



На правах рукописи

Можаева Вера Александровна

**Методы спектроскопии комбинационного рассеяния света
для идентификации белковых токсинов**

Специальность: 1.3.19. Лазерная физика

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральном исследовательском центре «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук» (ИОФ РАН) и Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Научный руководитель: **Гарнов Сергей Владимирович**
член-корреспондент РАН, доктор физико-математических наук,
директор ИОФ РАН

Официальные оппоненты: **Пеньков Никита Викторович**
доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный
центр биологических исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)

Ширшин Евгений Александрович
доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова» (МГУ)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский педагогический государственный университет» (МПГУ)

Защита состоится 10 июня 2024 года в 16:00
на заседании диссертационного совета 24.1.223.03 при ИОФ РАН по адресу:
г. Москва, ул. Вавилова, д. 38, корп. 1, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИОФ РАН <https://diss.gpi.ru/all>

Автореферат разослан _____ 2024 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета 24.1.223.03
кандидат физико-математических наук

Осадчий Александр Валентинович

1. Общая характеристика работы

Рамановская спектроскопия (РС) или спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света – относительно простая и удобная, и в то же время крайне информативная методика неразрушающего исследования вещества с помощью лазерного излучения. Ее применение к органической материи позволяет исследовать вопросы биологии и медицины.

РС позволяет получать информацию о частотах колебаний атомов или их групп в молекуле. Эти частоты отражают как состав молекулы, так и внутри- и внемолекулярные силы, которые содержат информацию о структуре, конформации, а также окружении молекулы. РС сочетает такие преимущества, как простота пробоподготовки, быстрота, информативность и экономичность. Она может быть крайне полезна в токсикологии, так как потенциально способна обеспечить получение уникальной информации о структурах белков [1], в частности, токсинов [2], а также о составе многокомпонентных смесей биомолекул (например, [3]), коими являются животные яды.

Актуальность темы исследования

Компоненты яда – токсины – крайне разнообразные и удивительные биологические молекулы со сложной структурой, часто включающей несколько дисульфидных связей [4]. Белковые и пептидные токсины интересны, в первую очередь, уникальными эффектами, которые они способны оказывать на организм, в частности, млекопитающих. В процессе длительной эволюции структуры этих биомолекул были оптимизированы для оказания определенных биологических эффектов. Некоторые животные токсины уже используются в качестве лекарств [5], многие рассматриваются как многообещающие кандидаты на эту роль [6, 7, 8]. В частности, в качестве мышечных релаксантов и как средство для лечения мышечной дистонии могут рассматриваться определенные токсины из ядов змей, являющиеся ингибиторами никотинового ацетилхолинового рецептора мышечного типа [9].

Таким образом, исследование токсинов методами лазерной спектроскопии – путь к новым эффективным, действующим на определенную цель, лекарственным веществам. Определение конкретных структурных мотивов в токсинах, за счет которых реализуется их биологическое действие, дает возможность последующего искусственного синтеза молекулы, содержащей данный мотив. Высокая избирательность (селективность) к цели (например, конкретному рецептору или ионному каналу) и скорость взаимодействия многих токсинов делает их не только многообещающими кандидатами в лекарственные препараты, но и полезными инструментами в биологии, которые позволяют идентифицировать различные

ионные каналы [10]. Также на основе разных функциональных мишеней различных токсинов, можно разработать ряд систем тканеселективной доставки [11].

Существующие методы анализа белковых структур, такие как рентгеноструктурный анализ и спектроскопия ядерного магнитного резонанса, трудоемки и времязатратны, а также требуют наличия относительно большого количества природных токсинов ядовитых животных. Помимо исследования нативных структур природных токсинов, важной задачей является валидация структур и конформаций их искусственно-синтезированных аналогов. Отсюда следует актуальность разработки подходов на базе РС анализа структур и конформаций природных и искусственных токсинов.

Задача же определения составов змеиных ядов и их меж- и внутривидовых вариаций, например, методами лазерной спектроскопии, непосредственно связана с разработкой и выбором противоядия для жертв укусов [12]. Змеиные укусы все еще являются причиной множества смертей. Всемирная организация здравоохранения поставила цель сократить вдвое смертность от укусов змей к 2030 году. В 2019 году от змеиных укусов во всем мире умерло более 63000 человек. Наибольшее бремя легло на Южную Азию. Доступность компактных рамановских спектрометров [13] делает возможным проведение полевых исследований, что важно для работы в развивающихся странах, где смертность от укусов змей достаточно высока, а лабораторный анализ зачастую не доступен.

Для изучения состава ядов в настоящее время используются методы, основанные на хроматографическом разделении и масс-спектрометрическом анализе, которые требуют пробоподготовки и применения сложного оборудования [14]. РС может послужить дополнением к этим методам. Комбинация этой спектроскопии с математическими методами понижения размерности (например, методом главных компонент) и кластеризации может упростить, ускорить и оптимизировать получение полезной информации об образцах (см., например, [15, 16]).

Степень разработанности темы исследования

РС является перспективным инструментом для решения ряда актуальных задач токсикологии. Возможности спектроскопии КР в этой области ранее были реализованы далеко не в полной мере. Так, КР спектры отдельных токсинов были проанализированы в предыдущих исследованиях, но отсутствовала методика, в частности, на основе РС, которая позволяла бы анализировать и сравнивать структуры большого количества токсинов. Разнообразие же последних крайне велико, и многие токсины и их структуры остаются не исследованы. Цельные же яды в предыдущих работах других авторов методом РС практически не исследовались, несмотря на перспективность использования этого метода.

Цели и задачи исследования

Исходя из обозначенного выше, в данной работе были поставлены следующие цели:

- разработка метода структурного анализа белковых и пептидных токсинов животных на основе спектроскопии КР;
- разработка метода анализа и оценки состава цельных змеиных ядов на основе спектроскопии КР.

Для достижения данных целей были поставлены следующие задачи:

- подбор оптимальных условий и приборных параметров снятия спектров КР и запись информативных спектров образцов животных токсинов и цельных ядов змей;
- обработка полученных спектральных данных для извлечения информации о белковой структуре или белковом составе (в случае яда) образцов;
- интерпретация и валидация полученных данных о структуре или составе образцов.

Научная новизна

В ходе выполнения работы, нами впервые получены и проанализированы спектры КР конотоксинов и некоторых других токсинов животных; впервые предложена и применена методика, основанная на РС (совмещенной с методами главных компонент и кластеризации), классификации белковых и пептидных токсинов животных в соответствии с их структурными особенностями. Кроме того, впервые продемонстрирована возможность различения дисульфидных изомеров конотоксинов с помощью РС, а также сравнения структур крайне схожих по аминокислотной последовательности токсинов и белков, подобных токсинам.

Далее, впервые были получены и проанализированы спектры КР цельных ядов различных видов змей; впервые предложена новая методика (основанная на РС, совмещенной с методами главных компонент и кластеризации) анализа и классификации цельных ядов змей в соответствии с родом или семейством змеи. Новым является демонстрация полезности спектроскопии КР для оценки составов ядов.

На основе предложенной методики нами впервые проведены анализ ядов отдельных особей гадюки Никольского, оценка внутривидовых (меж- и внутрипопуляционных) вариаций их ядов, а также сравнение этих вариаций с межвидовыми.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе результаты могут быть полезны как для теоретической (фундаментальной) науки, так и для прикладных разработок. Предлагаемый метод, на основе

РС и математических методов обработки спектров, отличается крайне небольшим расходом сухих образцов и может помочь в изучении токсинов и ядов редких и/или находящихся под угрозой исчезновения животных (их отдельных особей).

Можно говорить об этом методе как о дополнительном инструменте экспресс-анализа новых токсинов с целью выявления структурно-схожих и потенциально наиболее перспективных кандидатов на роль лекарств. В то же время, продемонстрированная способность метода различать конфигурации дисульфидных связей позволит обеспечить синтез правильного, аналогичного нативному, изомера токсина. Также продемонстрированная возможность видеть тонкие структурные различия токсинов и им подобных белков может быть полезна при изучении, в частности, влияния аминокислотных замен (в том числе единичных) на белковые структуры. Подобные замены часто вносятся в белки и пептиды при разработке препаратов на их основе с целью оптимизации лекарственных свойств.

Анализ составов ядов змей может быть полезен, в первую очередь, при разработке эффективных противоядий. Предложенный способ спектроскопического исследования ядов – первый шаг в разработке новых методов диагностики жертв укусов методами медицинской оптики, учитывающих тонкие особенности составов ядов, обусловленные меж- и внутривидовыми вариациями ядов. Кроме того, существует также криминалистическая задача определения вида змеи или места ее обитания (места отлова) путем анализа состава яда в связи с проблемой нелегальной перевозки и торговли ядами.

