



Structural-functional studies of peptides derived from a long-chain snake neurotoxin *Naja naja oxiana*

Adak Nasiripourdori ¹, Bijan Ranjbar ^{1*}, Hossein Naderi-Manesh ¹, Faramarz Mehrnejad ¹,
Safie Soofian ¹, Goudarz Sadeghi ², Saeed Kolahian ²

1. Dept. Biophysics, Faculty of Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2. Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran.

Received: 16 Jul 2008

Revised: 20 Sep 2008

Accepted: 24 Sep 2008

Abstract

Introduction: Today the design and structural characterization of mini-proteins with a compact folded structure provide insight into the complex architecture of proteins and has long been a challenging issue in structural-functional studies. Alpha neurotoxins from snake venom have a distinct folded structure comprised of a disulphide core and three loops or "fingers"; each of these loops are considered as a separate functional domain. Because of the selectivity and specificity of snake alpha neurotoxins, they are ideal candidates for structural-functional studies.

Methods: With the assumption that each "loop" in the structure of alpha neurotoxin is able to fold as a structurally independent unit and could possibly have functional properties, we have minimized the structure of a long-chain alpha neurotoxin into 18 and 31 amino acid peptides using solid-phase synthesis and cloning methods, respectively. The molecules are structurally studied using circular dichroism spectroscopy and also in vitro using organ bath apparatus and chick biventer cervicis muscle (CBCM).

Results: The 18 and 31-mer peptides form predominant beta structures (β -turn and β -sheet/alpha helix) in aqueous solutions which vary with solvent ionic strength. Data from in vitro and in silico studies indicate that these minimized structures block the twitches in CBCM with concentrations higher than 0.5 μ M; and this effect is absolutely dose dependent. On the other hand, the long-chain alpha neurotoxin completely and irreversibly blocks the CBCM even at 50 nanomolar concentration and both effects are post synaptic.

Conclusion: These data support the primary assumption that the peptides derived from the second loop of snake alpha neurotoxin can have a distinct folded structure and also exist as an independent biological unit.

Keywords: LTP, GABAergic neuron, Fast-spiking neuron, Metabotropic glutamate receptor, Visual cortex, Transgenic mouse.

* Corresponding author e- mail: ranjbarb@modares.ac.ir
Available online @: www.phypha.ir/ppj

مطالعات ساختاری - عملکردی پپتیدهای طراحی شده از نوروتوکسین *Naja naja oxiana* بلند زنجیره مار کبری گونه

آداک نصیری‌پور، بیژن رنجبر^{۱*}، حسین نادری‌منش^۱، فرامرز مهرنژاد^۱، صفیه صوفیان^۱، گودرز صادقی^۲، سعید کلاهیان^۲

۱. گروه بیوفیزیک دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران

دریافت: ۲۶ تیر ۸۷ بازبینی: ۳۰ شهریور ۸۷ پذیرش: ۳ مهر ۸۷

چکیده

مقدمه: آلفا نوروتوکسین سم مار دارای چارچوب سرشتی مشخص متشکل از یک هسته دی سولفیدی و سه حلقه است که هر یک از این حلقه‌ها یک دُمین عملکردی مجزا محسوب می‌شوند. این مولکول به علت پایداری و اختصاصی بودن زیاد برای گیرنده هدف، گزینه مطلوبی برای مطالعات ساختاری - عملکردی محسوب می‌شود.

روش‌ها: در تحقیق حاضر با این فرض که هریک از دُمین‌های مولکول آلفا نوروتوکسین قابلیت این را دارند که بصورت مستقل سرشته شده و احتمالاً واجد عملکرد نیز باشند، با تقلیل ساختار نوروتوکسین سم مار کبری به پپتیدهای ۱۸ و ۳۱ اسید آمینه‌ای با استفاده از روش‌های کلون کردن و سنتز پپتید به روش فاز جامد، ساختار و عملکرد این پپتیدها در محیط آبی به ترتیب با استفاده از روش دورنگ‌نمایی دورانی و مطالعه اثر آن‌ها بر عضله دوقلوی گردن جوجه (*Chick biventer cervicis muscle*)، مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: ساختار پپتیدهای ۱۸ و ۳۱ اسید آمینه‌ای در حالت محلول به ترتیب به دور بتا و مخلوطی از صفحات بتا و مارپیچ آلفا متمایل شد و مشاهده شد که تغییر pH محلول، بر شدت ساختار دوم پپتیدها تأثیر می‌گذارد؛ همچنین اثر پپتیدها بر روی گیرنده‌های استیل کولین عضله جوجه (CBCM) با سم نوروتوکسین مادر مقایسه شد. داده‌های بدست آمده از مطالعات تئوری و تجربی نشان می‌دهند که این مولکول‌ها با غلظت بیشتر از ۰/۵ میکرومولار اثر خود را اعمال می‌کنند و این اثر به شدت وابسته به دوز است در حالی که اثر برگشت ناپذیر سم نوروتوکسین مار کبری تا غلظت ۵۰ نانومولار نیز دیده می‌شود و هر دو اثر از نوع پس سیناپسی است.

نتیجه‌گیری: مولکول‌های طراحی شده از حلقه دوم سم مار علاوه بر داشتن ساختار در حالت محلول، قادر هستند به عنوان یک واحد زیستی مستقل، عملکرد نسبی را در مقایسه با سم اصلی نشان دهند.

واژه‌های کلیدی: طراحی پروتئین، نوروتوکسین، گیرنده استیل کولین.

مقدمه

منجر به مرگ قربانی می‌شوند. اثرات مرگبار گزش یک مار مربوط به حضور انواع اجزای سمی در زهر آن هاست، فراوانترین این اجزای مرگبار متعلق به گروه پلی پپتیدهای سمی مؤثر بر سیستم عصبی (نوروتوکسین‌ها) و سیستم قلبی (کاردیوتوکسین‌ها) است [۲۰]. زهر مارهای خانواده کبری (کبری، افعی) حاوی تعداد زیادی پلی پپتید آلفا نوروتوکسین پس سیناپسی است که از جمله مهمترین آن‌ها می‌توان به

زهر مارهای متعلق به خانواده مار کبری بسیار سمی است و اثراتی همانند فلج خفیف و نقصان در دستگاه تنفسی در جانداران عالی‌تر ایجاد می‌کند که در اغلب موارد این اثرات

ranjbarb@modares.ac.ir
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

اصلی اتصال آلفا نوروتوکسین های زهر مار به گیرنده استیل کولین، متشکل از تعدادی اسید آمینه کلیدی است [۳، ۴، ۵، ۸، ۱۳، ۲۵، ۳۶، ۳۷، ۳۵]. مقایسه توالی آمینو اسیدی در آلفا نوروتوکسین های بلند زنجیره شناخته شده تاکنون، مشخص کننده تعدادی اسید آمینه مشترک است که البته همه آن ها از لحاظ عملکرد قابل توجه نیستند. مطالعات انجام شده بر روی دو نوروتوکسین بسیار شناخته شده یعنی آلفا بونگاروتوکسین و آلفا کبری توکسین تعدادی از این اسید آمینه های کلیدی را مشخص کرده است و اگرچه اتصال سموم نوروتوکسین به گیرنده استیل کولین اتصالی چند نقطه ای است اما به نظر می رسد که نواحی اصلی اتصال در این سموم، در حلقه دوم واقع شده اند.

از جمله روش های متداول در مهندسی پروتئین، تجزیه پروتئین به قطعات و واحد های کوچکتر است که در ابتدا برای مطالعه مکانیسم ها و مسیرهای سرشتی پروتئین بنیان گذاری شد. از آن هنگام، کاربرد این روش ها بیشتر در جهت توضیح سامان دهی ساختاری پروتئین ها و منشاء تکاملی آن ها، و نیز طراحی سیستم های جدید پیوندی (هیبرید) بوده است. بررسی سامانه ساختاری یک پروتئین، امکان یافتن نواحی ای را در ساختار اولیه می دهد که می توان آن نواحی را از کل ساختار جدا نمود، بدون اینکه در عملکرد آن اختلالی بوجود آید. بطور طبیعی می توان حدس زد که دستکاری چارچوب پروتئین در نواحی با ساماندهی کمتر، مثل حلقه ها (loops) و اتصال دهنده ها (linkers) بهتر توسط سیستم تحمل می شود. در تحقیق حاضر با فرض این که هریک از حلقه ها - یا انگشت های - سم آلفا نوروتوکسین قابلیت این را دارند که همانند یک دُمین زیستی مجزا سرشته شده و توانایی اتصال به گیرنده را نیز داشته باشند، با جدا سازی ناحیه اصلی اتصال به گیرنده - یعنی حلقه دو - ساختار و عملکرد این قطعه در محیط آبی و بصورت *In vitro* و *in silico* مطالعه شد. پیش از انجام مطالعات تجربی، چگونگی شکل گیری این پپتید های جدا شده از ساختار اصلی سم در محیط آبی و نیز نحوه اتصال آن ها به گیرنده هدف به ترتیب با برنامه های شبیه سازی دینامیک مولکولی (Molecular Dynamics) و شبیه سازی اتصال (Docking simulation) پیش بینی شد.

