payandeh et al., 2011).

Петля S3-S4 является динамически подвижной, что обеспечивает ее свободные перемещения при сдвиге спирали S4 в процессе гейтинга.

Структурный анализ показал, что участок S1N и петля S2-S3 образуют внутриклеточную поверхность канала. При чем петля S2-S3 является довольно консервативной среди всех потенциал-зависимых ионных каналов. Она содержит два остатка фенилаланина, чьи выступающие боковые цепи, вероятно, стабилизируют потенциал-зависимый домен в мембране во время гейтинга (Long et al., 2007).

Так же на внеклеточной стороне потенциал-зависимого домена находится водная щель глубиной до 10 Å, которая располагается выше гидрофобного сайта перетяжки (HCS, рис 2b). Этот сайт содержит несколько высококонсервативных остатков (Ile 22, Phe 56 и Val 84), которые препятствуют просачиванию ионов при движении спирали S4 в ходе гейтинга.

Несмотря на эволюционное разделение более миллиарда лет назад, потенциал-зависимые домены NavAb и Kv1.2 показывают достаточно высокую степень структурного сходства (Payandeh et al., 2011).

В данной структуре пора находится в закрытом состоянии. Met 221 полностью перекрывает путь для ионов, а положение спиралей S6 хорошо совмещается с другими закрытыми структурами ионных каналов и совершенно отличается от положения спиралей S6 у открытой структуры Kv1.2 (Рис 3а,b).

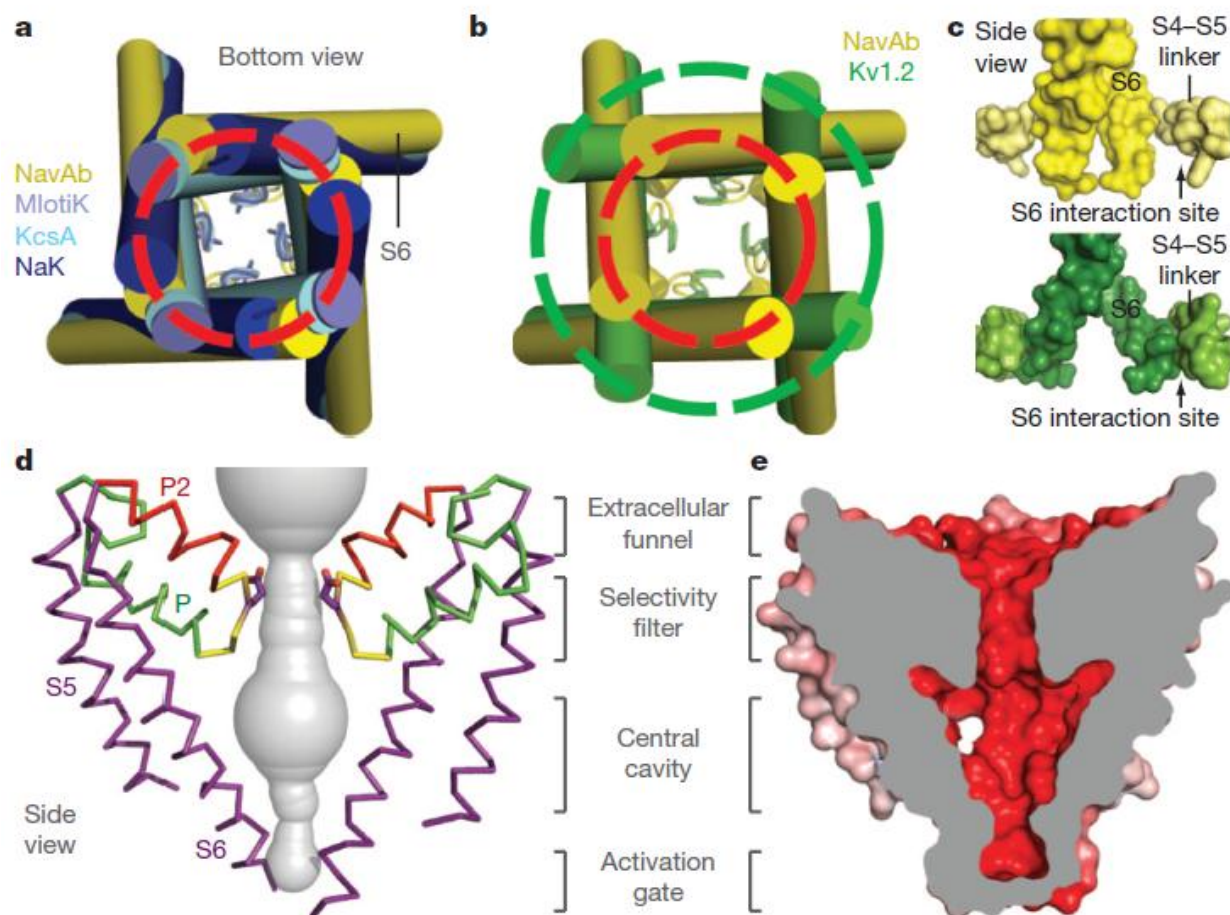


Рисунок 3. Структура поры NavAb. а – выравнивание спиралей S6 различных каналов: NavAb (желтый), MlotiK (фиолетовый), KcsA (голубой) и NaK (синий). Красным выделены позиции C_{α} -атомы Met 221. б – сравнение положения спиралей S6 NavAb (желтый) и Kv1.2/2.1 (зеленый). в – сайт взаимодействия спиралей S6 с линкером S4-S5 (NavAb сверху, Kv1.2/2.1 снизу). д – архитектура поры канала (объем поры показан серым, цветом выделены различные участки спиралей канала). е – поверхность канала, окрашенная по градиенту электростатического потенциала: от -10 до 10 kT (от красного к синему) (Payandeh et al., 2011).

Пора канала состоит из воронкообразной внеклеточной части, селективного фильтра (СФ), центральной полости и внутриклеточных активационных ворот. Большая центральная полость натриевого канала может легко вмещать ион натрия с гидратной оболочкой и имеет гидрофобную поверхность, что ускоряет диффузию иона из нее. Спираль Р способствует стабилизации положения катионов в центральной полости с помощью спираль-дипольного взаимодействия, предложенного для калиевых каналов (Doyle et al., 1998; Zhao et al., 2004). Спираль Р2 образует воронкообразную внеклеточную часть, подобной спирали нет у калиевых

каналов, поэтому ее можно считать специфичной для натриевых и кальциевых каналов.

Проводящий ионы путь является строго отрицательно заряженным, а селективный фильтр образует самое узкое место вблизи наружной мембраны (Рис. 3d,e). Размеры СФ составляют примерно $3,1 \times 5,1$ Å. Исследования с помощью мутагенеза показали, что боковые цепи глутаминовой кислоты играют ключевую роль в селективности канала.

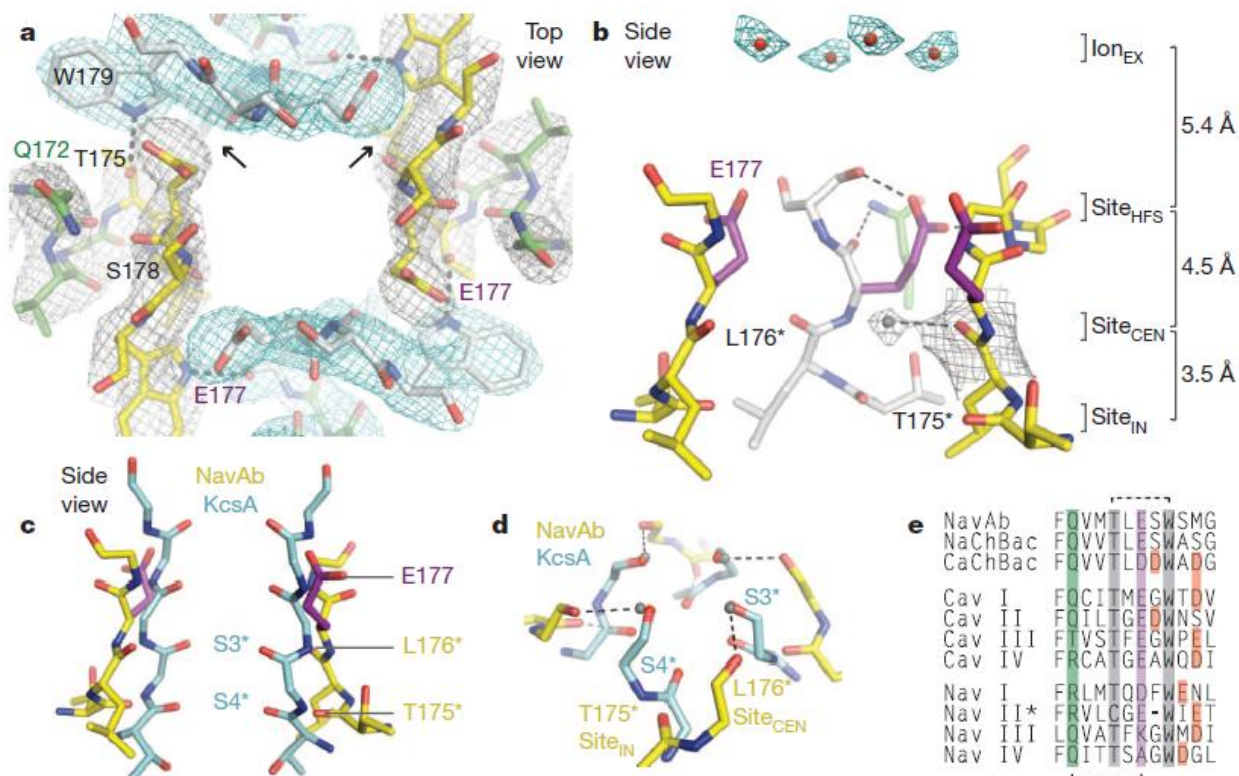


Рисунок 4. Структура селективного фильтра NavAb. а – вид сверху на пору канала. Симметричные участки окрашены в желтый и белый цвета, спираль Р показана зеленым. Пунктиром показаны водородные связи между Thr 175 и Trp 179. б – вид сбоку на СФ, фиолетовым показан Глу 177, взаимодействующий с Gln 172, Ser 178 и основной цепью Ser 180 (взаимодействия показаны пунктиром), предполагаемая молекула воды показана серой сферой. в – суперпозиция СФ NavAb и Kv1.2 (желтым показан СФ NavAb, голубым показан СФ Kv1.2), боковая цепь Glu 177 показана фиолетовым. г – укрупненный вид на сайт CEN и сайт IN, предполагаемые молекулы воды показаны серыми сферами. д – выравнивание СФ различных ионных каналов, гомологи Glu 177 показаны фиолетовым, внешнее кольцо отрицательных зарядов показано оранжевым (Payandeh et al., 2011).

Боковые цепи Glu 177 стабилизируются окружающей их структурой. Спираль Р заканчивается консервативными Thr 175, которые образуют водородные связи с Trp 179 соседней субъединицы. Это взаимодействие позволяет соединить все четыре субъединицы с образованием СФ канала. Из-

за изгиба основной цепи карбонильные группы Thr 175 и Leu 176 оказываются экспонированы наружу для проведения ионов (рис. 4b). Сеть водородных связей стабилизирует структуру СФ канала (Glu 177 с Ser 180 и Met 181, Gln 172 и карбонильная группа Glu 177).