Помимо практической значимости, описанная методика может быть востребована в эволюционной биологии и биологической систематике. В частности, установление вариаций ядов змей может пролить свет на процесс видообразования и эволюции [17].

Методология и методы исследования

Основные результаты работы были получены с использованием спектроскопии КР и методов математической обработки данных. Последние включали в себя следующие основные методики: метод главных компонент (МГК), k-means кластеризацию, анализ дискриминантных функций (discriminant function analysis, DFA).

Экспериментальная часть работы включала в себя подготовку образцов, если последние предоставлялись в виде растворов (в данном случае образцы высушивались на воздухе), и регистрацию спектров КР. Спектры получали с сухих образцов. Токсины и яды были любезно предоставлены коллегами из Института биоорганической химии РАН. Запись спектров КР выполнялась на рамановском микроскопе Bruker Senterra II с использованием лазера с длиной волны 532 нм. Частью экспериментальной работы также являлся поиск оптимальных условий записи спектров образцов.

Перед интерпретацией спектров КР или применением к ним МГК спектральные данные преобразовывались с целью унификации спектров.

Положения, выносимые на защиту

1. Спектроскопия КР в сочетании с МГК позволяет проводить группировку белковых токсинов животных в соответствии с их 3D-структурой;
2. Спектроскопия КР позволяет различать дисульфидные изомеры конотоксинов;
3. Спектроскопия КР в сочетании с МГК позволяет проводить группировку цельных змеиных ядов в соответствии с их составом;
4. Спектроскопия КР ядов змей в сочетании с МГК и анализом дискриминантных функций позволяет различать семейства соответствующих змей;
5. Спектроскопия КР в сочетании с МГК позволяет оценивать внутривидовые вариации яда отдельных особей змей и составы яда отдельных особей.

Личное участие автора

Автор лично получал спектры КР образцов, обрабатывал и интерпретировал данные; ставил основные цели и задачи, готовил материалы к публикациям совместно с соавторами. Доклады на конференциях были сделаны лично автором.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается за счет использования современной и качественной приборной базы, а также воспроизводимостью экспериментальных данных. Материалы, изложенные в диссертации, представлялись на 6 докладах лично автором. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в базы Web of Science и Scopus.

Тезисы докладов

1. «Классификация белковых (пептидных) лигандов никотиновых ацетилхолиновых рецепторов с использованием рамановской спектроскопии и РСА» // Школа-конференция молодых ученых «Прохоровские недели» (19–21 октября 2021 г., ИОФ РАН), устный доклад;
2. «Классификация токсинов из животных ядов посредством рамановской спектроскопии и метода главных компонент» // XXXIV международная зимняя молодёжная научная школа (8–11 февраля 2022 г., ИБХ РАН), устный доклад;
3. «Анализ изомеров пептидных токсинов с помощью рамановской спектроскопии и метода главных компонент» // IX Всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции» (20–22 апреля 2022 г., ФИЦ ХФ РАН), устный доклад;

4. «Raman spectroscopy as a tool for animal toxins investigation», 21st World Congress of the International Society on Toxinology (16–20 октября 2022 г.), стендовый доклад;
5. «Классификация змеиных ядов с помощью рамановской спектроскопии», XIV Всероссийская школа по лазерной физике и лазерным технологиям (18–22 сентября 2023 г., Национальный центр физики и математики), стендовый доклад;
6. «Классификация змеиных ядов на основе рамановской спектроскопии», Школа-конференция молодых ученых ИОФ РАН «Прохоровские недели» (24–26 октября 2023 г.), устный доклад.

2. Основное содержание работы

Введение содержит общие сведения по тематике диссертационного исследования, актуальности и степени разработанности темы; сказано о мотивации к исследованию, его целях и задачах, а также о научной новизне; подчеркивается теоретическая и практическая значимость работы. Кроме того, кратко описана методология исследования; обозначены положения, выносимые на защиту. Также обозначена степень достоверности результатов и представлена их апробация.

В **главе 1 «Обзор литературы»** рассмотрены наиболее важные с точки зрения темы диссертации литературные и опытные данные, касающиеся прикладных и теоретических аспектов метода РС применительно к исследованию белковых молекул. Проведено сравнение этого метода с альтернативными, а также описан ряд математических методик (таких как МГК и методы кластеризации) обработки соответствующих спектральных данных. Приведены примеры применения МГК к данным РС. Дополнительно подробно рассмотрены некоторые животные токсины и яды, и примеры их анализа методом РС. В общем, в данной главе произведена попытка доказать оправданность и перспективность применения используемой в работе методики на основе РС к ряду токсикологических задач.

В **разделе 1.1** даны общие сведения, касающиеся использования метода РС для исследования белковых молекул, обсуждаются методические вопросы; описаны особенности спектров КР белков (Рисунок 1); дополнительно обсуждается поверхностно-усиленная РС (SERS). В **разделе 1.2** представлены характеристики других основных методов (альтернативных РС) определения структуры белков. В **разделе 1.3** обсуждаются белковые животные токсины и яды змей, а также существующие в литературе примеры применения РС

для исследования токсинов. В разделе 1.4 даны общие сведения о МГК и некоторых методах кластеризации, а также приведены примеры работ по применению МГК к данным РС.

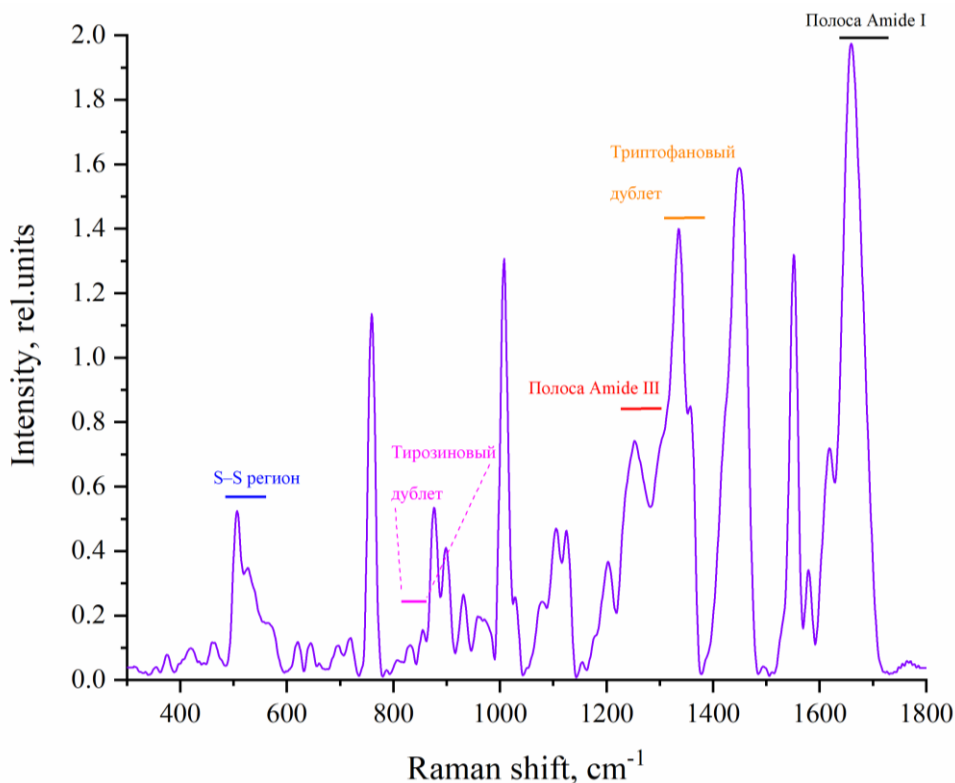


Рисунок 1 – Типичный спектр КР белка (лизоцима куриного яйца) с отмеченными маркерными регионами. Подписи осей (здесь и далее для спектров КР) соответствуют следующим русскоязычным обозначениям: ось абсцисс – Рамановский сдвиг, см⁻¹ (Raman shift, cm⁻¹); ось ординат – Интенсивность, отн.ед. (Intensity, rel.units).

В главе 2 «Классификация спектров КР токсинов с помощью МГК» описана методика, основанная на РС и МГК, классификации и анализа белковых и пептидных токсинов из ядов животных, включая их синтетические аналоги и дисульфидные изомеры.

