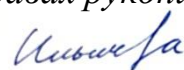


МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

На правах рукописи



Ильичева Полина Михайловна

**Физико-химические основы и полноатомное моделирование
формирования импринтированного альбумина**

1.4.4. Физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, доцент

Бурмистрова Наталия Анатольевна

Саратов 2026

Работа выполнена на кафедре общей и неорганической химии
Института химии ФГБОУ ВО «Саратовский национальный
исследовательский государственный университет имени
Н.Г. Чернышевского»

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Молекулярные рецепторы	13
1.2. Молекулярный импринтинг: подходы к получению и особенности систем.....	14
1.3. Физико-химические аспекты получения ИБ	17
1.3.1. Структура и сорбционные свойства нативного БСА.....	18
1.3.2. Механизмы и модели взаимодействия белок-лиганд	20
1.3.3. Особенности структуры и свойств ИБ	23
1.4. Методы исследования сродства связывания белка с лигандом	26
1.4.1. Изотермическая титрационная калориметрия.....	26
1.4.2. Методы компьютерного моделирования	28
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	31
2.1 Реагенты и материалы	31
2.2 Методики проведения экспериментов.....	31
2.3 Физико-химические методы исследования.....	33
2.3.1. Метод динамического рассеяния света	33
2.3.2. Электронная спектроскопия	33
2.3.3. Спектроскопия кругового дихроизма.....	34
2.3.4. DOSY-ЯМР-спектроскопия.....	34
2.3.5. Изотермическая титрационная калориметрия.....	36
2.4 Компьютерное моделирование	36
2.4.1. Подготовка молекулярных систем	36
2.4.2. Молекулярный докинг	37
2.4.3. Молекулярная динамика и метадинамика	38
2.4.4. Хемометрический анализ трехмерных спектров флуоресценции	38
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СИСТЕМЕ БСА — 4-ГИДРОКСИКУМАРИН	40
3.1. Влияние кислотности среды на физико-химические свойства свободного БСА	41

3.1.1. Влияние pH на вторичную структуру БСА	41
3.1.2. Влияние pH на флуоресценцию БСА	42
3.1.3. Влияние pH на гидродинамические и электрокинетические свойства БСА ...	45
3.2. Формирование ассоциата БСА:4-гидроксикумарин	51
3.2.1. Термодинамический профиль взаимодействий в системе БСА — 4- гидроксикумарин	51
3.2.2. Влияние условий на флуоресцентный сигнал в системе БСА — 4- гидроксикумарин	54
3.2.3. Хемометрический анализ данных трехмерной флуоресцентной спектроскопии.....	56
ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СИСТЕМЕ БСА — 4-ГИДРОКСИКУМАРИН	64
4.1. Структурно-динамические характеристики свободного БСА	64
4.2. Взаимодействия в системе БСА — 4-гидроксикумарин	69
4.3. Сопоставление экспериментальных характеристик и результатов моделирования	72
ГЛАВА 5. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ИМПРИНТИРОВАННЫХ БЕЛКОВ	79
5.1. Ретроспективный анализ систем БСА — молекула-шаблон.....	81
5.2. Прогнозирование оптимального молярного соотношения БСА:молекула-шаблон	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	93
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	107

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

БНС–ИБ — бионеорганический сорбент на основе частиц оксида кремния (IV), модифицированных импринтированным белком

БСА — бычий сывороточный альбумин

ИБ — импринтированный белок

ИТК — изотермическая титрационная калориметрия

ИФА — иммуноферментный анализ

МД — молекулярная динамика

МИП — молекулярно импринтированный полимер

НИБ — неимпринтированный белок

DOSY-NMR-спектроскопия — диффузионно упорядоченная спектроскопия ядерного магнитного резонанса (Diffusion-Ordered Spectroscopy Nuclear Magnetic Resonance)

ЕЕМ — трехмерные спектры возбуждения-испускания флуоресценции (Excitation-Emission Matrix)

FA (FA1–FA6) — сайты связывания жирных кислот альбумина (Fatty Acid binding sites)

ICA — анализ независимых компонент (Independent Component Analysis)

PCA — метод главных компонент (Principal Component Analysis)

PARAFAC — параллельный факторный анализ (Parallel Factor Analysis)

RMSD — среднеквадратичное отклонение (Root-Mean-Square Deviation)

SASA — площадь поверхности, доступная растворителю (Solvent-Accessible Surface Area)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Создание систем молекулярного распознавания является основой для развития современных высокотехнологичных методов разделения, химического анализа, экомониторинга и биомедицины. На сегодняшний день разработан широкий спектр искусственных рецепторов, способных селективно связывать целевые аналиты. В отличие от природных рецепторов (моноклональных антител) производство искусственных рецепторов не требует сложных биотехнологических процессов и сохраняет возможность получения материалов с заданными свойствами. В условиях пандемии COVID-19 борьба с быстро эволюционирующими патогенами убедительно показала, что разработка искусственных антител является актуальной задачей на стыке химии, биологии и медицины.

Молекулярно импринтированные полимеры (МИП) являются примером эффективных и универсальных синтетических систем молекулярного распознавания. МИП успешно зарекомендовали себя в качестве элементов распознавания низкомолекулярных соединений, макромолекул и клеток и нашли широкое применение в различных аналитических и биомедицинских приложениях, системах доставки фармацевтических препаратов, катализе и др. [1].

Благодаря возможности функционирования в водной среде, биосовместимости и низкой иммуногенности белковые молекулы могут выступать альтернативой полимерной матрице при реализации импринтинга. Такой тип молекулярного импринтинга (биоимпринтинг, импринтинг белковых молекул) применяется для получения импринтированных белков (ИБ), имитирующих каталитические свойства различных ферментов [2]. В качестве рецепторных элементов при разработке аналитических систем ИБ впервые применены в 2016 году [3]. К настоящему времени показана перспективность использования ИБ для разработки аналитических систем, характеристики

которых сопоставимы с коммерчески доступными иммунохимическими системами [4,5]. При этом получение ИБ экономически более выгодно, чем получение антител. Наиболее распространенной белковой матрицей для импринтинга является бычий сывороточный альбумин (БСА), пространственная организация и центры связывания которого обладают высокой гомологией с человеческим сывороточным альбумином, что делает его репрезентативной и коммерчески доступной матрицей для создания биомиметических рецепторов. Тем не менее, успех применения импринтинга белка во многом опережает фундаментальное понимание физико-химических основ формирования ИБ. Несмотря на то, что ключевые этапы получения ИБ определены [2], их необходимость и степень влияния на свойства конечного продукта до конца не изучены. Фундаментальное объяснение этих этапов требует детального рассмотрения на молекулярном уровне.

Таким образом, проведение комплексного физико-химического исследования отдельных этапов формирования центров связывания ИБ, является актуальной задачей. Полученные фундаментальные знания о природе и закономерностях данного процесса станут основой для направленного изменения свойств ИБ при их получении и расширения области их применения.

Цель диссертационной работы заключается в разработке физико-химических основ и полноатомном моделировании формирования импринтированного альбумина (БСА) с возможностью прогнозирования сорбционных свойств.

Для достижения поставленной цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

— Провести экспериментальное исследование влияния рН среды на конформационную динамику БСА комплексом оптических методов и сопоставить структуру белковой матрицы в различных конформационных состояниях с сорбционной емкостью импринтированного БСА, иммобилизованного на поверхности частиц оксида кремния (IV);

— Оценить термодинамические характеристики и закономерности формирования ассоциата БСА с модельной молекулой-шаблоном (4-гидроксикумарином) методом изотермической титрационной калориметрии (ИТК) при различных значениях pH;

— Разработать подход к полноатомному моделированию структуры ассоциата БСА:4-гидроксикумарин в процессе импринтинга белка; провести пространственное картирование и детальный анализ структурных особенностей центров связывания с указанием ключевых функциональных аминокислотных остатков; оценить аффинность лигандов к сайтам связывания; описать природу и динамику межмолекулярных взаимодействий;

— Провести сопоставление результатов полноатомного моделирования и экспериментальных исследований; определить условия получения ИБ с высокими сорбционными характеристиками.

— Оценить работоспособность разработанного подхода на примере получения импринтированного БСА, специфичного к низкомолекулярным молекулам-шаблонам различной природы.

Методы исследования.

Для решения поставленных в работе задач применяли комплекс физико-химических методов исследования: ИТК, диффузионно-упорядоченную ЯМР-спектроскопию (DOSY-ЯМР-спектроскопия), флуоресцентную спектроскопию, спектроскопию кругового дихроизма, метод динамического рассеяния света. При выполнении работы использовали современные методы молекулярного моделирования (методы молекулярной динамики и метадинамики, молекулярного докинга) и хемометрические методы (метод главных компонент (PCA), метод независимых компонент (ICA), параллельный факторный анализ (PARAFAC)).

Научная новизна исследования

Все результаты работы получены впервые и не описаны ранее в научной литературе.

— Показано влияние предварительного изменения конформации белковой глобулы в кислой среде на сорбционные свойства импринтированного БСА; установлен характер и степень влияния на сорбционную емкость и аффинность формируемых сайтов связывания ИБ;

— Получен полный термодинамический профиль процесса формирования ассоциата БСА:4-гидроксикумарин при различных значениях pH методом ИТК; показано влияние pH на термодинамический режим связывания: процесс является энтропийно-управляемым при pH 3,0 и энтальпийно-управляемым при pH 9,0;

— Предложена полноатомная модель формирования ассоциата белок:молекула-шаблон в процессе импринтинга белка; проведено пространственное картирование сайтов связывания, описана природа и динамика межмолекулярных контактов; установлена взаимосвязь между соотношением реагентов при получении ИБ и степенью заселенности сайтов связывания.

Практическая значимость работы.

Полученные результаты имеют не только фундаментальную научную ценность, но и формируют основу для развития технологических подходов к получению ИБ.

— Разработан и апробирован подход к полноатомному моделированию структуры ассоциатов белок:молекула-шаблон для исследования физико-химических основ формирования ИБ; показана возможность применения предложенного подхода для прогнозирования сорбционных свойств ИБ разного состава;

— Показана возможность увеличения сорбционной емкости ИБ путем направленного изменения конформации белковой матрицы в процессе его получения на примере импринтированного БСА;

— Предложен подход к прогнозированию оптимального молярного соотношения белок:молекула-шаблон, позволяющий выбрать условия получения ИБ с более высокой сорбционной емкостью;

— Предложен подход к прогнозированию оптимального времени очистки белковой матрицы от молекул-шаблонов на основе хеометрического анализа трехмерных спектров флуоресценции, позволяющий проводить мониторинг процесса очистки ИБ.

На защиту автор выносит:

— Установленные зависимости термодинамических параметров связывания БСА и 4-гидроксикумарина от рН, а также количественные характеристики их взаимодействия;

— Физико-химическое обоснование влияния контролируемого изменения конформации альбумина в кислой среде на увеличение сорбционной емкости импринтированного БСА;

— Структурно-динамические закономерности взаимодействий в системе БСА — 4-гидроксикумарин при импринтинге белка, установленные с помощью полноатомного моделирования и составляющие физико-химическую основу условий формирования ИБ;

— Расчетная модель, обеспечивающая прогнозирование оптимального молярного соотношения белок:молекула-шаблон для получения ИБ с более высокими сорбционными свойствами.

Личный вклад соискателя заключался в постановке основных целей и задач исследования; выборе экспериментальных и вычислительных методов их решения; сборе и анализе литературных данных; планировании и непосредственном проведении экспериментальных исследований и вычислений методами молекулярной динамики и метадинамики, молекулярного докинга; обобщении, анализе и интерпретации всех полученных результатов, формулировании выводов; подготовке и представлении полученных результатов на всероссийских и международных конференциях, написании текста диссертации и научных публикаций по теме работы. Диссертационная работа представляет собой обобщение результатов исследований, полученных автором лично и совместно с соавторами публикаций.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ в изданиях, входящих в перечень ВАК, библиографические базы данных Web of Science и Scopus и ряд материалов конференций.

Степень достоверности результатов исследований подтверждается применением комплекса современных физико-химических методов исследования и методов молекулярного моделирования, соответствием между полученными результатами, а также отсутствием противоречий с литературными данными, апробацией полученных данных на всероссийских и международных конференциях, публикацией основных положений диссертационного исследования в профильных высокорейтинговых реферируемых журналах.

Апробация работы. Основные результаты диссертационного исследования были представлены на всероссийских и международных конференциях: The 14th Winter Symposium on Chemometrics (Цахкадзор, Армения, 2024), XIII International Conference on Chemistry for Young Scientists “Mendeleev 2024” (Санкт-Петербург, Россия, 2024), XXIX Symposium “Bioinformatics and Computer-Aided Drug Discovery” (Москва, Россия, 2023), XXVII Saratov Fall Meeting 2023 (Саратов, Россия, 2023), X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов «OpenBio-2023» (Наукоград Кольцово, Россия, 2023), Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине «BioMedSeminar» (Саратов, Россия, 2023), The 14th Scientific Conference for Young Scientists «Presenting Academic Achievements to the World» (Саратов, Россия, 2023).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, экспериментальной части, изложения полученных результатов и их обсуждения (3 главы), выводов, списка цитируемой литературы и приложения. В тексте содержатся таблицы, диаграммы и графические иллюстрации. Работа представлена на 106 страницах, включает 22 рисунка и 7 таблиц.

Финансовая поддержка работы осуществлялась в рамках грантов Российского научного фонда «Высокоселективные сорбенты на основе молекулярно импринтированных полимеров для решения задач животноводства и растениеводства» (№ 22-16-00102), «Импринтированные белки — рецепторные элементы для определения и концентрирования цианотоксинов в водных объектах» (№ 24-73-00250), а также государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ FSRR–2026–0004).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Материалы подразделов 1.2. и 1.4.2. опубликованы в обзорной работе [61]. Информационный поиск, систематизация и критический анализ литературных источников, а также подготовка текста рукописи выполнены автором лично.

1.1. Молекулярные рецепторы

Молекулярное распознавание представляет собой процесс взаимодействия биологических макромолекул друг с другом или с различными малыми молекулами посредством нековалентных взаимодействий, образуя специфический комплекс [6]. Этот процесс характеризуется высокой специфичностью и сродством (афинностью) к целевым молекулам и лежит в основе процессов в живых организмах. Молекулярные рецепторы, ответственные за распознавание, в большинстве случаев представляют собой белковые молекулы, которые делятся на несколько основных классов. Среди них выделяют молекулярные рецепторы биологического происхождения (антитела (иммуноглобулины), ферменты, мембранные рецепторы), а также их искусственные аналоги (аптамеры, дендримеры, макроциклические соединения). Промежуточное положение между ними занимают биомиметические рецепторы – гибридные системы, которые искусственно воспроизводят молекулярную архитектуру природных активных центров [7]. В отличие от искусственных рецепторов, содержащих в основе жесткий синтетический каркас, основу биомиметических рецепторов составляют гибкие аминокислоты или биополимеры, способные сохранять конформационную подвижность.

Для создания искусственных рецепторных систем широко используют технологию молекулярного импринтинга, которая позволяет формировать специфические распознающие участки для целевых молекул с различной молекулярной массой, размером, структурой, а также химическими и физическими свойствами, с помощью молекул шаблонов [8–11]. Получаемые

материалы характеризуются высокой селективностью, прочностью и стабильностью, возможностью многократного использования, а также низкой себестоимостью. Применение белковых молекул в качестве альтернативы синтетическим полимерным матрицам позволяет перейти от пространственного моделирования геометрии полости к воспроизведению динамической молекулярной архитектуры активного центра. Получаемые на их основе биомиметические системы представляют собой перспективную альтернативу традиционным МИП.

1.2. Молекулярный импринтинг: подходы к получению и особенности систем

Природа межмолекулярных взаимодействий и пространственное распределение центров распознавания в матрице служат основой для классификации стратегий молекулярного импринтинга, которые определяют сорбционные характеристики, кинетику связывания получаемых материалов и, как следствие, потенциал их использования в практических приложениях [12]. В настоящее время опубликован ряд обзорных статей описывающих широкий спектр подходов к получению импринтированных материалов [12–14]. В данном разделе внимание сосредоточено на ключевых подходах, определяющих физико-химические параметры и специфику формирования распознающих центров.

По типу взаимодействий выделяют следующие подходы в импринтинге:

Ковалентный импринтинг (Метод Вульфа [15]): мономер/матрица и молекула-шаблон связываются обратимой ковалентной связью, которая разрывается в процессе элюации молекулы-шаблона. Ковалентный подход обеспечивает однородное распределение центров связывания и высокую специфичность [16]. Однако такие МИП демонстрируют медленную кинетику связывания-высвобождения, а выбор обратимых ковалентных пар ограничен [17].

Нековалентный импринтинг (Метод Мосбаха [18]): мономер/матрица и молекула-шаблон связываются нековалентно. Взаимодействие основано на

слабых силах: водородных связях, ионных, гидрофобных взаимодействиях, вандер-ваальсовых силах. Удаление молекул-шаблонов проводят методом экстракции. Такой подход является простым и быстрым и подходит для большинства молекул. Нековалентные МИП имеют гетерогенные центры связывания и избыток мономера может приводить к неспецифической сорбции [19–21].

Полуковалентный импринтинг: мономер и молекула-шаблон связываются обратимой ковалентной связью в процессе импринтинга, а после удаления молекул-шаблонов распознавание обусловлено нековалентными взаимодействиями [13]. Совмещает в себе преимущества обоих подходов (специфичность и быстрота получения).

По распределению центров связывания МИП различают:

Объемный (3D) импринтинг: полимеризация в массе, молекулы-шаблоны распределены по всему объему полимерной матрицы. МИП характеризуются сильно различающимися размерами частиц и неоднородной морфологией. Значительная часть молекул шаблона находится в толще полимерной матрицы, что осложняет процесс удаления шаблона, особенно крупных молекул, и значительно снижает эффективную емкость. Среди основных недостатков можно выделить (1) медленную кинетику массопереноса, (2) трудности при импринтинге биологических макромолекул, нерастворимых в органических растворителях, традиционно используемых в молекулярном импринтинге, (3) неполное удаление и утечка шаблона, (4) гетерогенность сайтов связывания. Объемные МИП всегда имеют большое количество неспецифических сайтов, которые способствуют «поликлональному» характеру их профилей связывания [21–23].

Поверхностный (2D) импринтинг [24]: полимеризация на поверхности (твердая подложка – силикагель, нано- и микрочастицы и др.), на границе раздела фаз (эмульсии) или в тонких пленках. МИП характеризуются возможностью полного удаления молекул-шаблонов и быстрой кинетикой

связывания (т.к. отсутствует диффузия «изнутри/вглубь»), что особенно подходит для импринтинга макромолекул, таких как белки, клетки, вирусы [13].

Механизм формирования участков молекулярного связывания в МИП основан на принципе «ключ-замок» и включает несколько стадий [13]. Первоначально один или несколько функциональных мономеров образуют предполимеризационный комплекс с молекулами-шаблонами посредством ковалентных или нековалентных взаимодействий. После добавления инициаторов к такому комплексу сшивающие агенты взаимодействуют с комплексом и образуют полимерную сеть. Затем молекулы-шаблоны удаляются с помощью подходящего метода экстракции, оставляя полости с геометрическими параметрами (т.е. размером, формой и ориентацией функциональных групп) и химическими группами, комплементарными молекулам-шаблонам. В результате МИП селективно повторно связываются с шаблоном с высокой специфичностью.

Использование органических растворителей и сложность получения идентичных полимерных структур могут вызывать ряд проблем, связанных с экологическими рисками импринтинга и воспроизводимостью физико-химических свойств получаемых импринтированных полимеров [12].

Импринтированные белки (белковые наноМИП) относятся к искусственным биосинтетическим рецепторам, которые наиболее близки по своей природе к биологическим рецепторам [25]. Конформационная подвижность белка обеспечивает формирование участков связывания, основанное на принципе индуцированного соответствия [26]. Такой процесс имитирует природный механизм молекулярного распознавания. Принцип получения ИБ (также известный как конформационная модификация или биоимпринтинг) основан на фиксации измененной конформационной структуры белковой матрицы после ее связывания с молекулами-шаблонами. Получение ИБ основано на принципах нековалентного поверхностного импринтинга. Расположение сайтов на поверхности белковых глобул обеспечивает высокую кинетическую доступность и скорость массопереноса. Коэффициенты диффузии

и константы скорости ассоциации и диссоциации в ИБ приближены к нативным биорецепторам, что минимизирует время достижения сорбционного равновесия.

Известны примеры использования ИБ для решения проблем биокатализа [2] и в качестве элемента молекулярного распознавания при разработке тест-систем в формате иммунохимического анализа [4,5]. Аналитические характеристики тест-систем на основе ИБ сопоставимы с характеристиками коммерческих иммунохимических систем. В то же время, в литературе зачастую отсутствует обсуждение природы процесса импринтинга, что осложняет создание универсальных и эффективных подходов к получению ИБ с заданными свойствами. Ключевые этапы производства ИБ постулированы [2], но их необходимость и степень влияния на свойства конечного продукта до конца не изучены. Понимание физико-химической природы этих этапов требует детального описания процесса образования ИБ на молекулярном уровне.

1.3. Физико-химические аспекты получения ИБ

Связывающая способность нативных рецепторных и ферментативных белков определяется пространственной (трехмерной) конформацией активного или связывающего центра белковой глобулы и системой слабых нековалентных взаимодействий [27]. Высокая избирательность и аффинность данного процесса обусловлена пространственным соответствием связывающего сайта и молекулы лиганда. Обладая непревзойденной аффинностью и селективностью в физиологических условиях, нативные макромолекулы, тем не менее, имеют ряд недостатков, существенно ограничивающих их практическое применение в биотехнологии, аналитической химии и создании биосенсоров. К ним относятся относительно низкая стабильность, короткий срок хранения, высокая стоимость и трудности с иммобилизацией [28]. ИБ, в свою очередь, имеют потенциал для замены природных рецепторов, поскольку приобретают сопоставимые сорбционные характеристики в процессе получения и остаются стабильным при изменении внешних условий.

Наиболее распространенной белковой матрицей для импринтинга является бычий сывороточный альбумин (БСА), пространственная организация и центры связывания которого обладают высокой гомологией с человеческим сывороточным альбумином, что делает его репрезентативной и коммерчески доступной матрицей для создания биомиметических рецепторов.

1.3.1. Структура и сорбционные свойства нативного БСА

Сывороточные альбумины являются основными растворимыми белковыми компонентами кровеносной системы и выполняют множество физиологических функций [29]. Наиболее важным свойством этой группы белков является способность к связыванию и транспортировке молекул. Их глобулярная структура претерпевает конформационные изменения, что позволяет белку взаимодействовать с широким спектром растворенных веществ, образовывать комплексы с жирными кислотами, липидами, растворенными малыми катионами и различными молекулами лекарственных препаратов, перенося их в кровоток [30]. БСА является одним из наиболее изученных белков этой группы, особенно из-за его структурной гомологии с человеческим сывороточным альбумином.

БСА — это глобулярный белок с молекулярной массой 66,5 кДа, состоящий из 583 аминокислотных остатков. Суммарный заряд белка составляет -17 при нейтральном pH [30–32]. Изоэлектрическая точка БСА находится в районе pH 4,5–5,5 [30]. На уровне третичной структуры нативный БСА представляет собой сердцевидную глобулу, состоящую из трех гомологичных доменов (I, II и III), которые разделены на девять петель (L1–L9) 17 дисульфидными связями (рис. 1). Каждый домен, в свою очередь, разделен на два субдомена (IA, IB и т.д.), формирующих пространственные полости. Домены соединены подвижными петлями, что обеспечивает высокую гибкость белка, а жесткость и стабильность субдоменов поддерживается за счет 17 дисульфидных мостиков. Согласно данным рентгеновской кристаллографии [31], на уровне вторичной структуры БСА преимущественно состоит из α -спиралей, а

оставшаяся часть полипептида расположена в виде витков и протяженных или гибких областей между субдоменами без β -листов.

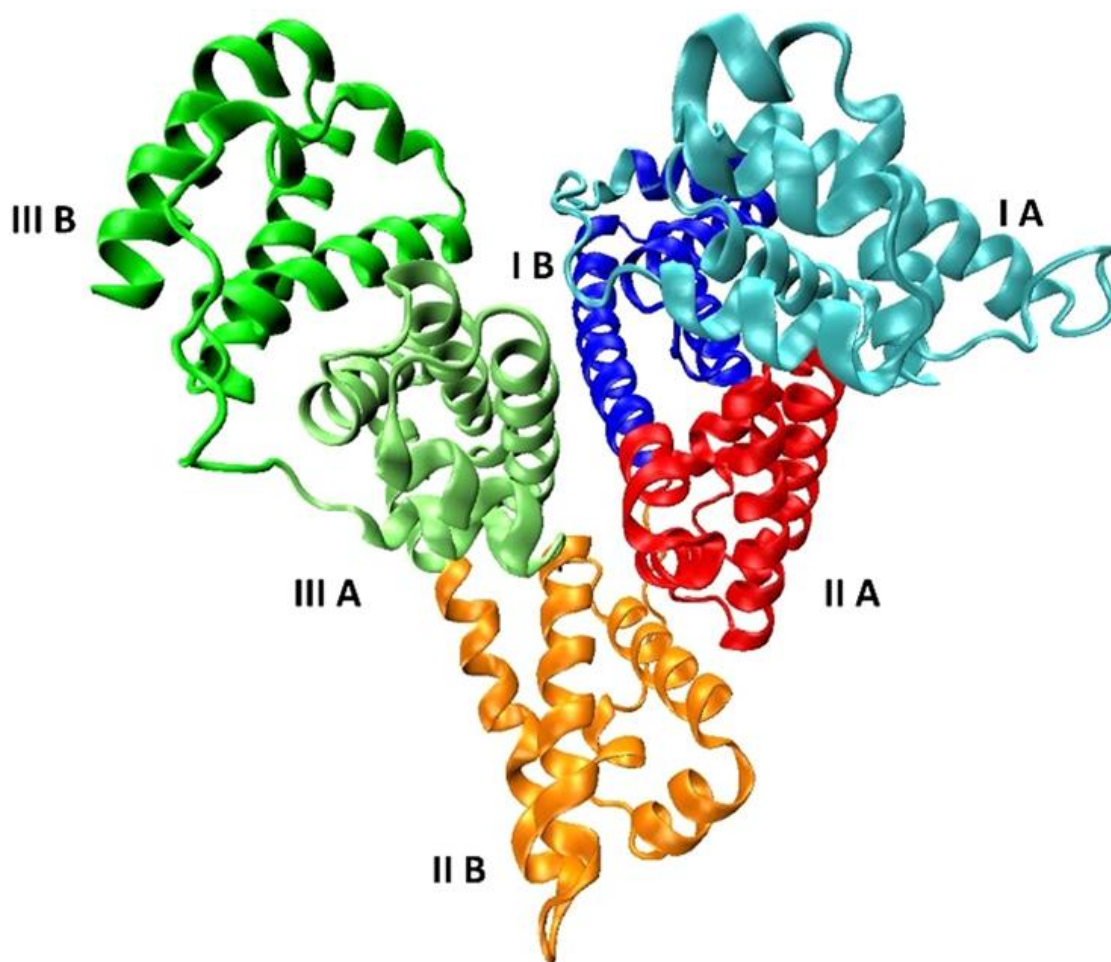


Рисунок 1. Трехмерная структура нативной формы БСА.

Структурные особенности БСА позволяют выделить несколько специфических центров связывания, организованных по иерархическому принципу. На уровне третичной структуры белок функционирует как динамическая матрица. Подвижность доменов позволяет молекуле совершать аллостерические перестройки, адаптируя общую геометрию под параметры низкомолекулярных лигандов. Внутри субдоменов сформированы изолированные от водного окружения пространственные полости – гидрофобные карманы. Локализованные здесь специфические центры связывания обладают избирательностью к определенным классам лигандов. Окружение амфифильных центров (сайтов Судлоу) сформировано неполярными аминокислотными остатками, обеспечивающими сродство к ароматическим кольцам, а периферия стабилизирована положительно заряженными остатками

лизина и аргинина, которые электростатически фиксируют полярные группы молекул-мишеней. Ароматические и гетероциклические лиганды связываются в двух гидрофобных карманах в субдоменах IIА и IIIА, а именно в сайте Судлоу I и сайте Судлоу II [33,34]. Семь сайтов связывания жирных кислот локализованы в субдоменах IV, IIIА, IIIВ и на границах субдоменов [34]. На уровне отдельных функциональных групп аминокислотных остатков БСА демонстрирует специфичность к молекулам газов и неорганическим ионам [35].

Известно, что молекула БСА подвергается сложным многоступенчатым трансформациям, поскольку все три домена белка разворачиваются независимо [36,37]. БСА, погруженный в водный раствор, подвергается обратимой конформационной перестройке в результате изменений pH раствора, что приводит к образованию различных конформеров — Е-формы (расширенной) при $\text{pH} < 3$, F-формы (быстрой) при $\text{pH} 3\text{--}5$, N-формы (нативной) при $\text{pH} 5\text{--}7$, В-формы (основной) при $\text{pH} 7\text{--}8,5$ и, А-формы (старой) при $\text{pH} > 8,5$ [38]. Вблизи изоэлектрической точки (около $\text{pH} 4,8$, N-форма) молекулярная форма имеет форму сердца, а в кислой среде ($\text{pH} < 4$, Е-форма) – расширенную с осевым соотношением 9:1. Стоит отметить, что возможны два основных процесса конформационных изменений: разворачивание третичной структуры (например, домена III) и разворачивание вторичной структуры, т.е. разворачивание α -спиралей (например, внутридоменной α -спирали в домене I).