Структура NavAb предоставляет модель селективности и проводимости ионов натрия. Анализ радиуса поры показал, что частично гидратированные ионы натрия могут связываться в сайте образованном боковыми цепями Glu 177 (сайт HFS, рис 4a,b). Наиболее узкий калиевый селективный фильтр может быть помещен внутрь СФ NavAb (рис 4с). Анализ электронной плотности показал наличие четырех молекул воды на расстоянии 2,5 Å от карбонильной группы Leu 176, образующей сайт CEN (рис 4b). Эти молекулы занимают позицию, сходную с положением карбонильных атомов сайта 3 для калиевых каналов (рис 4с,d). Т.о. ион натрия, окруженный четырьмя молекулами воды, может взаимодействовать с карбонильными группами Leu 176 (сайт CEN) и Thr 175 (сайт IN). Вероятно, в отличие от калиевых каналов, NavAb может отбирать и пропускать через себя ионы в гидратированной форме.

Так же структура NavAb предоставляет возможность получить информацию о фармакологических механизмах воздействия токсинов и лекарственных препаратов. Располагающийся на внеклеточной стороне канала Glu 177 представляет собой сайт взаимодействия с блокаторами, такими как тетродотоксин и сакситоксин (Noda et al., 1989). С внутриклеточной стороны могут воздействовать различные местные обезболивающие, антиаритмические и антиэпилептические препараты. Они проникают в канала через открытые ворота внутри клетки и связываются со спиралью S6 (Ragsdale et al., 1994, 1996).

1.1.3. Сопряжение потенциал-зависимого домена с поровым и процесс открытия/закрытия канала (гейтинга). Различные состояния канала

Потенциал-зависимая активация ионных каналов была впервые показана Ходжкиным и Хаксли. Они предсказали, что для этого типа активации натриевых каналов необходимо движение трех заряженных частиц через мембрану клетки под воздействием электрического поля (Hodgkin and Huxley, 1952).

Предсказанное движение этих зарядов было обнаружено как небольшой воротный ток при исследовании гигантского аксона кальмара (Armstrong and Bezanilla, 1973; Keynes and Rojas, 1974).

Спираль S4 натриевых каналов содержит от 4 до 7 повторяющихся мотивов положительно заряженных аминокислотных остатков, за которыми следует два гидрофобных (см. выше). Они и несут воротные заряды в соответствии с моделью скользящей спирали и спирального винта (Catterall, 1986; Guy and Seetharamulu, 1986; Yarov-Yarovoy et al., 2006).

Когда клетка находится в состоянии покоя, внутренняя сторона мембраны заряжена отрицательно, а наружная – положительно. При этом потенциал-зависимые калиевые каналы закрыты, и их S4 спираль расположена ближе к внутриклеточной стороне мембраны (R-состояние). При деполяризации мембраны активируется потенциал-зависимый домен, и S4 спираль двигается вверх, к внешней стороне мембраны клетки. Канал при этом все еще является закрытым, такое его состояние называется активированным (A-состояние). Следующим этапом является открытие канала, что позволяет ионам проходить через него внутрь клетки. Считается, что при длительной деполяризации происходит медленная инактивация канала, вызванная конформационными изменениями в селективном фильтре (Bjellmar et al., 2009; Cordero-Morales et al., 2007; Kiss et al., 1999).

В соответствии с моделью скользящей спирали (спирального винта) S4 располагается трансмембранно и в R-состоянии, и в A-состоянии, а воротные заряды стабилизированы за счет образования ионных пар с соседними отрицательно заряженными остатками. Движение спирали осуществляется при параллельном смещении заряженных остатков с образованием новых контактов (Catterall, 1986; Guy and Seetharamulu, 1986; Shafrir et al., 2008; Yarov-Yarovoy et al., 2006).

Мутации остатков аргинина в спирали S4 уменьшили отклик канала на изменение потенциала на мембране, что подтверждает важность этих остатков в процессе гейтинга (Kontis et al., 1997; Stühmer et al., 1989).

Если сравнить структуру NavAb с активированным потенциал-зависимым доменом, но закрытой порой, и структуру Kv1.2 с весьма сходной конформацией потенциал-зависимого домена и открытой порой, то можно обнаружить некоторые структурные изменения, которые обуславливают открытие канала (рис. 5). Сдвиг спирали S4 наружу, обуславливаемый деполяризацией, сопровождается вращательным движением спиралей S1-S3 вокруг S4, а так же вращение всего потенциал-зависимого домена относительно порового (Yarov-Yarovoy et al., 2012).

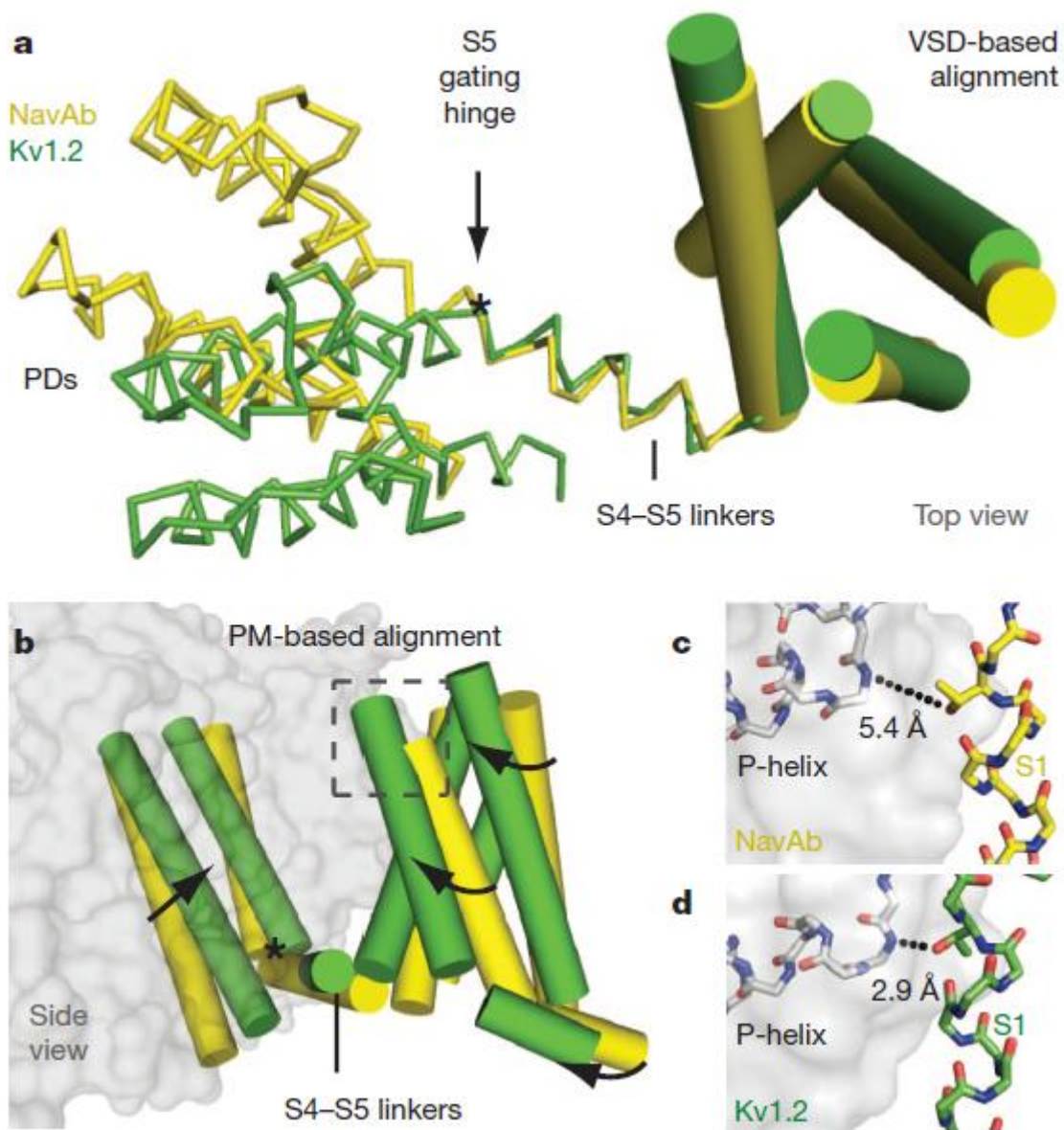


Рисунок 5. Модель открытия активационных ворот. **a** – суперпозиция NavAb (желтый) и Kv1.2/2.1 (зеленый) на основе их потенциал-зависимых доменов (показаны цилиндрами). **b** – суперпозиция NavAb (желтый) и Kv1.2/2.1 (зеленый) на основе поровых доменов (показаны серым), петля S4-S5 показана звездочкой, стрелками показаны сдвиги спиралей. **c, d** – демонстрируют взаимодействия петель P и спиралей S1 (Payandeh et al., 2011).

1.1.4. Экспериментальное изучение влияния модулирующих пептидов на функционирование потенциал-зависимых ионных каналов

В основе правильной работы канала лежит правильное сопряжение между потенциал-зависимым и поровым доменами. На данный момент существуют две модели, описывающие это сопряжение: механистическая модель и лиганд-рецепторная модель (рис. 6) (Choveau et al., 2012).

