

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ГНЦ ИБХ РАН)

На правах рукописи

Дубовский Петр Викторович

**Мембраноактивные полипептидные токсины:
взаимосвязь структура-функция**

Специальность: 1.4.9 Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва 2026

Работа выполнена в Лаборатории моделирования биомолекулярных систем Отдела структурной биологии в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН)

Официальные оппоненты:

Лазарев Василий Николаевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией геномной инженерии ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России.

Польшаков Владимир Иванович, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник межкафедральной научно-исследовательской лаборатории магнитной томографии и спектроскопии на Химическом факультете МГУ.

Поляков Николай Эдуардович, доктор химических наук, заведующий лабораторией магнитных явлений ФГБУ Института химической кинетики и горения им. Воеводского М.М. Сибирского отделения РАН.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН).

Защита состоится 28 октября 2026 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН по адресу: 119997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.ibch.ru ГНЦ ИБХ РАН

Автореферат разослан « ___ » _____ 2026 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор физико-
математических наук
В.А. Олейников



Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования Поиск новых физиологически-активных соединений – актуальная задача современной фармакологии. Это обусловлено тем, что традиционная химиотерапия и применение антибиотиков часто вызывают побочные эффекты, включая токсичность для здоровых тканей, развитие лекарственной устойчивости и подавление иммунного ответа. Определённые надежды возлагаются на биоактивные пептиды, особенно обладающие мембранной активностью. Последняя характерна для полипептидных токсинов из яда змей, ос, пчёл, пауков, муравьёв, скорпионов и др. Поэтому неудивительно, что поиск биоактивных пептидов с антимикробной, антигрибковой, цитотоксической, антивирусной активностями идёт именно среди мембраноактивных токсинов (МАТ).

Возможным источником МАТ является яд пауков. Особенно привлекательными являются антимикробные эффекты МАТ из яда пауков:

1. Прямое разрушение мембраны бактерий, что принципиально отличается от механизма действия классических антибиотиков.
2. Широкий спектр и многофункциональность. Быстрый механизм действия. Низкая склонность к развитию резистентности у бактерий.
3. МАТ могут действовать синергетически с классическими антибиотиками, повышая их эффективность.

Альтернативным источником МАТ является змеиный яд, который содержит сложную смесь токсинов, включая металлопротеиназы, сериновые протеазы и трех-петлевые токсины. Среди них выделяются мембраноактивные цитотоксины (иди кардиотоксины, КТ) кобры. Они обладают цитотоксическим действием на раковые клетки, вызывая их некроз и апоптоз.

Очевидно, что описанные свойства КТ и ЛП объясняются их мембранной активностью. Однако для рационального конструирования новых соединений с заданной активностью на их основе требуется понимание механизмов взаимодействия КТ и ЛП с липидными мембранами.

Цель исследований В данной работе рассматриваются два структурных класса МАТ: кардиотоксины (КТ) из яда кобр и линейные пептиды (ЛП), т.е. не содержащие дисульфидных связей, из яда пауков. Исследуется их пространственная структура в растворе и модельных мембранных средах, а также взаимодействие с модельными липидными мембранами различного фосфолипидного состава. Проводится анализ цитотоксической, антибактериальной активности КТ, а также антибактериальной и гемолитической активности ЛП. Это позволяет определить механизмы действия КТ и ЛП и определить структурные детерминанты мембранной активности этих полипептидов. С учётом полученных данных и опробованных экспериментальных подходов к изучению мембраноактивных пептидов решается задача оптимизации активности фрагментов ЛП против золотистого стафилококка, включая метициллин-резистентную форму.

Актуальность результатов диссертации С учётом полученных данных разработан подход к рациональному конструированию АМП на основе библиотеки фрагментов КТ и ЛП. Подход продемонстрирован на дизайне АМП, активных против метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA). Это определяет актуальность разработанных методик изучения взаимодействия МАТ с модельными мембранами и дизайна на их основе АМП с активностью в отношении заданных микроорганизмов, включая антибиотико-резистентные формы.

Научная новизна исследования заключается в разработке методов изучения взаимодействия пептид/липид на основе комбинации методов ЯМР высокого разрешения и широких линий. ЯМР высокого разрешения на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{15}N используется для структурного изучения пептидов, в том числе на естественном содержании этих изотопов, в мицеллах, сформированных из лизофосфолипидов. ЯМР широких линий на ядрах ^{31}P используется для изучения взаимодействия пептидов с фосфолипидными липосомами, сформированными из диацильных, уже не лизо-производных этих же фосфолипидов. В качестве источника АМП целесообразно использование

фрагментов ЛП. Именно эти пептиды содержат мотив(ы), ответственные за селективность взаимодействия с различными фосфолипидами.

Теоретическая и практическая значимость работы Изучена структура и взаимодействие КТ, ЛП с мембранами различного состава.

Продемонстрированы способы дизайна АМП с использованием нейросетей и дальнейшей оптимизации их свойств с помощью компьютерного моделирования и экспериментальных методов, включая ЯМР.

Положения, выносимые на защиту:

1. КТ с одним остатком Pro в петле-1 молекулы характеризуются конформационным равновесием в водном растворе между двумя формами, характеризующимися цис- и транс-конфигурацией связи X-Pro8. При этом амидный протон остатка X, предшествующего Pro, экспонирован в водную фазу в цис-форме. Это делает энергетически невыгодным её встраивание в липидную мембрану, в отличие от транс-формы.
2. КТ взаимодействуют с липидными мембранами окончаниями петель молекулы. Встраивание петель в мембрану происходит в соответствии с градиентом гидрофобности между петлями: петля-1 > петля-2 > петля-3, а именно, петля-1 встраивается первой, что сопровождается встраиванием петли-2, а затем -3. Если в окончании петли-2 присутствует остаток Ser28, то структура петли в этой области изменяется, чтобы оставить этот остаток на поверхности мембраны. При этом полость в центральной петле, где локализована долгоживущая молекула воды сохраняется, хотя система её водородных связей с атомами полипептидного остова молекулы КТ изменяется.
3. КТ обладают консервативной пространственной структурой, одним из элементов которой является центральная Ω -петля. Её структура не зависит от вариабельности аминокислотного состава в данной области КТ.
4. Мембранная активность КТ определяется наличием консервативных аминокислотных остатков, присутствующих в окончаниях петель: Pro9 в первой петле, Ser28 во второй, и Asn/Asp45 в третьей. С учётом роли петель в

мембранной активности КТ: петля-1 > петля-2 > петля-3, и присутствию/отсутствию в них специальных остатков получаем число возможных комбинаций: $2^3=8$ групп. Активность группы определяется комбинацией специальных остатков: при сравнении активности двух групп с одинаковым числом специальных остатков активность выше у той, сумма номеров петель, в которых локализованы эти остатки, будет выше.

5. Если для выбранных клеток мембранная активность ряда КТ определяет их цитотоксический эффект, то цитотоксическая активность в этом ряду будет ранжироваться в соответствии с принадлежностью КТ к группе, определяемой комбинацией специальных аминокислотных остатков в окончаниях петель.

6. Структура ЛП из яда паука определяется динамическим равновесием α -спираль – неупорядоченная конформация. При этом в водном растворе равновесие сдвинуто в сторону неупорядоченной конформации, а при связывании ЛП с мембраной – в сторону спиральной.

7. Как КТ, так и ЛП дестабилизируют липидные мембраны по ковровому механизму при связывании с ними. Дестабилизация мембраны, сопровождаемая образованием небислойной изотропной фазы, происходит, когда количество связанного с мембраной токсина превысит критический порог, определяемый способностью увеличения площади внешнего монослоя мембраны, в который встраивается токсин, относительно нижнего монослоя липидного бислоя мембраны.

8. При дизайне антимикробных пептидов на основе фрагментов КТ или ЛП установлено, что фрагменты КТ (длина в диапазоне 9 - 20 аминокислотных остатка) неактивны, в то время как фрагменты ЛП такой же длины проявляют активность, разрушая плазматическую мембрану бактерий. Неактивность фрагментов КТ обусловлена неспособностью формировать ими структуры с защитой амидных протонов от взаимодействия с водой. Для ЛП такой структурой является амфифильная α -спираль, формирующаяся при их взаимодействии с мембраной.

9. ЛП могут быть оптимизированы для активности в отношении MRSA. Для этого необходимо снабдить молекулу гидрофобным якорем на N-конце молекулы, состоящим из, как минимум, трёх гидрофобных аминокислотных остатков, мотив селективного взаимодействия молекулы пептида с головкой молекулы фосфатидилглицерина. Если тройка аминокислот сформирована из пары остатков фенилаланина и одного триптофана, минимизируется гемолитическая активность пептида.

Структура диссертации:

Диссертация изложена на 367 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материал проиллюстрирован 47-ю таблицами, 109-ю рисунками. Список цитированной литературы включает 595 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Структура КТ в водном растворе

Большинство известных до недавнего времени пространственных структур КТ было получено методами рентгеновской дифракции. Но в кристалле содержится только одна форма. Имеющиеся ЯМР-структуры тоже характеризовали одну структурную форму и уступали в точности рентгеновским структурам. Проблему решило получение изотопно-меченого КТ, аналога кардиотоксина-1 (CT1No) из яда *N. oxiana*, [U-¹³C,¹⁵N]rCTX1, отличающегося от природного токсина наличием дополнительного остатка Met на N-конце молекулы. Работы по экспрессии, фолдингу и очистке белка проведены к.б.н. Шулепко М.А., д.б.н. Люкмановой Е.Н. в лаборатории инженерии белка ГНЦ ИБХ РАН под руководством чл.-корр. РАН проф. Долгих Д.А. Сравнение гетероядерных ¹³C-HSQC и ¹⁵N-HSQC спектров [U-¹³C,¹⁵N]rCTX1 и природного токсина, накопленных на естественном содержании обоих изотопов, обнаружило их сходство. Это указало на сохранение нативной пространственной структуры у рекомбинантного

аналога. В то же время, в полученных спектрах было обнаружено дублирование сигналов, которое указывало на медленный конформационный обмен во временной шкале ЯМР между двумя формами. Неравная интенсивность сигналов обеих форм обозначила их как «минорную» и «основную».

Исследование структуры обеих форм методами многомерного ЯМР показало, что обе формы отличаются изомерией пептидной связи Val7-Pro8 (Рис. 1).

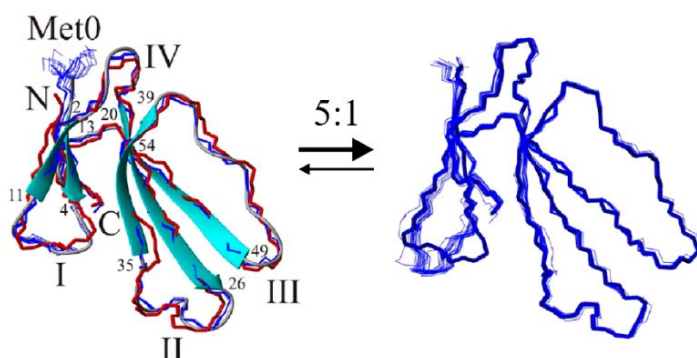


Рисунок 1. Равновесие в водном растворе между (а) «основной» и (б) «минорной» формами rCTX1. Модели совмещены по остову остатков 1–60 первой модели ЯМР-набора 20-ти структур нативного CT1No (код PDB 5NPN, красный цвет). Одна из моделей показана в ленточном виде для указания положений β-цепей.

Их начало и конец отмечены номерами остатков. Из всех боковых цепей показан остаток Met0 для указания его близости к так называемой петле IV (остатки 15–18). Концы петель (остатки 5–10, 27–34 и 46–48) отмечены римскими цифрами I, II и III, соответственно. На панели б) первая модель из ансамбля «основной» формы (пептидный остов показан тёмно-синим цветом) наложена на ансамбль «минорной» формы rCTX1. Ориентация моделей, расположение петель и β-тяжей идентичны показанным на панели а). Координаты ансамблей, показанных на панелях а) и б) были депонированы в PDB под номерами 5T8A и 5LUE, соответственно. Соотношение между населённостями обеих форм указано над стрелками между наборами.

Расчёт указывает на то, что «основная» и «минорная» формы rCTX1 характеризуются транс- (Рис. 1, слева) и цис-конфигурацией (Рис. 1, справа) связи Val7-Pro8, соответственно. Соотношение между населённостями обеих форм составляет ~5:1 (Рис. 1). Заметим, что рентгеновская дифракция детектирует только одну («основную») форму.

Интересной особенностью полученной структуры КТ является форма оконечности петли-2 молекулы, которая принимает особую укладку, Ω-петлевою. Она замечательна наличием полости, где позиционируется долгоживущая молекула воды, формирующая водородные связи с атомами

полипептидного остова молекулы КТ. Ранние ЯМР-структуры КТ часто не могли точно определить координаты этого фрагмента молекулы. Включение в расчёт координат связанной молекулы воды и удерживающих её водородных связей помогло преодолеть этот недостаток. Характерные времена жизни этой молекулы воды могут быть оценены из траекторий молекулярной динамики (МД) КТ в водном растворе (Рис. 2).

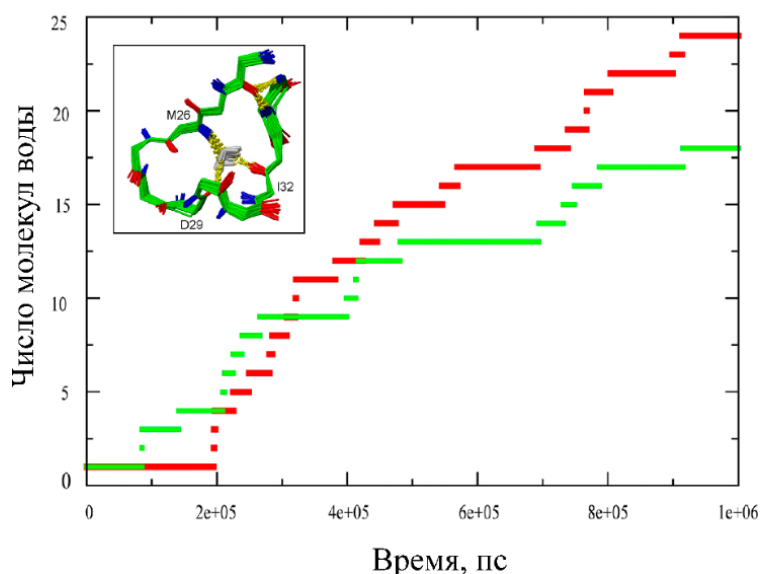


Рисунок 2. Статистика обмена молекул воды в окончании петли II природного СТ1No (красный) и его рекомбинантного аналога rCTXI (зеленый). Общее количество молекул воды, вошедших в полость этой петли, указано на оси Y. В каждый момент времени только одна молекула воды находится в полости и образует не менее трех водородных связей с атомами остова белка. Время моделирования МД отложено на оси абсцисс.

На вставке показана структура петли II нативного КТ О1 (набор ЯМР модели 5NPN) вместе с прочно связанной молекулой воды. Группы NH, группы CO, остова, водородные связи и молекула воды окрашены в синий, красный, зеленый, желтый и серый цвета соответственно. Остатки, атомы которых образуют водородные связи с молекулой воды, промаркированы.

Согласно Рис. 2, время жизни молекулы воды в полости попадает в диапазон 10–200 нс для рекомбинантного и природного СТ1No. Каждая молекула воды удерживается в полости тремя водородными связями: с протоном NH остатка Met26 и с группами CO остатков Asp29 и Ile32.

На вопрос, насколько типичны полученные пространственные структуры КТ, отвечает решение методом ЯМР структуры произвольно выбранного КТ. Предполагалось, что таким будет один из КТ, выделенных из яда *N. kaouthia*. Но при фракционировании яда этой кобры не удалось разделить КТ, отличающиеся одной аминокислотной (а.к.) заменой (Табл. 1).

Поэтому была предпринята попытка определить структуру обоих токсинов в смеси. Для этого были использованы отнесения сигналов в спектрах ^{13}C -HSQC и ^{15}N -HSQC CT1No, накопленных на естественном содержании изотопов. Отнесения сигналов в них были получены переносом соответствующих отнесений для $[\text{U-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]\text{rCTX1}$.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности (а.к.п.) КТ из яда *N. kaouthia* (Nk в названии) и *N. oxiana* (No в названии).

