

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего  
образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра общей и неорганической химии

**ИМПРИНТИРОВАНИЕ БЕЛКИ, СЕЛЕКТИВНЫЕ К  
МИКРОЦИСТИНАМ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 411 группы

Направления 04.03.01 «Химия»

Института химии

Хохотовой Екатерины Дмитриевны

Научный руководитель

Проф., д.х.н., доцент.

\_\_\_\_\_

подпись, дата

Н. А. Бурмистрова

Зав. кафедрой

проф., д.х.н., проф.

\_\_\_\_\_

подпись, дата

И. Ю. Горячева

Саратов 2025

## ВВЕДЕНИЕ

Эвтрофикация водоёмов приводит к массовому размножению цианобактерий, что создает серьезные экологические проблемы. Цианобактерии способны производить и выделять токсичные микроцистины в водоёмы.

Микроцистины – это циклические гептапептидные метаболиты. В настоящее время известно более 90 разновидностей микроцистинов. Различия между этими вариантами определяются вариациями  $\alpha$ -аминокислот в позициях 2 и 4 их молекулярной структуры. Сочетание лейцина и аргинина приводит к формированию микроцистина-LR – самого стабильного и токсичного.

Вычислительные методы, активно развивающиеся в последние годы, стали важным дополнением к эмпирическим исследованиям. В контексте разработки молекулярно импринтированных полимеров, где важна экологическая безопасность, вычислительные методы играют решающую роль. Преимуществами использования квантовохимического моделирования для разработки молекулярно импринтированных полимеров являются уменьшение времени эксперимента, экономия реагентов, выбор оптимальной матричной молекулы и молекулы-шаблона.

Из-за высокой стоимости и токсичности непосредственное использование в качестве молекулы-шаблона микроцистина-LR затруднено. Поэтому целью работы является выбор молекулы-шаблона для создания импринтированных белков (ИБ), селективных к микроцистину-LR, на основе квантовохимических расчётов.

Для достижения поставленной цели решены следующие задачи:

1. Квантовохимическое моделирование аминокислот, входящих в структуру микроцистина-LR;
2. Изучение связывания микроцистина-LR с бычьим сывороточным альбумином (БСА);

3. Синтез производных аминокислот (анилин-лейцин, ФИТЦ-лизин) для получения ИБ, селективного к микроцистину-LR;

4. Получение ИБ в присутствии производных аминокислот и оптимизация условий очистки ИБ.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** аргументирована актуальность темы исследования выпускной квалификационной работы, сформулированы цель и задачи исследования.

**В первом разделе (обзоре литературы)** представлена общая информация о микроцистине-LR, его токсическом действии, способах обнаружения и количественного определения. Приведены этапы получения молекулярно импринтированных полимеров и ИБ. Проведён анализ литературы, посвященной получению ИБ для определения микроцистина-LR, выделены работы, использующие квантовохимические расчёты. Описана значимость применения квантовохимических расчётов в контексте разработки молекулярно импринтированных полимеров [1, 4].

**Во втором разделе** перечислены реагенты и аппаратура, используемые в работе, а также описана техника эксперимента. Объектом исследования является микроцистин-LR и аминокислоты, входящие в его состав. Для проведения эксперимента использовали БСА, глутаровый альдегид (25 %), DL-лизин гидрохлорид, L-лейцин, анилин гидрохлорид, флуоресцеин-5-изотиоцианат (ФИТЦ). Растворы хлороводородной кислоты (HCl, 1 M) и гидроксида натрия (NaOH, 1 M) готовили из фиксаналов. Для разбавления и в качестве промывочного буферного раствора использовали 10 mM ФСБ, pH 7.4 и карбонат-бикарбонатный буферный раствор с pH 9.5. Остальные химические вещества и растворители, использованные в работе, имели классификацию не ниже ч.д.а., для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду Milli-Q (18 MОм/см). В работе использовали свежеприготовленные растворы.

Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV–1800, спектры флуоресценции растворов регистрировали на флуориметре Cary Eclipse (Agilent Technologies Inc.). ИК-спектры с преобразованием Фурье растворов регистрировали на спектрометре ФТ–801 (Симекс). Разделение смеси производных для очистки осуществляли в гель-фильтрационных обессоливающих колонках PD–10 (Merck). Концентрирование проводили центрифугированием в ультрафильтрационных пробирках 5000 MWCO (JET Bio–Filtration Co. Ltd.), использовали центрифугу 5430 R (Eppendorf). Кислотность растворов измеряли с помощью рН-метра АВ33РН и электрода ST310 (Ohaus Co.). Для математических расчетов использовалось программное обеспечение Origin 2021 (OriginLab Co.).

Оптимизация геометрии исследуемых молекул и расчет их электронных характеристик производились с помощью программы Firefly v8.1.0 [5, 6] и базисного набора 3-21G\* [7]. Карты электростатического потенциала строились в программе MolPLOT v1.0.

### **Общая методика получения ИБ**

Получение ИБ проводили по оптимизированной методике [8, 9]: в свежеприготовленный раствор БСА (1 мг/мл, 20 мл) порционно добавляли раствор HCl (1 М, 0.05 мл) до достижения рН = 2, после чего вносили раствор молекул-шаблона — производное ФИТЦ-лизин (0.003 мг/мл, 2 мл) или производное анилин-лейцин (0.11 мг/мл, 2 мл), перемешивали 10 минут. Денатурацию матричных молекул останавливали добавлением раствора NaOH (0.1 М, 1.52 мл), для фиксации полученной структуры добавляли 0.1%-раствор глутарового альдегида (0.01 М, 2 мл), завершение синтеза происходило в течение  $t = 18$  ч при  $T = 4$  °С. Концентрирование растворов ИБ осуществляли центрифугированием в ультрафильтрационных пробирках (4000 g, 4 °С, 10 мин). Для характеристики растворов использовали спектрофотометрию, флуоресцентную спектроскопию и ИК-спектроскопию.

## Квантовохимическое моделирование

В ходе квантовохимических исследований анализировались карты электростатического потенциала, которые показывают трехмерное распределение зарядов молекул (рисунок 1, 2). Эти карты позволяют визуализировать чередующиеся заряженные области молекулы. Поверхность молекулярного электростатического потенциала показывает электростатический потенциал положительно и отрицательно заряженных молекул. Синий цвет с положительным значением указывает на минимальный электростатический потенциал (он слабо связан или имеет избыток электронов) и действует как электрофильный агент. Красный цвет указывает на максимальный уровень электростатического потенциала, который имеет противоположный эффект.

В аргинине положительный потенциал локализуется в основном на атоме азота, входящем в гуанидиновую группу. Это характерная особенность аргинина. Азот связан двойной связью с углеродом, формируя делокализованную  $\pi$ -систему, которая способствует концентрации положительного потенциала [10, 11].

В лейцине положительный потенциал в основном сосредоточен на аминном азоте ( $\text{NH}_2$ ), присущем стандартной  $\alpha$ -аминогруппе. Структура не содержит дополнительных функциональных групп, способных делокализовывать заряд, как у аргинина.

L-аргинин позволяет точно воспроизвести ключевой электростатический центр микроцистина-LR (гуанидиновый азот). Боковая цепь L-лейцина формирует жёсткую конформацию макроцикла и экранирует соседний карбонил аланина, усиливая на нём положительный потенциал.

Таким образом, аминокислоты L-аргинин и L-лейцин могут быть использованы в качестве молекул шаблонов для ИБ, селективных к микроцистину-LR.



Рисунок 1 — Локализация положительного потенциала в молекулах аминокислот, входящих в состав микроцистина-LR

