

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.55

ВЛИЯНИЕ МИКРОГРАВИТАЦИИ НА КРИСТАЛЛИЗАЦИЮ
КАРДИОТОКСИНА ИЗ ЯДА ОЧКОВОЙ КОБРЫ *Naja naja*© 2023 г. К. М. Дубова^{1,2}, П. В. Дубовский³, Ю. Н. Уткин³, В. Р. Самыгина^{1,2,*}¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия²Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

*E-mail: lera@crys.ras.ru

Поступила в редакцию 07.07.2023 г.

После доработки 31.08.2023 г.

Принята к публикации 31.08.2023 г.

Кардиотоксины, относящиеся к семейству трехпетельных токсинов, — основные компоненты яда кобр, проявляющие различные виды биологической активности, включая антимикробную и цитотоксическую, в отношении раковых клеток. Данные о минимальных структурных различиях индивидуальных токсинов необходимы для понимания молекулярных механизмов их действия. Такая информация может быть получена методом рентгеноструктурного анализа высокого разрешения. Исследованы влияние микрогравитации на кристаллическую упаковку и дифракционное качество кристаллов кардиотоксина кобры *Naja naja*. При кристаллизации на Международной космической станции получены кристаллы, позволяющие получить максимально высокое разрешение для структуры данного токсина. Белок кристаллизовался исключительно в гексагональной пространственной группе, тогда как больше половины кристаллов, полученных в лабораторных условиях, принадлежало к ромбической сингонии.

DOI: 10.31857/S0023476123600465, EDN: HZBNYG

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время неуклонно растет интерес к мембраноактивным полипептидным токсинам из ядов змей и насекомых. Такие токсины обладают антимикробной и цитотоксической активностью в отношении раковых клеток и поэтому привлекают как основа для создания новых лекарственных соединений [1]. Мишенью действия этих токсинов является плазматическая мембрана бактериальных и раковых клеток, что значительно затрудняет выработку у таких клеток устойчивости к ним. Для рационального конструирования новых антибиотиков и цитостатиков необходимы данные о структуре самих токсинов в водной, модельной мембранной среде и кристалле. Если для токсинов из яда пауков и насекомых в этом направлении сделано довольно много, то для кардиотоксинов из яда кобр имеющейся информации явно не достаточно [2]. Это определяется структурными особенностями рассматриваемых токсинов. Токсины из яда пауков и насекомых, как правило, разупорядочены в водном растворе, а при взаимодействии с мембраной формируют α -спирали и/или их комбинации. Кардиотоксины представляют собой низкомолекулярные (6.5–7 кДа), высокоосновные (pI 8–10)

белки. Этот класс токсинов встречается в ядах змей рода *Naja* (настоящие кобры) [3] и монотипического рода *Hemachatus* (ошейниковая кобра) [4]. Кардиотоксины — наиболее распространенные компоненты яда кобр, относятся к семейству трехпетельных токсинов, одному из основных семейств токсинов змей [5]. Трехпетельная структура кардиотоксинов сформирована полипептидной цепью, уложенной в три петли, выходящие из небольшой глобулярной части. Петля I включает в себя остатки от 1 до 15, петля II — от 20 до 39, петля III — от 44 до 54, а остальные аминокислоты составляют глобулярную часть (рис. 1). Концы петель I–III содержат в основном гидрофобные остатки, придающие молекуле амфифильные свойства: гидрофобная область петель I–III окружена поясом заряженных остатков, в основном лизинов [6]. Вторичная структура кардиотоксина представляет собой пять антипараллельных β -листов, которые выстраиваются в двухцепочечный домен (состоящий из листов I и II) и трехцепочечный домен (состоящий из листов III, IV и V) [7]. Консервативными элементами в их пространственной структуре являются четыре дисульфидные связи и восемь формирующих их остатков цистеина [5].