آلفا بونگاروتوکسین جدا شده از زهر مار گونه *Bungarus multicinctus* و آلفا کبری توکسین جدا شده از زهر مارهای گونه *Naja* اشاره کرد.

تاکنون بیش از ۱۰۰ نوع نوروتوکسین از زهر مارهای خانواده الاپیده (کبری) و هیدروفیده (مارهای آبی) جداسازی و تعیین توالی شده است. بسته به توالی اسید آمینه ای و یا ساختار سوم، آلفا نوروتوکسین ها را می توان به گروه های کوتاه زنجیره، بلند زنجیره، بی قاعده و غیرمعمول دسته بندی کرد [۲۶]. آلفا نوروتوکسین های کوتاه زنجیره بطور معمول از ۶۰-۶۲ اسید آمینه و چهار پل دی سولفید تشکیل شده اند، در حالی که آلفا نوروتوکسین های بلند زنجیره پنج پل دی سولفید و ۶۶-۷۹ (متوسط ۷۳) اسید آمینه دارند. مطالعاتی که با روش های X-ray و NMR بر روی انواع مختلف نوروتوکسین های کوتاه و بلند زنجیره انجام شده است نشان داده که این پروتئین ها ساختارهای مشابهی در شکل بلوری و در محلول دارند: ویژگی تمام آلفا نوروتوکسین ها حضور چهار پل دی سولفیدی است که تشکیل یک هسته آب گریز را می دهند و از این هسته، سه حلقه محصور شده توسط پل دی سولفید بیرون زده می شود: I، II، III. یک ویژگی بارز ساختاری در آلفا نوروتوکسین ها، ساختارهای بتای سه رشته ای است که توسط حلقه مرکزی شماره II و حلقه III شکل گرفته است.

آلفا نوروتوکسین ها به گیرنده های نیکوتینی استیل کولین متصل می شوند. این گیرنده ها کانال های یونی وابسته به لیگاند هستند و متشکل از ۵ زیر واحد که در نوع عصبی این گیرنده ها، زیر واحدها از یک نوع هستند (مانند گیرنده عصبی $\alpha 7$) و در نوع عضلانی، زیرواحدها مختلف بوده، آرایش آن ها به شکل $\alpha 2\beta\gamma\delta(\epsilon)$ است [۱۹]. در اثر اتصال آلفا نوروتوکسین ها به گیرنده های پس سیناپسی استیل کولین، از اتصال لیگاند های طبیعی مانند مولکول استیل کولین ممانعت به عمل می آید و متعاقب آن، شار یونی از خلال گیرنده متوقف شده، فلج عضلانی اتفاق می افتد [۹، ۱۷، ۲۴، ۳۰]. سموم نوروتوکسین با تمایل زیاد (10^{-11} - 10^{-9} Molar) و اختصاصی بودن بالا، به عنوان ردياب های فارماکولوژی گزینه های ایده آلی برای اهداف طراحی دارو و کاربرد های پزشکی محسوب می شوند. ناحیه

مواد و روش‌ها

زهر مارکبری ایرانی گونه *Naja naja oxiana* از انستیتو تحقیقات رازی در شهرستان کرج تهیه و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. ستون ژل فیلتراسیون استفاده شده، سفادکس (G-50 (fine) متعلق به شرکت Pharmacia و دو جداره با ابعاد $220 \times 3/5$ سانتی متر بود که قبلاً بصورت دست ساز توسط واحد شیشه گری دانشکده فنی دانشگاه تهران ساخته شده بود. ابتدا ستون با مقدار مناسب ژل آماده شده در ۰/۰۵ مولار بافر استات آمونیم (Merck) متراکم شد؛ سپس ستون آماده شده با فاز متحرک استات آمونیم ۰/۰۵ مولار به تعادل رسید. شستشوی ستون توسط فاز متحرک با سرعت جریان ۶۰ میلی لیتر در ساعت و با استفاده از سیرکولاتور در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام شد.

برای جداسازی جزء مورد نظر از زهرخام، حدود ۲۵۰ میلی گرم ماده خشک در ۲ میلی لیتر فاز متحرک حل شد و بلافاصله بر روی ستون منتقل شد. هر ۵ میلی لیتر خروجی ستون بصورت یک سهم جمع آوری شد و جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ و ۲۱۵ نانومتر خوانده شد. نتیجه با تخلیص قبلی صورت گرفته در منبع [۱] مقایسه شد. نمونه‌ها توسط دستگاه لیوفیلایز خشک شدند تا برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

برای جداسازی مولکول نوروتوکسین مورد نظر از مخلوط پپتیدی موجود در سهم بدست آمده از ژل فیلتراسیون، از ستون C8 RP-HPLC Semiprep (ابعاد 250×10 میلی متر) استفاده شد. سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه بود و شستشو با استفاده از شیب خطی استونیتریل حاوی ۰/۱٪ تری فلورواستیک اسید انجام شد. جذب نمونه‌ها در طول موج های ۲۸۰، ۲۱۵ و ۲۴۵ نانومتر خوانده شد. نمونه‌ها توسط دستگاه لیوفیلایز خشک شدند تا برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

RNA سلولی از غدد زهری مار کبری - که بلافاصله در نیتروژن مایع نگهداری شد - استخراج شدند. سپس این غدد منجمد شده هموژنیزه شده و RNA موجود در آن با روش کیت استخراج total RNA شرکت سیناژن استخراج شد. مخزن حاوی mRNA بلافاصله در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. در مرحله بعدی با استفاده از آغاز گرهای طراحی

شده به همین منظور و روش RT-PCR، از این مخزن حاوی mRNA ژن مورد نظر بیرون کشیده شد. برای طراحی آغازگرها، توالی آمینو اسیدی سم بلند زنجیره مارکبری در نظر گرفته شد و بخشی از آن که شامل اسیدهای آمینه سیستمین شماره ۱۵ تا آلانین شماره ۴۶ است با در نظر گرفتن تمایل کدونی (Codon bias) باکتری *E. Coli* به توالی نوکلئوتیدی برگردانده شد. سپس ژن مورد نظر به کمک آغازگرهای طراحی شده طی مرحله RT-PCR از مخزن محتوی mRNA به دام انداخته شد. توالی آغازگر forward بصورت 5'-CTGGAATTCATGTGCGCACCTGGACAGAAC و توالی آغازگر reverse بصورت 5'-CATCTCGAGTTAAGCAGCACACCCCAATTC AAT طراحی شد. در مرحله بعد PCR معمولی برای تکثیر نسخه استخراج شده از RT-PCR در دماهای ۹۴، ۵۷ و ۷۲ درجه سانتیگراد به ترتیب در مدت زمان ۲ دقیقه، ۱ دقیقه و ۱ دقیقه به تعداد ۳۵ سیکل انجام شد.

پس از برش محصول PCR و نیز حامل PET32a(+) با استفاده از دو آنزیم برش *EcoRI* و *XhoI*، ژن و حامل جدا سازی و استخراج شدند. استخراج از ژل آگارز با استفاده از کیت BIONEER انجام گرفت. عمل جاگذاری در داخل حامل با استفاده از حامل پلاسمیدی PET (۰/۱۶۵ میکرو گرم یا ۰/۱۸ پیکومول)، قطعه خالص شده محصول PCR و آنزیم لیگاز انجام شد. انتقال حامل حاوی ژن مورد نظر به باکتری *E. coli* سویه اریگامی با استفاده از کیت فرمنتاز انجام شد. برای تایید عمل انتقال، آزمایش برش آنزیمی حامل استخراج شده با آنزیم های *EcoRI*، *XhoI* (دارای جایگاه برش) و *HindIII* (که در صورت حضور ژن در حامل، فاقد جایگاه برش است) انجام شد. حامل جدا شده برای تعیین توالی ارسال شد.

