

УДК 577.322.4

**СТРУКТУРА ЛЕД-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА
ИЗ *Myoxocephalus octodecemspinosus*, ПОЛУЧЕННАЯ МЕТОДОМ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ И НА ОСНОВЕ
СПЕКТРОВ КРУГОВОГО ДИХРОИЗМА**

© 2023 г. Г.А. Олейник*, П. Жданова*, В.В. Коваль*, **, А.А. Черноносков*, С.В. Баранова*.,#

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины,
пр-т Академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

**Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090, Россия

#E-mail: swb@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 30.12.2022 г.

После доработки 27.01.2023 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

Одна из стратегий, разработанных организмами для выживания в холодных экосистемах, где есть риск замерзания — наработка белков, способных связывать лед. Эти белки обладают важной способностью — связываться с поверхностью льда, влиять на его рост и предотвращать повреждение и гибель клеток. Для понимания механизма взаимодействия таких белков со льдом, необходимо знать их структуру. Данное исследование вносит вклад в изучение структурно-динамических механизмов действия лед-связывающих белков, которые обеспечивают адаптацию организмов в критических условиях. Изучение вклада белков, способных связывать лед, в адаптацию к холоду открывает широкие возможности в решении ряда интересных задач медицины, включая разработку эффективных клеточных и органных криопротекторов, а также долгосрочного хранения продуктов питания без потери их потребительских свойств в пищевой промышленности.

Ключевые слова: лед-связывающие белки, белки-антифризы, молекулярная динамика, круговой дихроизм, криопротекторы.

DOI: 10.31857/S0006302923040026, EDN: KJBZCU

Одна из стратегий, разработанных организмами для выживания в холодных экосистемах, где есть риск замерзания — наработка белков, способных связывать лед. Лед-связывающие белки обладают уникальным свойством связываться с поверхностью льда и, таким образом, контролируют его рост, тем самым помогая организмам избежать критических повреждений при понижении температуры. Это свойство позволяет им влиять на рост льда разными способами: формировать кристаллы льда определенной структуры, снижать температуру замерзания, препятствовать рекристаллизации и подавлять активность зародышеобразования льда. Зародышеобразование — это один из этапов формирования кристаллов льда, который инициируют инородные частицы (зародышеобразователи льда, активаторы). Лед-

связывающие белки предотвращают ассоциацию воды с зародышеобразователями льда и, как следствие, образование кристаллов [1, 2].

Несмотря на то, что в последнее время в научной литературе наблюдается повышенный интерес к лед-связывающим белкам [3, 4], структурно-динамические механизмы действия этих белков до сих пор не известны полностью.

Способность лед-связывающих белков контролировать рост льда может быть использована при хранении продуктов питания, в сельскохозяйственном производстве и для криоконсервации клеток, тканей и органов в медицине.

Первые лед-связывающие белки были описаны чуть больше 50 лет назад. Из сыворотки крови трех антарктических морских рыб был выделен белок, вклад которого в понижение ее точки замерзания составил 30% [5]. С тех пор исследователи обнаружили, что белки, способные связывать лед, очень разнообразны, существенно отличаются по размеру и структуре, кроме того, они и

Сокращение: MALDI-TOF — (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) — матрично-активированная лазерная десорбционно/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия.

по-разному функционируют [6–8]. Первыми были охарактеризованы белки-антифризы, которые подавляют рост льда [9]. Первоначально у рыб было найдено три типа белка, но коллективом авторов в 1996 г. из сыворотки крови *Myoxocephalus octodecimspinosus* (Longhorn sculpin) был выделен белок-антифриз, не похожий на ранее известные классы [10]. Характеризация этого белка показала, что, хотя он и является высокоспиральным по структуре, его молекулярная масса (12299 Да) намного больше, чем у других представителей лед-связывающих белков [10].

Последовательность белка-антифриза из сыворотки крови *Myoxocephalus octodecimspinosus* состоит из 108 (соответствует дикому типу белка) и 128 аминокислотных остатков (соответствует полноразмерному белку) [10, 11]. В организме Longhorn sculpin сначала синтезируется белок-предшественник, а затем происходит расщепление. Последовательность из 20 аминокислот MKFSLVATIVLLALAQGSFA, вероятно, является сигнальной последовательностью для секреции, а сам пептид – сильно гидрофобный [12].