Спектры КР были записаны с сухих образцов токсинов змей (Ctx, NT2 и Az) и конотоксинов из моллюсков рода *Conus* и их аналогов (SIA, K-SIA, MI, MII, L-PnIA и RL-PnIA) с помощью рамановского микроскопа, оснащенного лазером с длиной волны 532 нм. После предобработки полученных спектров КР в диапазоне 300–1800 см⁻¹ с целью их унификации, они были подвергнуты анализу МГК. Полученный график ГК показан на рисунке 2. На основании полученных данных можно достоверно разделить наши образцы на три группы, отмеченные на графике разными цветами, которые соответствуют трем различным типам организации пространственной структуры токсинов: 1) змеиные токсины Ctx и NT2 – белки с трехпетельной структурой, 2) α-конотоксины морских моллюсков – пептиды с двумя дисульфидными мостиками и 3)

змеиный пептид Az без дисульфидных связей. Достоверность такого разделения подтверждается иерархическим кластерным анализом.

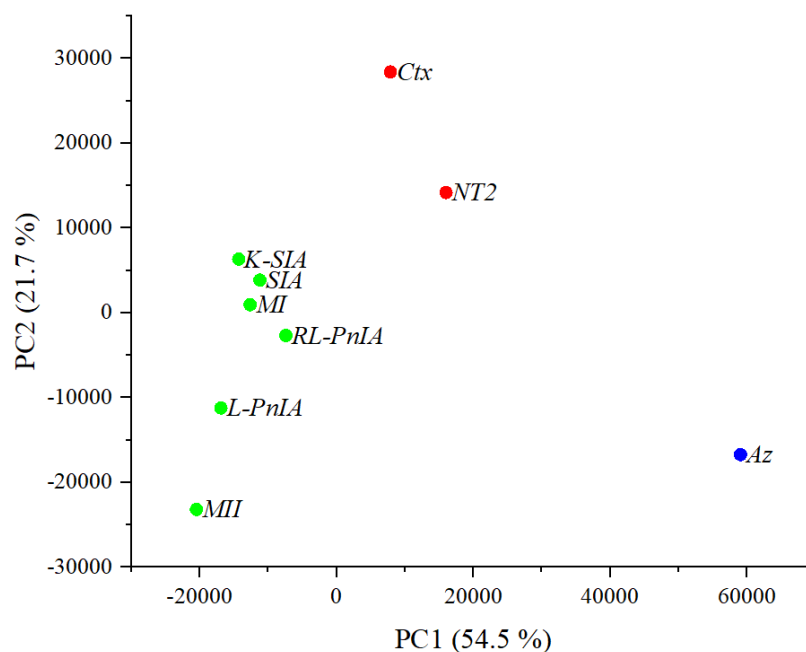


Рисунок 2 – График МГК, полученный после анализа предобработанных спектров в диапазоне 300–1800 cm^{-1} . В скобках указан процент объясненной дисперсии. Подписи осей PC1 и PC2 соответствуют русскоязычным обозначениям ГК1 и ГК2 (здесь и далее для графиков ГК).

Мы также применили МГК к спектрам токсинов в диапазоне от 1640 до 1730 cm^{-1} для получения более конкретной информации об их вторичной структуре. В этот диапазон частично входит полоса Amide I (1600–1690 cm^{-1}), которую используют для выявления наличия α -спиралей, β -слоев и нерегулярных структур в белках. Обычно, для анализа вклада элементов вторичной структуры используется фитинг полосы Amide I. В качестве альтернативы, для одновременного анализа всех образцов, мы применили МГК к (предварительно нормированному) диапазону 1640–1730 cm^{-1} их спектров, содержащему полосу Amide I. Далее, для объективного разделения образцов на группы, была использована k-means кластеризация. Результаты МГК и кластеризации показаны на рисунке 3.

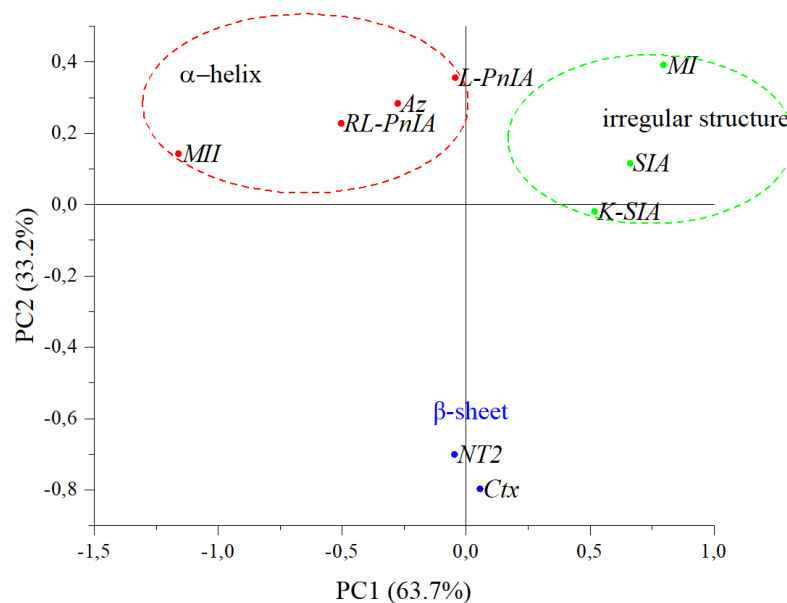


Рисунок 3 – График МГК, полученный после анализа спектров в диапазоне $1640\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$. Показана кластеризация белков и пептидов (разные кластеры отличаются цветом) в соответствии с особенностями вторичной структуры: α -helix – α -спираль, β -sheet – β -слой, irregular structure – нерегулярная структура.

Было проанализировано влияние различных спектральных составляющих на значения ГК1 и ГК2. Для этого был построен график весов (loadings) (Рисунок 4 (А)). Рассмотрение значений весов для разных частот спектра позволяет оценить влияние последних на величины ГК. Вместо представления весов, приведенного на рисунке 4 (А), можно использовать другую их репрезентацию, как на рисунке 4 (Б).

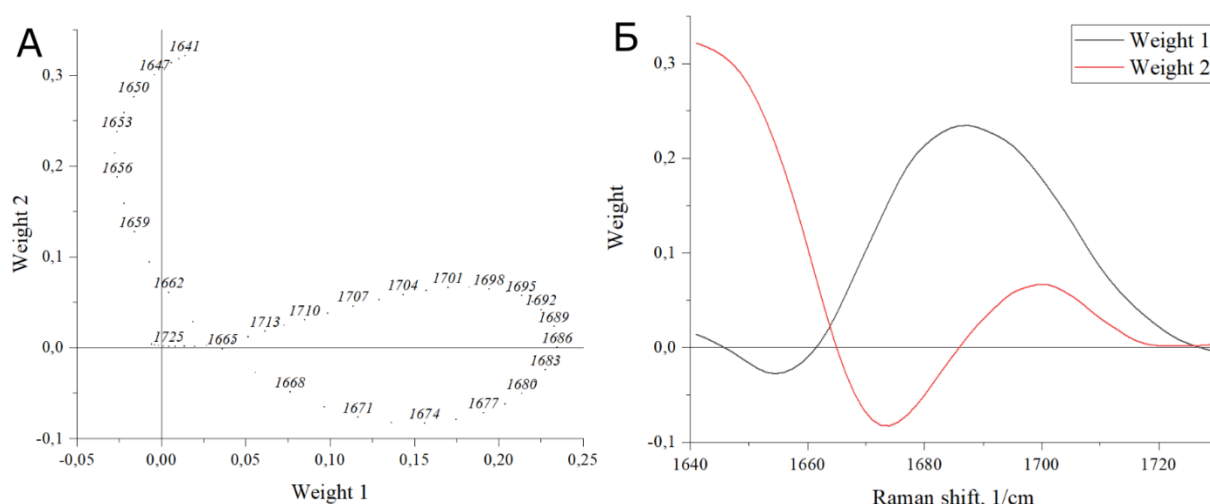


Рисунок 4 – Графический анализ весов. (А): График весов – точки соответствуют различным рамановским сдвигам. Некоторые точки не подписаны, чтобы избежать нагромождения. По осям отложены веса (weight), относящиеся к ГК1 и ГК2; (Б): Спектры весов ГК, отражающие влияние различных частот на значения ГК.

Анализ графика на рисунке 4 (А) приводит к следующим выводам. Наличие в спектре характерных для β -структур компонент около $1668\text{--}1677\text{ см}^{-1}$ ответственно за отрицательное значение ГК2. Сравнение графика весов с графиком ГК (Рисунок 3) позволяет сделать вывод о наличии β -слоев в структуре Ctx и NT2.