1.3.2. Механизмы и модели взаимодействия белок-лиганд

Для глубокого понимания процесса молекулярного распознавания между белком и лигандом необходимо разобраться в физико-химических механизмах, лежащих в основе взаимодействия белка и лиганда. Количественное описание сил, управляющих молекулярными ассоциациями, требует определения изменений всех термодинамических параметров, включая свободную энергию связывания (ΔG_B), энтальпию (ΔH_B) и энтропию (ΔS_B) связывания [39]. Тщательное изучение процесса связывания представляет значительный

практический интерес, поскольку оно формирует теоретическую базу для структурно-ориентированного молекулярного дизайна.

Движущие силы, определяющие связь между белком и лигандами, являются результатом различных взаимодействий и обмена энергией между белком, лигандом, водой и буферными ионами. ΔG_B включает в себя несколько составляющих [39] и является наиболее важным термодинамическим параметром, поскольку ее величина определяет стабильность любого комплекса белок-лиганд. Наблюдаемая экспериментально ΔG_B может быть одинаковой для взаимодействий, протекающих с положительными значениями ΔS_B и ΔH_B (связывание, в котором преобладает гидрофобный эффект) и с отрицательными значениями ΔS_B и ΔH_B (когда преобладают специфические взаимодействия). Более того, взаимодействующие системы, как правило, компенсируют энтальпийные и энтропийные вклады в ΔG_B , что делает свободную энергию связывания относительно нечувствительной к изменениям молекулярных деталей процесса взаимодействия [40]. Таким образом, учет ΔH_B и ΔS_B имеет решающее значение для детального понимания свободной энергии связывания.

Энтальпия — это мера полной энергии термодинамической системы, т.е. суммы внутренних энергий растворенного вещества и растворителя и количества энергии, необходимой для создания пространства для системы (рассчитывается как произведение объема системы и давления) [41]. Изменение энтальпии при связывании является результатом образования и нарушения множества отдельных взаимодействий, включая потерю водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, образованных между белком и растворителем, а также между лигандом и растворителем, образование нековалентных взаимодействий между белком и лигандом и реорганизацию растворителя вблизи поверхностей белка [39]. Эти отдельные компоненты могут вносить как благоприятный, так и неблагоприятный вклад, и изменение энтальпии является результатом их комбинации [27,42].

Недавно предложено, что общее изменение энтропии, связанное со связыванием, может быть выражено как сумма нескольких составляющих

эффектов [39]. Основным фактором, влияющим на ΔS_B образования комплекса, обусловлен эффектами гидратации. Поскольку энтропия гидратации полярных и неполярных групп велика, экранирование доступной для воды поверхности при связывании приводит к высвобождению растворителя, что часто вносит большой и положительный вклад в общую энтропию взаимодействия. Другой важный, хотя и неблагоприятный вклад отражает уменьшение вращательных степеней свободы вокруг торсионных углов боковых цепей белка и лиганда. Дополнительный член энтропии учитывает уменьшение числа частиц в растворе и их степеней свободы [43–45].

В настоящее время для объяснения механизмов связывания белка и лиганда предложены три различные модели: «ключ-замок», «индуцированное соответствие» и «конформационный отбор» [46,47]. Модель «ключ-замок» предполагает, что и белок, и лиганд являются жесткими, а их интерфейсы связывания должны идеально совпадать. В результате только лиганд правильного размера и формы (ключ) может располагаться в связывающем кармане (замочная скважина) белка (замок). Однако модель «ключ-замок» не может объяснить экспериментальные данные о связывании белка с лигандом, когда их исходные формы плохо совпадают.

Модель индуцированного соответствия (induced fit) предполагает, что сайт связывания в белке является гибким, а взаимодействующий лиганд вызывает конформационное изменение в сайте связывания. Поскольку механизм индуцированного соответствия учитывает только конформационную гибкость сайта связывания лиганда, эта модель, по-видимому, подходит для белков, демонстрирующих лишь незначительные конформационные изменения после связывания лиганда. Кроме того, как модель «ключ-замок», так и модель индуцированного соответствия рассматривают белок как единую стабильную конформацию в данных экспериментальных условиях. Однако большинство белков по своей природе динамичны, и модель конформационного отбора учитывает эту присущую им гибкость.

Модель конформационного отбора, которая выводится из теории ландшафта свободной энергии (free energy landscape – FEL) структуры и динамики белков [48,49], постулирует, что нативное состояние белка существует не как единая жесткая конформация, а как обширный ансамбль конформационных состояний/субсостояний, которые сосуществуют в равновесии с различными распределениями популяций, и что лиганд может избирательно связываться с наиболее подходящим конформационным состоянием/субсостоянием, в конечном итоге смещая равновесие в сторону этого состояния/субсостояния.

На поверхности потенциальной энергии высокогибкого белка существует несколько минимумов свободной энергии, внутри которых расположены ансамбли различных конформационных состояний/субсостояний. Модель конформационного отбора предполагает, что селективное связывание происходит только в одном минимуме свободной энергии, содержащей наиболее подходящий для связывания конформер, что напоминает связывание по механизму «замок-ключ», происходящее в единственной яме минимума свободной энергии. Конформационный отбор доминирует при медленном конформационном переходе белка и низкой концентрации лиганда, в то время как индуцированное соответствие доминирует при увеличении любой из этих величин [50].

1.3.3. Особенности структуры и свойств ИБ

Молекулярное распознавание в природных системах регулируется аддитивным вкладом множества слабых нековалентных взаимодействий. Высокая селективность связывания в ИБ также достигается за счет баланса гидрофобных и электростатических взаимодействий, а также направленных водородных связей [51]. С физико-химической точки зрения распознавание в таких системах регулируется энтальпийно-энтропийной компенсацией [40]. Образование комплементарных водородных связей характеризуется сильным энтальпийным выигрышем и компенсирует энтропийный штраф при

ограничении степеней свободы лиганда. Энтропийный вклад реализуется посредством гидрофобного эффекта, при котором происходит разрушение гидратных оболочек и вытеснение молекул воды в объемную фазу.

Соотношение различных типов взаимодействий определяет тип и степень селективности ИБ. При фиксации лиганда посредством электростатических взаимодействий и водородных связей может достигаться высокое сродство к конкретному соединению. В случае импринтинга, обусловленного преимущественно неспецифическими гидрофобными взаимодействиями или π - π стэкингом, ИБ будет селективен к целому классу структурно схожих гидрофобных веществ (групповая специфичность) [52,53]. Кроме того, как для нативных белков, так и для ИБ, характерно явление неспецифической сорбции – адсорбции посторонних веществ на их внешней гидрофобной или заряженной поверхности. В ряде случаев поверхность ИБ может становиться еще более гидрофобной из-за химической сшивки или иммобилизации. Тем не менее, в ИБ селективность повышается за счет комплементарности формы полости и, как правило, значительно более высокой константы связывания в полости, чем для неспецифических взаимодействий на поверхности белка [54,55].

Импринтинг белков основан на обратимых изменениях трехмерной структуры белка, вызванных нековалентными взаимодействиями с лигандом в мягких денатурирующих условиях. После этих изменений белок демонстрирует измененные связывающие свойства. Стандартная методика импринтинга, описанная Лю и др. [2], состоит из нескольких основных этапов: (1) протонирование аминокислотных остатков белка в кислых условиях; (2) добавление молекул-шаблонов для образования новых сайтов связывания; (3) стабилизация новой конформации путем сшивания белка; и (4) удаление молекул-шаблонов из белковой матрицы.

Согласно современным представлениям, создание сайтов в процессе импринтинга протекает по смешанному механизму [56]. На первом этапе — стадии формирования ассоциата — система полностью подчиняется термодинамическому регулированию. Взаимодействие функциональных

аминокислотных остатков с молекулами-шаблона носит обратимый характер, подчиняется закону действующих масс и определяется стремлением системы к минимуму свободной энергии Гиббса. Протонный статус среды (pH) и избыток концентрации титранта выступают здесь в роли термодинамических факторов, смещающих равновесие сорбции по принципу Ле Шателье и предопределяющих исходную заселенность сайтов. Напротив, введение сшивающего агента инициирует быструю и необратимую реакцию образования ковалентных азометиновых связей, переводя систему в режим жесткого кинетического контроля. Скорость внутримолекулярной ковалентной сшивки белка существенно превышает скорость диссоциации ассоциата. Это позволяет зафиксировать неравновесную конформацию глобулы белка, в которой она находилась в момент введения реагента

На сегодняшний день методология формирования ИБ доказала свою практическую состоятельность. Эффективность ИБ как стабильных биомиметических рецепторов наглядно подтверждается успешными примерами их интеграции в тест-системы в формате твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), сорбционные матрицы для твердофазной экстракции (ТФЭ) и биосенсоры [4,5]. Тем не менее, успех применения данной методологии во многом опережает фундаментальное понимание её физико-химического базиса. Механизм молекулярного распознавания в ИБ представляет собой сложный многостадийный процесс, который включает несколько конформационных перестроек как всей белковой глобулы, так и отдельных ее участков, перестройку локальной сети водородных и электростатических связей, а также десольватацию взаимодействующих участков. Таким образом, для дальнейшего развития технологии необходим комплексный детальный анализ термодинамических параметров взаимодействий в процессе импринтинга белка.

1.4. Методы исследования сродства связывания белка с лигандом

1.4.1. Изотермическая титрационная калориметрия

Общепризнанным калориметрическим методом исследования биологических макромолекул является ИТК. Это единственный подход, позволяющий напрямую измерять теплообмен во время образования лиганд-белкового комплекса, и является золотым стандартом в определении движущих сил процесса связывания. Эксперимент ИТК включает три этапа: (i) лиганд титруется в раствор, содержащий интересующую биомacroмолекулу (например, белок); (ii) измеряется тепло, выделяемое или поглощаемое в связи с событием связывания; и (iii) первичные данные ИТК обрабатываются и аппроксимируются для определения константы связывания (K_B), ΔG_B , ΔH_B и ΔS_B , а также стехиометрии (n) процесса связывания [39].

Калориметрические эксперименты по связыванию представляют собой технически сложную задачу, поскольку тепловой эффект нековалентного взаимодействия характеризуется малыми величинами, лежащими обычно в диапазоне 5–10 ккал/моль, и регистрируется поэтапно в ходе эксперимента [39]. Кроме того, добавление лиганда приводит к дополнительным тепловым эффектам, которые часто сопоставимы с интересующей теплотой связывания. Предел обнаружения высокочувствительных калориметров последнего поколения, выраженный как минимальное обнаруживаемое количество тепла, составляет 100 нДж. Инструментальная погрешность измерения не превышает 1–2% на стандартных калибровочных системах [57,58].

ИТК регистрирует общий тепловой эффект, который является глобальным свойством всей исследуемой системы, отражающим общее изменение тепла в калориметрической ячейке при добавлении лиганда. Измеренный тепловой эффект включает в себя не только количество теплоты, выделяемое или поглощаемое во время реакций связывания, но и вклады, возникающие из неспецифических тепловых эффектов (разбавление лиганда в буфере, разбавление образца белка, теплота смешивания, разница температур между

ячейкой и шприцем, а также смешивание буферов с немного отличающимся составом) и эффектов протонирования, связанных со связыванием. Поэтому крайне важно определить возможные вклады во внутреннюю энтальпию связывания и скорректировать их. Эти вклады определяют путем проведения как минимум трех контрольных экспериментов по титрованию (лиганд в буферный раствор, буфер в раствор белка, буфер в буферный раствор). Но даже скорректированные изменения тепла состоят из различных вкладов, поэтому энтальпия является кажущейся величиной [59].

В простейшем случае связывания лиганда каждая макромолекула состоит только из одного типа сайтов связывания с конечным числом идентичных невзаимодействующих сайтов связывания, каждый из которых обладает одинаковым внутренним сродством к лиганду. Существуют и другие более сложные модели с несколькими типами независимых сайтов связывания, одним типом взаимодействующих сайтов (кооперативных сайтов), несколькими типами взаимодействующих сайтов связывания. С помощью статистического термодинамического подхода можно деконволюировать изотерму связывания таких сложных систем.

Таким образом, прямые сорбционные и калориметрические эксперименты фиксируют лишь результирующие (кажущиеся) константы удержания и тепловые эффекты комплексообразования, однако истинная природа термодинамических движущих сил, детальная архитектура полостей и степень конформационной лабильности белковой матрицы часто остаются скрытыми в рамках классического физико-химического эксперимента. Данный дефицит фундаментальных знаний о механизме распознавания выступает главным лимитирующим фактором, который критически ограничивает возможности направленного изменения свойств ИБ и рационального проектирования рецепторов под новые классы аналитов. Для преодоления указанных ограничений необходимо объединение структурной информации с термодинамическими данными процесса связывания. Перспективным является комплексный детальный анализ термодинамических параметров

взаимодействия с привлечением методов вычислительного (компьютерного) моделирования.

1.4.2. Методы компьютерного моделирования

Различные вычислительные подходы, такие как квантовая механика, молекулярная механика и МД, активно используются для моделирования систем лиганд-белок при разработке МИП [60,61] и в настоящее время составляют основу для проектирования ИБ. Существует ряд исследований, посвященных оценке сродства связывания различных функциональных мономеров с белками при разработке МИП [62–64]. Уникальность этих исследований обусловлена использованием белков в качестве молекул-шаблонов для импринтинга и применением молекулярного докинга в качестве вычислительного метода. Однако неточные оценки молекулярной гибкости и связывания, опосредованного растворителем, которые играют решающую роль в термодинамике и кинетике молекулярного распознавания, значительно ограничивают надежность в отношении предсказательной способности этого метода [27]. Большинство программных пакетов могут учитывать гибкость лиганда, в то же время изучение гибкости белка по-прежнему остается сложной проблемой [65]. Колебания белка можно учитывать до, во время и после процедуры докинга, используя данные о конформации белка из различных кристаллографических и ЯМР-баз данных или рассчитывая их с помощью вычислительных методов, но эти представления не отражают процесса связывания. Это может привести к изменению конечной структуры комплекса и его прогнозируемого сродства связывания.

На практике поиск белковой матрицы с наилучшими адсорбционными свойствами и селективностью по отношению к молекулам шаблона является основной задачей для получения наиболее эффективных ИБ. Для нахождения соответствующих оптимальных условий необходимо тщательно изучить фундаментальные взаимодействия между белковой матрицей и лигандом, поскольку лежащий в основе механизм связывания остается неясным в каждом отдельном случае. Как правило, разработка ИБ сосредоточена на моделировании

взаимодействий белок-матрица посредством молекулярного докинга, но тщательное изучение механизма ассоциации требует исследования поведения как белковой матрицы, так и молекул шаблонов в выбранных условиях получения ИБ. Поскольку любая белковая молекула может сильно реагировать на изменения внешних условий, одним из ключевых аспектов молекулярного моделирования, используемого для разработки ИБ, является анализ конформационной динамики белковой матрицы в процессе импринтинга. Аппроксимация возможных побочных процессов, происходящих в матрице до ее ассоциации с белком, может быть выполнена с помощью методов молекулярной механики или квантовой механики. Разнообразие существующих методов молекулярного моделирования позволяет описать некоторые процессы, но каждая система требует своего собственного набора методов, наиболее подходящих для моделирования ее специфических особенностей.

Заключения по главе 1

Из проведенного анализа данных литературы следует, что молекулярный импринтинг, в особенности импринтинг белковых молекул, представляет собой перспективную методологию создания высокоселективных биомиметических рецепторов, способных выступать в качестве альтернативы традиционным МИП.

Несмотря на успешную интеграцию ИБ в аналитические системы (ИФА, сорбционные матрицы для ТФЭ, биосенсоры), практический успех применения данной методологии во многом опережает фундаментальное понимание её физико-химического базиса. Механизм молекулярного распознавания ИБ представляет собой сложный многостадийный процесс, включающий крупномасштабные конформационные перестройки белковой глобулы, реорганизацию локальной сети водородных и электростатических связей, а также десольватацию взаимодействующих участков. В связи с этим, проведение комплексного исследования термодинамических параметров взаимодействий в

процессе формирования ИБ является актуальной фундаментальной задачей. Полученные знания позволят направленно разрабатывать ИБ с заданными сорбционными свойствами.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Реагенты и материалы

В работе использовали БСА ($\geq 98,0\%$), 4-гидроксикумарин ($\geq 98,0\%$), глутаровый альдегид ($\geq 98,0\%$) производства Sigma-Aldrich, США; (3-аминопропил)триэтоксисилан (АПТЭС, 98%) производства Merck, Германия; диализные мешки (10 кДа) — Snake Skin 10 000 MWCO (Thermo Scientific Inc.).

Фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) (10 мМ, pH = 7,4) готовили из стандартизированных таблеток («Росмедбио», Россия). Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду (электропроводность ~ 18 МОм·см⁻¹), очищенную с помощью системы Milli-Q (Millipore, США). В качестве носителей для получения бионеорганического сорбента (БНС–ИБ) использовали частицы оксида кремния (IV): Aerosil 300 (Evonik, Германия) и Хромосорб Р-NAW 60/80 меш. (Хромлаб, Россия).

2.2 Методики экспериментов

Получение импринтированного БСА, специфичного к 4-гидроксикумарину

Получение ИБ на основе БСА, специфичного к 4-гидроксикумарину проводили по оптимизированной методике [5]. Водный раствор БСА (1 мг/мл) выдерживали 10 мин при перемешивании (20°C), титровали HCl (0,1 М) до достижения pH 3,0, перемешивали (10 мин), вносили 4-гидроксикумарин и перемешивали в течение 10 мин. Титровали NaOH (0,1 М) до достижения pH 8,0 и добавляли водный раствор глутарового альдегида (1%, об.), перемешивали (30 мин) при 4°C и оставляли на 18 часов без перемешивания для завершения импринтинга.

Получение нИБ проводили аналогично, за исключением стадии добавления молекул-шаблонов. Очистку полученных ИБ и нИБ от молекул-шаблона и низкомолекулярных примесей проводили методом диализа в ФСБ в течение 48 часов (объем диализата 2 л, смена каждые 4 ч).

Получение бионеорганического сорбента на основе частиц оксида кремния (IV), модифицированных ИБ

Иммобилизацию ИБ проводили на предварительно функционализированной поверхности частиц оксида кремния (IV). Для этого к навеске носителя массой 1 г добавляли 10 мл 5%-ного (по объему) раствора АПТЭС в этаноле. Реакционную смесь выдерживали 90 мин при постоянном перемешивании. После этого носитель осаждали центрифугированием в течение 2 мин при 3000 g и удаляли непрореагировавший АПТЭС последовательным промыванием осадка 5 мл 95%-ного этанола и ФСБ (3 × 5 мл). Аминированные носители кондиционировали в течение 18 ч в ФСБ.

БНС–ИБ получали по следующей методике: аминированный носитель осаждали центрифугированием в течение 2 мин при 3000 g из раствора, к 5 мг носителя добавляли 2 мл раствора ИБ (1 мг/мл в ФСБ) и перемешивали на орбитальном шейкере 1 ч при комнатной температуре. После инкубации БНС–ИБ осаждали центрифугированием (5000 g, 5 мин, комнатная температура) и хранили в холодильнике при 4°C.

Оценка сорбционных свойств бионеорганического сорбента

Для ТФЭ молекул-шаблонов из модельных растворов использовали свежесажженные БНС–ИБ после удаления надосадочной жидкости. К 5 мг БНС–ИБ добавляли по 2 мл рабочих растворов молекул-шаблонов (4-ГК, кумарина, 5,7-ДМК, кверцетина, 10 мкг/мл) в ФСБ. ТФЭ проводили в течение 30 мин, затем БНС–ИБ осаждали центрифугированием (5000 g, 10 мин), а супернатант анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием. ВЭЖХ проводили в изократическом режиме при скорости потока 1,0 мл/мин и постоянной температуре 45 °C, используя подвижную фазу А (0,1 мас. % раствор H_3PO_4 в воде Milli-Q) и подвижную фазу Б (ацетонитрил) в соотношении 60:40; время удерживания составило 5 мин 30 с. Регистрацию сигнала поглощения

осуществляли в двухканальном режиме (235 и 269 нм) на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения зеараленона.

Сорбционная емкость БНС–ИБ рассчитывали по уравнению:

$$Q = \frac{(C_{\text{исх}} - C_{\text{кон}})V}{m}$$

где $C_{\text{исх}}$ и $C_{\text{кон}}$ — начальная и конечная концентрации целевого анализа, V — объем раствора, а m — масса адсорбента.

2.3 Физико-химические методы исследования

Математические расчеты проводили с использованием программного обеспечения Origin 2024 (OriginLab Co., США). Кислотность растворов, измеряли с помощью рН-метра AB33PH и электрода ST310 (Ohaus Co., США).

2.3.1. Метод динамического рассеяния света

Гидродинамический диаметр и ζ -потенциал белков измеряли с использованием комплекса оборудования Zetasizer Advance Ultra (Malvern Panalytical, Великобритания).

2.3.2. Электронная спектроскопия

Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре «Shimadzu UV–1800» (Shimadzu, Япония). Спектры флуоресценции регистрировали на многофункциональном флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse («Agilent Technologies», Австралия) при 25°C в спектральном диапазоне 300–500 нм с разрешением 1 нм и длиной оптического пути 1 см, ширина щелей возбуждающего и анализирующего монохроматоров - 5 нм. Собственную флуоресценцию БСА регистрировали при возбуждении длиной волны $\lambda_{\text{возб.}} = 295$ нм.

Оценку времени жизни флуоресценции осуществляли при помощи модульного аппаратно-программного комплекса Horiba DeltaPro («Horiba Scientific», Великобритания) с диодным источником излучения 359 нм NanoLED («Horiba Scientific», Британия) и нейтральным отражающим фильтром из

кварцевого стекла OD2 («Thorlabs», США). Для обработки данных и расчетов использовали программное обеспечение EzTime, кривые затухания флуоресценции аппроксимировали трехэкспоненциальной функцией.

2.3.3. Спектроскопия кругового дихроизма¹

Спектры кругового дихроизма регистрировали на спектрометре Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания) в спектральном диапазоне 190–280 нм и длиной оптического пути 1 см. Растворы БСА (50 мкг/мл) готовили растворением в бидистиллированной воде. Значение pH регулировали с помощью 0,1 М H_3PO_4 и 0,1 М NaOH. Содержание элементов вторичной структуры оценивали с помощью программного обеспечения, доступного онлайн на сервере DichroWeb, и метода Гринфилд-Фасман.

2.3.4. DOSY-ЯМР-спектроскопия²

Измерения ЯМР ^1H в высокопольном диапазоне проводились на спектрометре Bruker Avance III 500 МГц (Bruker Biospin, Германия), оснащенном широкодиапазонным криогенным датчиком прямого наблюдения (CryoProbe VBO), оснащенным автоматическим устройством смены образцов Bruker, для 60 образцов при 297 К. Спектры ЯМР ^1H записывались с использованием одномерной импульсной программы NOESY с предварительным насыщением водой и градиентами спойлера, применяемыми во время релаксации, с использованием 32 сканирований. В общей сложности было получено 132 тыс. точек данных с шириной импульса 11,64 с, коэффициентом усиления приемника 69,5, временем сбора данных 5,4526 с и задержкой релаксации 5,0 с. Двумерную DOSY-ЯМР-спектроскопию проводили с использованием импульсной последовательности DOSY с предварительным насыщением воды путем задержки продольного вихревого тока с парой биполярных градиентных импульсов и двумя градиентами подавления. Длительность градиентного импульса (δ) была установлена на 1400 мкс, а время диффузии (Δ) — на 0,05 с.

¹ Анализ образцов методом спектроскопии кругового дихроизма выполнен при поддержке Центра коллективного пользования «Симбиоз» ИБФРМ РАН (Саратов, Россия).

² Анализ образцов методом DOSY-ЯМР-спектроскопии выполнен д.х.н. Монаховой Ю.Б. (Университет прикладных наук Аахена (Юлих, Германия)).

Четыре сканирования обеспечили достаточную чувствительность (параметр варьировался от 2 до 16). Измерение занимало 15 мин для одного образца. Данные записывались автоматически под управлением ICON–NMR (Bruker Biospin, Германия).

ЯМР-спектры обрабатывались вручную в MestReNova версии 14.1.2 (Mestrelab Research, Сантьяго-де-Компостела, Испания). Спектры подвергались экспоненциальному взвешиванию с коэффициентом 1,0 Гц. Для обеспечения сопоставимости все спектры были откалиброваны относительно внутреннего стандарта ТСП (натриевая соль 3-(триметилсилил)пропионовой кислоты) при Δ 0,0 ppm. Фаза и базовая линия были скорректированы вручную для всего спектра. Для обработки DOSY-ЯМР-спектров использовался Dynamic Center (Bruker Biospin, Германия). На двумерных графиках показаны значения коэффициента диффузии D в $[m^2\ s^{-1}]$.

Для ЯМР-измерений приблизительно 40 мг БСА растворяли в 1 мл смеси H_2O/D_2O (+ 0,1% ТСП в качестве внутреннего стандарта) в соотношении 9:1. pH регулировали с помощью раствора HCl или NaOH до следующих значений: 2,2; 3,3; 4,2; 4,7; 5,8; 7,7; и 9,0. ЯМР-спектры измеряли не позднее чем через 30 минут после приготовления образца, чтобы избежать деградации растворов. Для оценки надежности метода начальную массу БСА варьировали от 10 мг до 100 мг (7 точек). Для оценки точности измерений готовили несколько образцов и измеряли их в трех повторениях.

Для исследования процесса импринтинга готовили исходный раствор БСА (40 мг/мл) в смеси H_2O/D_2O в соотношении 9:1. pH доводили до 3,0 с помощью раствора HCl и перемешивали 10 мин. Затем к 3 мл полученного раствора БСА добавляли 60 мкл, 30 мкл и 3 мкл исходного раствора 4-гидроксикумарина (1,3 мг/мл в метаноле- d_4) для получения смесей. Растворы перемешивали в течение 20 мин, и из каждой смеси отбирали аликвоту по 0,6 мл. После этого pH каждого раствора регулировали до 8,0 с помощью раствора NaOH, и из каждой смеси отбирали аликвоту по 1 мл. Затем к 1 мл смесей добавляли 20 мкл, 10 мкл и 1 мкл глутарового альдегида (0,5% об.). После этого немедленно измеряли ЯМР-

спектры 0,6 мл смесей. Смесей 1–3 имели различные концентрации 4-гидроксикумарина для коррекции аналитического сигнала. Все измерения проводились при комнатной температуре.

2.3.5. Изотермическая титрационная калориметрия³

ИТК использовали для определения термодинамических параметров ассоциации (ΔH_B и ΔS_B), K_B , а также количества сайтов связывания (n) при импринтинге БСА в присутствии 4-гидроксикумарина при различных значениях pH. Измерения проводились с помощью изотермического титрационного калориметра NanoITC (TA Instruments, США) при 298 К. Титрование проводили путем пошагового введения раствора 4-гидроксикумарина (25 инъекций по 2 мкл) из автоматического шприца в ячейку с раствором БСА (рабочий объем 170 мкл) с раствором БСА при непрерывном перемешивании со скоростью 300 об/мин. Интервал между инъекциями, необходимый для достижения равновесия смеси, составлял 300 с. Все растворы дегазировали при 380 Торр и 298 К в течение 40 мин перед экспериментами. Исходные данные ИТК титрования БСА 4-гидроксикумарином были скорректированы путем вычитания термограмм титрования буферного раствора 4-гидроксикумарином при соответствующем pH. Скорректированные данные использовали для построения кривой титрования, показывающей наблюдаемое изменение энтальпии в зависимости от молярного соотношения БСА:4-гидроксикумарин. Кривые титрования были аппроксимированы с помощью модели многоцентрового титрования в программном обеспечении NanoAnalyze 3.12.0 (TA Instruments, США) для оценки значений ΔH_B , ΔS_B , K_B и n .

2.4 Компьютерное моделирование

2.4.1. Подготовка молекулярных систем

Кристаллографическая структура БСА (PDB ID: 4F5S) с разрешением 2,47 Å была загружена из базы данных Protein Data Bank [66]. Расчет проводили для

³ Анализ методом ИТК выполнен лабораторией физического факультета МГУ (Москва, Россия).

мономерной формы БСА. Подготовка структуры белка включала добавление атомов водорода и отсутствующих боковых цепей аминокислот, удаление молекул растворителя и корректировку состояния протонирования. Состояния протонирования были скорректированы в соответствии с константами кислотности аминокислотных остатков для моделирования определенных уровней pH с использованием алгоритма PROPKA [67]. Геометрические параметры белка и лигандов были рассчитаны с помощью силового поля amber99sb-ildn [68]. Все лиганды были параметризованы с помощью асруре [69]; точечные заряды атомов для всех лигандов были получены из *ab initio* расчетов B3LYP/6–31G* с использованием psiresp [70].

2.4.2. Молекулярный докинг

Предсказание сайтов связывания выполнялось с использованием SiteMap (Schrödinger, Сан-Диего, США) [71,72] и AutoDock Vina (v 1.2.3) [73]. Докинг лиганда выполнялся с использованием Glide, реализованного в программе Schrödinger Suite 2021-2 [74–76], с параметрами расчета: негибкий белок и гибкий лиганд, размер сетки 15 Å. Решения докинга ранжировались путем оценки следующих параметров расчета: оценка докинга (на основе GlideScore с исключением штрафа) и параметр энергетической ценности модели (Emodel), включая значение GlideScore, энергию несвязанных взаимодействий и энергетические параметры, затраченные на формирование стэкинга соединений в сайте связывания. Затем структура ассоциатов белок:молекула-шаблон помещались в орторомбическую систему с буферной зоной 13 Å, начинающейся от поверхности белка. Системы были заполнены водой TIP3P в средах NVT и NPT. Периоды МД-моделирования составляли 300 нс (при 298 K). Для каждой системы проведены три повторных моделирования. Протокол подготовки системы моделирования включал предварительные этапы минимизации и уравнивания. Поскольку растворитель моделировался явно в МД, средство связывания оценивалось с помощью традиционного метода молекулярной механики с обобщенной площадью поверхности Борна (MM–GBSA) [77].