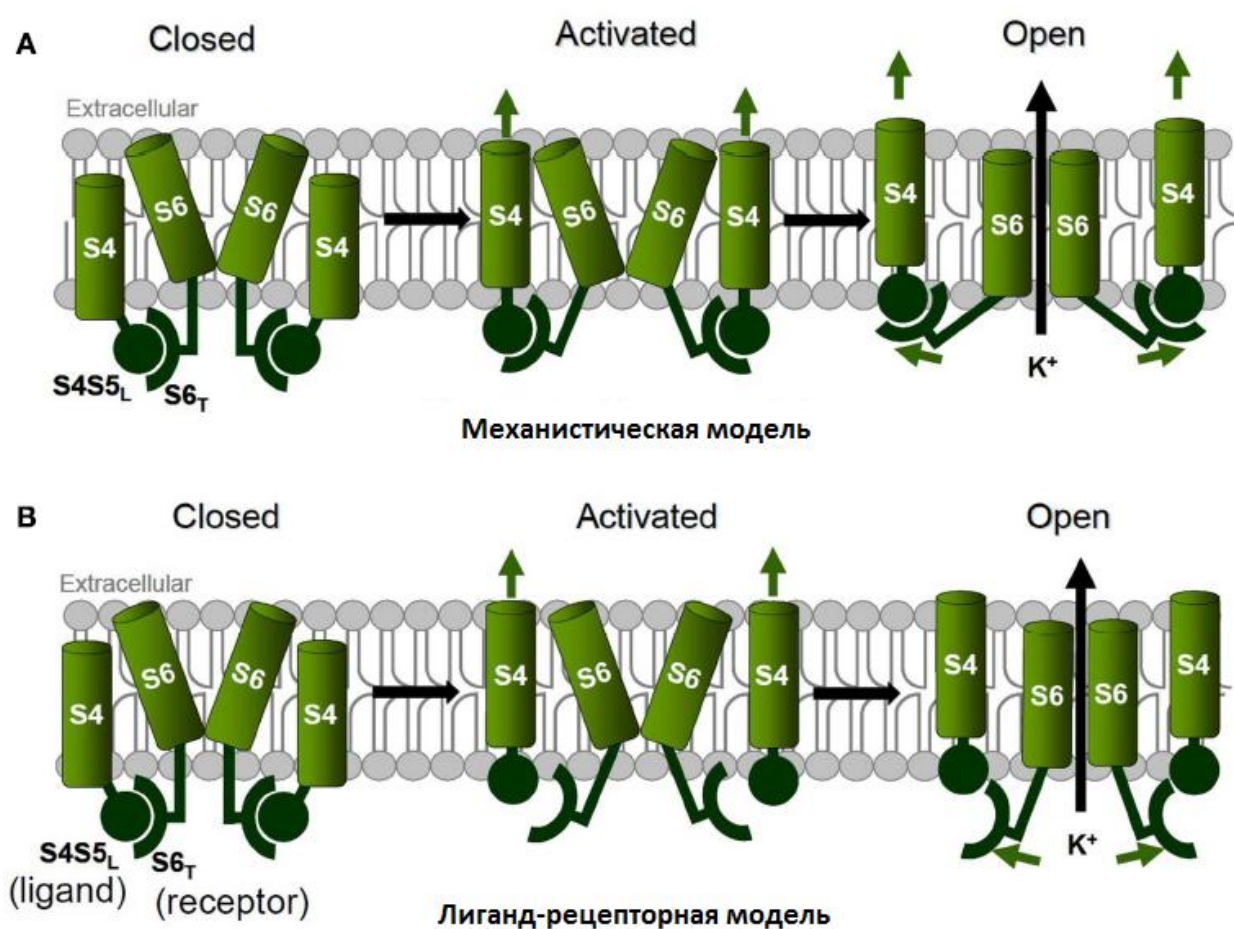


Рисунок 6. Модели сопряжения потенциал-зависимого домена и порового. А – механистическая модель. В – лиганд-рецепторная модель (Choveau et al., 2012).

Механистической модели вполне удовлетворяет работа калиевого потенциал-зависимого канала Shaker. Его потенциал-зависимые домены ковалентно связаны с порой посредством линкеров S4-S5, это взаимодействие является прочным и не зависит от состояния канала. При

открывании канала происходит независимое движение потенциал-зависимых доменов, что приводит к смещению линкеров, которые тянут за собой спирали S6, открывая тем самым канал (Bezanilla et al., 1994; Hoshi et al., 1994; Stefani et al., 1994; Zagotta et al., 1994a, 1994b).

Но не во всех потенциал-зависимых каналах такое сопряжение является прочным, оно может так же зависеть от состояния канала и стабилизировать либо закрытую конформацию, либо открытую. Это можно интерпретировать как лиганд-рецепторное взаимодействие, где линкер S4-S5 является лигандом, а концевой участок S6 – рецептором. В закрытом состоянии они связаны друг с другом, но при деполяризации спираль S4 оттягивает лиганд от рецептора, позволяя каналу открыться (Choveau et al., 2012).

Согласно этой гипотезе были предложены пептиды, повторяющие последовательность канала из участка линкера S4-S5 и концевого участка S6 (Choveau et al., 2011; Lu et al., 2002). Эксперименты проводились на канале KCNQ1 и они показали, что при совместной экспрессии пептида-лиганда и канала наблюдалось уменьшение тока через канал, а при совместной экспрессии пептида-рецептора и канала – наоборот. Это подтвердило гипотезу о том, что линкер S4-S5 может рассматриваться как лиганд, запирающий канал в закрытом состоянии при взаимодействии со своим рецептором, концевым участком S6.

Для эксперимента были взяты пептиды с различными последовательностями, но не все они оказывали эффект на работу канала, что позволяет делать выводы о важности некоторых аминокислотных остатков в сопряжении между потенциал-зависимым доменом и порой.

Эксперименты с мутагенезом так же позволили выделить наиболее важные для связывания остатки (рис. 7).

Таким образом, эксперименты позволили предложить некую кинетическую модель взаимодействия пептидов с каналом (рис. 8). В соответствии с этой моделью пептиды взаимодействуют с каналом, находящемся в незапертом состоянии, что приводит к стабилизации канала в закрытом или открытом состоянии.

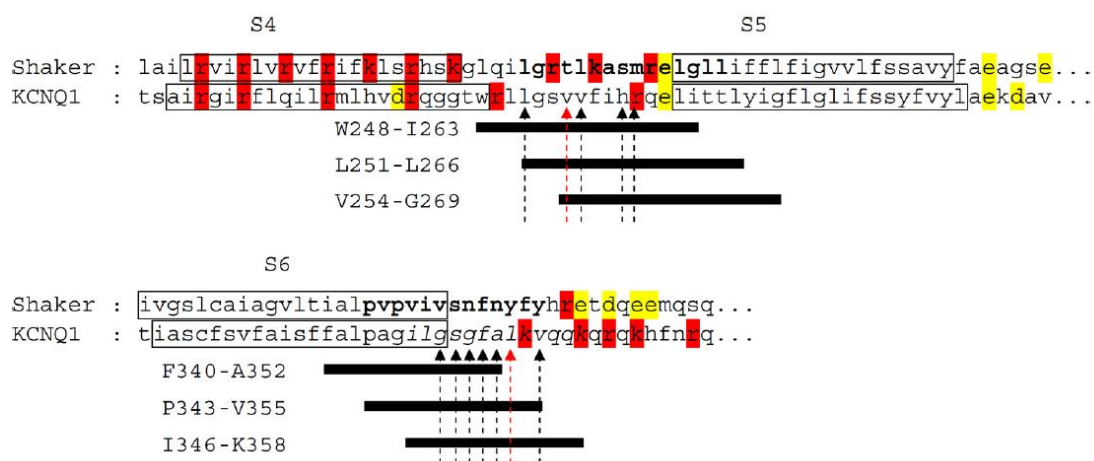


Рисунок 7. Определение гипотетического сайта связывания лиганда. Красным и желтым представлены положительно и отрицательно заряженные аминокислотные остатки соответственно. Черные прямоугольники демонстрируют различные пептиды, выбранные в ходе эксперимента. Стрелки показывают наиболее важные остатки (Choveau et al., 2011).

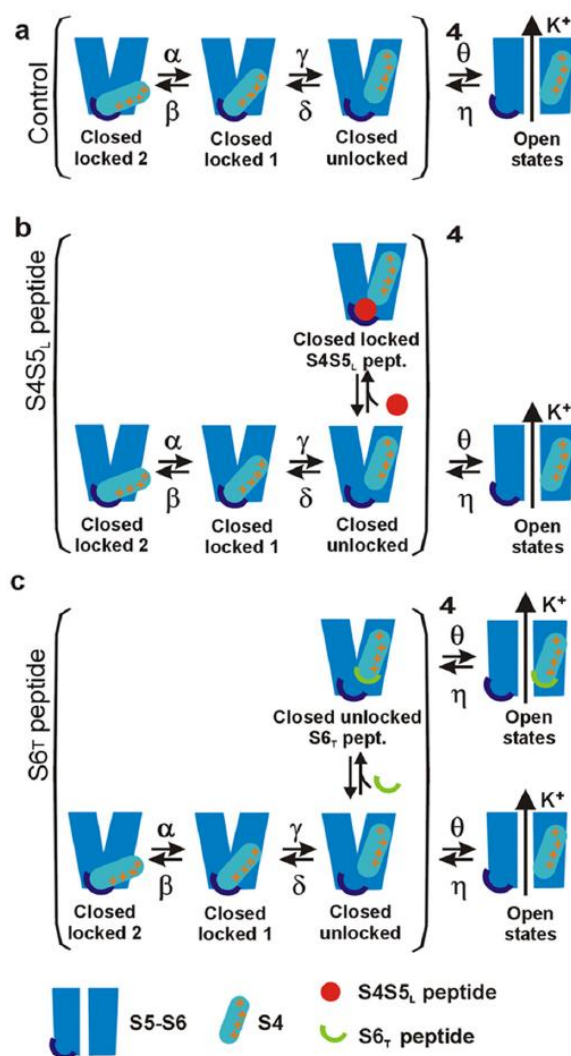


Рисунок 8. Кинетическая модель работы KCNQ1 и его взаимодействия с пептидами (Choveau et al., 2011).

Для натриевых и кальциевых каналов допустимо применение той же лиганд-рецепторной модели, что и для KCNQ1 (Choveau et al., 2011; Labro et al., 2011). Об этом позволяет судить кристаллическая структура NavAb, описанная выше – в ней пора закрыта, тогда как потенциал-зависимый домен активирован (Payandeh et al. 2011). Так же в ней уменьшена поверхность взаимодействия линкера S4-S5 и концевой участка S6. Эти наблюдения говорят в пользу модели спонтанного открытия и закрытия канала (McCusker et al. 2011, Shaya et al. 2011) с линкером S4-S5, блокирующим канал в закрытом состоянии, пока мембрана поляризована. Следовательно, мы можем использовать структуру NavAb для сходного эксперимента с модулирующими пептидами, как и в работе Choveau et al. 2011.

1.2. Методы изучения

В данном разделе первой главы приводится краткое описание методов, используемых в работе: моделирование по гомологии, докинг, молекулярная динамика.

1.2.1. Моделирование по гомологии

Моделирование по гомологии позволяет предсказывать конформацию белков, основываясь на уже имеющихся экспериментально полученных трехмерных структурах белков со сходной аминокислотной последовательностью.

Трехмерная структура белков в одном семействе является гораздо более консервативной, чем их последовательности. Таким образом, если два белка являются схожими на уровне последовательностей, то их структуры так же будут схожи. И зачастую даже белки с непохожей последовательностью имеют сходные трехмерные структуры.

Современный подход к моделированию по гомологии предполагает четыре основных шага: выбор белка-шаблона, выравнивание последовательностей белка-мишени и шаблона, построение трехмерной модели, оценка полученной модели. Если модель не удовлетворяет требованиям, то процедуру повторяют (Martí-Renom et al., 2000).

1.2.2. Белок-пептидный докинг

Метод молекулярного докинга позволяет предсказать конформацию лиганда в активном центре белка и свободную энергию образования комплекса между ними на основе данных о пространственной структуре белка-рецептора и химической структуре лиганда. В качестве лиганда может выступать как низкомолекулярное соединение, так и пептид. В нашей работе лигандом являлся именно пептид из 18 аминокислотных остатков.

Весь процесс можно условно разделить на два этапа — конформационный поиск и оценка результатов.

Конформационный поиск осуществляется с помощью алгоритма, основанного на варьировании торсионных углов лиганда и его перемещения относительно неподвижной структуры белка-мишени. Современные алгоритмы позволяют так же учесть и конформационную подвижность рецептора.

Оценочные функции (ОФ) позволяют вычислить примерную энергию комплексов. Как правило, результатом докинга является не единственное решение, а целый набор, из которого с помощью ОФ выбирается наилучшее. ОФ показывает сродство лиганда к рецептору и помогает оценить правдоподобность комплекса лиганд-рецептор.

Как правило, энергию связывания лиганда с рецептором раскладывают на отдельные слагаемые — термы, описывающие различные физические взаимодействия. ОФ является линейной комбинацией этих термов (Cosconati et al., 2010; Zoete et al., 2009).

1.2.3. Молекулярная динамика

Расчеты проводились с помощью метода молекулярной динамики. МД — метод компьютерного моделирования движений атомов и молекул. Метод основан на решении уравнения движения Ньютона для системы из N взаимодействующих атомов:

$$m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = \vec{F}_i, i = 1 \dots N.$$

Силы являются отрицательными производными потенциалов $U(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N)$:

$$\vec{F}_i = -\left(\frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i}\right).$$

Уравнения решаются одновременно путем интегрирования с малыми шагами. Координаты как функции времени дают траекторию системы.

