

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЛИКОПОЛИМЕР-БЕЛОК

АВТОРЕФЕРАТ
Магистерской работы

Студентки 2 курса 241 группы
Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Куклиной Александры Алексеевны

Научный руководитель:
зав. кафедрой биохимии и биофизики,
д.б.н., профессор



С.А. Коннова

Научный консультант:
к.х.н., с.н.с. ИБФРМ РАН



В. С. Гринёв

Заведующий кафедрой:
д.б.н., профессор ,



С.А. Коннова

Саратов 2021

Введение. Выделенные из экстремальных условий микроорганизмы хорошо адаптированы к действию неблагоприятных факторов среды и обладают огромным биотехнологическим потенциалом.

Галофилы занимают особое место среди остальных микроорганизмов, так как они обладают способностью существовать в среде с высоким содержанием солей. Чтобы выжить в такой агрессивной среде, галофилы используют разные стратегии, в том числе способность к синтезу высокомолекулярных полимеров во внешнюю среду. Экстраклеточные полисахариды служат барьером между клетками и окружающей средой, являются резервуаром, выполняя протекторную роль против высушивания и предотвращая стрессы в экстремальных условиях.

Экзополисахариды также обладают рядом уникальных свойств в отношении макроорганизмов, в том числе способностью к стабилизации структуры белков при воздействии денатурирующих факторов. В частности, выявлена способность ЭПС галофильных бацилл значительно увеличивать устойчивость белка цитоплазматических мембран, ферментов к денатурации. Денатурация белков ткани, приводящая к выработке аутоантигенов, является одной из хорошо документированных причин воспалительных заболеваний.

Ранее ЭПС также показали хорошие результаты в отношении снижения уровня холестерина и имели противоопухолевый, иммуномодулирующий и пробиотический эффекты. Некоторые из полисахаридов с противодиабетическими или противораковыми свойствами используются в форме сиропов или пищевых добавок.

Объект исследования - ЭПС граммотрицательных галофильных бактерий *Chromohalobacter salexsigens* EG1QL3 и *Bacillus licheniformis* EG1QL30. Препараты ЭПС галофильных микроорганизмов были любезно предоставлены аспирантом кафедры биохимии и биофизики Ибрахимом Ибрахимом М. Ибрахимом. В качестве белковых компонентов на разных этапах работы использованы коммерческие препараты лизоцима из куриного

яичного белка «Sigma-Aldrich», БСА фирмы «Sigma» и «Life Science». Овальбумин, используемый в данной работе, был выделен, очищен и осажден из белка куриного яйца.

Цель работы: выявление влияния ЭПС, продуцируемого грамотрицательными галофильными бактериями, на стабилизацию вторичной структуры белка в условиях денатурации.

Для реализации цели исследования были поставлены и решались следующие задачи:

1) Подобрать наиболее удобную и информативную модельную систему для выявления активности ЭПС в отношении стабилизации пространственной конфигурации белка, адаптировать условия эксперимента под выбранную систему;

2) с помощью метода КД осуществить контроль вторичной структуры в растворах различных по своей структуре белков при тепловой денатурации, сравнить полученные спектры пептидов с кривыми КД канонических вторичных структур;

3) выявить влияние ЭПС на структурную организацию молекулы белка при различных соотношениях концентраций белок : ЭПС, а также в динамике изменения температуры денатурации.

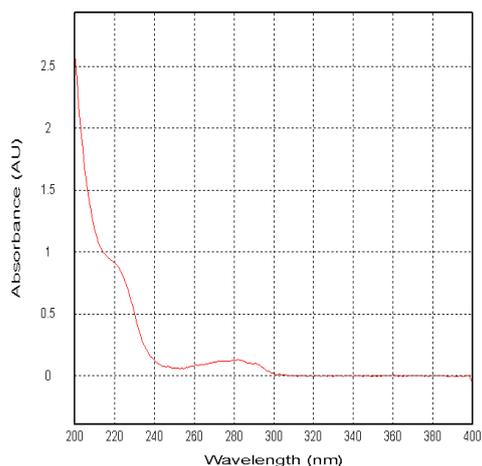
Структура бакалаврской работы: работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы составлен на основе анализа 73 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: общие сведения о галофильных и галотолерантных микроорганизмах; гликополимеры галофильных бактерий; структурные уровни белков; метод кругового дихроизма в исследовании полипептидов; образование комплексов белок-гликополимер; модельные объекты для изучения изменений пространственной структуры белков при тепловом воздействии с помощью метода кругового дихроизма.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

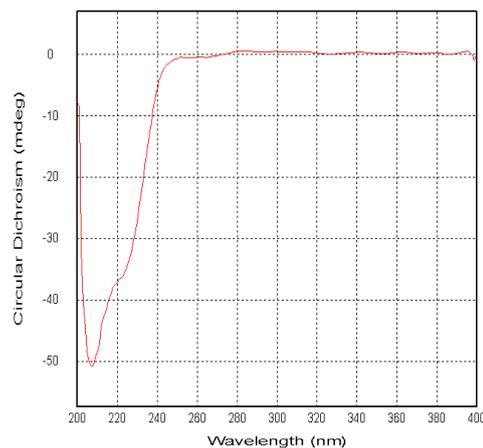
На первом этапе исследования были произведены эксперименты по подбору состава и оптимальных концентраций компонентов буферного раствора, отвечающих допустимым условиям для регистрации спектров поглощения и КД, пригодных для сохранения нативного состояния исследуемых белков. Выбор буферного раствора выполнялся с учётом рекомендаций производителя КД спектрометра Chirascan. Поскольку вследствие специфического поглощения в УФ области хлорид-анионами применение буферов на основе хлоридов строго не рекомендуется, нами была предложена буферная система на основе сульфата натрия и дигидрофосфата калия с рН 5,2. Максимальное поглощение буферного раствора составило 0,8 при $\lambda = 200$ нм, а в области 240-280 нм оптическая плотность была менее 0,2.

