

Изучение пространственной структуры ковалентного димера кателицидина козы *Capra hircus* в мембрано моделирующей среде методом ЯМР-спектроскопии

Научный руководитель – Шенкарев Захар Олегович

Миронов Павел Андреевич

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоинженерии, Москва, Россия

E-mail: pavel.mironov@student.msu.ru

Широкое применение антибиотиков привело к возникновению бактериальных штаммов, обладающих устойчивостью к их действию. В настоящий момент актуальны поиски альтернативных методов борьбы с антибиотикорезистентными штаммами, одним из которых являются антимикробные пептиды (АМП) врожденной иммунной системы. АМП способны активно взаимодействовать с мембраной бактерий, нарушая ее целостность. Примечательно, что механизм действия не направлен на повреждение мембраны эукариот, поэтому АМП в перспективе могут применяться для лечения бактериальных заболеваний, в частности для подавления резистентных штаммов.

В качестве объекта исследования был выбран антимикробный пептид кателицидин-1 (ChDode) козы *Capra hircus*. ChDode проявляет высокую антимикробную активность к антибиотикорезистентным штаммам грамотрицательных и некоторых грамположительных бактерий [1]. Изучение биологической активности кателицидина-1 может стать подспорьем для разработки антибактериальных препаратов широкой направленности.

Мы исследовали взаимодействие кателицидина-1 с мембраной бактерий. Для этого мы получили пространственную структуру ChDode в воде и в фосфолипидных мицеллах, имитирующих плазматическую мембрану бактерий, методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса [2]. Проведённое исследование показало, что кателицидин-1 в водном растворе образует гомодимер, имеющий структуру антипараллельного β -листа, который состоит из связанных дисульфидными связями двух симметричных молекул ChDode. Амфипатические свойства кателицидина-1, обусловленные характерным расположением полярных и заряженных аминокислотных остатков на N- и C-концах, а также гидрофобных остатков в центральной части пептида, позволяют ему проникать в мембрану бактериальных клеток. При добавлении фосфолипидных мицелл гомодимер кателицидина-1 димеризуется с образованием тетрамера, который полностью встраивается в мицеллу, пронизывая ее насквозь: все аминокислотные остатки, кроме остатков на N- и C-концах, находятся в липидной фазе, что было подтверждено при добавлении парамагнитных меток. Таким образом, амфипатические свойства пептида, а также тенденция к олигомеризации димеров на мембране с образованием поры лежат в основе антимикробной активности ChDode.

Источники и литература

- 1) Shamova, O. V. et al. (2016) 'Minibactenecins ChBac7.N α and ChBac7. N β - Antimicrobial Peptides from Leukocytes of the Goat *Capra hircus*', Acta Naturae, 8(3), pp. 136–146.
- 2) Mineev, K. S. and Nadezhdin, K. D. (2017) 'Membrane mimetics for solution NMR studies of membrane proteins', Nanotechnology Reviews, 6(1), pp. 15–32. doi: 10.1515/ntrev-2016-0074

Иллюстрации

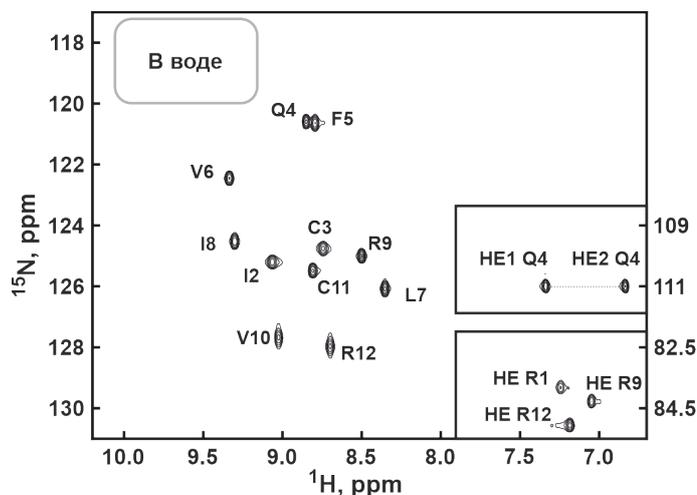


Рис. 1. 2D ^1H - ^{15}N HSQC спектры 0,4 мМ ^{15}N -меченого ChDode в воде (pH 4,0, 30 °C). Приведены полученные резонансные обозначения. Резонансы групп боковых цепей выделены в рамке.

