

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
ОВАЛЬБУМИНА В ПРИСУТСТВИИ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ
ПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА
КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

Направления 06.03.01 биология

Биологического факультета

Кузнецова Григория Владимировича

Научный руководитель:

Доцент кафедры биохимии
и биофизики, к.б.н., доц.

Ю.П. Федоненко

Зав. кафедрой биохимии и
биофизики д.б.н., проф.

С.А. Коннова

Саратов 2020 год

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БИ – ближний инфракрасный спектр
- ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия
- ИК – инфракрасный спектр
- КД – круговой дихроизм
- ККД – колебательный круговой дихроизм
- КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза
- ЛКП – левая круговая поляризация
- МКД – магнитный круговой дихроизм
- ПКП – правая круговая поляризация
- УФ – ультрафиолетовый спектр
- ФДКД – флуоресцентно детектируемый круговой дихроизм
- BSA – бычий сывороточный альбумин
- DS – декстрансульфат
- HEWL – яичный лизоцим
- IEF – паттерны изоэлектрического фокусирования
- OVA – яичный овальбумин
- SH – тиоловая группа
- SS – дисульфидная группа

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Многообразие белков и выполняемых ими функций, объясняемое явлениями модификации и образованием белковых комплексов, является основой существования биологических систем. Исследование пространственной структуры белков – одна из ключевых задач современной молекулярной биологии, поскольку именно пространственной структурой белков объясняются их биологические функции.

Исследования в данной области являются актуальными, поскольку позволяют изучать конформационные изменения белковых и полисахаридных компонентов бактерий при различных, в том числе физиологических, условиях, что расширяет понимание изменений биомолекул в живых организмах.

Прикладной аспект применения исследований пространственной структуры биологических веществ позволяет считать их одним из приоритетных направлений современной биотехнологии.

Степень разработанности темы исследования

За последние десятилетия с применением методов кругового дихроизма были охарактеризованы пространственные структуры большого количества белков. В ходе исследований были определены модельные объекты исследований; объяснены особенности изменения пространственных структур белков; составлены базы данных, содержащие сведения об отличиях пространственной структуры белков при различных внешних условиях; а также разработаны программы, анализирующие данные, полученные методом кругового дихроизма, и позволяющие осуществлять моделирование белковых молекул.

В настоящий момент метод кругового дихроизма и связанные с ним математические и биоинформационные методы применяются для анализа пространственной структуры не только белков, но и полисахаридов и

комплексов «белок-полисахарид» при различных температурах, давлении, в присутствии неорганических соединений и т.д.

Таким образом, метод КД широко применяется в современных исследованиях особенностей пространственной структуры белков в нативном состоянии или при различных условиях (температура, давление, присутствие органических или неорганических веществ и т.д.).

Цель исследования

Целью данной работы является критический анализ научных публикаций с целью рассмотрения возможности использования метода спектроскопии кругового дихроизма для исследования особенностей структурных изменений овальбумина в присутствии экстраклеточных полисахаридов бактерий.

Задачи исследования

1. проанализировать научные публикации по заявленной проблеме (исследование методом кругового дихроизма особенностей пространственной структуры белков);
2. ознакомиться с принципом метода кругового дихроизма и его модификаций;
3. описать возможность использования метода кругового дихроизма для характеристики изменения структуры модельных белков, вызванные взаимодействием с полисахаридами, в том числе и бактериального происхождения;
4. с использованием данных научных литературных источников, спрогнозировать изменение в пространственной структуре яичного овальбумина в присутствии экстраклеточных полисахаридов бактерий.

Структура и объем работы

Бакалаврская работа изложена на 40 страницах машинописного текста, содержит 4 иллюстрации. Состоит из следующих разделов: содержание, список сокращений, введение, обзор литературы, выводы, заключение, список используемой литературы. Библиографический указатель включает 49

источников по 2019 год включительно, из них 2 отечественных и 47 – зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Пространственная структура белков

Ключевыми процессами, определяющими пространственную структуру белка и, как следствие, выполняемую им функцию, являются: фолдинг («сборка» биологически активной структуры белка), анфолдинг («разборка» белка), мисфолдинг («частичная разборка» белка) и рефолдинг («пересборка» белка).

