на правах рукописи

tono

Колосова Ольга Андреевна

# ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ – ПРОТЕГРИНОВ (PG-2 - PG-5) В РАСТВОРЕ С МИЦЕЛЛАМИ МЕТОДАМИ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

01.04.07 – физика конденсированного состояния

## ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Казань – 2019

Работа выполнена на кафедре медицинской физики и в лаборатории ЯМР института физики ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель:	Клочков Владимир Васильевич доктор химических наук, профессор		
Научный консультант:	Усачев Константин Сергеевич кандидат физико-математических наук, доцент		
Официальные оппоненты:	Анисимов Александр Васильевич доктор физико-математических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Лаборатории механизмов роста растительных клеток Казанского института биохимии и биофизики КазНЦ РАН Юрковская Александра Вадимовна доктор физико-математических наук, главный научный сотрудник МТЦ СО РАН		
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»		

Защита состоится «<u>30</u>» <u>мая</u> 2019 года в <u>15</u> ч <u>30</u> мин на заседании диссертационного совета Д 212.081.15 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 16а, ауд.110.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте Казанского (Приволжского) федерального университета http://www.kpfu.ru

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_ 2019 года.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор физико-математических наук, профессор

Phr

Ерёмин М.В.

#### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

#### Актуальность работы

В настоящее время большое внимание уделяется исследованию пространственной структуры белковых молекул [1], антимикробных пептидов (АП), свойствами. которые обладают антибиотическими Такой интерес вызван потребностью поиска новых препаратов в связи с развитием устойчивости многих патогенных микроорганизмов к современным антибиотикам. Антимикробные пептиды - это эволюционно сохраняющиеся компоненты, существующие в истории жизни на Земле, они являются ключевыми молекулами врожденного иммунитета [2]. Данные пептиды обладают широким спектром действия и могут быть использованы в качестве новых лекарственных препаратов. Знание пространственного строения антимикробных пептидов, а также комплекса «пептид - синтетическая модель поверхности мембраны клетки» в растворе позволит подойти к фундаментальному пониманию молекулярных механизмов действия пептидов на процессы в живых клетках, что, несомненно, определяет значимость и актуальность исследований.

Среди физико-химических методов исследования пространственной структуры биоорганических соединений важное место занимает спектроскопия ядерного разрешения магнитного резонанса высокого (MMP). Наряду с данными рентгеноструктурного анализа и методов молекулярной динамики, результаты применения методов ЯМР высокого разрешения являются необходимыми и важными для исследования молекулярной структуры и динамики биологических макромолекул в растворе. Исследования пространственного строения молекул в растворах сегодня основаны на использовании современных подходов в ЯМР, таких как двумерная (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY), гетероядерная гомоядерная корреляционная (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC) спектроскопия ЯМР. Двумерная ЯМР <sup>1</sup>Н-<sup>1</sup>Н NOESY спектроскопия (спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера), позволяет определять расстояния между магнитными ядрами, не связанных посредством скалярного спин-спинового взаимодействия и отстоящими друг от друга на расстоянии до 5 Å.

### Объекты исследования

В данной работе в качестве объектов исследования были выбраны следующие природные пептиды: протегрин-2 (PG-2), протегрин - 3 (PG-3), протегрин - 4 (PG-4), протегрин – 5 (PG-5) (обозначения аминокислотных остатков в общепринятых буквенных кодах, соответствующих номенклатуре IUPAC/IUBMB, приведены на рисунке 1). Данные соединения относятся к классу цитотоксичных (способных вызывать необратимые изменения в клетках) пептидов и играют важную роль в иммунных системах множества организмов.



Рисунок 1 – Аминокислотные последовательности пяти природных протегринов

Известно, что олигомеры некоторых цитотоксичных пептидов способны вызвать гибель определенных клеток путем образования трансмембранных пор (Рисунок 2). Согласно результатам последних исследований пептидов, способных к проникновению в клеточную мембрану, протегрины и ряд других АП с β-складчатой структурой имеют схожие механизмы действия [3].



Рисунок 2 – Модель трансмембранной поры, образованной мономерами PG-1 [3]

Так, антимикробные пептиды протегрины проявляют свою активность в результате взаимодействия с клеточной мембраной. Для понимания молекулярного механизма их действия, необходимо исследовать структуру и функции протегринов PG-2, PG-3, PG-4, PG-5 методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения в среде с добавлением модельных мембран, имитирующих поверхность клеток, как это уже было сделано для PG-1 [4].