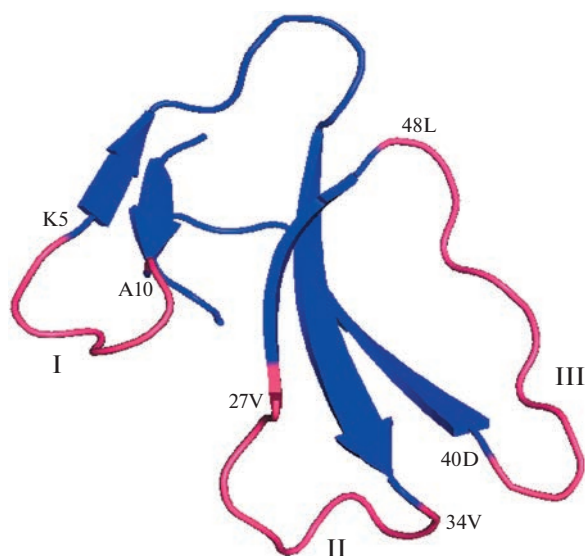


Рис. 1. Общая структура трехпетельного токсина (pdb 7QFC).

На основании различия связывания с фосфолипидами кардиотоксины разделены на Р- и S-типы [8]. Они имеют консервативные остатки пролина и серина в положениях 30 и 28 в первичной структуре соответственно, т.е. в оконечности второй петли молекулы. Если в окончании петли I кардиотоксинов присутствует только один остаток пролина (Pro-8), то оба типа взаимодействуют с анионными фосфолипидами, Р-тип проявляет активность также к цвиттер-ионным фосфолипидам [9]. Структура кардиотоксина S-типа СТ13 из *Naja naja* (СТ13Nn) определена [10] в двух кристаллических формах, орторомбической и гексагональной. Сравнительный анализ этих структур позволил установить важные конформационные особенности функциональных петель I и II токсина СТ13Nn [10]. Благодаря этим двум структурам удалось впервые выявить в кристалле конфигурацию петли II в так называемой мембранно-связанной форме. Исследованная гексагональная кристаллическая форма получена в условиях микрогравитации [10].

Ранее было показано, что кристаллизация в условиях микрогравитации может приводить к изменению кристаллической упаковки белков в кристаллах [11–13], увеличению размеров кристаллов, уменьшению мозаичности и в ряде случаев повышению разрешения [14, 15], что важно для точности структурного анализа. В настоящей работе показано, что микрогравитация улучшает дифракционное качество и влияет на кристаллическую упаковку кристаллов СТ13Nn.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и кристаллизация кардиотоксина. Токсин выделен из яда кобры *Naja naja* и очищен, как описано в [10]. Подбор условий кристаллизации токсина проводили методом диффузии в парах в варианте сидячей капли. Капли получали смешиванием 1 мкл белка (10 мг/мл) с 1 мкл резервуарного раствора. Объем резервуарного раствора составлял 120 мкл. Для поиска условий использовали кристаллизационные наборы Crystal Screen HR2-110, Crystal Screen HR2-112 (Hampton Research, США). Для скрининга использовали планшеты Intelli-Plate 48-3 (Hampton Research, США). Начальные условия оптимизировали путем варьирования добавок, pH, природы буфера. Наилучшие кристаллы были получены в 1.7 М хлориде натрия, 0.1 М дигидрофосфате натрия, 0.1 М дигидрофосфате калия в 0.1 М MES, pH 5.5, в течение 2–3 дней при комнатной температуре.

Затем найденные условия оптимизировали и адаптировали к методу встречной диффузии [16] путем варьирования концентраций белка и осадителя. Оптимизация при переходе к методу встречной диффузии заключалась в повышении концентрации белка до 15 мг/мл. Кристаллы были выращены в невесомости в стеклянных капиллярах с внутренним диаметром 0.5 мм в ходе российско-японского эксперимента с использованием оборудования PCRf [16–18] японского аэрокосмического агентства JAXA на борту Международной космической станции (МКС) с использованием российских космических кораблей.

Сбор и анализ дифракционных данных, анализ наборов данных, кристаллической упаковки. Сбор дифракционных данных проводили на синхротроне SPring-8, станция BLXU40 и Petra III, станция P14 Германия. Данные обрабатывали с использованием программ XDS [19] и Aimless [20]. Сбор данных проводили при 100 К, кристаллы предварительно вымачивали в крио-растворе, содержащем компоненты соответствующего кристаллизационного раствора и 20% глицерина. Анализ кристаллической упаковки провели с помощью программ CCP4 [21] и PyMol [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кристаллы токсина СТ13Nn были выращены в лаборатории методами диффузии в парах и встречной диффузии и на МКС методом встречной диффузии до размера 0.1 мм (рис. 2). Увеличить размер кристаллов и снизить их количество не удалось путем варьирования концентрации осадителя. Таким образом, размеры кристаллов, выращенных на земле и в условиях микрогравитации, не отличались. Для кристаллов СТ13Nn получены две кристаллические формы. В отличие