**Примечания:** обозначения атомов: чёрный – углерод, красный – кислород, синий – азот, белый – водород.

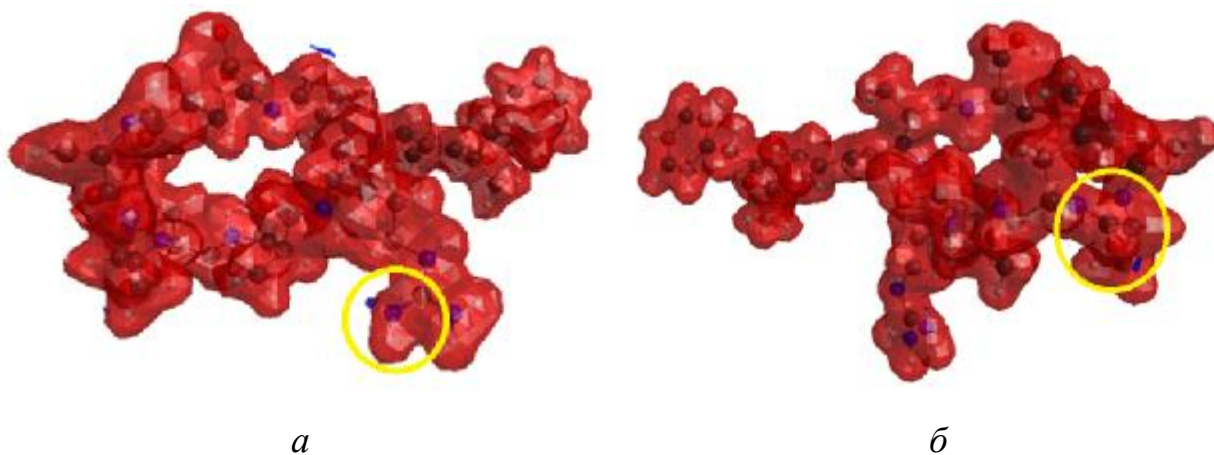


Рисунок 2 — Локализация отрицательного потенциала в молекуле микроцистина-LR

### Молекулярный докинг

Анализ результатов моделирования показал наличие четырёх потенциальных сайтов связывания микроцистина-LR на поверхности БСА (рисунок 3, таблица 1). Взаимодействия между микроцистином-LR и белковой матрицей во время импринтинга преимущественно включают связывание через гидрофобные сайты, а также посредством водородных связей (в т.ч. опосредованных водой). Потенциальные сайты связывания насыщены гидрофобными и заряженными аминокислотами.

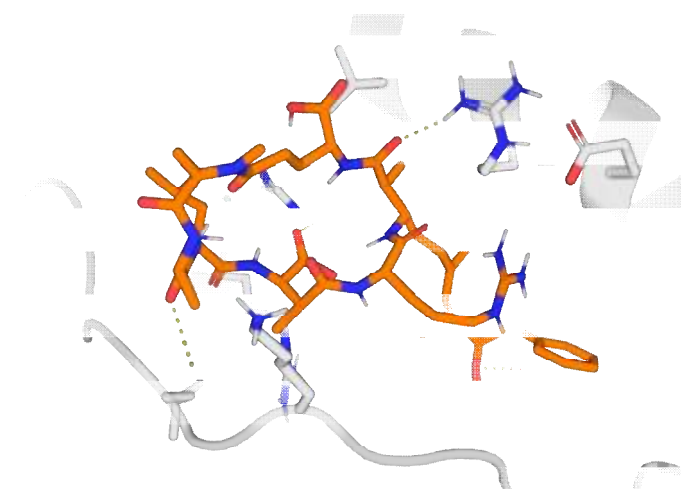


Рисунок 3 — Молекулярный докинг БСА с микроцистином-LR

Таблица 1 — Взаимодействие лигандов при «слепом» докинге (БСА – микроцистин-LR)

	LIG1	LIG2	LIG3	LIG4
Exhaust = 32	Glu399 (Glu)	Asp111 (Arg)	Asp311 (Arg)	Glu339 (Arg)
	Tyr400 (Glu)	Tyr160 (Mdha)	Lys312 (Glu)	Arg444
	Leu397 (Glu)		Ser272 (Mdha)	(ADDA)
	Glu548 (Arg)			Asp307 (Glu)

**Примечания:** Glu – глутаминовая кислота, Tyr – тирозин, Leu – лейцин, Asp – аспарагиновая кислота, Lys – лизин, Ser – серин, Arg – аргинин, Mdha – метилгидроаланин.

Для получения ИБ, селективных к микроцистину-LR, оптимально использовать L-аргинин в качестве молекулы-шаблона: гуанидиновая группа аргинина формирует прочные электростатические и водородные связи с отрицательно заряженными остатками (глутаминовая и аспарагиновая кислоты) на поверхности БСА. В тоже время использование аминокислоты не позволяет контролировать процесс очистки ИБ, в связи с этим в дальнейшей работе использовали его производное с ФИТЦ [12, 13].

