

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Софронова Алина Андреевна

**Взаимодействие белков с синтетическими и природными
полиэлектролитами и влияние на него посттрансляционных
модификаций**

03.01.08 – Биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в отделе биохимии животной клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный -

Семенюк Павел Игоревич

руководитель

кандидат биологических наук

**Официальные -
оппоненты**

Левицкий Дмитрий Иванович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией структурной биохимии белка Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Митькевич Владимир Александрович - доктор биологических наук, главный научный сотрудник ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Цветков Владимир Борисович – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник Центра математического моделирования в разработке лекарств, Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита диссертации состоится 8 июня 2022 года в 16:30 на заседании диссертационного совета МГУ.03.04 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/452818194/>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

И.В. Шаповалова

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
ДЛС – динамическое лазерное светорассеяние
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДС – декстрансульфат натрия
ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия
ИТК – изотермическая титрационная калориметрия
КД – спектроскопия кругового дихроизма
ПолиЦ – полицитидилат калия
ПСС – поли(стиролсульфонат) натрия
ПФ – полифосфат натрия
ПЭВП – бромид поли-N-этил-4-винилпиридиний
РНК – рибонуклеиновая кислота
СМL – карбоксиметиллизин
СМF – (карбоксиметил)фенилаланин
pTyr – фосфорилированный тирозин
sTyr – сульфатированный тирозин
SuccK – сукциниллизин

ВВЕДЕНИЕ

1. Актуальность проблемы и степень разработанности темы

Электростатические взаимодействия играют важную роль во многих биологических процессах, поскольку они контролируют специфичность взаимодействия белков с другими заряженными полимерами. В частности, белки содержат заряженные аминокислоты, а именно остатки аспартата, глутамата, лизина, аргинина и гистидина. В результате поверхность белка имеет отрицательно и положительно заряженные участки, которые важны для взаимодействия белка с другими макромолекулами (Lehninger et al., 2005).

Частным случаев белков с высокой плотностью заряда являются внутренне неупорядоченные белки, повышенное содержание заряженных аминокислот в которых дестабилизирует структуру подобных молекул и приводит к отсутствию компактной глобулы. Электростатические взаимодействия особенно важны для этого класса белков (Yang et al., 2020).

К заряженным полимерам можно отнести нуклеиновые кислоты, обладающие высокой плотностью отрицательного заряда, который необходим для образования белок-ДНК и белок-РНК комплексов (Peng and Alexov, 2017). Кроме того, к природным полимерам можно отнести сульфатированные полисахариды, в частности природный антикоагулянт гепарин и полисахариды, образующую клеточную стенку водорослей. Биологические системы также содержат множество фосфат-содержащих полимеров, от молекул, таких как АТФ и инозитолтрифосфат, до различных линейных полифосфатов, которые синтезируются в прокариотах и эукариотах, участвуют в энергетическом обмене (Jiménez et al., 2017).

Природные и синтетические гомополимеры и простые сополимеры применяются в биоинженерии, биотехнологии и фармакологии для очистки белков, иммобилизации ферментов и направленной доставки лекарственных препаратов (Achazi et al., 2021; Xu et al., 2011). Их использование также является перспективным подходом для подавления агрегации белков. Серии экспериментов показали влияние различных характеристик полиэлектролитов и белков, а также условий среды на образование комплексов белок-полиэлектролит (Cooper et al., 2006; Sedlák et al., 2009; Semenyuk et al., 2013; Shalova et al., 2007; Stogov et al., 2010; Xu et al., 2012).

Значительное изменение локального заряда на поверхности белка может приводить к изменению пространственной структуры и функции белка. С этой точки зрения, посттрансляционные модификации, такие как фосфорилирование (Azevedo et al., 2015), сульфатирование (Moore, 2003), гликирование (Sadowska-Bartosz and Bartosz, 2016) и прочие модификации представляют особый интерес для биоинженерии, поскольку они могут изменять белок-белковые взаимодействия. Кроме того, нарушения в регуляции пост-трансляционных модификаций может стать причиной развития многих заболеваний, включая диабет, онкологические и нейродегенеративные заболевания.

2. Цели и задачи

Целью данной работы является исследование взаимодействия белков с заряженными полимерами (полиэлектролитами, РНК, внутренне неупорядоченными белками) и влияния белковых посттрансляционных модификаций, ассоциированных с изменением локального заряда на поверхности белка, на это взаимодействие.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследование влияния поликатионов и полианионов на агрегацию белков (лизоцим, ГАФД, α -лактальбумин) при рН ниже и выше изоэлектрической точки белка
2. Сравнение взаимодействия полиэлектролитов разной степени полимеризации с модельным белком лизоцимом методом симуляций молекулярной динамики
3. Сравнение связывания нативного и гликированного β -казеина с различными полиэлектролитами при температуре 10°C и 25°C
4. Изучение влияния разных вариантов гликирования ГАФД на ее взаимодействие с α -синуклеином и РНК методом симуляций молекулярной динамики
5. Сравнение связывания различных производных гирудина с тромбином методами молекулярного моделирования с последующей экспериментальной проверкой антитромботической активности модифицированных форм *in vitro*.

3. Объект и предмет исследования

Объектом исследования были белки, полиэлектролиты и их молекулярные модели: лизоцим, α -лактальбумин, ГАФД, β -казеин, гликированные формы ГАФД и β -казеина, α -синуклеин, производные гирудина, полиэлектролиты.

Предметом исследования было взаимодействие белков с различными полиэлектролитами; влияние заряда белка и свойств полиэлектролита (заряд,

степень полимеризации и гидрофобность) на это взаимодействие; влияние гликирования на взаимодействие β -казеина с полиэлектролитами и ГАФД с РНК и α -синуклеином; аффинность к тромбину и степень ингибирования свертывания крови различных производных гирудина.

4. Научная новизна

Впервые была продемонстрирована универсальность подхода использования полиэлектролитов для подавления агрегации различных белков. В частности, было показано, что агрегация может быть подавлена одинаково заряженным полиэлектролитом. Взаимодействие белков с полиэлектролитами было впервые изучено при помощи полноатомного молекулярного моделирования, благодаря чему была предложена модель взаимодействия, объясняющая экспериментальные данные.

Впервые было изучено влияние гликирования на структуру β -казеина и его взаимодействие с природными и синтетическими полиэлектролитами. Показан различный характер влияния гликирования ГАФД на взаимодействие с полианионами РНК и α -синуклеином. Впервые было продемонстрировано, что фосфорилирование гирудина повышает его аффинность к тромбину и увеличивает антитромботическую активность.

5. Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты углубляют теоретические представления о взаимодействии белков с полиэлектролитами и могут быть использованы для выбора полиэлектролитов в качестве инструмента для подавления агрегации белков. Данные о гликировании β -казеина и его взаимодействия с полиэлектролитами полезны для химии молочных продуктов, в частности для использования полимеров при стабилизации белков молока и предотвращении их агрегации. Результаты влияния гликирования на взаимодействие ГАФД и α -синуклеина актуальны для выяснения молекулярного механизма взаимосвязи между развитием нейродегенеративных заболеваний и сахарного диабета. Данные об аффинности к тромбину и антитромботической активности

производных гирудина могут быть использованы при разработке новых антикоагуляционных препаратов для снижения рисков побочных эффектов.

6. Методология исследования

В исследовании были использованы биохимические и физико-химические методы, а также методы вычислительной биологии и биоинформатики. Все использованные методики отвечают общепринятым мировым стандартам. Результаты экспериментов воспроизводимы и были выполнены с надлежащими контролями.

7. Положения, выносимые на защиту

1. Использование полиэлектролитов является универсальным методом подавления агрегации белков, при этом шапероноподобная активность полиэлектролита возрастает с увеличением одноименного заряда на поверхности белка и длины цепи полиэлектролита.

2. Отрицательно заряженный β -казеин активно взаимодействует с поликатионом и относительно гидрофобным сульфатированным полианионом поли(стиролсульфонат), в то время как взаимодействие с более гидрофильными сульфатированными, полифосфатными и поликарбоксилатными полианионами гораздо менее выражено.

3. Гликирование ГАФД затрудняет ее взаимодействие с полианионами α -синуклеином и РНК, хотя механизм влияния гликирования на взаимодействие ГАФД с α -синуклеином и РНК был различным.

4. Фосфорилирование десульфо-гирудина улучшает его связывание с тромбином и антитромботическую активность по сравнению с природным сульфатированием.

8. Степень достоверности данных

Обзор литературы подготовлен с использованием актуальных публикаций и соответствует теме диссертации. Данные были получены с использованием

современных методов биохимии и вычислительной биологии и биоинформатики. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Origin8 и RStudio. Результаты исследования были представлены на российских и международных конференциях и опубликованы в международных научных журналах.

9. Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в международных рецензируемых научных журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science.

10. Апробация работы

Результаты работы были представлены на международных конференциях: XXXIV зимняя школа молодых ученых "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 2022, Москва, Россия; VII Молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия; VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум "Белки и пептиды", 2019, Дагомыс, Россия; The 2nd Russia-Japan Joint Forum for Education and Research, 2018, Москва, Россия; XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2017», Москва, Россия; International Conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals and Applications", Московская обл., Истра, Россия; V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, 2016, Сочи, Россия; XXIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», Москва, Россия; XXVIII зимняя школа молодых ученых "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 2016, Москва, Россия; XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015», Москва, Россия.