В данной работе приведен оптимизированный метод выделения, очистки и характеристики рекомбинантного белка из *Myoxocephalus octodecimspinosus* (Long4) полноразмерной формы, а также с помощью методов кругового дихроизма и молекулярно-динамического моделирования описана его вторичная структура в комплексе со льдом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся лед-связывающий белок из рыбы Longhorn sculpin (*Myoxocephalus octodecemspinosus*). Плазмида со встроенным геном, кодирующим лед-связывающие белки и содержащим N-концевую метку His₆ и сайт расщепления протеазы TEV (MENLYFQS), была получена от ООО «Евроген» (Россия).

Получение белка. Плазмиду, содержащую целевой ген белка Long4, трансформировали в химически компетентные клетки BL21 *E. coli* по стандартному протоколу, описанному в работе [13]. Культуру клеток с векторной конструкцией выращивали в среде для роста бактерий Luria Broth с 50 мкг/мл канамицина при 37°C. При достижении OD₆₀₀ значения 0.5 температуру понижали до 15°C и инкубировали 1 ч (90 об/мин). Экспрессию белка индуцировали добавлением изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозидо до конечной концентрации 1 мМ и культивированием в течение 18 ч при 15°C (220 об/мин). Клетки лизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора клеток Sonopuls HD 4100 (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Германия), проводя на льду 16 циклов обработки ультразвуком по 15 с.

Полученный гомогенат разделяли центрифугированием 20000 g в течении 1 ч.

Белок выделяли на хелатирующей колонке Ni-Trap-Chelating™ (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, США) с последующей дополнительной очисткой ионообменной хроматографией на колонке Q-Sepharose FF (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, США). Концентрацию гомогенного препарата белка определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop One^C (Thermo Scientific, США).

Характеризация белка. Белок был охарактеризован методом масс-спектрометрии с лазерной десорбционной ионизацией в присутствии матрицы (MALDI-TOF). Для анализа проводили гель-электрофорез в 18%-м полиакриламидном геле, белковые пятна вырезали из геля и расщепляли трипсином согласно методике, описанной в работах [14, 15]. Регистрацию масс-спектров осуществляли на MALDI-TOF-масс-спектрометре Autoflex Speed (Bruker, Германия), снабженном азотным лазером (337 нм) (VSL-337 ND, Laser Science, США), с продолжительностью импульса 1–5 нс. В качестве матрицы был использован насыщенный раствор α-циано-4-гидрокориичной кислоты в смеси ацетонитрила и 0.1%-й трифторуксусной кислоты (1 : 2). К 1 мкл реакционной смеси, содержащей гидролизованный белок, добавляли 1 мкл 0.2%-й трифторуксусной кислоты и 1 мкл матрицы, затем 1 мкл конечной смеси наносили на мишень для MALDI масс-спектрометрии, мишень высушивали на воздухе. Калибровка MALDI-спектров была проведена с использованием Peptide calibration standart (Bruker Daltonic, Германия).

Круговой дихроизм. Спектры кругового дихроизма регистрировали при комнатной (25°C) и пониженной (1.5°C) температуре с использованием спектрополяриметра J-600 (Jasco, Япония) в кювете с оптическим путем 1 см в диапазоне длин волн 200–240 нм с шагом 1 нм, используя раствор рекомбинантного белка в концентрации 0.03 мг/мл в 20 мМ натрий-фосфатном буфере (Na₂HPO₄–NaH₂PO₄, pH 7.4), содержащем 100 мМ NaCl.