#### **Синтез производного ФИТЦ-лизин**

Фракции, полученные в ходе хроматографического разделения смеси, содержащей производное ФИТЦ-лизин охарактеризованы с использованием спектрофотометрии (рисунок 4) и флуоресцентной спектроскопии (рисунок 5).



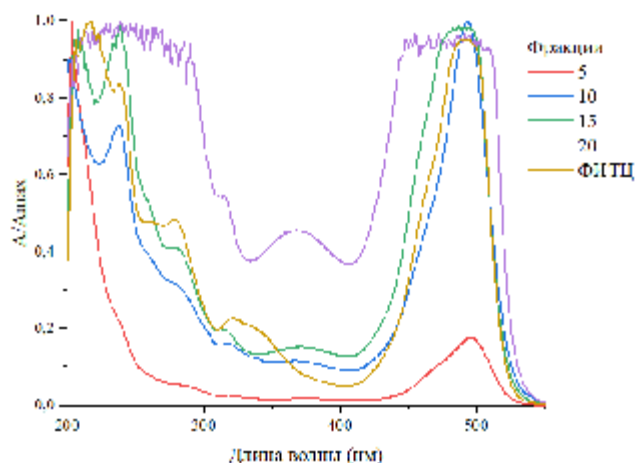


Рисунок 4 — Нормированные спектры поглощения фракций производного ФИТЦ-лизин, раствора ФИТЦ

Для фракции 5 на спектре поглощения наблюдается увеличение оптической плотности в области 200 нм, что свидетельствует о присутствии DL-лизина в производном, связанной с ФИТЦ — максимум в области 495 нм. Во фракциях 10, 15, 20 можно предположить, что DL-лизин отсутствует, так как не наблюдается увеличения оптической плотности в области 200 нм, в них преимущественно находится ФИТЦ.

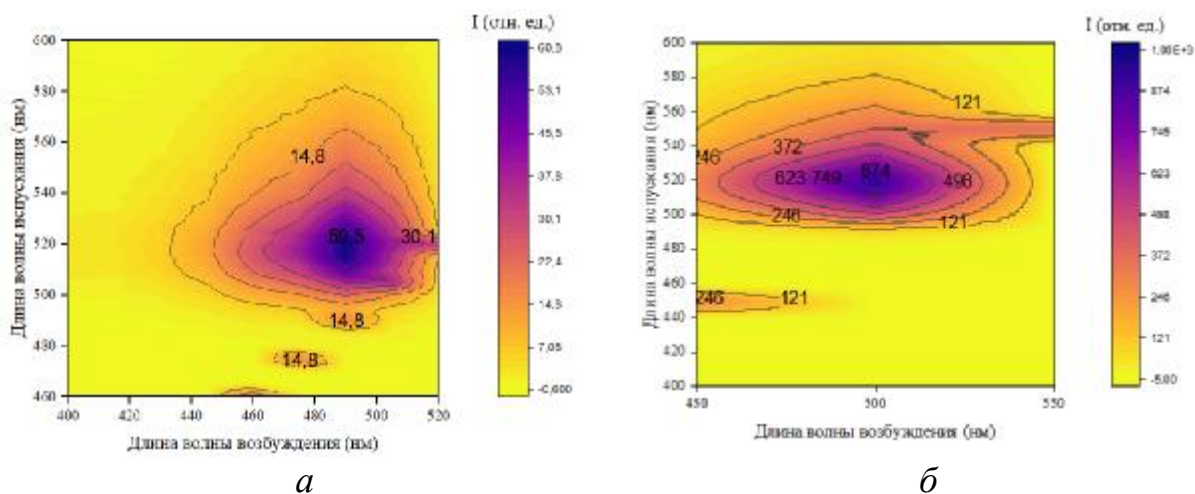


Рисунок 5 — Трёхмерные спектры флуоресценции:

а — фракция 3, ширина щели возбуждения = 2.5 нм, ширина щели испускания = 5 нм, тепловая карта по 9 длинам волн

б — фракция 30, ширина щели возбуждения = 5 нм, ширина щели испускания = 10 нм, тепловая карта по 3 длинам волн

По данным трёхмерных спектров флуоресценции можно сделать вывод, что фракция 3 является производным ФИТЦ-лизин, поскольку наблюдается снижение интенсивности флуоресценции ФИТЦ.