11. Личный вклад автора

Основные результаты работы были получены самим соискателем. Личный вклад автора заключается в анализе данных литературы, планировании и

проведении экспериментов, в обработке и анализе полученных данных, подготовке публикаций. Эксперименты по спектроскопии кругового дихроизма были проведены при участии А.М. Арутюняна; эксперименты по седиментационному анализу были проведены при участии П.В. Калмыкова и Н.Н. Магретовой; эксперименты по изотермической титрационной калориметрии были выполнены при участии В.Н. Орлова и В.Н. Мичуриной, эксперименты по динамическому лазерному светорассеянию по измерению размера и дзета-потенциала комплексов лизоцима с полиэлектролитами были выполнены Д.Б. Евстафьевой; эксперименты по поверхностному плазмонному резонансу были выполнены Д.В. Поздышевым и К.В. Бариновой.

12. Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, полученных результатов и их обсуждения, заключения, основных результатов и выводов, благодарностей и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 187 страницах, иллюстрирована 46 рисунками и 6 таблицами. Список цитируемой литературы включает 271 источник.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Экспериментальная часть

В работе были использованы следующие белки: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), лизоцим, α -лактальбумин, β -казеин, С-концевые (остатки 55-65) пептиды гирудина и его производные. Структурные формулы исследуемых полиэлектролитов приведены на Рис. 1.

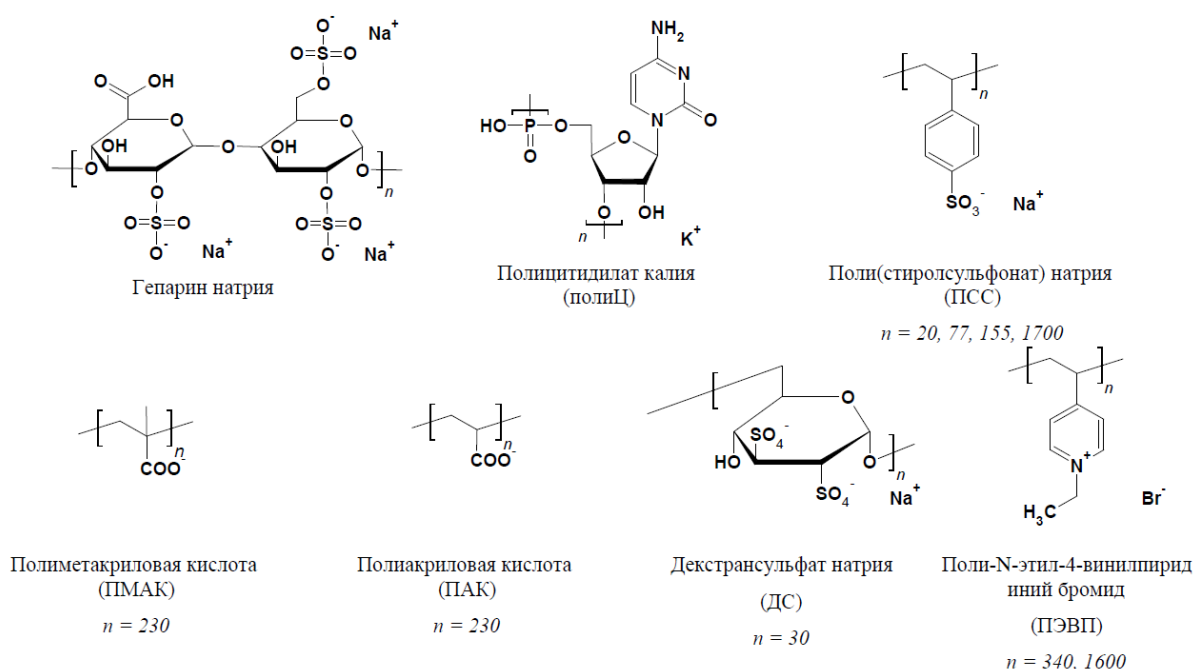


Рисунок 1. Химические формулы используемых полиэлектролитов

Влияние полиэлектролитов на тепловую агрегацию ГАФД оценивали путем измерения оптической плотности раствора на спектрофотометре Aminco DW2000, лизоцима и α -лактальбумина по размеру частиц в растворе методом динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) с использованием прибора ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments). **Гликирование β -казеина** осуществляли метилглиоксалем, конечные продукты гликирования детектировали методом флуоресцентной спектроскопии (спектрофлуориметр FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon)). **Размер комплексов β -казеина с полиэлектролитами** был определен методами ДЛС и аналитического ультрацентрифугирования, используя центрифугу модели Beckman E. **Прямое взаимодействие полиэлектролитов с β -казеином** исследовали при помощи изотермической титрационной калориметрии (ИТК) с использованием калориметра VP-ITC (Microcal, США). **Изучение влияния гликирования и взаимодействия с полиэлектролитами на структуру β -казеина** проводили с помощью измерения спектров кругового дихроизма (КД) в дальнем ультрафиолете на приборе Jobin Yvon CD Mark 6 и собственной флуоресценции β -казеина на спектрофлуориметре FluoroMax-3. **Частичный протеолиз β -казеина** в присутствии ПСС осуществляли пепсином в соотношении

фермент/субстрат 1:1000, полученные гидролизаты анализировали с помощью SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. **Антитромботическую активность** С-концевых аналогов гирудина оценивали по времени свертывания плазмы крови человека при добавлении тромбина.

2. Молекулярное моделирование взаимодействий

Симуляции и анализ молекулярной динамики были сделаны с использованием пакета программ GROMACS. Протонирование и визуализация структур белков при различных значениях pH осуществлялось с помощью веб-сервера PDB2PQR и APBS. **Симуляции молекулярной динамики взаимодействия лизоцима с полиэлектrolитами** были сделаны с использованием силового поля GROMOS 54a7. Каждая система моделирования состояла из одной молекулы лизоцима и нескольких молекул ПЭВП, неорганического полифосфата (ПФ) или ПСС. В зависимости от длины полиэлектrolита было добавлено разное количество молекул для достижения одинакового общего количества мономеров в системе. Молекулы полиэлектrolитов были параметризованы с помощью инструментов RED III и Firefly QC. Каждая система моделировалась трижды с разными случайными начальными положениями цепей в ячейке в течение 50 нс.

Симуляции молекулярной динамики взаимодействия между ГАФД и α -синуклеином или РНК проводили с использованием силового поля AMBER99-parmbsc0. Было выполнено три набора симуляций как для α -синуклеина, так и для РНК: с нативной ГАФД и двумя формами гликированной ГАФД: гликированная по бороздке ГАФД и равномерно гликированная ГАФД. Гликированные структуры белка ГАФД были получены путем замены остатков на N- ϵ -карбоксиметиллизина (CML, Рис. 2А). Молекула CML была параметризована с помощью инструментов RED III и Firefly QC. В каждом случае провели по 10 независимых симуляций по 200 нс с разными случайными выбранными исходными позициями α -синуклеина или РНК.

Симуляции направленной молекулярной динамики комплекса тромбин-гирудин проводились с различными производными гирудина. Химические структуры использованных нестандартных аминокислот представлены на Рис. 2Б. Было протестировано два силовых поля GROMOS-54A8 с надстройкой Vienna-PTM и Charmm 36М с дополнительной параметризацией с использованием онлайн-сервиса CGenFF. Расчет свободной энергии Гиббса (ΔG) взаимодействия тромбина с производными гирудина проводился методом зонтичной выборки (umbrella sampling) и методом анализа взвешенных гистограмм. Стандартная ошибка была оценена с использованием метода бутстрепа.

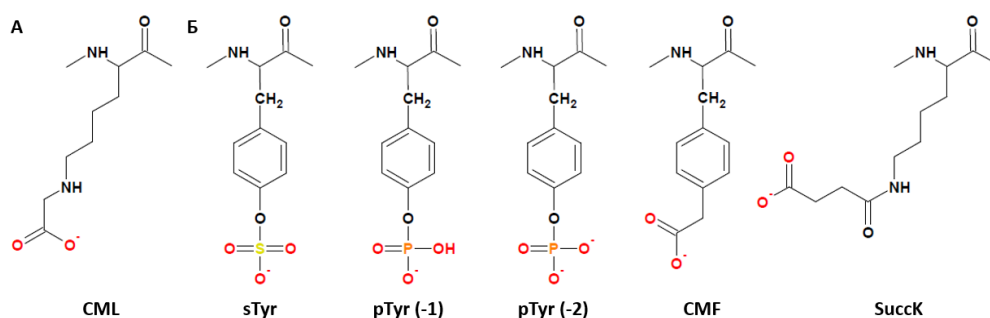


Рисунок 2. Структуры нестандартных аминокислот ГАФД (А) и гирудина (Б)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Взаимодействие белков с полиэлектролитами

Некоторые полиэлектролиты, взаимодействуя с белками, проявляют шапероноподобную активность и могут быть использованы для подавления агрегации белков. Для проверки гипотезы об универсальности метода подавления агрегации с использованием полиэлектролитов, были использованы три модельных белка с различной изоэлектрической точкой (pI): глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД, pI 8,5), лизоцим (pI 9,3) и α -лактальбумин (pI 4,9). Эксперименты проводили при различных значениях pH, как выше, так и ниже изоэлектрической точки белков. Таким образом, поверхностный заряд белков варьировался, и, следовательно, изменялось и

взаимодействие белков с полиэлектролитами. В качестве полиэлектролитов мы использовали полианион ДС, а также поликатион ПЭВП.