برای بیان پروتئین یک کلنی تازه از باکتری حامل وکتور در محیط LB حاوی ۱۰۰ میکرو گرم برمیکرو لیتر آمپی سیلین کشت داده شد و به مدت یک شب در دمای ۳۷ °C قرار گرفت. از محیط کشت داده شده به مقدار یک میلی لیتر به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت تازه اضافه شد و اجازه داده شد تا در دمای ۳۷ °C دانسیته نوری آن به ۰/۶ برسد؛ سپس برای القاء بیان، IPTG یک میلی مولار به محیط اضافه شد و محیط به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۲۵-۲۳ °C قرار داده شد. برای بررسی نحوه

سولفیدی بود و برای سنتز از روش اکسیداسیون در معرض هوا استفاده شد [۲]. برای این کار پپتید با غلظت $10^{-3} - 10^{-4}$ مولار در اسید استیک رقیق یا استات آمونیم حل شد و pH محلول بین ۷/۵ تا ۸ تنظیم شد. محلول در دمای اتاق در معرض هوا به هم زده شد. در نهایت پپتید با استفاده از تری فلورو استیک اسید بی حفاظ^۲ شده، با HPLC^۴ و بر روی ستون فاز معکوس Vydac C-18 semiprep و شیب غلظتی آب- استونیتریل حاوی ۰/۱٪ TFA، تخلیص و لیوفیلیزه و در دمای ۲۰ °C - نگهداری شد. خلوص بیش از ۹۵ درصدی پپتید با استفاده از ستون آنالیتیکال فاز معکوس Vydac C18 با HPLC تایید شد. برای تایید محتوای آمینو اسیدی آن از روش آنالیز آمینو اسیدی استفاده شد.

بررسی ساختار دوم پپتیدها با استفاده از تکنیک دو رنگ نمایی دورانی (CD) و در قدرت‌های یونی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. طیف‌های بدست آمده بر حسب تغییرات بیضی واری مولکولی علیه طول موج رسم شدند. دستگاه اسپکتروپلاریمتر استفاده شده Jasco-J715 بود. داده‌های خام CD با استفاده از رابطه زیر به بیضی واری مولکولی^۵ بر حسب $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ تبدیل شدند:

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{\theta_{\lambda} \cdot Mrw}{10LC}$$

θ_{λ} بیضی واری مشاهده شده بر حسب mdeg در طول موج λ و Mrw وزن متوسط پپتید مورد مطالعه است که از تقسیم وزن مولکولی آن بر تعداد اسید آمینه‌ها بدست می‌آید. C غلظت پپتید بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر و L طول مسیر طی شده بر حسب سانتیمتر است. ساختار پپتیدهای ۱۸ و ۳۱ اسید آمینه‌ای در حالت محلول و در pH های ۵ و ۸ بررسی شد (در اینجا pH=۸ نشان داده شده است). ساختار دوم سم نوروتوکسین تخلیص شده به منظور تایید ساختار دوم مولکول تخلیص شده و نیز به منظور مقایسه ساختار دوم آن با سایر پپتیدهای جدا شده، تنها در pH ۷ و در بافر فسفات مطالعه شد.

سم نوروتوکسین تخلیص شده (NTX-1) و پپتیدهای ۱۸ و

بیان در فواصل زمانی مختلف حدود ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت برداشت می‌شد و در بافر نمونه احیایی حل می‌شد تا در نهایت توسط ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گیرد.

پروتئین توأم بیان شده Trx-3 lmer (تیوردوکسین به همراه پپتید ۳۱ اسید آمینه ای) مورد نظر به علت داشتن برجسب هیستیدینی با ستون تمایلی نیکل-سفارز (Ni²⁺-NTA) قابل جداسازی است. پس از انجام خالص سازی با ستون نیکل و مشاهده نتیجه بر روی ژل SDS-PAGE، برای جدا سازی پپتید از ناحیه متیونین تعبیه شده در ژن اولیه، از سیانوزن برماید (CNBr) استفاده شد. برش پپتید از ناحیه متیونین مطابق روش گفته شده در پروتکل‌های مربوطه انجام شد [۱۰، ۳۲]. ابتدا حدود ۵ میلی گرم از پروتئین در ۱ میلی لیتر گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار و پس از آن در ۱ میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال حل شد. ۲۰ الی ۱۰۰ برابر وزن پروتئین سیانوزن برماید اضافه می‌شود؛ به این ترتیب در ازای هر میلی گرم پروتئین، ۲۰ میلی گرم بلور سیانوزن برماید به محلول اضافه شد و به مدت ۲۰ ساعت در دمای اتاق و زیر هود در تاریکی، هم زده شد. پس از ۲۰ ساعت برای توقف واکنش، محلول با آب مقطر به میزان ۵ برابر رقیق و با لیوفیلیزه کردن، واکنش کاملاً متوقف شد. در نهایت، محصول لیوفیلیزه شده واکنش با ستون کروماتوگرافی فیلتراسیون (Pharmacia, Superdex peptide 10/300 GL) Tricorn با دامنه جدا سازی پپتیدهای کوچک ۷۰۰-۱۰۰ متصل به دستگاه HPLC جدا سازی شد. بافر استفاده شده بافر فسفات ۰/۰۲ مولار با pH ۷/۲ و شدت جریان ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه انتخاب شد. برای تأیید ماهیت نمونه جدا سازی شده از روش هیدرولیز اسیدی و آنالیز اسید آمینه ای با دستگاه AminoNova استفاده شد.

اسید آمینه‌های محافظت شده، رزین‌ها و سایر مواد سنتز پپتید از کمپانی باخم (آلمان) خریداری شدند. پپتیدها به روش سنتز فاز جامد اسید آمینه^۱ Fmoc شده سنتز شدند و بصورت دستی با استفاده از ستون مخصوص واکنش^۲ بدنال هم سوار شدند. پپتید ۱۸ اسید آمینه‌ای سنتز شده دارای یک پل دی

3. Deprotected

4. High performance liquid chromatography (HPLC)

5. Molecular Ellipticity

1. N-9-fluorenylmethoxycarbonyl

2. Fritted glass reaction vessel

مولار استیل کولین رسید و سپس اثر نوروتوکسین بر روی آن مشاهده شد. زمان لازم برای توقف ۹۰٪ ماکزیمم تکانها در هر غلظت های ذکر شده برای نوروتوکسین ثبت شد.

برای مشاهده بستگی شدت پاسخ تکانه های عضله به دوزهای افزایشی استیل کولین به تنهایی و در حضور مولکول های مورد نظر، غلظت های استیل کولین از 10^{-7} تا 10^{-1} مولار بر روی بافت عضله آزمایش شد. سپس بافت کاملاً هر ۱۰ دقیقه و به مدت ۳۰ دقیقه شستشو داده شد تا تکانها به حالت عادی بازگشت. بعد از آن بافت عضله به مدت ۳ ساعت در معرض هر یک از مولکول ها قرار گرفت و بعد از گذشت ۳ ساعت، مجدداً دوز های افزایشی استیل کولین بر روی بافت آزمایش شد. در نهایت منحنی دوز-پاسخ در حضور مولکول ها، به صورت درصدی از پاسخ انقباضات عضله در عدم حضور مولکول ها (ماکزیمم پاسخ) رسم شد. غلظت مولکول های سم استفاده شده در آزمایش ها ۳/۵، ۵/۵ و ۱ میکرومولار بود که در مورد مولکول نوروتوکسین سم مار، غلظت ۵۰ و ۳۰ نانومولار نیز آزمایش شد.