Проводились измерения оптической плотности растворов лизоцима с концентрацией 50 мкг/мл (Рис. 1а) и ЭПС с максимальной концентрацией 50 мкг/мл относительно буферного раствора. Спектр поглощения раствора лизоцима выбранной концентрации в буфере в диапазоне 220-300 нм не имеет максимумов с интенсивностью более 1, что позволяет использовать его для измерений спектров КД. Профиль спектра КД аналогичен таковым для лизоцимов и α -лактальбуминов, выделенных из различных организмов, и представляет собой отрицательный максимум при 207 нм с плечом при 222 нм. Первую полосу обычно относят к $\pi \rightarrow \pi^*$, а вторую – к $n \rightarrow \pi^*$ переходам полипептидных цепей, принимающих α -спиральную форму. Вплоть до температуры около 75°C лизоцим, в предложенном нами буфере демонстрирует достаточно высокую термическую стабильность, что согласуется с данными, полученными для лизоцима в фосфатном буфере, где его температура плавления была определена равной 73-74 °C. Спектр КД раствора ЭПС исследуемого штамма показал отсутствие его оптической активности. Были зарегистрированы спектры КД растворов лизоцима (50 мкг/мл) в буфере как в присутствии ЭПС в различных концентрациях (5,

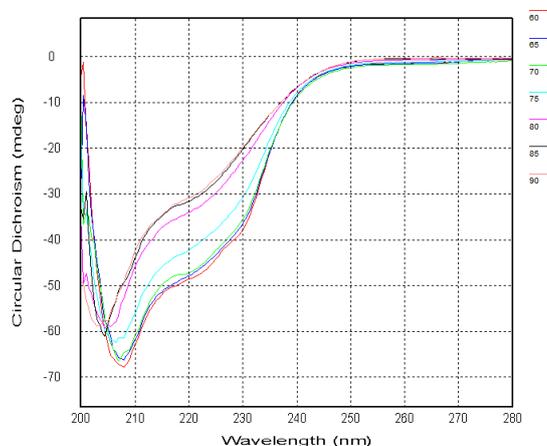
10, 50 мкг/мл), так и в его отсутствие в интервале температур 60-90 °С с шагом 5 °С (Рис. 1). Для выявления степени необратимости изменений в структуре белка под влиянием температуры проводили повторную регистрацию спектров КД его растворов, приведённых к исходным условиям (60 °С).



a



б



в

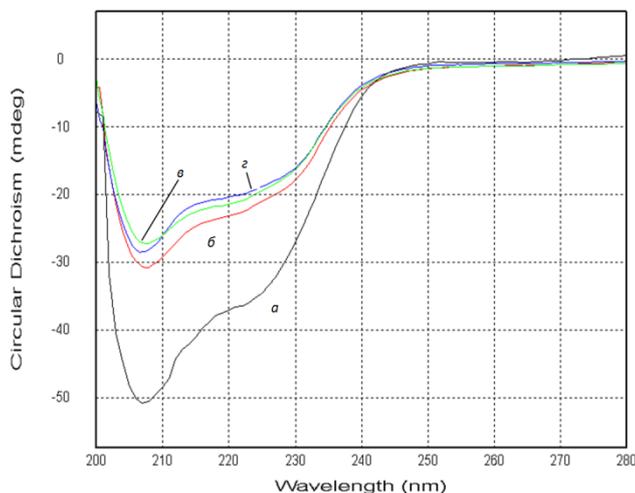
a – спектр поглощения;

б – спектр КД;

в – спектры КД при температурах 60-90 °С.

Рисунок 1 – Спектры поглощения и КД лизоцима с концентрацией 50 мкг/мл против буферного раствора

Результаты экспериментов позволили установить, что при добавлении к лизоциму растворов ЭПС во всех исследованных концентрациях наблюдается значительное уменьшение амплитуды сигнала КД при отсутствии изменений положений максимумов поглощения (при $\lambda = 207$ и 222 нм) (Рис. 2).



а) против буферного раствора;

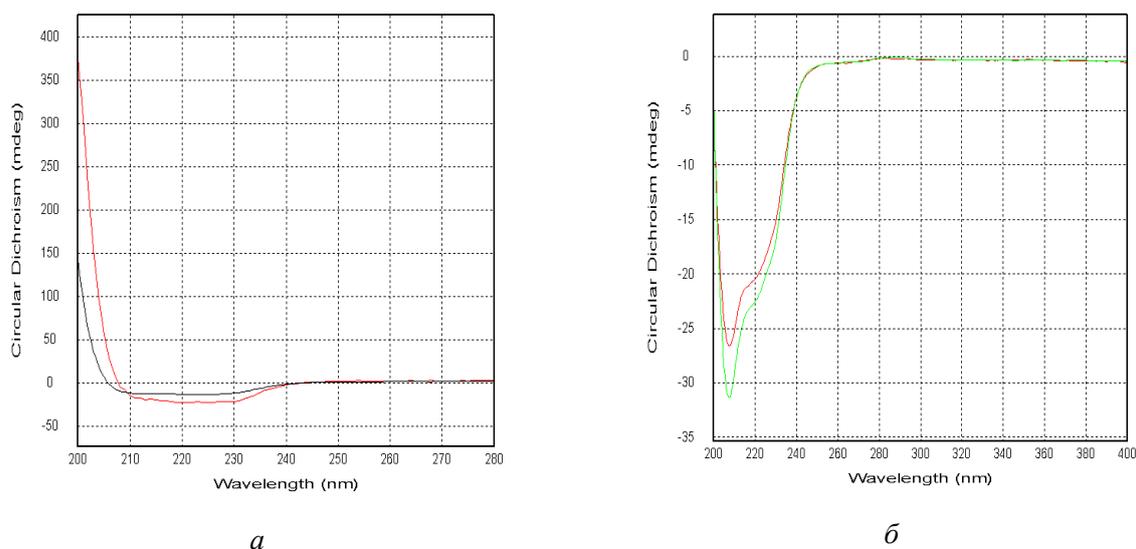
б, в, г – с добавлением раствора ЭПС исследуемого штамма в концентрации 5, 10, 50 мкг/мл соответственно.