Добавление ПЭВП к лизоциму (pI 9,3) позволило подавить тепловую агрегацию белка при всех выбранных значениях pH , причем подавление агрегации поликатионом было наиболее эффективным при pH 7,5, когда и лизоцим ($pI = 9,3$), и поликатион заряжены положительно и, следовательно, электростатическое связывание белок-поликатион наименее эффективно.

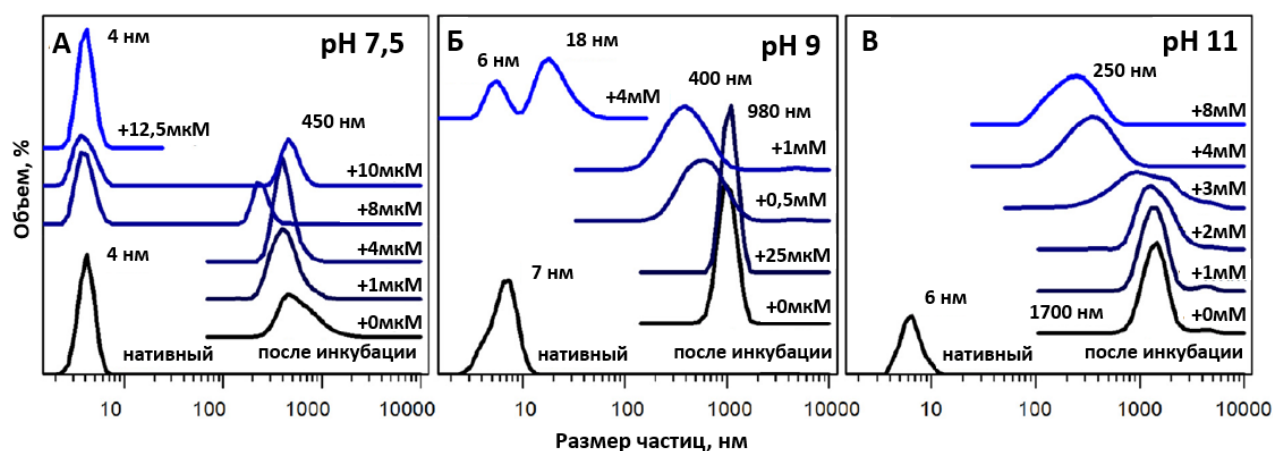


Рисунок 3. Гидродинамический диаметр частиц лизоцима с ПЭВП. Размер частиц лизоцима измеряли до (нижняя кривая) и после (остальные кривые) тепловой агрегации при pH 7,5 (А), pH 9,0 (Б) и pH 11,0 (В).

Далее мы исследовали тепловую агрегацию другого белка ГАФД ($pI = 8,5$) в присутствии полиэлектролитов, измеряя увеличение оптической плотности раствора в процессе агрегации. При всех выбранных значениях pH , агрегация ГАФД была полностью подавлена при добавлении полианиона ДС, а также частично подавлена при добавлении поликатиона ПЭВП. Как и в случае с лизоцимом, поликатион ПЭВП показал наибольшую эффективность при pH 6,5 (Рис. 4А), когда и белок, и поликатион заряжены положительно; полианион ДС оказался наименее эффективным при pH 6,5 (Рис. 4Б).

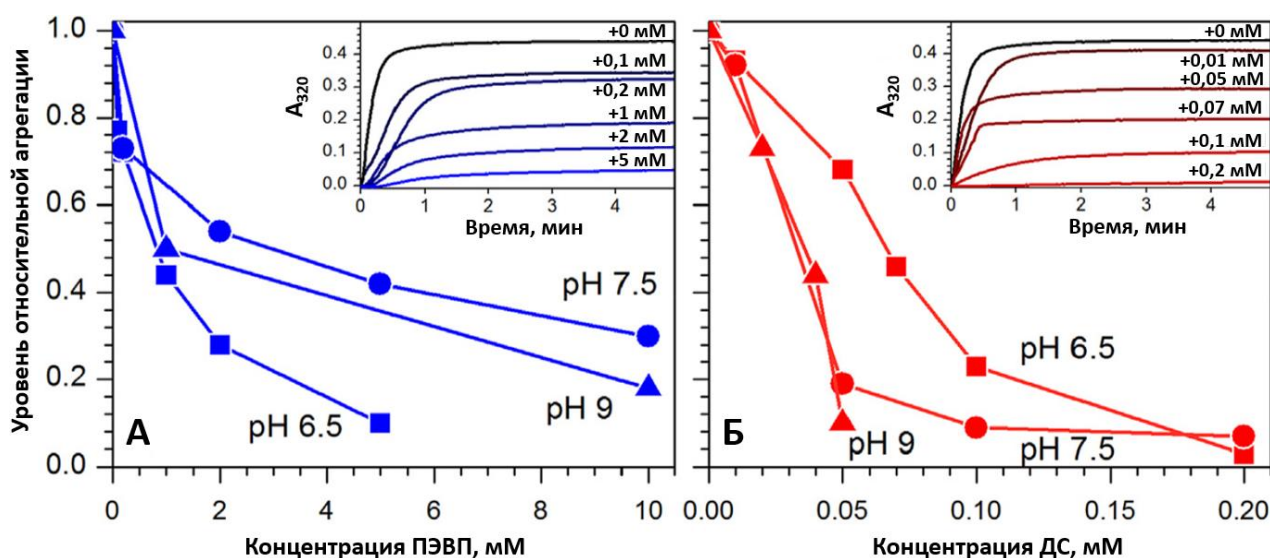


Рисунок 4. Зависимость уровня относительной тепловой агрегации ГАФД от концентрации добавленных полиэлектролитов ПЭВП (А) и ДС (Б) при различных значениях рН.

Затем эксперименты по подавлению агрегации были проведены с кислым белком α -лактальбумин ($pI = 4,9$) при рН 6,5, когда белок был заряжен отрицательно. Добавление одноименно заряженного полианиона ДС привело к снижению уровня агрегации α -лактальбумина.

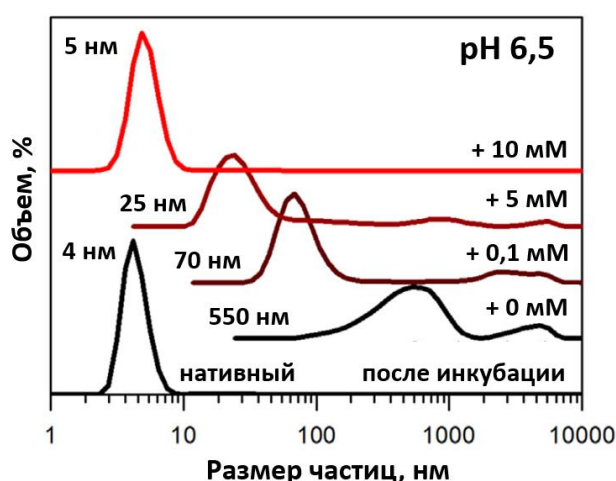


Рисунок 5. Размер частиц α -лактальбумина с ДС до (нижняя кривая) и после (остальные кривые) тепловой агрегации при рН 6,5.

На основе полученных результатов была предложена модель взаимодействия полиэлектролитов с белками в зависимости от значения рН (Рис. 6). Поскольку на поверхности белка одновременно расположены как

положительно, так и отрицательно заряженные аминокислоты, полиэлектролит связывает белок только частью своей цепи. Остальные мономеры полиэлектролита отталкиваются от одноименно заряженных остатков белка, образуя петли и хвосты с нескомпенсированным зарядом. Последние образуют заряженную оболочку вокруг белка, что, по-видимому, и определяет склонность комплекса к агрегации, т. е. более высокий защитный эффект полиэлектролита достигается за счет увеличения размеров и числа петель. В свою очередь размер и количество петель увеличиваются с уменьшением количества потенциальных сайтов связывания, т. е. противоположно заряженных участков на поверхности белка. Таким образом, увеличение эффективности подавления агрегации полиэлектролитом увеличивается с ростом одноименного заряда на белке. Возможность образования этих петель и хвостов также была показана с помощью моделирования молекулярной динамики лизоцима с поликатионом ПЭВП и двумя полианионами ПСС и ПФ.

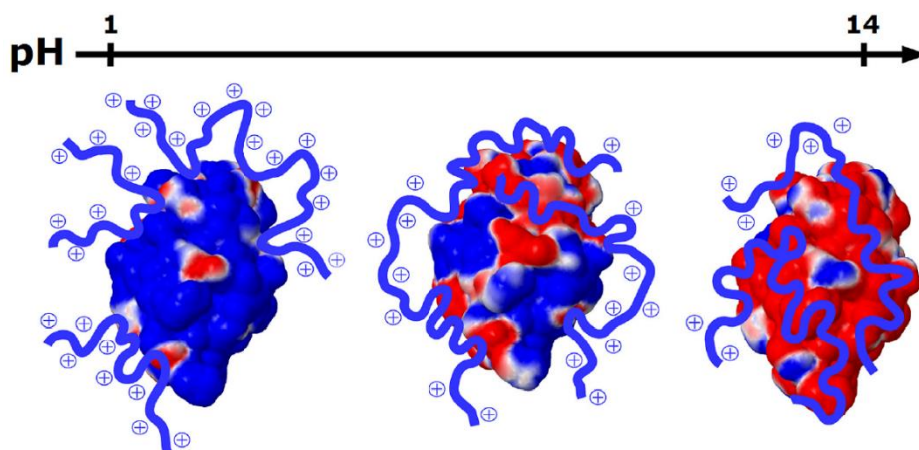


Рисунок 6. Модель взаимодействия белок-полиэлектролит при различных значениях pH .