Положительные значения ГК2 вместе с отрицательными или близкими к нулю значениями ГК1 определяются компонентами спектра в районе частот $1650\text{--}1660\text{ см}^{-1}$, характерных для α -спиралей. Следовательно, можно утверждать, что образцы красного кластера на рисунке 3 содержат α -спирали. Токсины MI, SIA, K-SIA зеленого кластера, вероятно, имеют нерегулярную структуру. Разумно предположить, что большие отрицательные значения ГК1 указывают на большую общую длину α -спиралей, а близкие к нулю или положительные значения указывают на меньшую длину α -спиралей или их отсутствие. Это подтверждается тем, что трехпетельные токсины, в частности Ctx [18] и NT2 [19], действительно имеют в своей структуре либо короткие α -спиральные элементы, либо не имеют их вовсе. Интересно, что, согласно результатам кластеризации, Az содержит α -спираль. Ранее структура Az была предсказана сервисом PEPFOLD [20], и это моделирование также выявило наличие спирали.

Мы решили далее проверить, можно ли выявить различия в строении двух дисульфидных изомеров α -конотоксина RgIA – глобулярного (RgIA) и ленточного (isoRgIA) – с помощью описанного выше метода. Аминокислотный состав обоих образцов одинаков, но в ленточной форме isoRgIA дисульфидные связи (Cys2–Cys12 и Cys3–Cys8) отличаются от таковых (Cys2–Cys8 и Cys3–Cys12) в глобулярной форме.

Разница в дисульфидных связях проявилась при анализе области S–S спектра КР RgIA и isoRgIA (Рисунок 5 (А)). Из рисунка 5 (А) видно, что пик спектра RgIA значительно уширен (относительно пика спектра isoRgIA): для RgIA значителен вклад колебаний в области $520\text{--}550\text{ см}^{-1}$, что указывает на наличие *gouche-gouche-trans* и/или *trans-gouche-trans* конформаций C–C–S–S–C–C. В то же время, в isoRgIA доминирует конформация *gouche-gouche-gouche*, о чем свидетельствует более узкий пик с максимумом около 513 см^{-1} .

Различие в дисульфидных сшивках (мостиках) может приводить к структурным изменениям, которые, в свою очередь, могут проявляться в полосе Amide I спектра КР. На рисунке 5 (Б) показаны спектры RgIA и isoRgIA в диапазоне $1640\text{--}1730\text{ см}^{-1}$. Видно, что максимум полосы в изомере заметно сдвинут относительно максимума нативной формы RgIA. Это указывает на то, что изменение дисульфидных мостиков приводит к изменению вторичной структуры этого конотоксина.

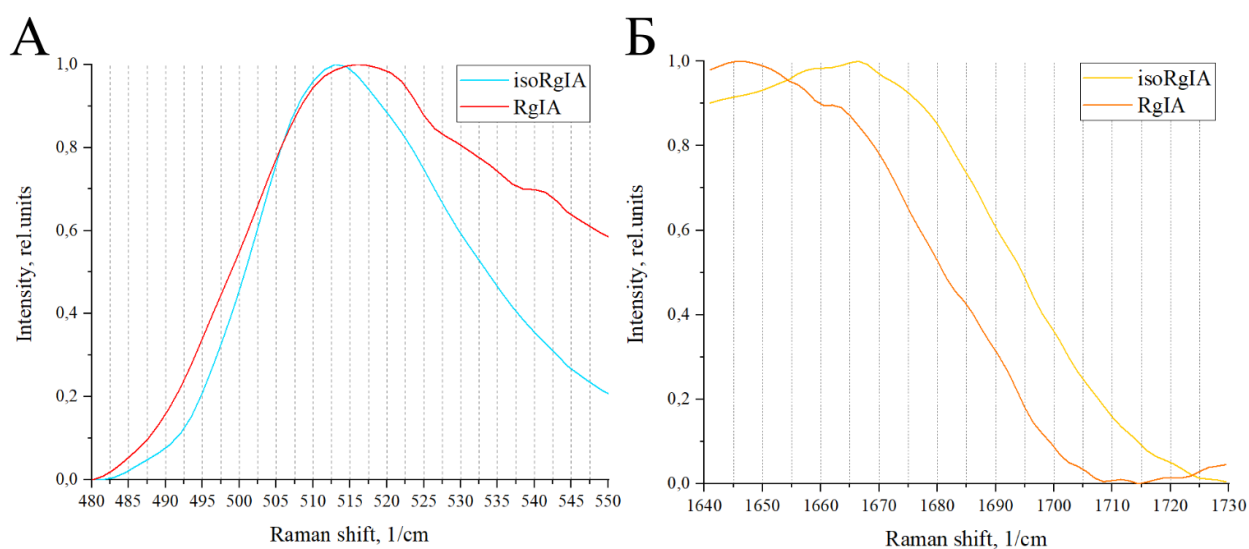


Рисунок 5 – (А): Область S–S спектров RgIA и isoRgIA; (Б): спектры RgIA и isoRgIA в диапазоне 1640–1730 cm^{-1} (Amide I).

В главе 3 «Классификация ядов разных видов змей с помощью РС» описывается применение РС для классификации, с помощью МГК и методов кластеризации, ядов различных видов змей из семейств Elapidae и Viperidae.

Отметим, что в составе ядов по содержанию преобладают соединения белковой природы. Поэтому белки вносят основной вклад в спектры исследованных образцов ядов (резонансных эффектов, существенно усиливающих спектры каких-либо других компонентов яда, обнаружено не было). Следовательно, спектр яда можно интерпретировать как суперпозицию спектров различных белков, входящих в его состав. Среди белков яда (токсинов) выделяют следующие основные семейства: секретируемые фосфолипазы A2 (PLA2), трехпетельные токсины (3FTx), металлопротеиназы змеиного яда (SVMP), сериновые протеазы змеиного яда (SVSP), оксидазы *l*-аминокислот (LAAO), богатые цистеином секреторные белки (CRiSP) и др.

Предобработанные спектры КР сухих образцов ядов были подвергнуты МГК. Итоговый график МГК показан на рисунке 6. Далее, чтобы идентифицировать группы ядов, мы применили метод *k*-means кластеризации. В результате, образцы были разделены на четыре кластера, которые показаны разными цветами.

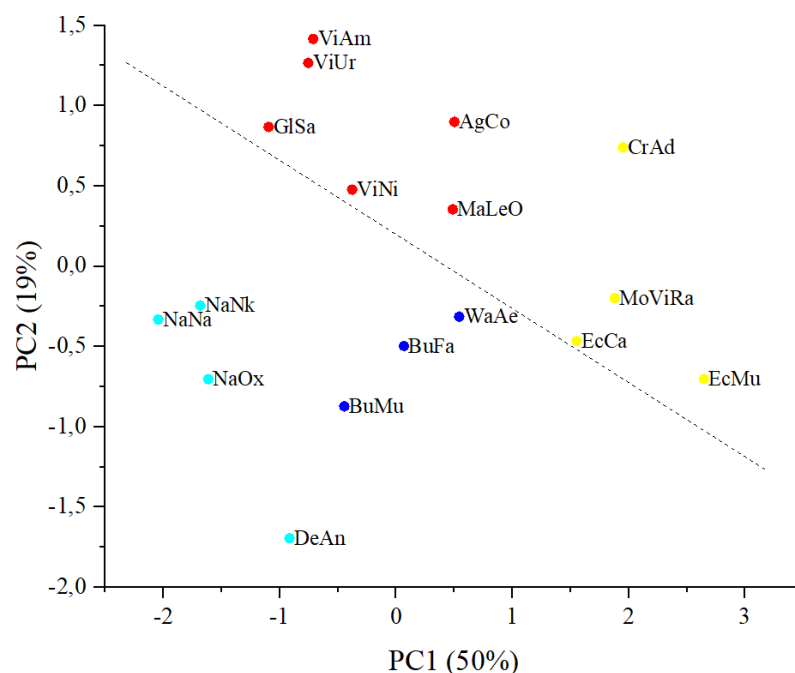


Рисунок 6 – График МГК, где в скобках указан процент объясненной дисперсии для каждой ГК.

Четыре кластера (полученные методом k-means кластеризации) различаются по цвету.

Пунктирной линией показано разделение образцов на яды Elapidae (под линией) и Viperidae (над линией).