2.4.3. Молекулярная динамика и метадинамика⁴

МД-симуляции проводились с использованием программных пакетов GROMACS 2024.3 [78–80] и PLUMED 2.9.3 [81]. Система помещалась в кубический бокс с периодическими граничными условиями и сольватировалась молекулами воды TIP3P. Для нейтрализации суммарного заряда добавлялись ионы Na^+ и Cl^- . Минимизацию системы проводили с использованием 5000 шагов методом наискорейшего спуска. Предварительное уравнивание системы проводилось последовательно в NVT- и NPT-ансамблях с наложением позиционных ограничений на тяжелые атомы с силовой константой 1000 кДж/моль·нм² в течение 1 нс для каждого этапа. Для температурной связи использовался термостат V-rescale [82]. Давление составляло 1 бар и моделировалось стохастическим баростатом [83]. На всех этапах моделирования временной шаг составлял 2 фс.

Для преодоления энергетических барьеров и получения стабильной конформации молекулы БСА были исследованы с методом well-tempered метадинамики с использованием двух коллективных переменных: (1) расстояние между центрами масс доменов 1 и 3 и (2) угол между этими центрами. Метадинамические потенциалы 1 кДж моль⁻¹ с шириной 0,04 нм и радиусом 0,02 рад применялись каждые 500 шагов. Коэффициент смещения был установлен равным 20. В моделировании использовалось 6 уолкеров, каждый из которых накапливал 1500 нс траектории, таким образом, общая продолжительность траектории составила 9 мкс.

2.4.4. Хемометрический анализ трехмерных спектров флуоресценции

ЕЕМ были получены в 3 временных точках для НИБ при pH 3,0 (0, 20 и 48 ч), в 6 временных точках для образцов, протонированных лимонной или фосфорной кислотой, при pH 1,0, pH 2,0 и pH 3,0 (0, 12, 20, 32, 40 и 48 ч) и в 5 временных точках для соляной кислоты при pH 1,0, pH 2,0 и pH 3,0 (0, 20, 32, 40

⁴ Вычисления проводили на оборудовании общего исследовательского центра высокопроизводительных вычислительных ресурсов Саратовского государственного университета (Саратов, Россия).

и 48 ч). Каждая ЕЕМ включала спектры испускания ИБ (300-500 нм, разрешение 2 нм) при различных длинах волн возбуждения (230-330 нм, разрешение 10 нм) и состояла в общей сложности из 12 длин волн возбуждения и 165 длин волн испускания. Спектральные данные нИБ использовали в качестве эталонного («теоретически очищенного») образца. Полный набор объединенных ЕЕМ имел размерность $48 \times 12 \times 166$, представляющий собой развернутую матрицу размерностью 48×1992 . Предварительная подготовка данных включала удаление артефактов Рэлея и Рамана с помощью бинарной маски.

Хемометрический анализ трехмерных спектров флуоресценции проводили методами PCA, ICA и PARAFAC с использованием программного обеспечения MATLAB R2013b (MathWorks, Франция). PCA и ICA применяли к развернутой матрице с использованием внутренней функции Matlab «svd.m» и с использованием собственных функций, основанных на алгоритме JADE, соответственно [84,85]. PARAFAC применялся непосредственно к трехмерной матрице с использованием функций из пакета nwaytoolbox [86].

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СИСТЕМЕ БСА — 4-ГИДРОКСИКУМАРИН

Материалы данной главы опубликованы в работах [89, 92, 99, 104, 105]. Анализ спектральных и термодинамических закономерностей, обработка и хемометрический анализ спектральных трехмерных массивов (РСА, ІСА и PARAFAC), а также интерпретация полученных данных и формулировка научных выводов выполнены автором лично. Экспериментальные измерения проведены при участии соавторов опубликованных работ.

Для детального исследования физико-химических закономерностей импринтинга белков в качестве модельной системы были выбраны БСА и 4-гидроксикумарин. Выбор 4-гидроксикумарина обусловлен тем фактом, что молекула альбумина изначально обладает эволюционно детерминированными гидрофобными полостями (в частности, сайтом Судлоу І), комплементарными кумариновым структурам и их производным (например, варфарину) [87,88].

Согласно данным литературы [89], проведение начальной стадии импринтинга в кислой среде способствует улучшению сорбционных характеристик ИБ. В исследуемой системе предварительное подкисление среды приводило к увеличению аналитической степени извлечения с 30 до 70% (рис. 2). Для объяснения наблюдаемого эффекта и выявления физико-химических механизмов, лежащих в его основе, на первом этапе работы с помощью комплекса оптических методов были исследованы изменения структуры БСА в кислой среде.

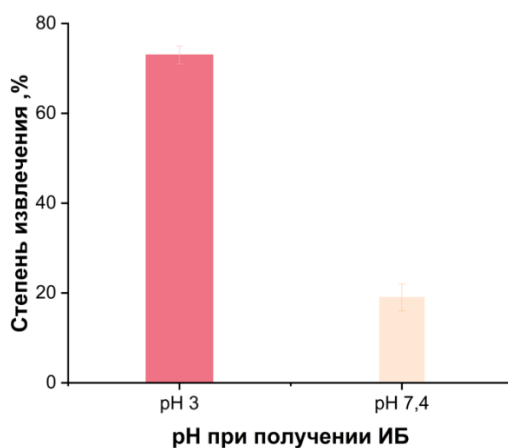


Рисунок 2. Зависимость степени извлечения от начальных условий импринтинга [89].

3.1. Влияние кислотности среды на физико-химические свойства свободного БСА

3.1.1. Влияние *pH* на вторичную структуру БСА

Спектры кругового дихроизма белков в дальней ультрафиолетовой области (190–260 нм) отражают конформационное состояние полипептидного остова и определяются оптической активностью двух типов электронных переходов пептидной группы. К ним относятся низкоэнергетический $n \rightarrow \pi^*$ переход амидного карбонила, формирующий отрицательный сигнал в области 222 нм, а также параллельный и перпендикулярный $\pi \rightarrow \pi^*$ переходы, проявляющиеся в спектральном диапазоне 190–210 нм. На длинах волн короче 200 нм регистрируют переходы с переносом заряда внутри амида, инструментальное измерение которых часто ограничено высокой оптической плотностью системы (суммарное поглощение белка и компонентов буферного раствора не должно превышать значения 1,0–1,2).

В нативном состоянии БСА характеризуется преимущественно α -спиральной пространственной организацией. Спектральные профили растворов БСА при *pH* 5,0 и *pH* 9,0 демонстрируют классический двухволновой отрицательный профиль с отчетливо выраженными экстремумами при 208 нм и 222 нм (рис. 3). При подкислении среды до *pH* 3,0 наблюдается существенное снижение интенсивности сигнала, что указывает на частичное разворачивание вторичной структуры.

Количественная оценка содержания α -спиралей с использованием деконволюционных алгоритмов веб-сервера DichroWeb (CDSSTR, CONTIN-LL, SELCON3) привела к значительному разбросу расчетных величин, что обусловлено ориентацией калибровочных спектральных базисов данных алгоритмов на компактные нативные глобулярные белки. В связи с этим количественная оценка содержания вторичной структуры была выполнена с привлечением классического уравнения Гринфилд — Фасман по величине молярной эллиптичности при 208 нм:

$$\%(\alpha\text{-спиралей}) = \frac{-[\theta]_{208} - 4000}{33000 - 4000} \times 100\%$$

где $[\theta]_{208}$ — среднеостаточная молярная эллиптичность при 208 нм.

Согласно проведенному расчету, доля α -спиралей в глобуле БСА снижается с 68–69 % при pH 5,0 и pH 9,0 до 54–55 % при pH 3,0 (табл. 1). Полученные данные доказывают, что при подкислении среды (pH 3,0) белок претерпевает умеренную конформационную дестабилизацию: утрачивается небольшая часть исходного спирального каркаса, тогда как основная часть вторичной структуры сохраняется. Это подтверждает формирование частично развернутой конформации, обеспечивающей сохранение целостности полостей для последующего образования молекулярных отпечатков.

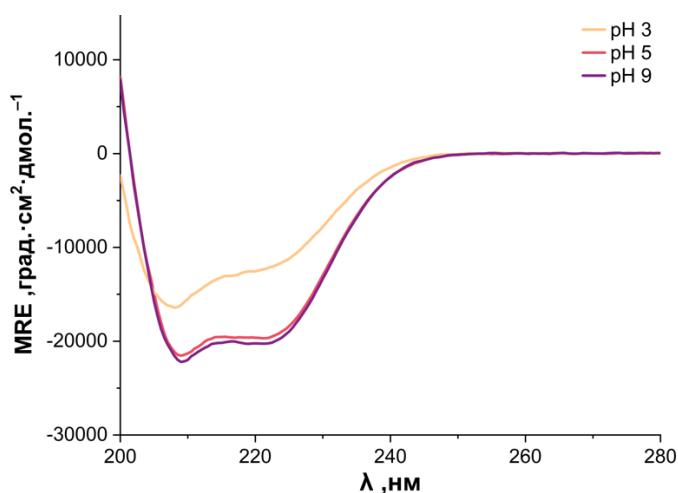


Рисунок 3. Спектры кругового дихроизма свободного БСА при разных значениях pH.

3.1.2. Влияние pH на флуоресценцию БСА

Стационарная флуоресцентная спектроскопия

Собственная флуоресценция белков обусловлена наличием ароматических аминокислотных остатков — фенилаланина, тирозина и триптофана (Trp). Доминирующим флуорофором выступает Trp, характеризующийся наибольшим коэффициентом молярной экстинкции и квантовым выходом за счет наиболее протяженной системы π -сопряжения. [90]. В структуре молекулы БСА присутствуют два остатка триптофана: Trp-134, экспонированный на

гидрофильную поверхность глобулы в субдомене IB, и Trp-213, локализованный в гидрофобном окружении сайта Судлоу I в субдомене IIА. Спектральные характеристики индольного хромофора имеют высокую чувствительность к полярности растворителя: увеличение полярности (диэлектрической проницаемости) окружения сопровождается смещением максимума эмиссии в длинноволновую область (батохромный/красный сдвиг), тогда как более гидрофобное окружение инициирует коротковолновое (гипсохромное/синее) смещение.

Анализ спектров испускания БСА ($\lambda_{\text{возб.}} = 290$ нм) показал выраженную зависимость флуоресцентных свойств белка от кислотности среды (рис. 4 (а), табл. 1). Вблизи изоэлектрической точки (рН 5,0) интенсивность флуоресценции максимальна ($\lambda_{\text{исп.}} = 348$ нм). При рН 9,0 профиль полосы практически сохраняется, демонстрируя умеренное снижение интенсивности сигнала. При рН 3,0 наблюдается снижение относительной интенсивности флуоресценции, сопровождающееся выраженным гипсохромным сдвигом максимума излучения до 336 нм ($\Delta\lambda \approx 12$ нм) и резким сужением спектральной полосы (ширина на полувысоте (FWHM) = 91,8 нм) (табл. 1).

Обычно разворачивание белка приводит к увеличению полярности окружения остатков Trp и батохромному сдвигу. Наблюдаемый в случае БСА гипсохромный сдвиг свидетельствует о специфическом конформационном переходе в кислой среде. Сужение пика указывает на существенное ограничение подвижности и жесткую фиксацию хромофора [91]. Жесткая фиксация геометрии ограничивает подвижность как самого хромофора, так и контактирующих с ним полярных групп, из-за чего растворитель перестает участвовать в процессе диполь-дипольной релаксации, энергия возбужденного состояния не рассеивается в виде тепла, и излучение происходит с более высокой энергией, что проявляется сдвигом максимума флуоресценции в синюю область. Снижение интенсивности может быть связано с увеличением доступности хромофоров для полярного растворителя и протонированием боковых

функциональных групп близлежащих аминокислотных остатков, которые действуют как эффективные тушители флуоресценции.

Время-разрешенная флуоресцентная спектроскопия

Исследование кинетики затухания флуоресценции во время-разрешенном режиме выявило сложный, гетерогенный характер процесса тушения, характерный для белковых молекул (рис. 4 (б)) [92]. Многоэкспоненциальный профиль затухания флуоресценции анализировали в рамках трехкомпонентной модели (табл. 1). В нативном состоянии (рН 7,4) локальное микроокружение Trp характеризуется высокой степенью экранированности от внешнего растворителя. При переходе в кислую среду (рН 3,0) наблюдается снижение среднего времени жизни флуоресценции, что обусловлено частичным разворачиванием глобулы БСА и увеличением доступности хромофоров для растворителя.

Первые две быстрые компоненты (τ_1 и τ_2) отражают излучательные переходы из двух почти изоэнергетических возбужденных состояний индольного кольца ($1L_a$ и $1L_b$) и слабо зависят от конформации белка, характеризуя фундаментальные внутримолекулярные свойства хромофора [93–95]. Третья, наиболее долгоживущая компонента (τ_3) вносит основной вклад в среднее время жизни (τ_{cp}) и напрямую отражает динамику взаимодействия остатков Trp с локальным белковым окружением.

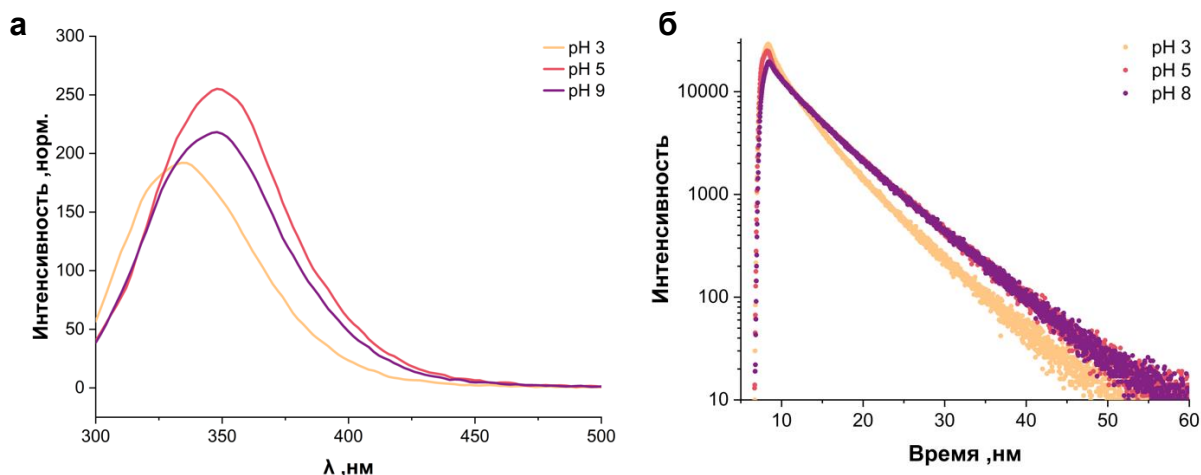


Рисунок 4. Спектры испускания ($\lambda_{\text{возб.}} = 290 \text{ нм}$) (а) и кривые затухания флуоресценции (б) БСА при разных рН.

Таблица 1. Влияние pH на характеристики БСА: содержание α -спиралей, FWHM и компоненты времени жизни флуоресценции ($\lambda_{\text{возб.}} = 290 \text{ нм}$)

pH	Содержание α -спиралей ^а , %	FWHM, нм	τ_1 , нс	τ_2 , нс	τ_3 , нс	$\tau_{\text{ср.}}$, нс	χ^2
2,0	—	—	0,3	2,0	4,7	3,7	1,29
3,0	55	92	0,3	2,3	5,5	4,7	1,11
5,0	—	122	0,2	2,8	6,3	5,9	1,07
7,4	69	—	0,3	3,1	6,5	6,0	1,10
8,0	—	105	0,3	3,0	6,4	6,0	0,99

Примечания:

а — на основе данных спектроскопии кругового дихроизма.

3.1.3. Влияние pH на гидродинамические и электрокинетические свойства БСА

Изменение pH среды перед внесением молекул-шаблонов вызывает перераспределение зарядов вследствие протонирования или депротонирования ионогенных функциональных групп полипептидной цепи: карбоксильных остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также аминок групп лизина, аргинина и гистидина. Изменение плотности поверхностного заряда белка, вызванное кислотностью среды, определяет его электрокинетические характеристики и вызывает конформационные изменения (разворачивание) глобулы, обнажая внутренние гидрофобные области и формируя дополнительные центры связывания. Поскольку разворачивание белковой глобулы и последующее введение сшивающего агента могут способствовать неконтролируемой агрегации белка, поведение БСА было детально охарактеризовано методами динамического рассеяния света и DOSY-ЯМР-спектроскопии.

Динамическое рассеяние света

Установлено, что электрокинетический потенциал (ζ -потенциал) глобул БСА меняет знак от положительного в кислой среде (+15,3 мВ при pH 3,0) до отрицательного в нейтральной и щелочной областях (–10,5 мВ при pH 7,4 и –19,7 мВ при pH 8,0) (табл. 2). В слабокислой среде при pH 4,5 (вблизи изоэлектрической точки белка, $pI \approx 4,7\text{--}4,9$) суммарный заряд глобулы

минимален ($-4,6$ мВ), что способствует компактизации белковой структуры в сжатую конформацию.

Анализ гидродинамических размеров показал, что для нативного белка при рН 7,4 средний гидродинамический радиус составляет $R_h = 4,70$ нм. При смещении рН от 8,0 до 4,5 размер изменяется незначительно, однако при переходе в кислую область (рН 3,0) гидродинамический радиус резко возрастает до 5,75 нм. Наблюдаемые результаты хорошо согласуются с литературными данными [38,96].

Анализ кривых распределения частиц по размерам (рис. 5) свидетельствует о том, что во всем диапазоне рН доминирующей фракцией в растворе являются мономерные формы альбумина. При рН 3,0 (рис. 5 (а)) наряду с основным сигналом мономеров наблюдался сигнал с низкой интенсивностью в области ~ 100 нм. Поскольку интенсивность рэлеевского рассеяния пропорциональна шестой степени радиуса частиц ($I \sim R^6$), даже следовые количества олигомеров дают заметный вклад в светорассеяние. Полученные профили указывают на сосуществование частично развернутых мономеров с олигомерами низкого порядка, что согласуется с данными ВЭЖХ [97], фиксирующими преобладание мономерного БСА (70–80 %) над димерными фракциями (15–25 %) в аналогичных кислых средах.

Введение глутарового альдегида при рН 8,0 приводит к увеличению гидродинамического радиуса до $R_h = 9,27$ нм и росту полидисперсности за счет формирования незначительного количества димерных и олигомерных белковых ансамблей, в то время как ζ -потенциал остается на том же уровне (табл. 2, рис. 5 (д)). Присутствие молекул-шаблонов на стадии сшивки способствовало компактизации структуры. Данный эффект обусловлен локальным изменением конформации белковой глобулы в ответ на ассоциацию и стабилизацией третичной структуры белка в соответствии с механизмом индуцированного соответствия.

Таким образом, результаты исследований подтверждают, что при рабочих концентрациях белка (10 мг/мл) мономеры БСА остаются преобладающей

формой в растворе на всех этапах импринтинга, обеспечивая доступность функциональных полостей матрицы для эффективного молекулярного импринтинга.

Таблица 2. Влияние pH на характеристики БСА

Условия	pH	$D^a \cdot 10^{11}$, $\text{м}^2/\text{с}$	ζ -потенциал, мВ	R_h , нм	Индекс полидисперсности
Свободный БСА					
	2,2	1,8	—	—	—
	4,5	6,6	−5	4,7	0,28
	7,4	5,6	−10	4,7	0,22
	9,0	0,1	—	—	—
Стадии формирования ИБ					
	3,0	4,0	+15	5,8	0,43
	8,0	—	−20	4,1	0,38
	8,0 ^б	—	−19	9,3	0,55
	8,0 ^в	—	−16	7,5	0,45

Примечание:

а — коэффициент диффузии (D) на основе данных DOSY-ЯМР-спектроскопии;

б — с добавлением глутарового альдегида;

в — с добавлением 4-гидроксикумарина и глутарового альдегида.

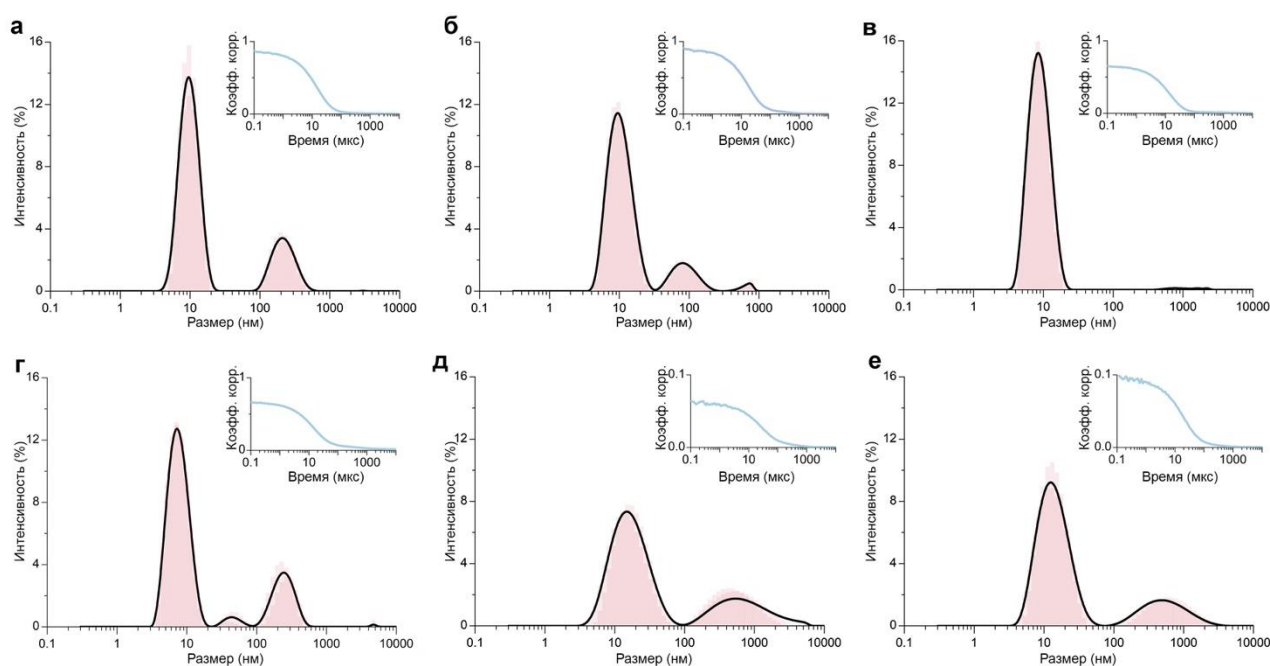


Рисунок 5. Зависимость распределения частиц БСА (1 мг/мл) по размеру от pH: pH 3,0 (а); 4,5 (б); 7,4 (в); 8,0 (г); БСА с добавлением глутарового альдегида, pH 8,0 (д); БСА с добавлением глутарового альдегида и 4-гидроксикумарина, pH 8,0 (е).

DOSY-ЯМР-спектроскопия

Для прямого определения подвижности индивидуальных белковых молекул без искажающего влияния рэлеевского рассеяния крупных ассоциатов проведено систематическое исследование растворов БСА методом DOSY-ЯМР-спектроскопии (рис. 6, 7, табл. 2, 3).

В DOSY-ЯМР-спектрах белков регистрируют сигналы протонов компонентов смеси в соответствии с их коэффициентами диффузии. Определение гидродинамических параметров белка и его гидратной оболочки базируется на отслеживании затухания интенсивности резонансных линий алифатических протонов боковых цепей (CH_3 -групп лейцина, изолейцина, валина в диапазоне 0,5–1,5 м.д.), α -протонов остова (3,5–4,5 м.д.) и амидных/ароматических протонов (6,5–8,5 м.д.) под действием импульсного градиента магнитного поля [98].

Анализ двумерных карт DOSY свободного БСА при разных значениях pH (рис. 6) показал строгую зависимость коэффициента диффузии D от конформационного состояния глобулы. В сильноокислой среде при pH 2,2 молекула БСА находится в развернутой конформации с развитой гидратной оболочкой, что отражается в относительно низких значениях коэффициента диффузии. При повышении pH от 2,2 до 3,3 и далее до 4,2 наблюдается закономерное смещение полос диффузии, свидетельствующее об уменьшении гидродинамического объема белка при приближении к изоэлектрической точке ($pI \approx 4,7$). В нейтральном диапазоне pH 4,2–7,7 подвижность молекулы стабилизируется на уровне нативной компактной глобулы. При экстремальном подщелачивании (pH 9,0–9,5) вследствие кулоновского отталкивания депротонированных функциональных групп белок переходит в базовую форму (В-конформацию) с минимальной скоростью диффузии. Таким образом, гидродинамический объем свободного БСА минимален в окрестности изоэлектрической точки и закономерно возрастает как при подкислении, так и при подщелачивании раствора.

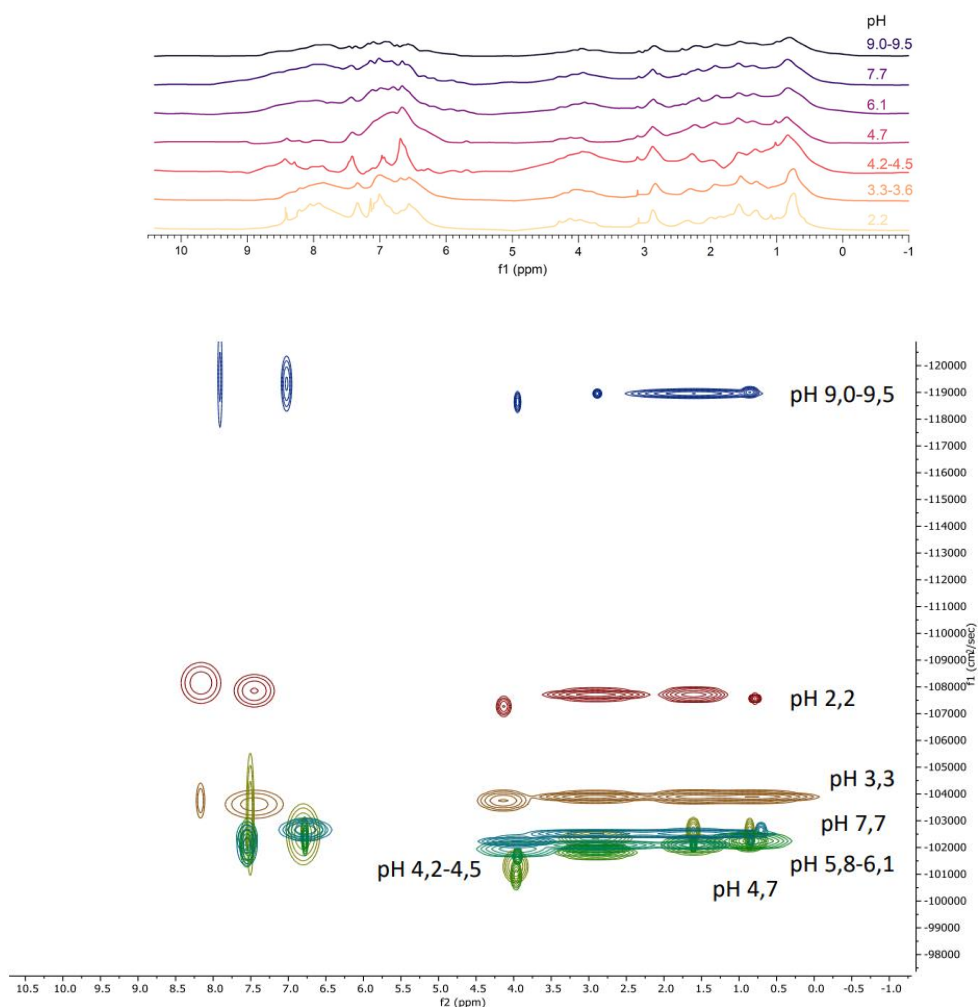


Рисунок 6. DOSY-ЯМР-спектры свободного БСА при различных значениях pH.

Изучение влияния последовательного изменения условий в соответствии с протоколом получения ИБ на диффузионную подвижность БСА (рис. 7, табл. 3) позволило проследить структурные изменения белковой матрицы. Добавление 4-гидроксикумарина к БСА при pH 3,0 (табл. 3, смеси 1–3) практически не изменяет величину коэффициента диффузии, что свидетельствует о сохранении частично развернутой конформации глобулы и мономерного профиля. Последующий перевод системы в pH 8,0–9,0 сопровождается ростом коэффициента диффузии, что прямо доказывает компактизацию глобулы вокруг связавшихся молекул-шаблонов. Ковалентная фиксация структуры глутаровым альдегидом приводит к дальнейшему увеличению коэффициента диффузии (табл. 3, смеси 1, 2), либо сохранению его на том же уровне (табл. 3, смесь 3).

Данный факт является физико-химическим подтверждением того, что полученные ИБ существуют в растворе преимущественно в виде мономерных

макромолекул, не образуя межмолекулярных агрегатов. Внутримолекулярная сшивка в щелочной среде фиксирует компактную конформацию белка вокруг молекул 4-гидроксикумарина, обеспечивая высокую геометрическую и электростатическую комплементарность формируемых полостей молекулярных отпечатков.