Используя уравнение движения Ньютона, мы автоматически используем классическую механику для описания движения системы. Это подходит для большинства атомов при нормальной температуре.

Потенциальная энергия системы складывается из нескольких компонент: энергии валентных связей, валентных углов, двугранных углов, плоских групп, ван-дер-ваальсовских и кулоновских взаимодействий.

$$U = U_{bonds} + U_{angles} + U_{dihedral} + U_{improper} + U_{LJ} + U_{qq}.$$

Каждая компонента определенным образом зависит от внутренних координат системы: длин связей, величин углов и т.д. Вид зависимости и параметры подбираются таким образом, чтобы более точно воспроизводить экспериментальные данные. К параметрам относятся: силовые константы, заряды на атомах и геометрические характеристики. Формулы и таблицы параметров, необходимые для вычисления потенциальной энергии называют силовым полем.

В работе использовалось силовое поле CHARMM22 для белков и CHARMM36 для липидов. В этих полях термы имеют следующий вид:

$$U_{bond} = \sum_{bonds} K_b (b - b^0)^2,$$

$$U_{angle} = \sum_{angles} K_\theta (\theta - \theta^0)^2,$$

$$U_{dihedral} = \sum_{dihedrals} K_\varphi (1 + \cos (n\varphi - \delta)) ,$$

$$U_{improper} = \sum_{impropers} K_\omega (\omega - \omega^0)^2,$$

$$U_{LJ} = \sum_{nonb.pairs} \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{ij}^{min}}{r_{ij}} \right)^6 \right] ,$$

$$U_{qq} = \sum_{nonb.pairs} \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}},$$

где b^0 , θ^0 , ω^0 – равновесные значения длин связей и углов; φ , b , θ , ω – текущие значения длин связей и углов; K_b , K_θ , K_ω , K_φ – силовые константы; q_i , q_j – парциальные заряды на атомах ; r_{ij} – расстояние между частицами i и j .

При моделировании объектов с помощью молекулярной динамики используется базовый алгоритм.

1. Входные начальные условия.

- Потенциал взаимодействия U , как функция, зависящая от расположения атомов
- Радиус-векторы r для каждого атома системы
- Скорости v для всех атомов системы.

Входные данные представляют собой, как правило, структурный файл и файл топологии. В структурном файле содержится перечень атомов, содержащихся в белке, и их координат. Файл топологии содержит больше сведений — он включает в себя данные о заряде, зарядовой группе и массе атома. Файл топологии так же имеет стандартную структуру и делится на несколько разделов.

2. Расчет сил.

- Для i -го атома сила:

$$F_i = - \frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i}$$

вычисляется путем нахождения силы взаимодействия двух несвязанных атомов:

$$F_i = \sum_j F_{ij}$$

3. Обновление состояния.

Движение атомов моделируется путем численного решения уравнения движения Ньютона:

$$m_i \frac{\partial^2 \vec{r}_i}{\partial t^2} = \vec{F}_i$$

Если необходимо, то координаты, скорости, энергии, температура, давление и т.д. могут быть выведены в виде графиков.

Глава 2. Создание молекулярных моделей

Эта глава посвящена краткому описанию процесса создания модели канала NavAb с удлиненными спиралями S6, докингу пептидов и созданию моделируемых систем.

2.1. Удлинение спирали S6 канала NavAb с помощью моделирования по гомологии

Т.к. имеющаяся кристаллическая структура канала NavAb имеет слишком короткие спирали S6, то необходимо было их удлинить. В качестве белка-основы была взята недавно полученная в группе D.Minor структура канала NavAe (данные по ней не опубликованы), которая имеет длинные С-концы.

Для построения модели было сделано выравнивание с помощью сервиса ClustalW2 ¹:

```
NavAb      YLRITNIVES-----SFFTK-----FIIYLIVLNGITMGLETSTFMQSF 40
NavAelp    SERQPDVLVGHKVQHPEDETLRGRLAWFIDRPGTQYFIVGLILVNAITLGLMTSPEVTAYL 60
          *  *  .::*                               ::* .          **: **:*.**:** **  .  :
NavAb      GVYTTLFNQIVITIFTIEIILRIYVHRISFFKDPWSLFDFFVVAISLVPTSSGFEILRVL 100
NavAelp    QPWLGWVNTFIIAAFVVEISLRIIADGPRFVRSGWNLFDFSVVAISLVPDSGAFSVLRAL 120
          :  . *  ::*: *.**:** ***  ..  *..  *.***** ***** *.**.:**.*
NavAb      RVLRLFRRLVTAVPQMRKIVSALISVIPGMLSVIALMTLFFYIFAIMATQLFGERFPEWFG 160
NavAelp    RILKVLRLFSMVPRLRRIVEALLRAIPGIAWIALLLLVIIFYVFAVMGTLFAQSFPEWFG 180
          *:***::**.: **:***:***.**: .***:  :  *:  ::***:***:*.**:*.: *****
NavAb      TLGESFYTLFQVMTLESWSMGIVRPLMEVYPYAWVFFIPFIFVVTFFVMINLVVAIIVDAM 220
NavAelp    TLGASMYTLFQVMTLESWSMGIA RPVIEAYPWAWIYFVSFILVSSFTVLNLFFIGIIESM 240
          *** *:*****.***:*.***:***:*.***:*.***:*.***:*.***:*.***:*.***:
NavAb      AILNQKEE- 228
NavAelp    QSAHWEAED 249
          :  :  *
```

Красным отмечен конец кристаллической структуры NavAb. С помощью моделирования структура удлинялась на 10 аминокислотных остатков.

Построение модели осуществлялось с помощью программы MODELLER. За основу брались две структуры: кристаллическая структура

¹ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

NavAb с короткими спиралями S6 и структура NavAe с длинным цитоплазматическим доменом. Последовательности для построения перекрывались, чтобы избежать искажений в новой модели.

MODELLER² построил 50 различных моделей, из которых на основе DOPE-score были выбраны лучшие для дальнейшей оценки при помощи PROCHECK³. Это позволило выбрать наилучшую структуру для дальнейших расчетов (рис. 9).

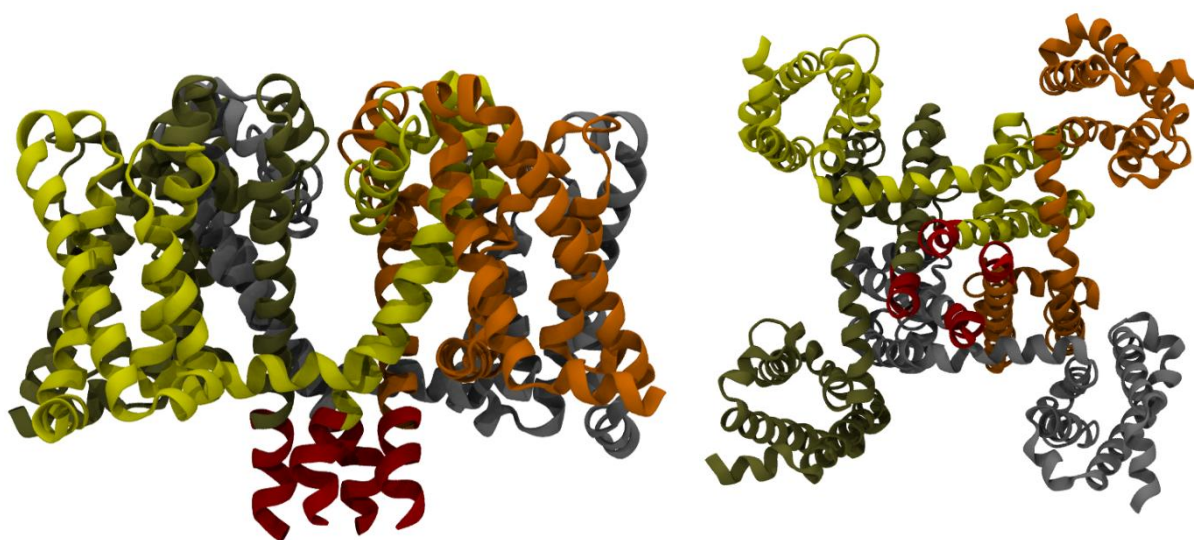


Рисунок 9. Модель канала NavAb, построенная по гомологии. Слева – вид сбоку, справа – вид снизу. Красным выделен участок, достроенный с помощью моделирования по гомологии.

После создания модели она была вставлена в мембрану ПОФХ и отрелаксирована в течении 100 нс.

2.2. Докинг пептидов MGMRKIVSALISVIPGML к каналу

В нашей работе мы исследовали взаимодействие канала и пептида, повторяющего последовательность линкера S4-S5, так как имеющаяся структура канала является активированной и закрытой, что позволяет моделировать канал, заблокированный в закрытом состоянии. Для работы с пептидом, повторяющим концевую часть спирали S6, необходима структура канала в открытом состоянии. В качестве мишеней для докинга были взяты

² <https://salilab.org/modeller/>

³ <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>

две структуры: модель полученная с помощью моделирования по гомологии и модель после 100 нс релаксации.

Докинг проводился с помощью пакета AutoDock Vina (Trott and Olson, 2010) и MGTools. Vina был выбран благодаря его высокой точности и скорости, а так же возможно параллельных вычислений.

К каналу докировалось по два пептида так, чтобы они располагались друг напротив друга (рис. 10).

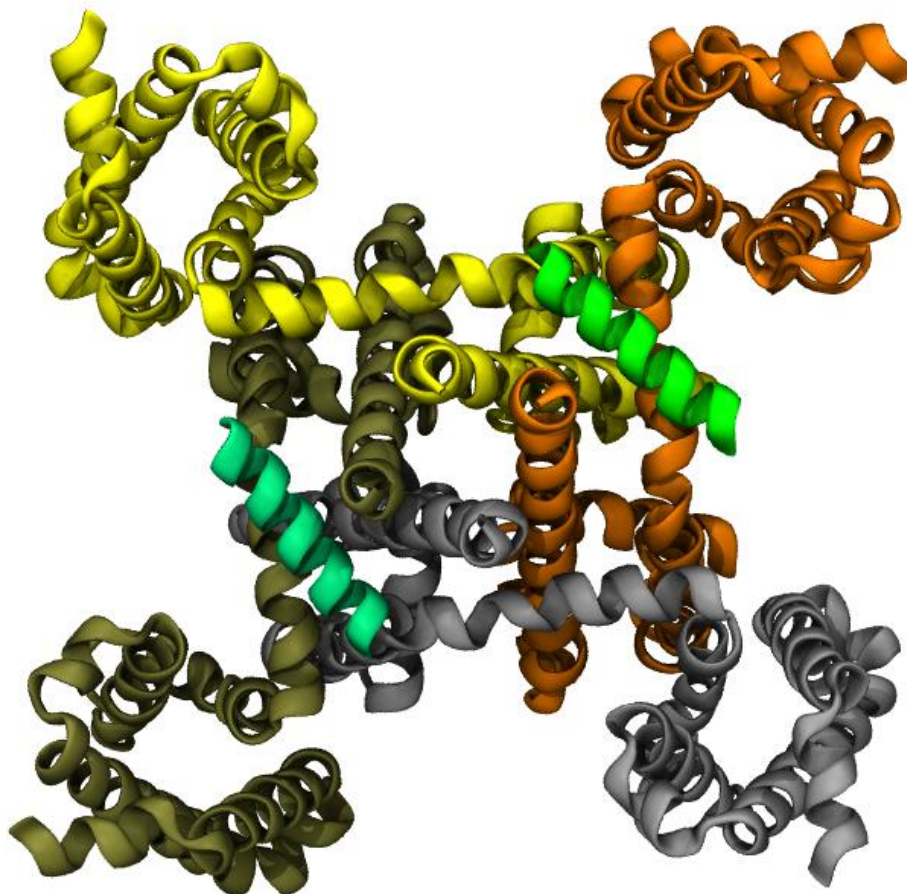


Рисунок 10. NavAb (вид снизу) и два докированных пептида (показаны зеленым).