Кластер 1 (красный) включает яд представителей рода *Vipera* (*V. nikolskii*, *V. ammodytes*, *V. ursinii*), *Agkistrodon contortrix*, *Gloydius saxatilis*, а также гюрзы (MaLeO). Кластер 2 (желтый) включает образцы змей рода *Echis* (*E. carinatus*, *E. multisquamatus*), *Montivipera raddei*, а также ромбического гремучника (CrAd). Все яды кластера 2 объединяет преобладание такого компонента, как SVMР [21]. Яд CrAd довольно отдален от других образцов этой группы, что можно объяснить тем, что вид CrAd является эндемиком США и его яд имеет специфические особенности. Кластер 3 (синий) объединяет яды крайтов (*Bungarus fasciatus*, *B. multicinctus*) и яд египетской пустынной кобры (WaAe). Интересно, что в отличие от яда большинства Elapidae, в яде некоторых представителей рода *Bungarus* доминирует PLA2. Вероятно, эта особенность отличает образцы ядов 3-й и 4-й групп. Группа 4 (голубая) состоит из ядов кобр (*Naja naja*, *N. kaouthia*, *N. oxiana*) и яда мамбы *Dendroaspis angusticeps* (DeAn), основными компонентами которых являются ЗФТх. Внутри этой группы яды кобр довольно четко выделяются в отдельную подгруппу, тогда как яд DeAn достаточно далек от них.

Из рисунка 6 видно, что образцы можно разделить на две большие группы, соответствующие ядам Elapidae и Viperidae; пунктирная линия, пересекающая Рисунок, иллюстрирует такое разбиение. Более строгое разделение можно провести, применив метод DFA. Мы использовали модификацию этого метода – ГК-DFA: в этом случае анализу подвергаются новые переменные – координаты образцов в пространстве ГК.

Около 40% образцов (Train) были использованы для обучения алгоритма ГК-DFA, то есть мы заранее указали, к какому семейству (Elapidae (E) или Viperidae (V)) они принадлежат. Для обеспечения разнообразия обучающей выборки из ядов семейств Elapidae и Viperidae были отобраны соответственно 3 и 4 тренировочных образца. После этого на основе уже обученной модели остальные образцы (Test) были автоматически отнесены к одному из двух семейств. Полученные результаты показаны на рисунке 7 (обратите внимание, что на этом графике значимо только расстояние между образцами по вертикали). Видно, что все тестовые образцы были правильно отнесены к одной из двух групп (семейств): яды Elapidae имеют отрицательные значения координаты ГК-DFA, а яды Viperidae – положительные.

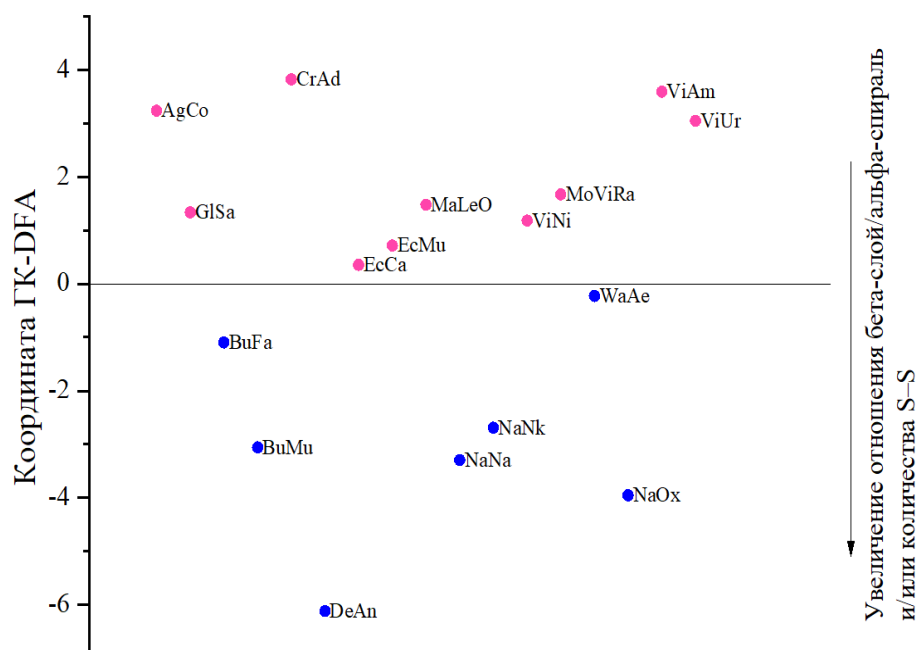


Рисунок 7 – График ГК-DFA. Горизонтальная линия при нулевом значении координаты ГК-DFA разделяет образцы на семейства. По горизонтали образцы разделены расстояниями, чтобы избежать наложения. Синим и розовым цветами обозначены яды семейств E и V соответственно. Указано направление увеличения соотношения β -слой/ α -спираль и/или увеличения количества дисульфидных связей (S–S).

Нам было интересно посмотреть, какие области спектра ответственны за такое разделение. Эту информацию можно получить из анализа весов ГК-DFA, которые, по аналогии с весами в МГК, показывают влияние различных частот спектров КР на координату (score) ГК-DFA (Рисунок 8). Из рисунка 8 видно, что частотам, ответственным за отнесение яда к семейству Elapidae, то есть которые имеют отрицательный вес, соответствуют пики в районах 510 и 1670 cm^{-1} .

Область 490–550 cm^{-1} представляет собой характеристическую полосу дисульфидных связей, а колебания на частоте около 510 cm^{-1} соответствуют основной (*gouche-gouche-gouche*)

конформации C–C–S–S–C–C. Следовательно, пик на этой частоте в спектре КР указывает на наличие дисульфидных связей в образце (белке), а интенсивность пика отражает их количество.

Колебания в области Amide I с частотой около 1670 см^{-1} характерны для β -слоев в структуре. Колебания же на частоты около 1655 см^{-1} характерны для α -спиральных структурных элементов в белке. Как видно из весов ГК-DFA, наличие α -спирали увеличивает «вероятность» отнесения образца к семейству Viperidae.

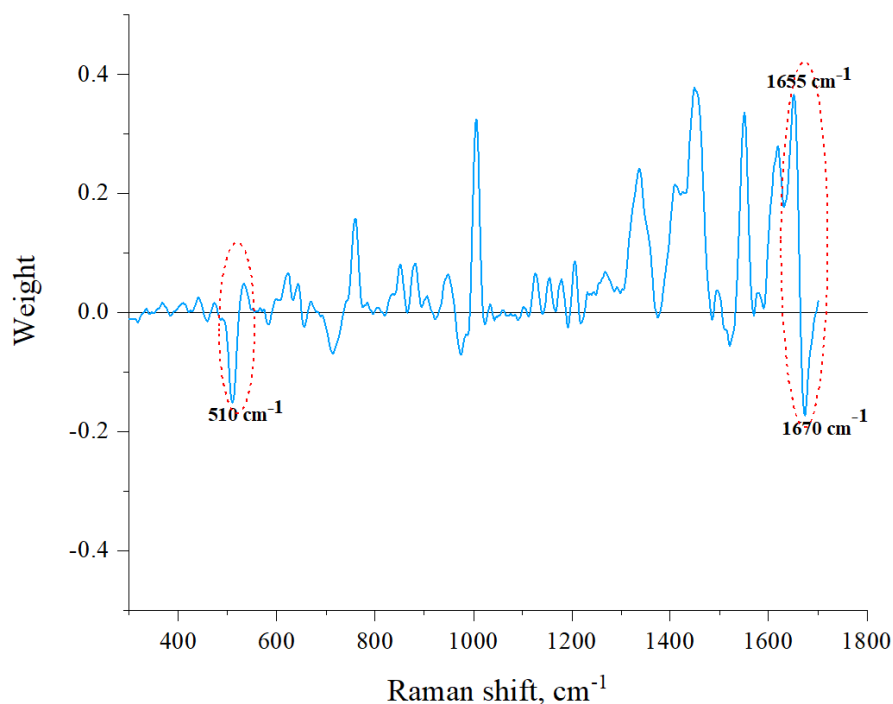


Рисунок 8 – Спектр весов ГК-DFA. Обведены полосы дисульфидов и Amide I. Частоты, ответственные за отнесение яда к семейству Elapidae (510 см^{-1} – S–S и 1670 см^{-1} – β -слой) и частота, характерная для α -спирали (1655 см^{-1}) подписаны.

