

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

Кафедра общей и неорганической химии
наименование кафедры

**Влияние pH на конформационные изменения в структуре бычьего
сывороточного альбумина и пепсина**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 411 группы

направления 04.03.01 «Химия»

код и наименование направления

Института химии

наименование факультета

Рудневой Ирины Максимовны

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель
профессор, д.х.н., доцент
должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

Н.А. Бурмистрова
инициалы, фамилия

Зав. кафедрой:
д.х.н., профессор
должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

И.Ю. Горячева
инициалы, фамилия

Саратов 2023

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Молекулярный импринтинг является многообещающим подходом к созданию индивидуальных сайтов связывания, комплементарных молекулам-шаблонам по форме, размеру и функциональным группам в полимерных и биополимерных матрицах. Молекулярно импринтированные полимеры (МИП) нашли широкое применение в твердофазной экстракции, в качестве рецепторов в различных видах иммуноанализа и других областях. Преимущества МИП заключаются в их надежности, высокой механической и термической стабильности в широком диапазоне кислотности среды и температур. Суть молекулярного импринтинга заключается в получении «молекулярных отпечатков», которые образуются в результате полимеризации функциональных мономеров в присутствии специально введенных молекул-шаблонов. Аналогичная процедура применима и для создания специфических участков распознавания в биомолекулах. В отличие от процесса классического молекулярного импринтинга, в котором образование селективных сайтов связывания происходит в синтетической полимерной матрице, процесс получения импринтированных белков (ИБ) предполагает использование в качестве матрицы природных полимеров. Синтез ИБ является низкочувствительным, быстрым процессом, отвечающим принципам «зеленой» химии. Поведение белковых молекул в процессе получения ИБ является мало изученной областью. Обоснование выбора используемых белковых молекул часто игнорируется, а исследователи следуют уже известным методикам синтеза или включают в работу доступные материалы.

При синтезе ИБ необходимо учитывать множество параметров, таких как концентрация, температура, влияние pH среды и др. Поскольку все эти параметры оказывают существенное влияние на структуру белка в процессе синтеза, важным шагом к пониманию взаимодействия матричного белка с молекулой-шаблоном, становится изучение и описание поведения белковой молекулы в условиях, соответствующих каждому из этапов синтеза ИБ. Кроме того, подробное описание белковой структуры позволит направленно изменять

условия синтеза и выбирать наиболее подходящую матрицу для конкретной задачи среди различных белков.

Цель работы: анализ влияния pH на конформационные изменения молекул бычьего сывороточного альбумина (БСА) и пепсина при проведении импринтинга белков. Достижение поставленной цели включало решение следующих задач: изучение влияния pH среды на формирование белковых агрегатов БСА и пепсина методом динамического рассеивания света (ДРС); определение элементов вторичной структуры БСА и пепсина методом спектроскопии кругового дихроизма (КД); изучение спектральных характеристик БСА и пепсина при различных pH, полученных методом флуоресцентной спектроскопии; изучение конформационных изменений БСА и пепсина в кислой среде (pH 3.0) методом молекулярной динамики (МД).

Научная новизна работы.

- Изучены конформационные изменения БСА и пепсина, вызванные изменением pH, а также оценены изменения их спектральных характеристик.
- Определены элементы вторичной структуры БСА и пепсина при разных pH методами спектроскопии КД и молекулярной динамики.

Практическая значимость работы.

Показана возможность применения ДРС, спектроскопии КД, флуоресценции и молекулярной динамики для анализа белковой структуры на этапе выбора оптимальной матрицы для синтеза импринтированных белков.

Материалы и методы исследования.