Имя токсина/ код UNIPROT	А.к.п. (номера указаны над а.к.о.)
CT3Nk/P01446	1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 LKC N KLIPLAYKTCSPAGKNLCYKMF M VS N KTVPVKRGCID A CPKNSLLVKYVCCNTDRCN
CT2Nk/P01445	LKC N KLIPLAYKTCSPAGKNLCYKMF M VS N KTVPVKRGCID V CPKNSLLVKYVCCNTDRCN
CT1No ¹ /P01451	LKC N KL V P I AYKTC P EGKNLCYKMF M SDLT I PVKRGCID V CPKNSLLVKYVCCNTDRCN
CT2No/P01441	LKCKKL V PL F SKTCSPAGKNLCYKMF V AAPHVPVKRGCID V CPK S LLVKYVCCNTDKCN

¹ – Отличие от остатков в CT3Nk подчеркнуты. Нумерация остатков дана сверху. Дисульфидные связи (обозначены римскими цифрами, остатки цистеинов пронумерованы) и локализация β -тяжей (заклучены в прямоугольники) и петель молекул (обозначены loop-1(-2,-3)) указаны снизу.

Протокол расчёта пространственной структуры КТ из яда *N. kaouthia* учитывал, что в спектрах присутствуют сигналы «минорной» формы. Ограничения на расстояния включали NOE контакты, дисульфидные и водородные связи, включая ограничения на связанную молекулу воды внутри второй петли. Её существование подтверждено спектрами NOESY и ROESY. На конечных этапах расчета структуры, когда несоответствия между объемами кросс-пиков и соответствующими расстояниями в рассчитанной структуре из-за перекрытия сигналов были минимизированы, были учтены гетероядерные химические сдвиги. Они были преобразованы в ограничения на двухгранные углы основной цепи PHI, PSI и боковой цепи CHI1 с использованием программы TALOS-N. Несмотря на то, что в расчёте отсутствовали химические сдвиги ^{13}CO (они не были определены), были получены довольно узкие интервалы для ограничений на двухгранные углы.

Рассчитанные структуры обоих токсинов приведены на Рис. 3. Они обнаруживают близкое сходство, что указывает на консерватизм пространственной структуры КТ, включая переменные участки, т.е. окончания петель, где а.к. различия наиболее заметны (Табл. 1). Но мембраноактивные свойства различных КТ, как следует из литературы, могут сильно отличаться. Причину этого решено было искать также методом ЯМР.

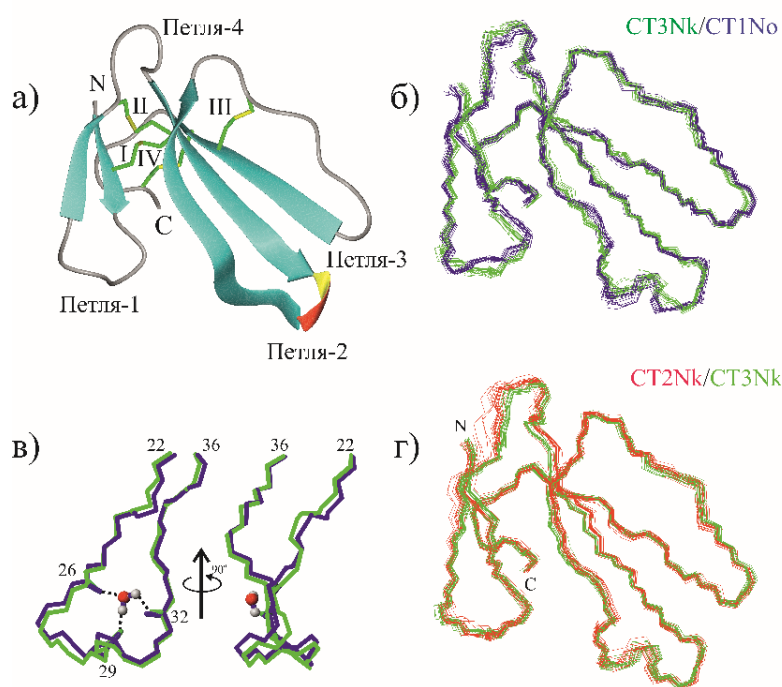


Рисунок 3. 3D структура основных форм CT3Nk, CT2Nk и CT1No в водном растворе. (а) Первая модель из ансамбля ЯМР CT3Nk показана в ленточном представлении. Локализация β -тяжей и дисульфидных связей см. в Табл. 1. (б) Ансамбль 20 ЯМР моделей основных форм CT3Nk (зеленый цвет, код pdb 6RC7) и CT1No (тёмно-синий цвет, код pdb 1RL5), совмещённых по остову. Показан только полипептидный остов молекул. Ориентация молекул идентична приведённой на панели (а).

(в) Наложённые друг на друга атомами остова остатков 1-60 показаны CT1No (код PDB 1RL5, синий цвет) и CT3Nk (код PDB 6RC7, зеленый цвет). Показан только фрагмент остова остатков 22-36 вместе с NH-связью 26-го остатка и CO-группами 29-го и 32-го остатков (эти связи отмечены на левой панели), водородно связанными (показаны пунктирными линиями) с атомом кислорода и протонами прочно связанной молекулы воды, соответственно. Последняя показана в шаростержневом представлении. Для ясности показана только одна молекула воды, координаты которой схожи для CT1No и CT3Nk. Правая панель представляет собой вид сбоку левой. (г) Наложение основной формы (с транс-конфигурацией пептидной связи Pe7-Pro8) CT3Nk (зеленый цвет, код PDB 6RC7) и основной формы CT2Nk (красный цвет, код PDB 7O2K). Показан только полипептидный остов молекул. Отмечены N- и C-концы молекулы. Оба ЯМР-ансамбля содержат по 20 структур.

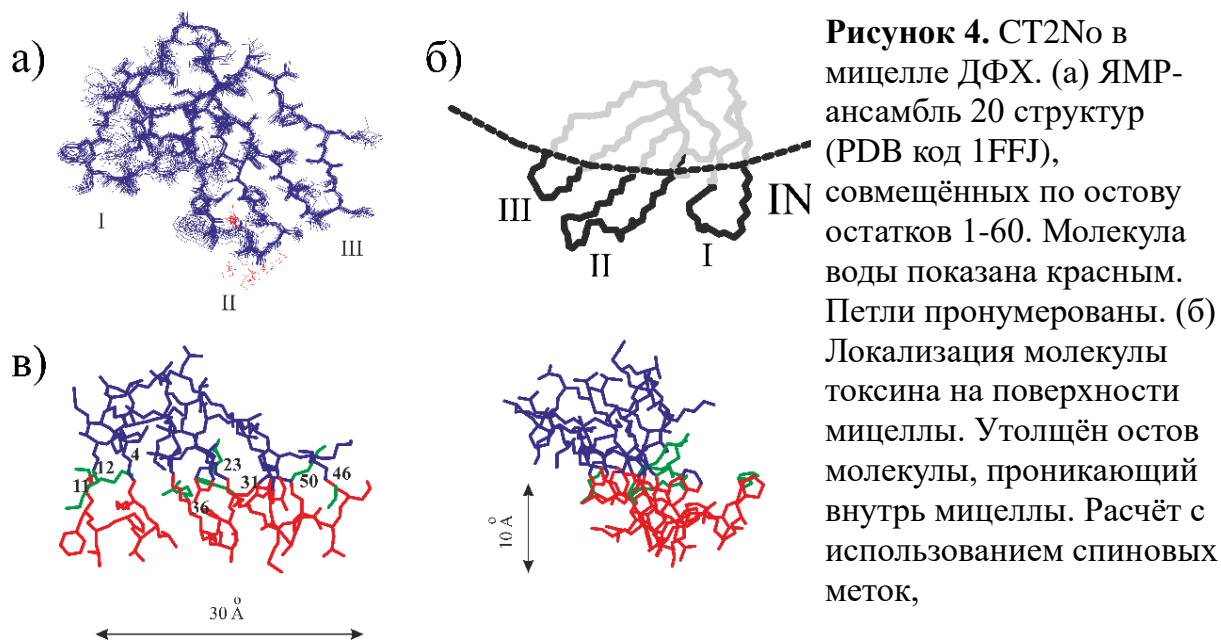
Для этого было изучено взаимодействие различных КТ с модельными мембранами. На первом этапе работы в качестве модельной среды были

выбраны мицеллы детергентов. В конце 90-ых годов прошлого века, когда были предприняты эти исследования, изотопно-обогащенных КТ ещё не было получено. Поэтому работы выполнялись на природных КТ, выделенных из яда кобры.

2. Структура КТ в мицеллах детергентов

Считалось, что взаимодействие КТ с липидными мембранами зависит от присутствия остатков Ser28 или Pro30 в оконечности петли-2. Первые относились к так называемому S-типу и уступали в мембранной активности представителям Р-типа, характеризующимся присутствием остатка Pro30. Поэтому представлялось логичным рассмотреть только два представителя всего семейства КТ. Для этого были выбраны пара КТ из яда *N. oxiana*, СТ1No и СТ2No (Табл. 1). Они принадлежат S- и Р-типу, соответственно.

Первым КТ в мицеллах дейтерированного додецилфосфохолина (ДФХ) был изучен СТ2No. Результаты представлены на Рис. 4.



доксил стеаратов, показал, что зона контакта мицеллы с молекулой токсина является вогнутой сферой с радиусом $\sim 70\text{\AA}$ (дана пунктиром). (в) Первая модель ансамбля, в которой голубым цветом покрашена экспонированная в воду часть.

Красным – погружённая в мицеллу. Зелёным – боковые цепи остатков Lys, локализованные на границе раздела мицелла -вода. Слева и справа – два ракурса с поворотом на 90° . Стрелками показаны размеры областей.

СТ2No содержит единственный остаток Pro в петле-1 и, следовательно, в водном растворе наблюдается конформационный обмен между двумя формами. Обе формы были структурно охарактеризованы ранее и депонированы в PDB-банк с кодами 1CB9 («основная» форма) и 1CCQ («минорная» форма). Обе формы структурно близки приведёнными для rCTX1 на Рис. 1. В мицеллу встраивается только «основная» форма (Рис. 4, а). При встраивании в мицеллу изменяются, главным образом, конформации боковых остатков, заглубляющихся в мицеллу (Рис. 4, б). Молекула токсина встраивается в мицеллу окончаниями всех трёх петель молекулы (Рис. 4, б, в). Почему не встраивается «минорная» форма? Её форма петли-1 сильно отличается от таковой «основной» формы (см. Рис. 1, правая панель). При этом в «минорной» форме амидный протон Val7 экспонирован в воду. Если бы «минорная» форма с цис-связью Val7-Pro8 встраивалась бы в мицеллу, то амидный протон Val7 оказывался бы в гидрофобной зоне мицеллы, что энергетически невыгодно.

Для СТ1No результат взаимодействия с мицеллойДФХ дан на Рис. 5.

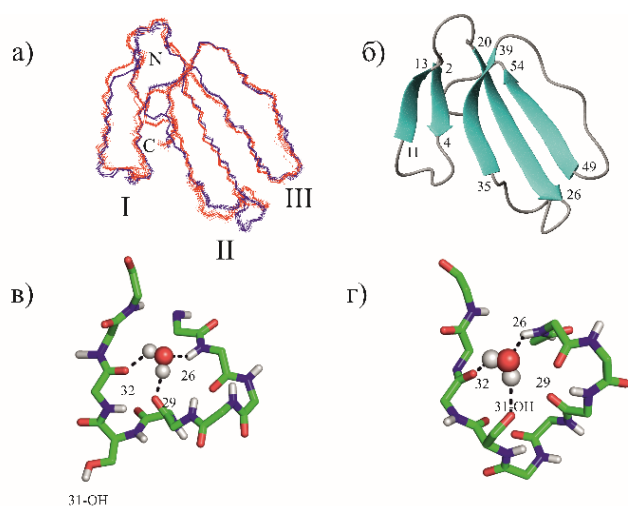


Рисунок 5. Пространственная организация СТ1No в водном растворе и мицеллеДФХ. (а) Ансамбли из 20 структур СТ1No в водном растворе (синий), наложенных на атомы основной цепи соответствующих структур в мицеллахДФХ (красный); обозначены N- и C-концы, петли пронумерованы римскими цифрами. (б) Модель-1 из набора структур в водном растворе в ленточном представлении;

каждая β -цепь обозначена двумя цифрами – начальным и конечным остатками; ориентация всех моделей на панелях (а), (б) идентичны. (в) Конфигурация петли-2 СТ1No в водном растворе и (г) мицеллеДФХ. Показаны только основная цепь (синий), NH-связи (красный), СО-связи (желтый) и боковая цепь остатка Thr31. Пронумерованы остатки, образующие водородные связи с долгоживущей молекулой воды в петле-2.

Токсин встраивает в мицеллу окончания всех трёх петель, подобно СТ2No (Рис. 4, б), что также было установлено с использованием спиновых меток, доксил стеаратов. Но, в отличие от СТ2No, обращает на себя внимание изменение конформации оконечности петли-2 при переходе СТ1No из водного раствора в мицеллу (Рис. 5, а). При этом полость в оконечности петли-2 сохраняется, но система водородных связей, которую формирует долгоживущая молекула воды с атомами полипептидного остова, изменяется (Рис. 5, в, г). На первый взгляд, отличия невелики, но к чему это приводит, когда модельная система усложняется и вместо мицелл фигурируют фосфолипидные липосомы?

3. Взаимодействие КТ с фосфолипидными липосомами

КТ плохо взаимодействуют с фосфолипидными мембранами, сформированными из цвиттерионных фосфолипидов. Поэтому для модельной системы, мультиламеллярных липосом (MLV), был взят анионный фосфолипид, дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG). Удобным методом контроля состояния липосом является ЯМР на ядрах ^{31}P , называемый также методом широких линий, в отличие от ЯМР высокого разрешения, использованного для изучения структуры КТ в мицеллах. В условиях магнитного поля спектрометра MLV DPPG деформируются и становятся эллипсоидальными (Рис. 6).

^{31}P -ЯМР спектры MLV DPPG в присутствии СТ2No приведены на Рис. 6, б. При росте температуры бислой DPPG претерпевает фазовый переход гель/жидкий кристалл, а ^{31}P -ЯМР спектры MLV претерпевают изменения: в спектре начинает доминировать узкий сигнал, отражающий нарушение бислойной упаковки молекул фосфолипидов. Если учесть, что с ростом температуры увеличивается площадь, занимаемая молекулой фосфолипида в обоих монослоях бислоя, то наблюдаемые спектральные изменения следует связать со способностью молекулы токсина встраиваться во внешний, доступный ему, монослой липосомы, увеличивая ещё более его площадь.

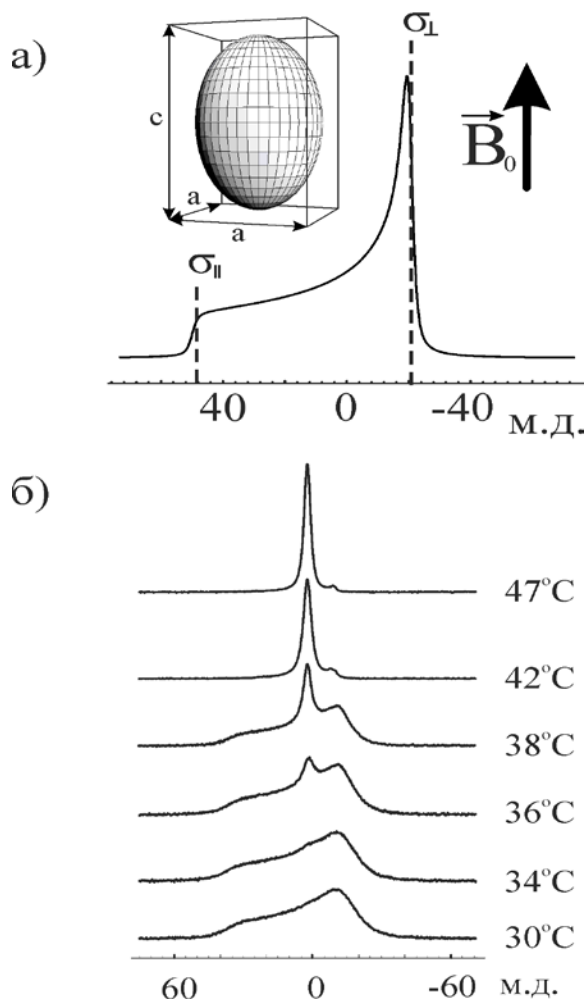


Рисунок 6. Теоретический и экспериментальные ^{31}P -ЯМР спектры MLV. (а) Параметры тензора анизотропии σ (CSA) и полуоси эллипсоида липосомы указаны на спектре и на вставке слева от спектра, соответственно. В расчётах фигурируют не компоненты тензора анизотропии σ на ядре фосфора, а их разность, называемая тензором анизотропии химического сдвига (CSA). Деформация липосомы (частное c/a осей эллипсоида) пропорциональна её радиусу и обратна пропорциональна модулю вязкоэластической упругости бислоя. (б) ^{31}P -ЯМР спектры MLV DPPG/CT2No (14:1 моль/моль) при разных температурах. Содержание воды в образце: $\text{H}_2\text{O}/\text{DPPG}=200$.