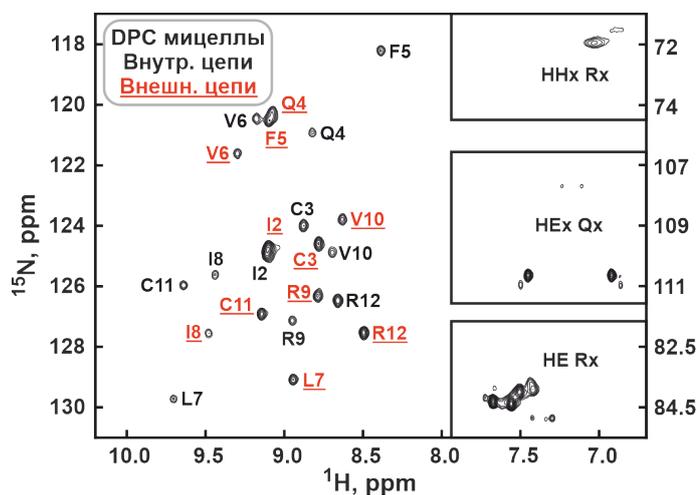


Рис. 2. 2D ^1H - ^{15}N HSQC спектры 0,4 мМ ^{15}N -меченого ChDode в мицеллах DPC (pH 4,0, 40 °C, P:D = 1:130). Приведены полученные резонансные обозначения. Резонансы групп боковых цепей выделены в рамке. Резонансные сигналы остатков внешних цепей тетрамера ChDode в DPC показаны красным цветом и подчеркнуты.

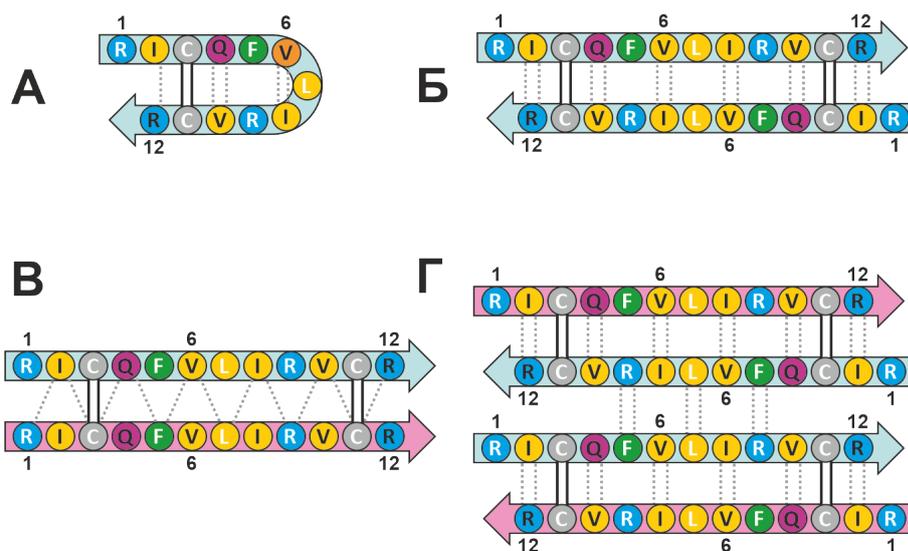


Рис. 3. Возможные структуры ChDode, предложенные в качестве гипотетических перед проведением исследования. (А) Модель β -шпильки с γ -поворотом; (Б). Антипараллельный β -лист (подтверждается текущим исследованием); (В). Модель параллельного β -листа; (Г). Антипараллельный нековалентный димер, состоящий из антипараллельных гомодимеров, связанных дисульфидными связями по данным ЯМР в мицеллах (текущее исследование).

