

## ОБЗОРЫ

УДК 577.352

## ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН С ПОМОЩЬЮ ESEEM СПЕКТРОСКОПИИ СПИНОВЫХ МЕТОК И ДЕЙТЕРИЕВОГО ЗАМЕЩЕНИЯ

С.А. Дзюба

*Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, Новосибирск  
Новосибирский государственный университет  
E-mail: dzuba@kinetics.nsc.ru*

*Статья поступила 20 февраля 2013 г.*

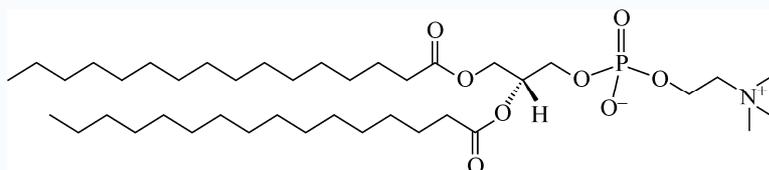
Спектроскопия модуляции огибающей сигналов электронного спинового эха (Electron Spin Echo Envelope Modulation, или сокращенно ESEEM) в сочетании с биохимическими методами направленного по месту спинового мечения и использованием дейтериевого замещения в молекулах или в участках молекул может быть использована для выяснения надмолекулярной (супрамолекулярной) структуры биологических мембран. Описано применение данного подхода к изучению проникновения воды в гидрофобную часть модельных фосфолипидных мембран и в ионные каналы в биологических мембранах, к выяснению локализации и ориентации в мембранах пептидов-антибиотиков, изучению конформаций ферментов и мембранных белков.

**Ключевые слова:** ЭПР, спиновые метки, электронное спиновое эхо, бислои, проницаемость биологических мембран, пептиды-антибиотики, надмолекулярная структура.

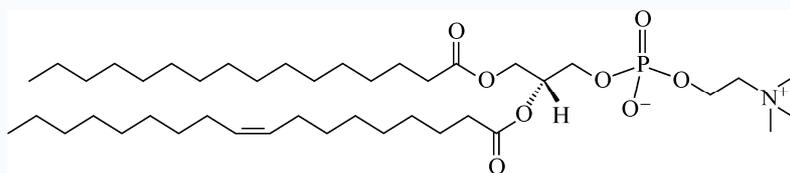
## ВВЕДЕНИЕ

Биологические мембраны отделяют содержимое клеток живых организмов от внешней среды, обеспечивают целостность клеток, регулируют обмен с внешней средой. Основой мембран является бислои липидов (к таковым относятся фосфолипиды, гликолипиды, холестерин), ориентированных приблизительно перпендикулярно поверхности бислоя и "хвостом к хвосту" в двух противоположных слоях. В состав мембран входят также мембранные белки. В мембранах могут находиться пептиды (от белков пептиды отличаются малым количеством аминокислот, меньшим чем 50). В частности, большой интерес представляют мембранно-модифицирующие свойства пептидов-антибиотиков [1–4]. Через мембраны могут проникать различные низкомолекулярные вещества — аминокислоты, углеводы, жирные кислоты, глицерин, неорганические ионы. Так как клетки в живых системах находятся в водном окружении, на функционирование клеточных мембран важное влияние оказывает структура гидратного слоя вблизи их поверхности и проникновение воды внутрь их гидрофобной части [5–8].

Фосфолипиды состоят из полярной головки и двух ацильных длинноцепочечных остатков. Ацильные остатки могут иметь полностью насыщенные межуглеродные связи — как, например, в дипальмитоил-фосфатидилхолине (DPPC):



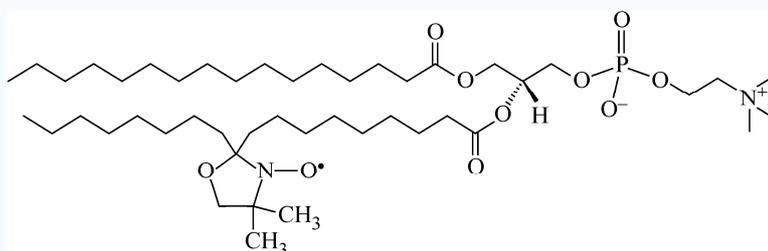
Могут также быть фосфолипиды с ненасыщенными связями в ацильном остатке — как, например, в пальмитоил-олеоил-фосфатидилхолине (ПОФС):



Взаимное расположение в мембране липидов разных типов, локализация и конформация белков и пептидов, трансмембранный профиль проникновения воды и других низкомолекулярных веществ определяют надмолекулярную (супрамолекулярную) структуру мембран. Знание этой структуры необходимо для понимания многих функциональных свойств мембран. Изучение надмолекулярной структуры биологических мембран в настоящее время активно проводится с использованием разных спектроскопических и физико-химических методов, таких как ЯМР [ 5, 9, 10 ], рентгеновское рассеяние и рассеяние нейтронов [ 11, 12 ], расчеты методом молекулярной динамики [ 6, 7, 13, 14 ] и др.

Для изучения структуры мембран применяется также метод спиновых зондов и меток. В этом методе изучаются биомолекулы с присоединенным в каком-либо положении нитроксильным радикалом (спиновой меткой), а исследование проводится методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Разработанные в настоящее время биохимические методы позволяют проводить так называемое направленное по месту спиновое мечение (site-directed spin labeling) [ 15, 16 ]. Нитроксильные радикалы — это стабильные парамагнитные молекулы, общим для которых является доступный для исследования методом ЭПР парамагнитный фрагмент NO [ 17, 18 ]. Этот содержащий неспаренный электрон фрагмент окружен экранирующими заместителями, которыми чаще всего служат метильные группы.

Ниже приведен пример спин-меченого липида:



Здесь нитроксильная спиновая метка находится в десятом положении атома углерода ацильного остатка (счет ведется от карбонильной группы).

### СПЕКТРОСКОПИЯ ESEEM

В изучении спин-меченых биологических систем рядом интересных возможностей обладает импульсная ЭПР спектроскопия в варианте электронного спинового эха (ЭСЭ) [ 19 ]. Сигнал ЭСЭ для системы спинов, находящихся во внешнем магнитном поле, возникает после подачи последовательности двух или трех СВЧ-импульсов на частоте магнитного резонанса, его природа определяется последовательными дефазировкой и фазировкой ларморовской прецессии спинов из-за эффектов неоднородного уширения линий [ 20, 21 ]. В настоящее время эксперименты по ЭСЭ чаще всего проводятся на коммерчески доступных спектрометрах серии ELEXSYS фирмы Брукер (Германия).

Есть два основных способа формирования сигнала ЭСЭ — двухимпульсный и трехимпульсный [ 20, 21 ]. В первом случае на спиновую систему в магнитном поле подаются два СВЧ-импульса, разделенных интервалом  $\tau$  (частота СВЧ соответствует условию магнитного резонанса в данном магнитном поле). Длительность и амплитуда первого импульса подбирают-

ся таким образом, что он поворачивает спиновую намагниченность на угол  $90^\circ$ , создавая таким образом сигнал свободной индукции, который можно наблюдать радиотехническими устройствами. Этот сигнал однако быстро затухает из-за дефазировки спинов в условиях обусловленного естественными причинами неоднородного уширения линий. В твердом теле в ЭПР из-за такой дефазировки сигнал свободной индукции вообще не наблюдается по причине "звона резонатора" после воздействия импульса (так называемое "мертвое время" прибора). (Отметим, что в ядерном магнитном резонансе этот эффект несуществен; и там сигнал свободной индукции является основным источником информации.) Второй,  $180^\circ$  импульс, изменяет фазу прецессии спинов таким образом, что через момент времени  $\tau$  после него (и в момент  $2\tau$  после первого импульса) спины снова оказываются сфокусированными в направлении, перпендикулярном к направлению магнитного поля, что приводит к появлению наблюдаемого сигнала свободной индукции. Этот сигнал и называется сигналом эха. Сигнал эха спадает с увеличением  $\tau$  за счет поперечной релаксации спинов, часто спад происходит экспоненциально с характерным временем, называемым  $T_2$ .