دینامیک مولکولی پپتیدها در محیط نرم افزار Gromacs (3.3.1) انجام شد [۳۳، ۲۲، ۷]. از پارامتر های میدان نیروی GROMOS96 برای شبیه سازی استفاده شد [۳۴]. مدل مولکول آب استفاده شده spc216، و فضای جعبه اطراف مولکول $8 \times 8 \times 8 \text{ \AA}^3$ انتخاب شد. از شرایط حدی منظم و ضریب قطع ۱۰ آنگستروم برای برهمکنش های غیر پیوندی و الکتروستاتیک^۱ PME استفاده شد. از الگوریتم LINCS برای اعمال قیود استفاده شد [۱۵]. در هر بار شبیه سازی ابتدا سیستم به مدت ۵۰۰ گام با استفاده از الگوریتم steepest descent کمینه سازی شد و جعبه با استفاده از تعداد مناسب یونها خنثی شد. مدت زمان شبیه سازی برای مولکول های پپتید ۳۱ و ۱۸ اسید آمینه ای ۲۰ نانوثانیه بود. مراحل شبیه سازی دینامیک مولکولی به این شرح است: نخست به منظور کمینه سازی انرژی از روش steepest descent استفاده شد، به دنبال این مرحله ۲۰ پیکو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی با اعمال قیود موضعی^۲ به روش کوپلینگ فشار و دمای Berendsen

۳۱ اسید آمینه ای برای سنجش فعالیت احتمالی بصورت *in vitro* بر روی عضله دوقلوی گردنی جوجه مورد آزمایش قرار گرفتند. استفاده از عضله دو قلوی گردنی جوجه به عنوان روشی استاندارد برای بررسی اثر نوروتوکسین ها و میوتوکسین ها قبلاً گزارش شده است [۱۷، ۱۴].

برای انجام آزمایش ها از حمام عضو معمولی با تعداد ۴ کانال که ظرفیت هریک ۲۵ میلی لیتر بود استفاده شد. برای پر کردن هر یک از کانال ها از محلول فیزیولوژیک کریس (۷/۵- pH=۷/۳) در آب فاقد یون آماده شد و بطور دائم با گاز کربون هوادهی شد (۵٪ CO_2 و ۹۵٪ O_2). دمای حمام عضو ۳۷ درجه سانتیگراد بود و در تمام مدت آزمایش در همین دما ثابت نگاهداری شد. بافت های جدا شده ابتدا به مدت حداقل ۴۵ دقیقه تحت کشش یک گرم قرار می گرفتند و دائماً هوادهی شدند. شدت پاسخ های انقباضی عضله بر حسب گرم اندازه گیری و بیان شد. داده ها توسط دستگاه ثبت Powerlab 4sp (AD instruments, Australia) ثبت شدند و با نرم افزار مربوطه Chart5 قابل نمایش و بررسی شدند.

جوجه های ۷-۱۴ روزه با اثر به بیهوشی عمیق رفته و کشته شدند و هر یک از دو عضله گردنی آن ها مطابق روش ذکر شده در منابع [۳۱، ۲۹، ۲۳، ۲۰، ۱۲، ۱۱] جداسازی و در حمام عضو ۲۵ میلی لیتری سوار شد. پس از آویختن عضله تحت کشش ۱ گرمی در حمام عضو و به تعادل رسیدن آن در شرایط گفته شده به مدت ۴۵ دقیقه، استیل کولین با غلظت نهایی یک میلی مولار به حمام ۲۵ میلی لیتری اضافه شد. پس از نشان دادن حداکثر پاسخ انقباضی به استیل کولین، حمام به مدت ۳۰ دقیقه تا زمانی که انقباض ها به حد پایه باز گردد شستشو داده شد. سپس مولکول ها به مدت ۳ ساعت با عضله انکوبه شدند، بعد از این مدت زمان مجدداً عضله در معرض استیل کولین یک میلی مولار قرار گرفت. پاسخ انقباضی در این حالت نیز مشاهده و ثبت شده، پس از رسیدن به حداکثر انقباض در این حالت بار دیگر بافت با فواصل زمانی ۱۰ دقیقه به مدت ۳ ساعت شستشو شد تا برگشت پذیری اثر مولکول در صورت برگشت پذیر بودن، مشاهده شود. زمان لازم برای توقف ۹۰٪ تکانها یا t_{90} برای مقایسه میزان سمیت نوروتوکسین گزارش شد؛ به این صورت که ابتدا عضله به ماکزیمم میزان انقباض خود در غلظت ۱ میلی

1. Particle Mesh Ewald

2. Position-restraint dynamics simulations

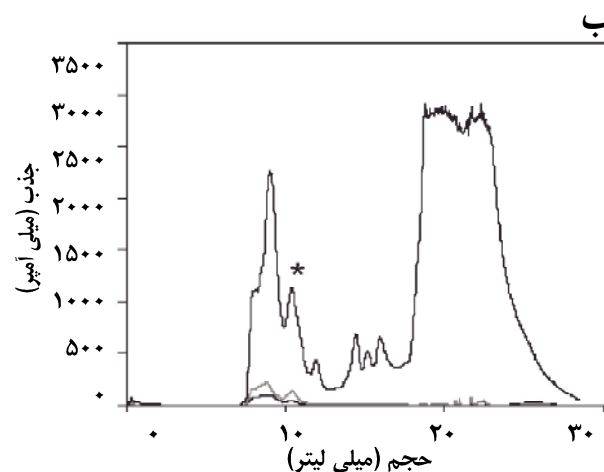
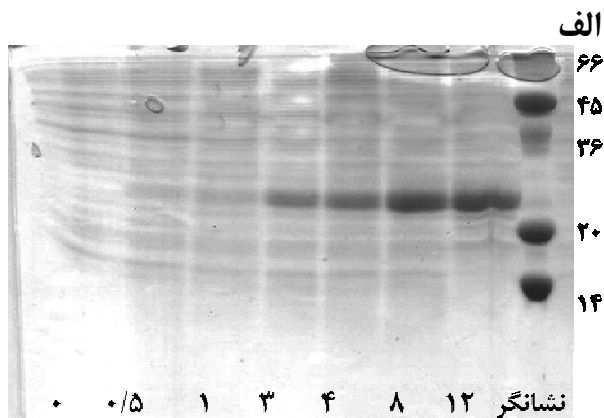
جدول ۱- برخی شاخص‌های پیش‌بینی شده و مشخصات فیزیکوشیمیایی پپتیدهای ۱۸ و ۳۱ اسید آمینه‌ای.

شاخص	بار کلی	ضریب خاموشی $\epsilon \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	نقطه ایزوالکتریک pI	توالی اسید آمینه	وزن مولکولی	تعداد اسید آمینه
۳۲/۷۶ (پایدار)	+ ۱	۱۱۱۲۵	۷/۷۳	TKTWCDAWCGSRGKVIEL	۲۰۵۳/۳	۱۸
۲۶/۶۹ (پایدار)	+ ۱	۱۲۷۴۰	۷/۸۲	CAPGQNLCYTKTWCDAWCGSRGKVIELGCAA	۳۳۰۵/۸	۳۱

در زیر آمده است:



توالی نوکلئوتیدی پپتید ۳۱ اسید آمینه‌ای بیان شده در حامل
بیانی PET32a(+) در ضمیمه تکمیلی مقاله قابل دسترسی



شکل ۱- الف- بیان ژن در حامل PET32a(+) در فواصل زمانی ۰، ۳۰، ۶۰، ۱۸۰، ۲۴۰، ۴۸۰ دقیقه و ۱۲ ساعت؛ القاء بیان با ۱ IPTG میلی مولار انجام شده است. نشان وزن مولکولی از بالا: ۶۶، ۴۵، ۳۶، ۲۰، ۱۴ کیلودالتون. ب- کروماتوگرام حاصل از جدا سازی پروتئین نوترکیب برش خورده با سیانوزن بر مایع روی ستون ژل فیلتراسیون Tricorn (Pharmacia, Superdex peptide 10/300 GL) متصل به دستگاه HPLC. چکاد متناظر با پپتید مورد نظر با ستاره مشخص شده است.

انجام گرفت [۶] و شبیه سازی دینامیک مولکولی نهایی برای
هریک از مولکول‌های ذکر شده، در مدت زمان‌های گفته شده
انجام گرفت.