Рисунок 2 – Спектр КД лизоцима (50 мкг/мл) с добавлением ЭПС

Поскольку спектр КД раствора ЭПС не вносит собственного вклада в оптическую активность раствора, можно сделать предварительный вывод о взаимодействии ЭПС с белком и, как следствие, изменении в организации белковой молекулы, что выражается, по-видимому, в уменьшении доли α -спиралей в её структуре. Изменения, произошедшие с белковой молекулой, скорее всего, не связаны с серьёзной перестройкой её пространственной организации, поскольку профиль спектра всё ещё позволяет констатировать преобладание α -спиральных участков.

В отсутствие ЭПС после нагревания до 90 °С в спектре раствора лизоцима наблюдается существенное уменьшение эффекта Коттона и, как следствие, вырождение его вместе с плечом в широкий отрицательный пик без выраженного максимума в области 215-230 нм (Рис. 3а), причём также

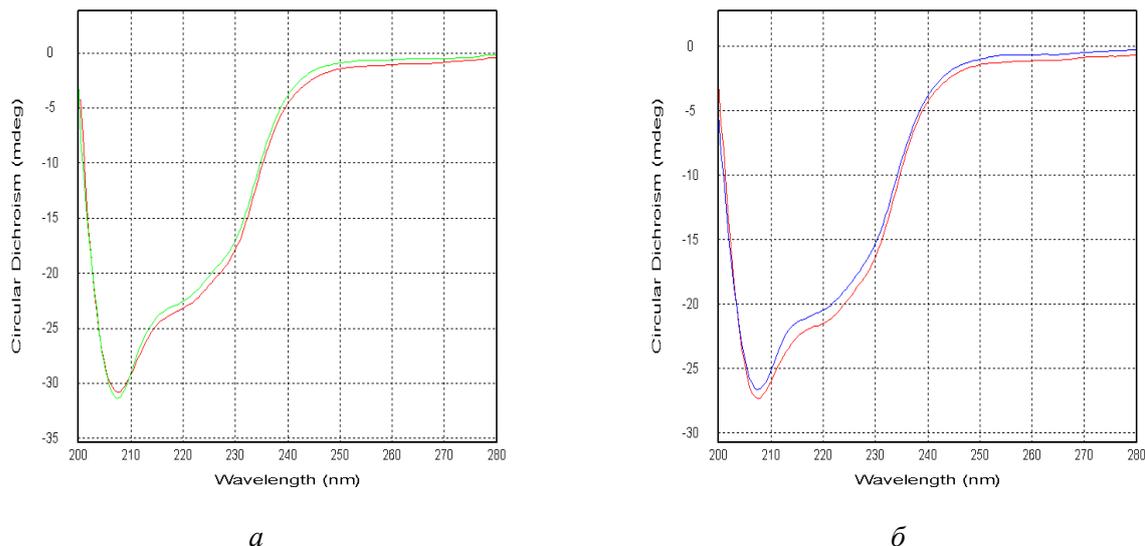
наблюдается высокоинтенсивный положительный пик, максимум которого находится за пределами измерений (менее 200 нм). Это свидетельствует о том, что в отсутствие стабилизаторов лизоцим не возвращается в исходное конформационное состояние после нагревания до 90 °С и последующего охлаждения до 60 °С. Профиль спектра КД говорит о почти полном исчезновении α -спиральных участков и преобладании β -слоистых структур. Похожий профиль спектра КД демонстрирует система, состоящая из лизоцима и ЭПС с концентрацией 10 мкг/мл. По-видимому, увеличение доли гидрофобных β -структур связано с описанным ранее явлением агрегации лизоцима в ходе температурного воздействия.



a) 1 (красн) – без ЭПС; 2 (черн) – 10 мкг/мл ЭПС;

б) 1 (красн) – 50 мкг/мл ЭПС; 2 (зел) – 5 мкг/мл ЭПС.

Рисунок 3 – Спектры КД лизоцима с концентрацией 50 мкг/мл после проведения температурного воздействия и приведения раствора к исходным условиям



а) 1 (красн) – до, 5 мкг/мл ЭПС; 2 (зел) – после, 5 мкг/мл ЭПС;

б) 1 (красн) – до, 50 мкг/мл ЭПС; 2 (син) – после, 50 мкг/мл ЭПС.

Рисунок 4 – Спектры КД лизоцима с концентрацией 50 мкг/мл до и после проведения температурного воздействия и приведения раствора к исходным условиям (60 °С)

Таким образом, низкая концентрация ЭПС (5 мкг/мл) оказывается достаточной для стабилизации лизоцима в растворе (Рис. 4). Напротив, 10 мкг/мл ЭПС оказывает заметное дестабилизирующее действие на молекулу лизоцима, которое выражается в изменении конформации путём увеличения β -структур и, по-видимому, частичной агрегации. Относительно высокая концентрация ЭПС вновь подавляет агрегацию лизоцима (Рис. 4б) и проявляет эффект стабилизации вторичной структуры белка, что, вероятно, связано с межмолекулярными взаимодействиями компонентов раствора.