Когда дисбаланс площадей внутреннего и внешнего монослоёв липосомы становится критическим, бислоем разрушается с образованием «липидных» частиц, которые представляют собой агрегированные комплексы токсин/липид с небислоевой организацией (Рис. 7).

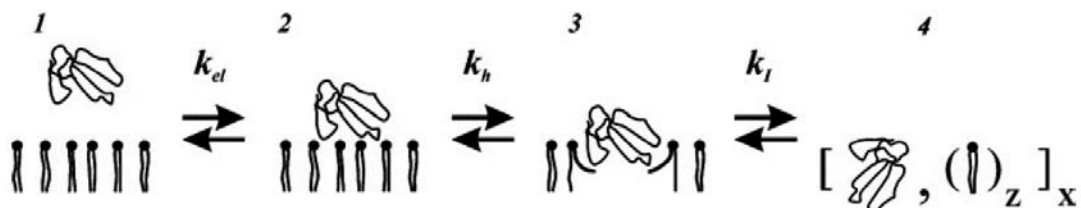


Рисунок 7. Схематическое изображения модели связывания КТ с бислоем DPPG. Показан только верхний монослой мембраны. Состояние (2) гелевое, в котором токсин связывается только с поверхностью монослоя, (3) жидкокристаллический бислоем; предполагается, что доминирует трёхпетельная мода встраивания, (3) изотропная фаза, формирование «липидной» частицы. Количество липидных молекул на рисунке условно и не соответствует стехиометрии взаимодействия токсина с липидом. Оно определяется суммарным электрическим зарядом молекулы токсина.

Для сравнения взаимодействия СТ2No и СТ1No с MLV DPPG удобно сравнивать не сами экспериментальные ^{31}P -ЯМР спектры, а результаты их декомпозиции, позволяющей оценить: долю изотропного сигнала в спектре и параметры «бислойной» (иначе называемой анизотропной) составляющей, а именно CSA и эллипсоидальность липосом. Такая декомпозиция осуществлена с помощью программы P-FIT. Она разработана сотрудником лаб. биомолекулярной ЯМР спектроскопии ИБХ РАН Лесовым Д.М. в рамках работы над диссертацией на соискание учёной степени канд. физ.-мат. наук «Изучение взаимодействия токсинов яда кобры *N. oxiana* с мембранами методом ЯМР спектроскопии». Результаты приведены на Рис. 8. Формирование изотропной фазы и изменение деформации липосом в магнитном поле, главным образом, определяются гидрофобным встраиванием молекулы токсина в бислой липосом. При одинаковых соотношениях липид/белок эффект более выражен для СТ2No (Рис. 8, а, в).

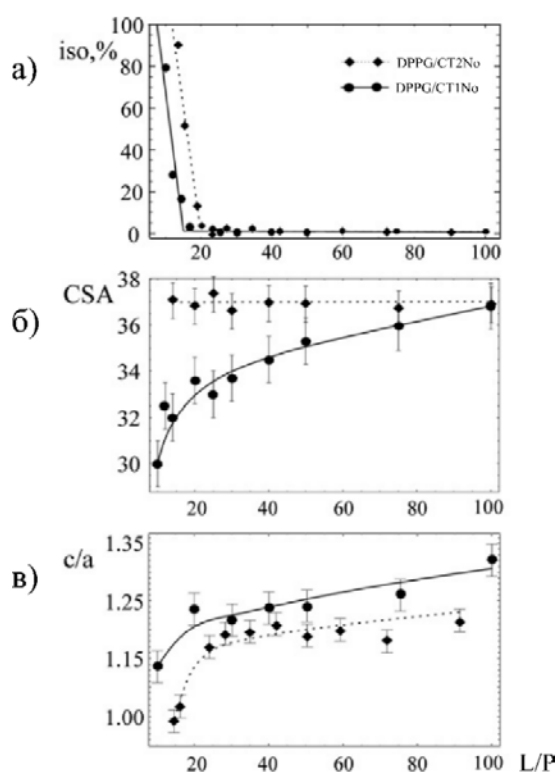


Рисунок 8. Зависимость взаимодействия СТ1No (сплошная линия) и СТ2No (пунктирная линия) с MLV DPPG от мольного соотношения липид/белок (L/P). Приведены результаты декомпозиции спектров ^{31}P -ЯМР при 50°C : (а) содержание изотропной фазы; (б) значение анизотропии химического сдвига (CSA); (в) с/а (деформация липосом) (см. Рис. 6, а, для визуализации параметров декомпозиции).

Изменение CSA связывают с изменением ориентации головной части молекулы липида из-за электростатических взаимодействий токсин/липид. Они более выражены для СТ1No (Рис. 8, б), что свидетельствует, вероятно, о

смещённой к периферии бислоя DPPG локализации молекулы этого токсина. В мицеллахДФХ оба токсина взаимодействуют с мицеллой одинаково, окончаниями всех трёх петель. Следовательно, в фосфолипидном бислое модель взаимодействия более сложна. Изучение этого взаимодействия с помощью методов молекулярной динамики (МД) (полно-атомная, грубо-зернистая, или высокоподвижная модель мембраны) привело к выводу, что вместо единственного состояния (3) на Рис. 7. следует рассматривать, как минимум, 3 состояния встраивания молекулы токсина в мембрану (Рис. 9). Эти состояния – встраивание в мембрану только петли-1, петель-1 и -2, и всех трёх петель молекулы. Переход состояния 3 в 4 сопровождается конформационными изменениями в петле-2 молекулы. Это отличает этот токсин от СТ2No, где Ser28 отсутствует и такой переход не происходит.

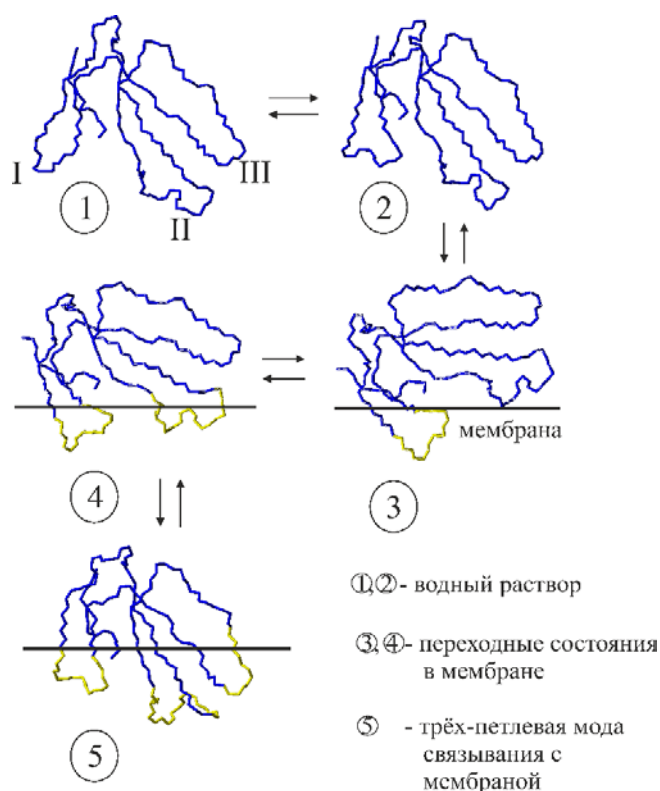


Рисунок 9. Конформационное равновесие КТ с одним остатком Pro в петле-1 в водном растворе и их связывание с липидной мембраной. Числа под моделями соответствуют структурным состояниям СТ1No в водном растворе и липидной мембране. Структуры были определены с помощью ЯМР-спектроскопии в водном растворе и мицеллах детергента. Состояние 1 – PDB код 5LUE для рекомбинантного токсина (остаток Met0 удалён). Петли обозначены римскими цифрами для состояния 1. Связь Val7-Pro8 только для состояния 1 находится в цис-конфигурации. В моделях (2–5) эта связь имеет транс-конфигурацию.

Состояние 2 – мажорная форма токсина в водном растворе (5NPN). Состояние 5 – модель в мицелле (5NQ4). Мембрано-взаимодействующие петли моделей, соответствующие состояниям 3–5, отмечены желтым цветом. Поверхность мембраны схематически показана горизонтальной линией.

Поэтому для СТ2No доминирующим состоянием в мембране будет трёх-петлевая мода связывания (состояние 5 на Рис. 9). Для СТ1No более

населёнными, по сравнению с состоянием 5, могут быть состояния 3 и 4, отражающие адаптацию петли-2 к мембранному окружению и её конформационное изменение. Однако возникает вопрос: можно ли схему состояний, представленную на Рис. 9, распространить на все КТ? Для ответа на этот вопрос необходимо расширить набор рассматриваемых КТ.

3.1. Расширение набора КТ

В качестве источника КТ использован яды кобр *N. naja* и *N. haje*. Выделено 5 и 2 КТ, соответственно. Для определения а.к.п токсинов использована масс-спектрометрия. Работы по выделению, очистке КТ проведены в лаборатории молекулярной токсикологии ГНЦ ИБХ РАН под руководством проф. Уткина Ю.Н. (Табл. 2).

Таблица 2. КТ из яда *N. naja* и *N. haje*.

Аббревиатура ¹	Uniprot код	А.к.п.
Nn17-3	P01440	1 10 20 30 40 50 60 LKCNKLVPLFYKTCSPAGKNLCYKMYMVATPKVPVKRGCIDVCPKSSLVVKYVCCNTDRCN
Nn18-3	_ ¹	LKCNKLVPLFYKTCSPAGKNLCYKMYMVAAPTVPVKRGCINVCPKNSLVKYECCNTNKC�
Nn16-1	P01445 ²	LKCNKLIPLAYKTCSPAGKNLCYKMFVMSNKTVPVKRGCIDVCPKNSLVVKYVCCNTDRCN
Nn15-1	P01447-1	LKCNKLIPLAYKTCSPAGKNLCYKMYMVSNTVPVKRGCIDVCPKNSLVKYECCNTDRCN
Nn14-1	P86382-1	LKCNKLIPLAYKTCSPAGKDLCYKMYMVSNTVPVKRGCIDVCPKNSLVKYECCNTDRCN
Nh1	P01455	LKCHKLVPPVWKTCEGKNLCYKMFVSTSTVPVKRGCIDVCPKNSALVKYVCCSTDRCN
Nh2	P01462	LKCHKLVPPVWKTCEGKNLCYKMYMVATPMLPVVKRGCIDVCPKDSALVKYVCCNTDRCN

¹ – Код еще не присвоен, новый КТ;

² – Для этого токсина существовало два варианта остатков 48-49 (VL или LV). Указана альтернатива, отобранная анализом с помощью Рентгено-структурного анализа (РСА) карты электронной плотности белка 2Fo-Fc на уровне 2σ для остатков 47-52.

Для изучения мембранной активности выделенных КТ использована детекция утечки флуоресцентного красителя из однослойных липосом, сформированных из эквимольной смеси диолеилфосфатидилхолина (DOPC)/диолеилфосфатидилглицерина (DOPG) диаметром 100 нм (Рис. 10). Этот метод позволяет использовать меньшие количества токсина, чем необходимо для ³¹P-ЯМР.

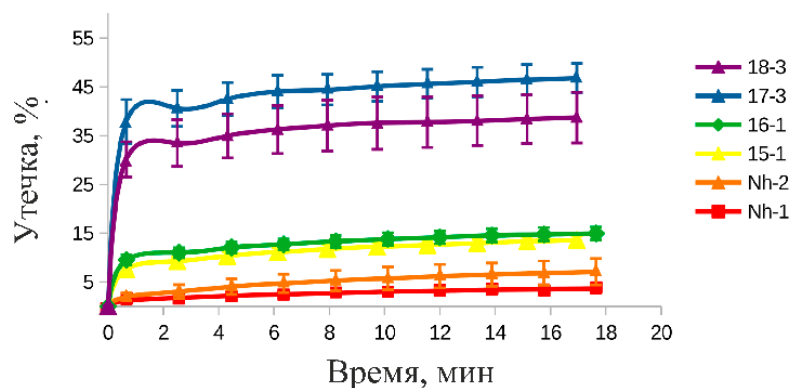


Рисунок 10. Зависимость от времени утечки кальцеина из однослойных липосом DOPC/DOPG (1:1), индуцированной добавлением КТ. Цвет кривой для каждого КТ закодирован цветом, указанным справа от кривых.

Концентрация общего липида составила 0.1 мМ. Концентрация добавленного КТ составила 1 мМ. Для каждой экспериментальной точки указана ошибка, которая оценивалась усреднением трех измерений.

КТ Nn14-1 не участвовал в эксперименте, т.к. был выделен в незначительных количествах. Обращает на себя внимание то, что оба токسينа из *N. haje* вызывают наименьший эффект, оцениваемый по максимальной амплитуде утечки (выход кривой на плато). Один из них, Nh1 содержит Ser28, а другой, Nh2 – Pro30. Следовательно, наличием только этих остатков наблюдаемую иерархию эффектов на Рис. 10 объяснить нельзя. Обращает на себя внимание то, что оба токسينа имеют два остатка Pro (Pro8-Pro9) в петле-1 (Табл. 2). Данные РСА для подобных токсинов указывают, что связь Pro8-Pro9 находится в цис-конфигурации (PDB код 1TGX). Если эта связь видна в РСА, значит, она должна быть «основной» формой для таких КТ в водном растворе. Действительно, на это указывают ЯМР-исследования (Chen et al., *Biochemistry*, 2005, 44(20):7414-26). Более того, имеется попытка ЯМР-изучения подобного КТ в мицеллахДФХ, не увенчавшаяся успехом из-за наблюдавшегося сложного конформационного равновесия в мицелле (Dauplais et al., *Eur J Biochem*. 1995, 230(1):213-20). С учётом этих данных, равновесие для КТ с двумя остатками Pro в петле-1 между состояниями в воде и мембране должно быть таким (Рис. 11).

Действительно, медленное конформационное равновесие в мицелле может быть только результатом цис-транс изомерии пептидной связи в петле-1. Такая связь только одна: Pro8-Pro9. Эта связь приводит к вытянутой

форме окончности петли-1, которая энергетически невыгодна в мицелле и, очевидно, липидной мембране.

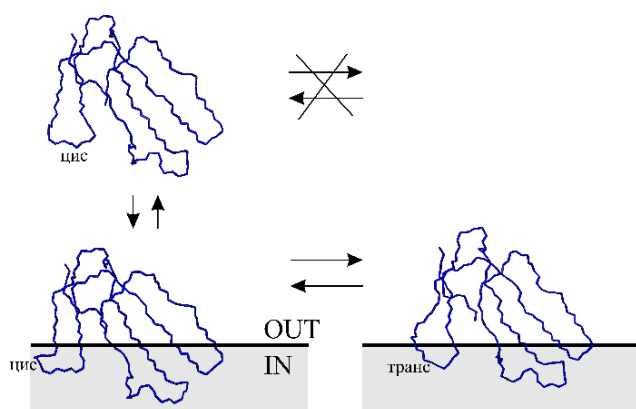


Рисунок 11. Конформационное равновесие в водном растворе и липидной мембране для КТ с двумя остатками Pro в петле-1 по данным ЯМР. Мембрана - серый прямоугольник. Внутримембранная область обозначена как «IN», а водная фаза обозначена как «OUT». Горизонтальные стрелки указывают на медленное конформационное равновесие между двумя формами.

Перечёркнутые стрелки указывают на сдвиг равновесия в сторону одной из форм.

Вертикальные двунаправленные стрелки соответствуют переходу токсина из водной среды в мембрану и наоборот. Конфигурация связи Pro8–Pro9 обозначена как цис/транс. В водном растворе (верхний ряд) модель, предсказанная с помощью AlphaFold, внизу: 1TGX (слева), 2CCX (справа). Показаны только полипептидные остовы без боковых цепей.

Это приводит к конформационному обмену между цис-транс формами (Рис. 11, нижний ряд), который является медленным во временной шкале ЯМР. Возможные промежуточные состояния в мембране, учитывающие возможное присутствие остатка Ser28 в петле-2, указанные на Рис. 9 (состояния 3, 4), на Рис. 11 не приведены.