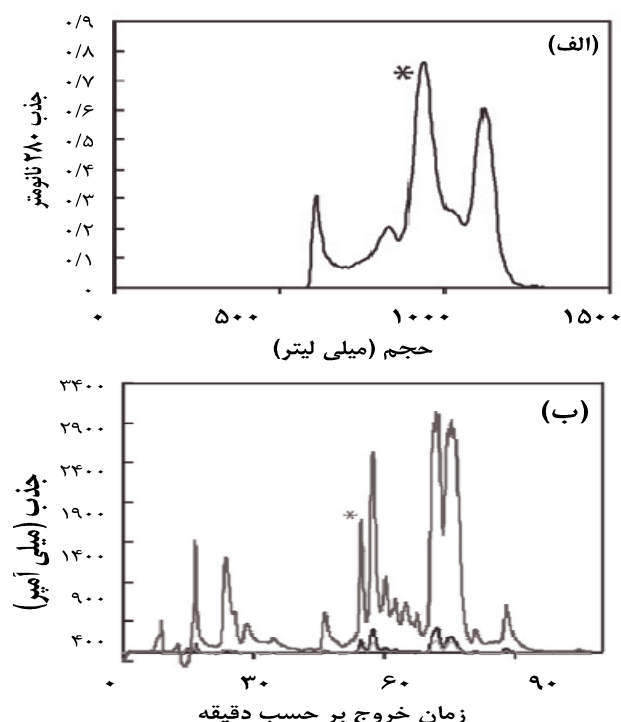
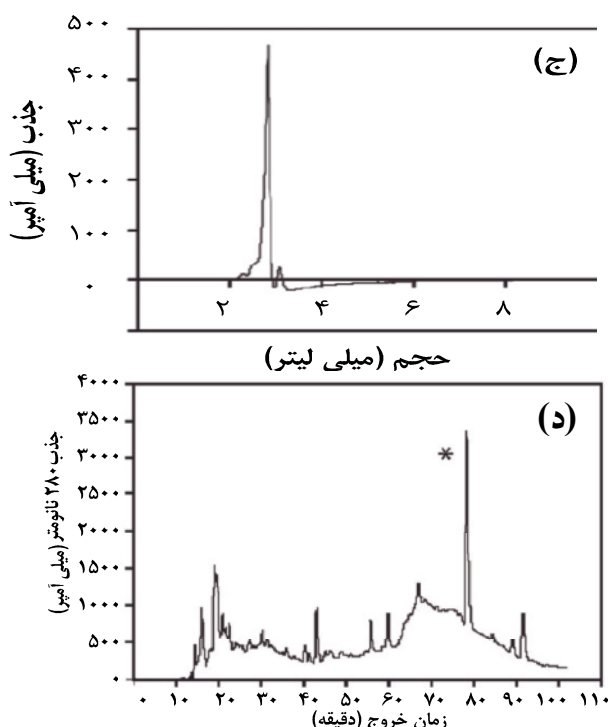
تحلیل داده‌های شبیه سازی دینامیک مولکولی با استفاده از
فرمان‌های موجود در بسته نرم افزاری Gromacs انجام
گرفت. محاسبه سطح در دسترس و پتانسیل الکتروستاتیک در
مولکول‌ها با استفاده از برنامه‌های swiss pdb viewer
VMD و [۱۸[13]] انجام شد.

یافته‌ها

یک تطبیق توالی^۱ معمول در میان آلفا نوروتوکسین‌ها نشان
می‌دهد بیشتر آمینو اسیدهای حفظ شده و واجد اهمیت
عملکردی، در ناحیه حلقه- یا انگشت - دوم واقع شده‌اند که این
واقعیت مبنای انتخاب اولیه ما محسوب می‌شود. چگونگی شکل
گیری این ناحیه در محیط آبی بصورت یک دُمین مجزا، ابتدا با
شبیه سازی دینامیک مولکولی توسط برنامه GROMACS طی
۲۰ نانو ثانیه بررسی شد؛ سپس قابلیت آن از لحاظ اتصال به
گیرنده استیل کولین در برنامه پیشگویی اتصال 3D-Dock
مطالعه شد. پایداری پیش بینی شده این پپتیدها و نیمه عمر
آن‌ها در انواع محیط‌ها، به همراه سایر شاخص‌های ساختاری و
فیزیکوشیمیایی در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

بررسی‌های اولیه وجود شاخص‌های مورد نظر -مانند
توانایی شکل‌گیری بصورت یک واحد ساختاری و عملکردی
مستقل، پایداری نسبی در محیط فیزیولوژیک و غیره- را در
ساختارها تأیید کردند. پس از این مرحله، ساختن پپتیدهای مورد
نظر با روش‌های متناسب با هدف، مثل بیولوژی مولکولی برای
تولید پپتید ۳۱ اسید آمینه‌ای و سنتز پپتید فاز جامد برای ساخت
پپتید ۱۸ اسید آمینه‌ای انجام شد. توالی‌های پپتیدهای تولید شده

1. Sequence alignment



پپتیدها با استفاده از تکنیک دورنگ نمای دورانی (Circular Dichroism) تا حد زیادی این نتایج را تأیید می‌کند.

سم نوروتوکسین مار کبری با کد بانک داده‌های پروتئینی NTX-1 (یا 1W6B) از تخلیص چکاد سوم ژل فیلتراسیون بر روی ستون C8 Semiprep متصل به دستگاه HPLC بدست آمد. نتیجه تخلیص در شکل ۲ نشان داده شده است. کروماتوگرام جداسازی زهر با ژل فیلتراسیون نشان دهنده ۴ چکاد اصلی است که چکاد سوم حاوی مولکول سم مورد نظر بود (تشخیص با استفاده از زمان خروج نشانگر وزن مولکولی قبل از تخلیص انجام شد). جدا سازی نوروتوکسین مورد نظر با تخلیص بیشتر این چکاد بر روی ستون C8 semiprep امکان پذیر شد (شکل ۲-ب). خلوص نمونه جدا شده با استفاده از ژل SDS-PAGE ۱۲٪ و نیز ستون آنالیتیکال C18 متصل به دستگاه HPLC تأیید شد (شکل ۲-ج) و در نهایت از سم نوروتوکسین مورد نظر برای انجام بررسی مقایسه ای توقف تکانه عصب-عضله استفاده شد.

نتیجه تخلیص پپتید ۱۸ اسید آمینه‌ای سنتز شده به روش فاز جامد با استفاده از ستون C18 Semiprep در شکل ۲-د نشان داده شده است، پپتید مورد نظر در شیب ۷۰٪ استونیتریل خارج شد و برای تأیید توالی آمینواسیدی، پس از هیدرولیز اسیدی با آمینو اسید آنالایزر مورد بررسی قرار گرفت. نمونه پپتید ۱۸ اسید آمینه‌ای سنتز شده پس از لیوفیلیزه شدن در دمای

شکل ۲-الف- کروماتوگرام ژل فیلتراسیون زهر مار کبری. تخلیص بر روی ستون G-50 (fine) انجام شده است و در نهایت چکاد سوم این تخلیص (در شکل با ستاره مشخص شده است) برای جدا سازی مولکول نوروتوکسین به ستون C8 semiprep منتقل شد. ب- کروماتوگرام چکاد سوم ژل فیلتراسیون که بر روی ستون C8 Semi-prep منتقل شده است. چکاد متناظر با مولکول نوروتوکسین با ستاره مشخص شده است. ج- نمایش خلوص نمونه جدا شده بر روی ستون C18 analytical. د- جدا سازی مولکول ۱۸ اسید آمینه ای بر روی ستون C18 Semiprep RP-HPLC