Таблица 3. Влияние условий на коэффициенты диффузии ($D \cdot 10^{11}$, м²/с) в системе БСА — 4-гидроксикумарин^а

рН	БСА	Смесь 1	Смесь 2	Смесь 3
3,0	5,4	—	—	—
3,0 ^б	—	5,6	5,6	5,6
8,0 ^б	—	7,4	7,9	8,1
8,0 ^в	—	9,1	8,9	7,8

Примечания:

а — молярные соотношения БСА:4-гидроксикумарин для смесей 1, 2 и 3 составили 75:1; 7,5:1 и 3,8:1;

б — с добавлением 4-гидроксикумарина;

в — с добавлением 4-гидроксикумарина и глутарового альдегида.

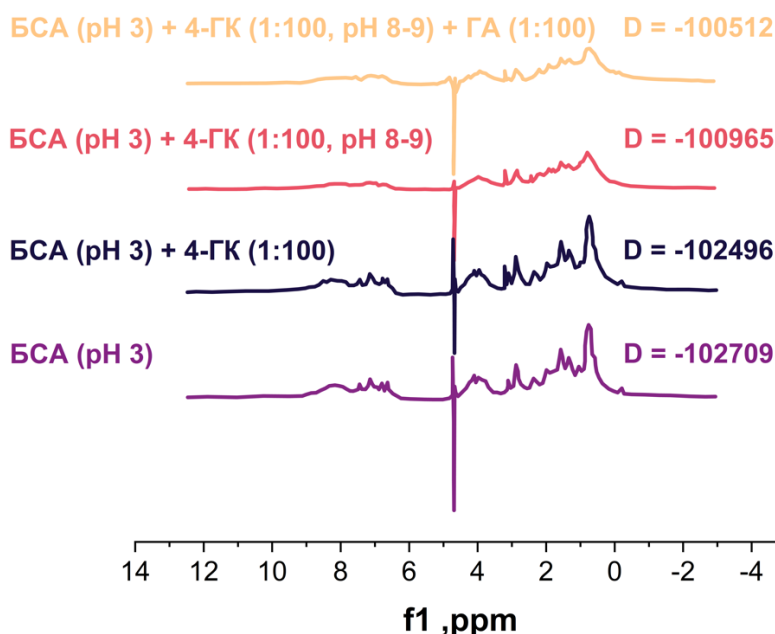


Рисунок 7. DOSY-ЯМР-спектры БСА (смесь 2) при рН 3,0 и смесей БСА: 4-гидроксикумарин при рН 3,0 и рН 8,0–9,0 до и после добавления глутарового альдегида.

3.2. Формирование ассоциата БСА:4-гидроксикумарин

3.2.1. Термодинамический профиль взаимодействий в системе БСА — 4-гидроксикумарин

Ключевое значение для достижения высоких сорбционных характеристик ИБ имеет формирование ассоциата белок:молекула-шаблон. Метод ИТК — единственный подход, позволяющий напрямую измерять теплообмен во время образования лиганд-белкового комплекса, и является общепризнанным методом определения движущих сил процесса связывания. В данной работе впервые изучены термодинамические параметры связывания белка с молекулами-шаблонами.

Экспериментальную оценку сродства связывания белок:молекула-шаблон проводили с помощью метода ИТК [99], предоставляющего количественные термодинамические данные, которые можно использовать для изучения стабильности комплексов и выяснения движущих сил связывания.

На рисунке 8 представлены исходные термограммы титрования БСА 4-гидроксикумарином при различных значениях рН, а также соответствующие интегральные изотермы связывания. Математическую аппроксимацию проводили с помощью модели множественных сайтов связывания. Рассчитанные термодинамические параметры приведены в таблице 4. При всех исследованных значениях рН кривые титрования показывают наличие двух процессов с различными константами связывания (K_1 и K_2). Оба процесса являются самопроизвольными, поскольку характеризуются отрицательными значениями свободной энергии Гиббса ΔG_B . Во всех случаях K_1 на два порядка больше, чем K_2 , что указывает на термодинамическое преимущество и высокую аффинность доминирующего процесса. Первый процесс отражает формирование взаимодействий в специфических полостях глобулы БСА. Рассчитанные константы связывания ($K_B = (99 \pm 25) \times 10^7$, $K_B = (74 \pm 40) \times 10^7$, $K_B = (98 \pm 30) \times 10^7$ для рН 3,0, 7,4 и 9,0, соответственно) указывают на формирование высокоаффинных сайтов связывания.

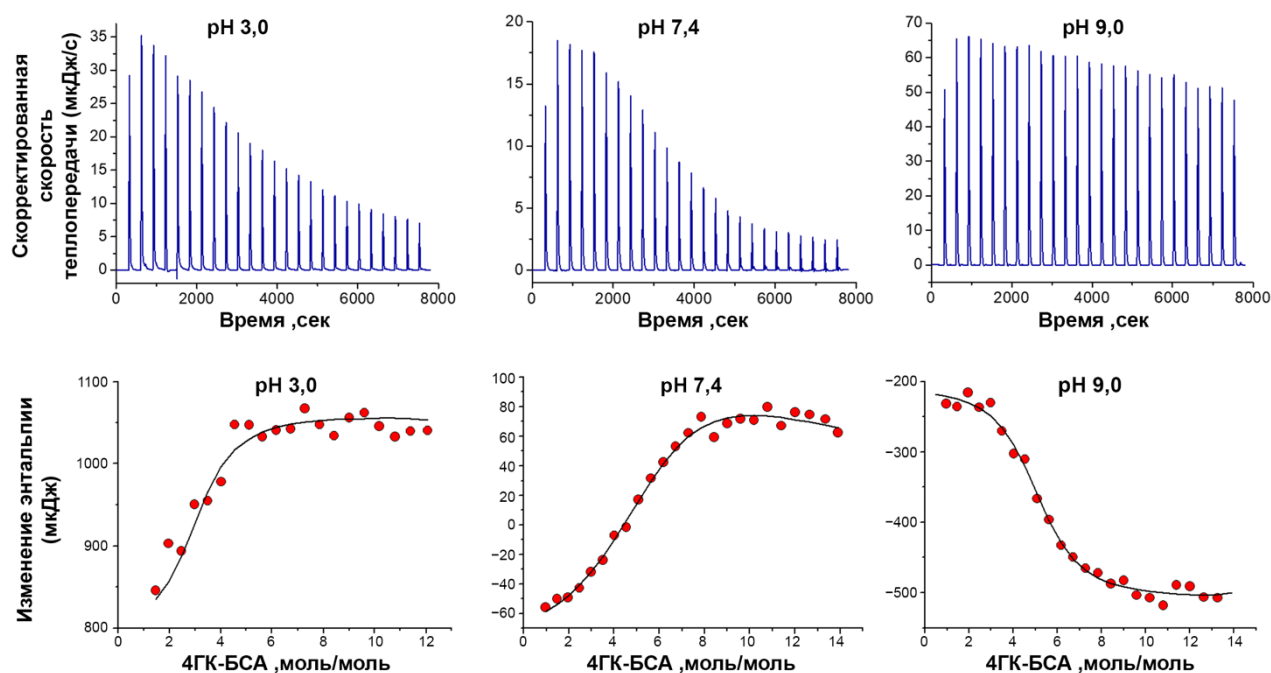


Рисунок 8. Исходные данные ИТК (а) и изотермы связывания (б) при титровании БСА (5 мг/мл) 4-гидроксикумарином (0,5 мг/мл) при различных значениях рН (298 К). Сплошные линии на изотермах — результат аппроксимации по двухсайтовой модели связывания.

Таблица 4. Термодинамические параметры связывания БСА (5 мг/мл) и 4-гидроксикумарина (0,5 мг/мл) при различных значениях рН, 298 К, n=3

Процесс	1			2		
рН	3,0	7,4	9,0	3,0	7,4	9,0
$\Delta H_{B,}$ кДж/моль	$(0,6 \pm 0,4) \cdot 10^2$	-11 ± 2	-36 ± 3	175 ± 3	14 ± 1	-84 ± 2
Сайты	$1,6 \pm 0,5$	$4,7 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,2$	$10,0 \pm 0,3$	$9,1 \pm 0,3$	$9,6 \pm 0,8$
связывания						
$K_B, \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$	99 ± 25	74 ± 40	98 ± 30	6 ± 3	3 ± 2	2 ± 1
$\Delta S_{B,}$ Дж/моль · К	349	134	57	745	188	-147
$\Delta G_{B,}$ кДж/моль	$-(0,44 \pm 0,4) \cdot 10$	-50 ± 2	-53 ± 3	-47 ± 3	-42 ± 1	-40 ± 2

В кислой среде (рН 3,0), соответствующей начальной стадии формирования ИБ, процесс сопровождается поглощением тепла и существенным возрастанием энтропии системы ($\Delta H_B > 0$ и $\Delta S_B > 0$). Положительные знаки энтальпии и энтропии однозначно указывают на энтропийный контроль процесса ассоциации, движущей силой которого выступают гидрофобные взаимодействия [100]. Вытеснение структурированных молекул гидратной воды из неполярных карманов частично развернутой формы белка при внедрении ароматического ядра 4-гидроксикумарина приводит к выигрышу энтропии растворителя, обеспечивая термодинамическую стабильность ассоциата. При этом образуются ассоциаты БСА:4-гидроксикумарин состава 1:1 или 1:2.

При переходе к рН 7,4 наблюдается инверсия знака энтальпии: процесс становится экзотермическим при сохранении положительного энтропийного вклада ($\Delta H_B < 0$ и $\Delta S_B > 0$). Такая смена знака свидетельствует об энтальпийно-энтропийном контроле процесса [101]. В нейтральной среде происходит депротонирование 4-гидроксикумарина ($pK_a \approx 4,1 - 4,4$) [102], что приводит к формированию электростатических контактов между отрицательно заряженным лигандом и положительно заряженными участками поверхности БСА с формированием ассоциата БСА:4-гидроксикумарин состава 1:5.

В щелочной среде (рН 9,0), соответствующей стадии депротонирования белковой матрицы и введению сшивающего агента, энтальпийный вклад возрастает при снижении энтропийного члена ($\Delta H_B < 0$ и $\Delta S_B > 0$). Движущая сила связывания остается той же – электростатические взаимодействия между заряженными группами 4-гидроксикумарина и БСА.

Второй процесс характеризуется более низким сродством и постоянным числом сайтов связывания во всем диапазоне рН, отражая неспецифическую сорбцию 4-гидроксикумарина на внешней поверхности белковой глобулы.

При рН 3,0 и 7,4 второй процесс контролируется энтропией ($\Delta H_B > 0$ и $\Delta S_B > 0$), что указывает на формирование гидрофобных взаимодействий. При рН 9,0 термодинамический профиль меняется: как ΔH_B , так и ΔS_B становятся

отрицательными ($\Delta H_B < 0$ и $\Delta S_B < 0$), что указывает на изменение природы второго процесса. В щелочной среде макромолекула БСА приобретает суммарный отрицательный заряд, испытывая электростатическое отталкивание от одноименно заряженных анионов 4-гидроксикумарина. Формирование ассоциата в этих условиях преодолевает кулоновский барьер за счет образования водородных связей и ван-дер-ваальсовых контактов [100], протекающих, вероятно, по механизму протонного сопряжения [39].

Обнаруженная совокупность термодинамических факторов указывает на необходимость применения избытка молекул-шаблонов при получении ИБ для полного насыщения специфических полостей.

3.2.2. Влияние условий на флуоресцентный сигнал в системе БСА — 4-гидроксикумарин

Конформационные перестройки белковой матрицы в системе БСА — 4-гидроксикумарин ($\lambda_{\text{возб.}} = 290$ нм) на ключевых этапах получения ИБ были изучены методом флуоресцентной спектроскопии (рис. 9). В нативном состоянии (раствор свободного БСА при pH 6,0) наблюдается интенсивный сигнал ($\lambda_{\text{исп.}} = 346$ нм). Перевод системы в кислую среду (стадия протонирования, pH 3,0) приводит к значительному снижению интенсивности флуоресценции БСА и выраженному гипсохромному сдвигу максимума эмиссии до 336 нм ($\Delta\lambda = 10$ нм). Изменения спектральных свойств БСА свидетельствуют о крупномасштабной конформационной перестройке макромолекулы, изменяющей полярность микроокружения хромофоров и активирующей процессы их эффективного тушения компонентами среды.

Введение молекулы-шаблона (4-гидроксикумарина) в раствор БСА при pH 3,0 (стадия формирования ассоциата) вызывает резкое снижение относительной интенсивности флуоресценции белка, что служит прямым физико-химическим подтверждением связывания 4-гидроксикумарина вблизи остатков Trp.

Последующее подщелачивание раствора (стадия депротонирования, pH 8,0) приводит к дальнейшему снижению интенсивности флуоресценции БСА и

значительному батохромному сдвигу максимума спектральной полосы до 366 нм ($\Delta\lambda = 30$ нм). Наблюдаемый красный сдвиг обусловлен компактизацией белковой глобулы вокруг связанного лиганда по механизму индуцированного соответствия с частичной реорганизацией сольватного окружения, а также наложением собственной спектральной эмиссии депротонированной формы сорбированного 4-гидроксикумарина.

Ковалентная сшивка матрицы глутаровым альдегидом (стадия фиксации, рН 8,0) сопровождается значительным снижением интенсивности флуоресценции системы. Столь выраженный эффект деактивации возбужденных состояний объясняется протеканием реакции модификации свободных аминогрупп лизина с образованием конъюгированных иминогрупп (оснований Шиффа), выступающих акцепторами энергии флуоресценции триптофанилов по безызлучательному механизму [90,103].

Интенсивность сигнала очищенного ИБ (завершающий этап, после проведения диализа, рН 7,4) возрастает, а максимум эмиссии смещается в коротковолновую область, достигая максимума эмиссии нативного белка ($\lambda_{\text{исп.}} = 346$ нм). Данная регенерация спектрального отклика доказывает успешное вымывание молекул-шаблона и снятие эффекта статического тушения хроморофоров белковой матрицы при сохранении ковалентно зафиксированной архитектуры сформированных центров связывания.

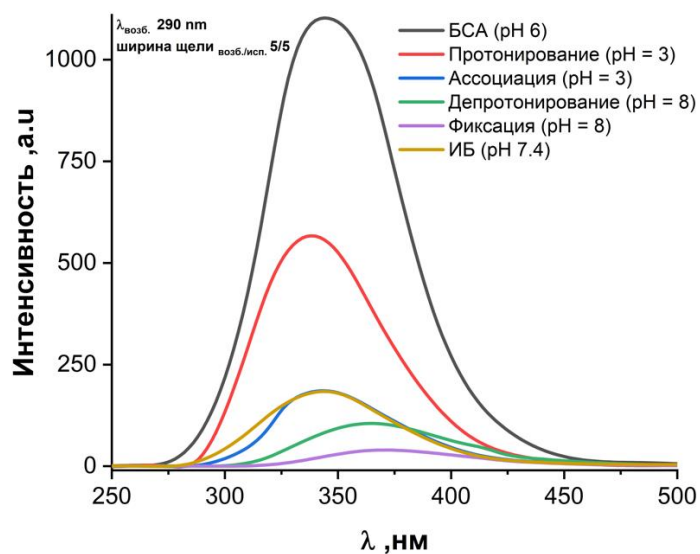


Рисунок 9. Спектры флуоресценции в системе БСА — 4-гидроксикумарин на ключевых этапах получения ИБ.

3.2.3. Хемометрический анализ данных трехмерной флуоресцентной спектроскопии

Одним из важнейших этапов получения ИБ является полное удаление молекул-шаблонов из белковой матрицы, поскольку глубина очистки полостей напрямую определяет ее сорбционную емкость [104]. Для решения этой задачи флуоресцентная спектроскопия обладает значительным потенциалом, обеспечивая не только мониторинг конформационных перестроек глобулы на этапах получения ИБ, но и прямой контроль полноты вымывания лиганда.

БСА ($\lambda_{\text{исп.}} \approx 346 \text{ nm}$) и 4-гидроксикумарин ($\lambda_{\text{исп.}} \approx 356 \text{ nm}$) характеризуются существенным перекрытием полос испускания. В связи с этим классическая флуоресцентная спектроскопия не позволяет надежно дифференцировать их сигналы. Более эффективным аналитическим инструментом выступает трехмерная флуоресцентная спектроскопия с регистрацией матриц возбуждения-испускания (ЕЕМ, excitation-emission matrix).

Тепловые карты ЕЕМ индивидуальных растворов БСА и 4-гидроксикумарина (ФСБ, 10 мМ, рН 7,4) демонстрируют выраженные спектральные различия (рис. 10 (а, б)). Трехмерный спектр свободного БСА

характеризуется областью излучения с максимумом при $\lambda_{\text{исп.}} = 346$ нм ($\lambda_{\text{возб.}} = 260\text{--}290$ нм) (рис. 10 (а)). В свою очередь, спектр 4-гидроксикумарина характеризуется широким диапазоном возбуждения ($\lambda_{\text{возб.}} = 220\text{--}320$ нм) с выраженным испусканием в интервале 350–375 нм (рис. 10 (б)). Различие спектральных профилей предполагает возможность мониторинга десорбции молекул-шаблонов из белковой матрицы в процессе диализа.

На тепловых картах ЕЕМ образцов ИБ до и после диализа наблюдается только один выраженный максимум испускания (рис. 10 (в, г)). Неочищенный образец до диализа характеризуется максимумом флуоресценции при $\lambda_{\text{исп.}} \approx 372$ нм ($\lambda_{\text{возб.}} \approx 300$ нм). Выраженный батохромный сдвиг максимума исходного образца по сравнению с индивидуальным белком ($\Delta\lambda_{\text{исп.}} \approx 26$ нм) в сочетании со значительным снижением интенсивности эмиссии (более чем в четыре раза) подтверждает формирование ассоциата между БСА, 4-гидроксикумарином и глутаровым альдегидом. После проведение 48-часовой диализной очистки максимум эмиссии образца возвращается в коротковолновую область ($\lambda_{\text{исп.}} \approx 347$ нм), приближаясь к параметрам индивидуального БСА (рис. 10 (г)). Аналогичная топология тепловых карт ЕЕМ регистрировалась и для контрольных образцов ИИБ.

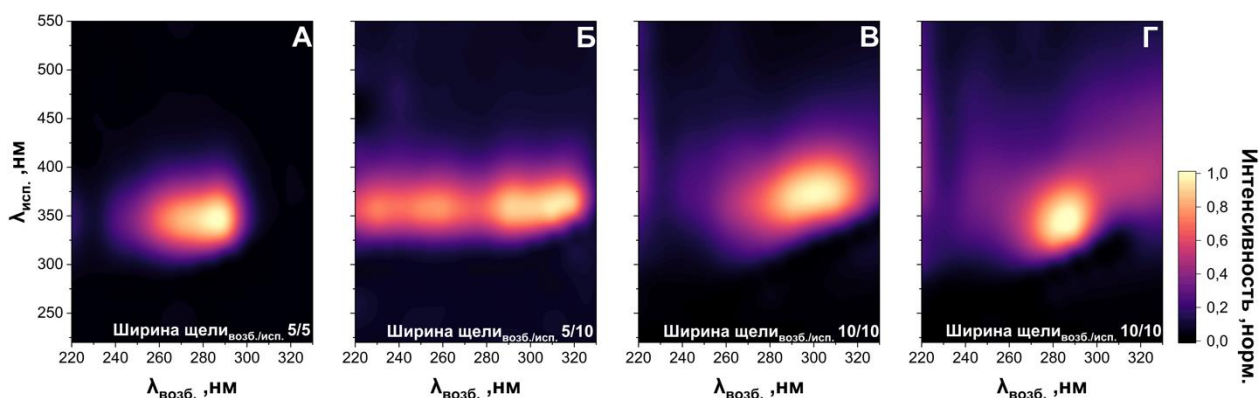


Рисунок 10. Трехмерные спектры флуоресценции для БСА (а), 4-гидроксикумарина (б) и ИБ до (в) и после (г) очистки.

Существенное спектральное перекрытие полос БСА и 4-гидроксикумарина в сочетании с преобладающим сигналом белка способно маскировать следовые количества неизвлеченных молекул-шаблонов. В связи с

этим для разделения спектральных сигналов и количественного контроля полноты очистки белковой матрицы впервые использовали многомерный хемометрический анализ трехмерных массивов ЕЕМ.

В работе использовали метод главных компонент (РСА), метод независимых компонент (ICA) [8, 13–19] и параллельный факторный анализ (PARAFAC) [20]. Метод РСА направлен на нахождение взаимно ортогональных направлений максимальной дисперсии исходных данных. Алгоритм ICA направлен на извлечение статистически независимых некоррелированных источниковых профилей индивидуальных компонентов (белок и молекула-шаблон) путем максимизации их негауссовости. Метод PARAFAC представляет собой прямое многомерное обобщение РСА на массивы более высокого порядка и реализует трилинейное разложение тензора без предварительного разворачивания матрицы. Фундаментальным преимуществом алгоритма PARAFAC перед билинейными методами (РСА и ICA), требующими предварительной развертки трехмерного массива ЕЕМ ($I \times J \times K$) в двумерную матрицу, является строгость математического аппарата (существует единственное решение). Благодаря этому PARAFAC восстанавливает истинные физико-химические индивидуальные профили компонентов без потери корреляции между длинами волн возбуждения и испускания [21].

Корректная предварительная обработка спектральных данных является одним из ключевых этапов для получения устойчивой и адекватной хемометрической модели. В исходных трехмерных спектральных массивах присутствуют интенсивные полосы рэлеевского рассеяния первого ($\lambda_{\text{исп.}} = \lambda_{\text{возб.}}$) и второго ($\lambda_{\text{исп.}} = 2\lambda_{\text{возб.}}$) порядков, а также рамановское рассеяние (рис. 11 (а)). Наличие подобных артефактов нарушает условие аддитивности оптических сигналов и препятствует корректному разложению. Для их устранения из спектральных массивов были удалены области рассеяния; минимальная анализируемая длина волны испускания превышала длину волны возбуждения не менее чем на 25 нм. В результате предобработки сформирован

скорректированный рабочий спектральный массив в диапазоне испускания $\lambda_{\text{исп.}}$ = 350–470 нм при возбуждении $\lambda_{\text{возб.}}$ = 220–330 нм (рис. 11 (б)).

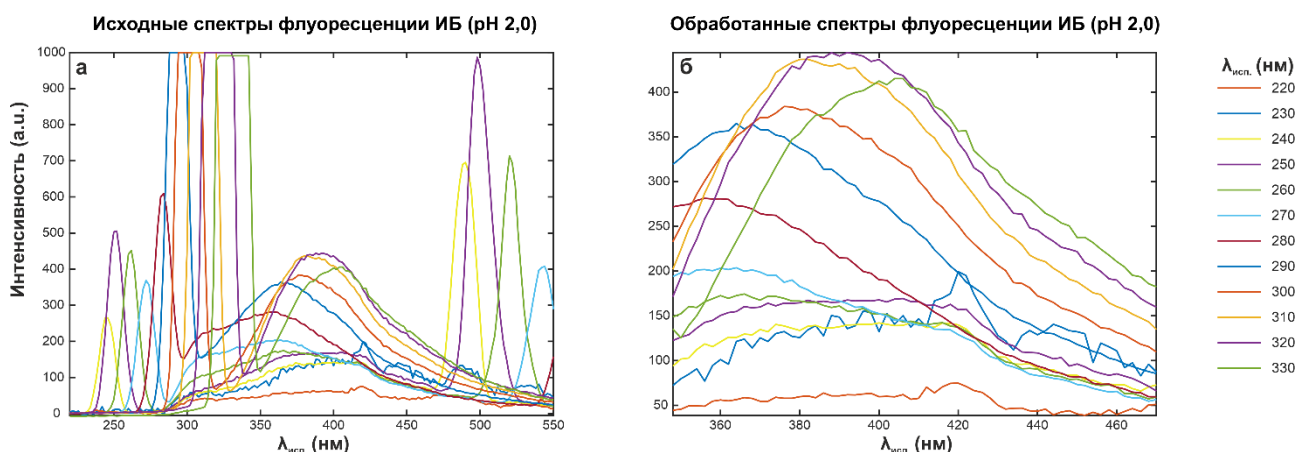


Рисунок 11. Трехмерные спектры флуоресценции ИБ (этап протонирования при pH 2,0) до (а) и после (б) предварительной обработки.

Билинейное разложение методом PCA

Двумерное разложение скорректированных спектральных массивов с помощью PCA показало, что первая главная компонента (ГК1) описывает обобщенный спектральный сигнал ассоциата БСА:4-гидроксикумарин, тогда как ГК2 коррелирует с собственной флуоресценцией белка. Значения счетов ГК1 и ГК2 монотонно возрастают с увеличением времени диализа (рис. 12), отражая высвобождение молекул-шаблонов из белковой матрицы. Третья главная компонента ГК3 не имеет прямого физико-химического смысла. При этом в контрольных образцах нИБ стабилизация счетов наблюдалась после 20 ч диализа.

Следует отметить, что алгоритм PCA не обеспечил математического разделения перекрывающихся спектров и не позволил выделить индивидуальный профиль 4-гидроксикумарина. В связи с этим применение линейного PCA для мониторинга очистки ИБ имеет ограниченный характер.

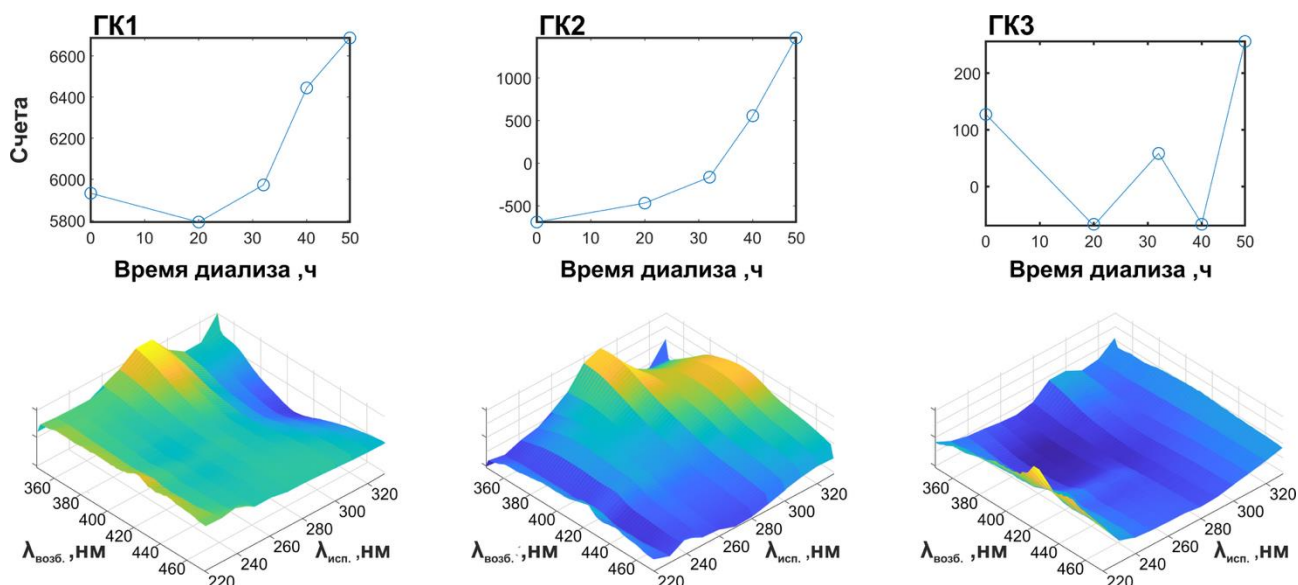


Рисунок 12. Результаты PCA: счета и нагрузки для ИБ (pH 2,0).

Билинейное разложение методом ICA

Для преодоления ограничений ортогонального базиса и разделения аддитивных сигналов использовали алгоритм ICA. Оптимальная размерность модели была установлена равной трем независимым компонентам (НК) на основе критерия Дарбина — Уотсона (*Приложение, Рис. 1 (а)*). Расчет проводили для объединенного массива развернутых двумерных матриц ЕЕМ, включающего кинетические серии диализа образцов ИБ, полученных при трех значениях pH на первом этапе импринтинга (pH 1,0, 2,0 и 3,0), а также контрольного образца НИБ (pH 3,0).

Выделенные независимые компоненты НК1 и НК2 описывают индивидуальные спектральные профили хромофоров: НК1 ($\lambda_{\text{возб.}}/\lambda_{\text{исп.}} \approx 290/350$ нм) воспроизводит собственную флуоресценцию альбумина, а НК2 ($\lambda_{\text{возб.}}/\lambda_{\text{исп.}} \approx 290\text{--}330/380\text{--}430$ нм) соответствует испусканию 4-гидроксикумарина (рис. 13).