Объекты исследования - БСА и пепсин. Для решения задач, поставленных в работе, применяли комплекс инструментальных методов исследования: флуориметрия (спектрофлуориметр Cary Eclipse, Agilent Technologies), ДРС (Zetasizer, Ultra Red Label), КД (Chirascan, Applied Photophysics). Программное обеспечение DichroWeb использовали для анализа методом ДРС содержания вторичной структуры БСА и пепсина при различных уровнях pH. Моделирование МД проводили с использованием пакета GROMACS v.4.5.4 с поддержкой MPI на высокопроизводительной вычислительной системе

Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского. В качестве исходных использовали структуры БСА (PDB ID: 4F5S) и пепсин (PDB ID: 3PEP

Структура и объем работы. Выпускная квалификационная работа (ВКР) состоит из введения, двух глав, заключения и списка использованных источников. В тексте работы содержатся таблицы и графические иллюстрации. Общий объем ВКР составляет 41 страницу, включая 22 рисунка и 4 таблицы.

Основное содержание работы.

В **главе 1** представлен обзор литературы, обсуждены проблемы конформационных изменений в белках и современные подходы к их изучению и показаны перспективы применения молекулярного моделирования.

В **главе 2** описаны материалы и методы, используемые в работе, обсуждается влияние рН среды на структурные и спектральные характеристики БСА и пепсина, а также представлен сравнительный анализ экспериментальных результатов и результатов моделирования.

Влияние рН на размер и спектральные характеристики БСА и пепсина

Для исследования агрегационной активности БСА и пепсина использовали метод ДРС. Изучено влияние концентрации белка в растворе на размер образующихся агрегатов. В выбранном диапазоне концентраций наблюдали монотонный спад линейных размеров агрегатов с увеличением концентрации белка в рабочем растворе. Установлено, что в диапазоне рН 2-12 в растворах преобладают частицы малого размера.

Методами КД и флуоресцентной спектроскопии изучены спектральные характеристики БСА и пепсина, результаты представлены на рисунках 1-4. Показано, что структура БСА характеризуется высоким содержанием α -спиралей, а пепсин – β -листов. Анализ спектров КД позволил установить, что переход от нативного рН к рН 3.0 приводит к снижению элементов вторичной структуры как для БСА, так и для пепсина. Изменение рН растворов БСА и пепсина приводит к смещению максимума флуоресценции.