## Цели и задачи исследования

Целью настоящей диссертационной работы являлось установление пространственного строения антимикробных пептидов протегринов PG-2, PG-3, PG-4, PG-5 с нативным содержанием изотопов <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C в комплексе с моделями поверхности биологических мембран в растворе и выявление общих закономерностей олигомеризации.

Для достижения указанной цели были решены следующие задачи:

- Регистрация необходимых для исследования одно- и двумерных спектров ЯМР (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC и <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC). Анализ и проведение полного соотнесения сигналов ЯМР на ядрах <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C для протегринов PG-2, PG-3, PG-4, PG-5.
- 2. Расчет пространственной структуры мономеров и димеров для протегринов PG-2, PG-3, PG-4, PG-5 на основе полученных экспериментальных ограничений.

#### Методы исследования и использованная аппаратура

При решении поставленных задач использовались двумерные гомоядерные и гетероядерные эксперименты ЯМР. Одномерные (<sup>1</sup>H) и двумерные (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C) спектры ЯМР были зарегистрированы на спектрометрах AVANCE II-500 (500МГц  $(^{1}H)$ ) и BRUKER AVANCE III HD (700МГц  $(^{1}H)$ , с четырехканальным криодатчиком) при температуре 293 К. Сигналы протонов в спектрах ЯМР были соотнесены с помощью методики на основе 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY и <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY экспериментов. Соотнесение сигналов ядер углерода <sup>13</sup>С было произведено 2D  $^{1}\text{H}-^{13}\text{C}$ HSOC.  $^{1}\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC экспериментов. посредством Расчет структуры пептидов производился методом молекулярной пространственной динамики в программах XPLOR-NIH и ARIA с использованием полученных

экспериментальных данных (межпротонных расстояний, двугранных углов и водородных связей) в качестве ограничений на геометрию молекулы [5,7].

На защиту выносятся положения, сформулированные в выводах.

**Научная новизна.** В данной работе впервые получены пространственные структуры пептидов PG-2, PG-3, PG-5 в растворе с мицеллами ДФХ и пространственная структура пептида PG-4 в растворе с детергентом CHAPS. На основании данных двумерной ЯМР <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY спектроскопии и моделирования молекулярных структур (с использованием программ XPLOR-NIH и ARIA) определены координаты атомов (в формате PDB), межпротонные расстояния и двугранные углы исследованных пептидов. Показано, что данные АП в присутствии модельных мембран образуют  $\beta$ -складку. Также установлено наличие димеризации протегринов в растворе с мицеллами и предположена модель о поэтапном образовании трансмембранных тороидальных пор.

<u>Обоснованность и достоверность результатов</u> подтверждается: использованием адекватных задачам методики и техники эксперимента; применением прямых методов измерения межпротонных расстояний; воспроизводимостью данных; соответствием с результатами, полученными другими методами, в том числе путем теоретического моделирования структуры; использованием современного оборудования для проведения ЯМР экспериментов и программного обеспечения.

#### Научная и практическая ценность заключается в том, что:

- 1. Установленные спектрально-структурные параметры (спектральная информация и пространственная структура депонированы в международные базы данных) в дальнейшем могут использоваться как справочный материал И быть применены для установления структур других макромолекул, подобных исследованным.
- Структуры, полученные в результате данной работы, позволяют строить модели о взаимодействии β-складчатых антимикробных пептидов с мембранами патогенных бактерий и вирусными оболочками.

#### Личный вклад автора

Участие при постановке целей и задач исследования. Регистрация одно- и двумерных спектров ЯМР и их обработка. Анализ и интерпретация полученных

результатов. Построение структур методом молекулярной динамики. Написание статей по теме данных исследований.

## Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на конференциях, семинарах и научных школах различного уровня таких, как: Двадцать первая Всероссийская научная конференция студентов-физиков и молодых ученых (ВНКСФ-21, г. Омск, 2015); VI Всероссийская конференция «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях» (г. Казань, 2015); 12-ая зимняя школа-конференция Spinus (СПбГУ, г. Санкт-Петербург, 2015); International symposium "Magnetic resonance: from fundamental research to practical application" (г. Казань, 2016); Международная конференция «Трансляционная медицина 2016» (г. Казань, 2016); 13th International Youth school-conference "Magnetic resonance and its applications"(r. Санкт-Петербург, 2016); III Международная школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Материалы и технологии XXI века" (г. Казань, 2018); The 2018 ASCB EMBO Meeting (г. Сан Диего, 2018).

Исследуемые в данной работе объекты были получены методом твердофазного синтеза в Технологическом университете Лулео (Швеция) под руководством доктора физико-математических наук Филиппова А.В.

