

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
ННІ «Фізико-технічний факультет»
Кафедра медичної фізики та біомедичних нанотехнологій

Пояснювальна записка

До дипломної роботи бакалавра

на тему (укр. мова) Взаємодія іонів важких металів з білками за даними
молекулярного докінгу

на тему (англ. мова) The interaction of heavy metal ions with proteins as revealed
by molecular docking

Виконав: студент 4 курсу, групи ТЛ-41

Напрямок підготовки 105 «Прикладна фізика та наноматеріали»



Кирил ЄЛЬЦОВ

(підпис, прізвище та ініціали)

Керівник:



Ольга ЖИТНЯКІВСЬКА

(підпис, прізвище та ініціали)

Рецензент:



Володимир ФАРАФОНОВ

(підпис, прізвище та ініціали)

Харків – 2024 року

АНОТАЦІЯ

Сльцов К.А. – Взаємодія іонів важких металів з білками за даними молекулярного докінгу. – Рукопис.

Дипломна робота бакалавра за спеціальністю 105 «Прикладна фізика та наноматеріали» – Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, 2024.

45 с., 12 рис., 1 табл., 52 джерел.

Розуміння взаємодії важких металів з білками є ключовим для розкриття їхньої ролі в біохімічних процесах та метало-індукованих захворюваннях, при розробці наносенсорів для ідентифікації важких металів із забруднених джерел та наноносіїв для цільової доставки необхідних металів до тканин або клітин. Формулювання наносистем на основі білків, спрямованих на детектування важких металів та/або їх цільової доставки, потребує розуміння здатності білка до зв'язування металів. Такі знання є ключовими для оптимізації дизайну та ефективності цих наносистем.

Метою даної роботи було встановлення особливостей взаємодії іонів важких металів з білками.

Було проведено дослідження зв'язування іонів важких металів з 7S глобуліном сої, гліциніном та β -лактоглобуліном, визначено енергетично вигідні центри зв'язування іонів важких металів та амінокислотні залишки білків, сприятливі для взаємодії.

Порівняння зв'язувальних залишків, сприятливих для комплексоутворення важких металів з різними білками, показує, що метали мають чіткі переваги до певних амінокислотних залишків. Це підкреслює важливість як властивостей самого металу, так і характеристик білка для стабілізації білково-металевих комплексів.

SUMMARY

Yeltsov K.A. – The interaction of heavy metal ions with proteins as revealed by molecular docking. – Manuscript.

Bachelor's project in speciality 105 "Applied Physics and Nanomaterials" – V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2024.

45 pages, 12 figures, 1 table, 52 sources.

Understanding the interaction of heavy metals with proteins is crucial for uncovering their roles in biochemical processes and metal-induced diseases, as well as developing nanosensors for identifying heavy metals from contaminated sources and nanocarriers for targeted delivery of essential metals to tissues or cells. Formulating protein-based nanosystems aimed at detecting heavy metals and/or their targeted delivery requires understanding the protein's metal-binding capabilities. Such knowledge is key to optimizing the design and efficiency of these nanosystems.

This study aimed to establish the characteristics of the interaction between heavy metal ions and proteins. The research involved studying the interaction of heavy metal ions with soybean 7S globulin, glycinin, and β -lactoglobulin, identifying energetically favorable binding sites for heavy metal ions and amino acid residues of the proteins involved in interaction.

Comparing the binding residues favorable for complexation of heavy metals with different proteins shows that metals have clear preferences for certain amino acid residues. This underscores the importance of both the metal's properties and the protein's characteristics in stabilizing protein-metal complexes.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
SUMMARY	3
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1 Вплив іонів важких металів на людей Помилка! Закладку не визначено.	
1.2 Сенсорні системи на основі білків для ідентифікації іонів важких металівПомилка! Закладку не визначено.	
1.3 Механізми взаємодії іонів металів з білками	16
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	20
2.1 Метод молекулярного докінгу	Помилка! Закладку не визначено.
2.2 Сервер прогнозування зв'язування іонів металів MIB	Помилка! Закладку не визначено.
2.3 Алгоритм молекулярного докінгу	20
РОЗДІЛ 3. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ	24
3.1 Взаємодія іонів важких металів з лактоглобуліном	Помилка! Закладку не визначено.
3.2 Взаємодія іонів важких металів з 7S глобуліном сої	Помилка! Закладку не визначено.
3.3 Взаємодія іонів важких металів з гліциніном сої Помилка! Закладку не визначено.	
ВИСНОВКИ	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	40

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

МІВ – сервер прогнозування взаємодії іонів важких металів з білками.