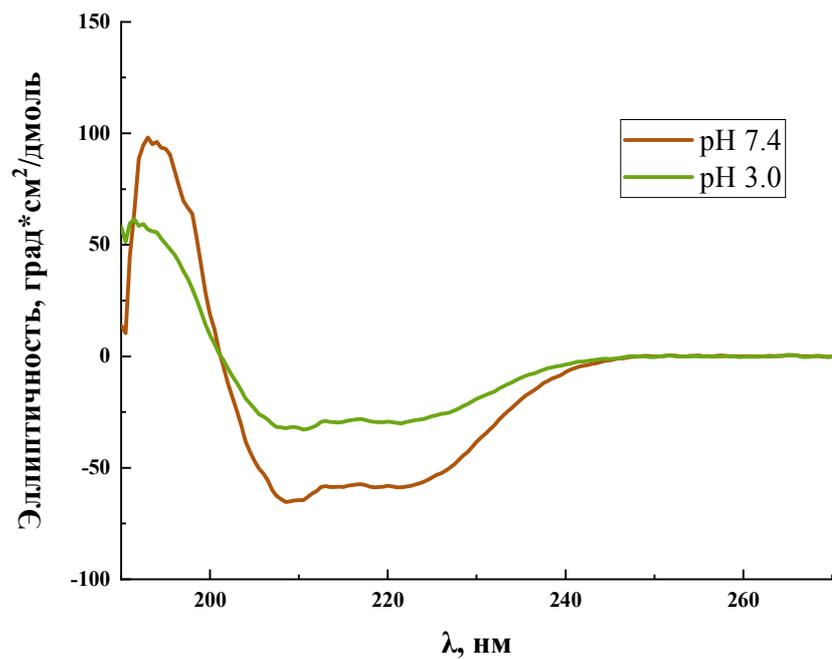


Рисунок 1 — Спектры КД БСА при pH 3.0 и pH 7.4

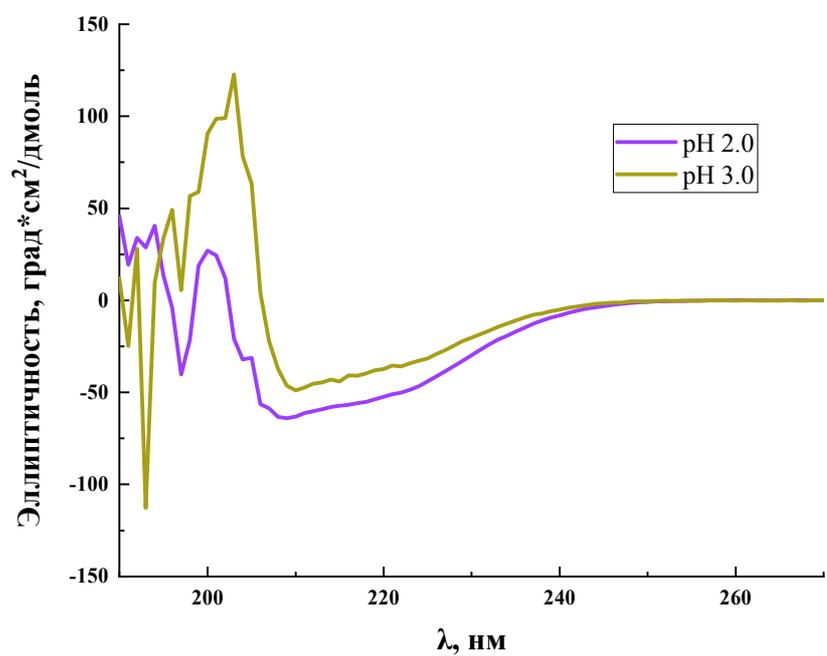


Рисунок 2 — Спектры КД пепсина при pH 2.0 и pH 3.0

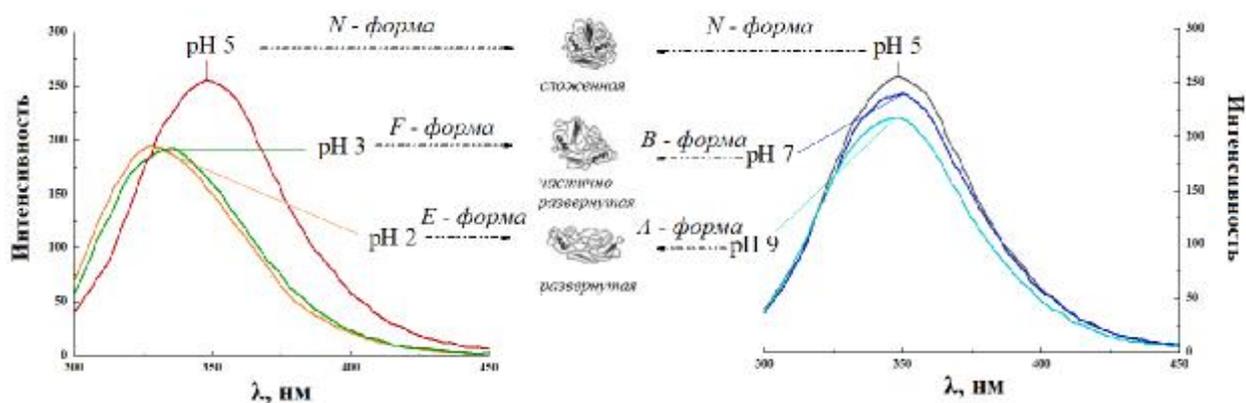


Рисунок 3 – Спектры флуоресценции БСА при различных рН

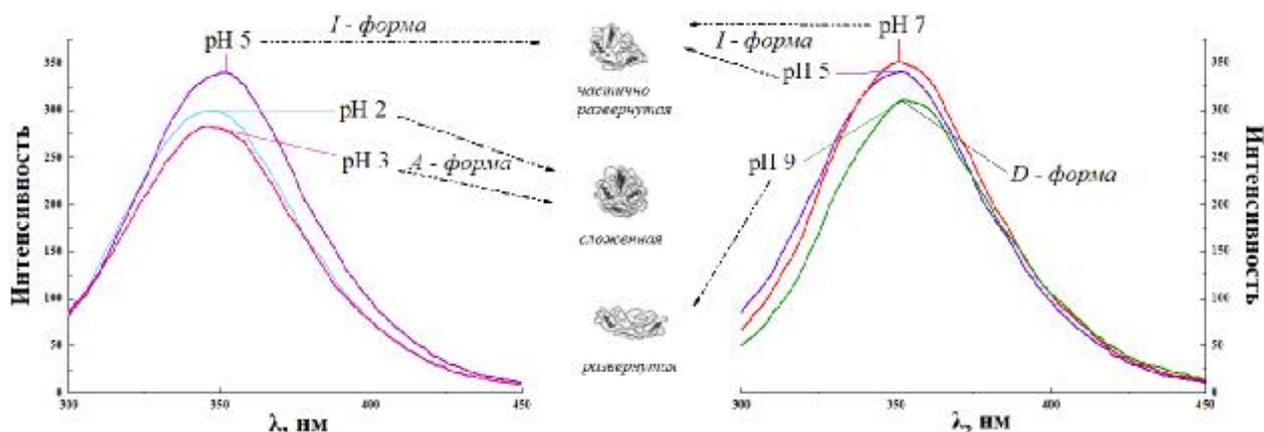


Рисунок 4 – Спектры флуоресценции пепсина при различных рН

Анализ структуры БСА и пепсина при рН 3.0

Моделирование динамики БСА и пепсина при рН 3.0 позволило установить их 3D структуру и рассчитать содержание элементов вторичной структуры для каждого белка. Анализ траектории МД показал, что снижение рН до значения 3.0 вызывает N-F конформационный переход БСА. Для пепсина рН 3.0 является близким к нативному рН, в связи с этим, изменение конформации пепсина было незначительным. Однако для обоих белков установлено, что конформация изменяется, при этом происходит частичная потеря вторичной структуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучено влияние рН среды на структуру БСА и пепсина с использованием метода ДРС. Изменение концентрации и рН повлияло на

размер и количество агрегатов белка в растворе. При анализе результатов БСА наблюдался спад размеров агрегатов с 800 нм до 500 нм с увеличением концентрации белка. Из результатов ДРС БСА и пепсина наблюдалось, что во всем диапазоне рН для растворов преобладают мелкие частицы;