<u>Публикации</u>. По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 4 статьи в реферируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

#### Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 122 страницах (включая 3 страницы приложения) машинописного текста и содержит 56 рисунков, 13 таблиц; включает введение, три главы, основные результаты и выводы, публикации автора по теме диссертации, список литературы из 117 наименований.

#### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель, приведены методы и объекты исследования, научная новизна и

практическая значимость полученных результатов, представлены выносимые на защиту научные положения.

<u>В первой главе</u> изложены основные положения классической и квантовомеханической теории ЯМР. Приводится квантово-механическое описание двумерных спектров ЯМР, описаны основные принципы расчёта структуры методом молекулярной динамики. Рассмотрены основы двумерной спектроскопии ЯМР COSY, TOCSY и NOESY, а также подробно рассмотрена методика расчета межпротонных расстояний в органических молекулах, приводится описание экспериментальной части диссертационной работы.

<u>Во второй главе</u> приводится литературный обзор, в котором изложены основные положения по антимикробным пептидам, описываются их свойства, и приводится их классификация, а также содержится описание исследуемых в работе объектов: антимикробных пептидов протегринов PG-2, PG-3, PG-4, PG-5.

**Третья глава** посвящена исследованию пространственного строения антимикробных пептидов протегринов PG-2, PG-3, PG-4 и PG-5 в растворе в комплексе с моделями поверхности клеточной мембраны (ДФХ и CHAPS), а также установлению механизма димеризации и олигомеризации протегринов. Используя подход, основанный на анализе экспериментально полученных межпротонных расстояний с помощью метода молекулярной динамики в программах XPLOR-NIH и ARIA, определена пространственная структура и геометрические параметры (координаты атомов в pdb формате) протегринов PG-2, PG-3, PG-4, PG-5 в растворе с мицеллами ДФХ и CHAPS.

# <u>Пространственная структура антимикробного пептида протегрина-2 в</u> комплексе с мицеллами <u>ДФХ</u>

Антимикробный пептид PG-2 состоит из 16 аминокислотных остатков. Значения химических сдвигов для PG-2 в комплексе с мицеллами додецилфосфохолина (ДФХ) были получены с помощью двумерных ЯМР методик <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H TOCSY и NOESY (Рисунок 3).



Рисунок 3 – Область NH-На двумерного  ${}^{1}\text{H}{-}^{1}\text{H}$  NOESY ( $\tau_{\text{mix}} = 100$  мс) спектра ЯМР (500 МГц) для PG-2 в растворе  $H_2O(90\%) + D_2O(10\%)$  с мицеллами додецилфосфохолина

Для расчета пространственной структуры PG-2 в комплексе с мицеллами додецилфосфохолина (Рисунок 4) было определено 174 межпротонных расстояния (Таблица 1). Для нахождения структуры данного пептида в растворе с мицеллами ДФХ с минимальной энергией нами задавались потенциалы: ЯЭО, ограничения на двугранные углы, ограничения на водородные связи, a также потенциал использующий базу данных двугранных углов определенными между аминокислотными остатками (rama).

Пространственные ограничения	Количество	
ЯЭО контакты		
Внутри аминокислотных остатков	127	
Последовательные ( $ i - j  = 1$ )	28	
Среднего диапазона (1 <   <i>i</i> − <i>j</i>   ≤ 4)	8	
Дальнего диапазона ( i – j  > 4)	11	
Ограничения на геометрию		
Водородные связи	6	
Двугранные углы	30	

Таблица 1 – Набор ограничений, использовавшихся в расчете структуры PG-2

Всего было рассчитано 200 структур, из которых было отобрано 20 с минимальной энергией для дальнейшей оптимизации с молекулами воды в программе Xplor-NIH. Анализ качества полученной структуры PG-2 в ДФХ мицеллах производили с помощью карты Рамачандрана для двугранных углов: 78.6% всех аминокислотных остатков наблюдались в наиболее вероятных областях, и 100% остатков - в разрешенных областях. Среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи 1,33 Å.



Рисунок 4 – Суперпозиция 20 структур с минимальной энергией для PG-2 (2MUH) в растворе  $H_2O(90\%) + D_2O(10\%)$  с мицеллами ДФХ (соотношение пептид/мицелла ~1:20)

Структура PG-2 представляет собой антипараллельную β-складку, образованную аминокислотными остатками 6-9 и 12-15. Также как и в случае PG-1, для PG-2 нами наблюдалось образование боковыми цепями аминокислотных остатков Leu5, Phe12, Val14 и Val16 аполярного кластера [4]. Основываясь на этих данных можно предположить, что PG-2 взаимодействует с мицеллами додецилфосфохолина путем взаимодействия гидрофобной области пептида с поверхностью мицеллы.