В трехимпульсном методе формирования эха на спиновую систему подаются три  $90^\circ$  импульса с интервалами  $\tau$  между первым и вторым и  $T$  между вторым и третьим. В разные моменты возникает четыре разных сигнала эха. Три из них возникают по тому же механизму, что и двухимпульсное эхо. Интерес представляет четвертый сигнал, возникающий в момент времени  $\tau$  после третьего импульса (и в момент  $2\tau + T$  после первого). Этот сигнал не сводится к обычному двухимпульсному эхо. Он называется стимулированным эхо (обычное двухимпульсное эхо называется еще первичным). Стимулированное эхо можно понимать как сигнал двухимпульсного эха с "разорванным" пополам вторым  $180^\circ$  импульсом; две  $90^\circ$  "половинки" отстоят друг от друга на интервал  $T$ . В формировании эха принимает участие только возникшая после второго  $90^\circ$  импульса продольная намагниченность, которая в течение интервала  $T$  "хранится" вдоль направления магнитного поля. Третий  $90^\circ$  импульс делает эту продольную намагниченность наблюдаемой, формируя из нее сигнал эха через время  $\tau$  после своего воздействия. Из-за процессов продольной релаксации спинов этот сигнал с увеличением  $T$  уменьшается с характерным временем, называемым  $T_1$ . В эксперименте по стимулированному эхо сканируется интервал  $T$  при постоянном  $\tau$ .

Спины неспаренных электронов обычно взаимодействуют со спинами близлежащих ядер, в твердом теле из-за этого взаимодействия возникают имеющие общие уровни разрешенные и запрещенные спиновые переходы (без переворота ядерного спина и с таким переворотом соответственно). При воздействии СВЧ-импульсов одновременно возбуждаются оба типа переходов. Квантово-механический анализ задачи [20—22] показывает, что из-за наличия разных резонансных частот амплитуда сигнала ЭСЭ при увеличении временной раздвижки между СВЧ-импульсами осциллирует с частотами магнитных взаимодействий электрона и ядер. Эти осцилляции хорошо наблюдаются на эксперименте (рис. 1 [23]), они называются модуляцией огибающей электронного спинового эха [22]. В литературе используется сокращение от англоязычного названия Electron Spin Echo Envelope Modulation — ESEEM. Эффект ESEEM позволяет получать информацию об электрон-ядерных взаимодействиях в твердом теле.

Амплитуда осцилляций зависит от магнитного момента ядра, величины магнитного поля спектрометра и от расстояния ядра от спина неспаренного электрона [20—22]. Для обычно используемых магнитных полей спектрометров ЭПР  $X$ -диапазона (частота СВЧ порядка 9 ГГц, резонансное поле около 3400 Гс) оказывается, что амплитуда осцилляций при взаимодействии с ядрами дейтерия существенно превышает таковую для взаимодействия с обычными протонами. Амплитуда осцилляций резко затухает при расстояниях между электроном и ядром, превышающим 0,5—0,8 нм [24]. Причем, если это расстояние больше чем 0,2—0,3 нм, можно говорить о взаимодействии неспаренного электрона с ядрами молекул матрицы.

Фурье-преобразование осцилляций сигнала по времени дает частотный спектр электрон-ядерных взаимодействий. В трехимпульсном варианте ESEEM спектр является значительно более разрешенным, чем в двухимпульсном, так как не содержит так называемых комбиниро-

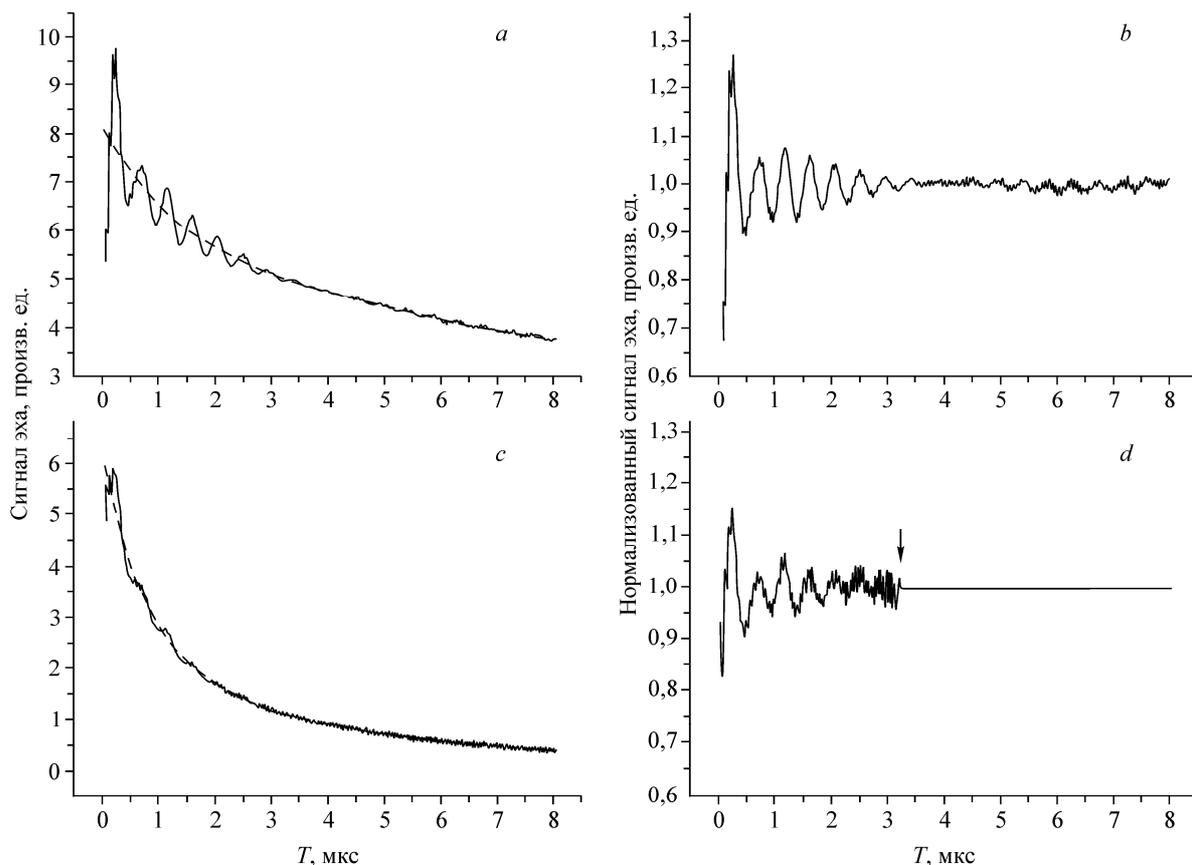


Рис. 1. Типичные экспериментальные временные зависимости интенсивности сигнала ЭСЭ  $V(T)$  для спиновых меток в гидратированных в  $\text{D}_2\text{O}$  мембранах (a, c). Отчетливо видны осцилляции — эффект ESEEM. Пунктиром показаны сглаженные кривые, которые соответствуют усредненной функции  $\langle V(T) \rangle$  (аппроксимировали двухэкспоненциальным спадом). Даны также нормализованные по формуле (1) временные зависимости  $V_n(T)$  (b, d). Образцы: спин-меченый в первом положении пептид трихогин в модельной мембране DPPC, в мольном отношении пептид/липид либо 1:250 (a, b), либо 1:20 (c, d). Стрелка на рис. d показывает начало искусственного "зануления" данных для уменьшения уровня шума. (Рисунок взят из [23] с разрешения издательства.)

ванных частот (суммы и разности различных резонансных частот), и линии не уширены за счет быстрой поперечной спиновой релаксации. Наиболее просто спектр выглядит для матричных ядер — он здесь представляет собой узкую одиночную линию, центрированную на частоте ларморовской прецессии ядра в магнитном поле спектрометра [20—22]. Для  $X$ -диапазона ЭПР частота ларморовской прецессии протонов равна 14,5 МГц (в поле 3400 Гс), дейтронов — 2,22 МГц. Для дейтронов линия поглощения имеет дублетное расщепление из-за квадрупольного взаимодействия ядра в молекуле [22].

Положение в частотном спектре линий ESEEM позволяет таким образом идентифицировать типы ядер в ближайшем окружении спиновой метки, а их амплитуда — определять пространственное расположение ядер относительно неспаренного электрона спиновых меток. Поэтому эффекты ESEEM являются эффективным инструментом изучения структуры ближайшего окружения спиновых меток.