ВМТ – вірус табачної мозаїки.

BSA - сироватковий альбумін бика

ВСТУП

Дослідження взаємодії між білками та важкими металами має важливе значення для розуміння їхньої біохімічної ролі в регуляції багатьох життєво-необхідних фізіологічних процесів та молекулярних основ металоіндукованих захворювань. Метали можуть втручатися в біологічну активність правильно згорнутих білків через різні взаємодії, включаючи зв'язування з вільними тіолами або іншими функціональними групами, витіснення іонів життєво-необхідних металів у металопротеїнах або каталізацію окислення бічних ланцюгів амінокислот [1-3]. Зокрема, інтеграція іонів металів з білковими системами сприяла створенню високоупорядкованих гібридних наноматеріалів на основі білків, які мають унікальні електричні, оптичні та електронні властивості, високу фотостабільність та біосумісність, що робить їх привабливими для різних застосувань у біологічній візуалізації, перетворенні сонячної енергії, хімічному зондуванні та інших [4-7]. Зокрема, амілоїдні фібрили, що самозбираються з різних білків (β -лактоглобулін, глобулін, шовк, альбумін тощо), продемонстрували чудову ефективність в очищенні стічних вод, забруднених важкими металами та радіоактивними сполуками [4-7]. Крім того, для підвищення біодоступності життєво-необхідних металів у харчових добавках або для розробки лікарських препаратів на основі металів з оптимізованою ефективністю та безпекою можуть бути сконструйовані нанопереносники металів на основі білків [8, 9]. Розуміння молекулярних механізмів, що лежать в основі взаємодії між рослинними білками та важкими металами, є важливим для розробки ефективних стратегій фіторемедіації. Вищезазначене застосування вимагає всебічного розуміння здатності білків зв'язувати метали. Експериментальні методи, такі як рентгенівська кристалографія, ЯМР-спектроскопія, електронна мікроскопія та абсорбційна спектроскопія, надають найбільш достовірну інформацію для вивчення білково-металевих взаємодій. Незважаючи на їхню точність і достовірність у при дослідженні взаємодії іонів важких металів з

білками, ці методи мають суттєві недоліки, включаючи високу вартість, тривалий час виконання та складність. Протягом останніх десятиліть обчислювальні методи стали безцінними інструментами для відносно швидкої та простої ідентифікації сайтів зв'язування металів з білками.

Ця робота була спрямована на дослідження механізмів взаємодії іонів важких металів із білками за допомогою молекулярного докінгу.

Для виконання мети було виконано наступні завдання:

- 1) ідентифікувати та охарактеризувати сайти зв'язування іонів важких металів (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Cu^+ , Au^+ , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Pt^{2+} , Sm^{3+} , and Sr^{2+}) з білками β -лактоглобуліном, 7S глобуліном та гліциніном з сої ;
- 2) оцінити вплив структури білків на їхню іон-зв'язуючу здатність та селективність.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Вплив іонів важких металів на людей.

Досі не існує єдиного та доведеного критерію, що таке взагалі важкі метали, оскільки не існує всіма визнаної умови відмінності від інших елементів. Сьогодні враховують не стільки хімічні та фізичні властивості металів, скільки токсичність для живих організмів, біологічну активність, ступінь залученості до природних і техногенних циклів та поширеність у природному середовищі. Важкі метали, нечітко визначена група елементів, що включає перехідні метали та деякі металоїди, зазвичай мають атомний номер більше 20 та атомну густину більше $5 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$ [10, 11]. Хоча класифікація є предметом постійних дискусій (Рис.1.1), деякі важкі метали, такі як Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} та Zn^{2+} в даний час визнані незамінними в певних кількостях [12, 13]. На противагу цьому, іони несуттєвих важких металів, таких як Pb^{2+} і Hg^{2+} , є токсичними навіть у незначних кількостях, викликаючи зміни біохімічних процесів і потенційно призводячи до різних захворювань у живих організмах [14, 15].