В отличие от PG-1 в спектрах NOESY протегрина PG-2 не наблюдалось кросспиков между протонами далеких аминокислотных остатков, принадлежащих разным цепям мономеров, образующих димер. В случае протегрина PG-1 кросс-пик между На протонами Val16 и Val18 указывал на наличие механизма димеризации. Однако, в силу того, что химические сдвиги На протонов Val14 и Val16 для PG-2 были практически идентичны (4,38 и 4,34 м.д.), утверждать об образовании димера для PG-2 не представляется возможным. Тем не менее, это не является доказательством того, что димеры не образуются. Этот вопрос требует дальнейшего изучения другими методам, такими как твердотельная ЯМР спектроскопия, как это было сделано для PG-1.

<u>Пространственная структура пептида протегрина-3 в комплексе с мицеллами</u> ДФХ

Для более детального изучения данных пептидов - протегринов, а также их взаимодействия с мембранами нами была исследована структура протегрина PG-3, длина которого на 2 аминокислотных остатка больше, чем PG-2.

С помощью двумерных ЯМР экспериментов <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H TOCSY и NOESY нами были получены значения протонных химических сдвигов для PG-3 в комплексе с мицеллами ДФХ. Кроме того, с помощью двумерных гетероядерных методик ЯМР (<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-TOCSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC, <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC) нами были получены <sup>13</sup>C и <sup>15</sup>N химические сдвиги для PG-3 в растворе с мицеллами ДФХ.

На рисунке 5 представлены фрагменты спектров  ${}^{1}\text{H}{}^{-1}\text{H}$  COSY и  ${}^{1}\text{H}{}^{-1}\text{H}$  NOESY для PG-3 при температуре 293К в водном растворе с мицеллами ДФХ (молярное отношение детергента к белку ~12).



Рисунок 5 - Области спектров ЯМР <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (**A**); <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY ( $\tau_{mix} = 100 \text{ мc}$ ) (**Б**)

Всего для PG-3 было определено 170 межпротонных расстояний, которые в дальнейшем использовались для расчета пространственной структуры PG-3 в комплексе с мицеллами додецилфосфохолина (ДФХ) (Таблица 2). Таблица 2 – Набор пространственных ограничений, использовавшихся в расчете 20 структур с минимальной энергией для PG-3 в растворе  $H_2O(90\%) + D_2O(10\%)$  с мицеллами ДФХ

Пространственные ограничения	Количество
ЯЭО контакты	
Внутри аминокислотных остатков	54
Последовательные ( $ i - j  = 1$ )	90
Среднего диапазона (1 <   <i>i</i> − <i>j</i>   ≤ 4)	11
Дальнего диапазона ( i – j  > 4)	0
Общее число расстояний внутри мономера	155
Общее число межмономерных расстояний	12
Ограничения на геометрию	
Водородные связи	6
Двугранные углы	28

Наличие большого количества ЯЭО контактов ближнего и среднего диапазона позволяют нам предположить, что PG-3 принимает форму β-складки в присутствии мицелл ДФХ (PDB: 2MZ5, Рисунок 6). Полученные ограничения на геометрию молекулы использовались для расчета пространственной структуры исследуемого образца методом молекулярной динамики в программе Xplor-NIH [5]. Среднеквадратичное отклонение координат атомов от основной цепи составляет 1,37Å.



Рисунок 6 – (А) Суперпозиция 20 структур с минимальной энергией для PG-3 (PDB: 2MZ5) в растворе  $H_2O(90\%) + D_2O(10\%)$  с мицеллами ДФХ. (Б) Структура мономера PG-3

Также, необходимо отметить, что в экспериментах по протонно-дейтериевому обмену в растворе D2O нами наблюдались сигналы от амидных протонов аминокислотных остатков 5-16. Установленный факт свидетельствует о том, что данные протоны участвуют в формировании водородных связей для стабилизации вторичной структуры пептида.

Для данного пептида в спектрах NOESY помимо большого числа кросс-пиков, характерных для  $\beta$ -складчатой структуры, наблюдались также сигналы от удаленных друг от друга фрагментов молекулы. Объяснением наличия не характерных для  $\beta$ -складчатой структуры межпротонных расстояний и медленного обмена амидных протонов может быть участие этих протонов в образовании водородных связей между мономерами PG-3 при образовании антипараллельного NCCN димера. Используя межпротонные расстояния, определённые из <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY спектров, в качестве входных параметров для расчётов пространственной структуры протегрина PG-3 в растворе с мицеллами ДФХ, были установлены конформация и геометрические параметры димера протегрина PG-3 (PDB ID: 2MZ6, Рисунок 7).