На модельной системе лизоцима с полианионами ПСС и ПФ с разной степенью полимеризации было исследовано влияние степени полимеризации полиэлектролита на его взаимодействие с белком. Оба полианиона связывались с лизоцимом, образуя комплекс белок-полиэлектролит за счет образования

ионных пар и водородных связей. Короткие цепи полианионов связывались с белком практически по всей длине молекулы, тогда как более длинные полианионы могли связываться только через небольшие фрагменты цепи (Рис. 7), при этом в случае обоих полианионов количество связанных мономеров полиэлектролита практически не зависит от степени его полимеризации. Таким образом, оба полианиона, вероятно, занимали все возможные сайты связывания из-за избытка полианионов в модельной ячейке. Количество свободных мономеров, наоборот, увеличивалось вместе со степенью полимеризации. Длинные цепи связывались с белком схожим числом мономеров, но вследствие их большей длины большее количество мономеров остается в свободной форме, образующих петли и хвосты, отталкивающиеся от поверхности белка.

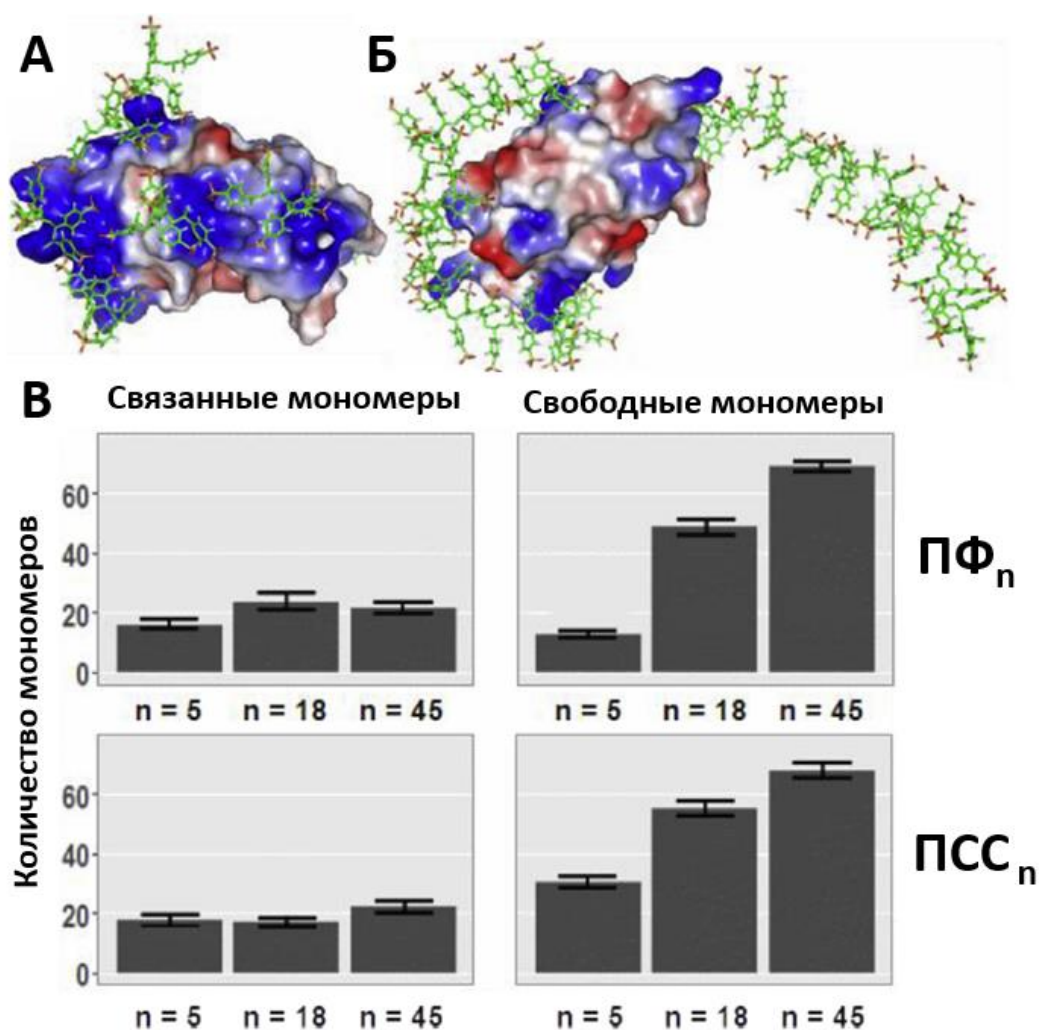


Рисунок 7. Общий вид комплекса белок-ПСС₅ (А) и белок-ПСС₄₅ (Б). (В) Количество связанных и свободных мономеров связанных цепей ПФ и ПСС.

Поскольку использование полиэлектролитов является эффективным методом предотвращения агрегации белков, нас интересовало исследование взаимодействия белок-полиэлектролит с точки зрения растворимости таких комплексов. Заряд комплекса оказался отрицательным и увеличивался по мере увеличения длины цепи полианиона за счет увеличения общего числа мономеров полиэлектролита в образующемся комплексе. Результаты, полученные с помощью моделирования, подтверждаются измерением размера и дзета-потенциала комплексов ПСС разной степени полимеризации с двумя разными белками, лизоцимом и ГАФД.

Таким образом, уменьшение количества противоположно заряженных участков на поверхности белка при изменении рН, с которыми может связаться полиэлектролит, а также увеличение степени полимеризации полиэлектролита приводит к усилению образования петель и хвостов и обеспечивает ингибирующий эффект агрегации полиэлектролитом.

2. Взаимодействие внутренне неупорядоченного белка β -казеина с полиэлектролитами и влияние гликирования

Было изучено взаимодействие нативного и гликированного внутренне неупорядоченного молочного белка β -казеина ($pI = 5,1$) с различными синтетическими и природными полиэлектролитами, различающихся заряженной группой, структурой и гидрофобностью: два сульфатированных полимера, гидрофильный гепарин и относительно гидрофобный ПСС, поликарбоксилат ПАК и полифосфат полиЦ, а также поликатион ПЭВП. Все эксперименты проводили при рН 7,5 при 10°C и 25°C, когда β -казеин находится преимущественно в мономерной и мицеллярной форме соответственно из-за своей амфифильной структуры.

Мы измерили размер комплексов нативного и гликированного β -казеина с полиэлектролитами с помощью динамического лазерного светорассеяния (Рис. 8А,Б). Добавление поликатиона ПЭВП к нативному белку привело к

образованию крупных комплексов, которые быстро выпадали в осадок. В присутствии полианионов ПАК и полиЦ диаметр частиц в пробе совпадал с диаметром свободного β -казеина, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия. Добавление ПСС и гепарина приводило к образованию растворимых комплексов с диаметром, отличным от нативного белка.

Гидродинамический диаметр гликированного β -казеина превышал диаметр нативного белка, что свидетельствует об образовании мицелл или олигомеров. Как и в случае с немодифицированным β -казеином, взаимодействие с поликатионом ПЭВП приводило к образованию крупных агрегатов и выпадению осадка. Добавление каждого из полианионов влияло на диаметр частиц в растворе. Добавление ПСС приводило к образованию комплексов, близких по размеру к мономеру нативного β -казеина.

Для более детального анализа размеров комплексов был проведен седиментационный анализ нативного и гликированного β -казеина (Рис. 8В-Ж). Гликирование привело к уменьшению коэффициента седиментации β -казеина, в отличие от увеличения гидродинамического диаметра по данным ДЛС (Рис. 8А,Б), что указывает на менее плотную структуру частиц гликированного β -казеина по сравнению с нативным.

Выраженное изменение коэффициентов седиментации наблюдалось при добавлении полианиона ПСС (Рис. 8Д). Результаты седиментационного анализа и ДЛС свидетельствуют об образовании относительно компактных комплексов в присутствии ПСС, причем особенно выражено это уплотнение для гликированного β -казеина. Согласно полученным КД спектрам, вторичная структура β -казеина при гликировании и взаимодействии с ПСС не изменилась.