2. Методом спектроскопии КД изучены спектральные характеристики БСА и пепсина и определено содержание элементов их вторичной структуры. В БСА процент α -спиралей уменьшается с 63,3 до 57,7, а процент неструктурированных участков увеличивается с 32,5 до 39,2. В пепсине процент β -сплетённых листов уменьшился с 38,3 до 35,6, а процент неструктурированных участков увеличился с 53,4 до 60,4;

3. Изучены спектральные характеристики БСА и пепсина при различных рН с помощью флуоресцентной спектроскопии. На спектрах флуоресценции БСА наблюдалось смещение максимума в коротковолновую область с 350 нм до 336 нм, что указывает на увеличение гидрофобности белка. В спектрах флуоресценции пепсина не наблюдается сдвигов максимумов;

4. Изучены конформационные изменения БСА и пепсина в кислой среде (рН 3.0) методом МД. При анализе результатов моделирования, было установлено, что при переходе из нативного рН в рН 3.0 гидрофобность аминокислотных остатков увеличивается, структура теряет свою стабильность и принимает развернутое положение. Проведен сравнительный анализ экспериментальных результатов и результатов моделирования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Gutierrez A.V.R., Hedström M., Mattiasson B. Bioimprinting as a tool for the detection of aflatoxin B1 using a capacitive biosensor/ A.V. Gutierrez R.,M. Hedström, B. Mattiasson // Biotechnol. Reports. -2016. - Vol. 11. - P. 12-17.
2. Imprinted proteins as a receptor for detection of zearalenone/ P. Pidenko, H. Zhang, I. Goryacheva, P. Lenain, S. De Saeger, N. Beloglazova // Anal. Chim. Acta. - 2018. - Vol. 1040. - P. 99-104.
3. Imprinted proteins for determination of ovalbumin / P. Pidenko, K.