Рис. 1.1 Класифікація іонів важких металів

Життєвонеобхідні важкі метали виконують біохімічні та фізіологічні функції в організмі. Вони є важливими складовими кількох ключових ферментів і відіграють важливу роль у різних окисно-відновних реакціях. Наприклад, мідь слугує незамінним кофактором для кількох ферментів, пов'язаних з окислювальним стресом, включаючи каталазу,

супероксиддисмутазу, пероксидазу, цитохром с оксидази, фероксидази, моноаміноксидазу та дофамін β -монооксигеназу. Таким чином, вона є необхідним живильним елементом, який входить до складу багатьох металоферментів, що беруть участь у формуванні гемоглобіну, метаболізмі вуглеводів, біосинтезі катехоламінів і зшиванні колагену, еластину і кератину волосся [16, 17]. Здатність міді циклічно переходити між окисненим станом Cu(II) і відновленим станом Cu(I) використовується купроензимами, залученими в окисно-відновні реакції. Однак саме ця властивість міді також робить її потенційно токсичною, оскільки переходи між Cu(II) і Cu(I) можуть призводити до утворення супероксидних і гідроксильних радикалів. Крім того, надмірне вплив міді пов'язаний з пошкодженням клітин, що призводить до хвороби Вільсона у людей. Подібно до міді, кілька інших есенціальних елементів необхідні для біологічного функціонування, однак надлишок таких металів спричиняє пошкодження клітин і тканин, що призводить до різних негативних наслідків і захворювань людини. Для деяких, включаючи хром і мідь, існує дуже вузький діапазон концентрацій між корисними і токсичними ефектами.

Важкі метали потрапляють в організм людини інгаляційним шляхом або через шкіру та шлунково-кишковий тракт. При промисловому забрудненні один із головних шляхів проникнення в організм - це поглинання з пилом. Після вдихання багато металів осідає в легенях і лише потім потрапляє до інших органів. Проте найпоширеніший шлях, завдяки якому токсичні метали опиняються в організмі, - через споживання їжі та води. Згідно з даними ВООЗ/Європи, допустимі норми споживання протягом тижня важких металів, таких як Hg, Pb, Cd, і As, становлять відповідно 0,0016, 0,025, 0,007 та 0,015 мг на кілограм маси тіла. Прикладаються значні зусилля для зменшення загрози забруднення довкілля важкими металами для здоров'я людини.

Незважаючи на численні дослідження, молекулярні механізми, що лежать в основі токсичності важких металів, до кінця не вивчені [18,19]. Основними факторами, через які важкі метали можуть проявляти свою

токсичну дію, є I) утворення активних форм кисню та окислювальний стрес [20,21]; II) порушення функції мембран та засвоєння поживних речовин [22]; III) пошкодження ДНК та порушення механізму репарації ДНК [23] та IV) порушення функції та активності білків [24].

В відповідь на надмірне надходження важких металів в організм, він може обмежити або навіть нейтралізувати токсичний вплив завдяки певним механізмам детоксикації. Проте на сьогоднішній специфічні механізми детоксикації для іонів металів досліджені недостатньо. Значна кількість металів в тілі можуть переходити в менш хворобливі форми за різними шляхами:

- - утворення комплексів, які не розчиняються, у кишковому тракті.
- - перенесення металу кров'ю до інших тканин, де він може бути затриманий. (як, наприклад, Pb^{2+} у кістках).
- - перетворення в нирках та печінці на менш шкідливу форму

Так, у відповідь на дію токсичних іонів кадмію, свинцю, ртуті та інших металів нирки та печінка людини множать синтез білків малої молекулярної маси, які складаються з приблизно 20 із 61 амінокислотних залишків, основа яких - цистеїн. Висока концентрація та специфічне розташування сульфгідрильних SH-груп можуть сприяти ефективному утриманню іонів важких металів [25]. Більш того, кілька білкових макромолекул містять вільні сульфгідрильні групи, які можуть реагувати з іонами токсичних металів, таких як свинець, ртуть і кадмій, що спричиняє виникнення токсичних наслідків. Але поки що не встановлено, які саме макромолекули відповідають за негативні наслідки для живого організму. Токсичність іонів металів у різних тканинах і органах не завжди корелює з рівнем їхнього накопичення. Немає гарантії, що найбільші ушкодження відбуваються там, де концентрація металу є найвищою. Наприклад, більш ніж 90% іонів свинцю (II) в організмі знаходяться в кістках, що призводить до їх іммобілізації. Однак залишкові

10% розподілені в інших тканинах, що призводить до токсичності. Також можна розглядати іммобілізацію іонів свинцю в кістках як спосіб детоксикації.