Молекулярное моделирование. Для получения трехмерной структуры белка Long4 использовали моделирование по гомологии с помощью веб-серверов AlphaFold [16] и SWISS-MODEL [17]. Моделирование молекулярной динамики пространственной структуры белка осуществляли с использованием программного обеспечения Amber20 [18] с ускоренным кодом для GPU [19, 20] и силовыми полями ff14SB для белка и TIP5P [21] для льда и растворителя. Для генерации льда использовали GenIce2 [22] и модель воды tip5p. Молекулярную динамику проводили для белка и его комплекса со льдом в явной модели раствори-

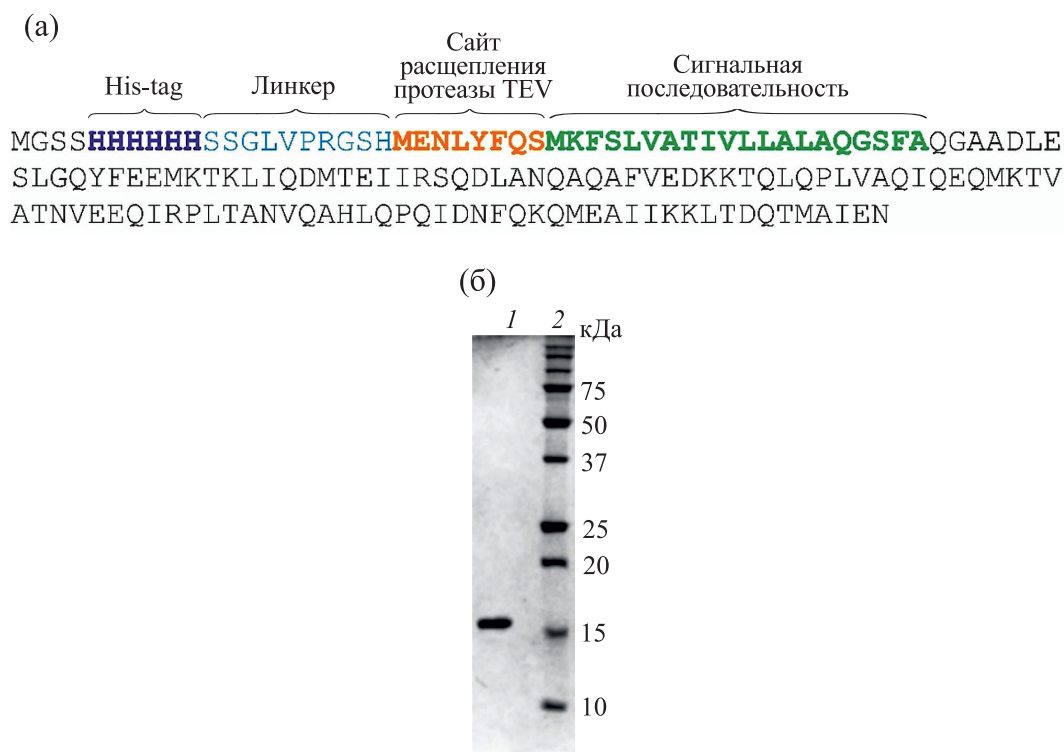


Рис. 1. (а) – Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка Long4. Выделены следующие фрагменты последовательности: His-tag, сайт расщепления протеазы TEV, сигнальная последовательность и линкер между His-tag и сайтом расщепления протеазы TEV. (б) – Электрофоретический контроль гомогенности препарата белка Long4: дорожка 1 – белок Long4 с молекулярной массой 17.5 кДа (масса белка приведена с His-tag и сайтом расщепления протеазы TEV); дорожка 2 – белковые маркеры молекулярной массы.

теля в течение 50 нс. Системы состояли из белка (128 аминокислот), поверхности льда (8320 молекул), 9841 молекул воды в модели белка и 18844 – в системе со льдом. Системы сначала минимизировали в неявной модели растворителя для релаксации молекулы белка. Затем белок, лед и комплекс растворяли в *tip5p*-воде. Полученные системы минимизировали в две стадии, на первой – релаксировали молекулы растворителя, удерживая белок и лед, на второй – релаксации подвергали всю систему. Далее проводили постепенное нагревание до 269 К. Дополнительно для белка проводили нагревание до 300 К. Молекулярную динамику проводили при установленных температурах (269 К для всех систем и 300 К дополнительно для белка в растворителе) в течение 50 нс. Анализ полученных траекторий проводили с помощью Chimera 1.16.1 [23] и CPPTRAJ [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеризация белка. В ходе разработанной и оптимизированной методики получен гомогенный полноразмерный белок Long4 (рис. 1а). Гомогенность белка подтверждали методом гель-

электрофореза в 18%-м полиакриламидном геле (рис. 1б).