Рисунок 7 - Структура димера PG-3 (PDB ID: 2MZ6) в растворе с мицеллами ДФХ. ЯЭО контакты между мономерами показаны пунктирными линиями

Качество полученных структур производили с помощью карт Рамачандрана: 93,8% для димера находились в благоприятных областях карты Рамачандрана, и 100% всех остатков находились в разрешенных регионах.

Несмотря на то, что часть ЯЭО контактов между протонами аминокислотных была объяснена образованием димера, в спектрах NOESY также присутствовали кросс-пики между другими протонами остатков L5 и C8 (L5 H $\alpha$  и C8 H $\beta$ ; L5 H $\alpha$  и C8 HN; L5 H $\delta$  и C8 H $\beta$ ). Более того, структура димера не объясняет наличие медленно обменивающихся амидных протонов основной цепи остатков C6 и C8. Аналогично, как это было сделано ранее, мы предположили, что амидные протоны остатков C6 и C8 участвуют в образовании водородных связей, но уже между димерами, таким образом, наблюдается механизм дальнейшей ассоциации димеров в олигомеры. Так как поверхность мембраны имеет положительный заряд, гидрофобный кластер должен быть погружен внутрь мембраны, а остатки с отрицательным зарядом должны быть обращены в сторону растворителя, мы предполагаем, что гидрофобный кластер PG-3 обращен в сторону мицеллы, а дисульфидные связи ориентированы в противоположном направлении внутрь тороидальной поры, как было показано ранее [6]. Предполагаемая структура мембранной поры, образованной октамером PG-3, представлена на рисунке 8.



Рисунок 8 - Справа показана вероятная структура трансмембранной поры, образованная 8 молекулами протегрина PG-3 (октамер). Слева стрелками показаны ЯЭО контакты, участвующие в олигомеризации димеров

<u>Пространственная структура протегрина-4 в комплексе с детергентом</u> <u>CHAPS</u>

Антимикробный пептид PG-4 не растворим в присутствии мицелл ДФХ. Его растворимость повышается в растворе с другим цвиттер-ионным детергентом – CHAPS. Изменение растворимости PG-4 объясняется тем, что в аминокислотной последовательности данного пептида, в отличие от всех других протегринов, присутствуют неполярные гидрофобные аминокислоты, триптофан и изолейцин.

Нами было произведено соотнесение сигналов по данным двумерных спектров <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY и NOESY экспериментов PG-4 в растворе  $H_2O + D_2O$  с детергентом CHAPS (BMRB ID 34357) (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Двумерный спектр ЯМР <sup>1</sup>H–<sup>1</sup>H NOESY ( $\tau_{mix}$ = 200мс) для PG-4 в растворе  $H_2O(90\%) + D_2O(10\%)$  с детергентом CHAPS (соотношение пептид/мицелла ~1:4), 293 К

Полученные ограничения (Таблица 3) на геометрию молекулы использовались для расчета пространственной структуры исследуемого образца методом молекулярной динамики в программе ARIA [7]. Для анализа вторичной структуры для PG-4 также были рассчитаны индексы химического сдвига, представляющие собой разность значений химических сдвигов исследуемого пептида и табличных значений химических сдвигов аминокислотных остатков в случае неупорядоченной структуры пептида (Рисунок 10).

Пространственные ограничения	Количество	
ЯЭО контакты		
Внутри аминокислотных остатков	68	
Последовательные ( $ i - j  = 1$ )	51	
Среднего диапазона (1 <   <i>i</i> − <i>j</i>   ≤ 4)	15	
Дальнего диапазона ( i – j  > 4)	11	
Общее число расстояний внутри мономера	145	
Общее число межмономерных расстояний	15	
Ограничения на геометрию		
Водородные связи	12	
Двугранные углы	25	

Таблица 3 – Набор пространственных ограничений для PG-4 с мицеллами CHAPS

Из рисунка видно наличие двух групп со смещением химических сдвигов в низкопольную область, что характерно для вторичной структуры в виде β-складки.



Рисунок 10 - Отклонения величин химических сдвигов На протонов для PG-4 в растворе с детергентом CHAPS

Далее, используя пространственные ограничения, было произведено моделирование структуры PG-4 в водном растворе методом молекулярной динамики в программе ARIA [7]. Структура мономера PG-4 с наименьшей энергией представлена на рисунке 11Б. Всего было рассчитано 200 структур PG-4, из них 20 структур с минимальной энергией были выбраны для конечного построения пространственной структуры PG-4 (Рисунок 11, PDB ID: 6QKF). Качество полученных структур производили с помощью карт Рамачандрана: 93,8 %

аминокислотных остатков наблюдались в наиболее благоприятной области карты, и 100% аминокислотных остатков - в разрешенных областях карты Рамачандрана.