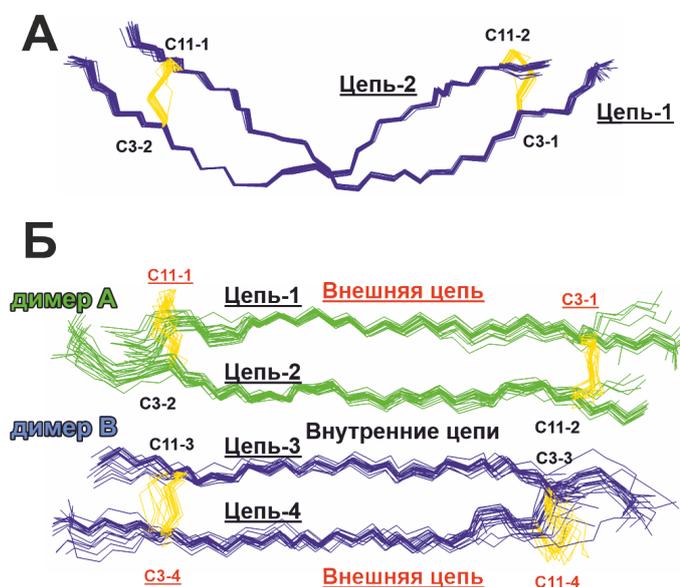


Рис. 4. Наборы из 20 лучших структур димера ChDode в воде (А) и тетрамера в мицеллах DPC (Б). Основная цепь димера в воде показана синим цветом. Основная цепь димеров А и В внутри тетрамера в мицеллах DPC показаны зеленым и синим цветом соответственно. Дисульфидные связи окрашены в желтый цвет

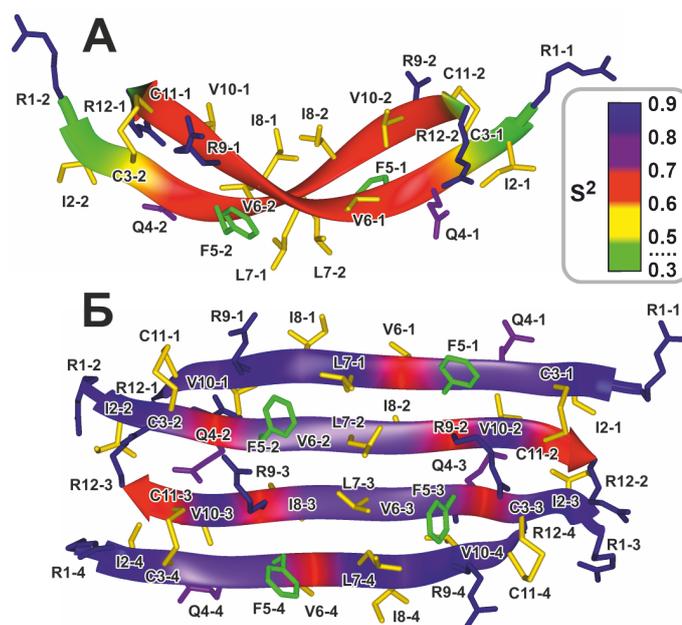


Рис. 5. Конформеры ChDode в воде (А) и мицеллах DPC (Б). Положительно заряженные, ароматические и полярные остатки окрашены в синий, зеленый и пурпурный цвета соответственно. Дисульфидные связи и гидрофобные остатки окрашены в желтый цвет. Первая, вторая, третья и четвертая пептидные цепи в димере или тетрамере ChDode обозначаются суффиксами '-1', '-2', '-3', и '-4' соответственно. Пептидная цепь окрашивается в соответствии с полученными динамическими данными ЯМР. Значения обобщенных параметров порядка (S^2), вычисленные при "model-free" анализе данных релаксации ^{15}N , имеют цветовую кодировку. Значения S^2 соответствуют амплитуде движений в масштабе времени пс-нс. Чем меньше значение S^2 , тем больше амплитуда движений.