Поскольку лизоцим является достаточно термостабильным ферментом, и температура плавления его тоже относительно высока, в качестве модельного белка с более низкой температурой перехода был выбран наиболее широко изученный и распространённый белок крови – бычий сывороточный альбумин (БСА). Нами были выбраны одновременно два коммерческих препарата БСА фирмы «Sigma» и «Life Science» с целью более достоверного

отражения результатов. Для количественной оценки долей элементов вторичной структуры белка до и после теплового воздействия на БСА как в присутствии, так и в отсутствие ЭПС того же исследуемого штамма с использованием спектроскопии КД применяли алгоритм анализа SELCON в ПО DichroWeb, доступного онлайн на сервере. С целью получения пригодных для обчёта алгоритмом SELCON спектральных данных нами был расширен диапазон длин волн, при которых проводятся измерения, до 185 нм в дальнюю УФ область.

Профиль спектра представляет собой отрицательный максимум при 208 нм с плечом при 222 нм, что характерно для макромолекул белка с преобладающим содержанием α -спиралей. Данные, полученные при расчете с помощью алгоритма SELCON содержания элементов вторичной структуры для нативного БСА в растворе с ЭПС представлены в долях единицы (безразмерная величина), в Таблицах 1, 2

Также были зарегистрированы спектры КД растворов БСА с соотношением массово-объёмных концентраций 1 : 1 (25 мкг/мл) в буферном растворе в присутствии раствора ЭПС (в интервале температур 60-90 °С с шагом 5 °С). При увеличении температуры с 40 до 90 °С включительно было замечено уменьшение интенсивности двух отрицательных пиков, хотя изменения в положениях их максимумов не наблюдались. Далее нами были записаны спектры КД растворов белка и ЭПС, подвергнутых температурному воздействию во второй раз, а затем приведённых к исходным условиям. Полученные серии кривых показывают, что при использовании в качестве стабилизатора ЭПС охлаждение с 90 до 40 °С не приводит к существенному изменению конформации исходного (нативного) белка, как и в предыдущем опыте с лизоцимом. Однако белок фирмы «Life Science» при вторичном нагреве потерял способность к восстановлению, вследствие чего мы наблюдали на графике выраженный отрицательный пик при 222 нм, что свидетельствует о разрушении доли α -

спиралей и появлении неупорядоченных структур и петель (Рис. 5).

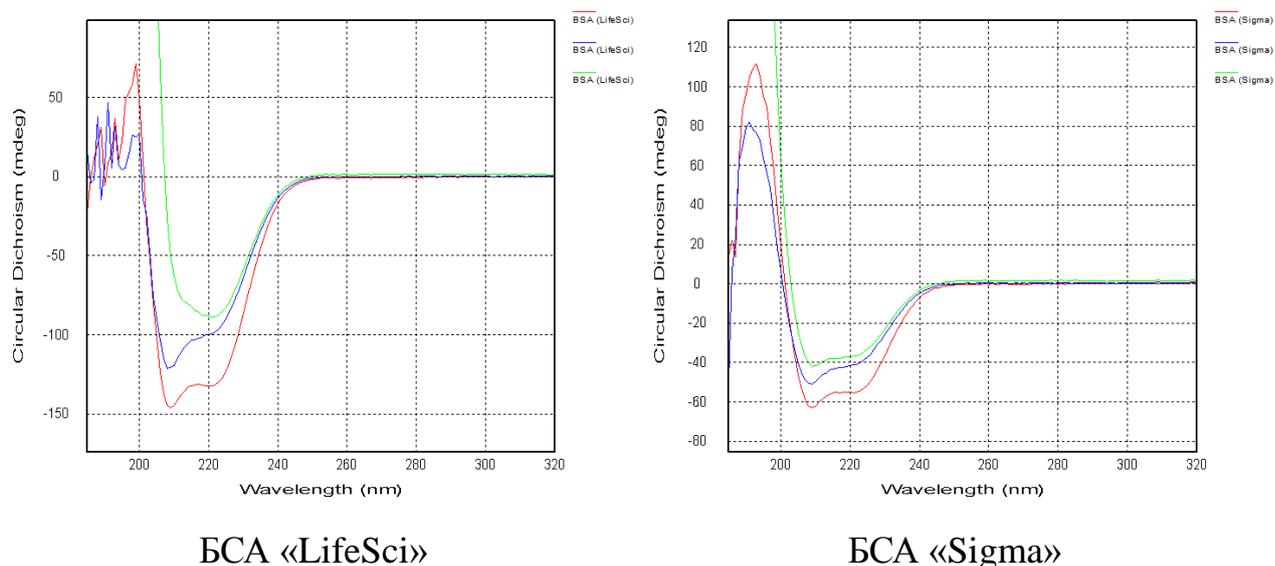


Рисунок 5 – БСА + ЭПС (EG1QL3) при 40 °С (красн.), после первого (син.) и второго (зел.) нагрева

В ходе эксперимента по выявлению влияния ЭПС EG1QL30 на структуру БСА в условиях денатурации, было установлено, что при добавлении к белку раствора ЭПС в концентрации 1 : 1 (50 мкг/мл) и последующего нагревания образцов до температуры в 90 °С происходит полная и необратимая денатурация исходного белка. При этом на спектрах можно наблюдать значительное уменьшение сигнала КД, где кривая смеси белка и ЭПС оказалась значительно выше кривой чистого денатурированного белка (Рис. 6). Отсюда следует, что данный ЭПС способствует расплетению α -спиральных участков. В исходных условиях (40 °С) спектры КД растворов не денатурированного БСА, а также БСА с добавлением ЭПС исследуемого штамма бактерий (*B. licheniformis*), остаются сходными (Рис. 5), из чего можно заключить, что взаимодействие было простимулировано повышением температуры. Причиной отрицательного влияния данного ЭПС на вторичную структуру БСА может быть следствием обнаружения с помощью ЯМР-

спектроскопии примесей тейхоевых кислот, которые, однако, не превышают 10%. В ЭПС галофильных бактерий *Chromohalobacter salexsigens* EG1QL3 леван (незаряженный) не содержал ответвлений.