Рисунок 11 – Ансамбль из 20 структур с наименьшей энергией (А) и структура мономера (Б) PG-4 в растворе  $H_2O(90\%) + D_2O(10\%)$  с мицеллами CHAPS по данным ЯМР спектров

При построении структуры мономера PG-4 нами были найдены 15 расстояний, которые не укладывались в его структуру. На основании данных полученных из анализа двумерных <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H спектров, а также основываясь на данных о том, что PG-1 образует димеры в растворе с моделями поверхности клеточных мембран, мы предполагаем, что данные контакты относятся к межмономерным связям и указывают на присутствие димеров PG-4 в комплексе с детергентом CHAPS (Рисунок 12).



Рисунок 12 - Димер PG-4 в растворе с мицеллами CHAPS по данным ЯМР. Межмономерный ЯЭО контакт между W11 и C15 (~4,9Å) выделен красной стрелкой

<u>ДФХ</u>

Отнесение сигналов ЯМР PG-5 в комплексе с мицеллами ДФХ производилось на основе двумерных <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY и NOESY методик ЯМР (Рисунок 13). Полученная спектральная информация была депонирована в BioMagResBank (BMRB ID 26009).



Рисунок 13 – Фрагмент <sup>1</sup>Н-<sup>1</sup>Н NOESY ( $\tau_{mix} = 150$  мс) спектра ЯМР (293 К). А) NH-На фрагмент; Б) На-На фрагмент. Межмономерный V14На- V16На ЯЭО сигнал выделен стрелкой

Таблица 4 – Набор пространственных ограничений, использованных в расчете 20 структур с минимальной энергией для PG-5 в растворе  $H_2O(90\%) + D_2O(10\%)$  с мицеллами ДФХ

Пространственные ограничения	Количество	
ЯЭО контакты		
Внутри аминокислотных остатков	89	
Последовательные ( $ i - j  = 1$ )	65	
Среднего диапазона (1 <   <i>i</i> − <i>j</i>   ≤ 4)	5	
Дальнего диапазона ( i – j  > 4)	5	
Общее число расстояний внутри мономера	164	
Общее число межмономерных расстояний	6	
Ограничения на геометрию		
Водородные связи	6	
Двугранные углы	25	

Всего 164 пространственных ограничения использовались для построения структуры протегрина с помощью метода молекулярной динамики в программе Xplor

NIH (Таблица 4) [5]. Нами было рассчитано 200 структур PG-5, и из них 20 структур с минимальной энергией были выбраны для конечного построения пространственной структуры PG-5 (PDB ID: 2NC7). Суперпозиция структур с минимальной энергией для PG-5 в растворе  $H_2O+D_2O$  с мицеллами ДФХ представлена на рисунке 14.



Распределение электростатического потенциала

Рисунок 14 – Пространственная структура PG-5. **A**) Ансамбль из 20 структур с минимальной энергией. **Б**) Ленточное представление структуры. **B**) Распределение электростатического потенциала на поверхности пептида

Процесс димеризации протегрина в присутствии мицелл ДФХ был исследован для PG-1[4], для PG-3 и PG-4 с помощью спектроскопии ЯМР. Для PG-5 мы также наблюдали кросс-пики в NOESY эксперименте, подтверждающие, что PG-5 в растворе с мицеллами ДΦХ образует антипараллельный димер. Данные экспериментов атомно-силовой микроскопии и расчетов методом молекулярной динамики показали, что протегрины способны образовывать тороидальные поры на поверхности мембраны, состоящие из 8 молекул протегрина (октамер) [8]. Основываясь на этих данных, мы использовали полученные нами результаты из NOESY экспериментов для PG-5 для построения пространственной структуры октамера (Рисунок 15).



Рисунок 15 – Структура трансмембранной поры PG-5. А) Вид сверху. Пора состоит из восьми одинаковых цепочек пептида. Б) Вид сбоку

Полученные нами пространственные структуры PG-2, PG-3, PG-4 и PG-5 в растворе с мицеллами, имитирующими заряженную поверхность клеточной мембраны, позволяют подтвердить теорию образования трансмембранных пор протегринами путем олигомеризации. На начальном этапе данного процесса происходит взаимодействие пептида с клеточной мембраной бактерии через гидрофобные и положительно заряженные аминокислотные остатки (Рисунок 16). Далее идет процесс димеризации протегрина, как первый этап олигомеризации, сопровождаемый образованием олигомера (октамера), который представляет собой трансмембранную пору и отвечает за дальнейшее разрушение мембраны бактерии, гриба или оболочки вируса.