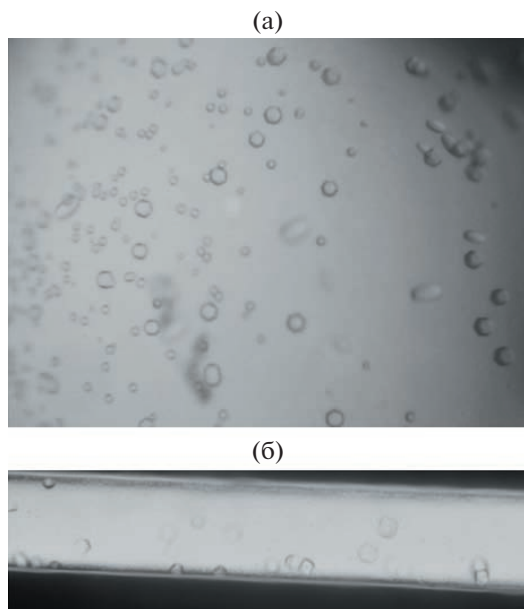


Рис. 2. Кристаллы кардиотоксина S-типа из яда *Naja naja* в кристаллизационной капле (а) и капилляре (б), выращенные в условиях микрогравитации.

от множества кристаллографических исследований гомологичных кардиотоксинов, которые были закристаллизованы с одной полипептидной цепью в независимой части, кристаллы СТ13Np получены в пр. гр. $P6_422$ с тремя субъединицами в независимой части и в пр. гр. $C222_1$ с шестью субъединицами в независимой части [10]. Кристаллические упаковки показаны на рис. 3.

Анализ показал, что все кристаллы, полученные в условиях микрогравитации, принадлежат к

гексагональной пространственной группе. Кристаллическая орторомбическая форма была получена только для кристаллов, выращенных на Земле в четырех случаях, как методом диффузии в парах, так и методом встречной диффузии. Анализировали пространственное разрешение, до которого рассеивали кристаллы, параметры ячейки и мозаичность. Критерием предела разрешения являлось значение $I/\sigma(I)$ не менее 1.5. Дифракционное качество кристаллов, выращенных в условиях микрогравитации, было выше, чем для кристаллов, полученных на Земле. Некоторые исследователи связывают более низкое содержание растворителя в ячейке с более высоким разрешением. Содержание растворителя составляло 65.36% (коэффициент Мэттьюса $3.55 \text{ \AA}^3/\text{Да}$) для орторомбической пространственной группы и 78.97% (коэффициент Мэттьюса $5.84 \text{ \AA}^3/\text{Да}$) для гексагональной. Таким образом, в данном случае гексагональная форма имеет более высокое разрешение, несмотря на более высокое содержание растворителя. Вместе с тем более высокое содержание растворителя в ячейке часто встречается при высокой симметрии [23].

Для сравнения дифракционного качества кристаллов, выращенных на Земле и на МКС, протестировали семь кристаллов, выращенных методом встречной диффузии или диффузией в парах в лабораторных условиях, и пять кристаллов, выращенных методом встречной диффузии на МКС (табл. 1).

Анализ показал, что обе формы имеют низкую мозаичность. Гексагональная форма образуется как в наземных условиях, так и в условиях микрогравитации. Случаев кристаллизации кардиотоксина СТ13Nh в условиях микрогравитации в ор-