Таким образом, как в петле-1, так и петле-2, есть «особые» остатки, определяющие мембранную активность КТ. А нет ли таких остатков в петле-3? Ведь КТ встраивают в мембрану окончания всех трёх петель молекулы (Рис. 4, б). Учитывая данные Рис. 10 по утечке кальцеина из липосом DOPC/DOPG (1:1), вызываемой КТ видно, что их активность (высота плато) располагается в ряду: Nn17-3 > Nn18-3 > Nn16-1 > Nn15-1 > Nh2 > Nh1. Самыми неактивными оказались КТ с парой остатков Pro в петле-1, Nh2, Nh1. При этом Nh2 активнее Nh1, потому что первый токсин P-типа, а второй S-типа. Nn16-1 и Nn15-1, оба S-типа, с одним остатком Pro в петле-1, уступают в активности КТ P-типа, Nn17-3, Nn18-3, также с одним остатком Pro в петле-

1. Но Nn17-3 всё-таки активнее, чем Nn18-3 именно за счёт более гидрофобной петли-3. У первого токсина окончание петли-3 сформировано остатками Ser45-Ser46-Leu47-Val48-Leu49, а у второго токсина в этой петле только одна замена: Ser45/Asn45. Хотя указанная замена не приводит к конформационным изменениям в петле-3, большая гидрофобность остатка Ser, по сравнению с Asn, очевидно, влияет на способность встраивания петли-3 в мембрану. Следовательно, это должно влиять на населённость трёх-петлевого мембранного состояния КТ. Петля-1 играет решающее значение для встраивания КТ в мембрану, по сравнению с петлёй-2, которая, в свою очередь, важнее петли-3. Такая иерархия между петлями в мембранной активности КТ была подтверждена экспериментально экспрессией КТ с варьируемой гидрофобностью окончаний петель и тестированием их литической активности (Ma et al., *Biochem. J.* 2002, 366:35-43). Резюмируя, объединением данных Рис. 9 и 11, приходим к модели на Рис. 12.

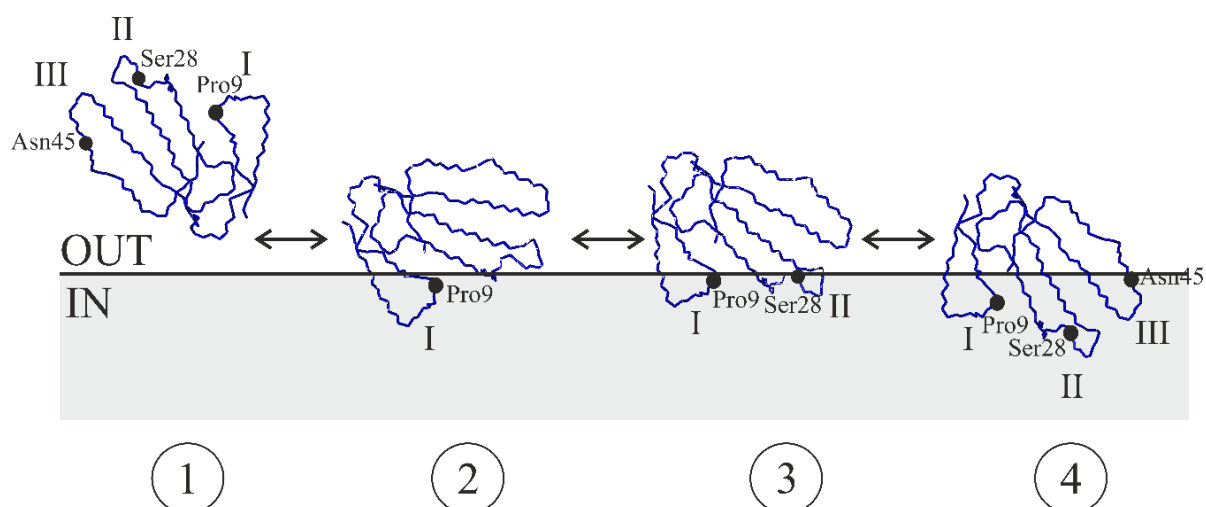


Рисунок 12. Маятниковая модель взаимодействия КТ с липидным бислоем и роль специальных аминокислотных остатков. Существует 4 стадии встраивания молекулы КТ в липидный бислои (серый прямоугольник, IN – мембрана, OUT – водная фаза). Они пронумерованы арабскими цифрами под каждым состоянием.

На стадии 1 молекула находится в водной фазе. Стадии 2–4 соответствуют включению только петли-1, петли-1 и -2 и всех трех петель, соответственно. Для всех стадий показан только полипептидный остов. Римские цифры нумеруют петли молекулы токсина. При переходе на стадию 2 токсин ориентируется определенным образом для включения петли-1 в мембрану. Двухнаправленные стрелки между положениями токсина на мембране зависят от наличия специальных а.о. в петлях (Pro9, Ser28, Asn45). Атомы Са специальных а. о. обозначены черной точкой.

А именно, наличие Pro9 в петле-1 приводит к образованию цис-связи между остатками Pro8–Pro9 на стадии 1 (Рис. 12). Это неблагоприятно для взаимодействия токсина с мембраной, поскольку требует перестройки конформации этой связи в транс-конфигурацию. Поэтому равновесие смещено в сторону стадии 1, т. е. водной фазы, по сравнению с токсинами, в которых остаток Pro-9 отсутствует. Если остаток Ser28 присутствует в петле-2, такой токсин, будучи встроенным в мембрану петель-1, испытывает трудности при переходе от стадии 2 к стадии 3, поскольку петля-2 требует адаптации к мембране. Таким образом, по сравнению с токсином с остатком Pro30 вместо Ser28, петля-2 которого не требует конформационной перестройки, равновесие смещено в сторону стадии 2 в токсине с Ser28. Наконец, замена Ser45/Asn45 менее благоприятна для встраивания петли-3 в мембрану, что смещает равновесие в сторону состояния 3 на Рис. 12.

3.2. Новая классификация КТ, согласно их мембранной активности

В зависимости от наличия специальных остатков в петлях КТ, всего существует восемь комбинаций присутствия/отсутствия особых (или специальных а.о.), то есть все КТ можно разделить на восемь групп (Табл. 3).

Таблица 3. Классификация КТ по наличию особых а.о. в их петлях¹

Спец. а.о. ² /номер петли	Группа (аббревиатура ³)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Pro9/петля-1	P	P	P	P	O	O	O	O
Ser28/петля-2	S	S	O	O	S	S	O	O
Asn/Asp45/петля-3	X	O	X	O	X	O	X	O

¹ Справедлива для широкого спектра липидных мембран, включая плазматические мембраны млекопитающих, бактериальные плазматические мембраны и искусственные фосфолипидные композиции;

² Нумерация а.о. дана для КТ длиной 60 остатков, составляющих большинство, нумерация критических а.о. дана на Рис. 12;

³ Сокращение названия каждой группы состоит из трех букв в соответствующем столбце, например, группа-1 становится PSX и т. д., 'O' обозначает пропуск, 'X'

обозначает Asn/Asp. Название групп (PSX, PSO, POX и т.д.) предложил профессор Уткин Ю.Н.

Итак, предлагаемое разделение КТ по группам, согласно Табл. 3, предлагает, что мембранная активность КТ, принадлежащего группе с большим номером, будет больше активности КТ из группы с меньшим номером. Внутри групп активность может определяться суммарной гидрофобностью окончаний петель и/или суммарным электрическим зарядом молекулы КТ. Какое количество КТ в каждой группе? На середину 2024 года, когда количество идентифицированных КТ не превышало 90 единиц, в группе PSX насчитывается 7, PSO – 0, POX – 5, POO – 9, OSX – 36, OSO – 6, OOX – 6, OOO – 21 КТ, соответственно. До недавнего времени разбиение предлагало только 2 группы P и S. В нашем представлении бывшая группа P – это объединение групп POX, POO, OOX, OOO, а S – все остальные группы (PSX, PSO, OSX, OSO). Т.е. группу P составляет 41 КТ, а S – 49. Следует отметить, что одна из новых групп, PSO, пуста. Мы полагаем, что это имеет следующее объяснение. КТ с самой слабой мембранной активностью, вероятно, оказывают своё биологическое действие в синергизме с фосфолипазами (PLA2). В формировании соответствующего комплекса определённую роль могут играть именно остатки в окончании петли-3. Поэтому соответствующая замена при переходе от группы 1 к 2 может приводить к ослаблению комплекса КТ/PLA2, что неблагоприятно для активности и, следовательно, не поддерживается эволюционным отбором.

Теперь, имея новую классификацию КТ, согласно мембранной активности, представляется интересным проверить, насколько мембранная активность КТ определяет их биологическую активность.

3.3. Как биологическая зависит от мембранной активности для КТ?

Проследим это на данных антибактериальной/цитотоксической активности расширенного набора КТ, приведённого в Табл. 2.

КТ из *N. naja* не проявляют антибактериальной активности против грамотрицательных бактерий *E.coli* и грамположительных бактерий *S. aureus*

в концентрациях до 50 μM . В то же время они обладают бактерицидной активностью (минимальная ингибирующая концентрация (МИС) = минимальная бактерицидная концентрация (МВС)) против грамположительных *B. subtilis*. Эксперименты с КТ Nh1, Nh2, которые имеют связь Pro8-Pro9 в петле-1, в отличие от остальных КТ, характеризующиеся присутствием одиночного остатка Pro в этой петле, не выявили никакой активности в исследуемом диапазоне концентраций.

Все КТ проявили цитотоксическую активность против аденокарциномы легких человека A549. Концентрации токсинов, приводящие к гибели 50% клеток (LD50), охватывали микромолярный диапазон (~5–17 μM).

Обе активности охарактеризованы в терминах МИС и LD50.

Соответствующие данные приведены в Табл. 4.

Таблица 4. Антибактериальная и цитотоксическая активность КТ¹.

КТ	Группа ²	Антибактериальный (<i>B. subtilis</i>) эффект, МИС, μM	Цитотоксический эффект (против A549), LD ₅₀ , μM
Nn17-3	8	0.8	7.4±0.1
Nn18-3	7	0.8	5.0±0.5
Nn16-1	5	3.1	5.6±1.5
Nn15-1	5	6.3	7.9±0.4
Nn14-1	5	50	17.4±0.8
Nh1	1	>50 (80 ³)	132±9 ⁴
Nh2	3	>50 (40 ³)	116±6 ⁴

¹ – Все измерения проведены Игнатовой А.А., н.с. лаб. оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ГНЦ ИБХ РАН под руководством д.б.н. Феофанова А.В.;

² – Согласно Табл. 3;

³ – Активность против *M. luteus* (Dubovskii et al., Mendeleev Commun. 2015, 25:70-71);

⁴ – Согласно опубликованным данным (Feofanov et al., Biochem J. 2005, 390:11-8).

Согласно Табл. 4, антибактериальная активность КТ увеличивается в следующем ряду: Nh1<Nh2<Nn14-1<Nn15-1<Nn16-1<Nn18-3≈Nn17-3. Для цитотоксической активности соответствующий ряд принимает вид: Nh1<Nh2<Nn14-1<Nn15-1<Nn17-3<Nn16-1<Nn18-3. Если заменить КТ номерами групп, то первый и второй ряд становятся: 1<3<5<5<5<7=8, 1<3<5<5<8<5<7. В первом ряду (антибактериальная активность) чередование

активностей соответствует номерам групп. В ряду цитотоксической активности токсин Nn17-3 находится левее, чем в предыдущем ряду. Такой перескок указывает на то, что не только мембранная активность определяет цитотоксическую активность КТ против клеток А549. Вероятно, такая активность определяется, главным образом, способностью раковой клетки захватывать КТ в лизосомы (Feofanov et al., Biochem J. 2005, 390:11-18). Разрыв мембраны лизосом происходит только после накопления в них КТ в достаточном количестве в соответствии с описанным механизмом (Рис. 6, 7).

4. Структура ЛП в водном растворе и липидном окружении

ЛП из яда паука – поликатионные хорошо водо-растворимые пептиды. Чтобы проиллюстрировать их структурные особенности и отличия от КТ, обратимся к латарцинам, ЛП из яда паука-муравьеда *Lachesana tarabaevi*, обитающего в Центральной Азии. Идентификация и выделение компонентов его яда впервые было осуществлено в ИБХ РАН в 2006 году в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов, руководимой академиком Е.В. Гришиным.

Для изучения методом ЯМР было выбрано два латарцина: латарцин 1 (Ltc1: SMWSGMWRRKLLKLRNALKKKLKGGE), и латарцин 2a (Ltc2a: GLFGKLIKKFGRKAISYAVKKARGKH). Оба пептида состоят из 25 и 26 а.о., соответственно, и характеризуются одинаковым суммарным электрическим зарядом +9 (рН 7.0). Ltc2a, Ltc1 и остальные ЛП, исследованные физико-химическими методами, получены химическим синтезом. Его осуществляли в Отделе молекулярной нейроиммунной сигнализации под руководством чл.-корр. РАН профессора В.И. Цетлина сотрудниками отдела к.х.н. Жмак М.Н., Иванов И.А., к.х.н. Егорова Н.С. Такое значение заряда является максимальной величиной среди КТ (для Nn18-3, 17-3, 16-1), приведённых в Табл. 2. Остальные КТ имеют меньший заряд: +7-8 при одинаковой их длине, 60 а.о. Неудивительно поэтому, что Ltc1 и Ltc2a являются рекордсменами заряда: при длине, более, чем вдвое меньшей, по сравнению с КТ, они имеют такой же заряд. Вполне закономерно, при отсутствии дисульфидных связей,

Ltc1, Ltc2a в водном растворе полностью разупорядочены. Об этом свидетельствуют ЯМР-данные, напр., характерные ^1H -ЯМР-спектры обоих пептидов в водных растворах с узким диапазоном разброса химических сдвигов амидных протонов и спектры Кругового Дихроизма (КД).

Охарактеризованные мембраноактивные свойства Ltc1, Ltc2a, включавшие их способность разрывать или вызывать изменение проводимости плоских мембран различного фосфолипидного состава в присутствии мембранного потенциала определённой полярности, указывали на возможную структурированность пептидов при взаимодействии с модельными мембранами (Kozlov et al., J. Biol. Chem., 2006, 281(30):20983-20992). Первым шагом на этом пути стало ЯМР-исследование пространственной структуры пептидов в модельной мембранной среде. Стандартным выбором стал полностью дейтерированный детергент – додецил сульфат натрия (SDS). Анализ спектров NOESY пептидов Ltc1, Ltc2a в этой среде позволил рассчитать их пространственные структуры (Рис. 13). Ltc2a состоит из двух спиральных фрагментов, 3-9 и 13-21, соединённых неупорядоченным участком (остатки 10-12) (Рис. 13, слева). Ltc1 принимает α -спиральную структуру в пределах остатков 8-23 (Рис. 13, справа).

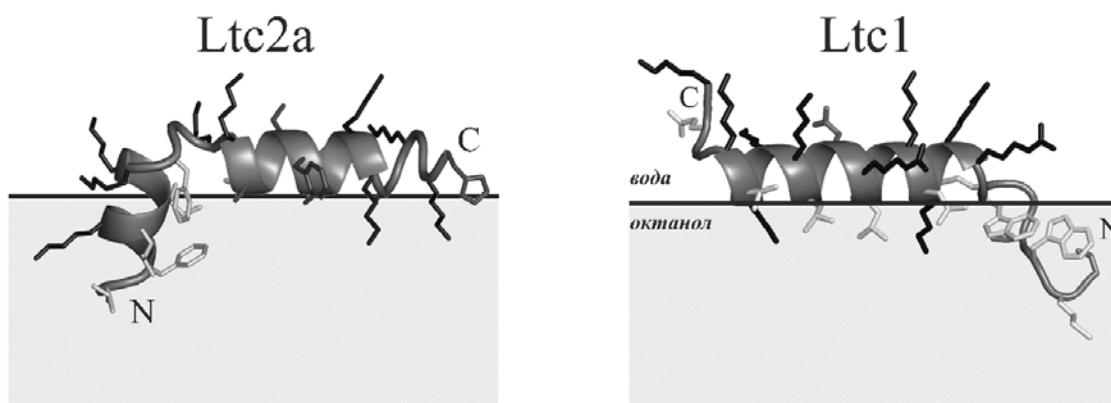


Рисунок 13. Пространственная структура Ltc2a (слева, PDB код 2G9P) и Ltc1 (справа, PDB код 2PCO), рассчитанная по данным ^1H -ЯМР в мицеллах SDS.