Отметим, что, хотя сигналы электронного спинового эха из-за быстрой спиновой релаксации удается наблюдать только при пониженных температурах, полученная в этом методе информация может быть важной и для определения структуры при физиологических температурах, когда можно считать, что взаимное расположение молекул при замораживании не меняется.

Проведенная определенным образом обработка экспериментальных данных позволяет при Фурье-преобразовании исключить влияние спиновой релаксации и унифицировать получение

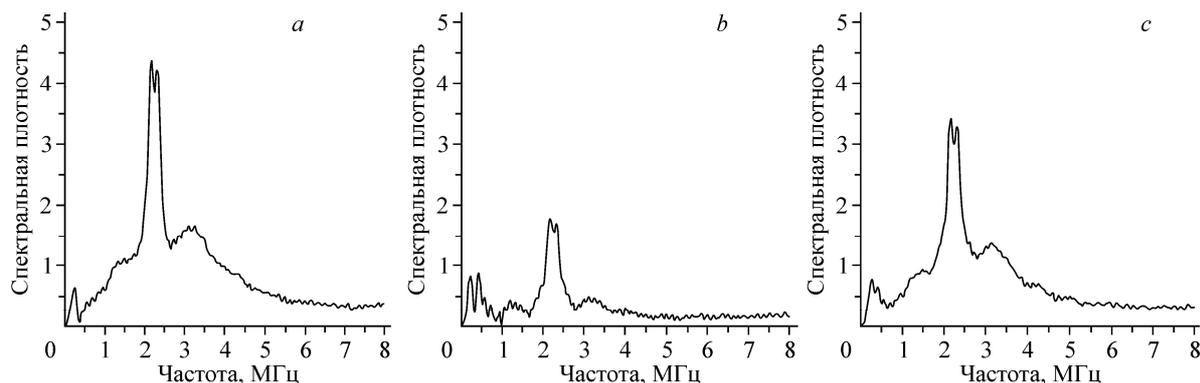


Рис. 2. Амплитудное Фурье-преобразование нормализованных временных зависимостей ESEEM (см. рис. 1) для пептида трихогин в модельной мембране DPPC в мольном отношении пептид/липид 1:250, спин-меченого в первом (a), четвертом (b) и восьмом положении (c). Единицы вдоль вертикальной оси произвольные (см. текст). (Рисунок взят из [ 23 ] с разрешения издательства.)

амплитуды сигнала так, чтобы она не зависела от коэффициента усиления прибора [24]. Выглядит это следующим образом. Сначала экспериментально измеренный сигнал ESEEM  $V(T)$  сглаживается подходящей функцией  $\langle V(T) \rangle$  (см. рис. 1 a, b). Считается, что эта функция зависит только от релаксационных процессов и не зависит от модуляционных эффектов. Тогда можно получить нормализованный сигнал, который от релаксации уже не зависит:

$$V_n(T) = \frac{V(T)}{\langle V(T) \rangle} - 1. \quad (1)$$

Единица здесь отнимается, чтобы при  $T \rightarrow \infty$  нормализованный сигнал стремился к нулю. Характерный вид нормализованного сигнала приведен на рис. 1 b, d. Затем проводится Фурье-преобразование:

$$F_c(f) = \int_{t_1}^{t_2} V_n(t) \exp(-2\pi if t) dt, \quad (2)$$

где  $t = \tau + T$  (в теории сигнал стимулированного эха осциллирует именно как функция данного временного параметра [ 20–22 ]);  $t_1$  и  $t_2$  — минимальные и максимальные значения этого параметра соответственно ( $t_1$  определяется мертвым временем прибора, обычно  $t_1 \sim 0,1$  мкс,  $t_2$  зависит от времени релаксации  $T_1$ , обычно  $t_2 \sim 10$  мкс);  $f$  — частота в МГц. Примеры полученных таким способом спектральных плотностей  $F_c(f)$  показаны на рис. 2 и 3 [ 23 ].

Отметим, что в разных случаях используют либо косинусное Фурье-преобразование (действительная часть от (2)), либо берут его абсолютное значение (корень квадратный из суммы квадратов действительной и мнимой частей). Косинусное преобразование более удобно для сравнения с теорией, однако вид спектральных линий здесь может существенно искажаться из-за наличия мертвого времени прибора.

Рассчитанная по формуле (2) спектральная плотность имеет абсолютное значение и не зависит от параметров прибора. Она имеет размерность времени, ее удобно измерять либо в микросекундах, либо в наносекундах. К сожалению, в ранних работах спектральные плотности рассчитывались с помощью стандартных компьютерных программ Фурье-преобразования, в которых результат получается в единицах, зависящих от шага временной развертки прибора. (Данные рис. 2 и 3 также получены в таких произвольных единицах.)

Интенсивность сигнала ESEEM прямо связана с концентрацией находящихся вблизи ядер (дейтронов в нашем случае). Детальный количественный анализ этой задачи [ 24 ] показал, что интенсивность линии ESEEM в частотной области приблизительно пропорциональна концентрации свободных ядер, т. е. ядер в молекулах, не связанных каким-либо взаимодействием со спиновой меткой. При этом оказалось, что глубина дублетного расщепления линии пропорциональна этой концентрации с хорошей степенью точности. На рис. 4 приводятся результаты численных расчетов для спиновой метки внутри полости, окруженной водой [ 24 ]. Видно, что сиг-

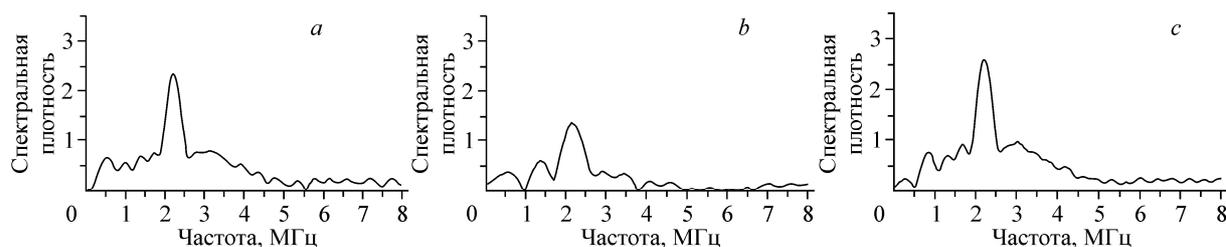


Рис. 3. То же, что на рис. 2, для пептида трихогина в модельной мембране DPPC в мольном отношении пептид/липид 1:20

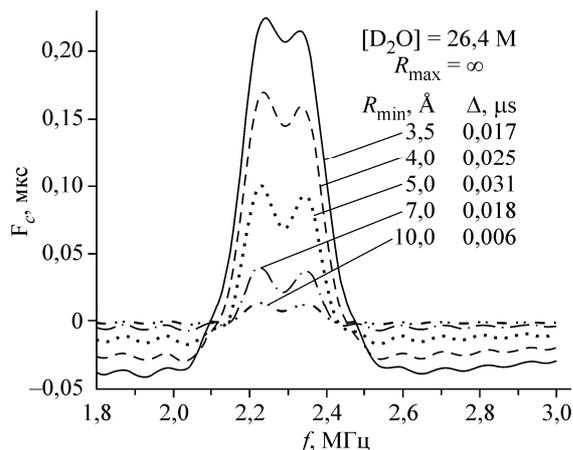


Рис. 4. Модельные расчеты формы линии косинусного Фурье-преобразования  $F_c$  сигнала ESEEM. В модели принимается, что неспаренный электрон находится в центре пустой сферы радиуса  $R_{\min}$ , окруженной молекулами  $D_2O$  с концентрацией 26,4 М. (Взято из [ 24 ] с разрешения издательства.)

нал ESEEM резко уменьшается при увеличении радиуса полости. Характерный размер, при котором метка "чувствует" ядра дейтерия, есть величина порядка 0,5 нм, при радиусе, большем 1 нм, чувствительность к ядрам дейтерия фактически пропадает.