Характеризацию проводили методом MALDI масс-спектрометрии. Для анализа использовали наиболее распространенный вариант «Bottom-up» – анализ соединений пептидной структуры [25]. Вырезанное из геля белковое пятно расщепляли трипсином по пептидным связям, образованным карбоксильными группами лизина и аргинина. После ферментативного расщепления полученную смесь пептидов очищали от низкомолекулярных примесей на ZipTip C_{18} и анализировали на MALDI-TOF масс-спектрометре Autoflex Speed (Bruker, Германия).

Идентификацию белка проводили по полученным массам пептидов в Mascot по базе данных Swiss-Prot с допуском 0.3 Да. Типичный масс-спектр MALDI-TOF трипсинового гидролизата Long4 представлен на рис. 2.

После проведения поиска в системе белков Mascot с допуском 0.3 Да полученный белок был идентифицирован как белок-антифриз из *Muohcephalus octodecemspinus* (Longhorn sculpin). Были найдены пептиды, суммарно соответствующие 55% последовательности белка.

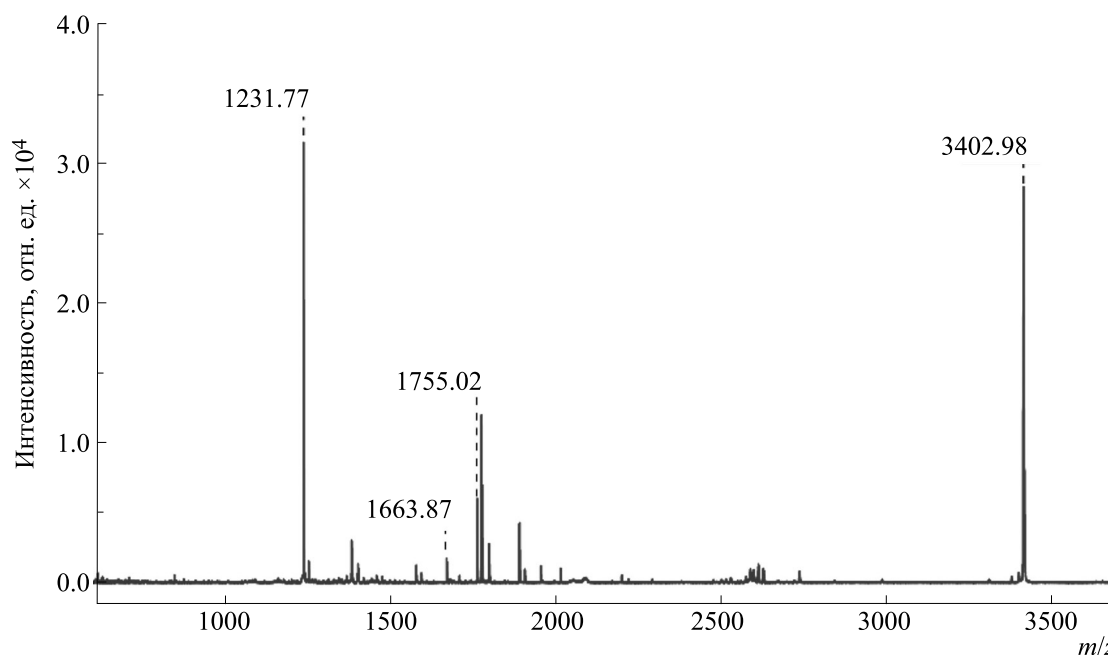


Рис. 2. Масс-спектр MALDI-TOF трипсинового гидролизата белка Long4. На рисунке приведены массы характерных пептидов.