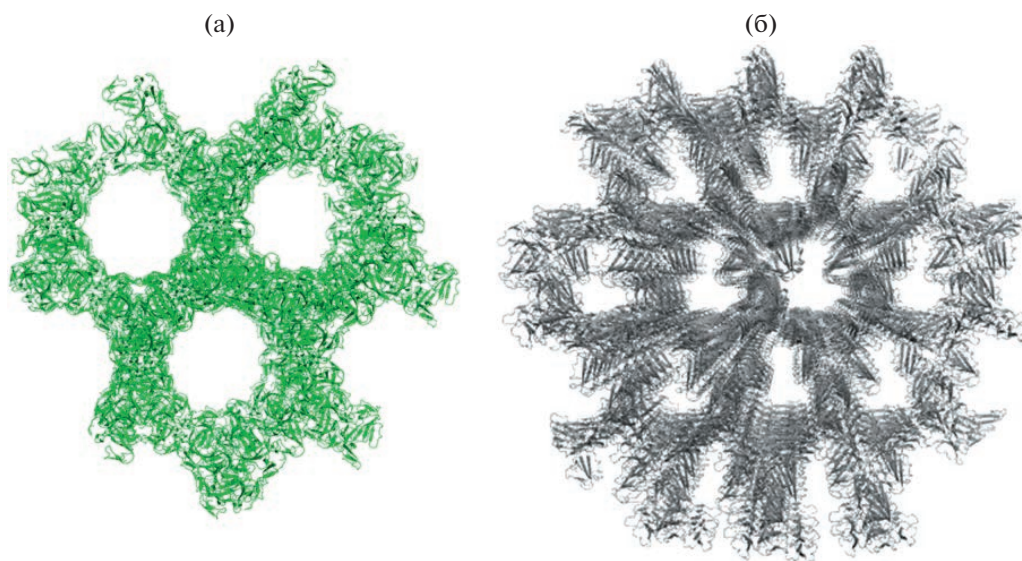


Рис. 3. Кристаллическая упаковка молекул CN13Np: а — гексагональная, б — орторомбическая.

Таблица 1. Характеристики кристаллов СТ13Nn

Пр. гр.	Разрешение, Å	<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , Å	Мозаичность, град	<i>I</i> /sig(<i>I</i>)	Метод кристаллизации
<i>C</i> 222 ₁	2.6	86.68, 96.86, 130.37	0.1	1.6	1
<i>C</i> 222 ₁	2.6	88.76, 97.17, 132.12	0.09	1.8**	2
<i>C</i> 222 ₁	2.76	88.74, 97.09, 131.64	0.07	1.73	2
<i>C</i> 222 ₁	2.65	88.79, 97.19, 131.73	0.1	1.5	2
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.6	109.41, 109.41, 135.86	0.19	1.5	2
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.6	109.36, 109.36, 135.86	0.2	1.7	1
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.73	109.35, 109.35, 135.79	0.18	1.8	1
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.3	109.33, 109.33, 135.77	0.12	2.3**	2*
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.3	109.35, 109.35, 135.69	0.14	2.0	2*
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.35	109.36, 109.36, 135.81	0.13	2.1	2*
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.4	109.34, 109.34, 135.73	0.15	1.9	2*
<i>P</i> 6 ₄ 22	2.45	109.30, 109.30, 135.81	0.17	1.96	2*

Примечание. Метод кристаллизации: 1 — диффузия в парах, 2 — встречная диффузия; * — кристаллы выращены на МКС.

** Кристаллы, с использованием которых были решены пространственные структуры в [10].

торомбической пространственной группе не обнаружено. Дифракционное качество кристаллов выше при использовании микрогравитации.

Случаи влияния микрогравитации на кристаллическую упаковку и дифракционное качество кристаллов описаны в литературе. В основном происходят уменьшение параметров ячейки и повышение разрешения [18]. Для формиатдегидрогиназы из *Arabidopsis thaliana* было установлено, что кристаллы, полученные на земле методом диффузии в парах, принадлежали к пр. гр. *P*2₁2₁2 и рассеивали до разрешения 1.7 Å (pdb code 3NAQ) [24], тогда как кристаллы, выращенные на МКС методом свободной диффузии, относились к тетрагональной сингонии и дифрагировали до 1.22 Å (pdb code 3JTM) [12]. Использование микрогравитации для кристаллизации позволило улучшить разрешение для таких белков, как фактор ингибирования миграции макрофагов, уридинфосфоорилаза, простагландин D синтеза и T1 липаза, до атомного или околоатомного разрешения [15, 25–27].

В настоящей работе показано, что в условиях микрогравитации кардиотоксин СТ13Nn кристаллизуется в более высокосимметричной кристаллической форме и образует кристаллы, рассеивающие до более высокого разрешения. От пространственного разрешения зависит детальность и точность результатов анализа структур. Таким образом, в случае кардиотоксина использование микрогравитации является предпочтительным для получения высококачественных кристаллов.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН (в части анализа дифракционного качества