Всего было получено 80 различных решений докинга, из которых на основе ОФ и кластерного анализа было выбрано 12 пептидов, с которыми и проводился дальнейший анализ.

Поскольку в соответствии с гипотезой Choveau et al. пептиды выполняют роль лигандов, то их правильная ориентация имела важное значение. Все отобранные пептиды имели ориентацию, сходную с линкером S4-S5 самого канала.

2.3. Добавление мембранного бислоя и растворителя

Все системы были построены с помощью пакета VMD⁴ (Humphrey et al., 1996), который позволяет создавать липидный бислой, добавлять молекулы воды и ионы в необходимой концентрации (рис. 11).

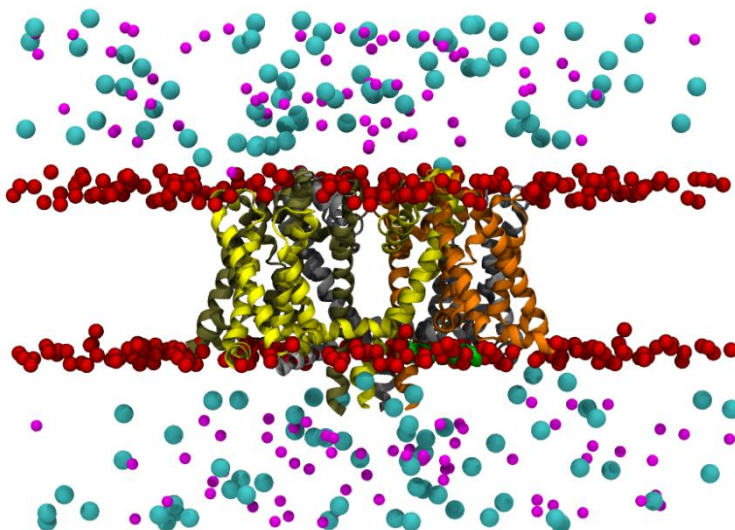


Рисунок 11. Общий вид системы с каналом в мембране. Красным показаны атомы фосфора молекул ПОФХ, голубым - иона хлора, фиолетовым - ионы натрия. Белок показан спиралями в центре, окрашен по субъединицам.

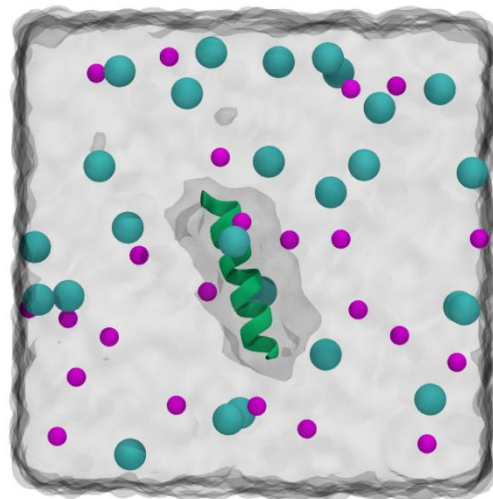


Рисунок 12. Система с пептидом в воде. Пептид показан зеленым, вода представлена серым, ионы хлора - голубым, ионы натрия - фиолетовым.

Расчеты проводились с помощью программного пакета NAMD (Phillips et al., 2005) с использованием силовых полей CHARMM22 и CHARMM36. Системы минимизировались в течении 100 нс (протокол релаксации см. в приложении А). В качестве липида использовался ПОФХ, как один из основных липидов клеточной мембраны. Мембрана строилась в пакете VMD автоматически, затем там же проводилось встраивание канала в нее.

Система для изучения стабильности пептида представляла собой пептид в водном растворе с ионами натрия и хлора. Эта система так же была построена в VMD. Она релаксировалась в течении 100 нс с помощью NAMD и с использованием силового поля CHARMM22 (рис. 12).

⁴ <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>

Глава 3. Результаты и обсуждение

В этом разделе приведены результаты расчетов МД, анализ траекторий и контактных карт.

3.1. Пептид в воде. Динамическая нестабильность вторичной структуры пептида

Релаксация пептида показала, что в воде он обладает динамической структурой: около 80% времени он был в виде альфа-спирали, а примерно 20% он терял свою структуру (рис. 13).

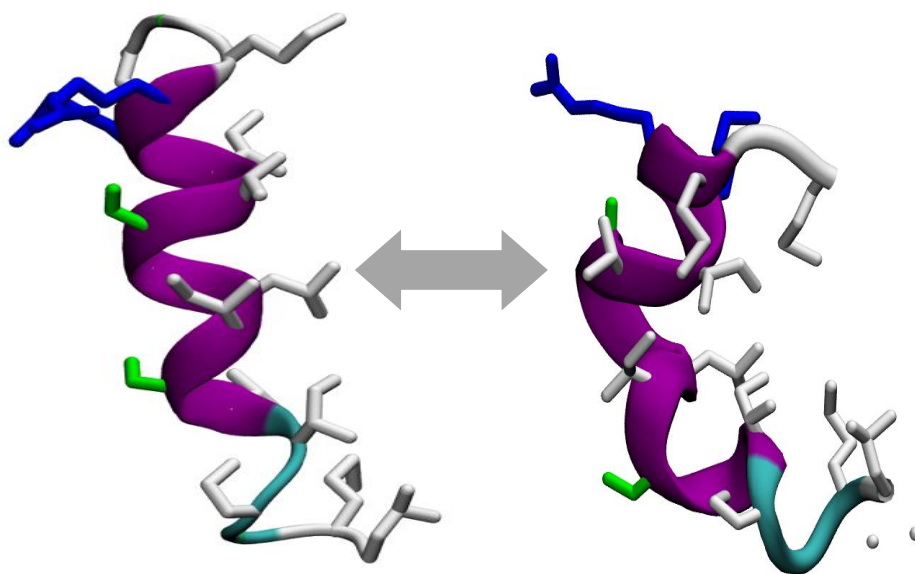


Рисунок 13. Разворачивание пептида в воде.

График RMSD от времени подтверждает тот факт, что структура пептида динамически нестабильна (рис. 14).

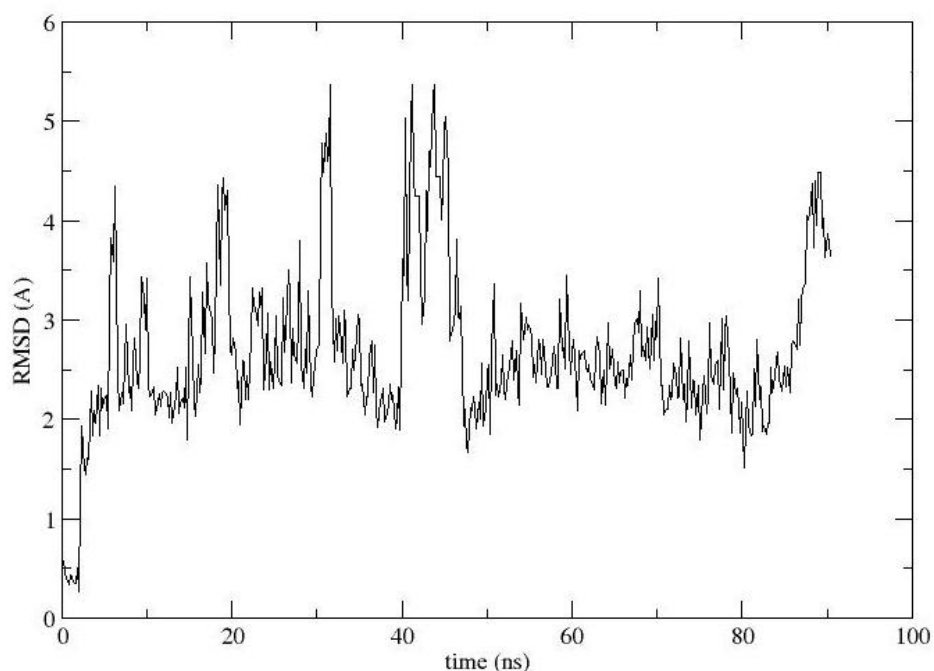


Рисунок 14. График зависимости RMSD пептида от времени (нс). Пики на нем соответствуют тем моментам, когда пептид частично теряет вторичную структуру.

Так же флуктуации вторичной структуры можно увидеть на рисунке 15, где представлена зависимость вторичной структуры от времени. Видно, что большая часть пептида сохраняет укладку в альфа-спираль, тогда как оставшаяся часть то разворачивается, то сворачивается обратно.

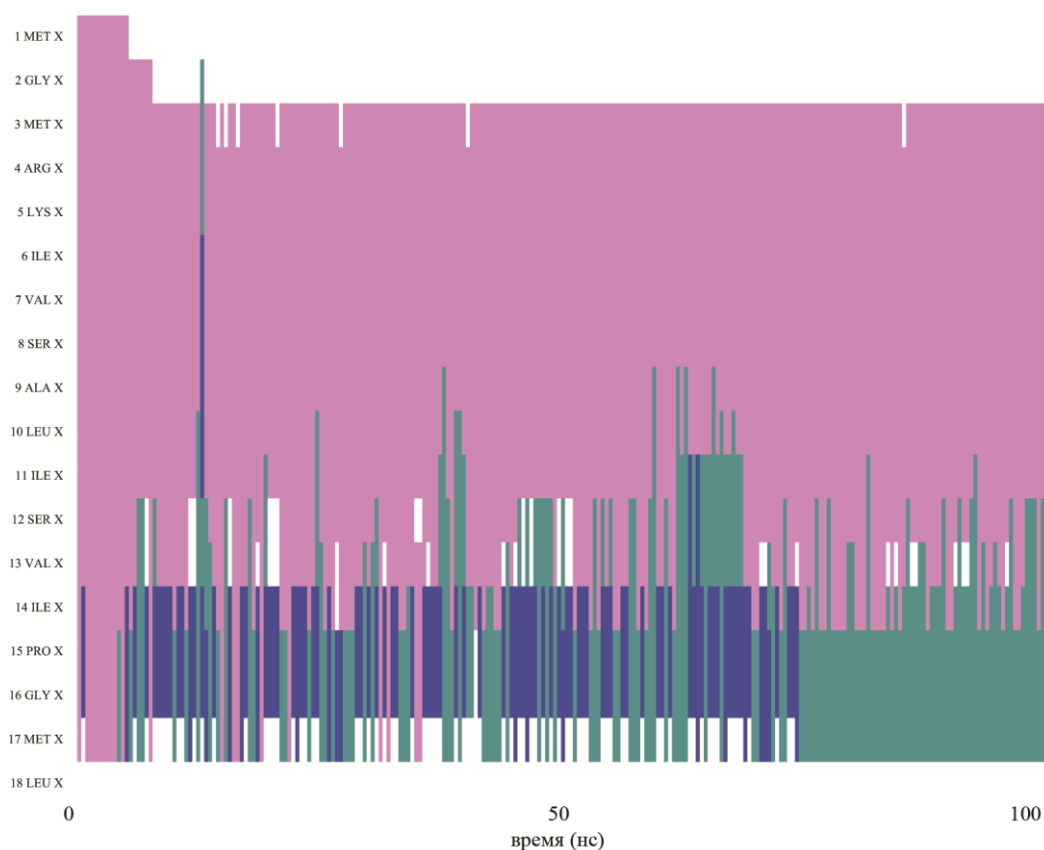


Рисунок 15. Зависимость вторичной структуры от времени. Сиреневым показана альфа-спираль, синим - 3-10 спираль, бирюзовым - повороты, белым - клубок.