Presnyakov, N. Beloglazova, N. Burmistrova // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2022. - Vol. 414, № 18. - P. 5609-5616.

4. Bioimprinting for multiplex luminescent detection of deoxynivalenol and zearalenone/ N. Beloglazova, P. Lenain, M. Tessier, I. Goryacheva, Z. Hens, S. De Saeger // *Talanta.* - 2019. - Vol. 192. - P. 169-174.

5. Bioimprinting as a Receptor for Detection of Kwakhurin / S. Sakamoto, K. Minami, P. Nuntawong, G. Yusakul, W. Putalun, H. Tanaka, S. Fujii, S. Morimoto // *Biomolecules.* - 2022. - Vol. 12, № 8. - P. 1064.

6. Three-dimensional structure of human serum albumin/ D.C. Carter, X.M. He, S.H. Munson, P.D. Twigg, K.M. Gernert, M.B. Broom, T.Y. Miller // *Science.* - 1989. - Vol. 244, № 4909. - P. 1195-1198.

7. Probing the secondary structure of bovine serum albumin during heat-induced denaturation using mid-infrared fiberoptic sensors / R. Lu, W.W. Li, A. Katzir, Y. Raichlin, H.Q. Yu, B. Mizaikoff // *Analyst.* - 2015. - Vol. 140, № 3. - P. 765-770.

8. PH-Induced conformational changes of BSA in fluorescent AuNCs@BSA and its effects on NCs emission / X.L. Cao, H.W. Li, Y. Yue, Y. Wu // *Vib. Spectrosc.* - 2013. - Vol. 65. - P. 186-192.

9. Michnik A., Michalik K., Drzazga Z. Stability of bovine serum albumin at different pH / A. Michnik, K. Michalik, Z. Drzazga // *J. Therm. Anal. Calorim.* - 2005. - Vol. 80, № 2. - P. 399–406.

10. Hassan M., Azzazy E., Christenson R.H All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications./ M. Hassan, E. Azzazy, R. H. Christenson. - San Diego, California: Academic Press // *Clin. Chem.* -1997. - Vol. 43, № 10. - P. 432.

11. Heda R., Toro F., Tombazzi C.R. Physiology, Pepsin / R. Heda, F. Toro, C.R. Tombazzi // *StatPearls.* - 2022.

12. Abad-Zapatero C., Rydel T.J., Erickson J. Revised 2.3 Å structure of porcine pepsin: Evidence for a flexible subdomain / C. Abad-Zapatero, T.J. Rydel, J. Erickson // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* - 1990. - Vol. 8, № 1. - P. 62-81.

13. Andreeva N.S., Rumsh L.D. Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: On the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of

pepsin-like enzymes / N.S. Andreeva, L.D. Rumsh // Protein Sci. - 2001. - Vol. 10, № 12. - P. 2439-2450.

14. Campos L.A., Sancho J. The active site of pepsin is formed in the intermediate conformation dominant at mildly acidic pH/ L.A. Campos, J. Sancho // FEBS Lett. - 2003. - Vol. 538, № 1–3. - P. 89-95.

15. Temperature- and pH-dependent protein conformational changes investigated by terahertz dielectric spectroscopy / Z. Zang, S. Yan, X. Han, D. Wei, H. L. Cui, C. Du // Infrared Phys. Technol. - 2019. - Vol. 98. - P. 260-265.

16. Time-resolved spectroscopy of the probe fluorescence in the study of human blood protein dynamic structure on SR beam / G.E. Dobretsov, N.K. Kurek , T.I. Syrejshchikova, M.N. Yakimenko, D.T. Clarke, G.R. Jones, I.H. Munro // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. - 2000. - Vol. 448, № 1. - P. 471-477.

17. Bito R., Shikano T., Kawabata H. Isolation and characterization of denatured serum albumin from rats with endotoxycosis / R. Bito R., T. Shikano, H. Kawabata // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics. - 2003. - Vol. 1646, № 1–2. - P. 100-111.