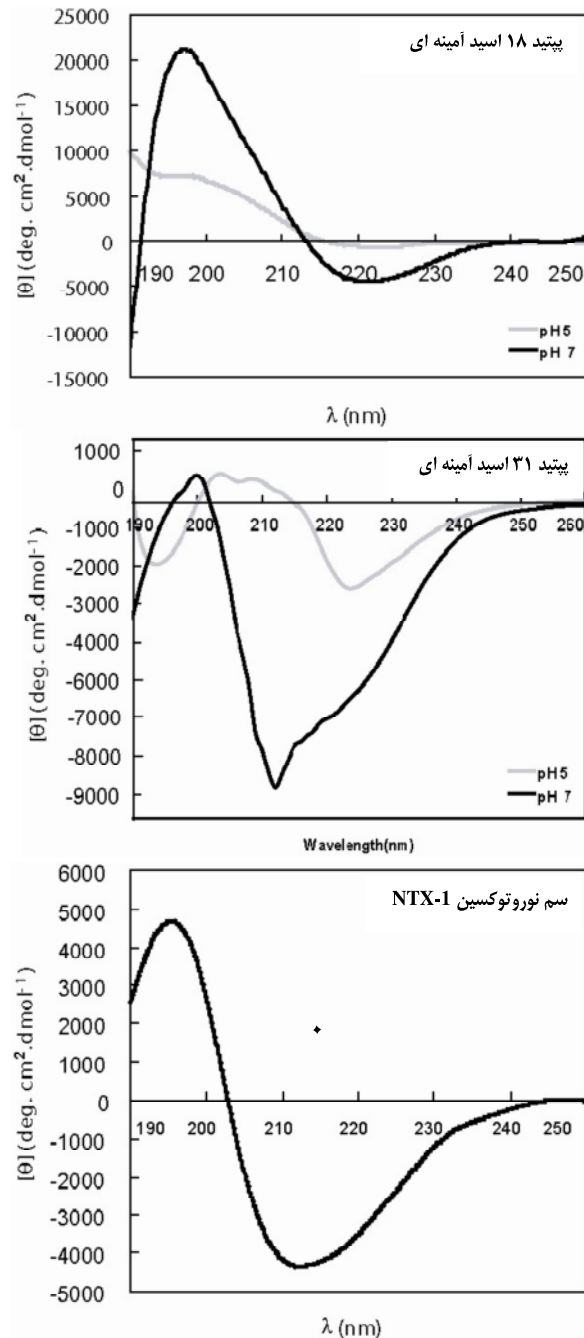
است و نتیجه تخلیص پروتئین بیان شده آن بر روی ژل SDS-PAGE در شکل ۱-الف نشان داده شده است. وزن مولکولی پروتئین نو ترکیب بیان شده که متشکل است از پروتئین تیوردوکسین و پپتید ۳۱ اسید آمینه ای، در روی ژل SDS-PAGE اندکی پایینتر از ۲۵ کیلودالتون قرار می‌گیرد. شکل ۱-ب کروماتوگرام حاصل از برش پروتئین بیان شده با استفاده از سیانوژن برامید را با استفاده از ستون ژل فیلتراسیون Tricorn (Pharmacia) نشان می‌دهد. پیش از جدا سازی نمونه پروتئینی، زمان خروج نمونه‌ها از ستون با استفاده از استاندارد وزن مولکولی تخمین زده شد.

مطالعه شبیه سازی انجام شده از ساختار قطعات پپتیدی، نشان دهنده آن است که ساختار غالب پپتید ۱۸ اسید آمینه‌ای به تدریج به سمت ساختار دور بتا و ساختار غالب پپتید ۳۱ اسید آمینه‌ای به سمت مخلوطی از ساختار های دور بتا و صفحات پیچ خورده ناموازی بتا متمایل شده است. مطالعه ساختار محلول در آب

محلول در آب را بدست دهد. درصد تقریبی این ساختارها بیانگر غالب بودن ساختار دور بتا در پپتید ۱۸ اسید آمینه ای، مخلوطی از ساختار مارپیچ-صفحات بتا در پپتید ۳۱ اسید آمینه ای و ساختار صفحات بتا در مولکول NTX-1 (نوروتوکسین) است. اثر مولکول نوروتوکسین سم مار جدا شده (NTX-1) بر روی عضله گردنی جوجه با غلظت های ۱ میکرومولار، ۵/۰، ۳ میکرومولار، ۰/۳، ۵۰ نانومولار و ۳۰ نانومولار بررسی شد ($n=3$). انکوبه کردن بافت عضله با مولکول سم نوروتوکسین NTX-1 به مدت ۱۸۰ دقیقه تا غلظت ۵۰ نانومولار، به تک دوز استیل کولین با غلظت ۱ میلی مولار و منحنی دوز-پاسخ استیل کولین از 10^{-7} تا 10^{-1} مولار پاسخ نداد و باعث توقف کامل و برگشت ناپذیر تکانه‌ها شد (شکل ۴-الف). در غلظت ۳۰ نانومولار سم، تکانه‌ها تا حدود $9 \pm 1\%$ برگشت پذیر بودند. در شکل ۴-ب، نمونه ای از پاسخ ثبت شده عضله در برابر اضافه کردن محرک استیل کولین دیده میشود. غلظت های استفاده شده برای مولکول های ۱۸ و ۳۱ اسید آمینه‌ای ۱، ۵/۰ و ۰/۳ میکرومولار انتخاب شد و زمان انکوباسیون با بافت ۱۸۰ دقیقه بود. مولکول ۱۸ اسید آمینه ای اثر مشهود را تنها در غلظت ۱ میکرومولار نشان داد. در این غلظت تکانه‌ها به اندازه ۶۷٪ متوقف شدند و همچنان بازگشت ناپذیر بودند (شکل ۴-ج). در غلظت ۵/۰ میکرومولار توقف تکانه‌ها به اندازه ۱۷٪ و در غلظت ۰/۳ میکرومولار توقف تکانه‌ها ۹/۷٪ مشاهده شد. در مولکول ۳۱ اسید آمینه ای نیز توقف مؤثر تکانه‌ها تنها در غلظت های بیش از ۵/۰ میکرومولار اتفاق افتاد و در غلظت ۵/۰ و ۱ میکرومولار توقف تکانه‌ها به ترتیب ۲۲٪ و ۷۶٪ مشاهده شدند (شکل ۴-د).

بحث

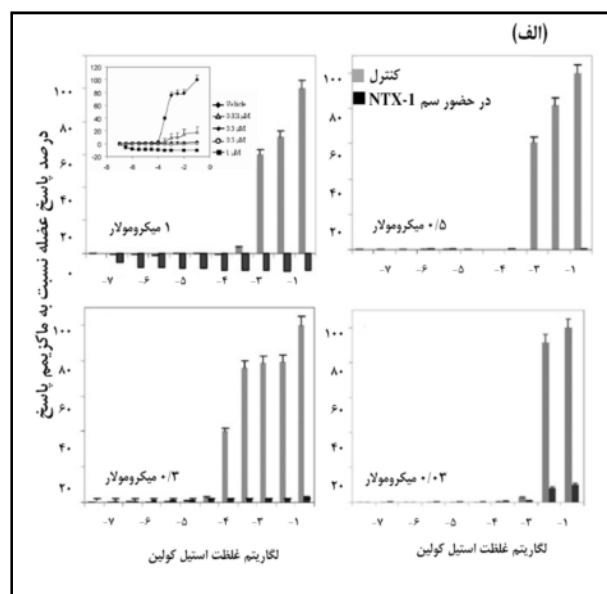
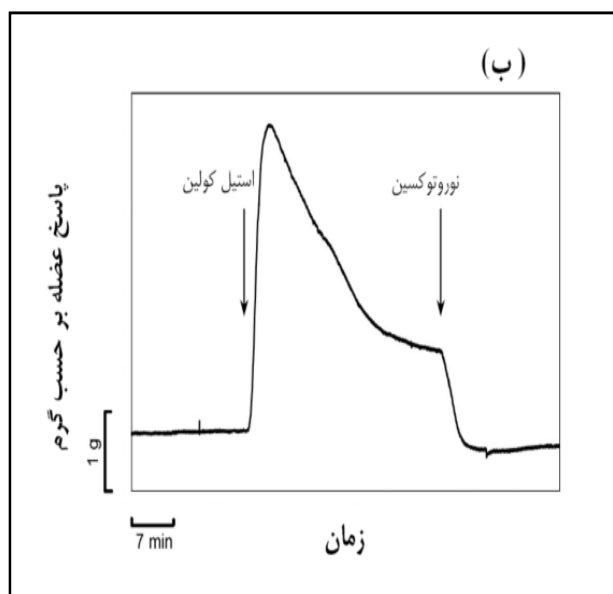
داده‌های ساختاری مربوط به مولکول‌های جدا شده از سم مادر (نوروتوکسین NTX1) بیانگر آن است که این مولکول‌ها قابلیت سرشته شدن (Folding) بصورت واحدهای مجزای ساختاری را در محیط آبی دارند. ساختارها به گونه‌ای انتخاب شده بودند که حداقل پایداری را با توجه به مصالح ساختاری، مانند پل دی‌سولفید و صفحات ناموازی بتا داشته باشند.



شکل ۳- طیف دو رنگ نمایی دورانی ساختار دوم مولکول های سم NTX1، ۳۱ اسید آمینه ای و ۱۸ اسید آمینه ای در ناحیه دور ماوراء بنفش.