Первой гипотезой, объясняющей это явление, было наличие большого числа гидрофобных аминокислотных остатков, которым энергетически более выгодно быть экранированными от растворителя. Эту гипотезу подтверждает тот факт, что при взаимодействии с каналом пептид сохраняет свою структуру.

Однако график гидрофобной поверхности пептида как функции времени (рис.16) не всегда подтверждает эту гипотезу, хотя и в некоторых случаях наличие большого количества гидрофобных остатков явно приводит к изменению структуры пептида.

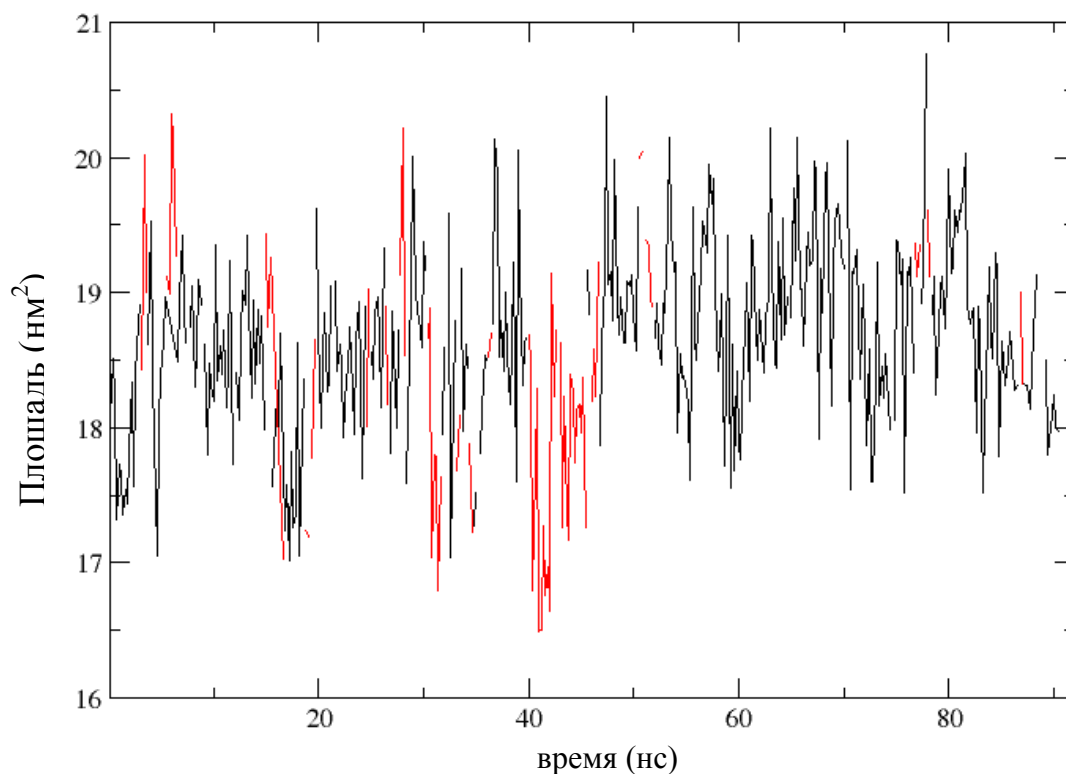


Рисунок 16. Площадь гидрофобной поверхности пептида в зависимости от времени. Красным показаны периоды времени, когда пептид развернут, черным - когда пептид свернут в альфа-спираль.

Так же в состав пептида входит один аминокислотный остаток пролина, который часто вызывает изгиб белковой цепочки, нарушая тем самым структуру.

Вероятно, именно эти два фактора - гидрофобность и наличие пролина в составе – приводят к тому, что пептид теряет свою вторичную структуру.

С помощью онлайн-сервиса NetSurf⁵ были подсчитаны вероятности образования альфа-спиралей конкретными аминокислотными остатками (см. таблицу 1). Из этих значений видно, что если заменить пролин на аланин, то вероятности образования альфа-спирали для него и соседних аминокислотных остатков ощутимо возрастают.

Еще одним вероятным кандидатом на нарушение структуры является Gly 16, который в связи с отсутствием боковой цепи делает остов белковой

⁵ <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/>

цепи избыточно подвижным. В таблице 1 приведены данные для мутантного пептида по Gly 16.

Таблица 1. Вероятность образования альфа-спирали конкретными аминокислотными остатками.

Аминокислота	Вероятность образования альфа-спирали оригинальной последовательности (%)	Вероятность образования альфа-спирали последовательности, где Pro заменен на Ala (%)	Вероятность образования альфа-спирали последовательности, где Gly 16 заменен на Asn (%)	Вероятность образования альфа-спирали последовательности, где Gly 16 заменен на Thr (%)
Met	0,3	0,3	0,3	0,3
Gly	20	20	20	20
Met	80	80	80	80
Arg	90	90	90	90
Lys	90	90	90	90
Ile	90	90	100	90
Val	100	100	100	100
Ser	100	100	100	100
Ala	100	100	100	100
Leu	100	100	100	100
Ile	90	100	100	90
Ser	90	100	100	90
Val	70	100	90	90
Ile	30	90	60	60
Pro	20	90	40	50
Gly	10	50	30	40
Met	10	30	20	30
Leu	0,3	0,3	0,3	0,3

3.2. Взаимодействие канала с модулирующими пептидами

3.2.1 Анализ RMSD

Из отобранных нами 12 конформаций пептидов 7 сохранили вторичную структуру и контакты с каналом. Это дает основания предполагать, что пептид действительно образует стабильное взаимодействие с ионными каналами. Именно это взаимодействие позволяет стабилизировать вторичную структуру пептидов, которая неустойчива в водном растворе.

Графики RMSD (рис.17), построенные для спиралей S6 различных систем (канал без пептидов, канал с пептидами) показал, что присутствие пептидов стабилизирует канал в закрытом состоянии, подтверждая тем самым экспериментальные данные. На графике две самые нижние линии представляют RMSD для систем, где пептиды докировались к уже отрелаксированным структурам, именно поэтому их RMSD изменяется меньше, чем у остальных.

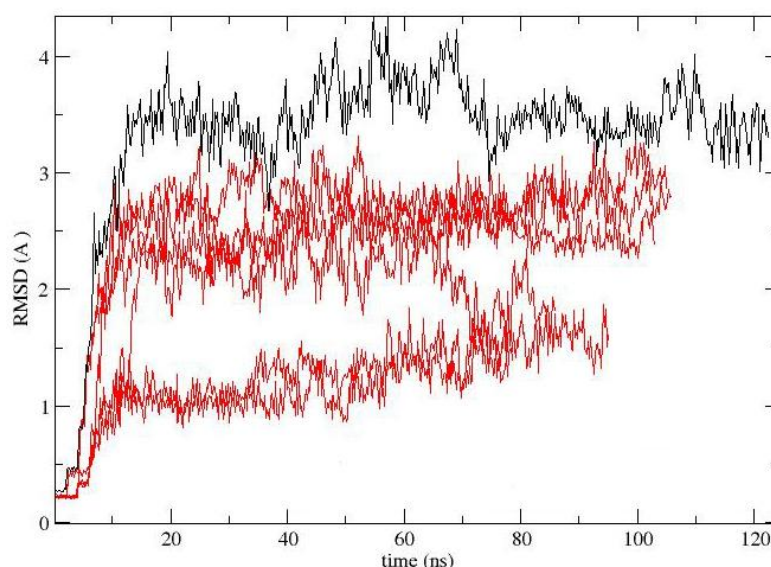


Рисунок 17. График RMSD от времени для различных систем. Черный – RMSD спиралей S6 канала без пептидов, красный – RMSD спиралей S6 каналов с докированными пептидами (все системы).

3.2.2. Анализ контактов

На рис. 18 и 19 видно, что из всех кандидатов лишь один значительно удалился от начального состояния, что говорит о правильности выбранного сайта связывания и ориентации пептида-лиганда по отношению к каналу. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что пептид взаимодействует с каналом как лиганд с рецептором, образуя стабильные контакты.

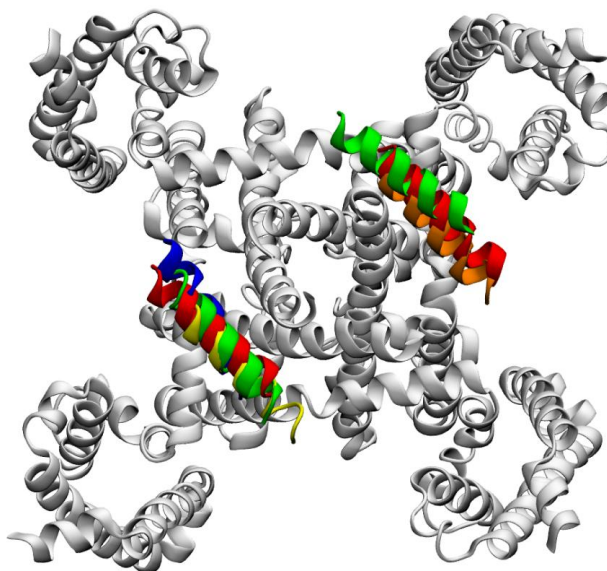


Рисунок 18. Системы канал+пептиды. Начальное состояние. NavAb показан белым, различные конформации пептида выделены цветом.

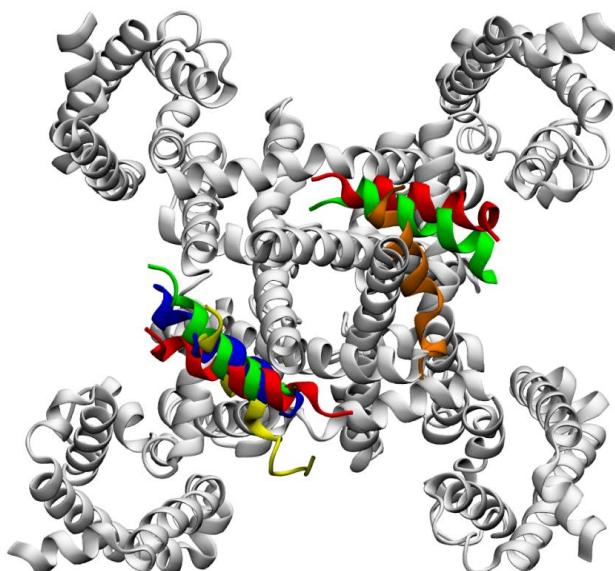


Рисунок 19. Системы канал+пептиды. После 100 нс релаксации. NavAb показан белым, различные конформации пептида выделены цветом.