Для определения пространственной структуры белка разработано множество методов, в число которых входит также метод кругового дихроизма.

Круговой дихроизм как метод исследования белков

Круговой дихроизм (КД) — один из эффектов оптической анизотропии, проявляющийся в различии коэффициентов поглощения света, поляризованного по правому и левому кругу. Различные типы регулярных компонентов вторичной структуры в белках приводят к появлению характерных спектров КД в дальнем УФ диапазоне.

В настоящее время спектры КД, можно получать, например, с помощью дихрографов.

Этот метод позволяет оценить симметричность поглощающей молекулы. Если молекула не имеет центра инверсии, то она неодинаково поглощает право- и левополяризованные световые волны, так как соответствующие дипольные моменты переходов не совпадают друг с другом. Поэтому метод КД широко применяется в исследованиях белков, содержащих в своем составе асимметричные компоненты.

Структурные изменения белков при взаимодействии с лигандами являются неотъемлемой частью механизма их действия и регуляции биологической активности. КД представляет собой очень удобный способ обнаружения таких изменений, которые можно исследовать в разных

спектральных областях. Метод спектроскопии КД можно использовать для оценки концентраций лигандов, на участках которых происходят структурные изменения, степени изменений интересующего белка и (с использованием исследований КД с временным разрешением) скорости, с которой происходят такие изменения. КД особенно ценен при изучении пептидов, где рентгеновская кристаллография обычно неосуществима, например, прионных пептидах в состоянии переключения между альфа-спиральными и бета-листовыми структурами.

Для метода КД было разработано несколько модификаций, основанных на различных физических свойствах исследуемых материалов. К таким модификациям относятся: магнитный круговой дихроизм (МКД, измерение разницы в поглощении света с ЛКП и ПКП, индуцированного в образце сильным магнитным полем); флуоресцентно-детектируемый круговой дихроизм (ФДКД, измерение дифференциального излучения света от образца, возбуждаемого излучением ЛКП и ПКП); БИС-КД (применение кругового дихроизма в ближней инфракрасной области); колебательный круговой дихроизм (ККД, определение разницы в поглощении, которое вещество проявляет между право- и левополяризованным светом).

Модельные объекты для определения пространственной структуры белков методом кругового дихроизма.

Объектом исследований особенностей вторичной, супервторичной и третичной структуры в разных условиях методом КД становятся белки, характеризующиеся термолабильностью, низкой устойчивостью к действию кислот и оснований, чувствительностью к физическим воздействиям, способностью образовывать комплексы с органическими и неорганическими молекулами, биологически значимыми функциями. Обратимые изменения пространственной структуры белка в нестандартных условиях под воздействием физических, химических и биотических факторов позволяют выявлять наличие/отсутствие специфических структурных изменений,

изменение соотношения отдельных элементов пространственной структуры посредством снятия спектров КД. Полученные данные позволяют моделировать особенности структуры молекулы белка при определенном воздействии.

Одним из модельных объектов подобных исследований методом КД являются белки куриного яйца.

В настоящее время одним из наиболее распространенных модельных объектов для исследований методом КД структуры белков в различных условиях является лизоцим яичного белка (Hen egg-white lysocime, далее HEWL). Полная первичная структура HEWL впервые была установлена в 1963 году, и чуть позднее, в 1965 году, была определена трёхмерная структура HEWL.

Широкий спектр знаний о HEWL и наличие информации о его структуре во множестве биологических баз данных объясняет факт того, что HEWL является основным модельным белком в структурных исследованиях с применением методов КД.

В последние два десятилетия активно изучаются особенности изменения структуры HEWL с использованием метода КД при различных условиях (при растворении в дейтериевой воде; в присутствии олигомерных аминокислотных последовательностей; в присутствии хемотрипсина под давлением; в присутствии кремниевых наночастиц; при метилировании остатков лизина и т.д.).

Одним из модельных объектов является яичный овальбумин (далее OVA). За последние два десятилетия был проведен ряд исследований особенностей структуры OVA при различных условиях (структурно-функциональные отличия OVA от ингибитора $\alpha 1$ -протеиназы; особенности структурного изменения OVA при фосфорилировании в присутствии пиррофосфата при нагревании и т.д.).

В последние годы как модельный объект также набирают популярность бычий сывороточный альбумин (БСА) и иные белки группы альбуминов.