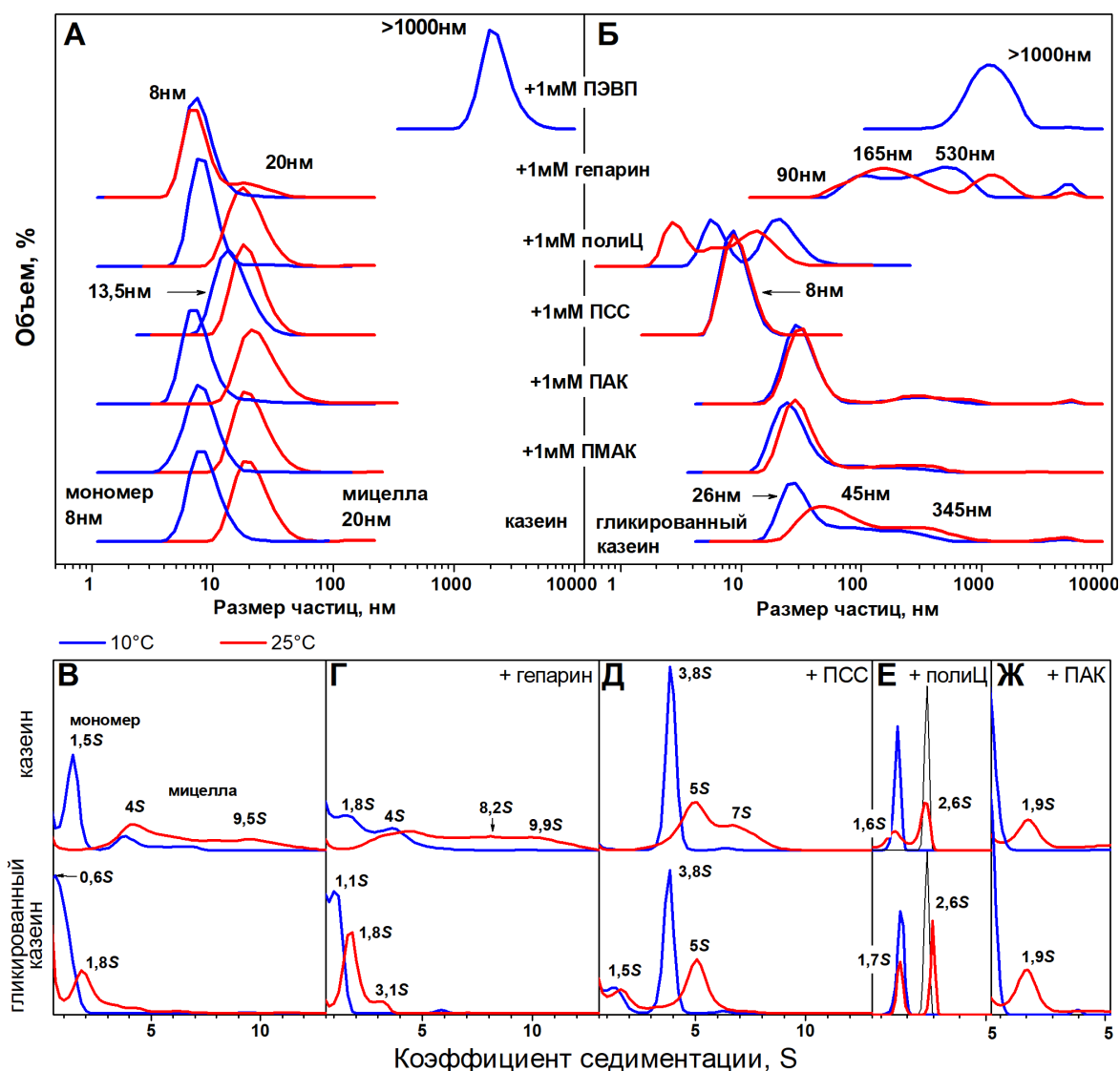


Рисунок 8. (А, Б) Кажущийся гидродинамический диаметр и (В-Ж) седиментограммы частиц нативного и гликированного β -казеина при температуре 10°C и 25°C в присутствии различных полиэлектролитов. Черная кривая на графике Е обозначает свободный полиЦ.

Прямое исследование взаимодействия β -казеина с полианионами (ПСС, гепарином, полиЦ и ПАК) проводили методом изотермической титрационной калориметрии (Рис. 9). Суммируя результаты экспериментов по титрованию, можно заключить, что наиболее эффективным было связывание β -казеина с ПСС. Гликирование привело к практически полному подавлению взаимодействия с полиЦ и частичному с ПАК.

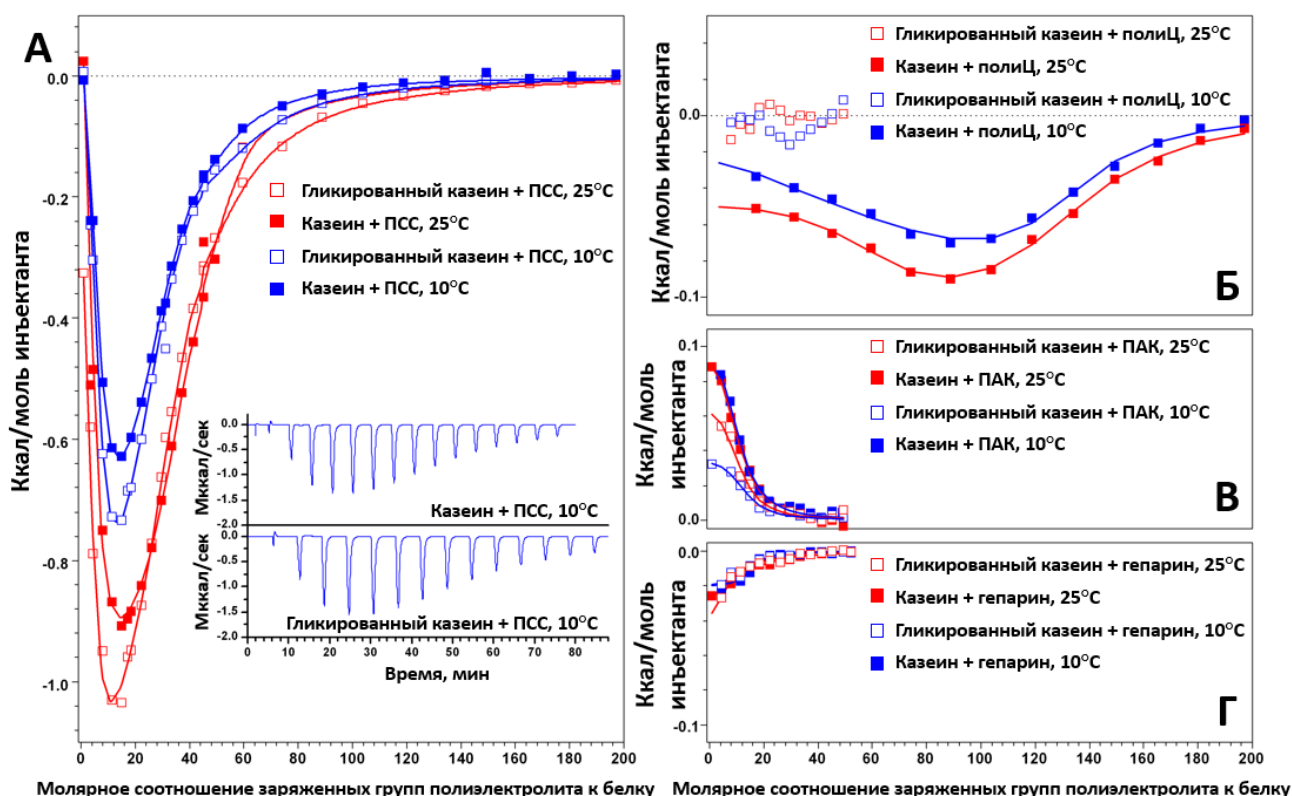


Рисунок 9. Данные ИТК для титрования нативного и гликированного β -казеина растворами полианионов при температуре 10°C и 25°C.

Изменения в структуре белка в результате гликирования и взаимодействия с полиэлектrolитами исследовали путем измерения собственной флуоресценции β -казеина. Гликирование привело к сдвигу длины волны максимума флуоресценции вправо, что означает дальнейшее разворачивание гликированного β -казеина. Присутствие полианионов на собственную флуоресценцию белка не повлияло.

Так как мы показали, что PSS наиболее эффективно взаимодействует с β -казеином, мы также проанализировали его влияние на протеолиз нативного и гликированного β -казеина. Электрофореграммы протеолиза нативного и гликированного белка не отличаются друг от друга, однако комплексообразование с PSS замедляло протеолиз как в случае нативного, так и гликированного β -казеина скорее всего за счет образования стабильных и компактных комплексов.

Суммируя описанные выше результаты, можно сделать вывод, что β -казеин эффективно взаимодействует с различными полиэлектролитами. Схема взаимодействия представлена на Рисунке 10. Отрицательно заряженный β -казеин при pH 7,2 эффективно связывает поликатион, образуя крупные комплексы, выпадающие в осадок. Взаимодействие β -казеина с полианионами более сложное и зависит от гидрофобности полиэлектролита. Взаимодействие с относительно гидрофобным сульфатированным полимером ПСС было значительно более эффективным, чем взаимодействие с другими полимерами. Поскольку связывание другого сульфатированного, но более гидрофильного полимера гепарина было наименее выраженным среди всех протестированных полианионов, можно заключить, что ключевую роль в связывании ПСС играют именно гидрофобные взаимодействия. Анионы полифосфатов, такие как полиЦ, и анионы поликарбоксилатов, такие как ПАК, также менее эффективно взаимодействовали с β -казеином, чем ПСС. Гликирование вызывало уменьшение количества положительно заряженных групп, что ослабило связывание как фосфатных, так и карбоксилатных полианионов. Однако даже после гликирования β -казеина, по-видимому, происходит связывание со всеми протестированными полианионами. Гликирование приводило к образованию относительно крупных комплексов в растворе свободного β -казеина, склонных к дальнейшему агрегированию при нагревании до 25°C (Рис. 8). Все протестированные полианионы подавляли указанную агрегацию гликированного β -казеина, за исключением гепарина, который, наоборот, вызывал образование еще более крупных комплексов.

