

Изучение олигомерных форм рекомбинантных лед-связывающих белков

Олейник Г.А.¹, Канарская М.А.^{1,2}, Рижиков Ю.Л.^{3,4}, Баранова С.В.¹

1 – Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

2 – Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

3 – Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

4 – Объединённый институт ядерных исследований, Дубна, Россия
swb@niboch.nsc.ru

В холодных экосистемах для выживания у организмов нарабатываются лед-связывающие белки (IBP). IBP очень разнообразны, существенно отличаются по размеру, структуре и способу связывать лёд. Уникальные свойства этих белков применяются в медицине, в качестве криопротекторов при транспортировке клеток, тканей и органов, сельском хозяйстве при хранении зерна и пищевой промышленности для сохранения вкуса и качества замороженных продуктов. Поэтому в последнее время наблюдается повышенный интерес к исследованию лед-связывающих белков [1–3], но структурно-динамические механизмы действия IBP при распознавании и связывании поверхности льда до сих пор остаются неизвестными.

Рядом исследователей показано [4–6], что эффективность связывания льда возрастает за счет увеличения площади взаимодействия белка со льдом, что предполагает наличие олигомерных форм. Кроме того, обнаружено, что сыворотка из антарктического угря (*Lycodichthys Dearborni*), содержит внутримолекулярный димер, который демонстрирует значительное усиление термического гистерезиса по сравнению с мономером [5].

Объектами исследования были: белки A0ZT93, найденный у рыб *Brachyopsis segaliensis*, и P80961, обнаруженный у *Myoxocephalus octodecemspinosus*. Изучение олигомерного состояния проводили на рекомбинантных белках.

Наличие олигомерных форм в растворе проводили с помощью времяпролетного масс-спектрометра Autoflex Speed (ИХБФМ, Новосибирск, Россия), методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI). Интерпретация масс-спектров дает представление о наличии зарегистрированных пиков, принадлежащих лед-связывающим белкам и их олигомерным формам.

На масс-спектре белка P80961 присутствуют олигомерные формы, соответствующие димеру, тримеру и тетрамеру. Помимо этого, обнаружены многозарядные ионы (M^{2+} и M^{3+}), которые позволяют с большей точностью подтвердить массу олигомерных форм. При анализе масс-спектров образцов, полученных после замораживания, было обнаружено присутствие олигомерных форм более высокого порядка: пентамер, гексамер, гептамер и их двухзарядные ионы. Эти формы детектировались с низкой интенсивностью. Анализ масс-спектров белка A0ZT93 также показал наличие олигомеров разных порядков.

Полученные данные подтверждены разделением белковых комплексов в полиакриламидном геле в нативных условиях. Олигомерные формы визуализируются преимущественно в диапазоне масс, соответствующих димеру, тримеру и тетрамеру. В

СД-V-08

верхней части изображений гелей видна размытость белковых полос, что указывает на гетерогенность образцов и присутствие крупных олигомерных форм.

Структурные особенности изучены методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Измерения были выполнены с использованием прибора Rigaku MicroMax-007HF (МФТИ, Долгопрудный, Россия) и на установке BL19U2 в Шанхайском центре синхротронного излучения (SSRF, Шанхай, Китай) Национального центра науки о белках (NFPS). Интенсивность пучка на образце составляла $\sim 3\text{-}4 \times 10^{12}$ photons/sec, а диапазон модуля вектора рассеяния q составлял 0.006-0.456 \AA^{-1} . Полученные данные показали, что белок A0ZT93 в растворе присутствует в виде ассоциатов с размерами 70 нм и больше. Из данных МУРР была проведена оценка радиуса гирации и размера белка: $R_g \sim 179 \text{\AA}$; $D_{\max} \sim 697 \text{\AA}$. Расчетный радиус гирации R_g для белка P80961 близок к 60 \AA . Максимальный диаметр частиц $D_{\max} \sim 208 \text{\AA}$.

Размеры белков определены с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Анализ АСМ-изображений показал, что в растворе белка P80961 присутствуют вытянутые частицы с различными характерными размерами: 5 нм – 20 нм, 17 нм – 27 нм, 28 нм – 40 нм и 44 нм – 60 нм. Наблюдается небольшая высота частиц, которая может свидетельствовать о мягкости белковых структур, диспергированных на поверхности. Анализ АСМ-изображений белка A0ZT93 показал наличие комплексов круглой и вытянутой формы. Характерный размер частиц ~ 78 нм, также встречаются частицы больше 100 нм в длину. Анализ полученных данных АСМ указывает на то, что в растворе образуется несколько различных по размеру олигомерных форм. Сравнение данных МУРР с результатами атомно-силовой микроскопии для белков выявило заметное соответствие структурных размеров.

Проведённое исследование позволило охарактеризовать лед-связывающие белки P80961 и A0ZT93, и подчеркнуло сложность выбранного класса объектов исследования. Нетривиальность лед-связывающих белков делает их интересным объектом для дальнейшего изучения. Полученные знания, позволят в будущем создать искусственные аналоги, которые будут применяться в разных сферах деятельности для предотвращения разрушений после замораживания-оттаивания, что позволит избежать повреждений.

Благодарности: Исследование было поддержано грантом РФФИ 23-24-00256 и проектом базового бюджетного финансирования ИХБФМ СО РАН № FWGN-2025-0020.

Литература:

- [1] Davies P.L. // *Biochemistry and cell biology*. 2022. 100. P. 282–91.
- [2] Jia Z., Davies P.L. // *Trends Biochem Sci*. 2002. 27. P. 101–6.
- [3] Correia L.F.L., Alves B.R.C., Batista R.I.T.P., Mermillod P., Souza-Fabjan J.M.G. // *Theriogenology*. 2021. 176. P. 94–103.
- [4] Baardsnes J., Kuiper M.J., Davies P.L. // *J Biol Chem*. 2003. 278. P. 38942–7.
- [5] Nishimiya Y., Ohgiya S., Tsuda S. // *J Biol Chem*. 2003. 278. P. 32307–12.
- [6] Sönnichsen F.D., DeLuca C.I., Davies P.L., Sykes B.D. // *Structure*. 1996. 4. P. 1325–37.