Одним з найбільш токсичних для організму людини металів є арсен. Забруднення високими рівнями арсену викликає занепокоєння, оскільки арсен може спричиняти низку негативних наслідків для здоров'я людини. Зокрема високі концентрації арсену впливаю викликають серцево-судинні та периферичні судинні захворювання, аномалії розвитку, неврологічні та нейроповедінкові розлади, діабет, втрату слуху, портальну фіброзу, гематологічні розлади (анемію, лейкопенію та еозинофілію) та карциному [16]. Вплив арсену впливає практично на всі системи організму, включаючи серцево-судинну, нервову, гепатобіліарну, ниркову, шлунково-кишкову та дихальну системи. Дослідження також вказують на значно вищі стандартизовані показники смертності від раку сечового міхура, нирок, шкіри та печінки в багатьох районах забруднення арсеном [16]. Серйозність негативних наслідків для здоров'я залежить від хімічної форми арсену, а також є залежною від часу та дози впливу. Хоча докази канцерогенності арсену для людей здаються сильними, механізм, за допомогою якого він викликає пухлини у людей, не повністю зрозумілі.

Основними шляхами впливу кадмію є інгаляція або вдихання диму сигарет і вживання їжі. Абсорбція через шкіру зустрічається рідко. Вплив кадмію на людину можливий через низку джерел, включаючи роботу в первинній металургійній промисловості, вживання забрудненої їжі, куріння сигарет і роботу на підприємствах, забруднених кадмієм, при цьому куріння є основним фактором. Інші джерела кадмію включають викиди від промислової діяльності, включаючи видобуток корисних копалин, виплавку та виробництво батарей, пігментів, стабілізаторів і сплавів. Важливим шляхом розподілу є кровеносна система, де кровеносні судини вважаються основними органами токсичності кадмію. Хронічний інгаляційний вплив частинок кадмію зазвичай пов'язаний зі змінами у функції легенів. Кілька епідеміологічних досліджень задокументували зв'язок хронічного

низькорівневого впливу кадмію зі зниженням мінеральної щільності кісток і остеопорозом [26]. Хоча механізми токсичності кадмію погано вивчені, вважається, що кадмій спричиняє пошкодження клітин головним чином через утворення активних форм кисню (ROS), які викликають одноланцюгові пошкодження ДНК і порушують синтез нуклеїнових кислот і білків [16].

1.2. Сенсорні системи на основі білків для виявлення іонів важких металів.

Люди піддаються впливу іонів важких металів через різні джерела, такі як вода, повітря, ґрунт і їжа. Забруднення важкими металами стає проблемою для глобальної сталості. Тому надійні методи виявлення і кількісного визначення цих іонів металів на поверхні води і в рідинах організму дуже важливі для покращення здоров'я населення. Традиційні методи вимірювання важких металів включають атомно-абсорбційну спектроскопію, індуктивно-зв'язану плазму / мас-спектрометрію, індуктивно-зв'язану плазму / атомно-емісійну спектроскопію, ультрафіолетово-видиму спектроскопію і т.д. Хоча ці техніки дуже чутливі та селективні, вони вимагають муторної підготовки та попередньої концентрації зразків, дорогого обладнання та кваліфікованого персоналу. Більше того, їх не можна використовувати як портативні пристрої для миттєвого виявлення на місці. У порівнянні з цим, нові наносенсори мають великий потенціал для високопродуктивного виявлення багатьох важких металів на місці. Швидкий розвиток нанотехнологій надав нові можливості для покращення характеристик сенсорів у відношенні до чутливості, межі виявлення, селективності та відтворюваності. Вкрай перспективними на даний момент вважаються біосенсори, що в якості елемента використовують макромолекули різної природи для виявлення іонів важких металів.