Поскольку других интенсивных отрицательных пиков весов не наблюдается, то можно предположить, что основными критериями отнесения яда к семейству E или V являются количество дисульфидных связей и содержание β -слоев. Чем больше этих структурных элементов присутствует в яде, тем больше отрицательный вклад в значение ГК-DFA координаты (score) данного яда и тем больше шанс, что он будет отнесен к семейству E. Также, чем ниже на графике рисунка 7 расположен образец яда, тем больше относительное количество S–S связей и/или β -слоев в белках, входящих в его состав (соответствующее направление отмечено на рисунке 7 стрелкой).

Эти результаты можно интерпретировать с точки зрения количественного содержания конкретных семейств белков в ядах. Поскольку в ядах Elapidae обычно доминируют 3FTx [22], большее количество β -структурных элементов в образцах этих ядов можно связать именно с

присутствием ЗФТх. Известно [2, 23], что в структуре большинства этих токсинов доминирует β -слои, образующие петли.

В то же время, особенностью некоторых ядов змей рода *Bungarus* семейства Elapidae является относительно низкое содержание ЗФТх с преобладанием PLA2 [21]. В частности, основные компоненты яда BuFa из Вьетнама следующие: 67 % PLA2 и 7% LAAO. Поскольку в структуре PLA2 преобладают α -спирали [24], мы можем отнести увеличение количества α -структур именно на счет PLA2. Это также отражено на графике рисунка 8: образец BuFa из семейства Elapidae близок к границе с Viperidae. Из этого рисунка можно дополнительно сделать вывод, что соотношение β -/ α -структур также снижено в яде WaAe. Обратная ситуация наблюдается для DeAn, который действительно характеризуется высоким содержанием ЗФТх.

Далее в главе 4 «Анализ спектров КР ядов отдельных особей змей» мы применили описанный подход к изучению более тонких – внутривидовых – вариаций ядов. Мы проанализировали уже не усредненные образцы, полученные путем объединения ядов нескольких особей змей, а яды отдельных змей вида *Vipera nikolskii*. Кроме того, мы сравнили обнаруженные таким путем внутривидовые вариации ядов с межвидовыми (относительно родственных видов *Vipera renardi* и *Vipera berus*).

Были записаны спектры сухих ядов особей следующих змей: двух популяций гадюки Никольского (VN) (с территорий вблизи реки Красивая Меча (VNK) (9 образцов) и г. Борисоглебска (VNB) (4 образца)), а также степной гадюки *Vipera renardi* (VR) (1 образец) и обыкновенной гадюки *Vipera berus* (VB) (3 образца). Далее спектральные данные всех образцов были подвергнуты МГК. Итоговый график МГК показан на рисунке 9 (А).

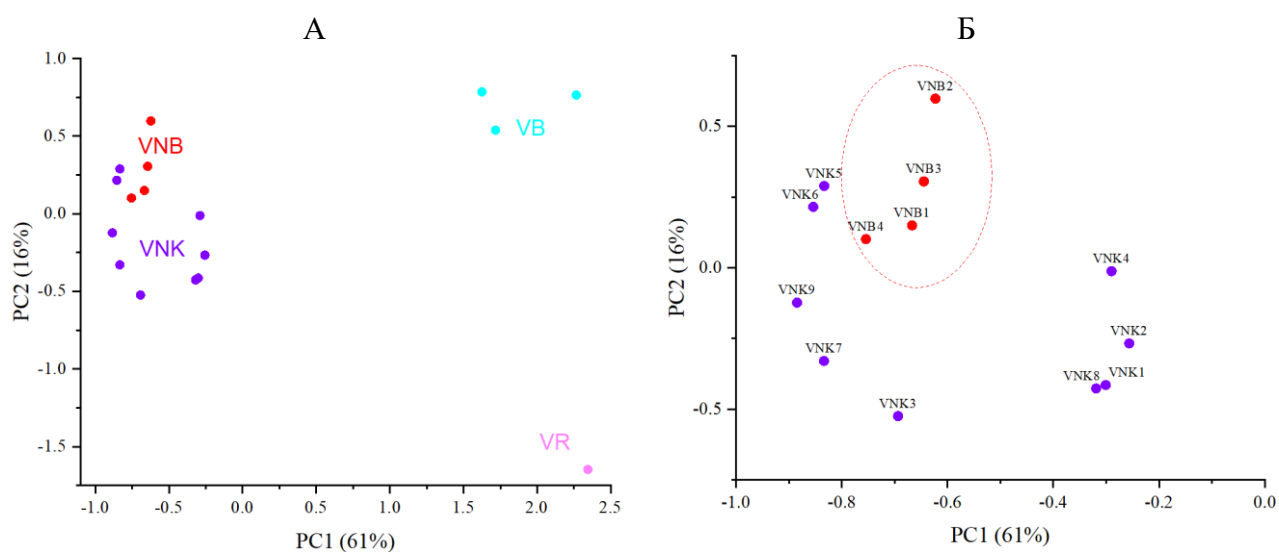


Рисунок 9 – (А): График МГК. Четыре группы образцов обозначены кружками разного цвета:

VNK – фиолетовые, VNB – красные, VR – розовые и VB – голубые; (Б): Образцы VN на увеличенном фрагменте графика МГК.

Видно, что расстояния между образцами ядов змей разных видов значительно больше, чем между ядами змей одного вида (VN). Мы можем использовать расстояния между точками на графике МГК для оценки степени изменчивости состава ядов. Межвидовые вариации в составе ядов вполне ожидаемы, но интересно отметить и наличие значительных внутривидовых различий.

Увеличенный фрагмент графика МГК, показывающий только образцы VN, показан на рисунке 9 (Б). Видно, что можно идентифицировать группу ядов змей одной и той же популяции (VNB, красные кружки). Следует отметить, что наблюдается тенденция к группировке, но не строгое отделение ядов одной популяции от другой, поскольку состав ядов различается и у змей внутри одной популяции.

Чтобы выяснить, какие особенности состава могут быть ответственны за полученную группировку ядов змей одной популяции, мы отдельно проанализировали полосу Amide I спектров КР ядов VN. Сначала мы получили усредненные спектры для каждой популяции. Далее была выполнена аппроксимация кривыми полученных средних спектров Amide I для оценки вклада различных элементов вторичной структуры (Рисунок 10).

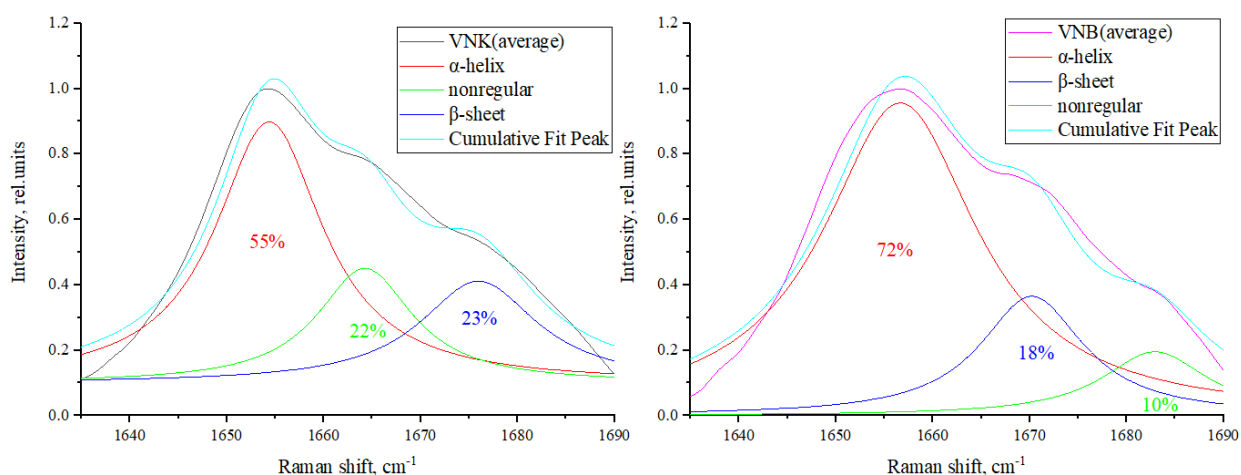


Рисунок 10 – Фитинг полосы Amide I средних (average) спектров VNK (слева) и VNB (справа). α -helix – α -спираль, β -sheet – β -слой, nonregular – нерегулярная структура, Cumulative Fit Peak – суммарный подгоночный пик (полученный суммированием всех подгоночных пиков).

Известно, что преобладающими компонентами змеиного яда VN являются фосфолипазы A2 (PLA2) – HDP1, HDP2 [25, 26]. Поэтому мы решили также записать спектры КР HDP1 и HDP2 и аналогичным образом проанализировать их полосы Amide I (Рисунок 11). Наши данные показывают, что α -спираль является основным структурным элементом в изученных PLA2.