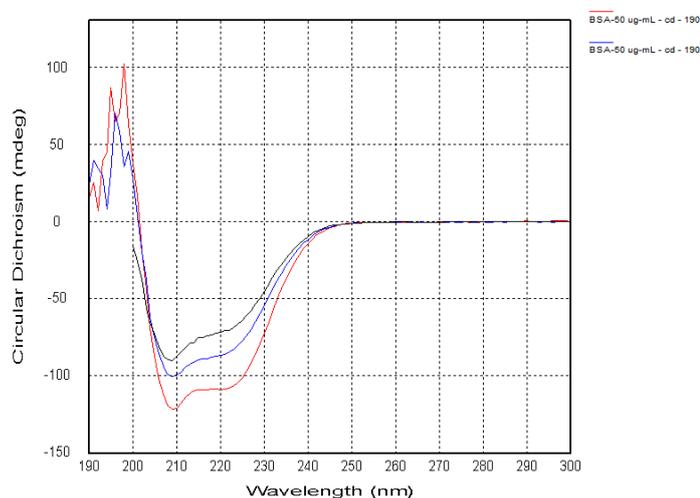


Рисунок 6 – Сравнение спектров КД нативного (красн.), денатурированного (син.) БСА и смеси БСА и ЭПС EG1QL30 (чёрн.), до и после проведения температурного воздействия и приведения раствора к исходным условиям (40 °С)

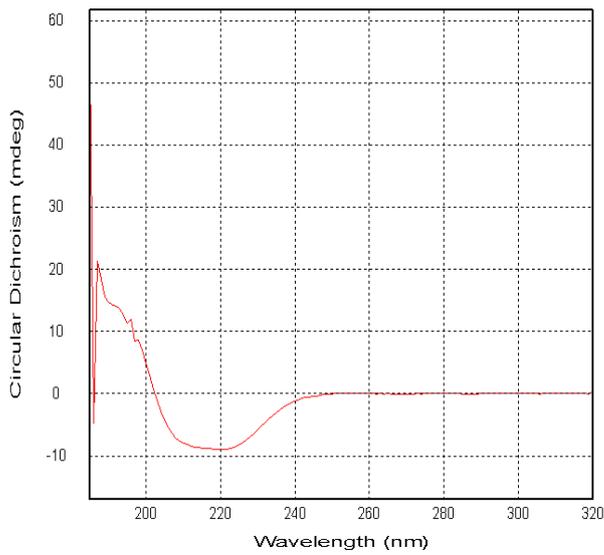
Таблица 1 – Содержание элементов вторичной структуры (в долях единицы), рассчитанное из КД спектров раствора нативного БСА (LifeSci) с добавлением ЭПС (EG1QL3)

SELCON, Set 3				
Элемент вторичной структуры	α -спираль	β -слой	Петля	Неупорядоченная структура
Нативный БСА+ЭПС	0,804	0,000	0,052	0,143
БСА+ЭПС при первой тепловой обработке	0,028	0,49	0,229	0,252
БСА+ЭПС после первой тепловой обработки	0,804	0,000	0,053	0,142
БСА+ЭПС при второй тепловой обработке	0,028	0,49	0,229	0,252
БСА+ЭПС после второй тепловой обработки	0,675	0,001	0,110	0,214

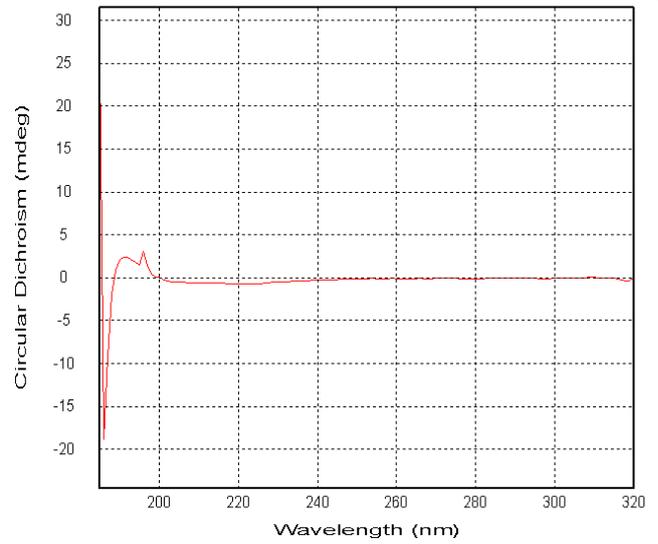
Таблица 2 – Содержание элементов вторичной структуры (в долях единицы), рассчитанное из КД спектров раствора нативного БСА (Sigma) с добавлением ЭПС (EG1QL3)

SELCON, Set 3				
Элемент вторичной структуры	α -спираль	β -слой	Петля	Неупорядоченная структура
Нативный БСА+ЭПС	0,805	0,001	0,052	0,144
БСА+ЭПС при первой тепловой обработке	0,028	0,49	0,228	0,253
БСА+ЭПС после первой тепловой обработки	0,805	0,001	0,052	0,144
БСА+ЭПС при второй тепловой обработке	0,028	0,49	0,228	0,253
БСА+ЭПС после второй тепловой обработки	0,804	0,001	0,052	0,145