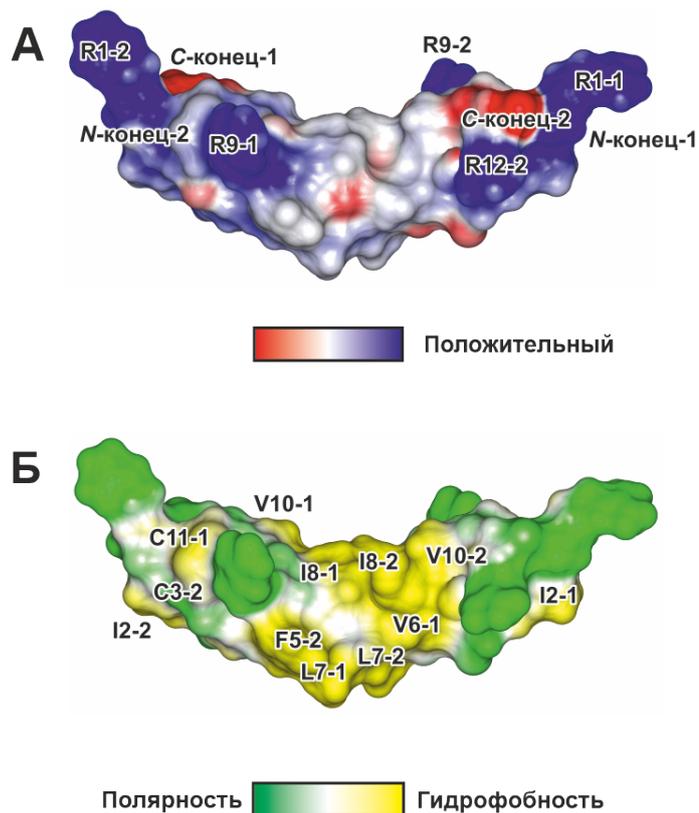


Рис. 6. Электростатические (А) и гидрофобные (Б) потенциалы молекулярной поверхности ChDode в воде.

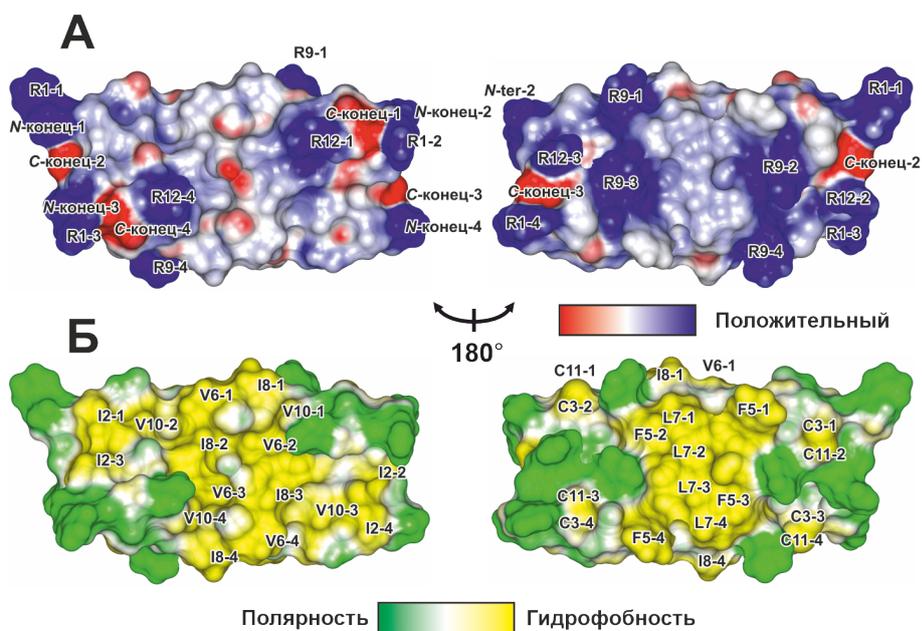


Рис. 7. Электростатические (А) и гидрофобные (Б) потенциалы молекулярной поверхности ChDode в мицеллах.