Применение метода кругового дихроизма при исследовании особенностей пространственной структуры полисахаридов

Метод КД также широко используется для изучения структуры поли- и олигосахаридов в обычном состоянии, либо в комплексе с другими видами соединений. В отличие от изучения белков методом КД, методы изучения поли- и олигосахаридов не имеют общепринятого модельного объекта и проводятся индивидуально для каждого поли- или олигосахарида. Однако мало что известно о том, как конформация полисахаридов может влиять на их функции – вероятно, из-за отсутствия инструментов для отслеживания динамических структурных изменений углеводов.

КД является ценным инструментом для использования в усилиях по функциональной гликомике, которые стремятся согласовать химическую и конформационную структуру с биологической активностью.

Изучение полисахаридов методом КД позволяет выявить ряд их структурных особенностей. Например, положение связей мономеров; конформации мономеров, способность изменять свою структуру при соединении дополнительных стабилизирующих/дестабилизирующих факторов различной природы и т.д.

Применение метода кругового дихроизма при исследовании особенностей пространственной структуры белков в присутствии полисахаридов

В последнее время были предприняты многочисленные исследования белково-полисахаридных систем, которые ведут к лучшему пониманию ключевых параметров, подразумеваемых в белок-полисахаридных взаимодействиях. Разрабатываются микроскопические методы для описания структурообразования в смешанных системах. Также достигнут прогресс в описании механизмов, лежащих в основе процессов фазового разделения с использованием методов рассеяния.

Основная проблема в понимании фундаментальной структурной основы взаимодействия макромолекул в растворе состоит в измерении их по отдельности. Определение взаимодействия между белками и полисахаридами является особенно сложным. Полисахаридный компонент часто является очень большим (10 кДа–1 МДа) и неподвижным, или он подвергается анизотропному движению в растворе. Кроме того, он часто демонстрирует сигналы в тех спектральных областях, которые обычно используются для вторичного структурного анализа белка методом КД.

Для изучения особенностей структурных изменений белков и протеинов при их взаимодействии с полисахаридами за последние два десятилетия был проведен ряд исследований. Например, рассматривались условия вторичных структурных изменений белка в водных комплексах белков и полисахаридов; взаимодействие карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) и производного хитина глутамат-глюкана с OVA; взаимодействие антимикробных пептидов кателицидина с бактериальными полисахаридами; и т.д.

Исходя из сравнительного анализа современной литературы можно сделать вывод, что взаимодействие полисахаридов с белковыми молекулами катализирует интенсивное образование альфа-спиральных конформаций, а образование бета-структур, напротив, угнетается. В случае OVA образование альфа-спиралей объясняется возможностью возникновения новых SS-мостиков, либо изменением структуры уже существующих. Повышенное образование альфа-спиральных конформаций приводит к возникновению белково-полисахаридных агрегатов, что угнетает биологическую функцию белка.

ВЫВОДЫ

1. Большое количество научных публикаций свидетельствуют об активном использовании метода КД в различных модификациях в исследованиях особенностей пространственной структуры белков, в том числе и при межмолекулярных взаимодействиях.

2. Спектроскопия КД – очень важный физический метод, и охватывающий структурные и стереохимические проблемы в органической химии (в том числе в химии природных соединений), конформационные проблемы в биохимии (спиральность белковых цепей).

3. Анализ современной научной литературы позволяет сделать вывод о возможности использования спектроскопии КД для детекции изменения пространственной структуры белков при взаимодействии с полисахаридами, в том числе и бактериального происхождения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С практической точки зрения изучение пространственной структуры белков при различных условиях, в том числе и в присутствии полисахаридов, позволит решить ряд проблем, связанных с пониманием действия молекулярно-биологических структур, в том числе и белков, на структуры других веществ.

Изучение пространственной структуры белков также важно в фармакологии, так как обеспечение безопасности разрабатываемых фармакологических средств тесно связано с приданием их активным компонентам таких конформаций, которые наиболее приближены к естественным – это снизит вероятность отрицательного действия фармакологического средства на биологическую структуру и усилит лекарственные свойства препарата.

Данные прикладные применения исследований о пространственной структуре биологических веществ являются одними из наиболее приоритетных направлений современной биологической промышленности.