Определение структуры белка Long4. Вторичную структуру белка изучали методом спектроскопии кругового дихроизма. Спектры кругового дихроизма представлены на рис. 3. Экспериментальные данные обрабатывали на сайте DichroWeb (DichroWeb job submission form (bbk.ac.uk)). Спектр кругового дихроизма при комнатной температуре представляет собой кривую, характерную для белков с невысоким содержанием

α -спиралей, при понижении температуры вклад α -спиралей в структуру белка увеличивается. Вероятно, при понижении температуры α -спирали способствуют увеличению поверхности соприкосновения со льдом. Это согласуется и с данными полученными разными коллективами авторов [10, 11]. Белок Long4 на N-конце содержит пироглутамильную группу и имеет высокое (17%) содержание глутамина, он сильно спирале-

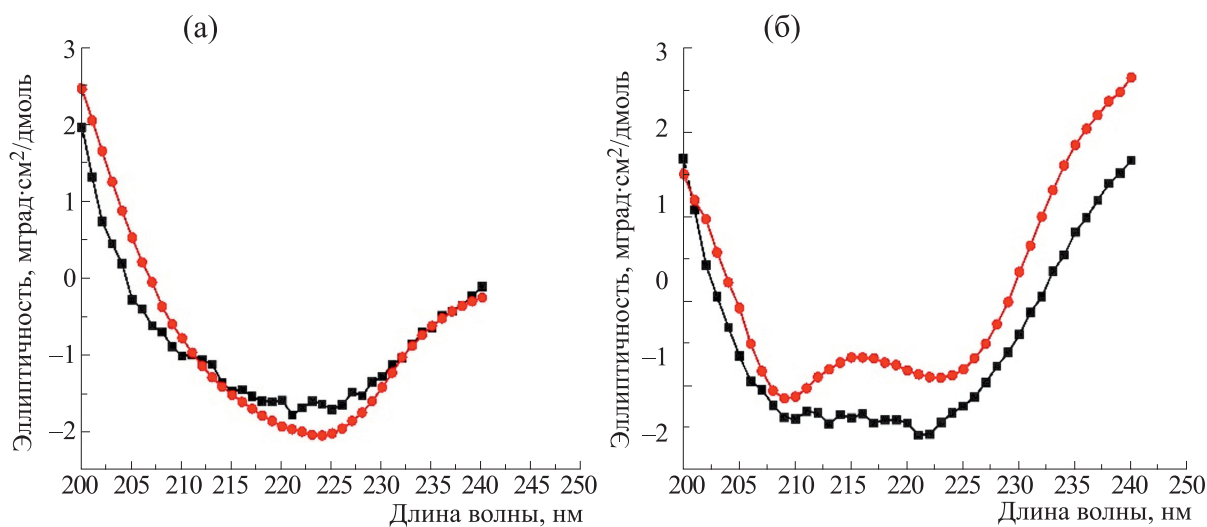


Рис. 3. Спектры кругового дихроизма при различных температурах: (а) – 25°C, (б) – 1.5°C. Квадраты – кривая, построенная по экспериментальным данным, кружки – кривая построена после обработки экспериментальных значений на сайте DichroWeb. Символ на кривой обозначает шаг длин волн.

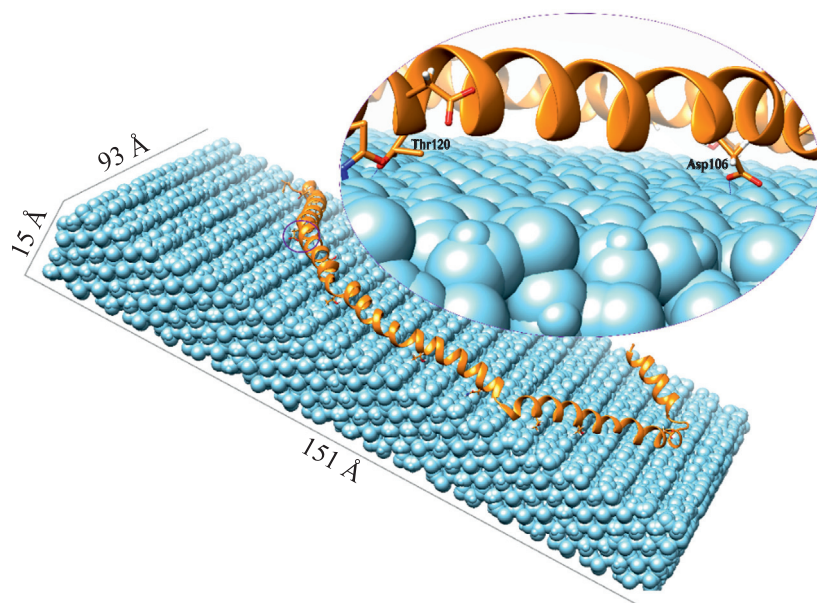


Рис. 4. Модель связывания белка с поверхностью льда Ih. Размеры кристалла льда указаны в ангстремах.