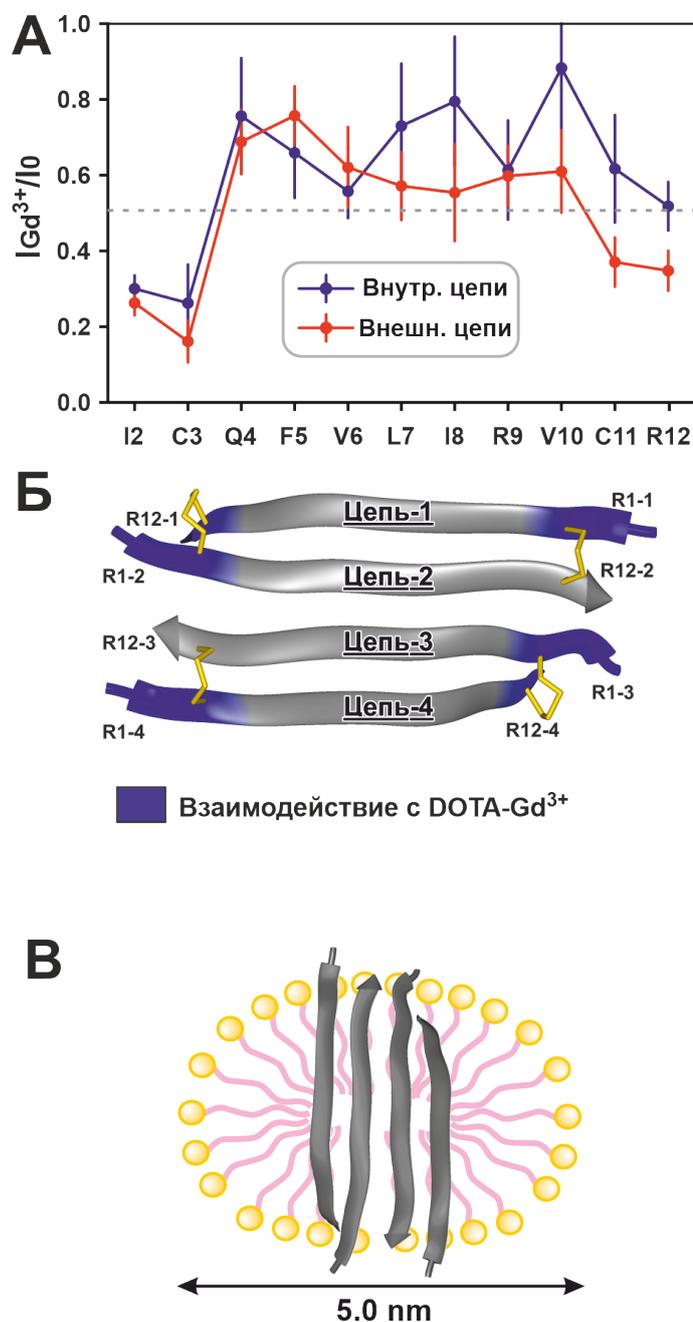


Рис. 8. Топология комплекса ChDode/DPC. (А) Ослабление кросс-пиков HN в спектре ¹⁵N-HSQC тетрамера ChDode с парамагнитным комплексом DOTA-Gd³⁺. Пороговая линия 0,5 делит данные на две группы: точки ниже линии соответствуют остаткам с HN-группами, доступными растворителю, точки выше линии соответствуют HN-группам, экранированным от парамагнитного зонда во внутренней части мицеллы. (Б) Данные эксперимента с DOTA-Gd³⁺, нанесенные на структуру тетрамера ChDode. (В) Предлагаемая модель комплекса ChDode/DPC.