### ПРОНИКНОВЕНИЕ ВОДЫ В МЕМБРАНЫ

В гидрофобную часть мембран полярные молекулы могут проникать только в очень малой концентрации. Однако у поверхности мембраны из-за наличия вблизи полярных групп головок липидов условия для проникновения полярных молекул смягчаются и можно ожидать, что здесь их концентрация будет уже значимой. Глубина проникновения полярных молекул внутрь гидрофобной части мембран связана с возможностью транспорта через мембраны полярных и заряженных частиц; эта глубина определяет энергетику встраивания белков в мембраны [ 5—8, 25—28 ].

Изучению профиля проникновения воды, т. е. зависимости концентрации воды от глубины внутрь мембраны, посвящено значительное количество работ, выполненных различными методами, такими как ЯМР [ 5, 9 ], метод молекулярной динамики [ 6, 7, 29 ] и др. В ряде работ использовался стационарный метод ЭПР и спин-меченые в разных положениях липиды [ 8, 30—33 ]. В исследованиях методом ЭПР измеряются сверхтонкие расщепления на ядрах  $^{14}\text{N}$  нитроксильных спиновых меток и компоненты их  $g$ -тензора. Оба этих типа магнитных взаимодействий зависят от полярности окружения; для воды они зависят также от образования водородных связей с молекулой нитроксильного радикала. Было установлено, что область с высокой полярностью вблизи поверхности мембраны в глубине мембраны переходит в область низкой полярности. Положение и ширина переходной области зависит от липидного состава, в частности от содержания холестерина, и от фазового состояния мембраны.

Прямые данные о содержании свободной воды в мембранах дает метод ESEEM спиновых меток для мембран, гидратированных тяжелой (дейтериевой) водой. Такой подход первоначально был использован в двухимпульсном варианте эха [ 34—37 ]. Использование дейтериевой воды обусловлено, как отмечалось, во-первых, тем, что амплитуда дейтериевой модуляции значительно больше, чем протонной и, во-вторых, тем, что таким образом отделяется вклад от протонов липидов. Используя селективное спин-мечение в разные положения липидов, методом ESEEM можно определять локальную концентрацию воды на молекулярном уровне в ближайшем окружении спиновой метки.

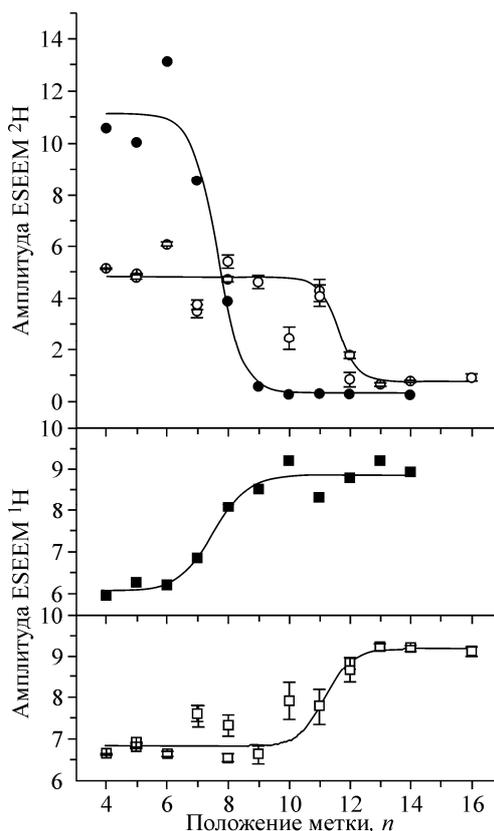
Рис. 5. Зависимость амплитуды пиков ESEEM в частотной области (в тех же единицах, что и на рис. 2 и 3) в зависимости от положения спиновой метки в липидах в модельной мембране DPPC. Кружки — сигнал от ядер дейтерия, квадратики — от протонов. Пустые символы — мембраны без холестерина, заполненные — с холестерином. (Взято из [38] с разрешения издательства.)

Необходимо различать молекулы воды, связанные водородными связями со спиновой меткой, от свободных молекул (далее будем говорить соответственно о связанной и свободной воде). Для определения концентрации воды внутри мембраны интерес представляют конечно именно последние, так как для первых дополнительным параметром задачи является величина непосредственного взаимодействия между меткой и водой. В случае двухимпульсного эха спектральное разрешение, однако, оказалось недостаточным для разделения вкладов от свободной и связанной воды (такая возможность в указанных работах [34—37] и не рассматривалась). Более информативным для изучения профиля проникновения воды в мембраны является метод ESEEM в трехимпульсном варианте [38]. С его помощью получают хорошо разрешенные линии на резонансной частоте дейтронов. Оказалось, что эти линии состоят из широкой подложки и узкого дублета (см. рис. 2 и 3). Широкая подложка проинтерпретирована взаимодействием с молекулами воды, связанными с нитроксильными радикалами водородной связью, узкий дублет — взаимодействием со свободными молекулами воды в объеме мембраны [38].

В исследованиях [38] использовались липиды, спин-меченые в различных положениях алифатического *sn*-2 хвоста (*n*-PCSL) в модельных фосфолипидных мембранах DPPC в присутствии и отсутствии холестерина. Модельные мембраны приготавливались в виде мультислойных липосом. Вид полученных экспериментальных временных кинетик стимулированного ESEEM и их косинусных Фурье-спектров аналогичен приведенным на рис. 1—3. Для образцов с разным положением спиновой метки вдоль липидного хвоста было найдено, что амплитуда (спектральная плотность) дейтериевой линии для разных положений заметно отличается. Детальная картина приведена на рис. 5, где эта амплитуда приведена как функция положения метки (амплитуды узкой линии и широкой подложки оказались пропорциональны друг другу). Видно, что при "движении" в глубь мембраны эта амплитуда (а, значит, и концентрация воды) падает.

Из данных рис. 5 для модельных мембран DPPC видно, что присутствие холестерина приводит к двум эффектам: большей концентрации воды вблизи поверхности мембраны и к значительно более резкому спаду концентрации при "движении" в глубь мембраны. В присутствии холестерина спад концентрации происходит вблизи положения 8 углеродного атома липидного хвоста, в его отсутствие — вблизи положения 11. Таким образом, холестерин уменьшает глубину проникновения воды в мембрану.

На рис. 5 наряду с данными по эффекту ESEEM, обусловленному ядрами дейтерия, приведены также данные по ESEEM, вызванному протонами. (Как отмечалось выше, сигнал ESEEM от протонов возникает на частоте 14,5 МГц.) Видно, что амплитуда сигнала в глубине мембраны возрастает в присутствии холестерина, начиная с положения 8 метки, в его отсутствие — начиная с положения 10 метки. Так как мембраны гидратированы в данном случае D<sub>2</sub>O, сигнал может быть обусловлен только протонами липидного "хвоста". Возрастание сигнала означает, что в глубине мембраны DPPC плотность протонов увеличивается. Это может происходить,



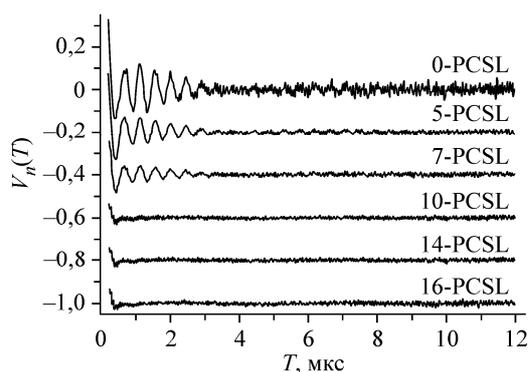


Рис. 6. Нормализованные временные зависимости ESEEM  $V_n(T)$  для спин-меченых липидов в мембране ePC с холестерином, гидратированной в  $D_2O$ . (Взято из [39] с разрешения издательства.)

если меняется характер упаковки липидов. Скорее всего, она становится в глубине мембраны более разупорядоченной.

На рис. 6 приведены временные кинетики ESEEM для спин-меченых липидов  $n$ -PCSL в гидратированных в  $D_2O$  холестеринсодержащих мембранах яичного фосфатидилхолина (ePC) [39]. Видно, что начиная с 10-го положения, вода в мембране отсутствует.

Информация о профиле проникновения воды в модельные мембраны, состоящие из смесей DPPC/PG/ $D_2O$ , ePC/PG/ $D_2O$  и DPPC- $d_{13}$ /PG/ $H_2O$  (PG — это фосфатидил-глицерин), также была получена с помощью спиновых зондов на основе доксил-стеариновой кислоты, спин-меченой соответственно в положениях 5, 7 и 16 атома углерода [40]. С увеличением номера положения спиновой метки интенсивность сигнала ESEEM падала с дейтерозамещенной водой и возрастала для образцов с дейтерозамещенными окончаниями липидов.