В экспериментальной работе Choveau et al. 2011 с помощью точечного мутагенеза были выявлены остатки, мутации в которых приводили к значительному снижению эффекта. На основе этих данных мы сделали выравнивание для NavAb, Shaker и KCNQ1, чтобы найти аналогичные по важности остатки для нашей структуры. Хотя данные три канала не являются близкими гомологами, расположение гидрофобных и заряженных аминокислотных остатков на поверхности их линкеров S4-S5 является сходными, а боковые цепи остатков ориентированы в одном направлении. Это дало нам возможность предположить, что для NavAb важными остатками будут те же, что и для KCNQ1.

Ниже представлено выравнивание для фрагмента линкера S4-S5 каналов Shaker, KCNQ1 и NavAb, красным выделены важные остатки для KCNQ1, а зеленым соответствующие им остатки NavAb:

Shaker	LAILRVIRLVRVFRIFKLSRHSKGLQILGRTLKASMRELGLLIFFLFIVG 50
KCNQ1	TSAIRGIRFLQILRMLHVDRQGGTWRL LLGS VVFI HRQ ELITTLTYIGFLGL 50
NavAb	---LRVLRVLRFLRLVTAVPQMR-- KIV SAL ISV IP GMLSVIALMTLFFY 45

Наиболее важные остатки: Ile 199, Leu 122, Ile 123, Ile 126 и Pro 127, которые соответствуют Ile 7, Leu 10, Ile 11, Ile 14 и Pro 15 для пептида.

На основе этих важных остатков и был проведен дальнейший анализ взаимодействий между каналом и пептидами, а именно контактные карты.

Контактные карты строили с помощью утилиты g_mdmat программного пакета GROMACS (Pronk et al., 2013). В соответствии с алгоритмом, расстояние между двумя остатками рассчитывается как минимальная дистанция между любыми двумя атомами этих остатков. За контакт бралось любое расстояние, меньшее 4 Å.

На рисунке 20 представлен пример контактной карты, получаемой с помощью g_mdmat. Изначально матрица, лежащая в основе контактной карты, является симметричной, а индексами в столбцах и строках являются номера остатков для канала и пептида одновременно, что приводит к тому, что некоторые участки матрицы демонстрируют контакты канала или

пептида с самим собой, следовательно, для дальнейшего анализа можно брать лишь небольшой участок, который и представлен на рисунке.

Для получения списка соответствующих контактов были написаны специальные скрипты, позволяющие получить номера остатков, а так же время жизни контактов.

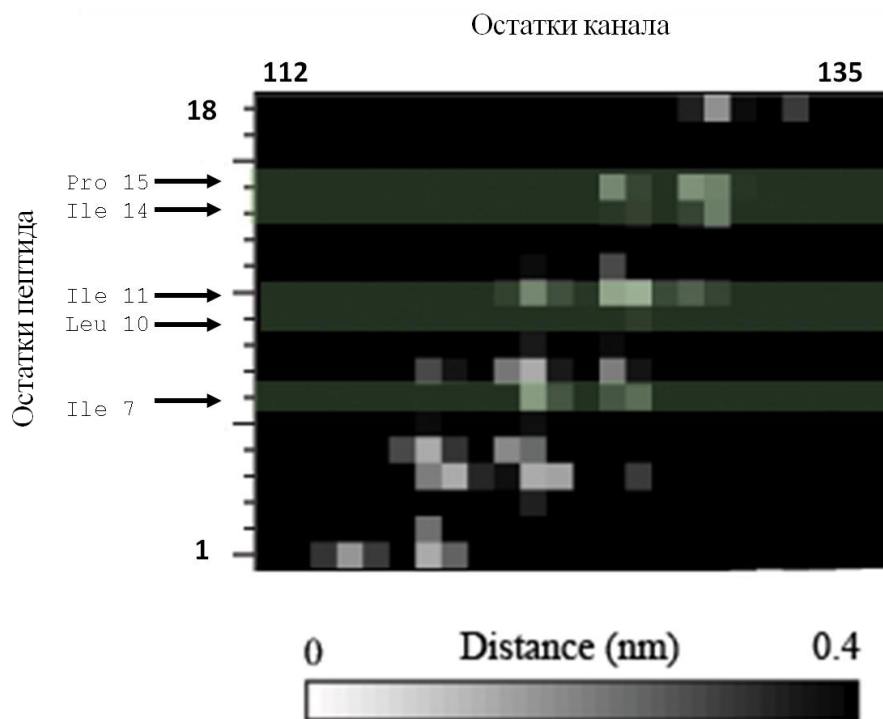


Рисунок 20. Пример контактной карты. Стрелками и светло-зеленым выделены важные остатки.

Были построены контактные карты для каждого десятого фрейма траектории, чтобы оценить время жизни каждого варианта контактов, а также были построены усредненные контактные карты для начальных шагов траектории и ее последней половины, что позволяло оценить глобальные изменения во взаимодействии канала с пептидами (рис. 21, приложение Б).

Видно, что большинство пептидов имели сходную начальную конфигурацию и сохранили ее после релаксации. Также можно заметить, что почти все пептиды не теряют контакты с каналом, если во взаимодействие вовлечены важные остатки, тогда как остальные контакты после релаксации пропадают. Это подтверждает важность данных остатков в образовании взаимодействий с каналом.

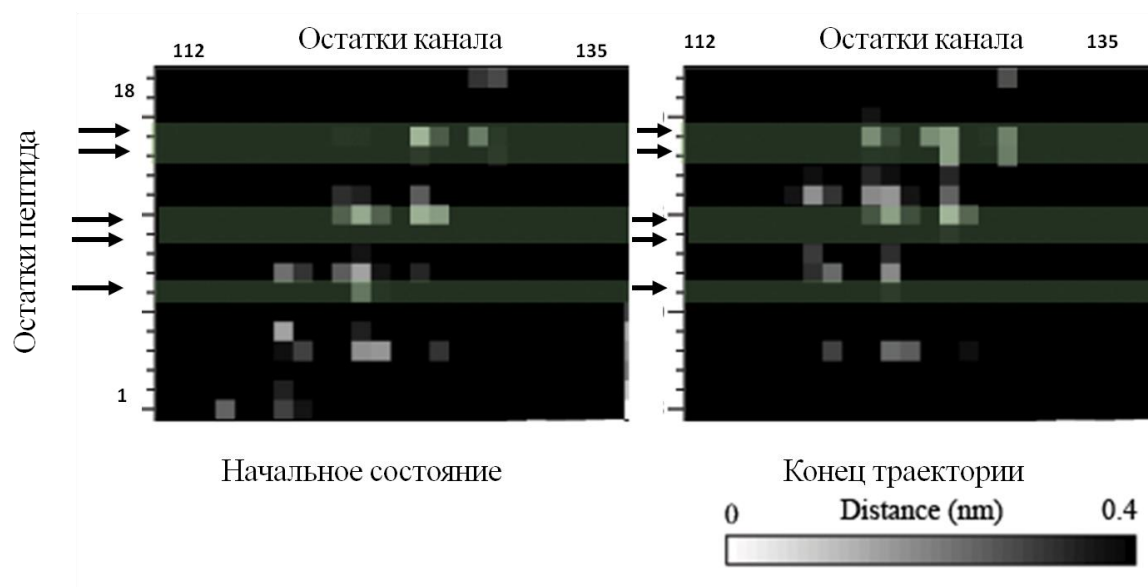


Рисунок 21. Пример контактных карт для одной конформации пептида. Стрелками выделены важные остатки. Слева представлена контактная карта для начального состояния, справа – усредненная карта для конца траектории.

Так же были построены графики количества контактов с участием важных остатков от времени (рис.22). Видно, что с течением времени количество контактов с участием важных остатков меняется несильно и сохраняются в течение всего времени расчета.

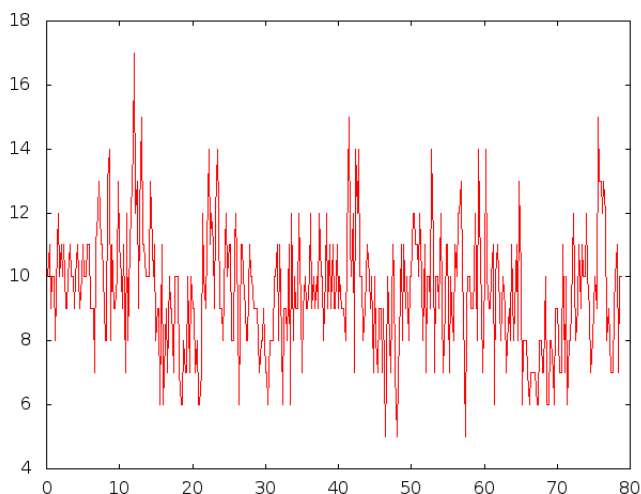


Рисунок 22. Пример графика зависимости количества контактов от времени. По оси абсцисс отложено время в нс, по оси ординат - количество контактов.

Исходя из списка долгоживущих контактов (сохранявшихся более 80% времени) был сделан вывод о том, что контакты пептида с каналом образованы гидрофобными остатками, что согласуется с аналогичными данными для каналов с известными структурами.

Заключение

В работе был проведен анализ взаимодействий канала NavAb с модулирующим MGMRKIVSALISVIPGML-пептидом. Были применены методы молекулярного моделирования, такие, как моделирование по гомологии белок-пептидный докинг и молекулярная динамика, были созданы скрипты для анализа контактных карт.

На основании проделанной работы можно сделать следующие выводы, носящие важный научный характер.

Выводы

- 1) Показано, что в водном растворе вторичная структура пептида нестабильна. Это обуславливается большим количеством гидрофобных остатков, а так же наличием пролина и глицина в составе
- 2) Показано, что пептид может связываться со спиралями S6 канала (предполагаемым сайтом связывания), стабилизируя их положение
- 3) Пептид взаимодействует с каналом NavAb через гидрофобные остатки
- 4) Предложены остатки, вероятно играющие наибольшую роль в образовании контактов пептида с каналом: Ile 7, Leu 10, Ile 11, Ile 14 и Pro 15 – которые могут быть проверены экспериментально.

Благодарности

Выражаю благодарность моему научному руководителю Шайтану Алексею Константиновичу, аспиранту Касимовой Марине Анатольевне за помощь в освоении методов молекулярного моделирования и руководителю группы моделирования и симуляции CNRS доктору Муниру Тареку за возможность пройти стажировку в университете Лотарингии и за полученный опыт.