18. Singh A.K., Darshi M. A fluorescence study of (4-((1E,3E)-4-[4-(dimethylamino)phenyl]-buta-1,3-dienyl}phenyl)methanol and its bioconjugates with bovine and human serum albumins / A.K. Singh, M. Darshi // New J. Chem. - 2004. - Vol. 28, № 1. - P. 120-126.

19. Multiple-probe analysis of folding and unfolding pathways of human serum albumin: Evidence for a framework mechanism of folding / M.K. Santra, A. Banerjee, S.S. Krishnakumar, O. Rahaman, D. Panda // Eur. J. Biochem. - 2004. - Vol. 271, № 9. - P. 1789-1797.

20. Investigation on the interaction behavior between bisphenol A and pepsin by spectral and docking studies / H. Zhang, J. Cao, Z. Fei, Y. Wang // J. Mol. Struct. - 2012. - Vol. 1021. - P. 34-39.

21. Wang Y.Q., Zhang H.M. Comparative studies of the binding of six phthalate

- plasticizers to pepsin by multispectroscopic approach and molecular modeling / Y.Q. Wang, H.M. Zhang // *J. Agric. Food Chem.* - 2013. - Vol. 61, № 46. - P. 1-36.
22. Власова И.М., Журавлева В.В., Салецкий А.М. Денатурация бычьего сывороточного альбумина под действием цетилтриметиламмонийбромида по данным флуоресцентного анализа / И.М. Власова, В.В. Журавлева, А.М. Салецкий // *Журнал физической химии.* - Москва, 2013. - Т. 87, № 6. - С. 1037-1044.
23. Власова И.М., Журавлева В.В., Салецкий А.М. Индуцированная додецилсульфатом натрия денатурация бычьего сывороточного альбумина по данным триптофановой флуоресценции белка / И.М. Власова, В.В. Журавлева, А.М. Салецкий // *Журнал химическая физика.* - Москва, 2014. - Т. 33, № 5. - С. 69-75.
24. Dorfmueller T. Dynamic light scattering - applications of photon correlation spectroscopy / T. Dorfmueller // *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys. Chemie.* - 1987. - Vol. 91, № 4. - P. 498-499.
25. Serdyuk I.N., Zaccai N.R., Zaccai J. Methods in Molecular Biophysics / I.N. Serdyuk, N.R. Zaccai, J. Zaccai // *Methods in Molecular Biophysics.* - 2007.
26. Palombo F., Fioretto D. Brillouin Light Scattering: Applications in Biomedical Sciences / F. Palombo, D. Fioretto // *Chemical Reviews.* - 2019. - Vol. 119, № 13. - P. 7833-7847.
27. Dubir P.L., Murrell J.M. Size Distribution of Complexes Formed between Poly(dimethyldiallylammonium chloride) and Bovine Serum Albumin / P.L. Dubir, J.M. Murrell // *Macromolecules.* - 1988. - Vol. 21, № 7. - P. 2291–2293.
28. Study of thermally and chemically unfolded conformations of bovine serum albumin by means of dynamic light scattering / A. Aschi, N. Mbarek, M. Othman, G. Abdelhafidh // *Materials Science and Engineering: C.* - 2008. - Vol. 28, № 5–6. - P. 594-600.
29. Impact of macromolecular crowding on structure and properties of pepsin and trypsin / W. Gtari, H. Bey, A. Aschi, L. Bitri, T. Othman // *Materials Science and Engineering: C.* - 2017. - Vol. 72. - P. 98-105.