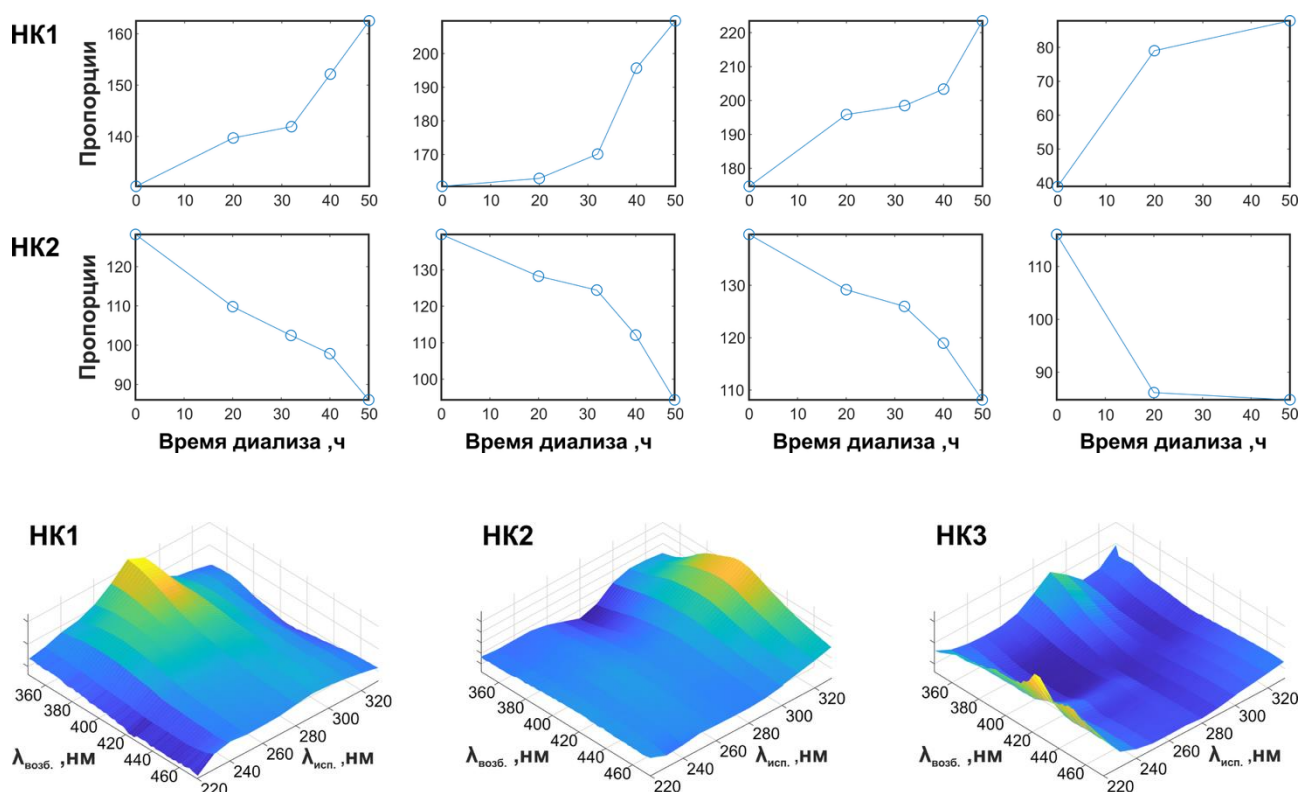


Рисунок 13. Результаты ICA: вклады НК1 и НК2 и нагрузки.

Анализ временных профилей относительных вкладов компонент позволил количественно охарактеризовать процесс очистки. Уменьшение доли компоненты молекулы-шаблона НК2 во времени отражает кинетику его десорбции в диализный буфер. Для образцов ИБ (рН 1,0) наблюдается наиболее выраженное падение сигнала НК2, приближающееся к базовой линии образца нИБ, что обусловлено слабым неспецифическим удерживанием молекул-шаблонов Е-формой альбумина и его быстрым вымыванием.

Напротив, в образцах ИБ (рН 3,0), где 4-гидроксикумарин локализован в специфических полостях, прочность связывания существенно выше: десорбция протекает медленнее, и к 50 часам диализа остаточный сигнал НК2 превышает контрольный уровень нИБ, что указывает на наличие связанных молекул-шаблонов, требующих более длительной очистки. Кинетический профиль образцов ИБ (рН 2,0) занимает промежуточное положение.

Трилинейное разложение методом PARAFAC

Наиболее строгим инструментом контроля очистки является метод трилинейного разложения PARAFAC. В соответствии с критерием консистентности ядра (Core Consistency Diagnostic > 85%) оптимальной принята трехфакторная модель (Приложение, Рис. 1 (б)).

Полученные трехмерные профили факторов разделяют вклад компонентов системы: Фактор 1 ($\lambda_{\text{возб.}}/\lambda_{\text{исп.}} \approx 290/350$ нм) соответствует индивидуальному спектру белковой матрицы БСА, Фактор 2 (с локальными максимумами $\lambda_{\text{возб.}}/\lambda_{\text{исп.}} \approx 250/390$ и $330/390$ нм) соответствует спектральному профилю 4-гидроксикумарина, Фактор 3 описывает остаточный аппаратный шум (рис. 14).

Кинетические зависимости счетов PARAFAC от времени диализа подтверждают тенденции, выявленные методом ИСА: во всех сериях образцов ИБ наблюдается падение фактора шаблона (Фактор 2) с одновременным ростом фактора белковой матрицы (Фактор 1). При этом активная фаза десорбции в образцах ИБ инициируется после 30 часов очистки.

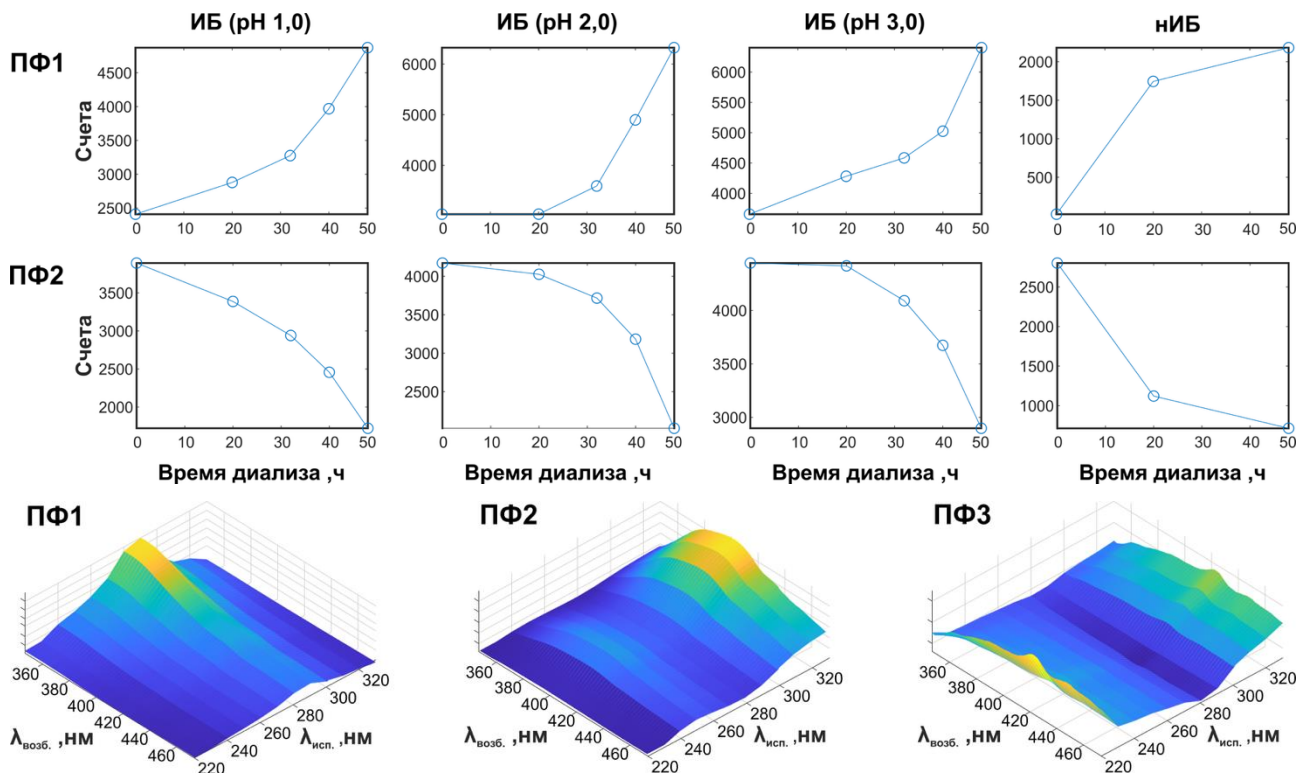


Рисунок 14. Результаты PARAFAC: счета ПФ1 и ПФ2 и факторы.

Сопоставление хемометрических подходов показывает высокую сходимость результатов моделей ICA и PARAFAC. Однако благодаря отсутствию вращательной неоднозначности и сохранению трехмерной геометрии спектральных массивов, алгоритм PARAFAC формирует физически однозначные спектральные профили индивидуальных соединений и является наиболее надежным и перспективным инструментом для аналитического мониторинга процесса очистки ИБ.

Заключение по главе 3

Комплексом физико-химических методов (метод динамического рассеяния света, спектроскопия кругового дихроизма, DOSY-ЯМР-спектроскопия, флуоресцентная спектроскопия) охарактеризовано поведение БСА в кислой среде (pH 3,0), характеризующееся сохранением элементов вторичной структуры (α -спиралей) при разворачивании третичной структуры и возрастании гидродинамического радиуса. На основании данных ИТК показана термодинамическая гетерогенность взаимодействия 4-гидроксикумарина с альбумином: установлено сосуществование высокоаффинных специфических центров связывания и центров неспецифической сорбции. Применение хемометрических алгоритмов (PCA, ICA, PARAFAC) к трехмерным спектрам флуоресценции позволило разделить спектральные сигналы белковой матрицы и молекулы-шаблона и обеспечить контроль полноты удаления молекул-шаблонов.

ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СИСТЕМЕ БСА — 4-ГИДРОКСИКУМАРИН

Материалы данной главы опубликованы в работах [89, 99, 105]. Вычислительные исследования (молекулярный докинг, молекулярная динамика и метадинамика), расчет свободной энергии связывания, сопоставление экспериментальных данных и результатов моделирования, а также формулировка научных выводов выполнены автором лично.

4.1. Структурно-динамические характеристики свободного БСА

БСА в водном растворе подвергается обратимым конформационным перестройкам при изменении pH среды, формируя ансамбль различных конформеров [38]. Отправной точкой для понимания молекулярных механизмов образования ИБ является детальное описание конформационного состояния белковой матрицы на начальном этапе получения ИБ – стадии протонирования в кислой среде (pH 3,0). Хотя каждый белок имеет оптимальный диапазон pH, при котором его связывающие свойства максимальны, мы рассмотрели условия первого этапа получения ИБ (pH 3,0), которые наиболее широко применяются в литературе. В связи с этим было проведено комплексное компьютерное моделирование структурно-динамических свойств БСА при pH 3,0.

Подготовка молекулярных систем

Протокол подготовки белковой глобулы состоял из двух этапов. Первый этап направлен на устранение дефектов кристаллографической структуры (добавлены недостающие атомы водорода и боковые цепи аминокислотных остатков, удалена кристаллизационная вода и буферные ионы), а второй – на воспроизведение условий pH среды. Коррекцию состояния протонирования выполняли с использованием алгоритма PROPKA [67]. Значения pK_a ионогенных групп в плотном белковом окружении сильно отличаются от табличных значений свободных аминокислот. Алгоритм PROPKA учитывает

локальную диэлектрическую проницаемость и водородные связи, корректно задавая протонирование остатков.

Оптимизацию геометрии лигандов выполняли методом теории функционала плотности DFT (функционал B3LYP, базис 6-31G*). Частичные атомные заряды рассчитывали по схеме фиттинга электростатического потенциала с ограничениями RESP (Restrained Electrostatic Potential), который напрямую согласован с параметризацией силовых полей семейства AMBER. Топологию лигандов (сопоставление типов атомов, геометрии и рассчитанных зарядов с параметрами силового поля общего назначения GAFF (General Amber Force Field)) генерировали с помощью пакета асрупе (Automated Topology Builder) [69]. Моделирование проводили в силовом поле AMBER99SB-ILDN. Модификация ILDN содержит скорректированные торсионные потенциалы для боковых цепей аминокислотных остатков Ile, Leu, Asp и Asn, что исключает артефактные конформационные искажения вторичной структуры и геометрии связывающих карманов при длительных симуляциях [68].

Классическая молекулярная динамика

Моделирование методом классической МД позволило получить детальную информацию о конформационном поведении БСА в кислой среде. При анализе траекторий наблюдали электростатически индуцированную частичную денатурацию, связанную со смещением молекулярных доменов относительно друг друга (рис. 15) [105]. В процессе МД-симуляции наблюдали увеличение расстояния между доменами 1 и 3, при этом область между доменом 2 и 3 действовала как шарнир. Полученные результаты согласуются с литературными данными [97,106,107], согласно которым частичное разворачивание БСА связано с увеличением среднего расстояния между доменами 1 и 3.

Вместе с тем реальные крупномасштабные конформационные перестройки макромолекулы в растворе происходят в масштабах сотен микросекунд, что недостижимо для стандартного МД-расчета. Большинство промежуточных конформационных состояний нестабильны, а их корректный анализ и

характеристика представляют собой трудную задачу [107]. Для преодоления временного масштаба симуляции и реконструкции полного профиля свободной энергии исследуемого перехода в данной работе впервые провели метадинамическое исследование разворачивания БСА в кислой среде.

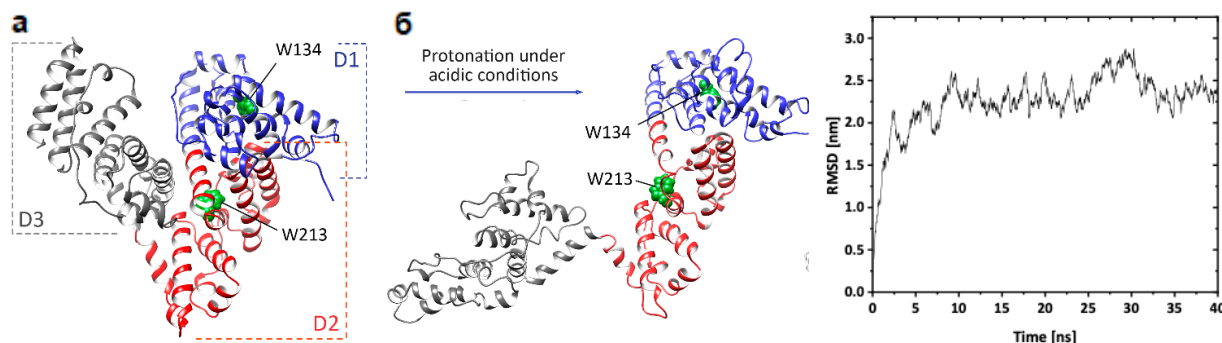


Рисунок 15. Модель БСА: кристаллографическая структура при pH 7,4 (PDB ID: 4F5S) (а), рассчитанная структура при pH 3,0 (б), среднеквадратичное отклонение (RMSD) системы в процессе МД-симуляции (в).

Реконструкция поверхности свободной энергии методом метадинамики

В методах ускоренного конформационного семплирования (enhanced sampling), в частности в метадинамике, к исходному гамильтониану молекулярной системы добавляется зависящий от времени потенциал смещения $V_{bias}(s, t)$, предназначенный для вывода системы из локальных энергетических минимумов и преодоления высоких активационных барьеров и, как следствие, ускорения исследования конформационного пространства.

На основе анализа траекторий классической МД был определен набор коллективных переменных, предназначенных для реконструкции поверхности свободной энергии. В качестве геометрических координат выбрали угол скручивания между доменами 2 и 3 и расстояние между центрами масс доменов 1 и 3 (рис. 16 (а, б)).

Для оценки конформационного ландшафта свободной структуры БСА провели моделирование методом Well-Tempered Multiple-Walker метадинамики. Стандартный протокол метадинамики вводит потенциал смещения в виде гауссианов постоянной высоты, что может приводить к артефактам избыточного

заполнения потенциальных ям (overfilling) и термодинамически некорректной денатурации макромолекулы [108]. Протокол Well-Tempered, в свою очередь, реализует адаптивное уменьшение амплитуды добавляемых гауссовых потенциалов по мере накопления энергии смещения в исследуемой области конформационного пространства [109]. Это обеспечивает строгую сходимость рассчитываемого профиля свободной энергии. Применение протокола Multiple-Walker с шестью параллельными независимыми траекториями (walkers) [110] позволило существенно ускорить сходимость расчета и преодолеть энергетические барьеры конформационных переходов благодаря одновременному семплированию различных областей конфигурационного пространства и формированию единого кумулятивного потенциала смещения.

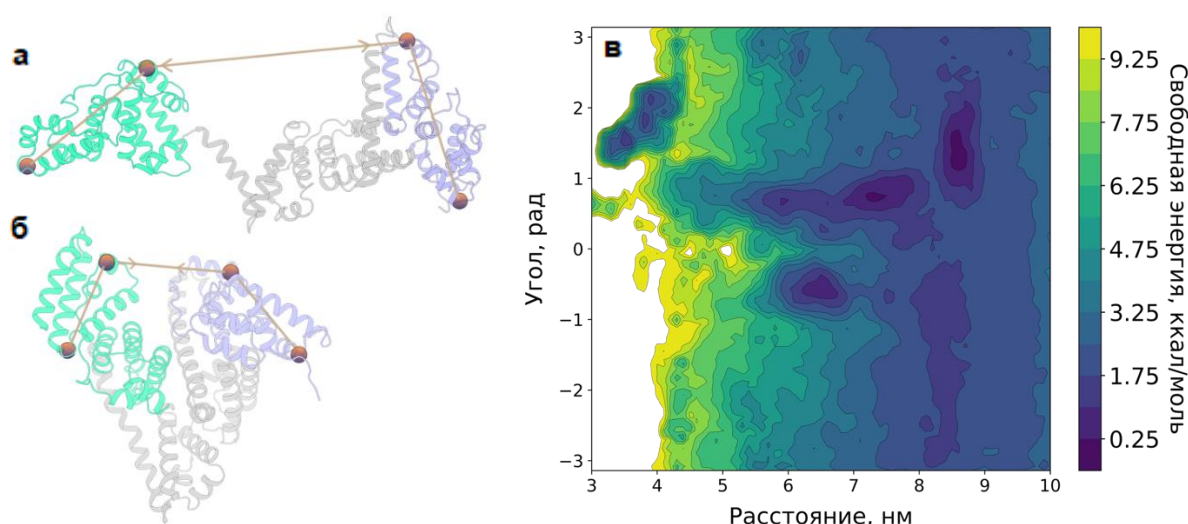


Рисунок 16. Результаты метадинамической симуляции БСА (pH 3,0): структура в основном энергетическом минимуме (а), нативная структура (б) и карта свободной энергии системы (в). Протокол симуляции: Well-Tempered Multiple-Walker Metadynamics, amber99sb-ildn, время симуляции 9 мкс (6 walkers, 1,5 мкс на каждый).

Реконструированная поверхность свободной энергии демонстрирует сложный рельеф с наличием трех выраженных локальных минимумов, соответствующих ансамблю метастабильных конформационных состояний (рис. 16 (в)). Активационный барьер перехода из нативного состояния в частично

развернутую конформацию характеризуется энергетическим барьером равным 5,85 ккал/моль, что свидетельствует о термодинамической доступности данной формы при комнатной температуре.

Для количественной валидации построенных моделей было проведено прямое сопоставление расчетных структурно-динамических параметров БСА с данными физико-химических экспериментов (табл. 5).

Таблица 5. Зависимость характеристик БСА от pH

pH	ζ - потенциал ^а , мВ	Заряд	Содержание α - спиральной структуры, %			R_h^a , нм	SASA ^б , нм ²	
		Модель	Модель	Эксп. ^в		Общая	Trp-134	Trp-213
7,4	-10	-9	67	69	4,7	285	11	37
3,0	+15	+99	55	55	5,8	336	41	86

Примечания:

а — на основе данных динамического и электрофоретического рассеяния света;

б — площадь поверхности, доступной растворителю;

в — на основе данных спектроскопии кругового дихроизма.

Сопоставление геометрических параметров конформации, соответствующей основному энергетическому минимуму, показало, что в кислой среде (pH 3,0) молекула БСА переходит в частично развернутое состояние без признаков полной линеаризации молекулы. Разделение доменов и частичное разворачивание белкового остова приводят к существенному увеличению площади поверхности, доступной для растворителя (SASA — Solvent-Accessible Surface Area), с 285 нм² при pH 7,4 до 336 нм² при pH 3,0 (табл. 5). При этом увеличение междоменного расстояния сопровождается изменением угла взаимного разворота доменов, что создает предпосылки для эффективного связывания молекул-шаблонов. Разделение доменов при сохранении компактности отдельных субдоменов формирует топологически доступные расширенные связывающие полости, что создает оптимальные геометрические предпосылки для координации молекул 4-гидроксикумарина.

Следует отметить, что не все белки изменяют свою конформацию в аналогичных условиях. Многие макромолекулы в аналогичных условиях

обладают более жестким каркасом и не проявляют выраженного изменения конформации в отличие от БСА. В связи с этим использование кислой среды для разворачивания белковой глобулы не является универсальным при получении ИБ и может оказаться избыточным или неэффективным. В качестве альтернативного фактора для обеспечения обратимого разворачивания белковой глобулы может выступать контролируемое температурное воздействие.

4.2. Взаимодействия в системе БСА — 4-гидроксикумарин

На основе конформационного состояния БСА, отвечающего минимуму свободной энергии, провели исследование взаимодействий в системе БСА — 4-гидроксикумарин. Идентификация потенциальных сайтов связывания по всей поверхности белковой матрицы при pH 3,0 осуществлялась с использованием протокола слепого докинга (blind docking). Дополнительно анализ полостей и валидацию сайтов проводили с помощью программного модуля SiteMap и генеративной нейросетевой модели лиганд-белковых комплексов Boltz-2. По результатам моделирования на поверхности частично развернутого БСА выявили шесть потенциальных сайтов связывания (рис. 17 (а)).

Для оценки устойчивости и эффективности удерживания лигандов в каждом из найденных сайтов связывания проведена МД-симуляция (время симуляции 300 нс). Установлено, что стабильное удерживание молекул 4-гидроксикумарина в течение всей расчетной траектории сохраняется только в двух потенциальных сайтах связывания (рис. 17 (а, б)): в кармане Судлоу II (субдомен IIIA) и сайте связывания жирных кислот FA5. Ассоциация в сайте Судлоу II стабилизирована взаимодействием с Glu441 и π -катионными контактами с Lys388 и Arg444, тогда как в сайте FA5 удерживание лиганда определяется преимущественно гидрофобным окружением остатка Pro57 (табл. 6). Полученные результаты согласуются с энтропийным характером связывания по данным ИТК (раздел 3.1.1.). Молекулы из остальных четырех полостей десорбируются и переходят в объем растворителя после 150 нс МД-симуляции. Наблюдаемые конформационные различия между свободной и связанной

формами БСА обусловлены взаимодействием с молекулами-шаблонами по механизму индуцированного соответствия, оптимизирующим пространственную и электростатическую комплементарность.

Следующим этапом процесса импринтинга является перевод системы в щелочную среду (pH 9,0) для химической фиксации глобулы глутаровым альдегидом. Депротонирование ионогенных групп значительно меняет электростатический ландшафт белковой матрицы и может приводить к дестабилизации исходных ассоциатов белок:молекула-шаблон и формированию альтернативных сайтов связывания. Однако последующее МД-моделирование подтвердило устойчивость обоих сайтов, сформированных на первом этапе (pH 3,0), при сдвиге pH в щелочную область (pH 9,0) (рис. 17 (а, в)).

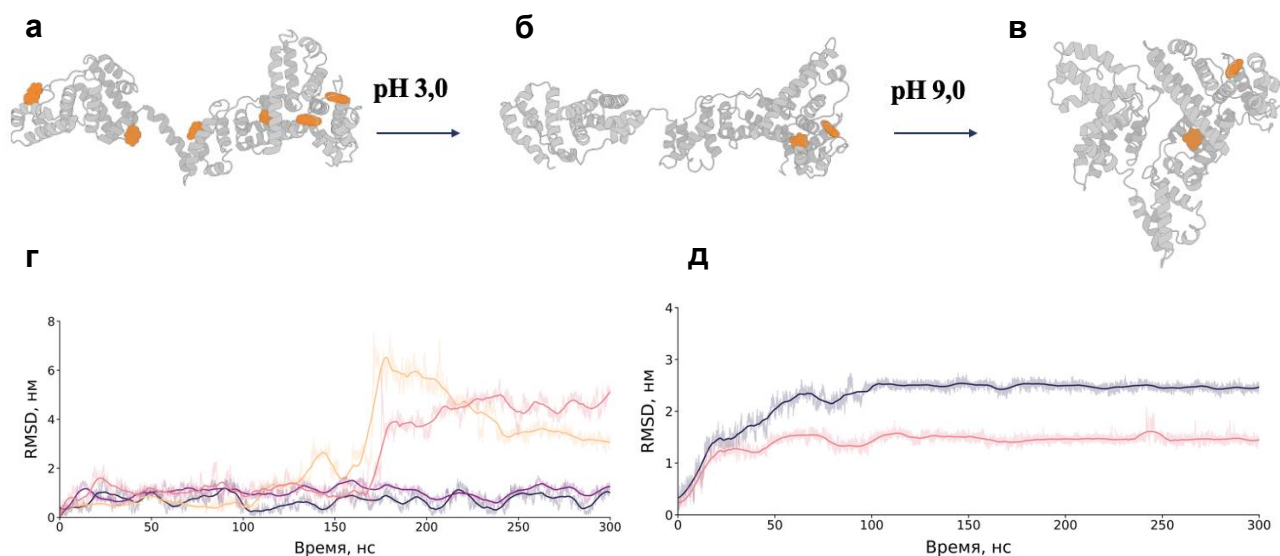


Рисунок 17. Модель ассоциата БСА:4-гидроксикумарин: структура, полученная методом молекулярного докинга при pH 3,0 (а), стабильная структура после МД-моделирования при pH 3,0 (б), стабильная структура после МД-моделирования при переходе в pH 9,0 (в), среднеквадратичное отклонение лигандов в процессе МД-симуляций (г, д). Лиганды 5 и 6 не представлены из-за высоких значений RMSD (более 40 нм). Протокол: МД-симуляция, amber99sb-ildn, время симуляции 300 нс.

Для выявления дополнительных центров координации молекул-шаблонов при pH 9,0 проведено моделирование методом слепого докинга. Анализ результатов моделирования показал наличие четырех дополнительных

потенциальных сайтов связывания на поверхности БСА: в полостях Судлоу I, FA1, FA2 и FA6 (табл. 6), что суммарно с сайтами Судлоу II и FA5 составляет шесть центров связывания (рис. 18 (а)). Ионизация 4-гидроксикумарина способствует формированию прочной сети водородных связей и электростатических контактов, дополнительно стабилизируемых π - π -стэкингом с ароматическими аминокислотными остатками (табл. 6). Анализ МД-траекторий подтвердил, что в щелочной среде (рН 9,0) молекулы 4-гидроксикумарина стабильно удерживаются во всех шести центрах на протяжении всего времени симуляции (рис. 18 (б–в)). Таким образом, в условиях импринтинга белка формируется устойчивый ассоциат БСА:4-гидроксикумарин состава 1:6.

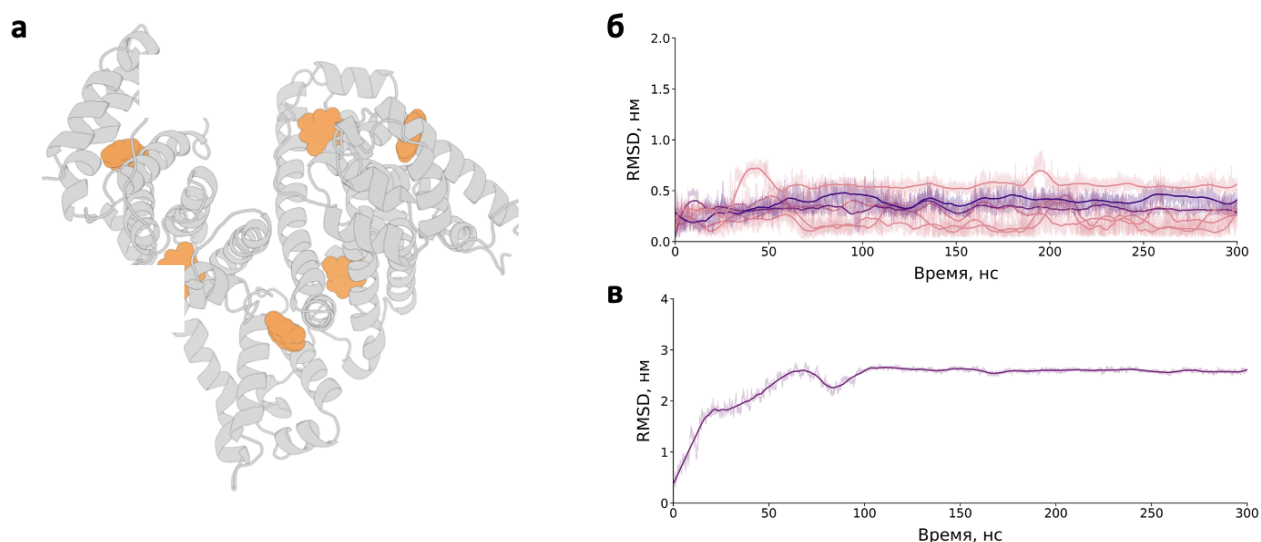


Рисунок 18. МД-симуляция процесса ассоциации БСА — 4-гидроксикумарин при рН 9,0: стабильная структура ассоциата (а), среднеквадратичное отклонение лигандов в процессе симуляции (б), среднеквадратичное отклонение α -субъединиц БСА в процессе симуляции (в).