Рисунок 16 – Модель формирования трансмембранной поры в биологической мембране

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

На основании данных одномерной ( ${}^{1}H, {}^{13}C$ ) и двумерной ( ${}^{1}H-{}^{1}H$  COSY,  ${}^{1}H-{}^{1}H$  TOCSY,  ${}^{1}H-{}^{1}H$  NOESY,  ${}^{1}H-{}^{13}C$  HSQC,  ${}^{1}H-{}^{13}C$  HMBC) спектроскопии ЯМР и

теоретического моделирования молекулярных структур (с использованием программ XPLOR-NIH и ARIA) были получены следующие результаты:

• впервые определены координаты атомов (в формате PDB) и пространственная структура пептида PG-2 в растворе с мицеллами ДФХ. Полученная спектральная информация и пространственная структура были депонированы в международные базы данных (BioMagResBank (ID 25212), Protein Data Bank (PDB: 2MUH)). Установлено, что пептид PG-2 в растворе с мицеллами ДФХ образует β-складчатую структуру;

• впервые определены координаты атомов (в формате PDB) и пространственная структура мономера и димера пептида PG-3 в растворе с мицеллами ДФХ. Полученная спектральная информация и пространственная структура были депонированы в международные базы данных (BioMagResBank (ID 25474) и Protein Data Bank (PDB: 2MZ5, 2MZ6).). Установлено наличие механизма димеризации протегрина-3, а также предположена модель о поэтапном образовании трансмембранных пор;

• впервые определена пространственная структура пептида PG-4 в растворе с детергентом CHAPS и протегрина PG-5 в растворе с мицеллами ДФХ. Установлено наличие вторичной структуры в виде β – шпильки для PG-4 и PG-5 в присутствии модельных мембран. Также установлено наличие механизма димеризации протегринов на основе межмолекулярных контактов ЯЭО. Полученная спектральная информация и пространственная структура были депонированы в международные базы данных: для PG-4 - BioMagResBank (ID 34357) и Protein Data Bank (PDB: 6QKF), для PG-5 - BioMagResBank (ID 26009) и Protein Data Bank (PDB: 2NC7);

• полученные данные о пространственном строении антимикробных пептидов протегринов PG-2, PG-3, PG-4, PG-5 в комплексе с мицеллами, а также данные о наличии механизма димеризации протегринов PG-3, PG-4, PG-5 позволяют построить обоснованную модель олигомеризации протегринов и сделать предположение о том, что протегрины могут образовывать трансмембранные поры на поверхности клеточных мембран.

#### ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- A1. High-resolution NMR structure of the antimicrobial peptide protegrin-2 in the presence of DPC micelles / K.S. Usachev, S.V. Efimov, O.A. Kolosova, A.V. Filippov, V.V. Klochkov // Journal of Biomolecular NMR.-2015.– V. 61. pp. 227-234.
- A2. Antimicrobial peptide protegrin-3 adopt an antiparallel dimer in the presence of DPC micelles. A high-resolution NMR study / K.S. Usachev, S.V. Efimov, O.A. Kolosova, E.A. Klochkova, A.V. Aganov, V.V. Klochkov // Journal of Biomolecular NMR.-2015.– V. 62. pp. 71-79.
- A3. Antimicrobial Peptide Protegrins Interact with DPC Micelles by Apolar Hydrophobic Cluster: Structural Studies by High-Resolution NMR Spectroscopy / O.A. Kolosova, K.S. Usachev, A.V. Aganov, V.V. Klochkov // BioNanoScience. 2016. V. 6. pp. 317–319.
- A4. Oligomerization of the antimicrobial peptide protegrin-5 in membrane mimicking environment. Structural studies by high-resolution NMR spectroscopy / K.S. Usachev,
  O.A. Kolosova, E.A. Klochkova, A.R. Yulmetov, A.V. Aganov, V.V. Klochkov // European Biophysics Journal.-2017.– V. 46. pp. 293-300.
- A5. Structure investigations of PG-4 by High Resolution NMR spectroscopy / O.
   Kolosova, K. Usachev, E. Klochkova, V. Klochkov // Molecular Biology of the Cell. 2018. V. 29(26). P. 561.
- A6. Dimer Structure of Animicrobial Peptide Protegrin-3 in the Presence of DPC Micelles from High-resolution NMR / K.S. Usachev, S.V. Efimov, O.A. Kolosova, E.A. Klochkova, A.V. Aganov., V.V. Klochkov // IV Всероссийская конференция «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях» при участии зарубежных ученых с элементами школы для молодых исследователей: сборник тезисов. Казань: КФУ, 2015. с. 178-179.
- А7. Колосова О.А. Пространственное строение антимикробного пептида PG-2 в растворе с мицеллами по данным спектроскопии ЯМР высокого разрешения / О.А. Колосова, К.С. Усачев, В.В. Клочков // Сборник тезисов, материалы Двадцать первой Всероссийской научной конференции студентов-физиков и молодых ученых (ВНКСФ-21, Омск): материалы конференции, тезисы докладов: в 1т.Т.1. Екатеринбург Омск: издательство АСФ России, 2015. с. 358-359.