видный [10, 11]. Спектры кругового дихроизма и конформационный анализ, основанный на данных о последовательности, показали, что этот белок имеет четыре спирали и, вероятно, складывается в пучок [10, 26].

Компьютерное моделирование. Одним из подходов, позволяющих предложить конформационные изменения, происходящие при понижении температуры, являются методы компьютерного моделирования. Белок Long4 из *Myoxocephalus octodecemspinus* на сегодняшний день не имеет структуры в базе данных PDB. Моделированием по гомологии с помощью веб-серверов AlphaFold [16] и SWISS-MODEL [17] в настоящей работе получены структуры белка Long4. Структуры использовали для проведения молекулярной динамики в неявной модели растворителя в силовом поле ff14SB [27]. Белок флуктуировал на протяжении всех 50 нс молекулярной динамики. Из литературных данных известно, что наиболее близкими к реальным температурам плавления обладают модели воды tip4p/ice и tip5p [28]. В данной работе была использована модель tip5p. Изучаемые системы содержали белок в явной модели растворителя и комплекс «белок–лед». Системы на протяжении всей динамики оставались стабильными. Анализ полученных траекторий показал, что среднеквадратичное отклонение для белка в явном растворителе при 269 К достигало ~25 Å, хотя альфа-спирали оставались довольно стабильными и значение среднеквадратичного отклонения для данных структур находилось в области 5 Å. Комплекс белка со льдом, в свою очередь, проявляет большую стабильность и зна-