Проникновение воды можно изучать не только для модельных липидных бислоев, но также и для ионных каналов в мембранах. Такие исследования были проведены для мембран, содержащих калиевые KcsA каналы [41]. Показано, что наблюдаемый сигнал ESEEM от дейтерия свидетельствует о проникновении воды вдоль обращенной к липидам внешней поверхности канала.

Кроме эффекта ESEEM за счет ядер дейтерия, для изучения структуры каналов также можно использовать эффект ESEEM за счет ядер  $^{31}P$  [41], которые естественным образом присутствуют в головках фосфолипидов. Отметим, что впервые эффекты ESEEM от ядер  $^{31}P$  в модельных мембранах были использованы для изучения локализации спиновой метки в доксил-стеариновых кислотах [42].

Отметим также, что расчеты методом молекулярной динамики показывают наличие некоторого изотопного эффекта для биологических мембран при замене обычной воды на дейтериевую [29]. Обнаруженные отличия касались однако только динамики молекул при комнатной температуре. Можно полагать, что они не столь существенны для надмолекулярной структуры мембран.

#### ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПЕПТИДОВ В МЕМБРАНЕ

*Пептиды-антибиотики.* Из-за эффекта привыкания болезнетворных бактерий к существующим антибиотикам в настоящее время проводится активный поиск антибиотиков новых типов [1—4]. Считается, что антибиотики на основе пептидов нарушают целостность клеточных мембран, что и приводит к гибели бактериальных клеток. Для небольших по размеру пептидов в основном обсуждаются два механизма их воздействия на мембраны. Так называемый механизм "бочоночных клепок" (barrel-stave mechanism) [43, 44] предполагает, что несколько пептидов агрегируют внутри мембраны таким образом, что формируют что-то похожее на открытый с обеих сторон бочонок, расположенный перпендикулярно поверхности (каждый пептид служит при этом отдельной "клепкой"). В результате целостность мембраны нарушается. Пептиды в этой модели находятся в трансмембранном расположении. Другой механизм называется ковровым [44, 45]. Здесь пептиды располагаются параллельно поверхности, нарушение целостности мембраны происходит из-за того, что на некотором участке мембраны пептиды при достаточно большой своей концентрации нарушают поверхностные свойства этого участка, в результате чего липиды теряют способность к самоассоциации, и данный участок разрушается. Однако, несмотря на большое количество работ, посвященных исследованию взаимо-

действия конкретных пептидов-антибиотиков с мембранами, многие детали надмолекулярной структуры системы мембрана—пептид остаются неясными.

В частности, активно исследуются сейчас так называемые пептайболы [46], выделенные из грибковой культуры *Trichoderma*. Их представителями являются, например, зервамицин (*zervamicin*), который в трехбуквенном обозначении аминокислот выглядит как Ас-Trp-Ile-Gln-Aib-Ile-Thr-Aib-Leu-Aib-Hyp-Gln-Aib-Hyp-Aib-Pro-Phl (здесь Ас = ацетил, Phl = фенилаланинол),

аламетицин (*alamethicin*)

Ас-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Glu(OMe)-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OMe)-Glu(OMe)-Phl,

трихогин (*trichogin GA IV*)

*n*Oct-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Lol (здесь *n*Oct = *n*-октаноил, Lol = лейцинол), состоящие из 17, 20 и 10 аминокислот соответственно. Характерным для пептайболов является наличие в их составе 2-аминоизобутановой (изомазляной) кислоты (сокращенно Aib, структура дана ниже), что и отражено в их названии (данная аминокислота не относится к стандартным протеиногенным кислотам). Считается, что пептайболы формируют трансмембранные потенциалзависимые ионные каналы [46]. Одним из популярных методов исследования структуры каналов является метод флуоресцентных меток [47—49]. Он имеет, однако, существенный недостаток — эти метки слишком объемные и могут поэтому выталкиваться из мембраны [50]. Спиновые метки занимают гораздо меньший геометрический объем. Но ими тоже надо пользоваться с осторожностью — имеются данные, что для некоторых режимов замораживания образцов они также могут не встраиваться в мембраны [51].

Спин-меченые пептиды могут быть получены путем прямого синтеза с помещением спиновой метки в желаемом месте аминокислотной последовательности. Ниже рассмотрены изученные к настоящему времени пептайболы и другие пептиды.

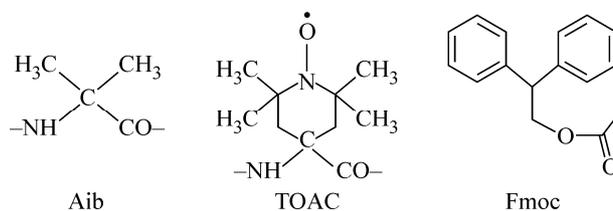
*Трихогин*. Спин-меченый пептид-антибиотик трихогин изучали методом ESEEM в D<sub>2</sub>O-гидратированных модельных мембранах DPPC [23, 52] и ePC [39]. Интерес к этому пептиду вызван еще и тем, что размера данного пептида недостаточно, чтобы образовать сквозные каналы в мембране. Длина спирали пептида 1,6 нм, что составляет примерно половину от толщины мембраны. Исследовали три спин-меченых [54] в разных положениях аналога пептида трихогина:

Fmoc-TOAC-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-OMe

Fmoc-Aib-Gly-Leu-TOAC-Gly-Gly-Leu-Aib-Gly-Ile-Leu-OMe

Fmoc-Aib-Gly-Leu-Aib-Gly-Gly-Leu-TOAC-Gly-Ile-Leu-OMe

(Fmoc = флуоренил-9-метил-оксикарбонил, используется для удобства синтеза и как флуоресцентная метка). Ниже даны структуры аминокислоты, спиновой метки TOAC и группы Fmoc.



Имеются данные, показывающие, что замещение на Fmoc и TOAC не приводит к изменению мембранно-модифицирующих свойств пептида [55].

Спектры ESEEM в частотной области для этих трех аналогов в DPPC показаны на рис. 2 для случая малой концентрации пептида в мембране (1:250 в мольном отношении к липидам) и на рис. 3 для случая большой, 1:20 концентрации [23]. Для определения локализации пептида

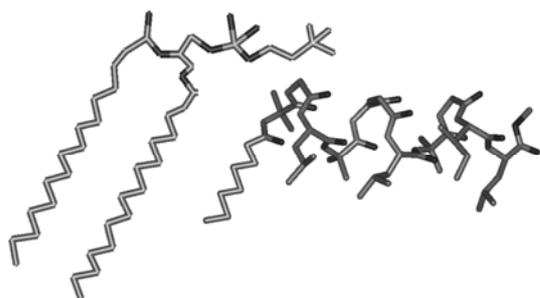


Рис. 7. Предложенная [23] модель локализации пептида трихогина в мембране из липидов DPPC. Слева — молекула липида, справа — пептида

*Trichogin GA IV* использовали "калибровочные" данные о профиле концентрации воды в модельной фосфолипидной мембране, также полученные методом ESEEM — см. рис. 5 (данные в отсутствие холестерина). Из этого сравнения видно, что в случае малой концентрации пептида (см. рис. 2) для положений 1 и 8 амплитуды ESEEM близки по величине к таковым для положений спиновых меток в липидах ближе, чем десятое. То есть положения 1 и 8 спиновых меток в пептиде расположены в мембране ближе к поверхности, чем спиновая метка в положении 10 в липиде. В то же время сравнение двух типов данных показывает, что положение 4 в пептиде близко по расположению к положению 10 в липиде. Отсюда можно сделать вывод, что пептид ориентирован параллельно поверхности мембраны. Основанная на этих данных предполагаемая надмолекулярная структура системы мембрана—пептид [23] показана на рис. 7.