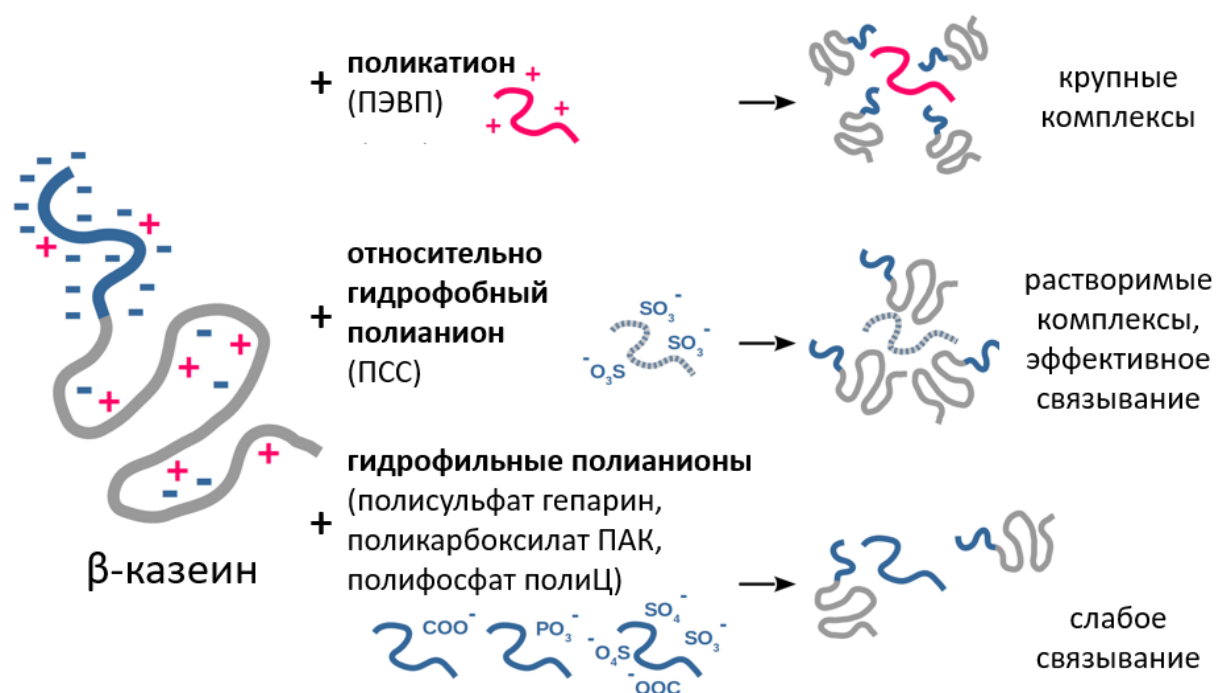


Рисунок 10. Модель взаимодействия β-казеина с полиэлектролитами. Розовый цвет обозначает положительно заряженную часть, синий цвет – отрицательно заряженную часть, серый цвет – гидрофобную часть.

3. Взаимодействие ГАФД с РНК и α-синуклеином и влияние гликирования

Методом симуляций молекулярной динамики было изучено влияние гликирования на взаимодействие ГАФД с двумя анионными биомакромолекулами, α-синуклеином и РНК. Симуляции были проведены с двумя разными формами гликированной ГАФД, полученные путем замены остатков лизина на отрицательно заряженный N-ε-карбоксиметиллизин (CML). В первом случае модифицировались все остатки лизина в обеих бороздках (всего 24 остатка, по 12 в каждой бороздке). Во втором случае модификации были равномерно распределены по поверхности ГАФД, всего было гликировано 40 остатков лизина.

Согласно результатам молекулярного моделирования, гликирование подавляет связывание α-синуклеина с ГАФД (Рис. 11). Стабильное взаимодействие между нативной ГАФД и α-синуклеином наблюдалось во всех

симуляциях. В результате гликирования, α -синуклеин связывался с ГАФД лишь в 3 и 5 из 10 симуляций в случае гликированной по бороздкам и равномерно гликированной формы ГАФД соответственно. Вывод о том, что гликирование ослабляет взаимодействие, подтверждается расчетом количества связей между различными формами ГАФД и α -синуклеином.

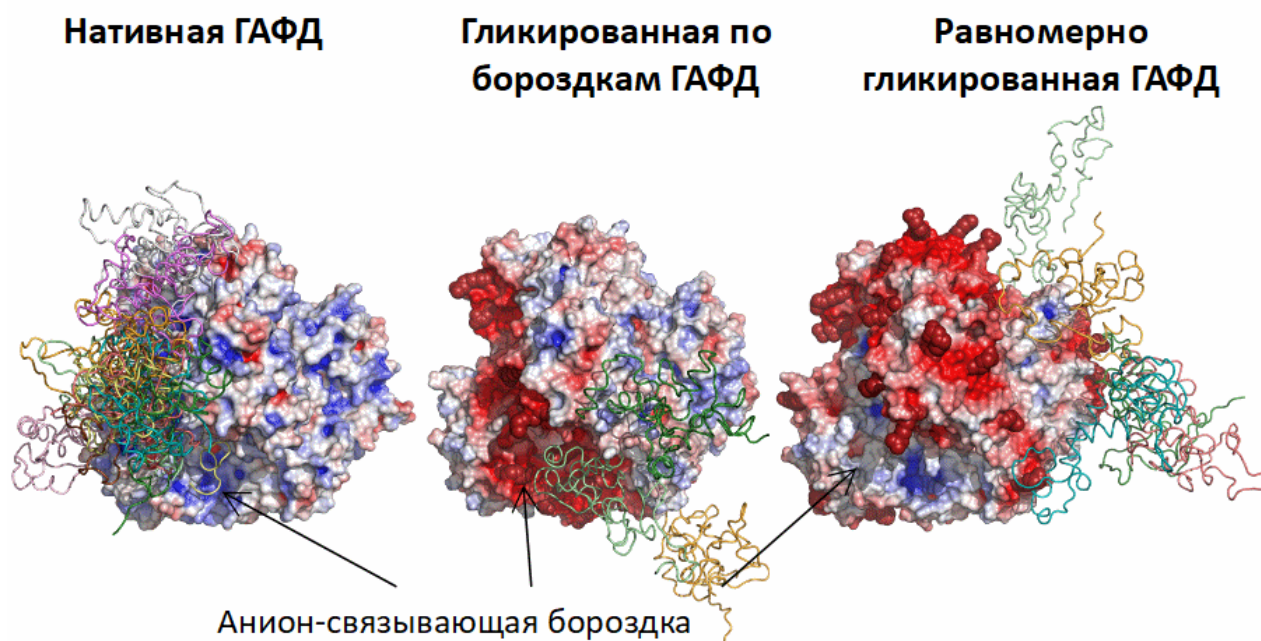


Рисунок 11. Результаты молекулярного моделирования связывания α -синуклеина с каждой из форм ГАФД.

Гликирование изменило потенциальный сайт связывания α -синуклеина на поверхности белка ГАФД. Предсказанный сайт связывания нативной формы ГАФД обогащен положительно заряженными остатками в бороздке (Рис. 11, Рис. 12А), которые взаимодействуют с отрицательно заряженным С-концевым участком α -синуклеина. В результате гликирования преимущественно образовывались солевые мостики между отрицательно заряженными остатками ГАФД, включая CML, и положительно заряженными аминокислотами на N-конце α -синуклеина (Рис. 12Б, В). Гликирование остатков, расположенных в положительно заряженной бороздке, было более критичным для связывания, в

то время как более интенсивное равномерное гликирование оказывало несколько меньшее влияние на взаимодействие.

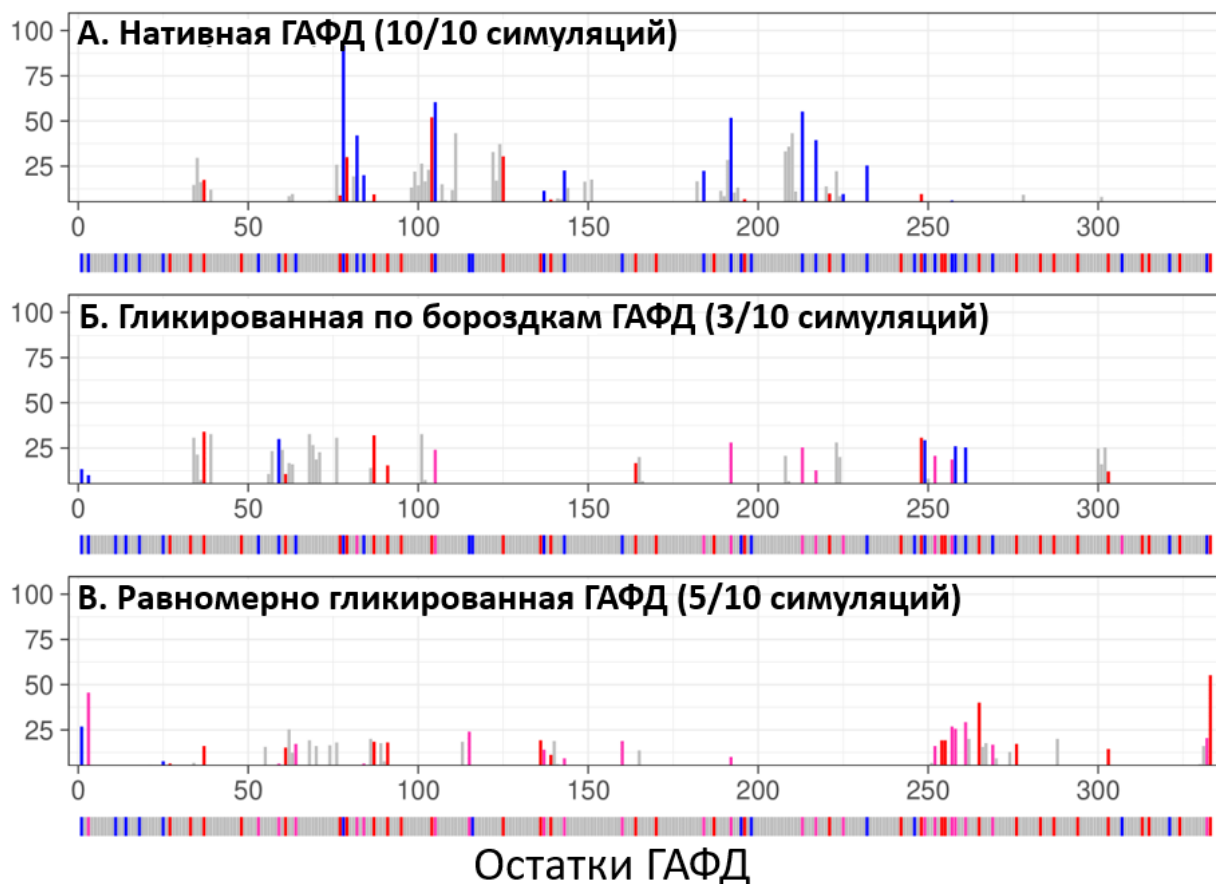


Рисунок 12. Процентное соотношение связывания каждого аминокислотного остатка различных структур ГАФД с α -синуклеином. Серым цветом показаны незаряженные аминокислоты, отрицательные и положительные остатки выделены красным и синим цветом соответственно. Остатки CML, показаны малиновым цветом.