чение среднеквадратичного отклонения для белковой молекулы достигает 8 Å благодаря неструктурированным областям, а отклонения во вторичных структурах, взаимодействующих с поверхностью льда, колеблется в районе 2 Å. Показано, что с поверхностью льда образуют водородные связи (рис. 4) Thr, Asn, Asp, Gln и Glu в различных позициях, находящиеся на расстоянии 15–20 Å друг от друга, что согласуется с литературными данными [29]. На малых временах видимого эффекта на стабилизацию/дестабилизацию структуры льда не обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании оптимизирован метод выделения и очистки рекомбинантного белка Long4, белок охарактеризован методом масс-спектрометрического анализа. Методом кругового дихроизма показано, что структура молекулы белка Long4 может быть представлена несколькими структурными типами: α -спиралями и неструктурированными элементами. При этом вклад α -спиралей в структуру белка увеличивается при понижении температуры. Полученные данные согласуются со структурой, полученной методами компьютерного моделирования. Показано, что в процессе динамики аминокислотные остатки Thr, Asn, Asp, Gln и Glu образуют водородные связи с поверхностью льда, что стабилизирует структуру белка при 269 К.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 23-24-00256.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Kawahara, in *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*, Ed. by R. Margesin (Springer International Publishing, Cham, 2017), PP. 237–257.
2. J. S. H. Lorv, D. R. Rose, and B. R. Glick, *Scientifica (Cairo)*, **2014**, 976895 (2014).
3. M. Bar Dolev, I. Braslavsky, and P. L. Davies, *Annu. Rev. Biochem.*, **85**, 515 (2016).
4. A. Białkowska, E. Majewska, A. Olczak, and A. Twarda-Clapa, *Biomolecules*, **10** (2), 274 (2020).
5. A. L. DeVries and D. E. Wohlschlag, *Science*, **163** (3871), 1073 (1969).
6. C.-H. C. Cheng, *Curr. Opin. Genetics & Development*, **8** (6), 715 (1998).
7. C. Deng, C.-H. C. Cheng, H. Ye, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** (50), 21593 (2010).
8. D. Doucet, V. K. Walker, and W. Qin, *Cell. Mol. Life Sci.*, **66** (8), 1404 (2009).
9. M. Bredow, V. K. Walker, *Ice-Binding Proteins in Plants. Front Plant Sci* **8**, S. 2153 (2017).
10. G. Deng, D. W. Andrews, and R. A. Laursen, *FEBS Lett.*, **402**, 17 (1997).
11. W. K. Low, Q. Lin, C. Stathakis, et al., *J. Biol. Chem.*, **276** (15), 11582 (2001).
12. Z. Zhao, G. Deng, Q. Lui, and R. A. Laursen, *Biochim. Biophys. Acta – Prot. Structure and Mol. Enzymol.*, **1382** (2), 177 (1998).
13. A. Y. Chang, V. W. Chau, J. A. Landas, and Y. Pang, *JEMI-methods*, **1**, 22 (2017).
14. *ProteaseMAX(TM) Surfactant, Trypsin Enhancer Technical Bulletin TB373* (Promega Corporation, 2015).
15. A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann, *Anal. Chem.*, **68** (5), 850 (1996).
16. J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, et al., *Nature*, **596** (7873), 583 (2021).
17. A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, et al., *Nucl. Acids Res.*, **46** (W1), W296 (2018).
18. D. Case, K. Belfon, S. Ben-Shalom, et al., *Amber20* (University of California, San Francisco, 2020).
19. A. W. Götz, M. J. Williamson, D. Xu, et al., *J. Chem. Theory Comput.*, **8** (5), 1542 (2012).
20. R. Salomon-Ferrer, A. W. Götz, D. Poole, et al., *J. Chem. Theory Comput.*, **9** (9), 3878 (2013).
21. Y. Khalak, B. Baumeier, and M. Karttunen, *J. Chem. Phys.*, **149** (22), 224507 (2018).
22. M. Matsumoto, T. Yagasaki, and H. Tanaka, *J. Comput. Chem.*, **39** (1), 61 (2018).
23. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, and C. C. Huang, *J. Comput. Chem.*, **25** (13), 1605 (2004).
24. D. R. Roe and T. E. Cheatham, *J. Chem. Theory Comput.*, **9** (7), 3084 (2013).
25. B. Bogdanov and R. D. Smith, *Mass Spectrom. Rev.*, **24** (2), 168 (2005).
26. G. Deng and R. A. Laursen, *Biochim. Biophys. Acta*, **1388** (2), 305 (1998).
27. C. Tian, K. Kasavajhala, K. A. A. Belfon, et al., *J. Chem. Theory Comput.*, **16** (1), 528 (2020).
28. C. Vega, E. Sanz, and J. L. F. Abascal, *J. Chem. Phys.*, **122** (11), 114507 (2005).
29. A. S. Oude Vrielink, A. Aloi, L. L. C. Olijve, and I. K. Voets, *Biointerphases*, **11** (1), 18906 (2016).

Structure of an Ice-Binding Protein from *Myoxocephalus octodecemspinosus* Determined by Molecular Dynamics and Based on Circular Dichroism Spectra

G.A. Oleinik*, P. Zhdanova*, V.V. Koval*, **, A.A. Chernonosov*, and S.V. Baranova*

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, prosp. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Novosibirsk State University, ul. Pirogova 1, Novosibirsk, 630090 Russia

One of the survival strategies evolved by the organisms living in cold ecosystems is production of ice-binding proteins. An important feature of these proteins is to bind to the surface of ice, keep the ice from growing and prevent cells from damage and death. To understand the mechanism underlying interaction between ice-binding proteins and ice, it is necessary to know the structure of these extraordinary proteins. This study contributes towards information on the structural and dynamic mechanisms of ice-binding proteins that ensure the adaptation of organisms to extreme conditions. Research on the mechanisms by which ice-binding proteins develop adaptation to cold opens up great opportunities in solving a wide range of interesting problems in medicine, such as the development of effective cryoprotectants for cells and organs, as well as in the food industry, such as long-term food storage without losing nutritional quality at the consumer level.

Keywords: ice-binding proteins, antifreeze proteins, molecular dynamics, circular dichroism, cryoprotectants