Таблица 6. Параметры связывания БСА с 4-гидроксикумарином

pH	Функциональные аминокислоты	$\Delta G_{MM/GBSA}^a$, ккал/моль	Сайты БСА	Преобладающий тип взаимодействий	Данные ИТК
3,0	1: Glu441, π -катион (Lys388, Arg444)	-21	Судлоу II	Гидрофобные	$\Delta H_B > 0$
	2: Pro57	-20	FA5		$\Delta S_B > 0$ $n = 1,6 \pm 0,5$
9,0	3: Glu351, Thr355, π - π -стэкинг (Phe329)	-38	FA6	Электростатические и водородные связи	$\Delta H_B < 0$
	4: Tyr149, Arg256	-31	Судлоу I		$\Delta S_B > 0$
	5: Leu42, π - π -стэкинг (Phe27)	-39	FA1		$n = 4,9 \pm 0,2$
	6: Gln29, Asp107, π - π -стэкинг (Tyr30, Tyr147)	-40	FA2		

Примечания:

а — относительное сродство связывания, рассчитанное в континуальном растворителе без учета энтропии.

4.3. Сопоставление экспериментальных характеристик и результатов моделирования

Сопоставление экспериментальных характеристик, полученных методом ИТК, и результатов полноатомного моделирования ключевых этапов получения ИБ (табл. 6) позволило выявить следующие физико-химические закономерности:

(1) Стадия протонирования (pH 3,0): взаимодействие 4-гидроксикумарина с частично развернутой формой БСА является самопроизвольным ($\Delta G_B < 0$), эндотермическим ($\Delta H_B > 0$) процессом, контролируемым энтропийным фактором ($\Delta S_B > 0$), и характеризуется формированием первичных ассоциатов БСА:4-гидроксикумарин состава 1:1 или 1:2. Результаты моделирования подтверждают, что в незаряженном состоянии молекулы 4-гидроксикумарина связываются в раскрывшихся гидрофобных полостях белка (сайт Судлоу II и сайт FA5). Движущей силой процесса выступает десольватация гидрофобных полостей и выигрыш энтропии за счет вытеснения упорядоченных молекул воды в объем растворителя.

(2) Сдвиг pH в щелочную область (стадия сшивки, pH 9,0) сопровождается сменой термодинамического режима: связывание является самопроизвольным ($\Delta G_B < 0$) экзотермическим процессом ($\Delta H_B < 0$) и характеризуется формированием ассоциата БСА:4-гидроксикумарин состава 1:5, согласно

данным ИТК. Полноатомное моделирование объясняет данный переход: первичный ассоциат сохраняет координацию лигандов в сайтах Судлоу II и FA5, а депротонирование 4-гидроксикумарина и компактизация белковой глобулы индуцируют заселение четырех дополнительных центров (Судлоу I, FA1, FA2, FA6) за счет направленных водородных связей, электростатических взаимодействий и π - π стэкинга. Суммарное число устойчивых специфических центров связывания достигает шести.

Таким образом, предварительное подкисление среды изменяет пространственную архитектуру белка и задает вектор направленной самосборки центров связывания при последующем переводе системы в щелочную среду. Движущей силой увеличения степени извлечения является не генерация принципиально новых полостей, а достижение предельной заселенности предсуществующих сайтов связывания и оптимизация их геометрической комплементарности форме целевой молекулы за счет последовательного изменения условий в процессе импринтинга.

Взаимосвязь между сигналом флуоресценции и структурой ассоциата БСА:4-гидроксикумарин

Собственная флуоресценция БСА определяется двумя остатками Trp: Trp-134, локализованным в субдомене IV на внешней гидрофильной поверхности белковой глобулы, и Trp-213, расположенным в гидрофобном кармане субдомена IIА (сайт Судлоу I). Для установления взаимосвязи между флуоресцентным сигналом и пространственной перестройкой белковой матрицы проведено сопоставление данных флуоресценции и рассчитанной SASA для индивидуальных ключевых хромофоров (табл. 5).

Сопоставление оптических характеристик и расчетных параметров на ключевых стадиях получения ИБ позволило выявить следующие закономерности:

(1) Стадия протонирования (рН 3,0): переход БСА в частично развернутую конформацию сопровождается падением интенсивности и выраженным

гипсохромным сдвигом максимума флуоресценции ($\Delta\lambda = 10$ нм) (рис. 9). Физико-химический механизм процесса обусловлен частичным разворачиванием белковой глобулы (возрастание R_h с 4,70 до 5,75 нм и общей SASA с 285 до 336 нм², табл. 5) за счет внутримолекулярного кулоновского отталкивания (суммарный расчетный заряд +99, ζ -потенциал +15,3 мВ). Снижение интенсивности флуоресценции обусловлено увеличением доступности хромофоров для растворителя (рост SASA для индивидуальных остатков Trp, табл. 5), что активирует тушение сигнала компонентами среды. В свою очередь, гипсохромный сдвиг максимума обусловлен усилением стерической фиксации хромофоров ввиду стремления близлежащих аминокислотных остатков экранировать их от растворителя.

(2) Стадия ассоциации с молекулами-шаблонами (pH 3,0): введение 4-гидроксикумарина в систему вызывает выраженное снижение интенсивности сигнала флуоресценции (рис. 9). В кислых условиях 4-гидроксикумарин находится преимущественно в нейтральной молекулярной форме ($pK_a = 4,4$), что способствует его эффективному внедрению в раскрывающиеся гидрофобные полости матрицы. По данным полноатомного моделирования, стабильное первичное связывание происходит в полостях Судлоу II и FA5 (табл. 6), координация лиганда вблизи Trp-213 инициирует контактное тушение хромофора и снижение сигнала флуоресценции. Это подтверждает термодинамические данные ИТК о протекании первичного формирования ассоциата в условиях десольватации гидрофобных полостей под контролем энтропии ($\Delta H_B > 0$ и $\Delta S_B > 0$, табл. 6).

(3) Сдвиг pH в щелочную область (стадия сшивки, pH 9,0): сопровождается снижением интенсивности флуоресценции и выраженным батохромным смещением максимума (рис. 9). В этих условиях ионизация 4-гидроксикумарина (переход в анионную форму) и депротонирование аминокислотных остатков белковой глобулы сопровождаются сворачиванием белка по механизму индуцированного соответствия. Связывание переходит под контроль энтальпии ($\Delta H_B < 0$ и $\Delta S_B > 0$, табл. 6), обусловленный заполнением четырех

дополнительных центров связывания (Судлоу I, FA1, FA2, FA6) посредством образования сети водородных связей, электростатических и π -катионных контактов (табл. 6). Ковалентная фиксация глутаровым альдегидом жестко стабилизирует геометрию центров координации, а тушение флуоресценции обеспечивается безызлучательным резонансным переносом энергии на образующиеся азометиновые связи (основания Шиффа).

(4) Сохранение молекулярной памяти (стадия очистки): проведение исчерпывающего диализа и перевод белковой матрицы в нейтральный буфер (ФСБ, pH 7,4) сопровождаются частичным восстановлением интенсивности флуоресценции с возвратом максимума к длине волны нативного альбумина ($\lambda_{\text{исп.}} = 346$ нм, рис. 9). Данный спектральный отклик подтверждает успешное вымывание молекул-шаблонов и устранение эффекта статического тушения хромофоров. При этом отсутствие полного возврата интенсивности к уровню исходного БСА доказывает, что ковалентно сшитая белковая матрица необратимо зафиксирована, сохраняет архитектуру сформированных полостей и топологический доступ растворителя к центрам распознавания.

Взаимосвязь между рассчитанным числом сайтов связывания и степенью извлечения

Выбор оптимального соотношения компонентов при получении ИБ имеет ключевое значение для достижения высоких сорбционных характеристик получаемых материалов [5]. Для перехода от фундаментального описания модельной системы к формулированию практических рекомендаций по оптимизации условий получения ИБ важно определить параметры, на основе которых можно сделать вывод о том, будет ли данный ИБ эффективно распознавать целевую молекулу. Для МИП в качестве основного критерия используют сродство функционального мономера к молекуле-шаблону [111]. Для ИБ данный методологический базис требует обязательного учета природы межмолекулярных нековалентных взаимодействий и общего числа формируемых специфических центров связывания.

Данный факт позволил выдвинуть предположение, что рассчитанное число высокоаффинных сайтов связывания может выступать фундаментальным прогностическим критерием для определения оптимального молярного соотношения белок:молекула-шаблон.

Для экспериментальной проверки данной гипотезы исследовали зависимость степени извлечения 4-гидроксикумарина импринтированным БСА, иммобилизованным на микротитровальном планшете, от исходного молярного соотношения БСА:4-гидроксикумарин (рис. 19) [112]. Зависимость степени извлечения 4-гидроксикумарина носит нелинейный характер. В диапазоне соотношений от 1:0 до 1:4 сорбция практически не превышает уровень неспецифического фона нИБ (11–12%). При соотношении 1:6, соответствующем рассчитанному числу специфических полостей, степень извлечения возрастает незначительно. Дальнейшее увеличение содержания молекул-шаблонов (1:8 и 1:16) сопровождается монотонным ростом степени извлечения до 19% и 28% соответственно. Критический скачок степени извлечения с выходом на плато (47–48%) наблюдается при достижении молярного соотношения БСА:4-гидроксикумарин, равного 1:30. Последующее увеличение избытка молекул-шаблонов до 1:32 не приводит к выраженному приросту аналитического сигнала, что свидетельствует о достижении термодинамического предела емкости рецепторных центров.

С физико-химической точки зрения резкое различие между рассчитанным числом специфических центров связывания (шесть) и оптимальным соотношением (1:30) объясняется данными ИТК (раздел 3.2.3, табл. 4). Помимо пяти высокоаффинных центров, макромолекула альбумина содержит порядка 10 низкоаффинных поверхностных центров связывания (согласно данным ИТК). При рассчитанном соотношении БСА:4-гидроксикумарин, равном 1:6, свободные молекулы-шаблоны в растворе распределяются между специфическими полостями и внешними неспецифическими участками белковой глобулы, вследствие чего целевые карманы оказываются заселены лишь частично.

Введение пятикратного молярного избытка молекул-шаблонов по отношению к числу рассчитанных сайтов связывания смещает химическое равновесие в растворе в сторону практически полной заселенности высокоаффинных сайтов (Судлоу I, Судлоу II, FA1, FA2, FA5, FA6; рис. 18 (а)). Последующая ковалентная сшивка глутаровым альдегидом фиксирует предельно насыщенную конформацию белковой матрицы, что и обеспечивает скачкообразный рост степени извлечения 4-гидроксикумарина.

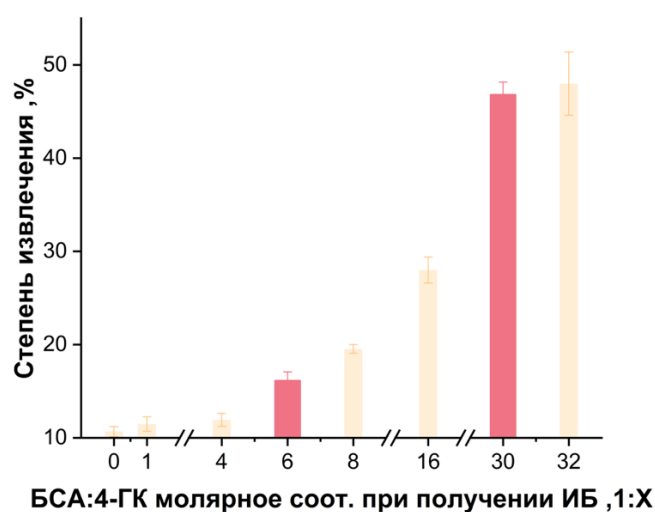


Рисунок 19. Зависимость степени извлечения от молярного соотношения белок:молекула-шаблон в процессе получения ИБ.

Таким образом, сопоставление экспериментальных данных и результатов полноатомного моделирования позволило сформулировать эмпирическое правило: для достижения высоких сорбционных характеристик ИБ требуется использовать как минимум пятикратный молярный избыток молекул-шаблонов по отношению к рассчитанному числу специфических сайтов связывания. С целью подтверждения работоспособности разработанного подхода на следующем этапе работы была проведена его апробация на расширенном круге соединений.

Заключение по главе 4

Методами вычислительного молекулярного моделирования построена модель конформационной адаптации БСА и формирования рецепторных

центров при импринтинге 4-гидроксикумарина. Показано, что использование кислых на первом этапе импринтинга способствует росту сорбционных характеристик (степени извлечения) ИБ за счет возможности полной заселенности сайтов связывания и улучшения их геометрической комплементарности. Реконструкция энергетического ландшафта методом метадинамики подтвердила разворачивание БСА при pH 3,0 с раскрытием гидрофобных полостей матрицы. Методами молекулярного докинга и МД показали, что в кислых условиях (pH 3,0) частично развернутая форма БСА стабильно координирует 2 молекулы-шаблона (сайты Судлоу II и FA5), тогда как последующий перевод системы в щелочную среду (pH 9,0) дополнительно координирует 4 молекулы-шаблона (сайты Судлоу I, FA1, FA2 и FA6). В результате формируется ассоциат БСА:4-гидроксикумарин состава 1:6. Сопоставление рассчитанного числа сайтов связывания (шесть) с экспериментальной зависимостью степени извлечения легло в основу формулировки гипотезы об оптимальном молярном соотношении компонентов при получении ИБ: для успешного импринтинга необходимо использование как минимум пятикратного молярного избытка молекул-шаблонов относительно рассчитанного числа сайтов связывания.

ГЛАВА 5. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ИМПРИНТИРОВАННЫХ БЕЛКОВ

Материалы данной главы опубликованы в работах [105, 111, 115, 116]. Вычислительный скрининг сайтов связывания методом слепого докинга, оценка стабильности ассоциатов методом молекулярной динамики, формулировка гипотезы об оптимальном молярном соотношении, теоретическое обоснование возможности использования фиктивных молекул-шаблонов, а также обобщение результатов выполнены автором лично. Экспериментальная оценка степени извлечения соединений проведена при участии соавторов опубликованных работ.

Для оценки работоспособности разработанного вычислительного подхода проведено исследование расширенного ряда низкомолекулярных соединений (молекул-шаблонов) различной природы ($n = 7$), который включал микотоксины и биологически активные вещества (зеараленон, дезоксиниваленол, афлатоксин B₁), изофлавоны (квакхурин), имидазолиноновый гербицид (имазамокс), а также аминокислоту L-аргинин и конъюгат L-аргинин-анилин. Структурные формулы исследованных соединений приведены на рис. 20.

Исследование включало два последовательных этапа: (1) ретроспективный анализ ранее опубликованных экспериментальных протоколов получения ИБ на основе БСА с целью установления взаимосвязи между структурными параметрами и аналитической эффективностью систем (степень извлечения); (2) проспективное прогнозирование оптимального молярного соотношения белок:молекула-шаблон с последующей экспериментальной верификацией сорбционной способности получаемых материалов.

Разработка эффективных методик получения ИБ требует баланса между точностью теоретического описания интересующего процесса, требуемой компьютерной мощностью и временными затратами на подготовку к эксперименту. Для оптимизации временных и вычислительных затрат при

переходе к расширенному ряду молекул-шаблонов использовали ступенчатый дифференцированный протокол:

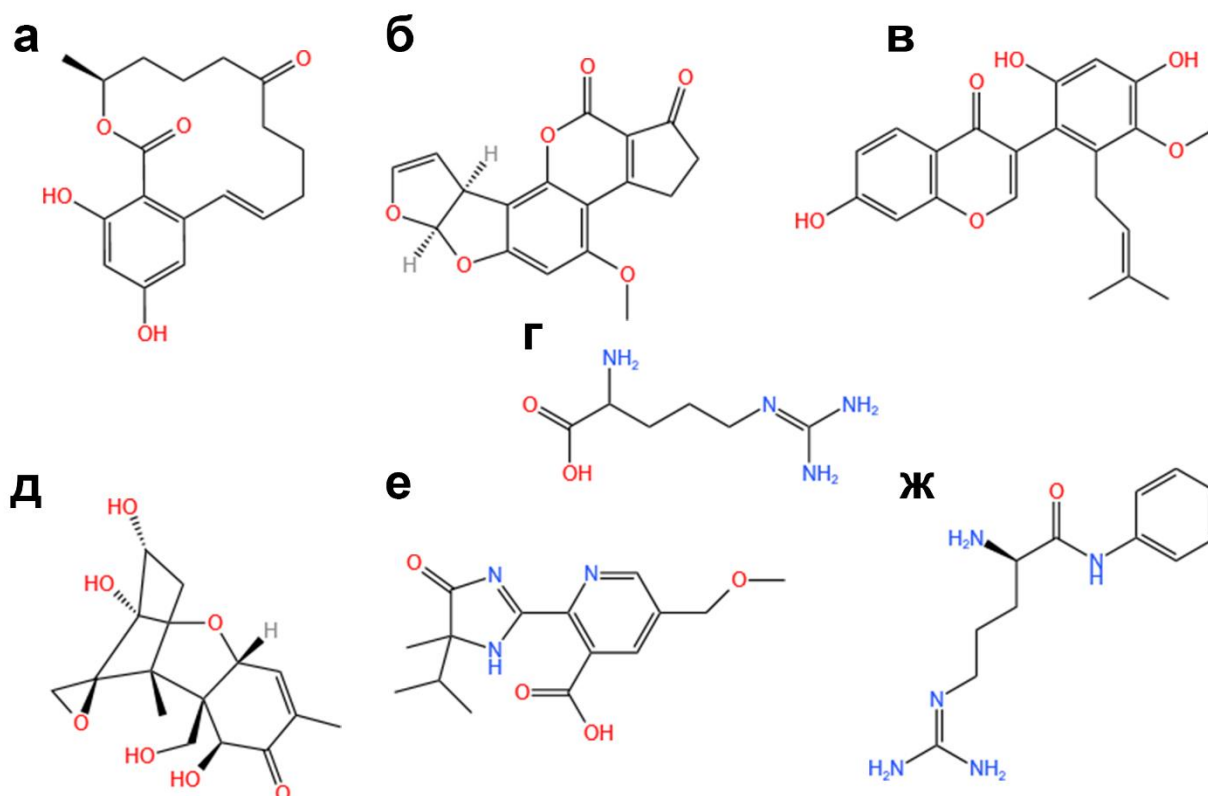


Рисунок 20. Структуры исследуемых молекул-шаблонов: зеараленон (а), дезоксиниваленол (б), афлатоксин Б1 (в), квакхурин (г), имазамокс (д), L-аргинин (е), L-аргинин-анилин (ж).

– Для ретроспективного анализа применяли упрощенный протокол, сочетающий первичное картирование сайтов связывания методом слепого докинга при рН 3,0 с последующей оценкой динамической стабильности ассоциатов методом классической МД. Проведение МД-симуляций на данном этапе методически необходимо для количественной дискриминации стабильно удерживаемых молекул от неустойчиво координированных лигандов и установления числа устойчивых специфических полостей.

– Для проспективного анализа использовали прикладной экспресс-протокол, основанный на оценке доступных полостей методом слепого докинга при рН 3,0 без привлечения МД-расчетов. Данный подход ориентирован на быстрое прогнозирование условий получения ИБ в аналитических лабораториях и позволяет

быстро рассчитать требуемый избыток молекул-шаблонов без привлечения ресурсоемких компьютерных вычислений.

5.1. Ретроспективный анализ систем БСА — молекула-шаблон

Система БСА — зеараленон

Зеараленон – дифенольное соединение ($pK_a = 7,62$), которое при pH 3,0 присутствует в растворе в основном в нейтральной форме, а при переходе к щелочным условиям среды (pH 9,0) переходит в форму фенолят-аниона.

Результаты молекулярного докинга показали, что для молекул зеараленона существует пять потенциальных сайтов связывания на поверхности БСА как при pH 7,4, так и при pH 3,0 (*Приложение, Табл. 1*). Анализ расчетных МД-траекторий (100 нс) подтвердил кинетическую стабильность всех сформированных центров: молекулы-шаблоны не покидают потенциальные сайты связывания в течение всей симуляции, претерпевая незначительные конформационные перестройки (*Приложение, Рис. 2*). Установлено, что координация зеараленона в кислых условиях (pH 3,0) осуществляется преимущественно за счет контактов с остатками лизина, тогда как при pH 7,4 возрастает вклад электростатических контактов с остатками аргинина. Несмотря на неизменность общего числа центров связывания (пять), их расположение изменяется: в условиях кислого pH наблюдается перераспределение сайтов связывания в пользу субдоменов домена III за счет раскрытия гидрофобных щелей белкового остова. (*Приложение, Табл. 1*).

Согласно экспериментальным данным [5], зависимость степени извлечения зеараленона от исходного молярного соотношения компонентов при получении ИБ носит нелинейный характер и достигает плато сорбции (~75%) при молярном соотношении БСА:зеараленон равном 1:24 (рис. 21).

Сопоставление результатов молекулярного моделирования с экспериментальными данными подтверждает выдвинутую гипотезу. Для выявленного числа специфических полостей связывания (пять) рассчитанное оптимальное молярное соотношение составляет 1:25. Хорошее совпадение

экспериментального (1:24) и рассчитанного (1:25) значений подтверждает необходимость пятикратного молярного избытка молекул-шаблонов относительно рассчитанного числа сайтов связывания для компенсации неспецифического связывания на поверхности белка и достижения высокой заселенности рецепторных центров.

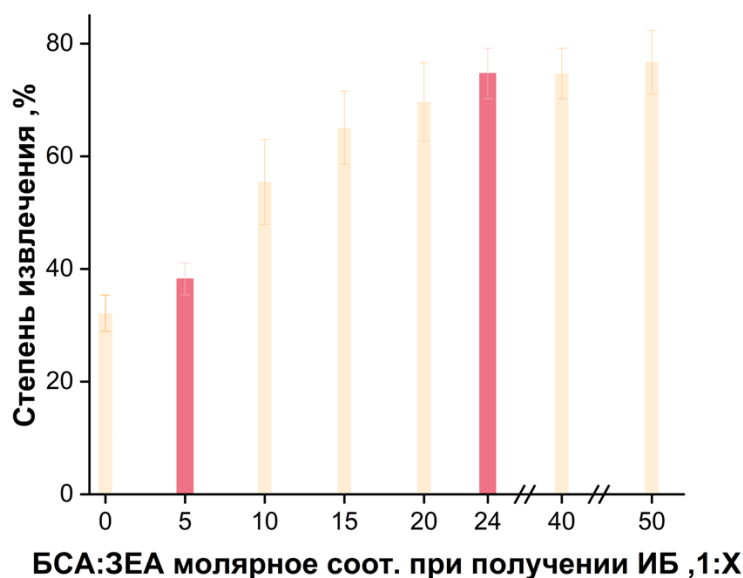


Рисунок 21. Зависимость степени извлечения от молярного соотношения БСА:зеараленон при получении ИБ [5].

Системы БСА — афлатоксин B1 и БСА — квакхурин

В литературе описаны примеры получения биорецепторов на основе БСА для определения афлатоксина B1 [3] и изофлавоноида квакхурина [113]. В обоих исследованиях авторам не удалось получить материалы с удовлетворительными сорбционными свойствами в исследованных концентрационных диапазонах. Причиной этого может являться недостаточная эффективность реализованного протокола импринтинга и отсутствие селективного распознавания.

Анализ экспериментальных методик [3,113] показал, что получение ИБ проводили при исходном молярном соотношении БСА:молекула-шаблон, равном 3:1 (что эквивалентно 1:0,33 молекул). Иными словами, синтез осуществлялся в условиях существенного дефицита молекул-шаблонов в реакционной среде.

Для установления причин отрицательного результата с позиций развиваемого вычислительного подхода было проведено моделирование взаимодействия БСА с афлатоксином B1 и квакхурином методом молекулярного докинга в кислой среде (pH 3,0). По результатам молекулярного докинга выявили десять потенциальных полостей связывания для молекул афлатоксина B1 и семь – для молекул квакхурина (*Приложение, Табл. 1, Рис. 2, 3*). Оба лиганда формируют ряд стабильных межмолекулярных контактов с белком. При этом молекулы афлатоксина B1 преимущественно взаимодействуют с катионогенными остатками Arg и Lys в сочетании с гидрофобными контактами с Leu и Val, а молекулы квакхурина координируются остатками Arg, Asn и Phe.

На основании рассчитанного числа специфических сайтов связывания, оптимальные соотношения БСА:молекула-шаблон должны составлять 1:50 для системы БСА — афлатоксин B1 и 1:35 для системы БСА — квакхурин (табл. 5). Сопоставление расчетных значений (1:50 и 1:35) с использованным в цитируемых работах молярным соотношением 1:0,33 демонстрирует, что концентрация молекул-шаблонов ниже в 100–150 раз относительно предполагаемого. В условиях столь глубокого дефицита лиганда и наличия конкурирующих поверхностных центров специфические полости альбумина оставались практически незаселенными в момент добавления сшивающего реагента. Данный факт может являться причиной отсутствия высоких сорбционных характеристик полученных ИБ.

Система БСА — дезоксиниваленол/зеараленон (мультишаблонный импринтинг)

Гидрофобные молекулы-шаблоны (зеараленон, афлатоксин B1, имазамокс, квакхурин) обладают выраженным нативным сродством к полостям сывороточного альбумина (карманам Судлоу I и II) [114,115]. Ассоциация с данными молекулами термодинамически выгодна, что позволяет успешно проводить импринтинг [4,5]. Напротив, дезоксиниваленол представляет собой высокополярный гидрофильный микотоксин, не обладающий выраженным сродством к гидрофобным полостям нативного БСА. Прямой импринтинг дезоксиниваленола малоэффективен.

Формирование специфических полостей для распознавания дезоксиниваленола становится возможным лишь в условиях кооперативного (мульти шаблонного) импринтинга при одновременном введении гидрофобной молекулы-шаблона, такого как зеараленон.

В работе [4] впервые реализован совместный импринтинг БСА двумя различными молекулами-шаблонами (зеараленоном и дезоксиниваленолом). Получение ИБ проводили при молярном соотношении БСА:дезоксиниваленол, равном 1:12. Авторы показали, что избыток зеараленона подавлял связывание дезоксиниваленола, тогда как присутствие дезоксиниваленола не оказывало влияния на связывание зеараленона.

Существенным физико-химическим осложнением процесса явилась химическая нестабильность дезоксиниваленола в кислой среде: при pH 3,0 часть молекул дезоксиниваленола восстанавливается до дезокси-дезоксиниваленола, что приводит к снижению исходной концентрации аналита на 30%. С учетом данного процесса фактическое молярное соотношение БСА к недеградировавшему дезоксиниваленолу в реакционной смеси составляло не более 1:8.

Для установления молекулярного механизма связывания проведено сравнительное полноатомное моделирование трех систем: БСА — зеараленон, БСА — дезоксиниваленол и БСА — дезокси-дезоксиниваленол (*Приложение, Табл. 1, Рис. 5*).

По результатам молекулярного докинга выявлено формирование пяти, семи и пяти сайтов связывания БСА с зеараленоном, дезоксиниваленолом и дезокси-дезоксиниваленолом, соответственно. Анализ среднеквадратичных отклонений координат системы показал, что системы БСА — дезоксиниваленол и БСА — дезокси-дезоксиниваленол достигают устойчивого плато уже после 50 нс траектории. Связывание дезоксиниваленола осуществляется преимущественно за счет сети водородных связей (включая контакты, опосредованные молекулами воды) и ван-дер-ваальсовых взаимодействий с неполярными остатками Leu и Ala. Координация молекул дезоксиниваленола в нескольких сайтах белка индуцирует

заметную компактизацию белковой глобулы, сближая домены и переводя систему в состояние, близкое к исходной глобулярной геометрии.

Сравнительный анализ пространственного распределения сайтов связывания показал, что центры координации дезоксиниваленола и дезокси-дезоксиниваленола перекрываются с сайтами связывания молекул зеараленона и могут напрямую конкурировать друг с другом за связывающие полости. Сравнительная оценка свободных энергий связывания показала, что связывание зеараленона термодинамически более выгодно практически во всех перекрывающихся центрах связывания. В условиях дефицита молекул дезоксиниваленола (фактическое соотношение 1:8 при рассчитанной емкости семи сайтов связывания, требующей соотношения 1:35) высокоаффинный зеараленон эффективно вытесняет дезоксиниваленол из общих полостей, что объясняет односторонний характер конкурентного связывания и субоптимальную степень извлечения дезоксиниваленола (65 %), зафиксированные в экспериментальной работе [4].

5.2. Прогнозирование оптимального молярного соотношения БСА:молекула-шаблон

Система БСА — имазамокс

Для проспективной апробации разработанного протокола было проведено исследование системы связывания БСА с имазамоксом — гербицидом группы имидазолинонов. Результаты молекулярного докинга показали наличие девяти потенциальных сайтов связывания на поверхности частично развернутой молекулы БСА при pH 3,0 (*Приложение, Табл. 1*). При этом ассоциация обусловлена сочетанием гидрофобных взаимодействий имидазолинового и хинолинового фрагментов имазамокса с алифатическими остатками белка, а также сетью водородных связей (включая связи, опосредованные молекулами воды). Анализ микроокружения координационных центров свидетельствует о сбалансированном распределении гидрофобных и полярных аминокислотных остатков (табл. 5).

Наличие девяти доступных центров связывания, согласно выдвинутой гипотезе, предполагает, что оптимальное молярное соотношение БСА:имазамокс для получения ИБ составляет 1:45. На основе полученных данных было проведено получение ИБ без проведения предварительной экспериментальной оптимизации концентраций [116]. Исследование сорбционных характеристик полученного ИБ подтвердило его высокую аналитическую эффективность: степень извлечения имазамокса составила 98%.

Системы БСА — L-аргинин и БСА — L-аргинин-анилин

Отдельный интерес для апробации работоспособности разработанного подхода представляет класс низкомолекулярных гидрофильных биогенных соединений и их синтетических производных, прямое распознавание которых традиционными полимерными сорбентами сопряжено со значительными трудностями. В качестве модельных объектов были выбраны аминокислота L-аргинин и конъюгат L-аргинин-анилин [117].

