

## Метод спектроскопии ЯМР в исследовании фармакологического потенциала ядов пауков на примере пространственной структуры двудоменного белка OtTx1a

Д.Д. Романовская<sup>1</sup>, К.Д. Надеждин<sup>1,2</sup>, М.Ю. Сачкова<sup>2</sup>, С.И. Ковальчук<sup>2</sup>, А.А. Василевский<sup>2</sup>,  
Е.В. Гришин<sup>2</sup>, А.А. Арсеньев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Паучьи яды - сложные многокомпонентные системы пептидной природы с широким спектром биологического действия. Знание пространственных структур и механизмов действия отдельных компонентов яда позволяет использовать их свойства при создании новых антибиотиков и анальгетиков на основе белковых молекул.

В данной работе мы исследовали белок OtTx1a, выделенный из яда паука *Oxyopes takobius* и состоящий из двух модулей, соединенных коротким линкером. N — концевой модуль (Lys<sup>1</sup> - Leu<sup>41</sup>) обладает цитотоксической активностью против широкого спектра патогенов. В то же время C - концевой модуль (Gly<sup>50</sup> - Glu<sup>59</sup>) по своим свойствам напоминает нейротоксины<sup>1</sup>.

В качестве основного экспериментального метода исследования мы использовали спектроскопию ЯМР на ядрах водорода <sup>1</sup>H, азота <sup>15</sup>N и изотопах углерода <sup>13</sup>C естественного природного содержания. Анализ и обработка спектров ЯМР позволили определить точную пространственную структуру белка.

OtTx1a	KFK-----WGKLFSTAKKLYKKGKKLSKNKNFKKALKFGKQLAKNLQAG
OtTx1b	KFK-----WGKLSAAKLYKKGKKLSKNKNFKKALKFGKQLAKNLQAG
OtTx2a	KFKLPKINWGKLSAKAKDVYKKGQKLAKNKNVKKALKY GKQLAENLAAG
OtTx2b	KFKFPKINWGKLSAKAKDVYKKGQKLAKNKNVKKALKY GKQLAENLAAG

Рис.1 Последовательности белков OtTx

Первый этап работы состоял в определении структуры N - концевого домена. Пептид был получен методом твердофазного химического синтеза на приборе Sygo I с использованием Fmoc(t-butyl) метода в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН. По данным ЯМР в воде основная цепь пептида не упорядочена. После добавления мицелл додецилфосфохолина - среды, имитирующей мембранное окружение - основная цепь пептида свернулась в α-спиральную конформацию. Структура N – концевого домена белка OtTx1a состоит из двух амфипатичных α-спиральных фрагментов (Lys<sup>1</sup>- Leu<sup>21</sup>; Lys<sup>25</sup>- Asn<sup>40</sup>), соединенных между собой коротким линкером.

Второй этап работы заключался в определении структуры C — концевой модуля OtTx1a. Было проведено выделение образца по протоколу Novagen pET system в  $^{15}\text{N}$  - меченой среде. По данным ЯМР белок представляет собой цистеиновый узел, стабилизированный 5 дисульфидными связями и 11 водородными связями. В ядре молекулы формируются два антипараллельных  $\beta$  - слоя длиной по 4 остатка ( $\text{His}^{26}$ - $\text{His}^{29}$  и  $\text{Thr}^{43}$  —  $\text{Val}^{46}$ ), петлевые участки соединены  $\beta$  -поворотами ( $\text{Ala}^{11}$ - $\text{Thr}^{14}$  и  $\text{Asp}^{18}$ - $\text{Asp}^{21}$ ). N – концевой участок домена ( $\text{Gly}^1$ - $\text{Val}^4$ ) является неупорядоченным и не формирует вторичной структуры.

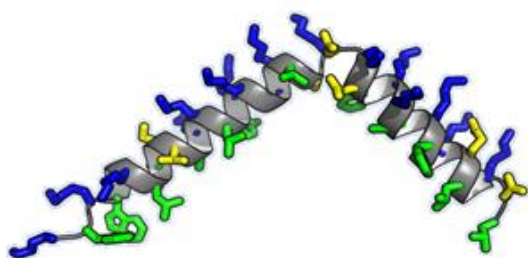


Рис.2a Пространственная структура OtTx1a – AMP(слева)

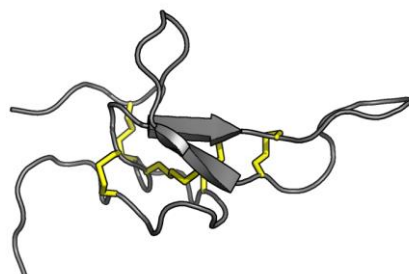


Рис. 2b Пространственная структура OtTx1a – ИСК(справа)

Наши данные находятся в полном согласии с ранее полученными результатами методом кругового дихроизма и подтверждают теоретический анализ аминокислотной последовательности пептида. Полученные результаты позволяют по-новому взглянуть на молекулярные механизмы антимикробных свойств пептидов.

## Литература

[1] Vassilevski AA, Sachkova MY, Ignatova AA, Kozlov SA, Feofanov AV, Grishin EV. Spider toxins comprising disulfide-rich and linear amphipathic domains: a new class of molecules identified in the lynx spider *Oxyopes takobius*. FEBS J. 2013 Dec; 280(23):6247-61

## Источник финансирования:

Грант No 14-14-01180 Российского научного фонда (РНФ) по теме «Молекулярные основы действия животных ядов». Руководитель: Василевский Александр Александрович