Спирали показаны в ленточном представлении. Дополнительно показано позиционирование спиралей на модели мембраны, аппроксимированной слоем октанола (слаб-модель, серый цвет). N- и C-концы пептидов обозначены. Боковые цепи Lys/Arg/His/Glu изображены тёмным цветом, гидрофобных остатков – светлым.

Интересно, что оба пептида позиционируются на слаб-модели мембраны одинаковым образом: заглублены в мембрану N-концевым участком. Отличие в том, что у Ltc2a этот фрагмент более структурирован. Отличия между пептидами становятся ещё более заметными при рассмотрении их взаимодействия с фосфолипидными мембранами.

4.1. Взаимодействие ЛП с фосфолипидными мембранами

Было обнаружено, что Ltc способны вызывать утечку флуоресцентного красителя из липосом различного состава. Величина утечки в значительной степени определяется этим составом (Рис. 14). Наиболее заметно то, что аналог Ltc1 неспособен вызывать утечку красителя из липосом, в состав которых входит фосфатидилэтаноламин (PE). Для сравнения в набор пептидов добавлен ещё Ltc3b-G. N-концевая часть его и у Ltc1 близки по а.к. составу. Но Ltc3b-G оказывается по свойствам вызывать утечку CBF ближе к Ltc2a.

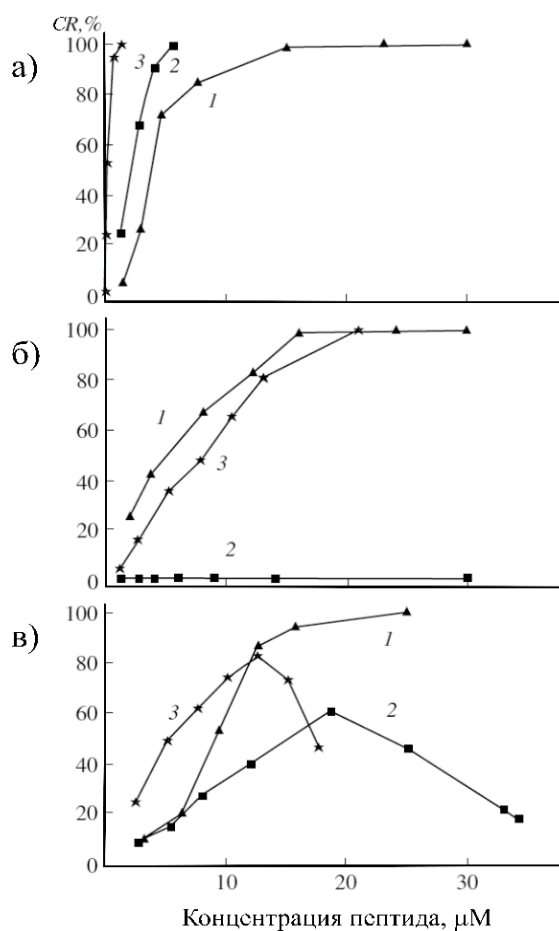


Рисунок 14. Зависимость утечки карбофлуоресцеина (CBF) из липосом состава:
 (а) диолеилфосфатидилхолин (DOPC),
 (б) диолеолифосфатидилэтаноламин (DOPE)/ диолеолифосфатидилглицерин (DOPG) (1:1),
 (в) DOPG пептидами:
 1) Ltc3b-G (SWASMAKKLKEYMEKCLKQRAG-NH₂);
 2) Ltc1-K (Ltc1 с дополнительным остатком Lys на С-конце);
 3) Ltc2a.
 Диаметр липосом 100 нм. Концентрация липида 0.1 мМ.

Более детально вопрос о роли PE в мембранной активности Ltc был исследован с помощью ^{31}P -ЯМР.

Спектры ^{31}P -ЯМР липосом DOPE/DOPG (7:3) диаметром 400 нм в присутствии и отсутствии пептидов Ltc1, 2a приведены на Рис. 15. Несмотря на присутствие двух липидов, DOPE и DOPG, ^{31}P -ЯМР спектр их смеси (DOPE/DOPG, 7:3) аппроксимируется теоретическим спектром с одним значением CSA (Рис. 15, а). Добавление Ltc2a при значении L/P=50:1 сохраняет «бислойный» характер спектра, но увеличивает значение CSA (Рис. 15, б). Эллипсоидальность липосомы при этом не изменяется и оба спектра (Рис. 15, а, б) описываются одинаковым значением параметра c/a. До значения L/P~25:1 спектр остаётся «бислойным».

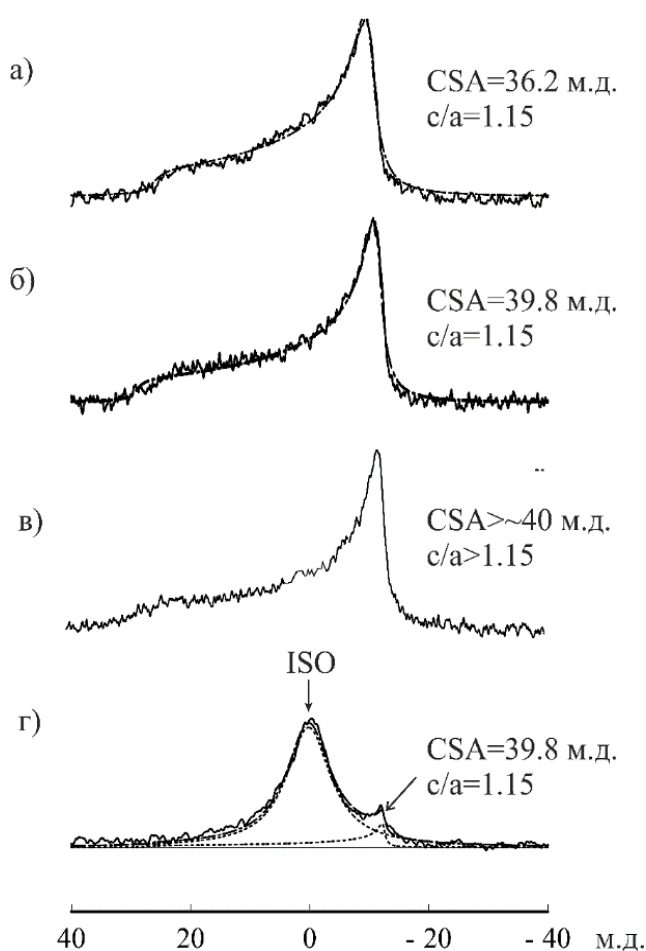


Рисунок 15. Спектры ^{31}P -ЯМР однослойных липосом состава DOPE/DOPG (7:3) диаметром 400 нм в отсутствие пептидов (а), и в их присутствии: (б) Ltc2a при L/P=50:1, (в) Ltc1, L/P=20:1, (г) Ltc2a, L/P=18:1. На панелях (а), (б), (г) пунктирной линией показаны теоретические аппроксимации экспериментального спектра, полученные с помощью программы P-FIT. Значения параметров CSA, c/a указаны рядом со спектрами. Для спектра на панели (в) приведены оценки этих параметров, сделанные на основании сравнения с теоретическими спектрами на панелях а, б.

При дальнейшем увеличении содержания Ltc2a бислой разрушается, в спектре начинает доминировать изотропный сигнал (Рис. 15, г). Остаточный «бислойный» сигнал в этом спектре характеризуется такими же параметрами

CSA, с/а, как и спектр на Рис. 15, б. Добавление Ltc1 к липосомам до значения L/P=20:1 не приводит к появлению изотропного сигнала в спектре (Рис. 15, в). Таким образом, данные ^{31}P -ЯМР подтверждают особую роль PE для Ltc1.

Дополнительно, было исследование влияние Ltc1 на плоские мембраны (Рис. 16).

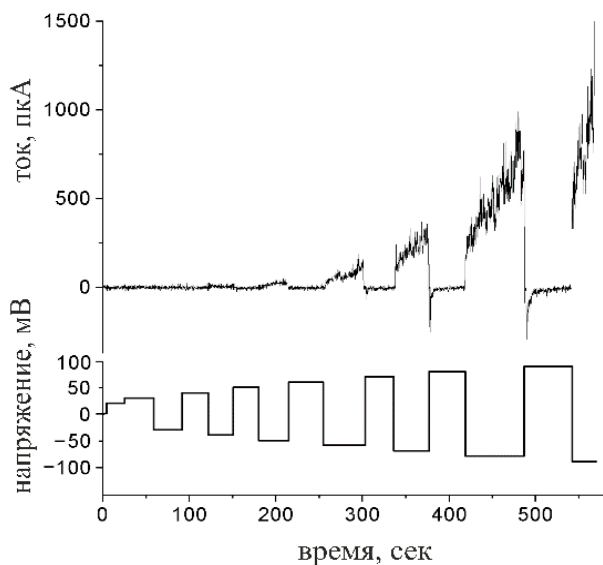


Рисунок 16. Эффект Ltc1 на плоских липидных мембранах, состоящих из смеси DOPE/DOPG (7:3). Показаны типичные электрические активности при концентрации пептида 0.835 мкМ.

Было обнаружено, что Ltc1 вызывает флуктуации тока через плоские мембраны того же липидного состава, что и в исследовании липосом, PE/PG (7:3). Флуктуации были обнаружены для концентраций пептида только выше 0.6 мкМ и приложенного положительного потенциала (Рис. 16). Непрерывное увеличение тока наблюдалось для потенциалов выше ~50 мВ (Рис. 78).

Интересно, что приложение отрицательного потенциала переводило мембрану в непроводящее состояние. Последующее изменение потенциала на противоположный, восстанавливало ток (Рис. 16). Проводимость увеличивалась без разрыва мембраны до напряжения ~90 мВ. Пептид Ltc2a вызывал разрушение мембраны в условиях, описанных выше для пептида Ltc1, даже без приложенного потенциала.

Таким образом, механизм дестабилизации мембраны ЛП из яда паука зависит от липидного состава мембраны, особенно, присутствия в ней PE, и приложенного трансмембранного потенциала.

5. Оксипинин 4а (Oxt4a) – пептид с уникальной структурой из яда паука

ЛП из яда пауков обладают цитолитической и антимикробной активностью. Их структурные особенности, как следует из приведённых выше результатов - при контакте с липидными мембранами они образуют амфипатические α -спирали, проявляя сходство с широко распространенным классом молекул, встречающихся в природе, и, в частности, в защитных системах высших эукариот и классифицируемых как антимикробные пептиды (АМП). Для более детального изучения взаимосвязи между ЛП и АМП выбран цитолитический пептид, оксипинин 4а (Oxt4a), из яда паука *O. takobius*: GIRCPKSWKCKAFKQRVLKRLLAMLRQHAF (30 а.о.). Он имеет необычную N-концевую петлю с одной дисульфидной связью. Любопытно, что эта петля очень напоминает так называемый мотив «Rana-box», обнаруженный в АМП из кожи лягушек-ранид и также содержащих единственную дисульфидную связь. Вероятно, это указывает на возможный эволюционный параллелизм или конвергенцию между амфибиями и пауками на молекулярном уровне. С другой стороны, дисульфид-замкнутая петля Oxt4a содержит остаток Pro и напоминает окончание петли-1 КТ, которыми они, как известно, взаимодействуют с липидными мембранами. Линейная часть Oxt4a напоминает латарцин-подобный фрагмент. Таким образом, Oxt4a – это комбинация мотивов, присущих как КТ, так и ЛП из яда пауков, а также АМП из кожи амфибий.

По данным ^1H -ЯМР, Oxt4a оказался неупорядоченным в водном растворе, но формировал упорядоченную структуру в мицеллах ДФХ. Сбор и обработка данных для расчёта его структуры были идентичны протоколу определения структур Ltc2a, Ltc1. Структура Oxt4a приведена на Рис. 17. Набор из 20-ти рассчитанных структур, наложенных по атомам основной цепи либо остатков 4–10, либо остатков 12–25, хорошо определенных участков молекулы пептида, показан на Рис. 17, а. Амфипатическая природа молекулы пептида отражена в его МПП потенциале (Рис. 17, в). Заряженные (красные) и гидрофобные (синие) области пространственно разделены.

Гидрофобный участок образован остатками: Phe13, Val17, Leu18, Leu21, Leu22, Met24 и Leu25 и занимает примерно одну треть поверхности пептида.

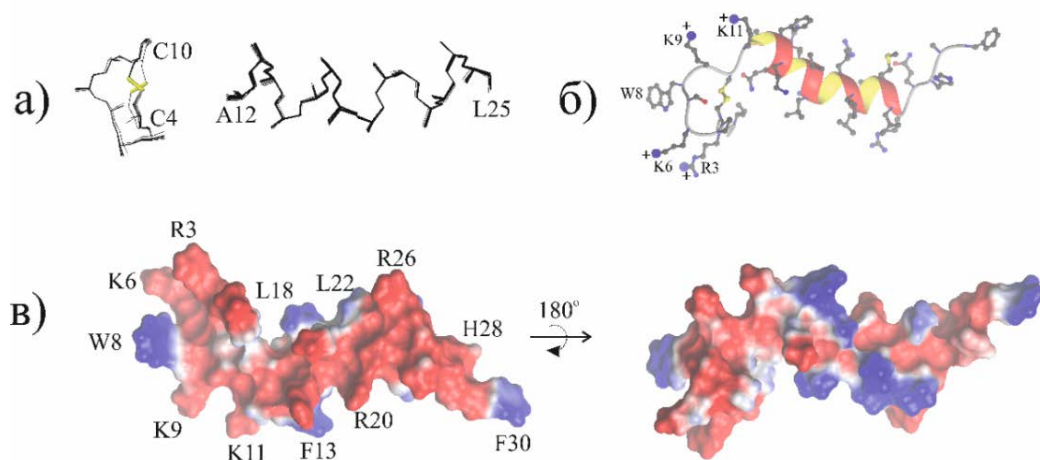


Рисунок 17. Пространственная структура Oxt4a в мицеллах ДФХ (PDB код 2L3I).

(а) 20 структур, наложенных по атомам основной цепи остатков 4–10 (слева) и 12–25 (справа). Боковые цепи, за исключением цистеинов, усечены по атомам C β . Дисульфидная связь показана желтым цветом. (б) Ленточное представление первой структуры из набора 20 рассчитанных. Боковые цепи показаны в шаростержневом представлении. Отмечены боковые цепи Arg3, Lys6, Trp8, Lys9 и Lys11 на N-конце. (в) Поверхность пептида окрашена в соответствии с потенциалом молекулярной гидрофобности (МГП). Красный и синий цвет соответствует полярным и гидрофобным областям, соответственно. Правое изображение получено из левого вращением на 180° вокруг горизонтальной оси.

МГП был рассчитан с помощью веб-сервера PLATINUM (Pyrkov et al., Bioinformatics, 2009, 25:1201-2).

Остатки 4–10 собраны в петлю, расположенную близко к передней части спирали. В результате, формируется кластер положительно заряженных боковых цепей остатков Arg3, Lys6, Lys9 и Lys11 (Рис. 17, б). Интересно, при рН >6.0 сигналы амидных протонов остатков 2–7 значительно уширены и не детектировались в ^1H -ЯМР спектре пептида, что говорит о высокой локальной плотности положительного заряда в этой области молекулы.

Подводя итог, можно сказать, что Oxt4a в мицеллах детергента принимает торпедо-подобную структуру, имеющую С-концевой амфипатический α -спиральный сегмент (тело; остатки 12–25) и N-концевую

дисульфид-стабилизированную петлю (головная часть; остатки 1–11) с необычно высокой концентрацией положительного заряда.

5.1. Дизайн антимикробных пептидов (АМП) на основе Oxt4a

На основе а.к.п. Oxt4a синтезированы пептиды меньшей длины с заменами остатков Cys/Ala, Leu(His)/Lys (Табл. 5).

Синтезированные пептиды были протестированы на гемолитическую и антибактериальную активность. Зависимость гемолитической активности от концентрации пептида показана на Рис. 18.

Таблица 5. А.к.п. и физико-химические характеристики производных Oxt4a.

Название пептида	Замены а.к.	А.к.п. ¹	Заряд
Oxt4a	–	1 5 10 15 20 25 30 GIRCPKSWKCKAFKQRLKRL L AMLRQNAF	+9
P1 ²	Oxt4a(11-30)4K	-----KAFKQRLKRR K AM K RQ K AF	+10
P2	Oxt4a(1-20)(C/A)	GIR A PKSWK A KAFKQRLK R -----	+8
P3	Oxt4a(6-25) (C/A)	-----K S WK A KAFKQRLKRL L AM L -----	+7
P4	Oxt4a(10-30)инв.	-----F A NQRL M ALLRKL V RQ K FA K	+6
P5 ⁴	Ltc1(1-8)Oxt4a(19-30)(L22/K)	SMW S GM W R-----KRL K AMLRQNAF	+5
P15	Oxt4a(17-25)	-----V L KRL L AM L -----	+2

¹ - Ожидаемые спиральные фрагменты пептидов подчеркнуты;

² - Жирным шрифтом выделены а.к., отличающиеся от исходной пептидными а.к.п.