Таким образом, получено производное ФИТЦ-лизин, которое можно использовать в качестве молекулы-шаблона для синтеза ИБ.

### Синтез производного анилин-лейцин

Согласно данным ИК-Фурье спектроскопии (рисунок 6), наличие пика при  $1580\text{ см}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}\text{ COO}^-$ ) в 5 фракции свидетельствует о присутствии лейцина в ней, связь анилин-лейцин ещё не образовалась. Во фракции 8 пропадает пик при  $1580\text{ см}^{-1}$  и появляется пик при  $1675\text{ см}^{-1}$  (плоские  $\delta_{\text{N-H}}$ ). Пропадание пика в 8 фракции подтверждает образование ионной связи между анилином и лейцином. Следовательно, можно сделать вывод, что 8 фракция является производным анилин-лейцин.

Полученное производное анилин-лейцин использовали в качестве молекулы-шаблона для получения ИБ.

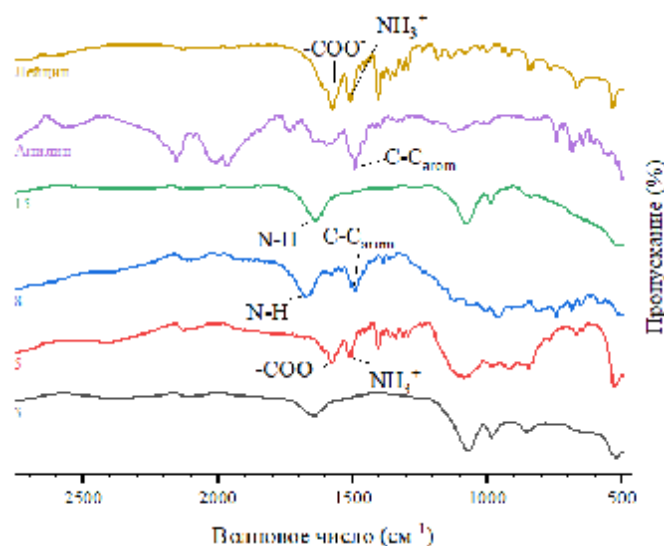


Рисунок 6 — ИК-спектры производного анилин-лейцин, чистых растворов анилина и лейцина

### Производное ФИТЦ-лизин в качестве молекулы-шаблона

Нормированные спектры поглощения (рисунок 7) ИБ до и после очистки схожи. По спектрам после концентрирования видна динамика элюирования шаблонов — уменьшается оптическая плотность, основная часть шаблона вымылась.

Трёхмерная флуоресцентная спектроскопия (рисунок 8) позволила отследить изменения в ИБ после очистки. Пик флуоресценции, наблюдавшийся при возбуждении на 400 нм, полностью исчез, а интенсивность сигнала при 490 нм значительно уменьшилась.

Таким образом, получен ИБ с производным ФИТЦ-лизин в качестве молекулы-шаблона.