- А8. Колосова О.А. Пространственное строение антимикробных пептидов протегринов PG-2 и PG-3 в растворе с мицеллами по данным спектроскопии ЯМР высокого разрешения/ О.А. Колосова, К.С. Усачёв, В.В. Клочков // 12-я Зимняя молодежная школа-конференция «Магнитный резонанс и его приложения»: Материалы конференции. Санкт-Петербург: Издательство BBM, 2015. с. 178-180.
- A9. Usachev, K.S. Structural studies of the antimicrobial peptides protegrins in membrane mimicking environment by high-resolution NMR spectroscopy / K.S. Usachev,
  O.A. Kolosova, E.A. Klochkova, A.V. Aganov, V.V. Klochkov // Международный симпозиум «Магнитный резонанс: от фундаментальных исследований к практическим приложениям»: сборник тезисов. Казань: КФУ, 2016. с. 179-180.
- А10. Колосова О.А. Исследование пространственной структуры PG-5 в растворе с мицеллами методами спектроскопии ЯМР высокого разрешения / О.А. Колосова, К.С. Усачев, В.В. Клочков // Сборник тезисов II Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» / Отв. ред. А.В. Герасимов. [Электронный ресурс] – Казань: КФУ, 2016. – С. 255.
- A11. Kolosova O.A. Structural studies of the antimicrobial peptide protegrins-5 in membrane mimicking environment by high-resolution NMR spectroscopy / O.A. Kolosova, K.S. Usachev, V.V. Klochkov // 13th International Youth school-conference. "Magnetic resonance and its applications": Book of abstracts. Saint-Petersburg: VVM Publishing house, 2016. pp. 197-199.
- А12. Колосова О.А. Структурные исследования антимикробного пептида PG-4 в растворе с модельными мембранами по данным спектроскопии ЯМР высокого разрешения / О.А. Колосова, К.С. Усачев, В.В. Клочков // Сборник тезисов III Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» / Отв. ред. А.В. Герасимов. [Электронный ресурс] – Казань: КФУ, 2018. – С. 43.

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Antimicrobial and conformational studies of the active and inactive analogues of the protegrin-1 peptide [Text] / S. Rodziewicz-Motowidlo, B. Mickiewicz, K. Greber et al. // FEBS Journal. – 2010. – V. 277. – pp. 1010–1022.
- Auvynet, C. Multifunctional host defense peptides: antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity [Text] / C. Auvynet, Y. Rosenstein // The FEBS journal and Rosenstein – 2009. – V. 276(22). – pp. 6497–6508.
- Antimicrobial properties of amyloid peptides [Text] / B.L. Kagan, H. Jang, R. Capone et al. // Mol.Pharmaceutics. – 2012. – V. 9. – P. 708–717.
- Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes [Text] / R.L. Fahner, T. Dieckmann, S. Harwig, R.I. Lehrer // Chemistry & Biology. – 1996. – V. 3(7). – pp. 543-550.
- The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package [Text] / C.D. Schwieters, J.J. Kuszewski, N. Tjandra, G.M. Clore // Journal of Magnetic Resonance . – 2003. – V. 160. – pp. 65-73.
- Langham, A.A. On the nature of antimicrobial activity: a model for protegrin-1 pores [Text] / A.A. Langham, A.S. Ahmad, Y.N. Kaznessis // J. Am. Chem. Soc. – 2008. – V. 130. – pp. 4338–4346.
- 7. ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation / J.P.Linge, M.Habeck, W. Rieping, M. Nilges // Bioinformatics. – 2003. – V. 19. – pp. 315-316.
- Jang, H. Conformational study of the protegrin-I (PG-I) dimer interaction with lipid bilayers and its effect [Text] / H. Jang, B.Y. Ma, R. Nussinov // BMC Structural Biology. - 2007. - V. 7. - pp. 21-35.