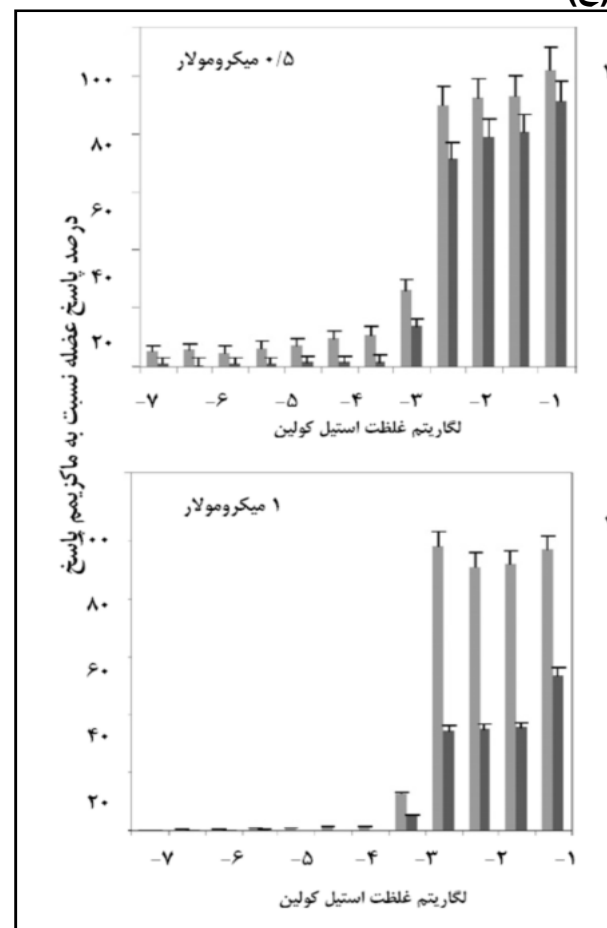
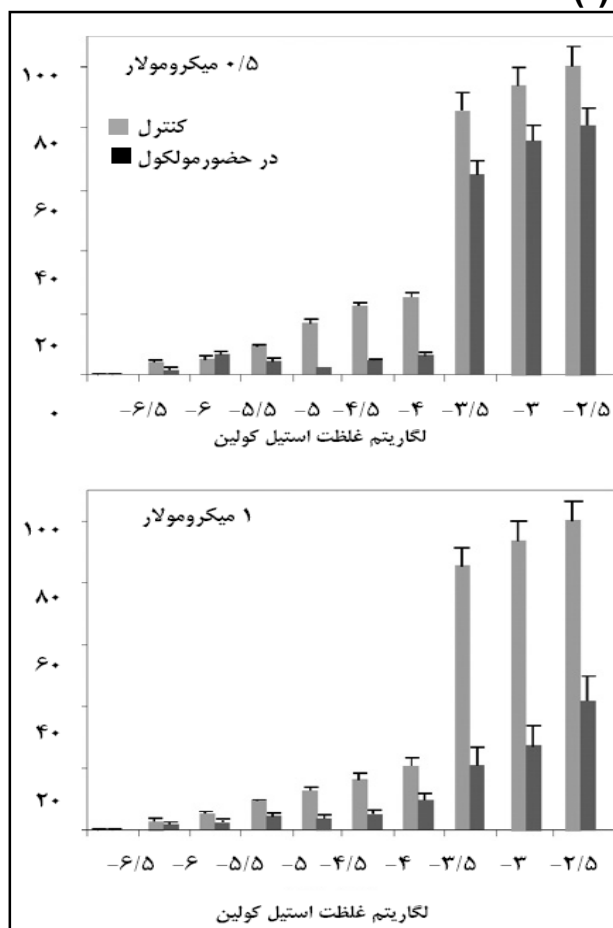
20°C - نگهداری شد تا جهت بررسی‌های ساختاری و عملکردی توقف تکانه‌های عصب- عضله مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج بررسی ساختار دوم محلول در آب پپتیدهای ۱۸ و ۳۱ اسید آمینه‌ای؛ همچنین ساختار دوم نوروتوکسین مار کبری در شکل ۳ نشان داده شده است. آنالیز طیف های بدست آمده با نرم افزار Jasco وابسته به دستگاه اسپکتروپلاریمتر دورنگ نمایی دورانی قادر است تا حد قابل قبولی تخمینی از ساختار دوم مولکول



(ب)

(الف)



(د)

(ج)

علیرغم این ملاحظات اولیه، تغییرات ساختارها در طول زمان در شبیه سازی دینامیک مولکولی و بررسی خط سیر^۱ دینامیک در این مولکول‌ها- در ۲۰ نانوثانیه نخست- نشان

شکل ۴-الف- تأثیر مولکول سم NTX1 بر روی عضله CBCM. منحنی الصاق شده در داخل تصویر شکل اولیه منحنی دوز-پاسخ بر حسب غلظت استیل کولین را نشان میدهد. ب- نمونه ای از پاسخ عضله به محرک استیل کولین. ج- تأثیر مولکول ۱۸ اسید آمینه ای بر روی عضله CBCM غلظت ۰/۵ و ۱ میکرومولار. د- تأثیر مولکول ۳۱ اسید آمینه ای بر روی عضله CBCM غلظت ۰/۵ و ۱ میکرومولار.

1. Trajectory

در نتیجه اتصال چندگانه سم اصلی هستند، طبیعتاً اثر محدود تری اعمال می کنند.

بطور خلاصه می توان چنین نتیجه گیری کرد که بخش اصلی و تعیین کننده در تأثیر مولکول های نوروتوکسین بلند زنجیره، حلقه دوم است که به خودی خود می تواند به صورت یک واحد مجزا نیز عمل نماید، اما اتصالات برقرار شده در سایر نقاط سم نوروتوکسین، به ویژه نوک حلقه ۳ و دم بلند انتهای C در القای توان مولکول سم بسیار مؤثرند و نقش مکمل را ایفا می کنند. با توجه به عملکرد اختصاصی و انتخابی نوروتوکسین های مار در اتصال به گیرنده های استیل کولین، این مولکول ها می توانند برای طراحی ترکیبات دارویی مؤثر بر گیرنده های استیل کولین الگو های بسیار مناسبی باشند و با دستکاری هدفمند برخی خصوصیات آن ها، می توان ویژگی های دلخواه را در اتصال به گیرنده هدف ایجاد کرد. بررسی جزئیات برهمکنش سموم طبیعی (مانند نوروتوکسین ها) با گیرنده های استیل کولین با استفاده از روش های تجربی (ترکیبات نشان دار، جهش زایی در مکان های خاص و غیره) و روش های محاسباتی و پیشگویی اتصال، امکان پذیر است و ادغام این روش ها، در طراحی سیستماتیک ترکیبات دارویی رهبر بسیار مؤثر خواهد بود.

سپاسگزاری

با تشکر ویژه از همکاری جناب آقای دکتر محمدپور رئیس بخش جانوران سمی مؤسسه سرم سازی رازی، جناب آقای دکتر زارع؛ گروه فارماکولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه تربیت مدرس.

منابع

- [۱] خیرآبادی میترا، خالص سازی و بررسی دینامیک مولکولی پپتید آلفا نوروتاکسین مار کبری ایرانی (*Naja naja oxiana*) توسط روش تعویض هیدروژن-دوتریوم با NMR و شبیه سازی. پایان نامه کارشناسی ارشد، تهران: دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۸۵
- [2] Amblard M, Fehrentz JA, Martinez J, Subra G, Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis.

دهنده چند نکته اساسی است: ۱- در مولکول ۳۱ اسید آمینه ای با فرض سرشته شدن ساختار بصورت مورد نظر، به تدریج به شکل پیچ خورده در می آید و به نظر می رسد که نیرو های بین مولکول ها در حالت محلول، ساختار مولکول ۳۱ اسید آمینه ای را به شکل تابدار^۱ سوق می دهد. ۲- مولکول ۱۸ اسید آمینه ای با توجه به ساختار تقلیل یافته تری که نسبت به مولکول ۳۱ اسید آمینه ای دارد و نیز وجود یک پل دی سولفید، در محیط آبی تغییرات کمتری نسبت به زمان نشان می دهد. در نهایت کلیه ساختار های بتا در این مولکول به سمت β -turn و β -bridge متمایل شده اند. بررسی ساختار دوم این پپتیدها با استفاده از تکنیک دو رنگ نمایی دورانی نیز تأیید کننده این نکته است.