Стабильное взаимодействие между нативной формой ГАФД и РНК наблюдалось во всех 10 независимых симуляциях. Почти во всех симуляциях с нативной формой ГАФД РНК связывалась с положительно заряженной бороздкой ГАФД (что и α -синуклеин) и только в одном случае РНК связывалась с другим положительно заряженным участком на поверхности субъединицы (Рис. 13, слева).

Как и в случае взаимодействия ГАФД с α -синуклеином, гликирование подавляет взаимодействие ГАФД с молекулой РНК. Действительно, взаимодействие наблюдалось лишь в 5 из 10 симуляций для гликированной по бороздкам формы ГАФД, причем молекулы РНК связывались в том же месте на поверхности субъединицы, что и в одной из симуляций с нативной формой ГАФД (Рис. 13). Этот сайт можно рассматривать в качестве альтернативного сайта связывания нуклеиновых кислот (Рис. 13, в центре), который стал первичным в случае гликирования бороздок. Ни в одной из симуляций для равномерно гликированной формы ГАФД не наблюдалось стабильное взаимодействие ГАФД-РНК. Значительное подавление взаимодействия между ГАФД и РНК после гликирования ГАФД подтверждается подсчетом количества различных типов контактов между молекулами.

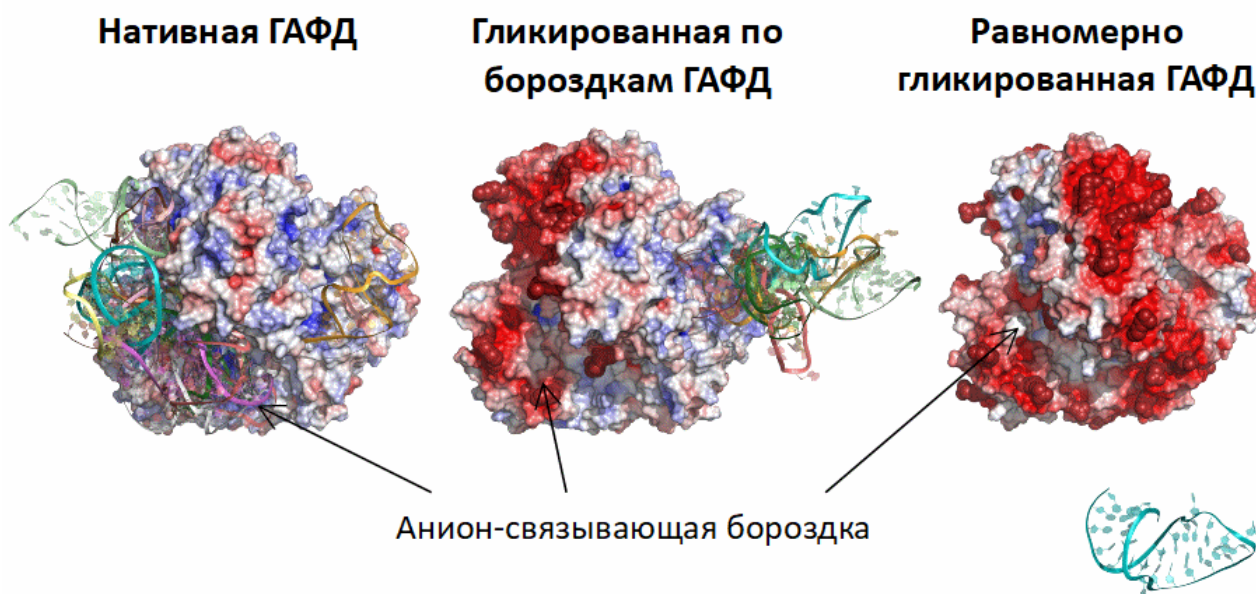


Рисунок 13. Результаты молекулярного моделирования связывания РНК с каждой из форм ГАФД.

Результаты моделирования молекулярной динамики подтверждаются полученными данными поверхностного плазмонного резонанса, согласно которым даже относительно низкий уровень гликирования ГАФД приводит к снижению эффективности связывания с α -синуклеином и РНК.

4. Влияние посттрансляционных модификаций на связывание гирудин-тромбин

Электростатические взаимодействия между тромбином и сульфатированным С-концом гирудина играют важную роль в образовании комплекса тромбин-гирудин. В клинической практике используется десульфатированный рекомбинантный аналог гирудина с более низкой эффективностью ингибирования. Мы предложили несколько модификаций гирудина, которые имитируют сульфатирование остатка Tyr63: фосфотирозин с зарядом -1 и -2, (карбоксиметил)фенилаланин (CMF) и глутамат; и модификации других остатков для неспецифического увеличения отрицательного заряда гирудина: Gln65Glu и замена всех остатков лизина на остатки сукциниллизина (SuccK).

Для оценки свободной энергии связывания производных гирудина с тромбином были проведены симуляции направленной молекулярной динамики с последующим использованием метода зонтичной выборки (Рис. 14). Свободные энергии связывания для десульфо-гирудина и сульфо-гирудина соответствуют значениям из литературы (Myles et al., 2001; Stone et al., 1989). Мутация Tyr63Glu не оказывает заметного влияния на свободную энергию связывания гирудина, мутация Tyr63CMF дестабилизирует взаимодействие с тромбином по сравнению с десульфо-гирудином. Три производных гирудина, фосфо-гирудин (-1), Gln65Glu гирудин и K₃27,36,47SuccK₃ гирудин, связываются прочнее десульфо-гирудина с преимуществом в энергии связывания $\Delta\Delta G$ от -9,6 до -10,6 кДж/моль. Самое сильное взаимодействие с тромбином наблюдалось для фосфо-гирудина (-2) с предсказанной разницей в энергии $\Delta\Delta G$ -51,7 кДж/моль по сравнению с десульфо-гирудином.