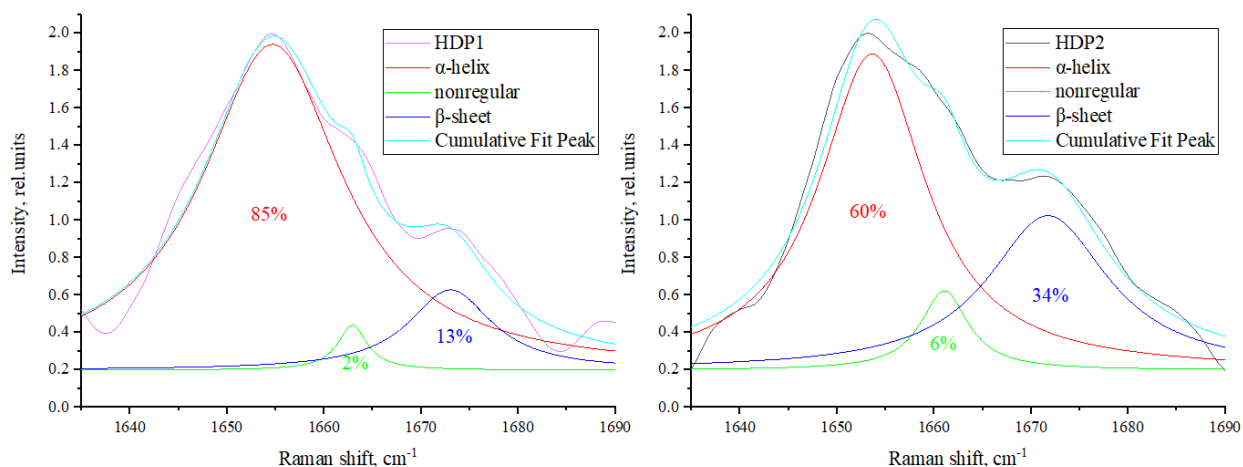


Рисунок 11 – Фитинг полосы Amide I спектров HDP1 (слева) и HDP2 (справа). α -helix – α -спираль, β -sheet – β -слой, nonregular – нерегулярная структура, Cumulative Fit Peak – суммарный подгоночный пик.

Интересно отметить, что соотношение вторичных структур α/β в HDP1 и HDP2 различается, что указывает на их структурные различия: в HDP2 заметен больший вклад β -слоев. Учитывая обнаруженные различия между ядами VNK и VNB в содержании элементов вторичной структуры, можно предположить, что большее количество α -структур в ядах VNB объясняется бóльшим содержанием PLA2 или HDP1 в этих ядах, по сравнению с VNK. Можно также предположить, что вклад токсинов других семейств (например, SVSP) в спектры VNK (и соответственно, в их составы) более заметен.

В заключительной главе 5 «Сравнение спектров КР рекомбинантного и синтетического белка SLURP-1» проведено сравнение рекомбинантной, произведенной *E. coli*, версии подобного трехпетельным токсином белка SLURP-1 – rSLURP-1 с синтетической версией sSLURP-1, полученной методом пептидного синтеза. rSLURP-1 имеет один дополнительный N-концевой остаток Met [27, 28], в то время как sSLURP-1 идентичен по своей аминокислотной последовательности природному белку человека. Несмотря на это минимальное различие двух версий белка, их активность ранее была найдена различной. Поэтому была предпринята попытка объяснения данного различия разницей структур rSLURP-1 и sSLURP-1. Обнаружение подобных тонких структурных различий молекул может быть выполнено с помощью инструмента PC, поэтому нами было проведено PC-исследование этих двух белков. Также была предпринята попытка выявления преимущества использования той или иной версии SLURP-1.

Анализ S–S области (Рисунок 12 (A)) позволил установить, что в структуре обоих образцов преобладает конформация *gauche-gauche-gauche* C–S–S–C–C, поскольку максимум основного пика локализован вблизи 510 см^{-1} . Однако для sSLURP-1 заметен небольшой вклад

gauche-gauche-trans конформации, о чем свидетельствует появление плеча около 525 cm^{-1} . Это может быть связано с тем, что определенный процент молекул sSLURP-1 имеет измененную конформацию C–C–S–S–C–C.

Анализ тирозинового дублета (Рисунок 12 (Б)) позволяет утверждать, что тирозиновые остатки в обоих образцах имеют преимущественно гидрофобное окружение (поскольку основной пик локализован в районе 830 cm^{-1}), однако следует отметить, что в отличие от sSLURP-1, некоторая часть остатков тирозина в молекулах rSLURP-1 имеет гидрофильное окружение (дополнительный максимум около 850 cm^{-1}).

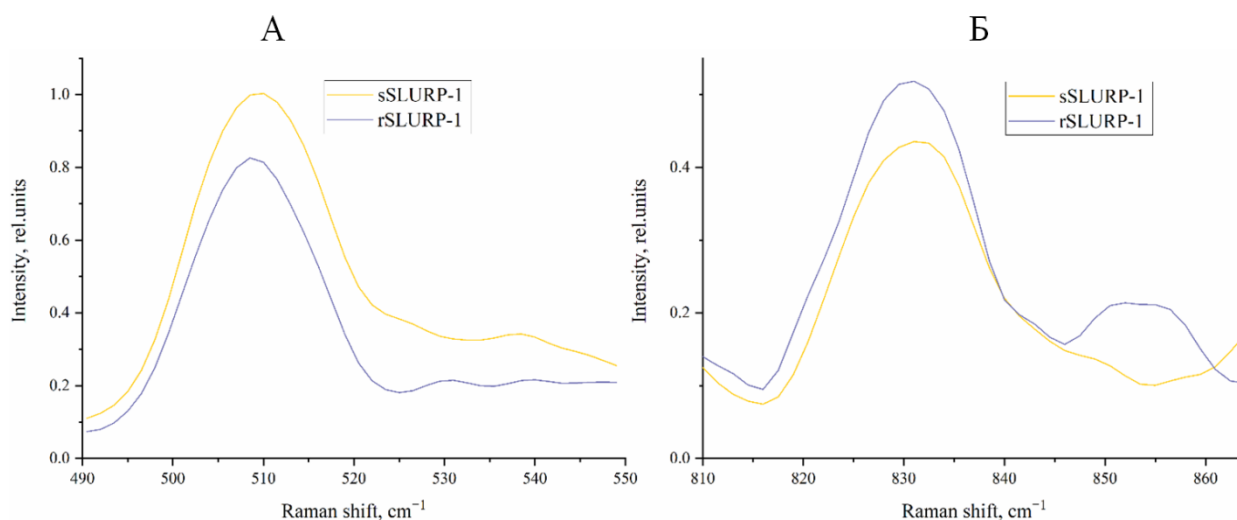


Рисунок 12 – Спектры областей S–S (А) и дублета тирозина (Б).

Анализ вторичной структуры образцов не выявил существенных различий: в обоих наблюдается наличие β -структур, о чем свидетельствуют положения основных пиков: около 1240 cm^{-1} для Amide III и 1670 cm^{-1} для Amide I.

В **заключении** сформулированы основные выводы диссертационной работы.

3. Заключение

Итоги выполненного исследования (выводы)

1. Разработана методика структурного анализа белковых и пептидных токсинов животных на основе КР спектроскопии.
2. Разработана методика анализа цельных змеиных ядов на основе КР спектроскопии.
3. Впервые продемонстрировано, что КР спектроскопия в сочетании с МГК и кластеризацией может успешно применяться как для выявления структурных сходств и

различий между белковыми (пептидными) токсинами животных, включая их синтетические аналоги, так и для классификации цельных ядов змей, отражающей состав ядов.

4. Показано, что на основе разработанной методики можно различать дисульфидные изомеры одного и того же пептидного токсина, а также фиксировать тонкие структурные различия близких по аминокислотной последовательности токсинов и им подобных белков.

5. Показано, что обработка КР спектров образцов ядов змей различных видов, с помощью метода анализа дискриминантных функций (DFA), совмещенного с МГК, корректно разделяет образцы на две группы, соответствующие семействам змей Viperidae и Elapidae.

6. Продемонстрированы и оценены внутривидовые (меж- и внутривидовые) различия в составе ядов и проведено сравнение этих различий с межвидовыми.