Біосенсори — це аналітичні сенсорні пристрої, які поєднують фізичні та хімічні методи виявлення [27]. Їх продуктивність базується на прямому контакті двох елементів: біологічного та фізико-хімічного, міцний зв'язок між якими досягається фізичними або хімічними методами іммобілізації. Біологічний елемент слугує рецептором (біорецептором), тобто він відповідає

за розпізнавання конкретного аналізованого об'єкта в середовищі на основі взаємодії аналізованого об'єкта та біорецептора. Фізико-хімічний перетворювач перетворює відповідь, що виникає внаслідок взаємодії аналізованого об'єкта та біорецептора на їхньому інтерфейсі, у вимірюваний сигнал, який може бути оброблений та відображений у вигляді читабельних значень. Для належної роботи біосенсора біологічна сполука має бути іммобілізована в безпосередній близькості до перетворювача, і іммобілізація може здійснюватися шляхом фізичного утримання або хімічного приєднання [27]. Необхідна лише невелика кількість молекул біорецептора, і вони можуть багаторазово використовуватися для вимірювань.

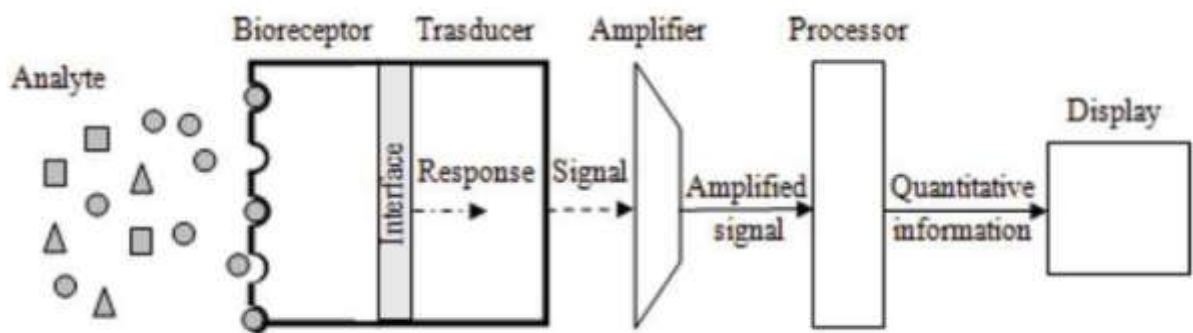


Рис. 1.2. Схематичне зображення принципу роботи біосенсорів [27]

Білки, такі як фітохелатини або металотіонеїни, можуть використовуватися як біологічні компоненти в біосенсорах при іммобілізації на поверхні перетворювача [27]. Взаємодія білків і металів у біосенсорі реалізується через утворення комплексів, тому зміни у білковому шарі, що виникають в результаті, виявляються шляхом вимірювання електричної ємності або імпедансу за допомогою відповідного перетворювача. Використання білкового біосенсора дозволило оцінити біодоступні концентрації важких металів. Крім того, використовуючи ємнісні сенсори, які належать до класу електрохімічних біосенсорів, можна досягти значно вищої

чутливості до низьких концентрацій важких металів у порівнянні з пристроями на основі клітин.

В цьому відношенні білки, особливо важливі, оскільки містять в своїй структурі багато принциповажливих функціональних груп, що здатні взаємодіяти з іонами важких металів. Так, наприклад, Байрам з колегами продемонстрували, що мутант білка оболонки вірусу табачної мозаїки ВТМ може бути вкрай ефективним для селективного виявлення і кількісного визначення іонів важких металів, таких як Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} і Ni^{2+} [28]. Основний принцип роботи даного сенсору-це гасіння власної флуоресценції білку. Варто зазначити, що білок оболонки ВТМ є недорогим, може масово вироблятися, оскільки він експресується та екстрагується з *E. coli*. Він також має кілька різних функціональних груп, що дозволяє використовувати широкий спектр біокон'югаційних хімічних реакцій; таким чином, його можна легко інтегрувати у функціональні пристрої. Цікаво, що дана сенсорна система можемо розрізняти хімічно подібні іони важких металів, такі як іони кадмію та цинку [28].