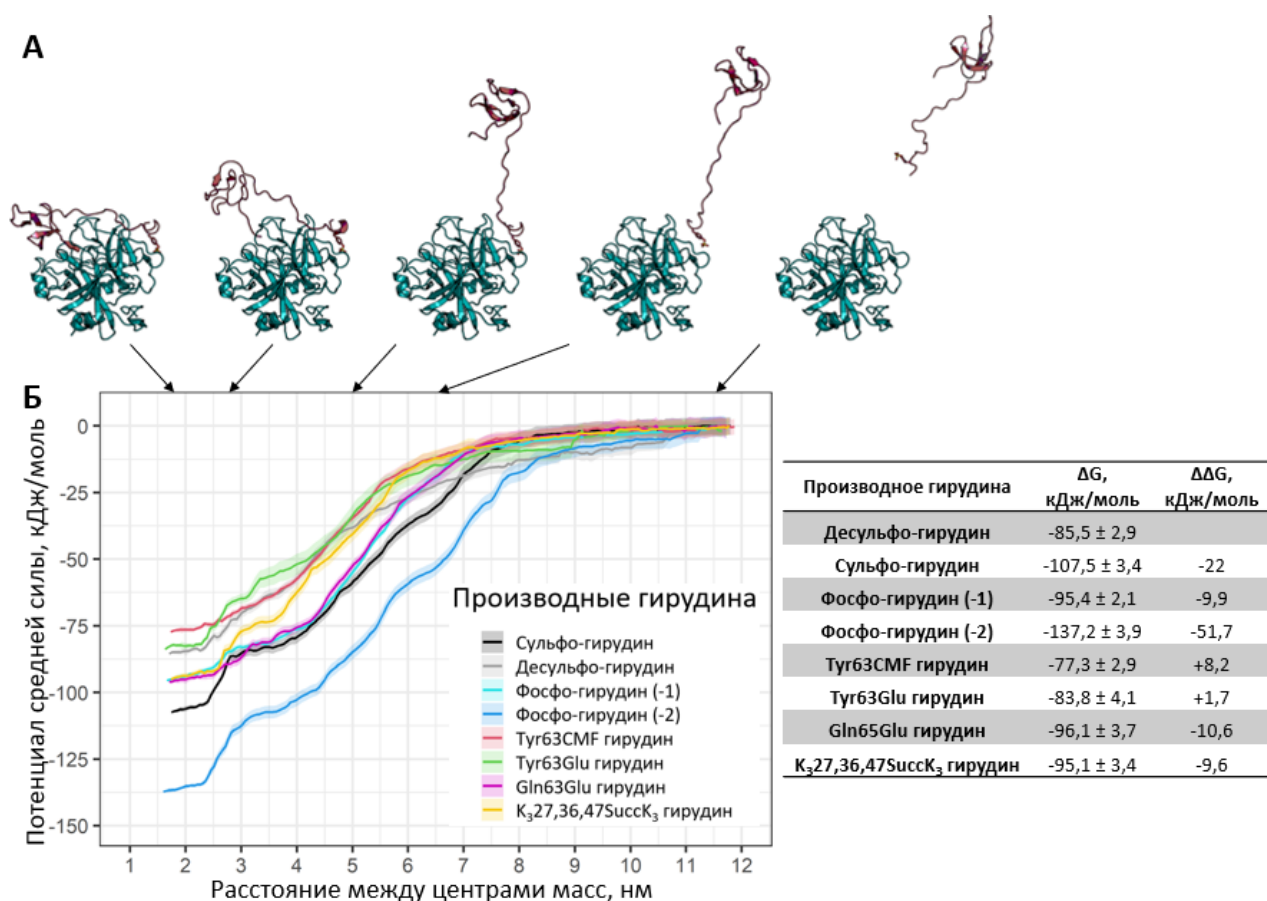


Рисунок 14. (А) Визуализация последовательной диссоциации сульфo-гирудина от молекулы тромбина в результате симуляций направленной молекулярной динамики и (Б) потенциал средней силы и предсказанные свободные энергии связывания.

Для проверки антитромботической активности были проведены эксперименты по ингибированию тромбин-опосредованного свертывания плазмы крови человека при добавлении различных производных гирудина. При экспериментальной проверке были использованы аналоги С-концевого фрагмента (остатки 55-65) молекулы гирудина. В присутствии всех протестированных аналогов гирудина 55-65 время до сворачивания плазмы крови (тромбиновое время) увеличивалось, за исключением аналога гирудина Tyr63CMF 55-65. Фосфо-гирудин 55-65 обладает наибольшей антитромботической активностью.

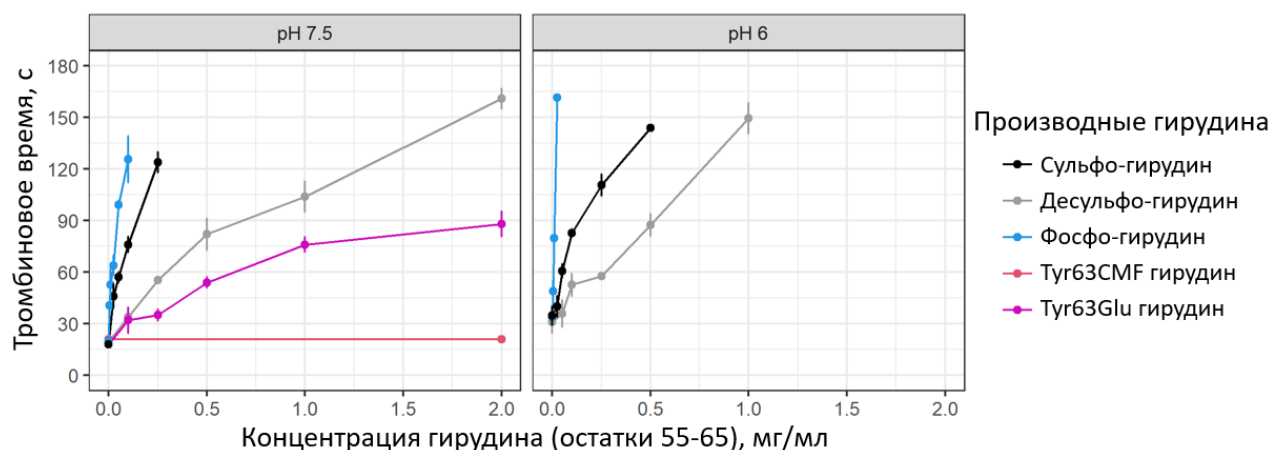


Рисунок 15. Тромбиновое время в зависимости от концентрации С-концевых производных гирудина (остатки 55-65).

Таким образом, согласно расчетам свободной энергии связывания и измерением антитромботической активности фосфорилированный гирудин является наиболее перспективным производным гирудина в качестве ингибитора тромбина для медицинского применения.

ВЫВОДЫ

1. Снижение уровня агрегации лизоцима и α -лактальбумина наблюдалось при добавлении одноименно заряженного полиэлектролита, тогда как агрегацию ГАФД удалось подавить как поликатионом, так и полианионом.

2. Согласно предложенной модели, эффективность полиэлектролита подавлять агрегацию возрастает с увеличением одноименного заряда на поверхности белка и длины цепи полиэлектролита, за счет образования длинных хвостов и петель с нескомпенсированным зарядом и увеличения заряда комплексов.

3. Отрицательно заряженный β -казеин эффективно взаимодействует с поликатионом, образуя агрегированные комплексы, и относительно гидрофобным сульфатированным полианионом поли(стиролсульфонат). Взаимодействие с более гидрофильными полианионами, в том числе с гидрофильным сульфатированным гепарином, а также полифосфатными и поликарбоксилатными полианионами, было гораздо менее выражено.

4. Гликирование снижает эффективность взаимодействия β -казеина с другими полианионами, особенно с модельной нуклеиновой кислотой полицитидилатом калия.

5. Гликирование ГАФД затрудняет ее взаимодействие с α -синуклеином, при этом ключевую роль играет гликирование остатков, расположенных в положительно заряженной бороздке ГАФД, тогда как эффект более интенсивного равномерного гликирования менее выражен.

6. Гликирование ГАФД по положительно заряженной бороздке частично подавляет ее взаимодействие с РНК, тогда как при интенсивном равномерном гликировании РНК не взаимодействует с ГАФД совсем.

7. Фосфорилирование десульфо-гирудина улучшает его связывание с тромбином и антитромботическую активность по сравнению с природным сульфатированием.

НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI

1. **Sofronova, A. A.**, Izumrudov, V. A., Muronetz, V. I. & Semenyuk, P. I. Similarly charged polyelectrolyte can be the most efficient suppressor of the protein aggregation. *Polymer* 108, 281–287 (2017); IF: 3,771, (0,44/0,35)¹

2. **Sofronova, A. A.**, Evstafyeva, D. B., Izumrudov, V. A., Muronetz, V. I. & Semenyuk, P. I. Protein-polyelectrolyte complexes: Molecular dynamics simulations and experimental study. *Polymer* 113, 39–45 (2017); IF: 3,771, (0,44/0,3)

3. **Sofronova, A. A.**, Semenyuk, P. I. & Muronetz, V. I. The influence of β -casein glycation on its interaction with natural and synthetic polyelectrolytes. *Food Hydrocoll.* 89, 425–433 (2019); IF: 5,839, (0,56/0,45)

4. **Sofronova, A. A.**, Pozdyshev, D. V., Barinova, K. V., Muronetz, V. I. & Semenyuk, P. I. Glycation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits the binding with α -synuclein and RNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 698, 108744 (2021); IF: 3,017, (0,63/0,45)

¹ В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.

ДРУГИЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **Софронова А.А.**, Семенюк П.И., Мутантные формы рекомбинантного гирудина с улучшенной антитромботической активностью, XXXIV зимняя школа молодых ученых "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 2022, Москва, Россия

2. Семенюк П.И., **Софронова А.А.**, Влияние гликирования на взаимодействие ГАФД с партнерами, вовлеченными в развитие нейродегенерации, VII Молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, 2020, Санкт-Петербург, Россия

3. Семенюк П.И., **Софронова А.А.**, Муронец В.И., Роль пост-трансляционных модификаций белков, связанных с изменением заряда, в белок-белковых взаимодействиях, VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум "Белки и пептиды", 2019, Дагомыс, Россия

4. **Sofronova A.A.**, Semenyuk P.I., Muronetz V.I., The influence of glycation of beta-casein on its interaction with natural and synthetic polyelectrolytes, The 2nd Russia-Japan Joint Forum for Education and Research, 2018, Moscow, Russia

5. **Sofronova A.A.**, Semenyuk P.I., Muronetz V.I., The influence of glycation of beta-casein on its interaction with natural and synthetic polyelectrolytes, International Conference "Biocatalysis-2017", 2017, Moscow region, Russia

6. **Sofronova A.A.**, The effect of protein glycation on interaction with synthetic and natural polyelectrolytes, International Conference "Lomonosov-2017", 2017, Moscow, Russia

7. Semenyuk P.I., **Sofronova A.A.**, Evstafyeva D.B., Izumrudov V.A., Muronetz V.I., Protein-polyelectrolyte complexes: monitoring functional state and enzyme aggregation, V Biochemistry Congress, 2016, Sochi, Russia

8. **Sofronova A.A.**, Interaction of polyelectrolytes and proteins: a molecular dynamics simulation study, International Conference "Lomonosov-2016", 2016, Moscow, Russia

9. **Софронова А.А.**, Полиэлектролиты – универсальный инструмент подавления агрегации белков, XXVIII зимняя школа молодых ученых "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 2016, Москва, Россия

10. **Sofronova A.A.**, Polyelectrolytes – the universal method for suppression of aggregation, International Conference "Lomonosov-2015", 2015, Moscow, Russia