Для оценки сорбционной емкости БСА проведен слепой докинг при pH 3,0. Полноатомное моделирование показало, что на поверхности частично развернутой глобулы альбумина формируется пять потенциальных сайтов связывания для молекул L-аргинина (рис. 22 (б)). Ассоциация стабилизируется формированием сети водородных связей (включая опосредованные молекулами воды) и локальными гидрофобными взаимодействиями алифатического фрагмента аргинина с неполярными аминокислотными остатками белка.

Введение дополнительного ароматического бензольного кольца в структуру аналита (конъюгат L-аргинин-анилин) за счет экранирования терминальной карбоксильной группы и возрастания стерического объема лиганда приводит к изменению доступности полостей белковой матрицы: число устойчивых сайтов связывания снижается до четырех (рис. 22 (в)). За счет ароматического фрагмента координация конъюгата в полостях дополнительно усиливается взаимодействиями с ароматическими боковыми радикалами белковой матрицы.

Количество специфических сайтов связывания предполагает, что оптимальными молярными соотношениями БСА:молекула-шаблон являются 1:25 и 1:20 для L-аргинина и L-аргинин-анилин.а, соответственно. Получение ИБ в соответствии с предложенными оптимальными молярными соотношениями без предварительного экспериментального варьирования концентраций, позволило достичь удовлетворительного связывания целевых аналитов: степень извлечения составила 99 % для L-аргинина и 97 % для конъюгата L-аргинин-анилин (табл. 7) [117]. Полученные результаты подтверждают работоспособность расчетной модели при работе с высокополярными молекулами-шаблонами.

Таблица 7. Расчетные и экспериментальные параметры связывания в системах БСА — молекула-шаблон в процессе получения ИБ

Молекула-шаблон	Молярное соотношение белок:молекула-шаблон		Степень извлечения, %
	Моделирование	Оптимальное	
Зеараленон	1:5	1:25	1:24
Дезоксиниваленол	1:7	1:35	1:12→1:8 ^а
Афлатоксин Б1	1:10	1:50	3:1→1:0,33
Квакхурин	1:7	1:35	3:1→1:0,33
Имазамокс	1:9	1:45	1:45
L-аргинин	1:5	1:25	1:25
L-аргинин-анилин	1:4	1:20	1:20

Примечания:

а — снижение фактического соотношения обусловлено 30%-й деградацией дезоксиниваленола.

Таким образом, систематическое сопоставление расчетных параметров и экспериментальных характеристик для всех исследуемых систем (табл. 7) позволило установить количественную взаимосвязь между рассчитанным оптимальным молярным соотношением и аналитической эффективностью ИБ. Комплексная апробация разработанного расчетного подхода на расширенном ряде низкомолекулярных соединений ($n = 7$) доказала его работоспособность: ретроспективный анализ исчерпывающе объяснил эмпирические результаты литературных источников, а проспективное *in silico* планирование условий позволило рассчитать оптимальные молярные соотношения и получить

высокоселективные ИБ без дополнительной эмпирической оптимизации условий их получения.

Импринтинг БСА в присутствии фиктивных молекул-шаблонов

В ряде случаев высокая токсичность, низкая стабильность, коммерческая недоступность и т.п. целевых молекул шаблонов препятствуют их использованию при получении МИП и ставит задачу их замены на фиктивные шаблоны (dummy template). Этот подход широко используется в традиционном импринтинге, однако выбор фиктивных шаблонов, как правило, проводят эмпирически.

Нами рассмотрена возможность выбора фиктивных шаблонов для получения ИБ селективного к представителю цианобактерий – циклического гептапептида микроцистина–LR.

Высокая токсичность и стоимость экотоксиканта делают актуальной задачу его замены на безопасные и коммерчески доступные структурные аналоги при получении ИБ с сохранением их селективности по отношению к целевым токсинам. Известно, что МИП, синтезированные в присутствии L-аргинина, используют для определения микроцистина–LR (рис. 22 (а)) [118]. Однако свободный L-аргинин формирует полости, комплементарные не только гуанидиновому фрагменту, но и концевой карбоксильной группе. В молекуле микроцистина-LR остаток аргинина включен в макроциклический полипептидный остов, а его карбоксильная группа заблокирована пептидной связью, что существенно снижает эффективность распознавания целевого токсина полостями, полученными с использованием свободного аргинина.

В связи с этим оценена возможность направленного формирования сайтов связывания БСА, комплементарных аргининовому фрагменту микроцистина–LR, при использовании конъюгата L-аргинин-анилин, в котором терминальная карбоксильная группа заблокирована гидрофобным ароматическим ядром, имитирующим окружение токсина.

Согласно данным полноатомного молекулярного моделирования, на поверхности БСА (рН 3,0) формируются четыре потенциальных сайта связывания

микроцистина – LR (рис. 22), стабилизируемых гидрофобными контактами и сетью водородных связей с полярными и заряженными остатками матрицы (рис. 22). Анализ структурных особенностей микроокружения показал, что определяющий вклад в связывание токсина вносит именно остаток L-аргинина в его циклической структуре. Сравнительный анализ координационных центров выявил следующие различия: (1) из пяти сайтов связывания свободного L-аргинина лишь один пространственно перекрывается с сайтами связывания микроцистина–LR; (2) для конъюгата L-аргинин-анилин три из четырех расчетных сайтов совпадают с центрами связывания микроцистина–LR и демонстрируют схожий профиль межмолекулярных контактов при незначительном снижении расчетной энергии связывания (~ 2 ккал/моль) за счет стерических ограничений ароматического кольца.

Таким образом, результаты полноатомного компьютерного моделирования подтвердили высокую комплементарность полостей, формируемых конъюгатом L-аргинин-анилин, центрам молекулярного распознавания микроцистина-LR. Полученные данные обосновывают применимость синтетического конъюгата L-аргинин-анилин в качестве эффективного, безопасного и экономически доступного фиктивного шаблона для получения ИБ, специфичных к микроцистину-LR.

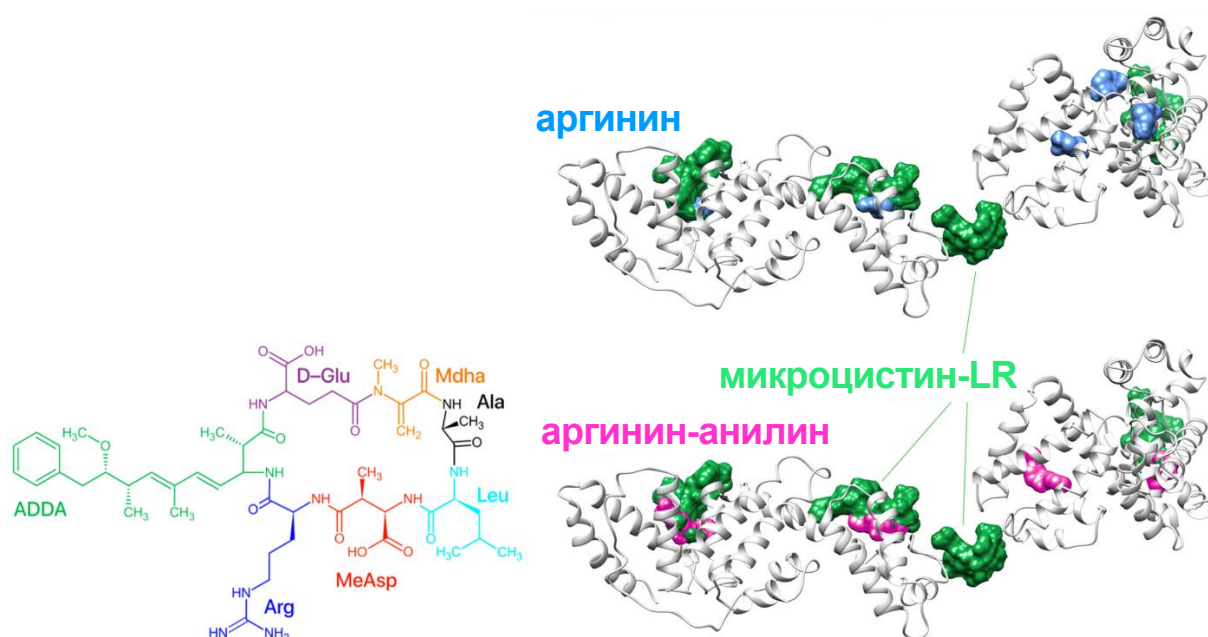


Рисунок 22. Микроцистин-LR и сопоставление моделей ассоциатов БСА:микроцистин-LR с БСА:L-аргинин и БСА:L-аргинин-анилин.

Заключение по главе 5

Апробация разработанного вычислительного подхода на расширенном круге низкомолекулярных соединений ($n = 7$) показала его работоспособность при получении ИБ. Ретроспективный анализ экспериментальных данных, представленных в литературе, косвенно подтверждает правильность модели: экспериментальное плато степени извлечения зеараленона при соотношении 1:24 совпадает с рассчитанным молярным соотношением БСА:зеараленон равным 1:25. Низкая эффективность импринтинга афлатоксина B1 и квакхурина, вероятно, обусловлена дефицитом молекул-шаблонов в процессе получения ИБ (молярное соотношение 1:0,33 более чем в 100 раз меньше предполагаемого согласно расчетным данным). На примере мульти-шаблонного импринтинга дезоксиниваленола и зеараленона показано, что топологическое перекрывание сайтов связывания в сочетании с термодинамическим преимуществом зеараленона и частичной деградацией дезоксиниваленола (фактическое соотношение 1:8 вместо рассчитанного теоретически оптимального 1:35) может приводить к конкурентному вытеснению дезоксиниваленола. Прогнозирование позволило рассчитать оптимальные молярные соотношения для систем БСА — имазамокс (1:45), БСА — L-аргинин (1:25) и БСА — L-аргинин-анилин (1:20) и достичь степени извлечения аналитов 97-99% без предварительного подбора условий. Пространственное перекрывание 3 из 4 расчетных сайтов связывания микроцистина-LR конъюгатом L-аргинин-анилин теоретически обосновало успешное применение последнего в качестве эффективного и безопасного фиктивного шаблона для получения ИБ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработаны физико-химические основы формирования импринтированного альбумина (БСА), включающие установленные зависимости термодинамических параметров связывания от рН и молекулярные механизмы взаимодействия БСА с 4-гидроксикумарином, что позволило разработать подход к полноатомному моделированию его структуры с возможностью прогнозирования сорбционной емкости.

2. Установлен термодинамический профиль процесса взаимодействия в системе БСА — 4-гидроксикумарин при различных значениях рН методом ИТК. Выявлено наличие двух самопроизвольно протекающих процессов при всех исследованных значениях рН. Доминирующий процесс характеризуется высокими константами связывания ($K_B = (99 \pm 25) \times 10^7$, $K_B = (74 \pm 40) \times 10^7$, $K_B = (98 \pm 30) \times 10^7$ М⁻¹ для рН 3,0, 7,4 и 9,0 соответственно) и соответствует формированию специфических полостей во время импринтинга. В кислой среде связывание регулируется выраженным энтропийным вкладом гидрофобного взаимодействия, в нейтральной и щелочной – энтальпией при локальных электростатических контактах. Побочный процесс характеризуется более низкими константами связывания и соответствует неспецифической сорбции на поверхности белка.

3. Предложена полноатомная структурно-динамическая модель формирования ассоциата БСА:4-гидроксикумарин в процессе импринтинга. Проведено пространственное картирование сайтов связывания БСА, установлены природа и динамика межмолекулярных контактов. Результаты молекулярного моделирования хорошо согласуются с полученными экспериментальными данными.

4. Показана возможность увеличения сорбционной емкости ИБ на примере системы БСА — 4-гидроксикумарин путем направленного изменения конформации белковой матрицы в кислой среде в процессе получения ИБ. На основе полученных результатов полноатомного моделирования и

экспериментальных результатов, установлено, что разворачивание глобулы в кислой среде способствует пространственному раскрытию внутренних гидрофобных полостей белка, что приводит к образованию первичных ассоциатов БСА:4-гидроксикумарин состава 1:1 или 1:2. Последующий сдвиг pH в щелочную среду стабилизирует сформированные контакты и приводит к формированию дополнительных центров связывания с увеличением суммарной емкости структуры ассоциата БСА:4-гидроксикумарин до состава 1:6. Проведение импринтинга БСА без предварительного конформационного разворачивания белковой глобулы в кислой среде ограничивает этот показатель формированием ассоциата БСА:4-гидроксикумарин состава 1:5.

5. Предложен подход к выбору оптимального молярного соотношения белок:молекула-шаблон при получении ИБ. Методами ИТК и молекулярного моделирования показано, что при получении ИБ формируется ассоциат БСА:4-гидроксикумарин состава 1:5 или 1:6. На основании сравнительного анализа значений сорбционной емкости и степени извлечения установлено, что необходимым является пятикратный молярный избыток молекул-шаблонов относительно рассчитанного числа сайтов связывания.

Полученные результаты могут быть использованы в разработке биосинтетических рецепторов для твердофазной экстракции, тест-систем иммуноферментного анализа, оптических биосенсоров и систем доставки лекарств.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Mofazali, P. Molecularly imprinted polymers: applications, computational approaches, and the transformative role of artificial intelligence / P. Mofazali, M. Lalinia, J. Gross, A. Samadi // *Coordination Chemistry Reviews*. — 2026. — (559). — P. 217808.
2. Liu, J. Bioimprinted protein exhibits glutathione peroxidase activity / J. Liu, K. Zhang, X. Ren, G. Luo, J. Shen // *Analytica Chimica Acta*. — 2004. — № 1 (504). — P. 185-189.
3. Gutierrez R., A. V. Bioimprinting as a tool for the detection of aflatoxin B1 using a capacitive biosensor / A.V. Gutierrez R., M. Hedström, B. Mattiasson // *Biotechnology Reports*. — 2016. — (11). — P. 12-17.
4. Beloglazova, N. Bioimprinting for multiplex luminescent detection of deoxynivalenol and zearalenone / N. Beloglazova, P. Lenain, M. Tessier, I. Goryacheva, Z. Hens, S. De Saeger // *Talanta*. — 2019. — (192). — P. 169-174.
5. Pidenko, P. Imprinted proteins as a receptor for detection of zearalenone / P. Pidenko, H. Zhang, P. Lenain, I. Goryacheva, S. De Saeger, N. Beloglazova // *Analytica Chimica Acta*. — 2018. — (1040). — P. 99-104.
6. Adhav, V.A. The Realm of Unconventional Noncovalent Interactions in Proteins: Their Significance in Structure and Function / V.A. Adhav, K. Saikrishnan // *ACS Omega*. — 2023. — № 25 (8). — P. 22268-22284.
7. Saylan, Y. Advances in Biomimetic Systems for Molecular Recognition and Biosensing / Y. Saylan, Ö. Erdem, F. Inci, A. Denizli // *Biomimetics*. — 2020. — № 2 (5). — P. 20.
8. Luan, J. PEGylated Artificial Antibodies: Plasmonic Biosensors with Improved Selectivity / J. Luan, K. Liu, S. Tadepalli, Q. Jiang, J. Morrissey, E. Kharasch // *ACS Applied Materials & Interfaces*. — 2016. — № 36 (8). — P. 23509-23516.
9. Saylan, Y. Molecular Fingerprints of Hemoglobin on a Nanofilm Chip / Y. Saylan, A. Denizli // *Sensors*. — 2018. — № 9 (18). — P. 3016.

10. Yang, K. Epitope Imprinting Technology: Progress, Applications, and Perspectives toward Artificial Antibodies / K. Yang, S. Li, L. Liu, Y. Chen, W. Zhou, J. Pei, Z. Liang, L. Zhang, Y. Zhang // *Advanced Materials*. — 2019. — № 50 (31). — P. 1902048.
11. Xu, J. Molecularly Imprinted Synthetic Antibodies: From Chemical Design to Biomedical Applications / J. Xu, H. Miao, J. Wang, G. Pan // *Small*. — 2020. — № 27 (16). — P. 1906644.
12. Refaat, D. Strategies for Molecular Imprinting and the Evolution of MIP Nanoparticles as Plastic Antibodies—Synthesis and Applications / D. Refaat, M. G. Aggour, A. A. Farghali, R. Mahajan, J. Wiklander, I. Nicholls, S. Piletsky // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2019. — № 24 (20). — P. 6304.
13. Chen, L. Molecular imprinting: perspectives and applications / L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, J. Li // *Chemical Society Reviews*. — 2016. — № 8 (45). — P. 2137-2211.
14. Arabi, M. Molecular Imprinting: Green Perspectives and Strategies / M. Arabi, A. Ostovan, J. Li, X. Wang, Z. Zhang, J. Choo, L. Chen // *Advanced Materials*. — 2021. — № 30 (33). — P. 2100543.
15. Wulff G. The Use of Polymers with Enzyme-Analogous Structures for the Resolution of Racemates / G. Wulff, A. Sarhan // *Angewandte Chemie International Edition*. — 1972. — № 5 (11). — P. 341–344.
16. Shah, N. A Brief Overview of Molecularly Imprinted Polymers: From Basics to Applications / N. Shah, M. Ul-Islam, M. Haneef, J. Park // *Journal of Pharmacy Research*. — 2012. — (5). — P. 3309-3317.
17. Wulff, G. Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers/ G. Wulff // *Chemical Reviews*. — 2001. — № 1 (102). — P. 1-28.
18. Arshady, R. Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization / R. Arshady, K. Mosbach // *Die Makromolekulare Chemie*. — 2003. — (182). — P. 687-692.

19. Haupt, K. Molecular Imprinting K. Haupt, Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. — 362 p.
20. Karlsson, B. C. G. Structure and Dynamics of Monomer–Template Complexation: An Explanation for Molecularly Imprinted Polymer Recognition Site Heterogeneity / B. C. G. Karlsson, J. O'Mahony, J.G. Karlsson, H. Bengtsson, L.A. Eriksson, I.A. Nicholls // Journal of the American Chemical Society. — 2009. — № 37 (131). — P. 13297-13304.
21. Chen, L. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications / L. Chen, S. Xu, J. Li. // Chemical Society Reviews. — 2011. — № 5 (40). — P. 2922-2942.
22. Bossi, A. Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: the state of the art / A. Bossi, F. Bonini, A. Turner, S. Piletsky // Biosensors and Bioelectronics. — 2007. — № 6 (22). — P. 1131-1137.
23. Cheong, W. J. Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews / W.J. Cheong, S.H. Yang, F. Ali // Journal of Separation Science. — 2013. — № 3 (36). — P. 609-628.
24. Ramstroem, O. Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting / O. Ramstroem, L.I. Andersson, K. Mosbach // The Journal of Organic Chemistry. — 1993. — № 26 (58). — P. 7562-7564.
25. Cowen, T. Molecular imprinting using biopolymers as building Blocks: Sustainable and biocompatible metamaterials for smart recognition and selective biointerfaces / T. Cowen, D. Maniglio, A.M. Bossi // TrAC Trends in Analytical Chemistry. — 2025. — (193). — P. 118422.
26. Lei, W. “Induced fit” recognition of proteins by surface imprinted silica with “soft” recognition sites / W. Lei, Z. Meng, W. Zhang, L. Zhang, M. Xue, W. Wang // Talanta. — 2012. — (99). — P. 966-971.

27. Du, X. Insights into Protein – Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods // International Journal of Molecular Sciences. — 2016. — № 2 (17). — P. 144.
28. Poma, A. Advances in the manufacture of MIP nanoparticles / A. Poma, A.P.F. Turner, S.A. Piletsky // Trends in Biotechnology. — 2010. — № 12 (28). — P. 629-637.
29. Carter, D.C. Structure of Serum Albumin // Lipoproteins, Apolipoproteins, and Lipases: Advances in Protein Chemistry / eds. C.B. Anfinsen. — Academic Press, 1994. — (45). — P. 153-203.
30. Kun, R. Isothermal titration calorimetric studies of the pH induced conformational changes of bovine serum albumin / R. Kun, M. Szekeres, I. Dékány // Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. — 2009. — № 3 (96). — P. 1009-1017.
31. Peters, T. The Albumin Molecule: Its Structure and Chemical Properties // All About Albumin. — San Diego: Academic Press, 1995. — P. 9-75.
32. Hirayama, K. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS / K. Hirayama, S. Akashi, M. Furuya, K. Fukuhara // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 1990. — № 2 (173). — P. 639-646.
33. Peters, T. Serum Albumin // Advances in Protein Chemistry / eds. C.B. Anfinsen, J.T. Edsall, F.M. Richards. — New York: Academic Press, 1985. — P. 161-245.
34. He, X.M. Atomic structure and chemistry of human serum albumin / X.M. He, D.C. Carter // Nature. — 1992. — № 6383 (358). — P. 209-215.
35. Topală, T. Bovine serum albumin interactions with metal complexes / T. Topala, A. Bodoki, L.Oprean, R. Oprean // Medicine and Pharmacy Reports. — 2014. — № 4 (87). — P. 215-219.
36. Johanson, K.O. Refolding of bovine serum albumin and its proteolytic fragments. Regain of disulfide bonds, secondary structure, and ligand-binding ability/ K.O. Johanson, D.B. Wetlaufer, R.G. Reed, T. Peters // The Journal of Biological Chemistry. — 1981. — № 1 (256). — P. 445-450.

37. Dockal, M. Conformational Transitions of the Three Recombinant Domains of Human Serum Albumin Depending on pH / M. Dockal, D.C. Carter, F. Rüker // *Journal of Biological Chemistry*. — 2000. — № 5 (275). — P. 3042-3050.
38. Varga, N. Comprehensive study on the structure of the BSA from extended-to aged form in wide (2—12) pH range / N. Varga, V. Hornok, D. Sebok, I. Dekany // *International Journal of Biological Macromolecules*. — 2016. — (88). — P. 51-58.
39. Perozzo, R. Thermodynamics of Protein—Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects / R. Perozzo, G. Folkers, L. Scapozza // *Journal of Receptors and Signal Transduction*. — 2004. — № 1-2 (24). — P. 1-52.
40. Dunitz, J. D. Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions/ J. D. Dunitz // *Chemistry & Biology*. — 1995. — № 11 (2). — P. 709-712.
41. Li, H. Physicochemical bases for protein folding, dynamics, and protein-ligand binding / H. Li, Y. Xie, C. Liu, S. Liu // *Science China Life Sciences*. — 2014. — № 3 (57). — P. 287-302.
42. Liu S.Q. Protein Folding, Binding and Energy Landscape: A Synthesis // *Protein Engineering* / ed. P. T. P. Kaumaya. — IntechOpen, 2012. — P. 211-240.
43. Murphy, K.P. Structural energetics of peptide recognition: Angiotensin II/antibody binding / K.P. Murphy, D. Xie, K.C. Garcia, L.M. Amzel, E. Freire // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. — 1993. — № 2 (15). — P. 113-120.
44. Murphy, K.P. Entropy in biological binding processes: Estimation of translational entropy loss / K.P. Murphy, D. Xie, K.S. Thompson, L.M. Amzel, E. Freire // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. — 1994. — № 1 (18). — P. 63-67.
45. Murphy, K.P. Configurational effects in antibody–antigen interactions studied by microcalorimetry / K.P. Murphy, E. Freire, Y. Paterson // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. — 1995. — № 2 (21). — P. 83-90.

46. Csermely, P. Induced fit, conformational selection and independent dynamic segments: an extended view of binding events / P. Csermely, R. Palotai, R. Nussinov // *Trends in Biochemical Sciences*. — 2010. — № 10 (35). — P. 539-546.
47. Koshland Jr., D. E. The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory / D. E. Koshland Jr. // *Angewandte Chemie International Edition in English*. — 1995. — № 23-24 (33). — P. 2375-2378.
48. Henzler-Wildman, K. Dynamic personalities of proteins / K. Henzler-Wildman, D. Kern // *Nature*. — 2007. — № 7172 (450). — P. 964-972.
49. Frauenfelder, H. The Energy Landscapes and Motions of Proteins / H. Frauenfelder, S.G. Sligar, P.G. Wolynes // *Science*. — 1991. — № 5038 (254). — P. 1598-1603.
50. Greives, N. Both protein dynamics and ligand concentration can shift the binding mechanism between conformational selection and induced fit / N. Greives, H.-X. Zhou // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2014. — № 28 (111). — P. 10197-10202.
51. Verheyen, E. Challenges for the effective molecular imprinting of proteins / E. Verheyen, J. Schillemans, M. Van Wijk, M. Demeniex, W. Hennink, C. Van Nostrum // *Biomaterials*. — 2011. — № 11 (32). — P. 3008-3020.
52. Bastide, J. The use of molecularly imprinted polymers for extraction of sulfonylurea herbicides / J. Bastide, J. Cambon, F. Breton, S. Piletsky, R. Rouillon // *Analytica Chimica Acta*. — 2005. — № 1 (542). — P. 97-103.
53. Andersson, L.I. Solid-phase extraction on molecularly imprinted polymers // *Bioanalytical Separations: Handbook of Analytical Separations* / ed. I.D. Wilson. — Elsevier Science B.V., 2003. — (4). — P. 45-71.
54. Ostovan, A. A review of binding properties of molecularly imprinted materials and strategies to suppress nonspecific recognition in complex matrices / A. Ostovan, J. Chen, Y. Sun, Y. Wang, Q. Yang, R. Mei, L. Chen, J. Choo, M. Arabi // *Analytica Chimica Acta*. — 2026. — (1418). — P. 345680.

55. Turner, N. W. From 3D to 2D: A Review of the Molecular Imprinting of Proteins / N. Turner, C. Jeans, K. Brain, C. Allender, V. Hlady, D. Britt // *Biotechnology progress*. — 2006. — № 6 (22). — P. 1474-1489.
56. Li, S. Molecularly Imprinted Polymers: Thermodynamic and Kinetic Considerations on the Specific Sorption and Molecular Recognition / S. Li, X. Huang, M. Zheng, W. Li, K. Tong // *Sensors*. — 2008. — № 4 (8). — P. 2854-2864.
57. Kantonen, S.A. Evaluation and Minimization of Uncertainty in ITC Binding Measurements: Heat Error, Concentration Error, Saturation, and Stoichiometry / S.A. Kantonen, N.M. Henriksen, M.K. Gilson // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. — 2017. — № 2 (1861). — P. 485-498.
58. Medoš, Ž. Calibrating ITC instruments: Problems with weak base neutralization / Z. Medos, M. Bester-Rogac, E. Leontidis, J. Tellinghuisen // *Analytical Biochemistry*. — 2024. — (694). — P. 115602.
59. Cooper, A. Introduction to microcalorimetry and biomolecular energetics / A. Cooper, C.M. Johnson // *Methods in Molecular Biology*. — 1994. — (22). — P. 109-124.
60. Sobiech, M. Computer-Assisted Strategies as a Tool for Designing Green Monomer-Based Molecularly Imprinted Materials / M. Sobiech // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2024. — № 23 (25). — P. 12912.
61. Ilicheva, P.M. Molecularly Imprinted Polymers in Drug Delivery Systems / P.M. Ilicheva, P.S. Pidenko, N.A. Burmistrova in *Modern Strategies of Drug Therapy: Multi-Target Drug Delivery, Bioimaging, Diagnostics* // *Russian Journal of General Chemistry*. — 2025. — (95). — P. S1–S448.
62. Rajpal, S. Rational design based on multi-monomer simultaneous docking for epitope imprinting of SARS-CoV-2 spike protein/ S. Rajpal, A. Batista, R. Grob, J. Munch, B. Mizaikoff, P. Mishra // *Scientific Reports*. — 2024. — № 1 (14). — P. 23057.

63. Kryscio, D. R. Molecular docking simulations for macromolecularly imprinted polymers / D. R. Kryscio, Y. Shi, P. Ren, N. Peppas // *Industrial & engineering chemistry research*. — 2011. — № 24 (50). — P. 13877-13884.
64. Boroznjak, R. A computational approach to study functional monomer-protein molecular interactions to optimize protein molecular imprinting/ R. Boroznjak, J. Reut, A. Tretjakov, A. Lomaka, A. Öpik, V. Syritski // *Journal of Molecular Recognition*. — 2017. — № 10 (30). — P. e2635.
65. Cole, J. Molecular Docking—A Solved Problem? // *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. — 2017. URL: [sciencedirect.com](https://www.sciencedirect.com) (accessed: 05.09.2026). — [Электронный ресурс].
66. Berman, H. M. The Protein Data Bank / H. Berman, T. Battistuz, T. Bhat, W. Bluhm, P. Bourne, K. Burkhardt, Z. Feng, G. Gilliland, L. Iype, S. Jain, P. Fagan, J. Marvin, D. Padilla, V. Ravichandran, B. Schneider, N. Thanki, H. Weissig, J. Westbrook, C. Zardecki // *Nucleic Acids Research*. — 2000. — № 1 (28). — P. 235-242.
67. Søndergaard, C.R. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values / C. Søndergaard, M. Oisson, M. Rostkowski, J. Jensen // *Journal of Chemical Theory and Computation*. — 2011. — № 7 (7). — P. 2284-2295.
68. Lindorff-Larsen, K. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field / K. Lindorff-Larsen, S. Piana, K. Palmo, P. Maragakis, J. Klepeis, R. Dror, D. Shaw // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. — 2010. — № 8 (78). — P. 1950-1958.
69. Sousa da Silva, A. W. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE / A.W. Sousa da Silva, W.F. Vranken // *BMC Research Notes*. — 2012. — № 1 (5). — P. 367.
70. Alenaizan, A. Python implementation of the restrained electrostatic potential charge model / A. Alenaizan, L.A. Burns, C.D. Sherrill // *International Journal of Quantum Chemistry*. — 2020. — № 2 (120). — P. e26035.