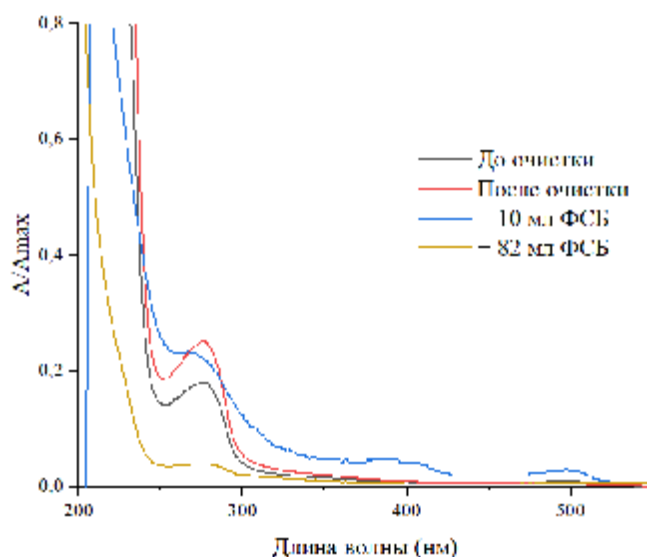
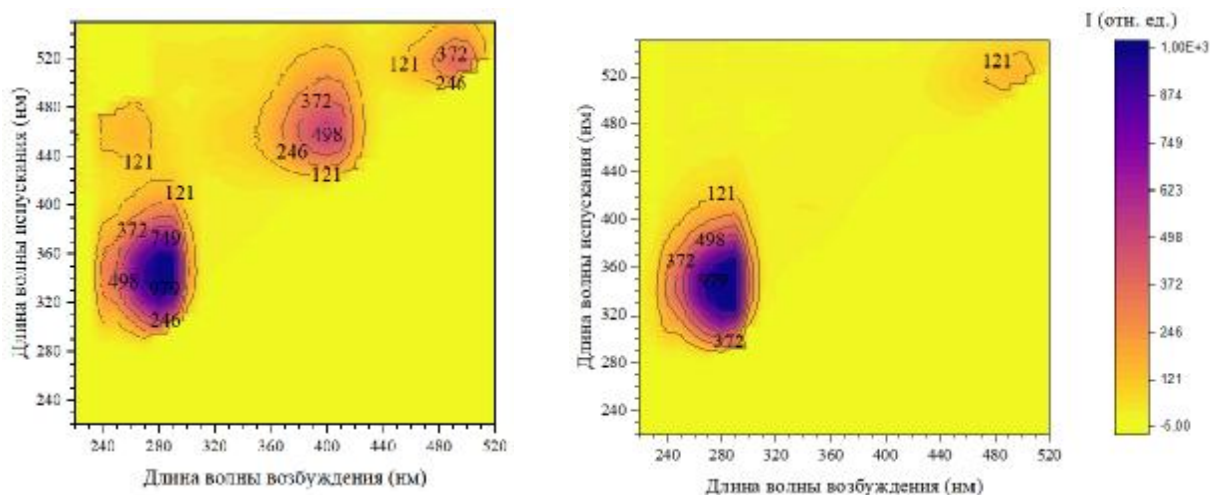


Рисунок 7 — Нормированные спектры поглощения ИБ до и после очистки и элюента в процессе очистки



*До очистки*

*После очистки*

Рисунок 8 — Трёхмерные спектры флуоресценции ИБ до и после очистки и элюента в процессе очистки. Ширина щели испускания = 5 нм, ширина щели возбуждения = 10 нм

### **Производное анилин-лейцин в качестве молекулы-шаблона**

Согласно нормированным спектрам поглощения (рисунок 9), в ИБ после очистки наблюдается пик при 270 нм, что говорит об остаточном количестве производного анилин-лейцин в полученном ИБ. Однако большую часть молекулы-шаблона удалось вымыть.

По результатам ИК-спектроскопии (рисунок 10) видно, что в ИБ после очистки отсутствует пики при  $1530\text{ см}^{-1}$ , соответствующий асимметричным валентным колебаниям  $\text{COO}^-$ . Этот пик также отсутствует на ИК-спектре элюента после очистки. Таким образом, ИБ очищен от производного анилин-лейцин.

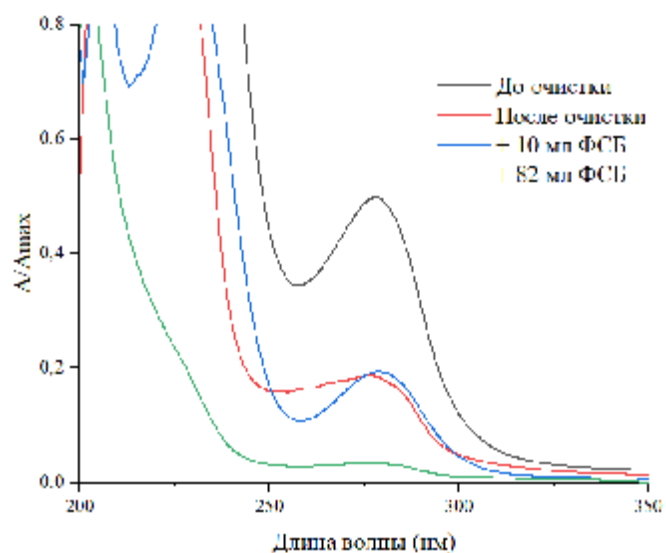


Рисунок 9 — Нормированные спектры поглощения ИБ до и после очистки и элюента в процессе очистки