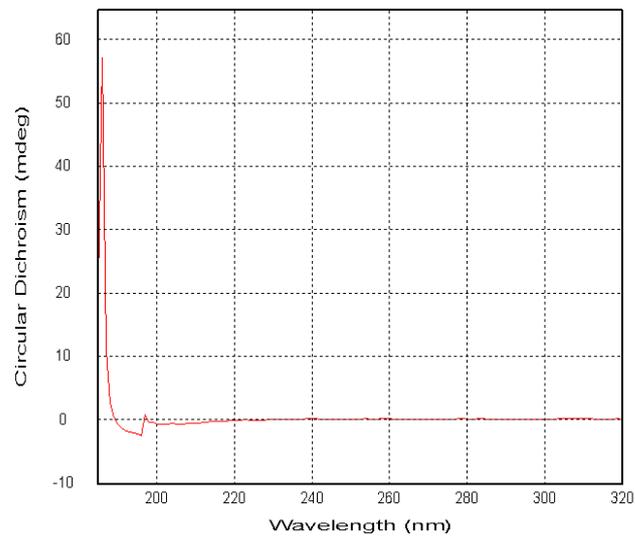
Далее нами были зафиксированы серии кривых КД растворов ОВА 50 мкг/мл и ЭПС 50 мкг/мл отдельно в исходных условиях (40 °С) для дальнейшего наблюдения за изменением нативной конформации исследуемого белка (Рис.7). Нагревание и последующее охлаждение чистого ОВА приведено на рисунке 8.



a



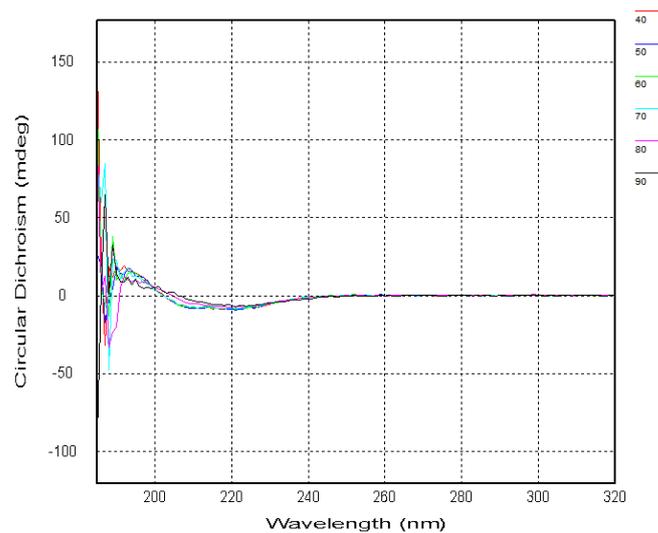
б



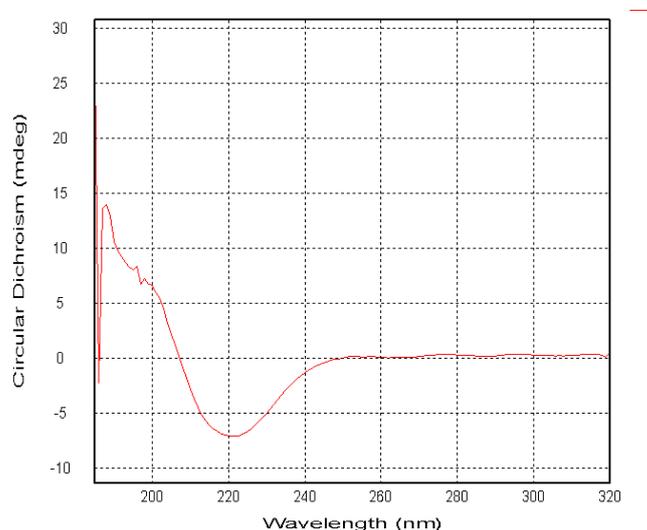
в

- a*) нативный ОВА;
- б*) ЭПС EG1QL3;
- в*) ЭПС EG1QL30.

Рисунок 7 – Спектры КД ОВА (50 мкг/мл) и ЭПС (50 мкг/мл) против
буферного раствора при температуре 40 °С



a



б

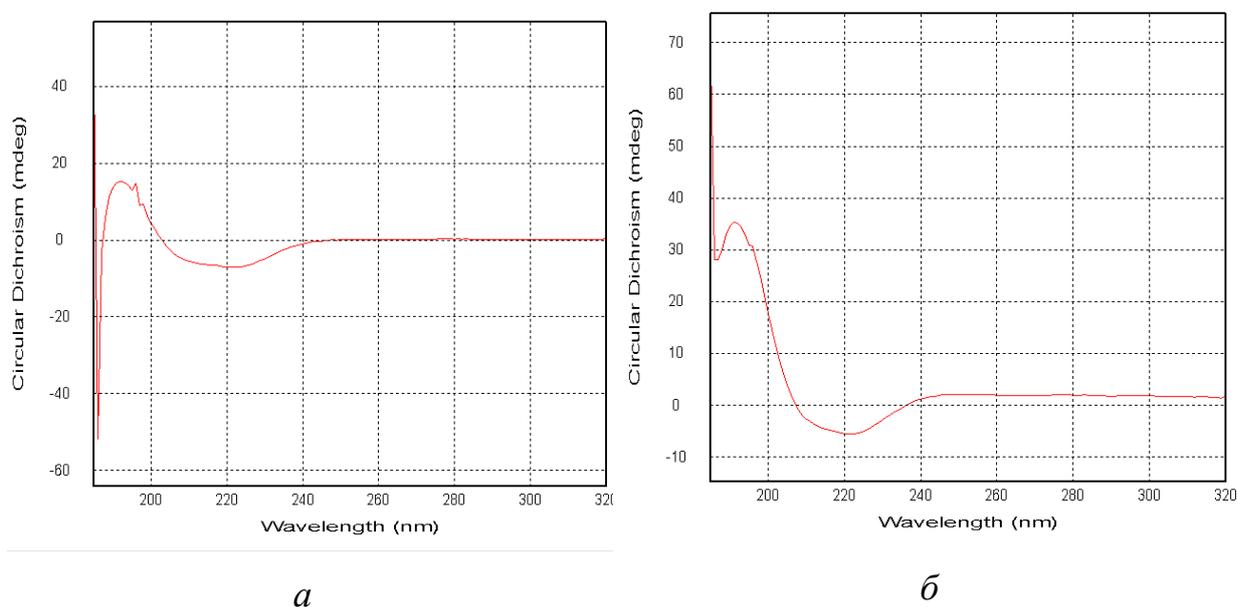
a) ОВА при температурах 40-90°C;

б) ОВА после нагрева и охлаждения до 40°C.