При увеличении мольной доли пептида в DPPC до величины 1:20 картина существенно меняется (см. рис. 3): амплитуда пика для спин-меченого положения 1 заметно уменьшается. Таким образом, при увеличении концентрации пептида он своим *N*-окончанием погружается глубже в мембрану — переходит в ориентацию, близкую к трансмембранной. Из данных импульсного двойного электрон-электронного резонанса (PELDOR) [23] следует также, что имеет место его агрегация в виде пар пептидов по типу "голова к голове". Образование трансмембранного димера, видимо, может привести к образованию канала в мембране. Позже было показано, что димеры обладают способностью вращения вокруг своей длинной оси [53]. Так как пептиды имеют спиралевидную форму, возможно, такое вращение способствует транспорту молекул через мембрану (здесь уместна аналогия с известным из древнейших времен насосом по типу "Архимедова винта"). Необходимое для транспорта молекул предпочтительное вращение в одну сторону может вызываться градиентом концентрации.

Клетки животных отличаются от клеток бактерий присутствием холестерина. Поэтому представляет интерес изучение влияния холестерина на локализацию пептида в мембране. Были изучены мембраны ePC при двух концентрациях трихогина — 0,5 и 5 мол. %, в присутствии и отсутствии холестерина [39]. Из величин амплитуд пиков ESEEM в D<sub>2</sub>O-гидратированных мембранах сделан вывод о планарной концентрации пептида при малой его концентрации в обоих случаях. При большой его концентрации в отсутствие холестерина ориентация пептида оставалась планарной, в то время как в его присутствии ориентация изменялась на трансмембранную. То есть холестерин как бы способствует образованию каналов. Впрочем, на такой результат могло бы повлиять наличие объемных Fmoc-групп (как отмечалось, искусственно введенных при синтезе) на *N*-окончании пептидов. Можно полагать, что холестерин выталкивает эти неполярные группы в центр мембраны.

*Аламетицин*. Спин-меченый аламетицин изучали методом ESEEM в D<sub>2</sub>O-гидратированных модельных мембранах [56—58]. Спиновые метки TOAC в ходе синтеза [59] также помещались вместо аминокислотной кислоты в одно из трех положений:

положение 1: Ac-**TOAC**-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Glu(OMe)-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OMe)-Glu(OMe)-Phl;

положение 8: Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Glu(OMe)-**TOAC**-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OMe)-Glu(OMe)-Phl;

положение 16: Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Glu(OMe)-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-**TOAC**-Aib-Glu(OMe)-Glu(OMe)-Phl.

Эти спин-меченые аналоги аламетицина изучались в модельных биологических мембранах димиристоил-фосфатидилхолина (DMPC) и диолеил-фосфатидилхолина (DOPC) [56], DPPC и POPC [57], яичного фосфатидилхолина (ePC) [58]. Во всех случаях наблюдали заметное сни-

жение амплитуды ESEEM при переходе к положению 16 метки, что принималось как свидетельство "заглубленности" в мембране C-окончания пептида. То есть расположение пептида должно быть близко к трансмембранному. Учитывая длину пептида, следует ожидать, что положение 16 метки по сравнению с положениями 1 и 8 расположено в другой половине бислоя. Причем оказалось, что в насыщенных липидах (DMPC [ 56 ], DPPC [ 57 ]) сигнал ESEEM достигает максимума для положения 8, в то время как для ненасыщенных (DOPC [ 56 ], POPC [ 57 ]) — для первого. Это свидетельствует о том, что в насыщенных липидах ориентация *n*-окончания пептида имеет более планарный характер. Увеличение концентрации пептида в насыщенных липидах приводило к заметному уменьшению сигнала в положениях 8 и 16, при этом в положении 1 он не изменялся [ 56, 57 ]. Из других данных (стационарный ЭПР, импульсный двойной электрон-электронный резонанс — сокращенно PELDOR) следовало также, что пептиды при повышении своей концентрации агрегируют в тетрамеры. Данные ESEEM свидетельствуют о том, что агрегация сопровождается изменением локализации пептидов в сторону ее более трансмембранного характера. Совокупность данных методов стационарного ЭПР, PELDOR и ESEEM позволила предложить детальную надмолекулярную структуру тетрамера аламетицина в мембране ePC [ 58 ].

*Зервамицин.* Пептид-антибиотик зервамицин изучали для образцов, в которых спиновая метка присоединялась либо к *N*-окончанию пептида, либо к его C-окончанию, для модельных мембран ePC, гидратированных D<sub>2</sub>O [ 60 ]. Установлено, что наибольшая амплитуда ESEEM наблюдается для метки в *N*-окончании пептида. Детальный анализ формы линии в частотной области привел к выводу о том, что все спиновые метки на *N*-окончании находятся на поверхности мембраны. Для C-окончания такая ситуация имеет место только для 60 % меток, а 40 % погружены глубже в мембрану, то есть локализация пептида имеет гетерогенный характер.

*Мелиттин.* В модельных мембранах из смесей липидов DPPC, фосфатидилглицерина (PG), ePC, фосфатидил-этаноламина (PE) (DPPC/PG, 7:3 w/w, ePC/PG, 7:3 w/w, PE/PG, 7:3 w/w) изучали локализацию двух пептидов-антибиотиков — пептида натурального происхождения мелиттина



(используются однобуквенные обозначения, всего в пептиде 26 аминокислот) и синтетического пептида



(15 аминокислот, курсивом даны *D*-аминокислоты) [ 40, 61, 62 ]. Использовались пептиды, меченые лишь по одному положению, спиновая метка присоединялась к *N*-окончанию пептида. Мембраны либо гидратировались дейтериевой водой, либо, в случае DPPC, использовались дейтерозамещенные липиды в двух вариантах: с полным замещением дейтерием (DPPC-*d*<sub>62</sub>), либо с присоединенными к конечному атому углерода тремя метильными группами (DPPC-*d*<sub>9</sub>). Гидратация в двух последних случаях осуществлялась обычной водой. Также в качестве "линейки сравнения" использовали спин-меченые фосфолипиды [ 62 ] и стеариновые кислоты, спин-меченые в положениях 5, 7 и 16 атома углерода соответственно [ 40 ]. Расстояния между меткой и дейтериевым ядром теоретически оценивали для простой модели, в которой спин электрона расположен на определенном расстоянии от слоя равномерно распределенных атомов дейтерия [ 40 ]. Кроме ESEEM использовали метод PELDOR и низкотемпературную электронную микроскопию, а также проводили расчеты методом Монте-Карло.

Полученные данные показали, что *N*-окончание пептидов лежит на поверхности мембраны для мембран DPPC/PG и ePC/PG. Для мембран ePE/PG наблюдали некоторое его погружение внутрь мембраны. Увеличение концентрации пептидов (немеченых) приводило к заметному увеличению проникновения воды внутрь мембраны, что регистрировалось по увеличению дейтериевых пиков для меченых липидов [ 40, 62 ]. Это послужило свидетельством того, что пептиды влияют на проницаемость мембран. Также данные ESEEM показали, что при увеличении концентрации пептидов плотность липидов DPPC увеличивается в полярной области вблизи поверхности мембраны и уменьшается в ее глубине [ 62 ]. Этот результат воздействия мелиттина интерпретирован как следствие нарушения целостности мембраны и сегрегации разных частей фосфолипидов [ 62 ].

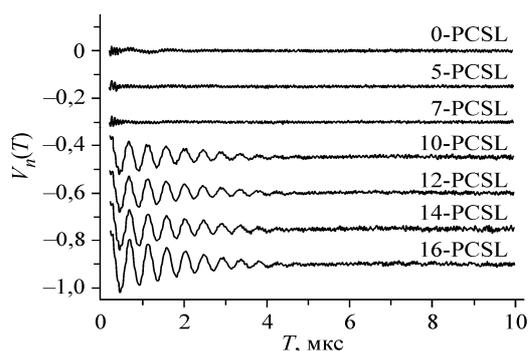


Рис. 8. Нормализованные временные зависимости сигнала ESEEM в мембранах ePC, полученные гидратированием обычной водой и содержащие холестерин-d<sub>7</sub>

### ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ И ФОЛДИНГ БЕЛКОВ

Методом ESEEM в условиях гидратации мембран D<sub>2</sub>O изучались мембранные ферменты Na,K-АТФ-азы, спин-меченые двумя разными способами [63, 64]. В одном способе ферментативная активность полностью сохранялась, в другом она частично исчезала. Оказалось, что для первого способа амплитуды дейтериевого сигнала ESEEM были больше, чем для второго. Это интерпретировалось как большая близость к поверхности мембраны в первом случае [63].