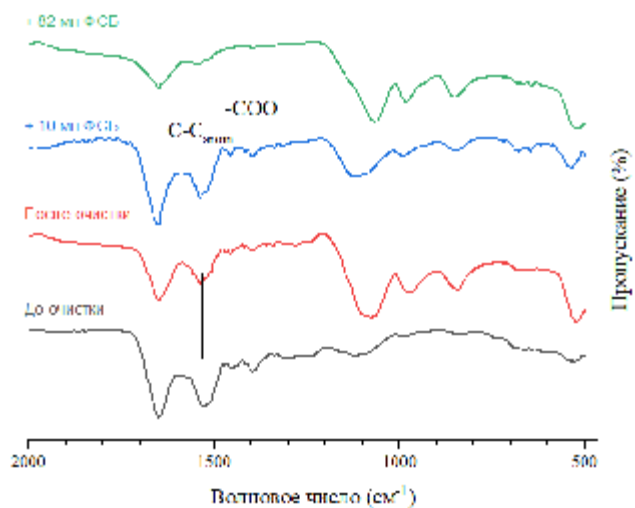


Рисунок 10 — ИК-спектры ИБ до и после очистки и элюента в процессе очистки

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведено квантовохимическое моделирование и анализ карт электростатического потенциала аминокислот, входящих в структуру микроцистина-LR.
2. Изучены особенности связывания микроцистина-LR с БСА методом молекулярного докинга, определены центры связывания.
3. Импринтированный БСА получен в присутствии фиктивных аналогов микроцистина-LR, использование производных аминокислот (с ФИТЦ и анилином) для этих целей позволяет контролировать процесс очистки ИБ.
4. Показана возможность полной очистки ИБ от производных ФИТЦ-лизин и анилин-лейцин, подтвержденная методами спектроскопии.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Zhang S. et al. The latest advances in the reproductive toxicity of microcystin-LR // *Environ. Res.* – 2021. – Т. 192. – С. 110254.
2. Smith J. L., Haney J. F. Foodweb transfer, accumulation, and depuration of microcystins, a cyanobacterial toxin, in pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*) // *Toxicon.* – 2006. – Т. 48. – №. 5. – С. 580-589.
3. Svirčev Z. et al. Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins // *Arch. Toxicol.* – 2017. – Т. 91. – С. 621-650.
4. Lone Y., Koiri R. K., Bhide M. An overview of the toxic effect of potential human carcinogen Microcystin-LR on testis // *Toxicol. Rep.* – 2015. – Т. 2. – С. 289-296.
5. Firefly Home Page [Electronic resource]. URL: <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html> (accessed: 04.03.2025).

6. Schmidt M.W. et al. General atomic and molecular electronic structure system // *J. Comput. Chem.* 1993. Vol. 14, № 11. P. 1347–1363.
7. Krishnan R. et al. Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions // *J. Chem. Phys.* 1980. Vol. 72, № 1. P. 650–654.
8. Pidenko P. S., Presnyakov K. Y., Burmistrova N. A. Proteins: templates and matrices in molecular imprinting // *J. Anal. Chem.* – 2023. – T. 78. – №. 8. – C. 953-964.
9. Pidenko P. et al. Imprinted proteins as a receptor for detection of zearalenone // *Analyt. Chim. Acta.* - 2018. – Vol. 1040. – P. 99–104.
10. Shreder K.R. et al. Design and synthesis of AX7574: a microcystin-derived, fluorescent probe for serine/threonine phosphatases // *Bioconjugate Chem.* – 2004. – T. 15. – №. 4. – C. 790-798.
11. Schug K.A., Lindner W. Noncovalent binding between guanidinium and anionic groups: focus on biological-and synthetic-based arginine/guanidinium interactions with phosph [on] ate and sulf [on] ate residues // *Chem. Rev.* – 2005. – T. 105. – №. 1. – C. 67-114.
12. Zhao D. et al. Solubility of L-lysine hydrochloride in dimethyl sulfoxide, methanol, ethanol, water, and glycol between (283 and 323) K // *JCED.* – 2009. – T. 54. – №. 7. – C. 2126-2127.
13. Hermanson G. T. *Bioconjugate techniques.* – Academic press, 2013.