Рисунок 8 - Спектры КД ОВА (50 мкг/мл) при температурном воздействии и приведения раствора к исходным условиям

При добавлении ЭПС обоих штаммов в раствор с нативным ОВА на спектрах КД наблюдалось существенное изменение конформации исходного белка, что выразалось в значительном уменьшении интенсивности отрицательных пиков и его плеча. Это свидетельствует о том, что даже при

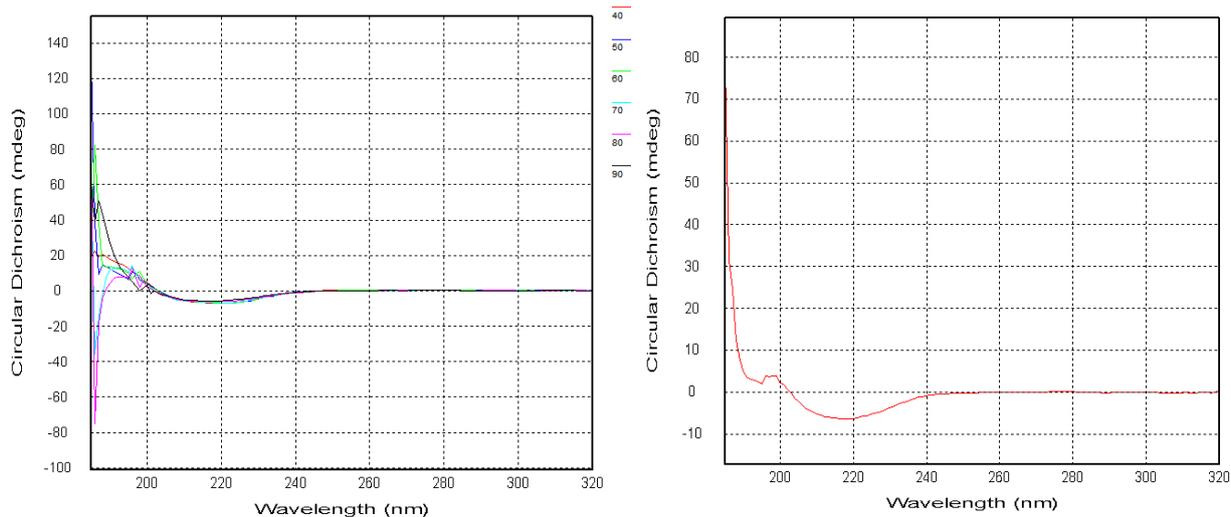
простом смешивании растворов ОВА и ЭПС, не подверженных температурному воздействию, количество α -спиральных участков резко снижается (Рисунок 9). С одной стороны, это подтверждает наличие межмолекулярного взаимодействия в отношениях белок-гликополимер, однако, с другой стороны, подобное поведение позволяет отметить сильное нарушение пространственной структуры нативного ОВА, что на данном этапе нельзя отнести к стабилизирующим свойствам используемых в эксперименте ЭПС.



- а) ОВА+ЭПС EG1QL3;
- б) ОВА+ЭПС EG1QL30.

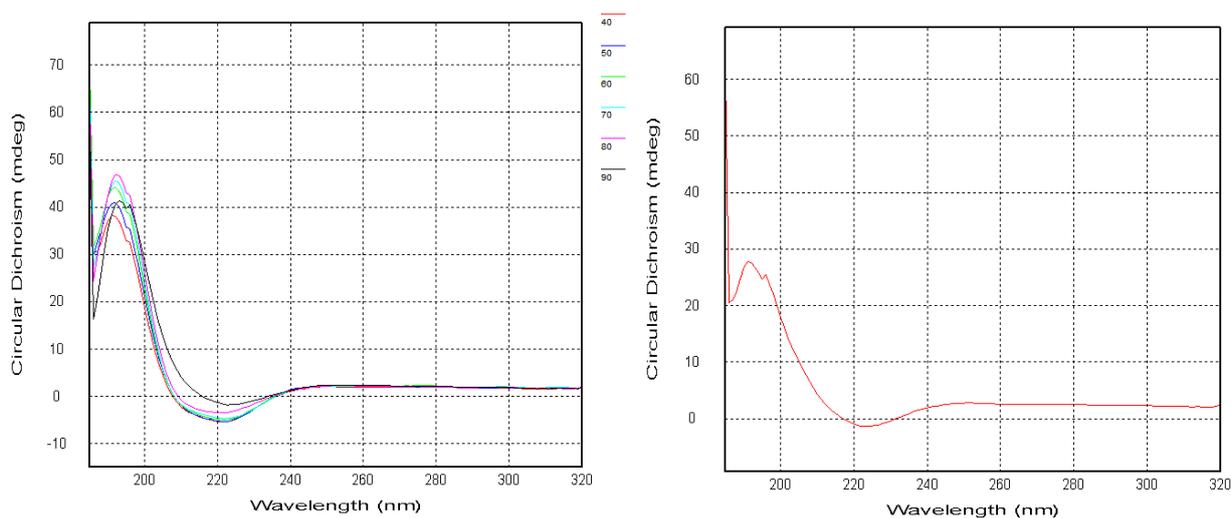
Рисунок 9 – Спектры КД ОВА и ЭПС (1:1) до проведения температурного воздействия

Дальнейший нагрев демонстрирует, что возвращение ОВА к своей нативной структуре не происходит, что указывает на необратимый переход полипептида в форму с преобладанием β -слоистых участков (Рисунок 10).