تأثیر سم نوروتوکسین مار کبری بر روی عضله جدا شده، تا غلظت ۵۰ نانومولار اثری برگشتناپذیر و فوری است (دقیقه ۵ $t_{90} = 1 \mu M$). تأثیر این سم بر روی عضله گردن جوجه وابسته به زمان و وابسته به دوز بود و با توجه به طبقه بندی این سم، این اثر در رده اثرات پس-سیناپسی رده بندی می شود. ملاحظه تأثیر مولکول های ۱۸ و ۳۱ اسید آمینه ای نشان داد که این مولکول ها با غلظت های به مراتب بیشتری اثرات خود را اعمال می کنند (حداقل ۲۰ برابر) اما این اثرات همچنان برگشتناپذیر هستند. نکته حائز اهمیت در باره نحوه اثر مولکول های ۱۸ و ۳۱ اسید آمینه ای این است که کاملاً وابسته به دوز استیل کولین عمل می کنند و در غلظت های کم (زیر ۰/۵ میکرومولار) بیشترین اثر را در دوز های کمتر از یک میلی مولار استیل کولین نشان می دهند. با توجه به رقابت این مولکول ها با مولکول استیل کولین می توان نتیجه گیری کرد که جایگاه اتصال این مولکول ها با استیل کولین تداخل دارد و اثر آن ها از نوع پس سیناپسی است.

به نظر می رسد که همانگونه که پیش بینی شده بود این مولکول ها علاوه بر داشتن ساختار در شکل محلول، قادر هستند عملکرد نسبی را در مقایسه با سم اصلی نشان دهند. سم مادر (NTX1) اتصالی چند نقطه ای با گیرنده برقرار می کند که این شکل اتصال تضمین کننده توان (potency) سم نوروتوکسین بلند زنجیره است؛ اما مولکول های کوچکتری که از این ساختار مشتق شده اند به علت این که فاقد تمامیت ساختار سه بعدی و

1. Twisted

- [15] Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM, LINCS: A linear constraint solver for molecular simulation. *J Comput Chem* 18(1997)1463-1472.
- [16] Hodgson WC, Wickramaratna JC, In vitro neuromuscular activity of snake venoms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29 (2002) 807-814.
- [17] Hodgson WC, Eriksson CO, Alewood P F, Fry BG, Comparison of the in vitro neuromuscular activity of venom from three Australian snakes (Hoplocephalus stephensi, Austrelaps superbus and notechis scutatus): efficacy of tiger snake antivenom. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30 (2003) 127-132.
- [18] Humphrey W, Dalke A, Schulten K, VMD, Visual Molecular Dynamics. *J Molec Graphics* 14 (1996) 33-38.
- [19] Karlin A, Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Reviews* 3 (2002) 102-114.
- [20] Kuruppu S, Reeve S, Smith AI, Hodgson WC, Isolation and pharmacological characterisation of papuatoxin- a postsynaptic neurotoxin from the venom of the Papuan black snake (Pseudechis papuanus). *Biochem Pharmacol* 70 (2005) 794-800.
- [21] Kumar ,Understanding the structure, function and folding of cobra toxin. *Proc Natl Sci Counc* (Review) 23 (1999) 1-19
- [22] Lindhal E, Hess B, van der Spoel D, Gromacs 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J Mol Mod* 7(2001) 306-317.
- [23] Lumsden NG, Fry BG, Ventura S, Kini RM, Hodgson WC, Pharmacological characterisation of a neurotoxin from the venom of Boiga dendrophila (Mangrove catsnake). *Toxicon* 45 (2005) 329-334.
- [24] Meldrum BS, The action of snake venoms on nerve and muscle. *Pharmacol Rev* 17(1965) 393-445.
- [25] Moise L, Piserchio A, Basus VJ, Hawrott E, NMR structural analysis of α -bungarotoxin and its complex with the principal α -neurotoxin-binding sequence on the $\alpha 7$ subunit of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor, *J Biol Chem* 277 (2002)12406-12417.
- [26] Nirthanen S, Gwee M C E, Three-finger α -neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J Pharmacol Sci* 94 (2004)1-17.
- [27] Samson AO, Scherf T, Eisentein M, Chill JH, Anglister J, The mechanism for acetylcholine receptor inhibition by α -neurotoxins and species-specific resistance to α -bungarotoxin revealed by NMR. *Neuron*, 35(2002)319-332.
- [28] *SPDBViewer 3.7* (<http://expasy.org/spdbv/>)
- Mol Biotech* 33 (2006) 239-354.
- [3] Antil S, Servent D, Ménez A, Variability among the sites by which curaremimetic toxins bind to Torpedo acetylcholine receptor, as revealed by
- [4] Arias HR, Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brian Res Rev* 25 (1997)133-191.
- [5] Balass M, Katchalski-Katzir E, Fuchs S, The α -bungarotoxin binding site on the nicotinic acetylcholine receptor: analysis using a phage-epitope library. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997)6054-6058.
- [6] Berendsen HJC, Postma JPM, DinNola A, Haak JR, Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* 81(1984) 3684-3690.
- [7] Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R, GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp Phys Comm* 91(1995) 43-56.
- [8] Bourne Y, Talley TT, Hansen SB, Taylor P, Marchot P, Crystal structure of a Cbtx-AChBP complex reveals essential interactions between snake a-neurotoxins and nicotinic receptors. *Euro Mol Biol Org* 24 (2005) 1512-1522.
- [9] Chang CC, *Handbook of experimental pharmacology*. 52 (1979) 309-376.
- [10] Christie D, Gagnon J, Isolation, characterization and N-terminal sequences of the CNBr-cleavage peptides from human complement Factor B, *Biochem J* 202 (1982) 555-567.
- [11] Clarke C, Kuruppu S, Reeve S, Smith AI, Hodgson WC, Oxylepitoxin-1, a reversible neurotoxin from the venom of the inland taipan (Oxyuranus microlepidotus). *Peptides* 27 (2006) 2655-2660.
- [12] Ginsborg BL, Warriner J, The Isolated chick biventer cervix nerve-muscle preparation. *Br J Pharmacol* 15 (1960) 410-411.
- [13] Harel M, Kasher R, Nicolas A, Guss JM., Balass M, Fridkin M, Smit AB, Brejc K, Sixma TK, Katchalski-Katzir E, Sussman JL, Fuchs S, The binding site of acetylcholine receptor as visualized in the x-ray structure of a complex between α -bungarotoxin and a mimotope peptide. *Neuron* 32 (2001) 265-275.
- [14] Harvey AL, Barfaraz A, Thomson E, Faiz A, Pretson S, Harris JB, Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. *Toxicon* 32 (1994) 257-265.

- Apol E, Meulenhoff PJ, Tieleman DP, Sijbers ALTM, Feenstra KA, Van Drunen R, Berendsen HJC, **Gromacs User Manual version 3.2**, 2004.(www.gromacs.org)
- [34] Van Gunsteren WF, Kruger P, Billeter SR, Mark AE, Eising AA, Scott WRP, Huneberger PH, Tironi IG, Bimolecular Simulation: **The GROMOS96 Manual and User Guide**. (1996)
- [35] Young HS, Herbette LG, Skita V, α -Bungarotoxin binding to acetylcholine receptor membranes studied by low angle x-ray diffraction. **Biophys J** 85 (2003) 943–953.
- [36] Zeng H, Hawrot E, NMR-based Binding Screen and Structural Analysis of the Complex Formed between α -Cobratoxin and an 18-Mer Cognate Peptide derived from the $\alpha 1$ Subunit of the Nicotinic Acetylcholine Receptor from *Torpedo californica*. **J Biol Chem** 277 (2002) 37439–37445.
- [29] Sullivan D, Chiara DC, Cohen JB, Mapping the agonist binding site of the Nicotinic acetylcholine receptors, **Mol Pharmacol** 61(2002)463–472,
- [30] Takacs Z, Wilhelmsen C.K, and SorotaSnake S, α -Neurotoxin Binding Site on the Egyptian Cobra *Naja haje*. **Mol Biol Evol** 18 (2001)1800–1809.
- [31] Takayanagi I, Suzuhigashi K, Ishii Y, Koike K, Pharmacological properties of acetylcholine receptor in molluscan smooth muscle **Japan J Pharmacol** 33 (1983) 698-701.
- [32] Ueda T, Ohkuri T, Imoto T, Identification of the peptide region that folds native conformation in the early stage of the renaturation of reduced lysosyme. **Biochem Biophys Res Comm** 1996 (228) 203-208.
- [33] Van der Spoel D, Lindhal E, Hess B, Van Buuren AR,