кристаллов) и в рамках Федеральной космической программы 2016–2025 гг. (ОКР “МКС (Наука)” (в части кристаллизации кардиотоксина).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khalil A., Elesawy B.H., Ali T.M. et al. // *Molecules*. 2021. V. 26. P. 4941. <https://doi.org/10.3390/molecules26164941>
2. Dubovskii P.V., Efremov R.G. // *Expert Rev. Proteomics*. 2018. V. 15. P. 873. <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1537786>
3. Kalita B., Utkin Y.N., Mukherjee A.K. // *Toxins (Basel)*. 2022. V. 14. P. 839. <https://doi.org/10.3390/toxins14120839>
4. Joubert F.J. // *Eur. J. Biochem.* 1977. V. 74. P. 387. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11403.x>
5. Gayatri S., Gorai B., Sivaraman T. // *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2016. V. 7. P. 936.
6. Konshina A.G., Dubovskii P.V., Efremov R.G. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2012. V. 13 (6). P. 570.
7. Дубовский П.В., Уткин Ю.Н. // *Acta Naturae*. 2014. Т. 6. № 3. С. 12.
8. Chien K.Y., Chiang C.M., Hseu Y.C. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 14473.
9. Dubovskii P.V., Ignatova A.A., Alekseeva A.S. // *Toxins*. 2022. V. 15. P. 6. <https://doi.org/10.3390/toxins15010006>
10. Dubovskii P.V., Dubova K.M., Bourenkov G. et al. // *Toxins*. 2022. V. 14. P. 149. <https://doi.org/10.3390/toxins14020149>
11. Luna A., Meisel J., Hsu K. et al. // *NPJ Microgravity*. 2020. V. 6. P. 12. <https://doi.org/10.1038/s41526-020-0102-3>
12. Shabalin I.G., Serov A.E., Skirgello O.E. et al. // *Crytallography Reports*. 2010. V. 55 P. 806. <https://doi.org/10.1134/S1063774510050159>

13. *Timofeev V., Samygina V.* // Crystals. 2022. V. 13. P. 71. <https://doi.org/10.3390/cryst13010071>
14. *Esposito L., Sica F., Sorrentino G. et al.* // Acta Cryst. D. 1998. V. 54. P. 386. <https://doi.org/10.1107/s0907444997011992>
15. *Dubova K.M., Sokolov A.V., Gorbunov N.P. et al.* // Crystallography Reports. 2018. V. 63. P. 951. <https://doi.org/10.1134/S1063774518060111>
16. *Tanaka H., Inaka K., Sughiyama Sh.* // J. Synchrotron Rad. 2004. V. 11. P. 45. <https://doi.org/10.1107/S0909049503023446>
17. *Takahashi S., Tsurumura T., Aritake K. et al.* // Acta Cryst. F. 2010. V. 66. P. 846. <https://doi.org/10.1107/S1744309110020828>
18. *Boyko K.M., Timofeev V.I., Samygina V.R. et al.* // Crystallography Reports. 2016. V. 61. № 5. P. 718. <https://doi.org/10.1134/S1063774516050059>
19. *Kabsch W.* // Acta Cryst. D. 2010. V. 66. P. 133. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047374>
20. *Evans P.R., Murshudov G.N.* // Acta Cryst. D. 2013. V. 69. P. 1204. <https://doi.org/10.1107/S0907444913000061>
21. *Agirre J., Atanasova M., Bagdonas H. et al.* // Acta Cryst. D. 2023. V. 79. P. 449. <https://doi.org/10.1107/S2059798323003595>
22. *Schrödinger L., DeLano W.* 2020. PyMOL. <http://www.pymol.org/pymol>
23. *Chruszcz M., Potrzebowski W., Zimmerman M.D. et al.* // Protein Sci. 2008. V. 17. P. 623. <http://www.protein-science.org/cgi/doi/10.1110/ps.073360508>
24. *Shabalin I.G., Tikhonova T.V., Polyakov K.M. et al.* // EMBL Annual. 2007. Rep. 2. P. 109.
25. *Eistrikh-Heller P.A., Rubinsky S.V., Samygina V.R. et al.* // Crystallography Reports. 2021. V. 66. P. 777. <https://doi.org/10.1134/S1063774521050059>
26. *Inaka K., Takahashi S., Aritake K. et al.* // Cryst. Growth Des. 2011. V. 11. P. 2107. <https://doi.org/10.1021/cg101370v>
27. *Rahman R.N., Ali M.S., Leow T.C. et al.* // Gravitation- al and Space Biology. 2010. V. 23. P. 89.