71. Halgren, T. New Method for Fast and Accurate Binding-site Identification and Analysis / T. Halgren // *Chemical Biology & Drug Design*. — 2007. — № 2 (69). — P. 146-148.
72. Halgren, T. A. Identifying and Characterizing Binding Sites and Assessing Druggability / T. A. Halgren // *Journal of Chemical Information and Modeling*. — 2009. — № 2 (49). — P. 377-389.
73. Trott, O. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading / O. Trott, A.J. Olson // *Journal of Computational Chemistry*. — 2010. — № 2 (31). — P. 455-461.
74. Friesner, R. A. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy / R.A. Friesner, J.L. Banks, R.B. Murphy, T.A. Halgren, J.J. Klicic, D.T. Mainz, M.P. Repasky, E.H. Knoll, M. Shelley, K.K. Perry, D.E. Shaw, P. Francis, P.S. Shenkin // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 2004. — № 7 (47). — P. 1739-1749.
75. Friesner, R. A. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes / R.A. Friesner, R.B. Murphy, M.P. Repasky, L.L. Frye, J.R. Greenwood, T.A. Halgren, P.C. Sanschagrin, D.T. Mainz // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 2006. — № 21 (49). — P. 6177-6196.
76. Yang, Y. Efficient Exploration of Chemical Space with Docking and Deep Learning / Y. Yang, K. Yao, M. Repasky, K. Leswing, R. Abel, B. Shoichet, S. Jerome // *Journal of Chemical Theory and Computation*. — 2021. — № 11 (17). — P. 7106-7119.
77. Genheden, S. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities / S. Genheden, U. Ryde // *Expert Opinion on Drug Discovery*. — 2015. — № 5 (10). — P. 449-461.
78. Abraham, M. J. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers / M.J. Abraham, T.

- Murtola, R. Schulz, S. Pall, J. Smith, B. Hess, E. Lindahl // SoftwareX. — 2015. — (1-2). — P. 19-25.
79. Abraham, M. GROMACS 2024.3 Source code // Zenodo. — 2024. — URL: zenodo.org (accessed: 02.09.2026). — DOI: 10.5281/zenodo.12185203. — [Электронный ресурс].
 80. Bekker, H. Gromacs: A parallel computer for molecular dynamics simulations / H. Bekker, H. Berendsen, E. Dijkstra, S. Achterop, R. Vondrumen, D. Vanderspoel, M. Renardus // Physics Computing. — 1993. — (92). — P. 252-256.
 81. Bussi, G. Biomolecular Simulations: Methods and Protocols G. Bussi, New York, NY: Springer, 2019. — 529-578 p.
 82. Bussi, G. Canonical sampling through velocity rescaling / G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello // The Journal of Chemical Physics. — 2007. — № 1 (126). — P. 014101.
 83. Bernetti, M. Pressure control using stochastic cell rescaling / M. Bernetti, G. Bussi // The Journal of Chemical Physics. — 2020. — № 11 (153). — P. 114107.
 84. Cardoso, J.F. Blind beamforming for non-gaussian signals / J.F. Cardoso, A. Souloumiac // IEE Proceedings F (Radar and Signal Processing). — 1993. — № 6 (140). — P. 362-370.
 85. Rutledge, D.N. Independent Components Analysis with the JADE algorithm / D.N. Rutledge, D. Jouan-Rimbaud Bouveresse // TrAC Trends in Analytical Chemistry. — 2013. — (50). — P. 22-32.
 86. Bro R. The N-way Toolbox: Tools for fitting multi-way (tensor) models such as PARAFAC // MathWorks MATLAB Central File Exchange. — 2026. — URL: <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/1088-the-n-way-toolbox> (accessed: 27.08.2026). — [Электронный ресурс].
 87. Zatón, A. M. L. Binding of coumarins to site I of human serum albumin. Effect of the fatty acids / A. Zaton, J. Ferrer, J. de Gordo, M. Marquinez // Chemico-Biological Interactions. — 1995. — № 2 (97). — P. 169-174.

88. Wang, Y. Spectroscopic and molecular docking studies on binding interactions of camptothecin drugs with bovine serum albumin / Y. Wang, J. Li, X. Li, B. Gao, J. Chen, Y. Song // *Scientific Reports*. — 2025. — № 1 (15). — P. 8055.
89. Presnyakov, K.Yu. Dummy-Template Imprinted Bovine Serum Albumin for Extraction of Zearalenone / K.Yu. Presnyakov, P.M. Ilicheva, D.V. Tsyupka, E.A. Khudina, M.V. Pozharov, P.S. Pidenko, N.A. Burmistrova // *Microchimica Acta*. — 2024. — № 12 (191). — P. 767.
90. Lakowicz J.R. Protein Fluorescence // *Principles of Fluorescence Spectroscopy* / ed. J.R. Lakowicz. — Boston, MA : Springer US, 2006. — P. 529-575.
91. Lakowicz J.R. Solvent and Environmental Effects // *Principles of Fluorescence Spectroscopy* / ed. J.R. Lakowicz. — Boston, MA : Springer US, 2006. — P. 205-235.
92. Ильичева П. М. Характеризация импринтированного альбумина с помощью молекулярного моделирования и спектроскопии (Characterization of imprinted albumin by molecular modelling and spectroscopy) / П.М. Ильичева, И.А. Решетник, Д.Д. Дрозд, П.С. Пиденко, Н.А. Бурмистрова // *Известия Саратовского университета. Серия Физика*. — 2025. — №2 (25). — С. 222-229.
93. Tayeh, N. Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins / N. Tayeh, T. Rungassamy, J.R. Albani // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. — 2009. — № 2 (50). — P. 107-116.
94. Albani, J.R. New Insights in the Interpretation of Tryptophan Fluorescence / J.R. Albani // *Journal of Fluorescence*. — 2007. — № 4 (17). — P. 406-417.
95. Albani, J.R. Fluorescence Lifetimes of Tryptophan: Structural Origin and Relation with $S_0 \rightarrow 1L_b$ and $S_0 \rightarrow 1L_a$ Transitions / J.R. Albani // *Journal of Fluorescence*. — 2009. — № 6 (19). — P. 1061-1071.
96. Jachimska, B. Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces/ B. Jachimska, A. Pajor // *Bioelectrochemistry*. — 2012. — (87). — P. 138-146.

97. Scanavachi, G. Aggregation features of partially unfolded bovine serum albumin modulated by hydrogenated and fluorinated surfactants: Molecular dynamics insights and experimental approaches / G. Scanavachi, Y. Espinosa, J. Yoneda, R. Rial, J. Ruso, R. Itri // *Journal of Colloid and Interface Science*. — 2020. — (572). — P. 9-21.
98. Lee, J. High-Resolution Diffusion Measurements of Proteins by NMR under Near-Physiological Conditions / J. Lee, S.H. Park, S. Cavagnero, J.H. Lee // *Analytical Chemistry*. — 2020. — № 7 (92). — P. 5073-5081.
99. Ilicheva, P.M. Toward Rational Design of Imprinted Proteins Based on Albumins: Computational and Experimental Studies / P.M. Ilicheva, A.L. Kwiatkowski, I.A. Reshetnik, K.Y. Presnyakov, I.E. Menyailo, M.V. Pozharov, P.S. Pidenko, Y.B. Monakhova, O.E. Philippova, N.A. Burmistrova // *Polymers*. — 2026. — № 11 (18). — P. 1280.
100. Siddiqui, S. Studying the interaction of drug/ligand with serum albumin / S. Siddiqui, F. Ameen, S. Rehman, T. Sarwar, M. Tabish // *Journal of Molecular Liquids*. — 2021. — (336). — P. 116200.
101. Callies, O. Application of isothermal titration calorimetry as a tool to study natural product interactions / O. Callies, A. Hernández Daranas // *Natural Product Reports*. — 2016. — № 7 (33). — P. 881-904.
102. Nowak, P.M. Origin of Remarkably Different Acidity of Hydroxycoumarins-Joint Experimental and Theoretical Studies / P.M. Nowak, F. Sagan, M.P. Mitoraj // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2017. — № 17 (121). — P. 4554-4561.
103. Migneault, I. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking / I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron // *BioTechniques*. — 2004. — № 5 (37). — P. 790-802.
104. Burmistrova, N.A. 3D Fluorescence Spectroscopy Combined With Chemometrics as a Tool for Control of Imprinted Protein Purification From Template Molecules

- / N.A. Burmistrova, P.M. Ilicheva, K.Y. Presnyakov, P.S. Pidenko, D.N. Rutledge
// *Journal of Chemometrics*. — 2024. — № 12 (38). — P. e3622.
105. Ilicheva P. M. Theoretical design of imprinted albumin against foodborne toxins
/ P.M. Ilicheva, E.S. Fedotova, K.Y. Presnyakov, V.S. Grinev, P.S. Pidenko, N.A.
Burmistrova // *Molecular Systems Design & Engineering*. — 2024. — №5 (9).
— P. 456-463.
106. Baler, K. Electrostatic Unfolding and Interactions of Albumin Driven by pH
Changes: A Molecular Dynamics Study / K. Baler, O. Martin, M. Carignano, G.
Ameer, J. Vila, I. Szleifer // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2014. — №
4 (118). — P. 921-930.
107. Srivastav, A. K. 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
Advances*. — 2020. — № 23 (10). — P. 13451-13459.
108. Laio A. Metadynamics: a method to simulate rare events and reconstruct the free
energy surface / A. Laio, F. Gervasio // *Reports on Progress in Physics*. — 2008.
— № 12 (71). — P. 126601.
109. Barducci A. Well-tempered metadynamics: A smoothly converging and tunable
free-energy method / A. Barducci, G. Bussi, M. Parrinello // *Physical Review
Letters*. — 2008. — № 2 (100). — P. 020603.
110. Raiteri P. Efficient reconstruction of complex free energy landscapes by multiple
walkers metadynamics / P. Raiteri, A. Laio, F. Gervasio, C. Micheletti, M.
Parrinello // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2006. — № 7 (110). — P.
3533–3539.
111. Cowen T. Computational approach in the design of synthetic receptors – a review
/ T. Cowen, K. Karim, S. Piletsky // *Anal. Chim. Acta*. — 2016. — (936). — P.
62–74.
112. Пресняков К.Ю. Применение фиктивных аналогов для получения
бионеорганического сорбента, модифицированного импринтированными

- белками / К.Ю. Пресняков, П.М. Ильичева, Д.В. Цюпка, И.Е. Меняйло, Н.А. Бурмистрова, П.С. Пиденко // Журнал аналитической химии. — 2025. — № 10 (80). — С. 1687–1696.
113. Sakamoto, S. 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. — № 8 (12). — P. 1064.
114. Saifi, I. J. Mycotoxin-Induced Structural Shifts in Serum Albumin: An Integrated Elucidation with Aflatoxin B1, T2-Toxin, Alternariol and Tenuazonic Acid / I.J. Saifi, S. Adhikary, A. Badar, Z. Arif, D. Kumar, K.M. Ansari // — 2024. — URL: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4758180 (date of access: 02.09.2026).
115. Poór, M. Interaction of mycotoxin zearalenone with human serum albumin / M. Poor, S. Kunsagi-Mate, M. Balint, C. Hetenyi, Z. Gerner, B. Lemli // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 2017. — (170). — P. 16-24.
116. Presnyakov, K.Y. Imprinted Proteins as a Receptor in Fluorescent Sensing Microplate Assay for Herbicide Determination / K.Y. Presnyakov, I.S. Matlakhov, I.A. Reshetnik, P.M. Ilicheva, D.V. Tsyupka, D.G. Koganova, S.A. Mescheryakova, T.Y. Rusanova, M.V. Pozharov, D.D. Drozd, P.S. Pidenko, I.Y. Goryacheva, N.A. Burmistrova // *Biosensors*. — 2026. — № 3 (16). — P. 149.
117. Presnyakov, K.Y. A Novel Approach to Determination of Amino Acids and Cyclic Heptapeptides Using Imprinted Proteins / K.Y. Presnyakov, P.M. Ilicheva, I.A. Reshetnik, M.V. Pozharov, P.S. Pidenko, N.A. Burmistrova // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2026. — № 3 (418). — P. 587-596.
118. Mbukwa, E.A. Preparation of guanidinium terminus-molecularly imprinted polymers for selective recognition and solid-phase extraction (SPE) of [arginine]-microcystins / E.A. Mbukwa, T.A.M. Msagati, B.B. Mamba // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. — 2013. — № 12 (405). — P. 4253-4267.

ПРИЛОЖЕНИЕ

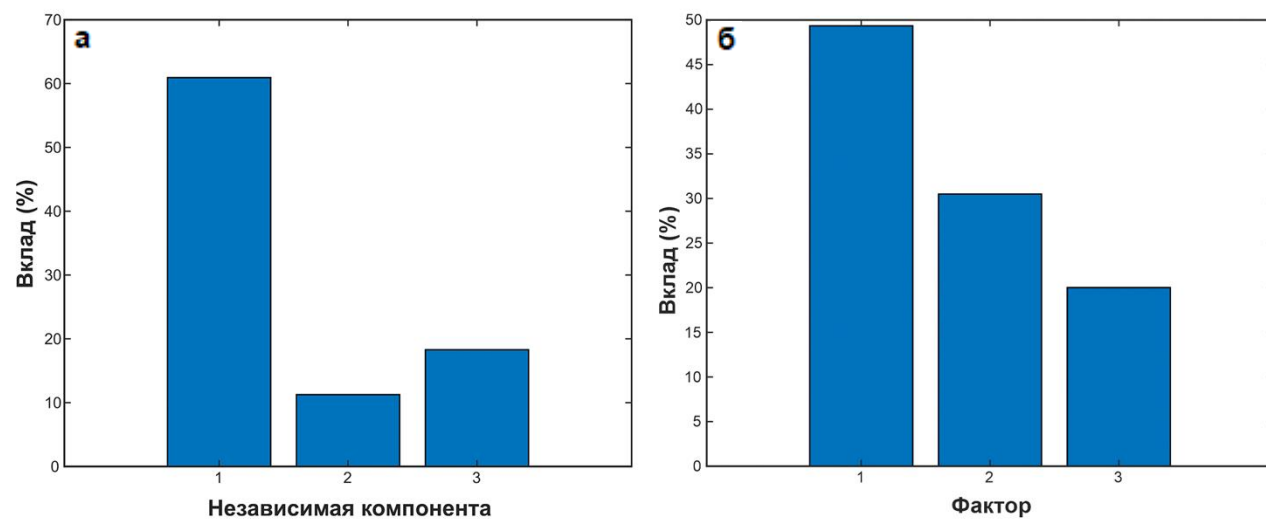


Рисунок 1. Объясненная дисперсия: ICA (а), PARAFAC (б).

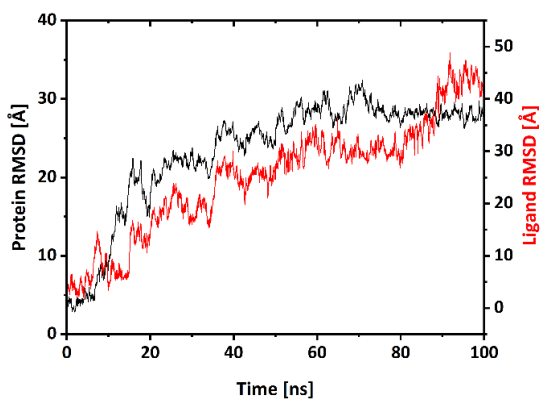
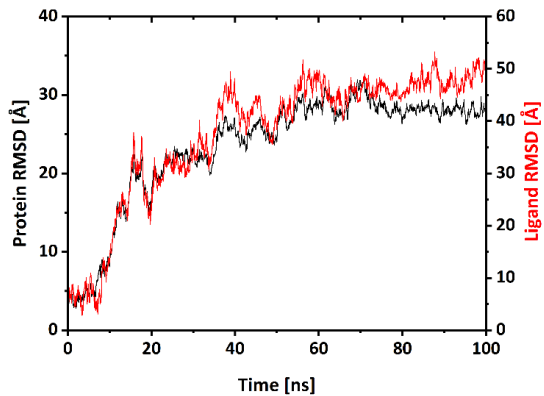
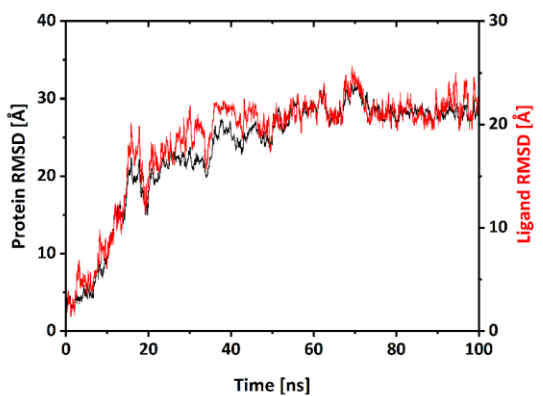
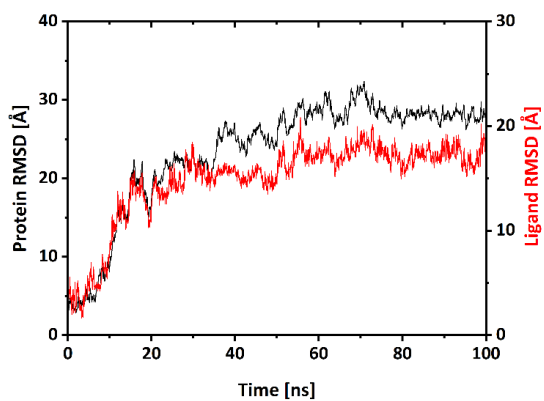
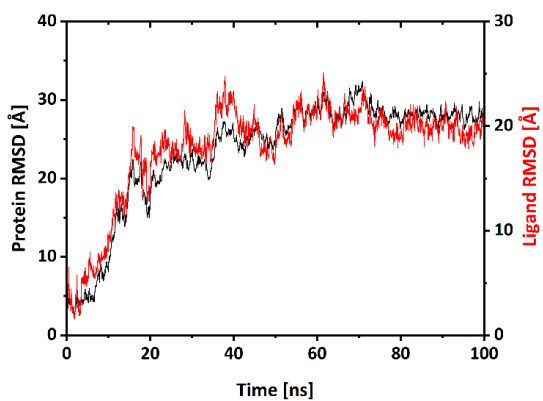


Рисунок 2. RMSD системы БСА — зеараленон в процессе МД-симуляции.



Рисунок 3. RMSD системы БСА — афлатоксин Б1 в процессе МД-симуляции.

Резкие высокоамплитудные флуктуации RMSD (20–25 Å) на временном интервале 65–85 нс симуляции носят характер расчетного технического артефакта, обусловленного диффузионным пересечением полипептидным остовом белка границ периодической ячейки. Синхронный характер скачков для C_{α} -атомов белка и молекулы лиганда, а также последующая быстрая релаксация значений к исходному базисному уровню подтверждают сохранение геометрической целостности комплекса и отсутствие спонтанной диссоциации лиганда из центров связывания на протяжении всей траектории.

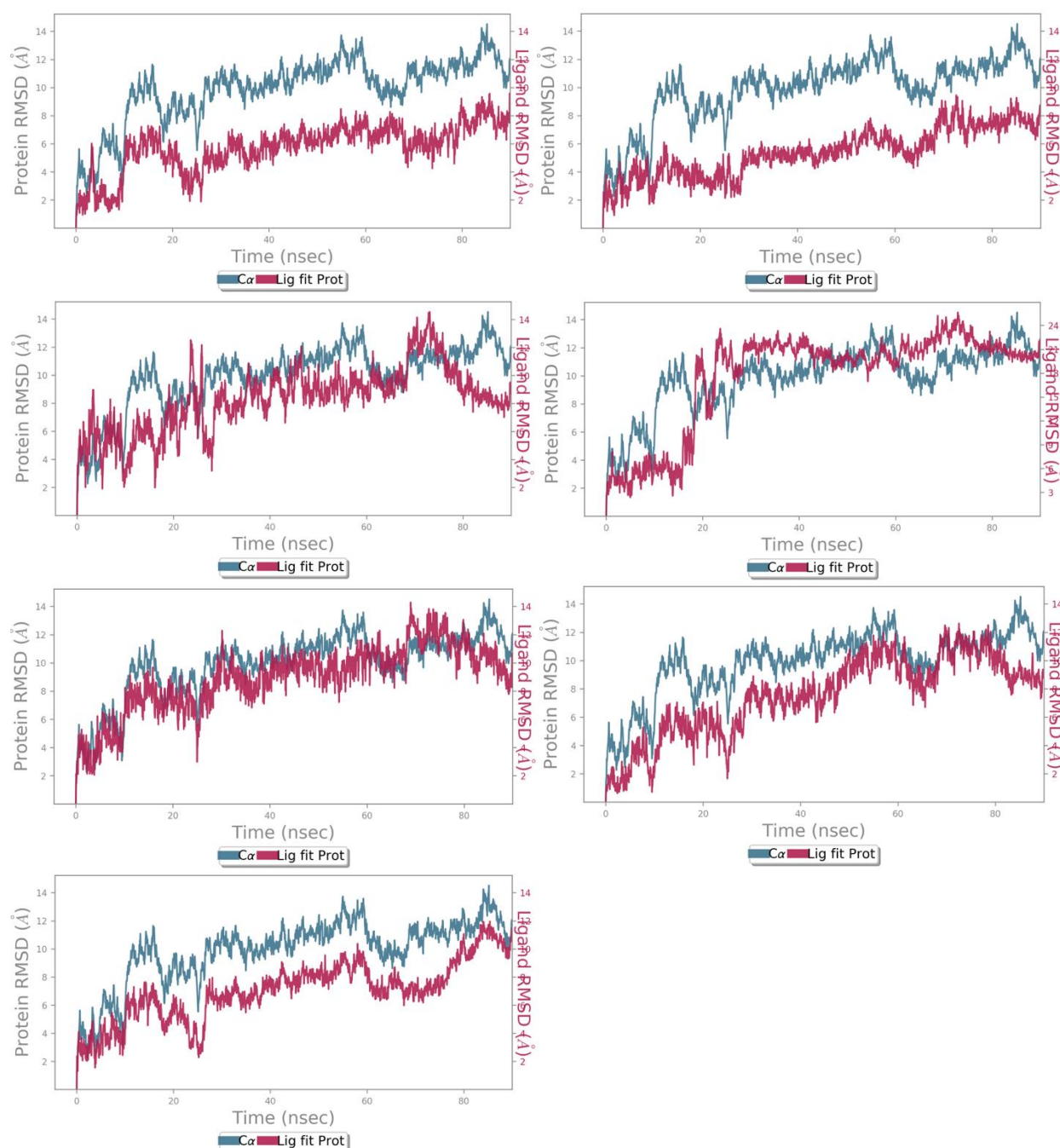


Рисунок 4. RMSD системы БСА — квакхурин в процессе МД-симуляции.

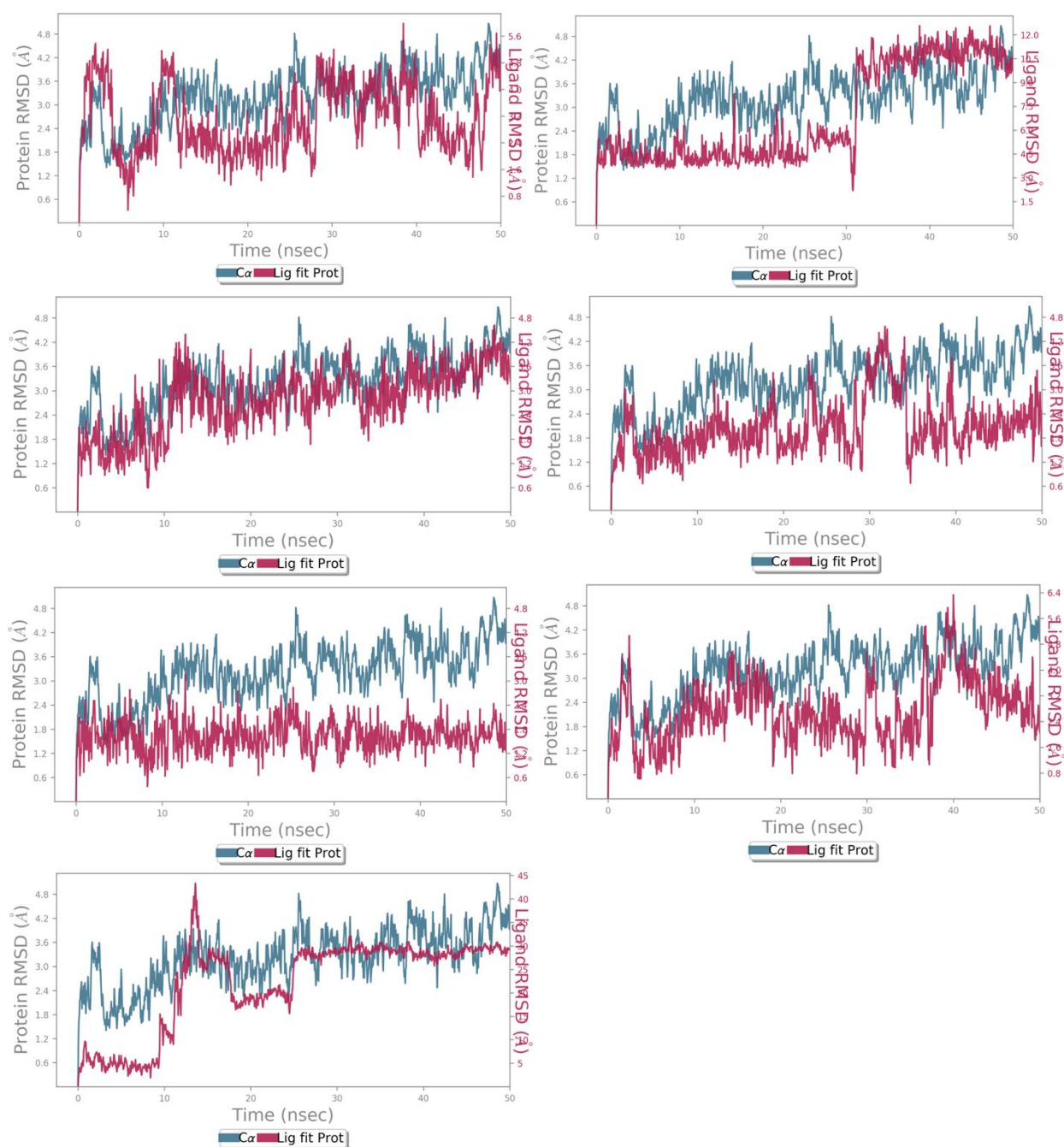
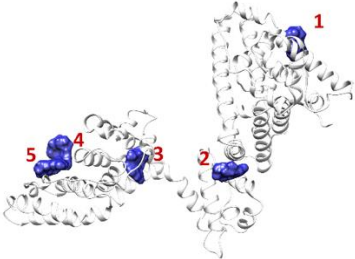
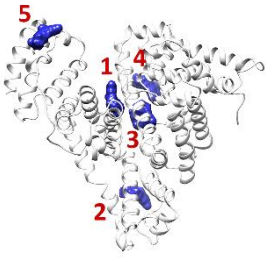
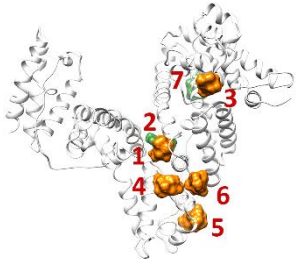
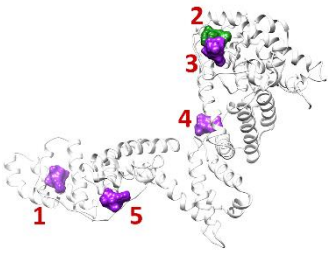
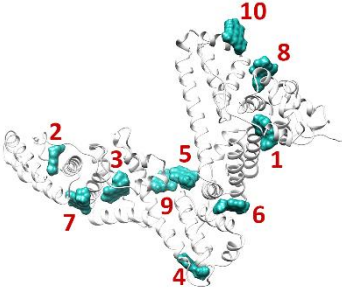


Рисунок 5. RMSD системы БСА — дезоксиниваленол в процессе МД-симуляции.

Таблица 1. Рассчитанные параметры взаимодействия БСА с различными молекулами-шаблонами

Молекула-шаблон	Сайты связывания $\Delta G_{MM-GBSA}$, ккал/моль	Модель ассоциата БСА — молекула-шаблон
Зеараленон	1: -33,8	
	2: -40,9	
	3: -47,8	
	4: -35,1	
	5: -25,7	
Зеараленон (pH 7,4)	1: -40,3	
	2: -37,9	
	3: -28,6	
	4: -23,9	
	5: -23,5	
Дезоксиниваленол	1: -49,8	
	2: -46,5	
	3: -39,0	
	4: -36,7	
	5: -33,8	
	6: -31,6	
	7: -23,3	
Дезокси- дезоксиниваленол	1: -50,5	
	2: -39,3	
	3: -36,0	
	4: -29,3	
	5: -21,7	
Афлатоксин Б1	1: -65,9	
	2: -56,3	
	3: -51,9	
	4: -43,2	
	5: -41,5	
	6: -41,4	
	7: -38,7	
	8: -34,7	
	9: -34,7	
	10: -26,5	

Продолжение Таблицы 1. Приложение 1

Квакхурин	1: -59,8
	2: -53,6
	3: -40,8
	4: -40,5
	5: -37,6
	6: -30,5
	7: -23,6
Имазамокс	1: -61,4
	2: -59,3
	3: -51,9
	4: -49,2
	5: -43,6
	6: -41,6
	7: -39,2
	8: -33,6
	9: -27,3