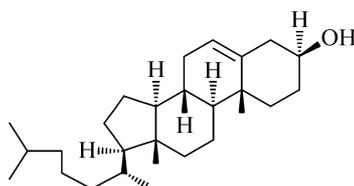
Исследовалось также влияние мочевины на фолдинг (складывание) фермента Na,K-АТФ-азы [64]. Установлено, что мочевина увеличивает проникновение воды к спиновым меткам, причем больший эффект наблюдается для спиновых меток первого типа, что указывает на меньшую распаковку фермента под влиянием мочевины в этом случае. То есть мочевина продуцирует появление ненативных состояний, для которых ферментативная функция теряется.

Мембранные белки расположены в структурированной среде, в которой некоторые из их фрагментов доступны для окружающей воды, некоторые находятся в контакте с липидами, некоторые погружены в сам белок. Доступность для воды может быть определена методом ESEEM в условиях гидратации D<sub>2</sub>O. В рамках такого подхода для различных белковых фрагментов светособирающего комплекса LHCPb были определены параметры доступности [65]. Методом ESEEM также было обнаружено изменение окружения (доступности протеинового фрагмента для воды) в ходе фолдинга [66].

Сывороточный альбумин человека является транспортным белком, который может переносить жирные кислоты и различные гидрофобные фармакологические препараты. Было изучено связывание с этим белком спин-меченых в разных положениях стеариновых кислот D<sub>2</sub>O-окружении [67]. Установлено, что все спин-меченые фрагменты приблизительно одинаково доступны для воды.

### ЛОКАЛИЗАЦИЯ ХОЛЕСТЕРИНА

Также разработанный подход на основе спектроскопии ESEEM спиновых меток с дейтериевым замещением молекул среды может быть использован для определения локализации холестерина



в мембранах.

Такие эксперименты были проделаны для модельных мембран ePC с использованием холестерина-d<sub>7</sub> с дейтерийзамещенным алкильным остатком —CH(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub> [39]. Результаты показаны на рис. 8 [39]. Видно, что до положения 7 углеродного атома включительно сигнал от дейтронов не регистрируется, он появляется только начиная с положения 10. Согласно данным высокопольного ЭПР (рабочая частота 94 ГГц) [68], стерольное ядро как раз должно заканчиваться вблизи положения 10. С помощью данного подхода можно проводить сравнительные измерения локализации холестерина в мембранах разного типа.

## СТРУКТУРА МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ

Спектроскопия ESEEM спиновых меток с дейтериевым замещением может быть использована для изучения конформационного строения мембранных белков. Такая возможность возникает с применением направленного по месту спинового мечения белка при селективном дейтериевом замещении в определенных структурных группах белковой молекулы [69—71]. Возможности метода продемонстрированы для  $\alpha$ -спирального белкового элемента ацетилхолинового рецептора в фосфолипидном бислое. Причем дейтериевому замещению подвергались разные остатки белковой молекулы — либо валин [69], либо лейцин [70, 71]. Спиновые метки также "пришивались" в разные участки молекулы. Изменения спектров ESEEM в разных образцах коррелировали с изменением вторичной структуры белков ( $\alpha$ -спираль или  $\beta$ -складки) [70]. Утверждается, что данный подход дает новые и уникальные возможности для структурной биологии [69—71].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Спектроскопия ESEEM спиновых меток с использованием дейтериевого замещения определенных молекул или участков молекул позволяет получать полезную информацию о надмолекулярной структуре биологических мембран с присутствующими в них холестерином, белками и пептидами-антибиотиками. Использование дейтерия обусловлено, во-первых, тем, что амплитуда дейтериевого эффекта ESEEM значительно больше, чем протонного, и, во-вторых, тем, что таким образом выделяется вклад от нужных молекул (например, воды) или участков молекул (например, алкильного остатка холестерина). Такой подход первоначально был использован в двухимпульсном варианте эха [34—37]. Гораздо более информативным оказался метод ESEEM в трехимпульсном варианте [38]. С его помощью получают хорошо разрешенные линии на резонансной частоте дейтронов. Оказалось, что при взаимодействии с молекулами  $D_2O$  эти линии состоят из широкой подложки и узкой линии. Теоретический анализ [24, 38] показывает, что широкая подложка обусловлена взаимодействием с молекулами воды, связанными с нитроксильными радикалами водородной связью, а узкая линия обусловлена взаимодействием со свободными молекулами  $D_2O$  в объеме мембраны. Метод чувствителен к дейтронам, находящимся на расстоянии менее  $\sim 0,5$  нм [24].

Данный подход был использован для измерения профиля концентрации воды в гидрофобной части модельных мембран, для изучения локализации в мембранах пептидов-антибиотиков, для изучения конформационного строения мембранных белков и их локализации в мембранах. Его можно применять для выяснения локализации холестерина в мембранах, и, возможно, для решения других задач определения надмолекулярной структуры биологических мембран.

Данная работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 12-03-00192 и Министерством образования и науки РФ, контракт № 11.519.11.1006.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wimley W.C.* // Amer. Chem. Soc. Chem. Biol. – 2010. – **5**, N 10. – P. 905.
2. *Fjell C.D., Hiss J.A., Hancock R.E.W., Schneider G.* // Nature Reviews Drug Discovery. – 2012. – **11**, N 1. – P. 37.
3. *Nguyen L.T., Haney E.F., Vogel H.J.* // Trends in Biotechnology. – 2011. – **29**, N 9. – P. 464.
4. *Wimley W.C., Hristova K. J.* // Membr. Biol. – 2011. – **239**, N 1-2. – P. 27.
5. *Kausik R., Han S.* // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2011. – **13**, N 17. – P. 7732.
6. *Lucas T.R., Bauer B.A., Davis J.E., Patel S.* // J. Comput. Chem. – 2012. – **33**, N 2. – P. 141.
7. *Saito H, Shinoda W.* // J. Phys. Chem. – 2011. – **115**, N 51. – P. 15241.
8. *Marsh D.* // Appl. Magn. Res. – 2009. – **37**, N 1. – P. 435.
9. *Shintani M., Yoshida K., Sakuraba S., Nakahara M., Matubayasi N.* // J. Phys. Chem. B. – 2011. – **115**, N 29. – P. 9106.
10. *McDermott A.* // Annual Rev. Biophys. – 2009. – **38**, N 1. – P. 385.