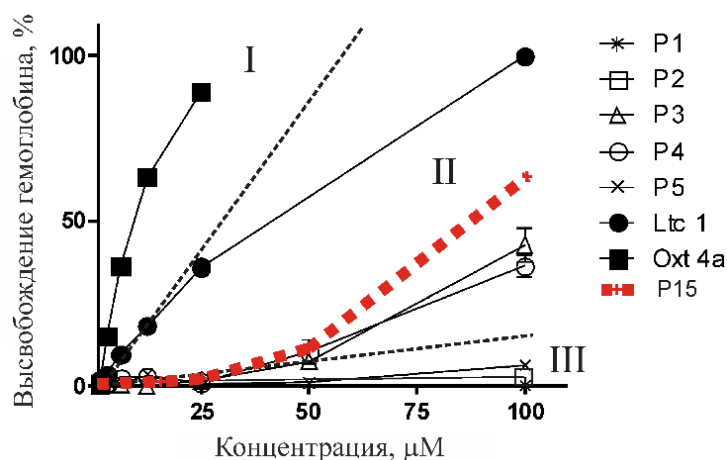


Рисунок 18.

Гемолитическая активность спроектированных и исходных пептидов, представленная как зависимость выхода гемоглобина (%) от концентрации. Области, обозначенные римскими цифрами, соответствуют сильной (Oxt 4a),

умеренной (Ltc1, P3, P4, P15-красный цвет) и слабой (Ltc3a, P1, P2, P5) активности.

Каждому пептиду соответствует кривая с точками на ней, обозначенными на вставке справа. Все измерения на клетках крови человека выполнены Игнатовой

А.А. (н.с. лаб. оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ГНЦ ИБХ РАН).

Антибактериальные свойства пептидов были протестированы против как грамположительных (*S. aureus*), так и грамотрицательных (*E. coli*, *P. aeruginosa*) бактерий (Таблица 6).

Таблица 6. Антибактериальная активность Oxt4a и его производных¹.

Бактерии ¹	P1	P2	P3	P4	P5	P15	Oxt4a
<i>S. aureus</i> 209P	> 100	> 100	25	6.3	25	25	10
<i>E. coli</i> C600	> 100	> 100	3.1	6.3	6.3	6.3	0.5
<i>P. aeruginosa</i> PA101	>100	>100	6.3	100	12.5	25	- ²

¹ – см. примеч. 1 к Табл. 4;

¹ – Концентрация (μМ), при которой наблюдается 100% подавление роста бактерий;

² – Данные отсутствуют.

Согласно Таблицам 5,6, варьируя гидрофобные свойства, заряд спирали пептида, и его длину можно оптимизировать антибактериальную/гемолитическую активность пептидов. Действительно, антибактериальная активность P4 против *S.aureus*, *E.coli* на порядок меньше, чем против *P.aeruginosa* (Табл. 6). Остальные пептиды обладают сравнимыми активностями против выбранных микроорганизмов. Интересно, что P5 и P15 обладают сравнимой антибактериальной активностью, но гемолитическая активность P5 значительно меньше, несмотря на большую длину пептида (Рис. 18). Таким образом, представляет интерес разработка методики настройки активности пептида на определённый вид микроорганизмов, минимизируя при этом его гемолитические свойства. Решение этой задачи предложено в следующем разделе.

6. Поиск АМП на базе библиотеки фрагментов ЛП и КТ против золотистого стафилококка, включая метициллин-резистентную форму

Как КТ, так и ЛП из яда пауков обладают антимикробной активностью. Но этой активностью обладают не только полноразмерные токсины, но и их фрагменты, не короче 9 а.о. и длиной около 20 а.о. (см. Табл. 5). Целевой

микроорганизм стоит выбрать, исходя из того, что в последнее время наблюдается рост случаев возникновения антибиотикорезистентных стафилококковых инфекций (MRSA). Считается, что полноценной заменой традиционным антибиотикам могут составить АМП. А такими АМП могут выступить фрагменты КТ и ЛП. Но какие именно будут оптимальны?

Задача решена в несколько этапов: 1) создание библиотеки фрагментов (длина 9-22, верхняя граница увеличена для проверки нейросети) КТ и ЛП; 2) создание библиотеки АМП, состоящих из стандартных а.о. для обучения нейронной сети; 3) обучение нейронной сети для узнавания фрагментов из библиотек, активных в отношении MRSA; 4) проверка предсказаний нейросети синтезом активных фрагментов, выбранных нейросетью, и испытанием их активности; 5) исследование механизма действия активных пептидов и оптимизация их активности. Остановимся на них подробнее.

6.1. Формирование библиотеки фрагментов

Объединим все известные на данный момент КТ (~90 единиц) и ЛП (~2200 единиц). Нас интересуют не сами а.к.п., а их фрагменты заданной длины, которые и будут проверяться на антибактериальные свойства с помощью пред-обученной нейронной сети. Нарезка каждой а.к.п. идёт с шагом 1 а.о. (Рис. 19), т.е. фрагменты должны отличаться, по крайней мере, одним а.о. Идентичные фрагменты удаляются программой.

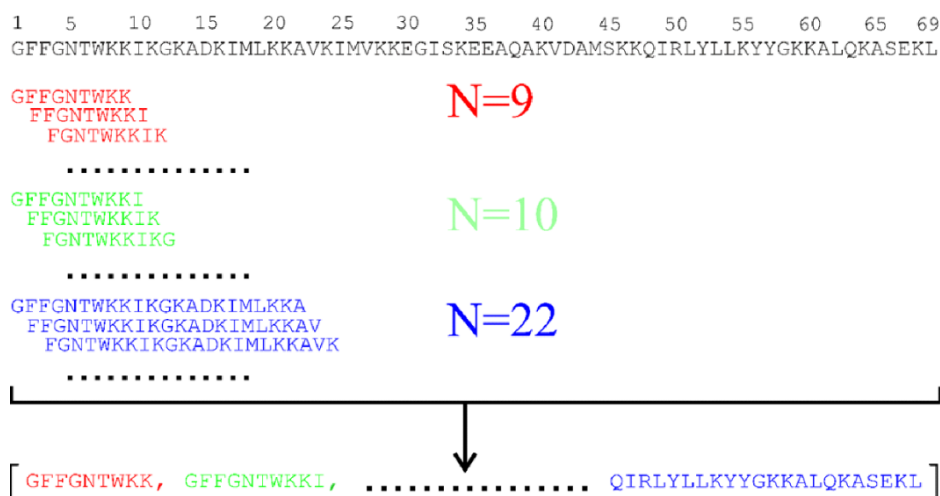


Рисунок 19. Иллюстрация нарезки а.к.п. ЛП (на примере цитоинсектотоксина 1a) на фрагменты длиной от 9-ти до 22-х а.о. Пептиды разной длины (N, указано

рядом с набором фрагментов соответствующей длины) показаны разными цветами. Исходная последовательность показана вверху и а.о. пронумерованы сверху. Многоточием показано продолжение процедуры фрагментации/опущенные пептиды).

6.2. Выбор нейронной сети и её обучение

Для предсказания активности АМР в равной степени могут использоваться методы, основанные на классическом машинном обучении и глубоком обучении нейронных сетей. Имеет смысл использовать несколько программ с различной архитектурой. Однако необходимо, чтобы программа предусматривала обучение на данных пользователя. Это так называемый обучающий набор, представляющий собой пептиды, активные в отношении требуемого микроорганизма. Обучающий набор пептидов должен включать АМП, состоящие исключительно из стандартных а.о. В нашем случае такие пептиды были собраны из литературных источников, баз данных АМП, руководствуясь критериями: 1) целевой пептид состоит из стандартных а.о., не имеет дисульфидных связей (за исключением пептидов из кожи лягушки, содержащих одну дисульфидную связь на С-конце), из модификаций допускается только амидирование С-конца; 2) длина пептида не превышает 50 а.о.; 3) активность против хотя бы одного штамма MRSA с MIC в диапазоне <20 мкг/мл; 4) активность определена стандартным методом серийных разведений. В итоге, удалось собрать немногим более 400 активных пептидов. В процесс обучения некоторых нейросетей, помимо активных, используются неактивные пептиды, не обладающие хотя бы минимальной антимикробной активностью. Их число может достигать нескольких тысяч экземпляров.

6.3. Отбор antiMRSA-активных фрагментов библиотеки и тестирование их активности

Из базы данных фрагментов ЛП (всего 75235 пептидов) было отобрано 15 фрагментов длины 13-20 а.о. с электрическим зарядом от +2 до +5, получивших максимальные баллы, как минимум, двумя из 3-ёх

использованных нейросетей. Эти пептиды были синтезированы твердофазным методом. Корректность проведённого синтеза подтверждали определением их молекулярных масс с помощью MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии. Исследование антибактериальной активности пептидов проводили методом серийных разведений в жидкой среде при концентрации бактерий $(0.5-1) \times 10^5$ кл/мл. Пептиды, представляющие интерес для последующего обсуждения, приведены в Табл. 7.

Таблица 7. ЛП-фрагменты с предполагаемой antiMRSA-активностью.

Номер	А.к.п. ¹	Длина	Заряд	Масса ²
IX	IWL ⁺ SLMKFAGKHL-NH ₂	13	3	1541.87/1542.88
X	IWL ⁺ SLMKFAGKHL	13	2	1542.87/1543.87
XIII	FWFKALKSVAKFIA-NH ₂	14	4	1654.96/1654.97
XIV	I IWL ⁺ LPVLKFLASHV-NH ₂	14	2	1634.99/1634.98
XV	IWWTAVKFFGKQL-NH ₂	13	3	1494.80/1494.79

¹ – Амидирование С-конца обозначено добавлением (NH₂) к С-концу пептида;

² – Расчётная/измеренная (Да);

Активность пептидов приведена в Табл. 8.

Таблица 8. Антибактериальная активность фрагментов ЛП в отношении грам-положительных микроорганизмов¹.

Номер	МИС (мкг/мл)			
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	ATCC 29213 (MSSA)	ATCC 43300 (MRSA)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
IX	12.5	25	25	25
X	>200	>200	>200	>200
XIII	6.25	3.125	6.25	6.25
XIV	6.25	12.5	12.5	25
XV	>200	>200	>200	>200
Ванкомицин ²	0.78	0.78	1.56	3.125

¹ – Все измерения проведены к.х.н. Барановой А.А. и к.х.н. Алферовой В.А., лаб. антибиотикорезистентности ГНЦ ИБХ РАН;

² - Трициклический гликопептидный антибиотик из *Streptococcus orientalis*.

Свойства пептида IX были исследованы далее методом ЯМР в водном растворе, мицеллах анионного детергента лизопальмитоилфосфатидилглицерина (LPPG) и фосфолипидных липосомах DOPG.

6.4. Структура пептида IX и его взаимодействие с детергентом и фосфолипидами по данным ЯМР

Пептид хорошо растворим в воде в широком диапазоне pH. Измерение коэффициента трансляционной диффузии пептида в водном растворе даёт значение $(28.4 \pm 0.09) \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$. Согласно формуле Стокса-Эйнштейна, гидродинамический радиус молекулы пептида составляет: $0.98 \pm 0.04 \text{ нм}$, что близко ожидаемому радиусу, 1.06 нм ($=0.027 \times M^{0.5}$), для неупорядоченного пептида такой же молекулярной массы (измеренная масса пептида $M=1542.88$ Да, см. Табл. 7). Таким образом, в водном растворе пептид IX - мономер с неупорядоченной структурой.

При взаимодействии с LPPG пептид структурируется. Учёт NOE-контактов и ограничений на двухгранные углы, полученные анализом гетероядерных химических сдвигов (соответствующие HSQC спектры накоплены на естественном содержании изотопов) позволили рассчитать пространственную структуру пептида (Рис. 20).

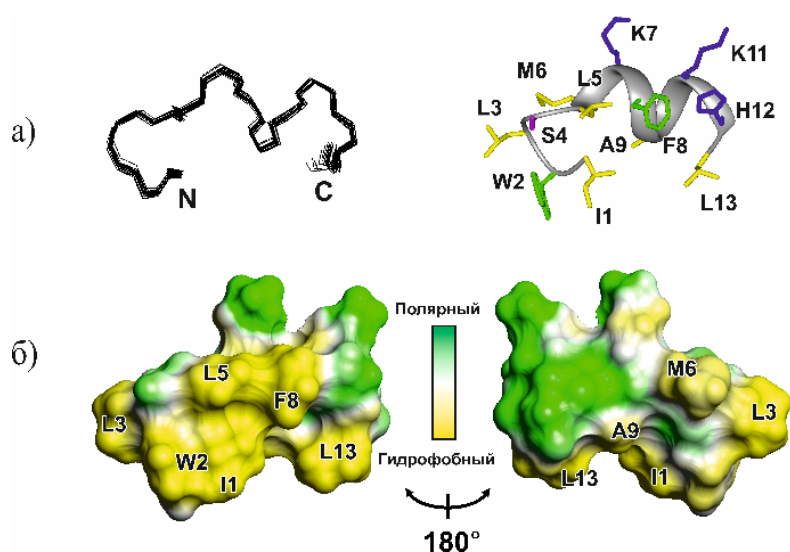


Рисунок 20. Структура пептида IX в мицелле LPPG. (а) Набор 20-ти структур (PDB код 9WХК), совмещённых по атомам остова пептида (слева), и лучшая структура набора (номер 1) в ленточном представлении (справа). (б) Распределение полярных/гидрофобных свойств по поверхности молекулы, изображённой на панели (а, справа).

Правые и левые изображения получены вращением на 180° вокруг вертикальной оси. В центре панелей – цветовая шкала распределения свойств.

Молекула пептида компактна. На N-конце – вытянутая спираль (остатки 1-6). Остатки 7-12 – α -спираль, стабилизированная водородными связями. Следующим шагом стало изучение локализации пептида на поверхности мицеллы с использованием спин-меченых жирных кислот. Однако были обнаружены межмолекулярные NOE-контакты между молекулой пептида и LPPG. Они указывают, что в контакте с молекулой пептида находится только одна молекула детергента, которую можно рассматривать как взаимодействующую специфически (т.е. формирующую комплекс) с молекулой пептида. С учётом NOE-контактов (Табл. 9)

Таблица 9. Межмолекулярные NOE контакты между молекулой пептида и детергента.

ЛК9 (пептид IX) ¹	LPPG
H ^{ε1} W2	C2H, C3H, C4H, C1'H, C2'H, C3'H, sn-3 H
H ^{δ1} , H ^{ε3} , H ^{ζ2} , H ^{ζ3} W2, H ^δ , H ^ε F8	C3H, C4H

¹ – В этой колонке указаны атомы протонов молекулы пептида. В соответствующих строках таблицы указаны протоны молекулы детергента, на которые наблюдаются кросс-пики в NOESY спектре.

была рассчитана модель комплекса пептид/LPPG и его позиционирование в мицелле (Рис. 21).

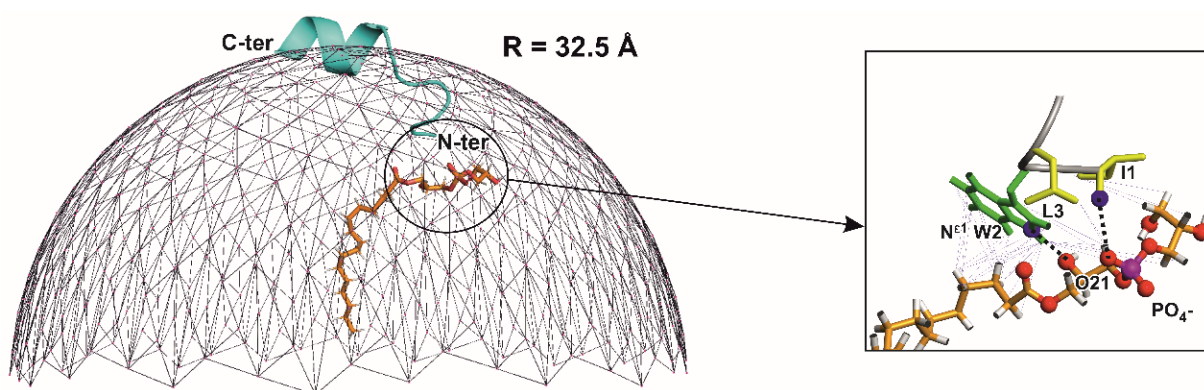


Рисунок 21. Модель комплекса пептид IX/LPPG на поверхности мицеллы (полусфера). Её радиус (сверху) оценен по диффузии. N- и C-конец пептида маркированы. Справа детализированы контакты молекулы пептида с LPPG.