а

б



в

г

- а) OBA + ЭПС (EG1QL3) при температурах 40-90 °С;*
- б) OBA + ЭПС (EG1QL3) после нагрева и охлаждения до 40°С;*
- в) OBA + ЭПС (EG1QL30) при температурах 40-90 °С;*
- г) OBA + ЭПС (EG1QL30) после нагрева и охлаждения до 40°С.*

Рисунок 10 – Спектры КД OBA и ЭПС (1:1) при температурном воздействии и приведении раствора к исходным условиям

Таким образом, было установлено, что при добавлении к ОВА раствора ЭПС в концентрации 1 : 1 (50 мкг/мл) и последующего нагревания полученных образцов до температуры 90 °С, и охлаждения до температуры 40 °С, происходит полная и необратимая денатурация исходного белка.

Из результатов, полученных при проведении анализа содержания вторичной структуры, с использованием алгоритма SELCON в ПО DichroWeb следует, что после температурного воздействия и последующего охлаждения до 40 °С доля α -спиралей в ОВА при взаимодействии с ЭПС снизилась до нулевых значений (Таблицы 3,4).

Таблица 3 – Содержание элементов вторичной структуры (в долях единицы), рассчитанное из КД спектров раствора нативного ОВА

SELCON, Set 3				
Элемент вторичной структуры	α -спираль	β -слой	Петля	Неупорядоченная структура
Нативный ОВА	0,676	0,000	0,110	0,214
ОВА при тепловой обработке	0,028	0,489	0,229	0,254
ОВА после тепловой обработки	0,023	0,430	0,217	0,330

Таблица 4 – Содержание элементов вторичной структуры (в долях единицы), рассчитанное из КД спектров раствора нативного ОВА с добавлением ЭПС

SELCON, Set 3				
Элемент вторичной структуры	α -спираль	β -слой	Петля	Неупорядоченная структура
Нативный ОВА+ ЭПС (EG1QL3)	0,023	0,431	0,216	0,330
ОВА+ ЭПС (EG1QL3) при первой тепловой обработке	0,028	0,489	0,229	0,254
ОВА+ ЭПС (EG1QL3) после тепловой обработки	0,030	0,421	0,219	0,330
Нативный ОВА+ ЭПС (EG1QL30)	0,028	0,485	0,227	0,26
БСА+ ЭПС (EG1QL30) при тепловой обработке	0,028	0,490	0,229	0,252
БСА+ ЭПС (EG1QL30) после тепловой обработки	0,022	0,492	0,23	0,265

Полученные в результате математической обработки спектральных данных КД подтверждают выдвинутое предположение о том, что ЭПС исследуемых штаммов EG1QL3 и EG1QL30, представляющие собой полифруктаны леван и леван со значительным (5-10%) содержанием тейхоевой кислоты, соответственно, способствуют изменениям во вторичной структуре нативных белков в растворе, что выражается в уменьшении α -спиральных участков и увеличении доли β -укладки, аналогично термическому воздействию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании имеющихся данных можно предположить, что в ходе взаимодействия белков и ЭПС грамотрицательных галофильных бактерий *C. salexsigens* EG1QL3 происходит образование комплекса, конформация белка в котором несколько отличается от его нативного состояния, однако соотношение компонентов вторичной структуры, в целом, сохраняется, что подтверждается сохранением профилей спектров КД до и после температурного воздействия по сравнению со спектрами раствора чистого белка. Спектроскопия КД позволяет фиксировать уменьшение доли α -спиральных участков в белке, тем не менее, образующиеся комплексы оказываются более устойчивыми к температурному воздействию в отличие от нативных лизоцима и БСА, и демонстрируют возвращение конформации после приведения условий к первоначальным. В отсутствие же ЭПС наблюдается необратимый переход полипептидов в форму, в которой преобладают β -слоистые участки. Так как исследуемый нами ЭПС *C. salexsigens* EG1QL3 не несёт заряда, а БСА обладает суммарным отрицательным зарядом в исследуемых условиях, то, вероятнее всего, образованные комплексы поддерживаются гидрофобными взаимодействиями, вследствие конформационных и структурных изменений биополимеров, которые произошли после повышении температуры выше 75 °С.

Напротив, исследования температурного воздействия на растворы белков как в присутствии, так и в отсутствие ЭПС галотолерантных бактерий *V. licheniformis* EG1QL30 показывают дестабилизирующее действие последнего, что объясняется его отрицательным зарядом, обусловленным присутствием тейхоевых кислот, что приводит к усилению неспецифического кулоновского отталкивания с молекулами БСА и, как следствие, значительным изменением конформации последних.

Также, было выявлено отсутствие унифицированного характера воздействия исследуемых

ЭПС обоих штаммов с ОВА не наблюдалось стабилизации пространственной структуры последнего, поскольку само взаимодействие приводило к снижению доли α -спиральных участков.

ВЫВОДЫ

- 1) Подобраны параметры (состав буферной смеси и температурный режим) исследования пространственной структуры белков (лизоцима и бычьего сывороточного альбумина) методом спектроскопии кругового дихроизма.
- 2) Методом КД показано, что добавление к растворам лизоцима и бычьего сывороточного альбумина ЭПС бактерий *C. salexsigens* EG1QL3, в концентрациях 5 и 50 мкг/мл для лизоцима, и 25 мкг/мл для бычьего сывороточного альбумина, позволяет снизить глубину изменения пространственной структуры исследуемых белков при нагревании до 90°C.
- 3) Установлено, что межмолекулярное взаимодействие ЭПС *Chromohalobacter salexsigens* EG1QL3 и *Bacillus licheniformis* EG1QL30 с овальбумином приводит к необратимому изменению вторичной структуры белка, а именно практически полному исчезновению α -спиральных участков, что характерно для денатурированных белков.