30. Greenfield N.J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure / N.J. Greenfield // *Nat. Protoc.* - 2007. - Vol. 1, № 6. - P. 2876–2890.
31. Circular dichroic analysis of denatured proteins: Inclusion of denatured proteins in the reference set / S.Y. Venyaminov, I. A. Baikalov, Z. M. Shen, C. S. Wu, J. T. Yang // *Anal. Biochem.* - 1993. - Vol. 214, № 1. - P. 17-24.
32. Circular dichroism spectroscopic assessment of structural changes upon protein thermal unfolding at contrasting pH: Comparison with molecular dynamics simulations / P. García-Gutiérrez, M. Camarillo-Cadena, L. Vera-Robles, R. Zubillaga, A. Hernández-Arana // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* - 2022. - Vol. 274.
33. Koseki T., Kitabatake N., Doi E. Conformational changes in ovalbumin at acid pH / T. Koseki, N. Kitabatake, E. Doi // *J. Biochem.* - 1988. - Vol. 103, № 3. - P. 425-430.
34. Circular dichroic and fluoropolarimetric studies on tryptophyl residues in acid-induced isomerization of bovine plasma albumin / M. Sogami, S. Era, S. Nagaoka, H. Inouye // *Int. J. Pept. Protein Res.* - 1982. - Vol. 19, № 3. - P. 263-269.
35. Molecular dynamics simulation revealed the intrinsic conformational change of cellular inhibitor of apoptosis protein-1/ H. Xu, Z. Tang, Y. Zuo, F. Xiong, K. Chen, H. Jiang, C. Luo, H. Zhang // *J. Biomol. Struct. Dyn.* - 2020. - Vol. 38, № 4. - P. 975-984.
36. Thermally induced conformational changes and protein-protein interactions of bovine serum albumin in aqueous solution under different pH and ionic strengths as revealed by SAXS measurements / D. Molodenskiy, E. Shirshin, T. Tikhonova, A. Gruzinov, G. Petersa, F. Spinozzi // *Physical Chemistry Chemical Physics.* - 2017. - Vol. 19, № 26. - P. 17143-17155.
37. Effect of pH on the structure and stability of irisin, a multifunctional protein: Multispectroscopic and molecular dynamics simulation approach / R. Waseem, A. Shamsi, M. Shahbaz, T. Khan, S.N. Kazim, F. Ahmad, M. I. Hassan, A. Islam // *J. Mol. Struct.* - 2022. - Vol. 1252.
38. Srivastav A.K., Gupta S.K., Kumar U. A molecular simulation approach

towards the development of universal nanocarriers by studying the pH- and electrostatic-driven changes in the dynamic structure of albumin / A.K. Srivastav, S.K. Gupta, U.Kumar // RSC Adv. - 2020. - Vol. 10, № 23. - P. 13451-13459.

39. Electrostatic unfolding and interactions of albumin driven by pH changes: A molecular dynamics study / K. Baler, O.A. Martin, M.A. Carignano, G.A. Ameer, J.A. Vila, I. Szleifer. // J. Phys. Chem. B. - 2014. - Vol. 118, № 4. - P. 921-930.

40. Quest Calculate Phosphate Buffer (pH 5.8 to 7.4) Preparation and Recipe// URL: <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/phosphate-buffer-ph-5-8-to-7-4> (дата обращения: 15.02.2023). - Яз. англ.

41. Quest Calculate Citrate Buffer (pH 3.0 to 6.2) Preparation and Recipe // URL: <https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/citrate-buffer-ph-3-to-6-2>. (дата обращения: 15.02.2023). - Яз. англ.

42. DichroWeb - Online Circular Dichroism Deconvolution // URL: <https://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/links.shtml> (дата обращения: 04.05.2023). - Яз. англ.

43. GROMACS: Fast, flexible, and free / D. V. D. Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H.J. Berendsen // Journal of Computational Chemistry. - 2005. - Vol. 26, № 16. - P. 1701-1718.

44. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration / H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. Gunsteren, J. Hermans // Nature. - 1981. - Vol. 11, № 1. - P. 331-342.

45. Witten T.A., Sander L.M. Diffusion-limited aggregation, a kinetic critical phenomenon / T.A. Witten, L.M. Sander // Phys. Rev. Lett. - 1981. - Vol. 47, № 19. - P. 1400-1403.

46. Wetzel P.A., Pierce B.J., Geri G.A. Viewing distance and the perceived size of simulator imagery / P.A. Wetzel, B.J. Pierce, G.A. Geri // J. Soc. Inf. Disp. - 1996. - Vol. 4, № 4. - P. 247-253.