Далее было охарактеризовано взаимодействие пептида IX с фосфолипидными липосомами. Согласно ^{31}P -ЯМР, это взаимодействие зависит от липидного состава липосом (Рис. 22).

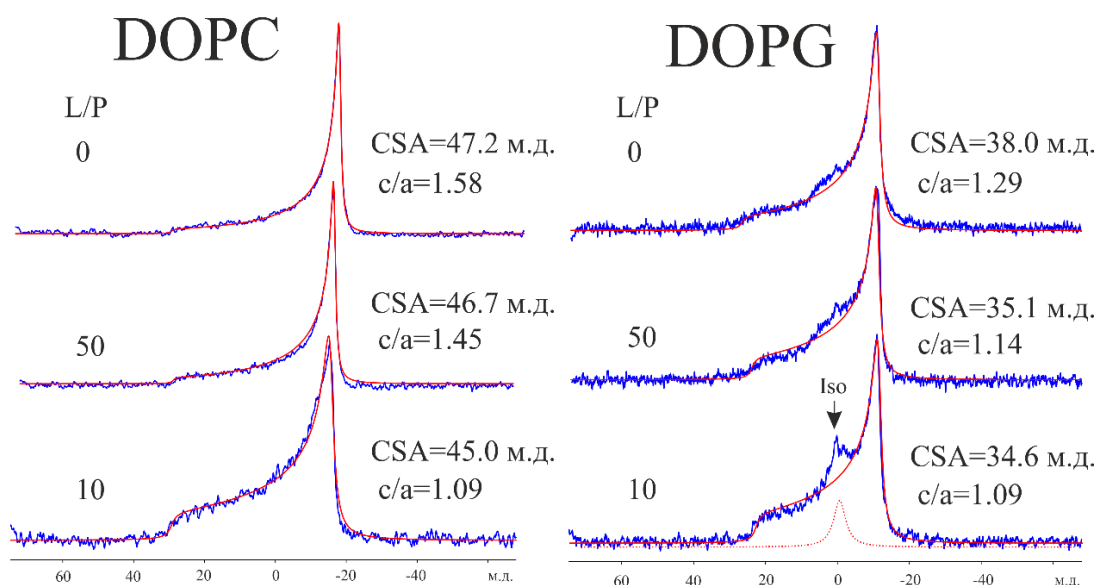


Рисунок 22. ^{31}P -ЯМР спектры MLV DOPC (слева) и DOPG (справа) в отсутствии и присутствии пептида IX. Молярное соотношение липид:пептид (L/P, указано слева), а также параметры спектров (указаны справа: значение тензора анизотропии на ядре фосфора, CSA, и параметр эллипсоидальности липосом в магнитном поле, c/a), полученные с помощью анализа спектров с использованием программы P-FIT, приведены рядом со спектрами. Расчётные спектры показаны красным цветом. Спектры регистрировались при T=298 К, pH 7.

Пептид встраивается в бислои MLV как DOPC, так и DOPG, что следует из уменьшения параметров CSA, c/a при уменьшении L/P (Рис. 22). Но только в мембранах DOPG регистрируется изотропный сигнал (Рис. 22, справа, нижний спектр). По всей видимости, это результат специфического взаимодействия пептида IX с головкой молекулы DOPG, которая идентична головке LPPG (Рис. 21). Следовательно, модель комплекса пептид IX/LPPG может быть перенесена на DOPG.

6.5. Структурно-функциональное изучение antiMRSA-пептидов

Пептид X – ближайший аналог пептида IX. Он имеет свободный C-конец. Поэтому при нейтральных pH суммарный его заряд составляет +2. Пептид становится нерастворимым. Но при pH 5, когда заряд пептида +3 и он

водорастворим, он не проявляет активности против MSSA и MRSA. Также в этих условиях не вызывает появление изотропного сигнала при взаимодействии с DOPG. Это связано с тем, что заряженный С-конец пептида дестабилизирует α -спираль, которая необходима для связывания пептида с бислоем как DOPC, так и DOPG. Следовательно, С-концевое амидирование необходимо для активности пептидов длины 13-14 а.о. Подтверждает этот вывод то, что изученные фрагменты КТ, независимо от С-концевого амидирования, оказались неактивными против MRSA и MSSA. Они оказались неспособны формировать спираль при взаимодействии с LPPG (согласно снятым КД-спектрам). Следовательно, пептид должен сначала связаться с мембраной, а уже потом селективно взаимодействовать с молекулами липидов.

Пептид XIII принимает в LPPG структуру, сходную с той, что у пептида IX (Рис. 20). Он также формирует комплекс с LPPG тремя N-концевыми а.о. Вероятно, комплекс более стабилен, что проявляется увеличением активности пептида (Табл. 8). С помощью конфокальной микроскопии показано, что пептид XIII нарушает целостность плазматической мембраны бактерий *S. aureus* (Mironov et al., *Pharmaceutics*, 2025,17(12):1526). Этот процесс является быстрым и гибель бактерий происходит в течение 10-15 мин после добавления пептида. Интересно, что и гемолитическая активность пептида XIII значительно меньше, чем у пептида IX (Табл. 10).

Таблица 10. Гемолитическая активность anti-MRSA пептидов.

Пептид	Гемолитическая активность ¹ (%)		
	Концентрация пептида		
	25 мкМ	50 мкМ	100 мкМ
IX ²	0	14	100
XIII ²	0	0	0
XIV ²	0	60	100
XV ²	0	0	0

¹ – Кровь человека, см. примеч. 1 к Табл. 4;

² – А.к.п. - см. Табл. 7.

Следует ожидать, что это является следствием более слабого взаимодействия пептида XIII с цвиттерионными мембранами (модель плазматической мембраны эритроцитов), по сравнению с пептидом IX. Вероятно, это следует отнести к а.к. составу N-концевой тройки. При неблагоприятном а.к. составе этой тройки комплекс с PG перестаёт формироваться и пептид теряет активность. Таким образом, детерминантами активности пептидов против золотистого стафилококка, включая антибиотико-резистентную форму, являются: 1) длина, не менее 13 остатков; 2) суммарный заряд, не менее +2 (при нейтральных рН); 3) N-концевой гидрофобный якорь, имеющий не менее трёх гидрофобных остатков; 4) C-концевая α -спираль из не менее 5-ти остатков, стабилизированная амидированием; 5) хорошая водорастворимость в широком диапазоне рН. Активные пептиды формируют комплекс с молекулами фосфатидилглицерина за счёт N-концевой аминогруппой и первыми тремя остатками гидрофобного якоря. Максимальная стабильность комплекса достигается, если трипептид состоит из двух остатков фенилаланина и одного триптофана. Такие пептиды слабо взаимодействуют с фосфатидилхолином и, соответственно, слабо гемолитичны.

Заключение

Предложенное ранжирование КТ по группам, в соответствие с их мембранной активностью, позволяет предложить, что присутствие в яде кобры, как правило, нескольких КТ обеспечивает яд широким спектром активности. КТ из групп с малым номером охотнее формируют комплекс с фосфолипазами и действуют с ними в синергизме на клетки жертвы. КТ из групп с большим номером проявляют мембранную активность самостоятельно. Яд паука также содержит набор ЛП со спектром мембранных активностей. Однако здесь варьирует специфичность взаимодействия ЛП с липидными компонентами биомембраны. Это обеспечивает широкий спектр активностей – от дестабилизации мембраны до

проникновения через неё и атаки на внутриклеточные органеллы и, возможно, рецепторы.

Критерием проверки полученных результатов и сделанных выводов являются практические результаты работы, направленные на разработку биоактивных пептидов заданной функциональности на базе фрагментов КТ и линейных мембрано-активных полипептиды (ЛМАП) яда паука.

Практический результат работы – идентификация мотива селективности ЛМАП. Для фосфатидилглицерина (ФГ) этот мотив определяется гидрофобным якорем, сформированным 3-мя а.о. на N-конце молекулы: FWF (IWL, IIW). Мотивы селективности в отношении фосфатидилхолинов (ФХ) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) могут быть идентифицированы в ближайшем будущем. Способность ЛМАП и их фрагментов формировать стабильные комплексы пептид/ фосфолипид необходимо учитывать при рассмотрении их мембранной активности и разработке на их основе цитотоксических и антиинфекционных препаратов. Для мембран из фосфатидилхолинов, фосфатидилглицеринов и их смесей формируемый комплекс характеризуется положительным напряжением кривизны и вызывает дестабилизацию мембраны. В мембранах, содержащих фосфатидилэтаноламин, комплекс имеет отрицательное напряжение кривизны и стабилизирует мембрану. Однако приложенный к мембране потенциал определённой полярности может нивелировать эффект стабилизации. Учёт селективности взаимодействия ЛП с фосфолипидами плазматической мембраны клеток послужит основой дизайна селективных антимикробных пептидов для лечения антибиотико-резистентных инфекций и химиотерапии ряда новообразований.

ВЫВОДЫ

1. Кардиотоксины (КТ) яда кобры - трехпетлевые бета-структурные мембраноактивные полипептиды. Их взаимодействие с мембранами описывается в рамках модели динамического равновесия между набором

состояний в водном растворе и мембране. Первый обусловлен цис/транс изомерией связи X-Pro8 в петле-1. Для КТ с двумя остатками пролина в этой петле доминирует конформер с цис-формой связи Pro8-Pro9. В мембране возможны три состояния: встраивание в бислой петли-1, петель-1 и -2 или всех трёх петель молекулы.

2. Мембранная активность КТ определяется населённостью трёх-петлевого состояния, зависящего от присутствия консервативных остатков в оконечностях петель. С учётом строго детерминированной последовательности встраивания петель в мембрану, начиная с петли-1, затем -2 и, наконец, -3, наблюдается следующая иерархия в мембранной активности КТ, содержащих эти остатки: Pro9 < Ser28 < Asn/Asp45. С учётом числа возможных комбинаций получается 8 групп, из которых группа 1 содержит все остатки, а в группе 8 их нет. Активность КТ увеличивается с увеличением номера группы.

3. Встраивание КТ в мембрану увеличивает модуль её вязкоэластической упругости. При достижении критической концентрации КТ во внешнем монослое мембраны происходит её разрушение с образованием липидных частиц - агрегированных комплексов пептид/липид. Мембранная активность КТ коррелирует с их антимикробной активностью против грам-положительных микроорганизмов. Фрагменты КТ длиной 9-20 остатков полностью теряют её, не проявляя гемолитические/ цитотоксические эффекты вследствие сниженного потенциала к формированию альфа-спирали в липидных мембранах.

4. Линейные мембрано-активные полипептиды (ЛМАП) яда паука в водном растворе характеризуются доминированием неупорядоченной структуры. На мембране равновесие смещается в сторону непрерывной амфифильной альфа-спирали или набора спиралей. Механизм дестабилизации липидных мембран, вызываемый ЛМАП, близок обнаруженному для КТ. Эффект зависит от структуры ЛМАП, которая, в свою очередь, определяется

липидным составом мембраны и возможным селективным взаимодействием молекулы пептида с липидами мембраны.

5. Активность ЛМАП может быть сведена к их фрагментам длины 9-20 аминокислотных остатка. Поиск таких фрагментов можно осуществить с помощью разработанной в ходе данной работы процедуры: создание библиотеки фрагментов ЛМАП, отбор фрагментов с максимумом/минимумом ожидаемой активности (антимикробной/гемолитической) с помощью нейронной сети, химический синтез отобранных фрагментов с испытанием активности и структурно-функциональное изучение активных фрагментов с использованием комбинации ЯМР высокого разрешения и ^{31}P -ЯМР широких линий.

6. Фрагменты ЛМАП с активностью против грам-положительных микроорганизмов, включая устойчивый к метициллину золотистый стафилококк, характеризуются наличием N-концевого гидрофобного якоря, состоящего из трёх гидрофобных остатков. Активные пептиды формируют комплекс с головками молекула фосфатидилглицерина за счёт этого мотива. Стабильность комплекса зависит от аминокислотного состава трипептида, одним из которых должен быть триптофан.

7. Набор КТ, принадлежащих, как правило, к разным группам, присутствует в яде кобры для обеспечения разнообразия мембрано-литического действия. КТ из групп с меньшим номером формируют комплекс с фосфолипазой А2 и действуют в синергизме. КТ из групп с большим номером действуют самостоятельно. Яд паука также характеризуется набором ЛП с разнообразным спектром мембрано-литического действия. Эффект определяется специфичностью взаимодействия молекул ЛП с липидами биомембран жертвы, а также профилем молекулярно-гидрофобного потенциала амфифильной спирали, формируемой пептидом в мембране. Разнообразие мембранных эффектов ЛП, возможно, обеспечивает синергизм взаимодействия с другими компонентами яда для максимизации его действия.

Список публикаций по теме диссертации

1. Уткин Ю.Н., **Дубовский П.В.**, Дубинный М.А., Жаравин В.А., Симонова Т.Н., Барсуков Л.И., Арсеньев А.С. (1999) Спин-меченый по Lys35 цитотоксин II из яда кобры *Naja oxiana* для исследования его взаимодействия с фосфолипидными мембранами методом ЭПР. Биоорганическая химия Т.25, №12, С.930-932.
2. Дубинный М.А., **Дубовский П.В.**, Уткин Ю.Н., Симонова Т.Н., Барсуков Л.И., Арсеньев А.С. (2001) Изучение методом ЭПР взаимодействия цитотоксина II с модельными мембранами. Биоорганическая химия Т.27, №2, С.102-113; версия на английском языке: Dubinnyi, M.A., **Dubovskii, P.V.**, Utkin, Y.N., Simonova, T.N., Barsukov, L.I., Arseniev, A.S. (2001) An ESR study of the cytotoxin II interaction with model membranes. Russ. J. Bioorg. Chem. V. 27, №2, P.84-94.
3. **Dubovskii P.V.**, Dementieva D.V., Bocharov E.V., Utkin Yu.N., Arseniev A.S. (2001) Membrane Binding Motif of the P-type Cardiotoxin. J. Mol. Biol. V.305, №1, P.137-149.
4. Efremov R.G., Volynsky P.E., Nolde D.E., **Dubovskii P.V.**, Arseniev A.S. (2002) Interaction of cardiotoxins with membranes: a molecular modelling study. Biophys. J. V.83, №1, P.144-153.
5. **Dubovskii P.V.**, Lesovoy D.M., Dubinnyi M.A., Utkin Y.N., Arseniev A.S. (2003) Interaction of the P-type cardiotoxin with phospholipid membranes. Eur. J. Biochem. V.270, №9, P.2038-2046.
6. Феофанов А.В., Шаронов Г.В., Дубинный М.А., Астапова М.А., Куделина И.А., **Дубовский П.В.**, Родионов Д.И., Уткин Ю.Н., Арсеньев А.С. (2004) Сравнительное изучение структуры и активности цитотоксинов из яда кобр *Naja oxiana*, *Naja kaouthia* и *Naja haje*. Биохимия Т.69, №10, С.1410-1421; версия на английском языке: Feofanov A.V., Sharonov G.V., Dubinnyi M.A., Astapova M.V., Kudelina I.A., **Dubovskii P.V.**, Rodionov D.I., Utkin Y.N., Arseniev A.S. (2004) Comparative study of structure and activity of cytotoxins from venom of the cobras *Naja oxiana*, *Naja kaouthia*, and *Naja haje*. Biochemistry (Moscow) V.69, №10, P.1148-1157.
7. **Dubovskii P.V.**, Lesovoy D.M., Dubinnyi M.A., Konshina A.G., Utkin Y.N., Efremov R.G., Arseniev A.S. (2005) Interaction of three-finger toxins with phospholipid membranes: comparison of S- and P-type cytotoxins. Biochem. J. V.387, №3, P.807-815.
8. Dubinnyi M.A., Lesovoy D.M., **Dubovskii P.V.**, Chupin V.V., Arseniev A.S. (2006) Modeling of ³¹P-NMR spectra of magnetically oriented phospholipid liposomes: A new analytical solution. Solid. State Nucl. Magn. Reson. V.29, №4, P.305-311.
9. **Dubovskii P.V.**, Volynsky P.E., Polyansky A.A., Chupin V.V., Efremov R.G., Arseniev A.S. (2006) Spatial structure and activity mechanism of a novel spider antimicrobial peptide. Biochemistry V.45, №35, P.10759-10767.