Список литературы

- 1) Armstrong, C.M., and Bezanilla, F. (1973). Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 242, 459–461.
- 2) Bezanilla, F., Perozo, E., and Stefani, E. (1994). Gating of Shaker K⁺ channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation. *Biophys. J.* 66, 1011–1021.
- 3) Bjelkmar, P., Niemelä, P.S., Vattulainen, I., and Lindahl, E. (2009). Conformational changes and slow dynamics through microsecond polarized atomistic molecular simulation of an integral Kv1.2 ion channel. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000289.
- 4) Brackenbury, W.J., and Isom, L.L. (2011). Na Channel β Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Front. Pharmacol.* 2, 53.
- 5) Cannon, S.C. (1996). Sodium channel defects in myotonia and periodic paralysis. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 141–164.
- 6) Cannon, S.C. (1997). From mutation to myotonia in sodium channel disorders. *Neuromuscul. Disord. NMD* 7, 241–249.
- 7) Catterall, W.A. (1986). Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 953–985.
- 8) Catterall, W.A. (2014). Structure and function of voltage-gated sodium channels at atomic resolution. *Exp. Physiol.* 99, 35–51.
- 9) Choveau, F.S., Rodriguez, N., Abderemane Ali, F., Labro, A.J., Rose, T., Dahimène, S., Boudin, H., Le Hénaff, C., Escande, D., Snyders, D.J., et al. (2011). KCNQ1 channels voltage dependence through a voltage-dependent binding of the S4-S5 linker to the pore domain. *J. Biol. Chem.* 286, 707–716.
- 10) Choveau, F.S., Abderemane-Ali, F., Cuyan, F.C., Es-Salah-Lamoureux, Z., Baró, I., and Loussouarn, G. (2012). Opposite Effects of the S4-S5

Linker and PIP(2) on Voltage-Gated Channel Function: KCNQ1/KCNE1 and Other Channels. *Front. Pharmacol.* 3, 125.

11) Cordero-Morales, J.F., Jogini, V., Lewis, A., Vásquez, V., Cortes, D.M., Roux, B., and Perozo, E. (2007). Molecular driving forces determining potassium channel slow inactivation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1062–1069.

12) Cosconati, S., Forli, S., Perryman, A.L., Harris, R., Goodsell, D.S., and Olson, A.J. (2010). Virtual Screening with AutoDock: Theory and Practice. *Expert Opin. Drug Discov.* 5, 597–607.

13) Denac, H., Mevissen, M., and Scholtysik, G. (2000). Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362, 453–479.

14) Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280, 69–77.

15) George, A.L., Jr (2005). Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J. Clin. Invest.* 115, 1990–1999.

16) Grant, A.O., Carboni, M.P., Neplioueva, V., Starmer, C.F., Memmi, M., Napolitano, C., and Priori, S. (2002). Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J. Clin. Invest.* 110, 1201–1209.

17) Guy, H.R., and Seetharamulu, P. (1986). Molecular model of the action potential sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 508–512.

18) Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500–544.

19) Hoshi, T., Zagotta, W.N., and Aldrich, R.W. (1994). Shaker potassium channel gating. I: Transitions near the open state. *J. Gen. Physiol.* 103, 249–278.

- 20) Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* *14*, 33–38, 27–28.
- 21) Isom, L.L., De Jongh, K.S., Patton, D.E., Reber, B.F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A.L., and Catterall, W.A. (1992). Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* *256*, 839–842.
- 22) Isom, L.L., Ragsdale, D.S., De Jongh, K.S., Westenbroek, R.E., Reber, B.F., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1995). Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* *83*, 433–442.
- 23) Kazarinova-Noyes, K., Malhotra, J.D., McEwen, D.P., Mattei, L.N., Berglund, E.O., Ranscht, B., Levinson, S.R., Schachner, M., Shrager, P., Isom, L.L., et al. (2001). Contactin associates with Na⁺ channels and increases their functional expression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 7517–7525.
- 24) Keynes, R.D., and Rojas, E. (1974). Kinetics and steady-state properties of the charged system controlling sodium conductance in the squid giant axon. *J. Physiol.* *239*, 393–434.
- 25) Kim, J.-B. (2014). Channelopathies. *Korean J. Pediatr.* *57*, 1–18.
- 26) Kiss, L., LoTurco, J., and Korn, S.J. (1999). Contribution of the selectivity filter to inactivation in potassium channels. *Biophys. J.* *76*, 253–263.
- 27) Köhling, R. (2002). Voltage-gated sodium channels in epilepsy. *Epilepsia* *43*, 1278–1295.
- 28) Koishi, R., Xu, H., Ren, D., Navarro, B., Spiller, B.W., Shi, Q., and Clapham, D.E. (2004). A superfamily of voltage-gated sodium channels in bacteria. *J. Biol. Chem.* *279*, 9532–9538.
- 29) Kontis, K.J., Rounaghi, A., and Goldin, A.L. (1997). Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains. *J. Gen. Physiol.* *110*, 391–401.

- 30) Labro, A.J., Boulet, I.R., Choveau, F.S., Mayeur, E., Bruyns, T., Loussouarn, G., Raes, A.L., and Snyders, D.J. (2011). The S4-S5 linker of KCNQ1 channels forms a structural scaffold with the S6 segment controlling gate closure. *J. Biol. Chem.* 286, 717–725.
- 31) Lerche, H., Heine, R., Pika, U., George, A.L., Jr, Mitrovic, N., Browatzki, M., Weiss, T., Rivet-Bastide, M., Franke, C., and Lomonaco, M. (1993). Human sodium channel myotonia: slowed channel inactivation due to substitutions for a glycine within the III-IV linker. *J. Physiol.* 470, 13–22.
- 32) Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450, 376–382.
- 33) Lossin, C., Wang, D.W., Rhodes, T.H., Vanoye, C.G., and George, A.L., Jr (2002). Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron* 34, 877–884.
- 34) Lu, Z., Klem, A.M., and Ramu, Y. (2002). Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels. *J. Gen. Physiol.* 120, 663–676.
- 35) Malhotra, J.D., Kazen-Gillespie, K., Hortsch, M., and Isom, L.L. (2000). Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *J. Biol. Chem.* 275, 11383–11388.
- 36) Martí-Renom, M.A., Stuart, A.C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., and Sali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 291–325.
- 37) Mitrović, N., George, A.L., Jr, Lerche, H., Wagner, S., Fahlke, C., and Lehmann-Horn, F. (1995). Different effects on gating of three myotonia-causing mutations in the inactivation gate of the human muscle sodium channel. *J. Physiol.* 487 (Pt 1), 107–114.
- 38) Noda, M., Suzuki, H., Numa, S., and Stühmer, W. (1989). A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett.* 259, 213–216.

- 39) Ogata, N., and Ohishi, Y. (2002). Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *Jpn. J. Pharmacol.* 88, 365–377.
- 40) Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., and Catterall, W.A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475, 353–358.
- 41) Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kalé, L., and Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781–1802.
- 42) Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M.R., Smith, J.C., Kasson, P.M., van der Spoel, D., et al. (2013). GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 29, 845–854.
- 43) Ragsdale, D.S., McPhee, J.C., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1994). Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics. *Science* 265, 1724–1728.
- 44) Ragsdale, D.S., McPhee, J.C., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1996). Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9270–9275.
- 45) Ratcliffe, C.F., Qu, Y., McCormick, K.A., Tibbs, V.C., Dixon, J.E., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2000). A sodium channel signaling complex: modulation by associated receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Nat. Neurosci.* 3, 437–444.
- 46) Ren, D., Navarro, B., Xu, H., Yue, L., Shi, Q., and Clapham, D.E. (2001). A prokaryotic voltage-gated sodium channel. *Science* 294, 2372–2375.
- 47) Schott, J.J., Alshinawi, C., Kyndt, F., Probst, V., Hoorntje, T.M., Hulsbeek, M., Wilde, A.A., Escande, D., Mannens, M.M., and Le Marec, H. (1999). Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat. Genet.* 23, 20–21.

- 48) Schwartz, P.J., Priori, S.G., Dumaine, R., Napolitano, C., Antzelevitch, C., Stramba-Badiale, M., Richard, T.A., Berti, M.R., and Bloise, R. (2000). A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N. Engl. J. Med.* *343*, 262–267.
- 49) Shafrir, Y., Durell, S.R., and Guy, H.R. (2008). Models of voltage-dependent conformational changes in NaChBac channels. *Biophys. J.* *95*, 3663–3676.
- 50) Spampanato, J., Kearney, J.A., de Haan, G., McEwen, D.P., Escayg, A., Aradi, I., MacDonald, B.T., Levin, S.I., Soltesz, I., Benna, P., et al. (2004). A novel epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A identifies a cytoplasmic domain for beta subunit interaction. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 10022–10034.
- 51) Srinivasan, J., Schachner, M., and Catterall, W.A. (1998). Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 15753–15757.
- 52) Stefani, E., Toro, L., Perozo, E., and Bezanilla, F. (1994). Gating of Shaker K⁺ channels: I. Ionic and gating currents. *Biophys. J.* *66*, 996–1010.
- 53) Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X.D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., and Numa, S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* *339*, 597–603.
- 54) Tan, H.L., Bink-Boelkens, M.T., Bezzina, C.R., Viswanathan, P.C., Beaufort-Krol, G.C., van Tintelen, P.J., van den Berg, M.P., Wilde, A.A., and Balser, J.R. (2001). A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* *409*, 1043–1047.
- 55) Trott, O., and Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* *31*, 455–461.
- 56) Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J.L., Moss, A.J., Towbin, J.A., and Keating, M.T. (1995). SCN5A mutations

associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* *80*, 805–811.

57) Yarov-Yarovoy, V., Baker, D., and Catterall, W.A. (2006). Voltage sensor conformations in the open and closed states in ROSETTA structural models of K(+) channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 7292–7297.

58) Yarov-Yarovoy, V., DeCaen, P.G., Westenbroek, R.E., Pan, C.-Y., Scheuer, T., Baker, D., and Catterall, W.A. (2012). Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E93–102.

59) Yu, F.H., and Catterall, W.A. (2004). The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* *2004*, re15.

60) Zagotta, W.N., Hoshi, T., Dittman, J., and Aldrich, R.W. (1994a). Shaker potassium channel gating. II: Transitions in the activation pathway. *J. Gen. Physiol.* *103*, 279–319.

61) Zagotta, W.N., Hoshi, T., and Aldrich, R.W. (1994b). Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. *J. Gen. Physiol.* *103*, 321–362.

62) Zhao, Y., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2004). A gating hinge in Na⁺ channels; a molecular switch for electrical signaling. *Neuron* *41*, 859–865.

63) Zoete, V., Grosdidier, A., and Michielin, O. (2009). Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. *J. Cell. Mol. Med.* *13*, 238–248.

Приложение А.

Протокол релаксации систем «канал в мембране»:

```
#NAMD CONFIGURATION FILE FOR Na CHANNEL
```

```
#pme parameters
#ldbUnloadPME yes
PME on
PMETolerance 10e-6
PMEInterpOrder 4
PMEGridspacing 1.2
```

```
#temperature control and equilibration
langevin on
langevintemp 300
langevindamping 1.0
```

```
#pressure control
usegrouppressure yes
useflexiblecell yes
langevinpiston on
langevinpistontarget 1
langevinpistonperiod 200
langevinpistondecay 100
langevinpistontemp 300
surfacetensiontarget 0.0
strainrate 0. 0. 0.
```

```
#brnch_root_list_opt
splitpatch hydrogen
hgroupcutoff 2.8
```

```
#integrator params
timestep 2.0
firstTimestep 0
fullElectFrequency 2
nonbondedfreq 1
```

```
#force field params
structure NavAb_long.0.psf
paratypecharmm on
parameters par_all27_prot.prm
parameters par_all36_lipid.prm
exclude scaled1-4
1-4scaling 1.0
rigidbonds all
rigidtolerance 0.00001
rigiditerations 400
cutoff 11.0
pairlistdist 13.0
stepspercycle 16
switching on
switchdist 8.0
```

```
#script
#minimize 5200
run 1000000
```

Приложение Б.

Контактные карты для всех конфигураций пептидов.