11. Bill R.M., Henderson P.J.F., Iwata S., Kunji E.R.S., Michel H., Neutze R., Newstead S., Poolman B., Tate C.G., Vogel H. // *Nature Biotechnology*. – 2011. – **29**, N 4. – P. 335.
12. Pabst G., Kučerka N., Nieh M.-P., Rheinstädter M.C., Katsaras J. // *Chem. Phys. Lipids*. – 2010. – **163**, N 6. – P. 460.
13. Khalili-Araghi F., Gumbart J., Wen P.-C., Sotomayor M., Tajkhorshid E., Schulten K. // *Current Opinion Struct. Biol.* – 2009. – **19**, N 2. – P. 128.
14. Dror R.O., Dirks R.M., Grossman J.P., Xu H., Shaw D.E. // *Annual Rev. Biophys.* – 2012. – **41**, N 1. – P. 429.
15. Hubbell W.L., Cross A., Langen R., Lietzov M.A. // *Current Opinion Struct. Biol.* – 1998. – **8**. – P. 649.
16. Fanucci G.E., Cafiso D.S. // *Current Opinion Struct. Biol.* – 2006. – **16**. – P. 644.
17. Бучаченко А.Л., Вассерман А.М. Стабильные радикалы. – М.: Химия, 1973.
18. Володарский Л.Б., Григорьев И.А., Диканов С.А. и др. Имидазолиновые нитроксильные радикалы. – Новосибирск: Наука, 1988.
19. Дзюба С.А. // *Успехи химии*. – 2007. – **76**. – P. 752.
20. Салихов К.М., Семенов А.Г., Цветков Ю.Д. Электронное спиновое эхо и его применение. – Новосибирск: Наука, 1976.
21. Schweiger A., Jeschke G. Principles of pulsed electron paramagnetic resonance. – UK, Oxford: University Press, 2001.
22. Dikanov S. A., Tsvetkov Y. D. Electron Spin-Echo Envelope Modulation (ESEEM) Spectroscopy. – USA, CRC Press: Boca Raton, 1992.
23. Sannikov E.S., Erilov D.A., Milov A.D., Tsvetkov Yu.D., Peggion C., Formaggio F., Toniolo C., Raap J., Dzuba S.A. // *Biophys. J.* – 2006. – **91**. – P. 1532.
24. Milov A.D., Samoiloa R.I., Shubin A.A., Grishin Yu.A., Dzuba S.A. // *Appl. Magn. Res.* – 2008. – **35**. – P. 73.
25. Aman K., Lindahl E., Edholm O., Hakansson P., Westlund P.-O. // *Biophys. J.* – 2003. – **84**. – P. 102.
26. Fitter J., Lechner R.E., Dencher N.A. // *J. Phys. Chem. B.* – 1999. – **103**. – P. 8036
27. Milhaud J. // *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes*. – 2004. – **19**. – P. 1663.
28. Bhide, S.Y. Berkowitz M.L. // *J. Chem. Phys.* – 2005. – **123**. – P. 224702.
29. Róg T., Murzyn K., Milhaud J., Karttunen M., Pasenkiewicz-Gierula M. // *J. Phys. Chem. B.* – 2009. – **113**, N 8. – P. 2378.
30. Subczynski W. K., Wisniewska A., Yin J. J., Hyde J. S., Kusumi A. // *BioChem.* – 1994. – **33**. – P. 7670.
31. Marsh D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – **98**. – P. 7777.
32. Kurad D., Jeschke G., Marsh D. // *Biophys. J.* – 2003. – **85**. – P. 1025.
33. Conte E., Megli F.M., Khandelia H., Jeschke G., Bordignon E. // *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes*. – 2012. – **1828**, N 2. – P. 510.
34. Hiff T., Kevan L. // *J. Phys. Chem.* – 1989. – **93**. – P. 1572.
35. Bartucci R., Guzzi R., Marsh D., Sportelli L. // *Biophys. J.* – 2003. – **84**. – P. 1025.
36. Noethig-Laslo V., Cevc P., Arcon D., Sentjunc M. // *Origins Life Evol. Biosphere.* – 2003. – **34**. – P. 237.
37. Noethig-Laslo V., Cevc P., Arcon D., Sentjunc M. // *Appl. Magn. Res.* – 2004. – **27**. – P. 303.
38. Erilov D.A., Bartucci R., Guzzi R., Shubin A.A., Maryasov A.G., Marsh D., Dzuba S.A., Sportelli L. // *J. Phys. Chem. B.* – 2005. – **109**. – P. 12003.
39. Syryamina V. N., De Zotti M., Peggion C., Formaggio F., Toniolo C., Raap J., Dzuba S. A. // *J. Phys. Chem. B.* – 2012. – **116**. – P. 5653
40. Carmieli R., Papo N., Zimmermann H., Potapov A., Shai Y., Goldfarb D. // *BioPhys. J.* – 2006. – **90**, N 2. – P. 492.
41. Cieslak J.A., Focia P.J., Gross A. // *BioChem.* – 2010. – **49**, N 7. – P. 1486.
42. Kurshev V.V., Kevan L. // *J. Phys. Chem.* – 1995. – **99**. – P. 10616.
43. Ehrenstein G., Lecar H., Quart. Rev. // *Biophys.* – 1977. – **10**. – P. 1.
44. Oren Z., Shai Y. // *Biopolymers*. – 1998. – **47**. – P. 451.
45. Gazit E., Boman A., Boman H. G., Shai Y. // *Biochem.* – 1995. – **34**. – P. 11479.
46. Benedetti E., Bavoso A., Di Blasio B., Pavone V., Pedone C., Toniolo C., Bonora G. M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1982. – **79**. – P. 7951.
47. Epand R.F., Epand R.M., Monaco V., Stoia S., Formaggio F., Crisma M., Toniolo C. // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – **266**. – P. 1021.
48. Kaiser R.D., London E. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – **1375**. – P. 13.
49. Mazzuca C., Stella L., Venanzi M., Formaggio F., Toniolo C., Pispisa B. // *Biophys. J.* – 2005. – **88**. – P. 3411.
50. Kaiser R.D., London E. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – **1375**. – P. 13.

51. *Dzikovski B., Tipikin D., Freed J.* // J. Phys. Chem. B. – 2012. – **116**, N 23. – P. 6694.
52. *Syryamina V. N., Isaev N. R., De Zotti M., Peggion C., Formaggio F., Toniolo C., Raap J., Dzuba S. A.* // Biopolymers. – 2011. – **96**. – P. 497.
53. *Syryamina V. N., Isaev N. P., Peggion C., Formaggio F., Toniolo C., Raap J., Dzuba S. A.* // J. Phys. Chem. B. – 2010. – **114**. – P. 12277.
54. *Crisma M., Monako V., Formaggio F., Toniolo C., George C., Flippen-Anderson J.-L.* // Lett. Pept. Sci. – 1997. – **4**. – P. 213.
55. *Monaco V., Formaggio F., Crisma M., Toniolo C., Hanson P., Millhauser G.L.* // Biopolymers. – 1999. – **50**. – P. 239.
56. *Bartucci R., Guzzi R., Sportelli L., Marsh D.* // BioPhys. J. – 2009. – **96**, N 3. – P. 997.
57. *Salnikov E. S., De Zotti M., Formaggio F., Li X., Toniolo C., O'Neil J. D. J., Raap J., Dzuba S.A., Bechinger B.* // J. Phys. Chem. B. – 2009. – **113**. – P. 3034.
58. *Milov A.D., Samoiloa R.I., Tsvetkov Y.D., De Zotti M., Formaggio F., Toniolo C., Handgraaf J.-W. Raap.* // BioPhys. J. – 2009. – **96**, N 8. – P. 3197.
59. *Peggion C., Coin I., Toniolo C.* // Biopolymers. – 2004. – **76**. – P. 485.
60. *Milov A.D., Samoiloa R.I., Shubin A.A., Gorbunova E.Y., Mustaeva L.G., Ovchinnikova T.V., Raap J., Tsvetkov Y.D.* // Appl. Magn. Res. – 2010. – **38**, N 1. – P. 75.
61. *Gordon-Grossman M., Gofman Y., Zimmermann H., Frydman V., Shai Y., Ben-Tal N., Goldfarb D.* // J. Phys. Chem. B. – 2009. – **113**, N 38. – P. 12687.
62. *Gordon-Grossman M., Zimmermann H., Wolf S.G., Shai Y., Goldfarb D.* // J. Phys. Chem. B. – 2012. – **116**, N 1. – P. 179.
63. *Guzzi R., Bartucci R., Sportelli L., Esmann M., Marsh D.* // BioChem. – 2009 – **48**, N 35. – P. 8343.
64. *Guzzi R., Babavali M., Bartucci R., Sportelli L., Esmann M., Marsh D.* // Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes. – 2011. – **1808**, N 6. – P. 1618.
65. *Volkov A., Docker C., Bund T., Paulsen H., Jeschke G.* // Biophys. J. – 2009. – **96**, N 2. – P. 1124.
66. *Volkov A., Docker C., Polyhach Y., Paulsen H., Jeschke G.* // J. Phys. Chem. Lett. – 2010. – **1**. – P. 663.
67. *De Simone F., Guzzi R., Sportelli L., Marsh D., Bartucci R.* // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – **1768**. – P. 1541.
68. *Kurad D., Jeschke G., Marsh D.* // Biophys. J. – 2004. – **86**. – P. 264.
69. *Mayo D., Zhou A., Sahu I., McCarrick R., Walton P., Ring A., Troxel K., Coey A., Hawn J., Emwas A.-H., Lorigan G.A.* // Protein Science. – 2011. – **20**, N 7. – P. 1100.
70. *Zhou A., Abu-Baker S., Sahu I.D., Liu L., McCarrick R.M., Dabney-Smith C., Lorigan G.A.* // BioChem. – 2012. – **51**, N 38. – P. 7417.
71. *Liu L., Sahu I.D., Mayo D.J., McCarrick R.M., Troxel K., Zhou A., Shockley E., Lorigan G.A.* // J. Phys. Chem. – 2012. – **116**, N 36. – P. 11041.