В итоге, в работе представлен чрезвычайно экономичный экспресс-метод, основанный на спектроскопии КР и математических методов обработки данных, который позволяет быстро анализировать большое количество токсинов и ядов. Малый расход материалов дает возможность работать с небольшими количествами образцов, что важно при изучении токсинов и ядов малопродуктивных, а также редких и исчезающих видов животных.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

Метод может рассматриваться как дополнение или, в ряде случаев, альтернатива существующим методикам структурного и протеомного анализа. Он может найти применение в медицинских приложениях: для разработки лекарств и противоядий.

Совместные работы исследователей из разных научных областей представляются крайне перспективными и многообещающими. Подобная конвергенция позволяет расширять методологические подходы, а также обращаться к новым интересным объектам исследования. В дальнейшем планируется продолжить работы в направлении применения спектроскопии КР в области токсикологии. В частности, в планах создание библиотеки представителей различных семейств белковых токсинов ядов змей и попытка реализации декомпозиции спектров КР цельных ядов и более точной оценки их состава с опорой на данную библиотеку. Также перспективным кажется обнаружение и анализа с помощью РС змеиного яда в биотканях.

4. Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. Toxins' classification through Raman spectroscopy with principal component analysis / V.A. Mozhaeva, D.S. Kudryavtsev, K.A. Prokhorov [et al.] // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2022. – Vol. 278. – P. 121276. – doi: 10.1016/j.saa.2022.121276.

2. Differentiation of snake venom using Raman spectroscopic analysis / V.A. Mozhaeva, V.G. Starkov, D.S. Kudryavtsev [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2023. – Vol. 11. – P. 6435–6442. – doi: 10.1039/d3tb00829k.
3. Comparison of Conformations and Interactions with Nicotinic Acetylcholine Receptors for E. coli-Produced and Synthetic Three-Finger Protein SLURP-1 / V. Kost, D. Sukhov, I. Ivanov, I. Kasheverov, L. Ojomoko, I. Shelukhina, V. Mozhaeva, D. Kudryavtsev, A. Feofanov, A. Ignatova, Y. Utkin, V. Tsetlin // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – P. 16950. – doi: 10.3390/ijms242316950.

Литература

1. Miura, T. Raman spectroscopy of proteins and their assemblies. / T. Miura, G. J. Thomas // *Sub-cellular biochemistry*. – 1995. – Vol. 24. – P. 55-99.
2. Takamatsu, T. Raman spectra of some snake venom components / T. Takamatsu, I. Harada, K. Hayashi // *BBA - Protein Structure*. – 1980. – Vol. 622. – № 2. – P. 189-200.
3. Principal components analysis of Raman spectral data for screening of Hepatitis C infection / A. Ditta, H. Nawaz, T. Mahmood [et al.] // *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2019. – Vol. 221 – P. 117173.
4. Tsetlin, V. Snake venom α -neurotoxins and other “three-finger” proteins / V. Tsetlin // *European Journal of Biochemistry*. – 1999. – Vol. 264. – № 2. – P. 281-286.
5. From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery / K. de C. F. Bordon, C. T. Cologna, E. C. Fornari-Baldo [et al.] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2020. – Vol. 11 – P. 1132.
6. Animal protein toxins: origins and therapeutic applications / N. Chen, S. Xu, Y. Zhang, F. Wang // *Biophysics Reports*. – 2018. – Vol. 4. – № 5. – P. 233-242.
7. Antiviral Effects of Animal Toxins: Is There a Way to Drugs? / Y. Utkin, A. Siniavin, I. Kasheverov, V. Tsetlin // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 7 – P. 3634.
8. Snake venom phospholipase A2s exhibit strong virucidal activity against SARS-CoV-2 and

- inhibit the viral spike glycoprotein interaction with ACE2 / A. E. Siniavin, M. A. Streltsova, M. A. Nikiforova [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2021. – Vol. 78. – № 23. – P. 7777-7794.
9. Azemiopsin, a selective peptide antagonist of muscle nicotinic acetylcholine receptor: Preclinical evaluation as a local muscle relaxant / I. V. Shelukhina, M. N. Zhmak, A. V. Lobanov [et al.] // *Toxins*. – 2018. – Vol. 10. – № 1 – P. 34.
 10. Editorial: Animal toxins as comprehensive pharmacological tools to identify diverse ion channels / Y. Utkin, A. Vassilevski, D. Kudryavtsev, E. A. B. Undheim // *Frontiers in Pharmacology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 423.
 11. Kini, R. M. Toxinology provides multidirectional and multidimensional opportunities: A personal perspective / R. M. Kini // *Toxicon: X*. – 2020. – Vol. 6 – P. 100039.
 12. Daltry, J. C. Diet and snake venom evolution / J. C. Daltry, W. Wüster, R. S. Thorpe // *Nature*. – 1996. – Vol. 379. – № 6565. – P. 537-542.
 13. Dhankhar, D. Cell-phone camera Raman spectrometer / D. Dhankhar, A. Nagpal, P. M. Rentzepis // *Review of Scientific Instruments*. – 2021. – Vol. 92. – № 5 – P. 054101.
 14. Merbel, N. van de. Sample preparation for LC-MS bioanalysis of proteins / N. van de Merbel // *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis*. – 2019. – P. 304-318.
 15. Raman Spectroscopy to Monitor Post-Translational Modifications and Degradation in Monoclonal Antibody Therapeutics / B. S. McAvan, L. A. Bowsher, T. Powell [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2020. – Vol. 92. – № 15. – P. 10381-10389.
 16. Conformational fingerprinting of tau variants and strains by Raman spectroscopy / G. Devitt, A. Crisford, W. Rice [et al.] // *RSC Advances*. – 2021. – Vol. 11. – № 15. – P. 8899-8915.
 17. Chippaux, J. P. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation / J. P. Chippaux, V. Williams, J. White // *Toxicon*. – 1991. – Vol. 29. – № 11. – P. 1279-1303.
 18. α -Cobratoxin : Proton NMR Assignments and Solution Structure / R. Le Goas, S. R. LaPlante, A. Mikou [et al.] // *Biochemistry*. – 1992. – Vol. 31. – № 20. – P. 4867-4875.
 19. Structure-function relationship of three neurotoxins from the venom of *Naja kaouthia*: A comparison between the NMR-derived structure of NT2 with its homologues, NT1 and NT3 / Y. Cheng, Q. Meng, W. Wang, J. Wang // *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. – 2002. – Vol. 1594. – № 2 – P. 353-363.

20. Natural compounds interacting with nicotinic acetylcholine receptors: From low-molecular weight ones to peptides and proteins / D. Kudryavtsev, I. Shelukhina, C. Vulfius [et al.] // *Toxins*. – 2015. – Vol. 7. – № 5. – P. 1683-1701.
21. The chemistry of snake venom and its medicinal potential / A. L. Oliveira, M. F. Viegas, S. L. da Silva [et al.] // *Nature Reviews Chemistry*. – 2022. – Vol. 6. – № 7. – P. 451-469.
22. Utkin, Y. N. Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom - Milestones of discovery / Y. N. Utkin // *Toxicon*. – 2013. – Vol. 62. – P. 50-55.
23. The three-finger toxin fold: a multifunctional structural scaffold able to modulate cholinergic functions / P. Kessler, P. Marchot, M. Silva, D. Servent // *Journal of Neurochemistry*. – 2017. – Vol. 142. – P. 7-18.
24. Computational studies of snake venom toxins / P. G. Ojeda, D. Ramírez, J. Alzate-Morales [et al.] // *Toxins*. – 2018. – Vol. 10. – № 1 – P. 8.
25. Heterodimeric neurotoxic phospholipases A2-The first proteins from venom of recently established species *Vipera nikolskii*: Implication of venom composition in viper systematics / A. S. Ramazanova, L. L. Zavada, V. G. Starkov [et al.] // *Toxicon*. – 2008. – Vol. 51. – № 4. – P. 524-537.
26. Quantitative proteomic analysis of venoms from Russian vipers of Pelias group: Phospholipases A2 are the main venom components / S. I. Kovalchuk, R. H. Ziganshin, V. G. Starkov [et al.] // *Toxins*. – 2016. – Vol. 8. – № 4 – P. 105.
27. Human neuromodulator SLURP-1: Bacterial expression, binding to muscle-type nicotinic acetylcholine receptor, secondary structure, and conformational heterogeneity in solution / M. A. Shulepko, E. N. Lyukmanova, A. S. Paramonov [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2013. – Vol. 78. – № 2. – P. 204-211.
28. Human secreted Ly-6/uPAR related protein-1 (SLURP-1) is a selective allosteric antagonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor / E. N. Lyukmanova, M. A. Shulepko, D. Kudryavtsev [et al.] // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – № 2 – P. 0149733.