10. Василевский А.А., Козлов С.А., Жмак М.Н., Куделина И.А., **Дубовский П.В.**, Шатурский О.Я., Арсеньев А.С., Гришин Е.В. (2007) Синтетические аналоги антимикробных пептидов из яда среднеазиатского паука *Lachesana tarabaevi*. Биоорган. химия. Т.33 №4, С.405-412: версия на английском языке:
Vassilevski, A.A., Kozlov, S.A., Zhmak, M.N., Kudelina, I.A., **Dubovskii, P.V.**, Shatursky, O.Ya., Arseniev, A.S., Grishin, E.V. (2007) Synthetic analogues of antimicrobial peptides from the venom of the Central Asian spider *Lachesana tarabaevi*. Russ. J. Bioorgan. Chem. V. 33, №4, P.376-382.
11. **Dubovskii, P.V.**, Volynsky, P.E., Polyansky, A.A., Karpunin, D.V., Chupin, V. V., Efremov, R. G., Arseniev, A. S. (2008) Three-Dimensional structure/hydrophobicity of laticins specifies their mode of membrane activity. *Biochemistry* V.47, №11, P. 3525-3533.
12. **Dubovskii, P.V.**, Vassilevski, A.A., Samsonova, O.V., Egorova, N.S., Kozlov, S.A., Feofanov, A.V., Arseniev, A.S., Grishin, E.V. (2011) Novel lynx spider toxin shares common molecular architecture with defense peptides from frog skin. *FEBS. J.* V.278, P.4382-4393.
13. Кузнецов А.С., **Дубовский П.В.**, Воронцова О.В., Феофанов А.В., Ефремов Р.Г. (2014) Взаимодействие линейных катионных пептидов с фосфолипидными мембранами и полимерами сиаловой кислоты. Т.79, №5, С.583-594; версия на английском языке:
Kuznetsov A.S., **Dubovskii P.V.**, Vorontsova O.V., Feofanov A.V., Efremov R.G. (2014) Interaction of linear cationic peptides with phospholipid membranes and polymers of sialic acid. *Biochemistry (Moscow)*, V.79, P.459-468.
14. **Dubovskii, P.V.**, Vorontsova, O.V., Utkin, Y.N., Arseniev, A.S., Efremov, R.G., Feofanov, A.V. (2015) Cobra cytotoxins: determinants of antibacterial activity. *Mendeleev Commun.* V.25, №1, P.70-71.
15. Shulepko M.A., Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., **Dubovskii P.V.**, Astapova M.V., Feofanov A.V., Arseniev A.S., Utkin Y.N., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A. (2017) Towards universal approach for bacterial production of three-finger Ly6/uPAR proteins: Case study of cytotoxin I from cobra *N. oxiana*. *Protein Expr. Purif.* V.130, P.13-20.
16. **Dubovskii P.V.**, Dubinnyi M.A., Konshina A.G., Kazakova E.D., Sorokoumova G.M., Ilyasova T.M., Shulepko M.A., Chertkova R.V., Lyukmanova E.N., Dolgikh D.A., Arseniev A.S., Efremov R.G. (2017) Structural and dynamic "portraits" of recombinant and native cytotoxin I from *Naja oxiana*: how close are they? *Biochemistry*, V.56, P.4468-4477.
17. **Dubovskii P.V.**, Dubinnyi M.A., Volynsky P.E., Pustovalova Y.E., Konshina A.G., Utkin Y.N., Efremov R.G., Arseniev A.S. (2018) Impact of membrane partitioning on the spatial structure of an S-type cobra cytotoxin. *J. Biomol. Struct. Dyn.* V.36, №13, P.3463-3478.
18. **Dubovskii P.V.**, Ignatova A.A., Volynsky P.E., Ivanov I.A., Zhmak M.N., Feofanov A.V., Efremov R.G. (2018) Improving therapeutic potential of

- antibacterial spider venom peptides: coarse-grain molecular dynamics guided approach. *Future Med. Chem.* V.10, №19, P.2309-2322.
19. **Dubovskii P.V.**, Ignatova A.A., Feofanov A.V., Utkin Y.N., Efremov R.G. (2020) Antibacterial activity of cardiotoxin-like basic polypeptide from cobra venom. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* V.30, №3, P.126890.
 20. Dubinnyi M.A., **Dubovskii P.V.**, Starkov V.G., Utkin Y.N. (2021) The omega-loop of cobra cytotoxins tolerates multiple amino acid substitutions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V.558. P.141-146.
 21. Konshina A.G., **Dubovskii P.V.**, Efremov R.G. (2021) Stepwise Insertion of Cobra Cardiotoxin CT2 into a Lipid Bilayer Occurs as an Interplay of Protein and Membrane "Dynamic Molecular Portraits". *J. Chem. Inf. Model.* V.61, №1, P.385-399.
 22. **Dubovskii P.V.**, Dubova K.M., Bourenkov G., Starkov V.G., Konshina A.G., Efremov R.G., Utkin Y.N., Samygina V.R. (2022) Variability in the Spatial Structure of the Central Loop in Cobra Cytotoxins Revealed by X-ray Analysis and Molecular Modeling. *Toxins (Basel)*. V.14, №2, P.149.
 23. **Dubovskii P.V.**, Ignatova A.A., Alekseeva A.S., Starkov V.G., Boldyrev I.A., Feofanov A.V., Utkin Y.N. (2022) Membrane-Disrupting Activity of Cobra Cytotoxins Is Determined by Configuration of the N-Terminal Loop. *Toxins (Basel)*. V.15, №1, P.6.
 24. Дубова К.М., **Дубовский П.В.**, Уткин Ю.Н., Самыгина В.Р. (2023). Влияние микрогравитации на кристаллизацию кардиотоксина из яда очковой кобры *Naja naja*. *Кристаллография* 68 (6), 902–906; англ. версия: Dubova K.M., **Dubovskii P.V.**, Utkin Y.N., Samygina V.R. (2024). Effect of Microgravity on the Crystallization of Cardiotoxin from the Venom of Spectacled Cobra *Naja naja*. *Cryst. Rep.* V.68, №6, P.900–904.
 25. Mironov P.A., Baranova A.A., Alferova V.A., Egorova N.S., Ignatova A.A., Feofanov A.V., Shenkarev Z.O., **Dubovskii P.V.** (2025). NMR Unveils Activity Mechanism of Linear Spider Venom Peptide Fragments Selected by Neural Networks Against Staphylococci Including MRSA. *Pharmaceutics*, V.17, №12, P.1526.
- Обзоры:**
26. Konshina A.G., **Dubovskii P.V.**, Efremov R.G. (2012) Structure and dynamics of cardiotoxins. *Curr. Prot. Pept. Sci.* V.13, P.570-584.
 27. **Dubovskii P.V.**, Konshina A.G., Efremov R.G. (2014) Cobra cardiotoxins: membrane interactions and pharmacological potential. *Curr. Med. Chem.* V.21, P.270-287.
 28. **Дубовский П.В.**, Уткин Ю.Н. (2014) Цитотоксины кобр: структурная организация и антибактериальная активность. *Acta Naturae* (русскоязычная версия), Т.6, №3(22), С.12-19; версия на английском языке: **Dubovskii P.V.**, Utkin Y.N., (2014) Cobra cytotoxins: structural organization and antibacterial activity. *Acta Naturae*, V.6, №3(22), P.11-18.
 29. **Dubovskii P.V.**, Utkin Y.N. (2015) Antiproliferative activity of cobra venom cytotoxins. *Curr. Top. Med. Chem.* V.15, P.638-648.

30. **Dubovskii P.V.**, Vassilevski A.A., Kozlov S.A., Feofanov A.V., Grishin E.V., Efremov R.G. (2015) Latarcins: versatile spider venom peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* V.72, P.4501-4522.
31. **Dubovskii P.V.**, Efremov R.G. (2018) The role of hydrophobic/hydrophilic balance in the activity of structurally flexible vs. rigid cytolytic polypeptides and analogues developed on their basis. *Expert Rev. Proteomics*, V.15, №11, P.873-886.
32. **Dubovskii P.V.**, Utkin Y.N. (2024) Specific Amino Acid Residues in the Three Loops of Snake Cytotoxins Determine Their Membrane Activity and Provide a Rationale for a New Classification of These Toxins. *Toxins (Basel)*. V.16, №6, P.262.

Избранные материалы всероссийских и международных конференций

1. Efremov R.G., Volynsky P.E., Polyansky A.A., Aliper E.T., **Dubovskii P.V.**, Arseniev A.S. Binding of membrane-active peptides to lipid bilayers: From modeling of structure and dynamics to understanding the function. Atlanta, Georgia. Abstr. of papers of the American Chemical Society, v.231, Mar. 26, 2006, Meeting Abstr.: 105-PHYS.
2. Лесовой Д.М., Бочаров Э.В., **Дубовский П.В.**, Дубинный М.А., Люкманова Е.Н., Щукин А.В., Уткин Ю.Н., Долгих, Д.А., Арсеньев А.С. «Разные биологические функции общего структурного мотива токсинов яда кобры *Naja oxiana*» VIII Международный Семинар по Магнитному Резонансу (Спектроскопия, Томография и экология), Ростов-на-Дону, Россия, 11-16 сентября 2006, Материалы Семинара, с. 66.
3. **Dubovskii P.V.**, Dubinnyi M.A., Bragina N.A., Chupin V.V., Arseniev A.S. Interaction of bioactive amphipathic molecules with phospholipid liposomes: ³¹P-NMR characterization. *Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter. 4th Meeting "NMR in Life Sciences"* Sankt-Peterburg, 9-13 July 2007. Book of Abstracts, P.62.
4. **Dubovskii P.V.** Latarcins, antimicrobial peptides from spider venom: a variety of the mechanisms of action. EHRlich II –2nd World Conference on Magic Bullets. Celebrating the 100th Anniversary of the Nobel Prize Award to Paul Ehrlich. Nurnberg, October 3-5, 2008, Abstract Book, P.A-82.
5. Lesovoy D.M., Bocharov E.V., **Dubovskii P.V.**, Nolde S.B., Lyukmanova E.N., Utkin Y.N., Dubinnyi M.A., Arseniev A.S. Common molecular scaffold and functional variety of toxins from cobra *Naja oxiana*. International conference on Multidimensional NMR in structural biology, 1-6 August, 2010, Cioco (Lucca), Italy, Book of Abstr., P.24.
6. **Dubovskii P.V.**, Shulepko M.A., Lyukmanova E.N., Chertkova R.V., Astapova M.V., Feofanov A.V., Dolgikh D.A. Cytotoxin I from *N. oxiana* venom: recombinant production, anticancer activity and NMR-characterization. International Workshop “Structure and Function of Biomembranes” 29.09.2014-03.10.2014: Book of Abstracts, P.93-94.

7. **Dubovskii P.V.**, Feofanov A.V., Utkin Y.N., Efremov R.G. Numerical features of the mechanisms of cancer cell death triggered by homologous cationic peptides. 40th FEBS congress “The biochemical basis of life”, July 4-9, 2015, Berlin, Germany, FEBS J. 2015, V.282 (Suppl. 1), P.249-250.
8. **Dubovskii P.V.**, Dubinnyi M.A. Konshina A.G., Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Chertkova R.V., Bocharov E.V., Dolgikh D.A., Utkin Y.N., Efremov R.G. 3D-structure and dynamics of cobra cardiotoxins: NMR and MD analyses. 40th FEBS congress “The biochemical basis of life”, July 4-9, 2015, Berlin, Germany, FEBS J., 2015, V.282 (Suppl. 1), P.330.
9. **Dubovskii P.V.**, Ignatova A.A., Utkin Y.N., Feofanov A.V. Structure-function relationships in cobra cardiotoxins: antibacterial activity. 6th Russian-Korean Conference «Current issues of biologically active compounds: chemistry and biotechnology» MedChem 2015, July 5-10, 2015, Novosibirsk, Russia, Book of abstracts, P.168.
10. Волынский П.Е., Коншина А.Г., **Дубовский П.В.**, Ефремов Р.Г. Взаимодействие кардиотоксинов с липидными мембранами: изучение методами молекулярной динамики. V съезд биофизиков России, 4-10 октября 2015 г. Ростов-на-Дону, Южный федеральный университет, Материалы докладов, том 2, с. 42.
11. Kazakova, E.D., Volynsky, P.E., **Dubovskii, P.V.**, Efremov, R.G. Interaction of cytolytic peptides with lipid membranes: coarse-grained and full-atom MD-studies. International Workshop “Mechanisms of Aging and Age-related Diseases” MIPT, Dolgoprudny, Russia, 26.09.2016-30.09.2016: Book of Abstracts, P.104.
12. Samygina, V.R., Dubova, K.M., Bourenkov, G., **Dubovskii, P.V.**, Utkin, Y.N. X-ray structural study of a novel S-type cardiotoxin (CTX) from *N. naja*. 43rd FEBS congress “Biochemistry forever” Prague, Czech Republic, July 7-12, 2018, FEBS Open Bio, 2018, V.8, P.436.
13. Kazakova, E. D., Kim, A.A., Ignatova, A.A., Ivanov, I.A., Zhmak, M.N., Feofanov, A.V., **Dubovskii, P.V.**, Efremov, R.G. Antibacterial/hemolytic activity of long-length cyto-insectotoxins is gained due to the cumulative effect of its parts. International Conference on Biomembranes “Biomembranes 2018”, MIPT, Dolgoprudny, Russia, 1st-5th October 2018, J. Bioenerg. Biomembr. 2018, V.50, №6, P.548.
14. **Дубовский П.В.**, Коншина А.Г., Ефремов Р.Г. Молекулярная динамика цитотоксинов кобр в высокоподвижной модельной мембране — эффективный инструмент изучения их структурно-функциональных свойств. VII съезд биофизиков России, 17 - 23.04.2023 (г. Краснодар), Сборник научных трудов, том 1, с. 83-84.
15. Миронов П.А., **Дубовский П.В.**, Баранова А.А., Алферова В.А., Шенкарев З.О. Нейросетевой скрининг и структурно-функциональное исследование линейных пептидов из яда паука с активностью против метициллинрезистентного золотистого стафилококка. XII Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов, молекулярных биологов и специалистов

фундаментальной медицины — сб. тез. АНО «Инновационный центр Кольцово». — Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2025 — с. 348-349.

16. Миронов П.А., Дубовский П.В., Баранова А.А., Алферова В.А., Егорова Н.С., Игнатова А.А., Феофанов А.В., Шенкарев З.О. Антимикробные пептиды на основе линейных пептидов из яда паука: взаимодействие с модельными липидными мембранами и клетками. Сборник тезисов докладов школы-конференции «Инженерия живых систем – достижения и перспективы» к 25-летию кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. — Москва: МГУ, 2025 — с. 95.

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

АМП – антимикробные пептиды	3D – трёхмерный (пространственный)
ДФХ – додецилфосфохолин	CBF – карбофлуоросцеин
КД – круговой дихроизм	CSA – анизотропия химического сдвига (на ядре ³¹ P)
КТ – кардиотоксин (цитотоксин)	CT1No, CTI – цитотоксин 1 из яда <i>N. oxiana</i> (также КТ O1)
ЛП – линейный пептид	CT2No, CTII – цитотоксин 2 из яда <i>N. oxiana</i> (также КТ O2)
ЛМАП - линейный мембрано-активный полипептид	DOPC – 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин
МАТ – мембраноактивный токсин	DOPE – 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
МГП – молекулярный гидрофобный потенциал	DOPG – 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфо-(1'-гас-глицерин)
МД – молекулярная динамика	EC50 – концентрация токсина вызывающая гибель 50% клеток
МК – Монте-Карло	LPPG – 1-пальмитоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфатидилглицерин
РСА – Рентгено-Структурный Анализ	Ltc1 – латарцин 1
ТПТ – трёх-петельные токсины	Ltc2a – латарцин 2a
а.к.п. – аминокислотная последовательность	MIC – минимальная ингибирующая концентрация
а.о. – аминокислотный остаток	MRSA – метициллин-резистентный <i>S. aureus</i>
инв. – инверсия	MSSA – метициллин-чувствительный <i>S. aureus</i>
м.д. – миллионные доли	PE – фосфатидилэтаноламин
	PG – фосфатидилглицерин
	PLA2 – фосфолипаза A2
	SDS – додецилсульфат натрия
	rCTX1 – рекомбинантный CT1No