Коу з колегами розробили стратегію синтезу адсорбентів важких металів на основі гідрогелю в м'яких фізіологічних умовах шляхом ковалентного зшивання металопротеїнів, таких як інженерні супер уранил-зв'язуючі білки (SUP) і природні молібдат/хромат-зв'язуючі білки (ModA) [29]. Отримані рекомбінантні білкові гідрогелі продемонстрували здатність вибірково вилучати уранил з морської води та хромат з водопровідної води. Ці результати вказують на зручний і універсальний підхід до перетворення металопротеїнів у макроскопічні адсорбенти металів з величезним потенціалом у галузі альтернативної енергетики, а також для очищення від важких металів [29].

В дослідженні [30] було показано потенціал бичачого сироваткового альбуміну (BSA) для визначення декількох іонів важких металів. Для розроблення нового біосенсора були оптимізовані різні параметри, включно з поверхневим ефектом і концентрацією зонда BSA, і він був протестований з

різними іонами важких металів, такими як Cu^{2+} і Pb^{2+} . Відтворюваність, селективність і ефективність цього сенсора контролювали за результатами оптичних рідких кристалів.

Можливість детектування іонів важких металів була також продемонстрована для модифікованого зеленого флуоресцентного білка (eGFP), шляхом модифікації метал-зв'язуючих петель в петлевій ділянці eGFP, щоб зробити цей білок неактивним [31]. Цікаво, що зв'язування металевих іонів з eGFP викликає його конформаційну зміну та відновлює початкову активність. Зокрема, eGFP відновлює флуоресценцію при контакті з Cd та Hg, що дозволяє кількісно визначити зазначені метали в діапазоні концентрацій від 0 до 5 μM . З використанням цього підходу розроблену сенсорну платформу для кількісного визначення Cd у штучно збагачених зразках ґрунту та води. Хоча отримані результати вказують на необхідність значного покращення продуктивності сенсора, представлена концепція дизайну, як вважається, має високу цінність для дослідників у галузі виявлення важких металів і сприятиме розробці нових біосенсорів [31].

В останні роки продемонстровано значну роль амілоїдних фібрил білків різних класів для детектування та очищення різноманітних середовищ від іонів важких металів [32-36]. Зокрема, амілоїдні фібрили, що самозбираються з різних білків (β -лактоглобулін, глобулін, шовк, альбумін тощо), продемонстрували чудову ефективність в очищенні стічних вод, забруднених важкими металами та радіоактивними сполуками [32-36]. Zang з колегами виявили, що β -лактоглобулін-стабілізовані флуоресцентні нанокластери золота є перспективними для селективного наномолярного виявлення Hg^{2+} у напоях, сечі та сироватці крові [37]. Peydayesh et al. продемонстрували ефективність амілоїдних фібрил β -лактоглобуліну у видаленні важких металів шляхом виготовлення гібридної мембрани з активованим вугіллям [35]. Виявлено, що іони важких металів ефективно і міцно адсорбуються на амілоїдних фібрилах β -лактоглобуліну через міцні супрамолекулярні взаємодії метал-ліганд, причому величина поглинання залежить від

конкретного важкого металу [35]. Новий клас рослинних білків під назвою металогістини, був використаний для створення мікрокантилеверного біосенсора для виявлення іонів металів, таких як Hg(II) та Zn(II) [36]. Металогістин був прикріплений до покритої золотом сторони кантилеверів з нітриду кремнію через з'єднувальні групи [36]. Продемонстровано, що мікрокантилевер може бути використаний для розрізнення іонів металів, що зв'язуються і не зв'язуються з металогістином [38].

Окрім того, можливість *in situ* визначення іонів Cu(II) було продемонстровано за допомогою волоконно-оптичного біосенсора на основі флуоресценції [39]. Біокомпонентом є варіант людської карбоангідрази II, який був мічений флуорофором, що прикріплений до дистального кінця оптичного волокна, який зв'язує вільний Cu(II) з високою афінністю та селективністю [39]. Основа перетворення полягає в тому, що зв'язування іона металу з флуорофором специфічного місця призводить до часткового гасіння флуоресценції. Обмеженням даного сенсору є те, що він втрачає стабільність через кілька годин. Потенційні причини цього погіршення включають біообростання, денатурацію білка та втручання інших іонів металів, таких як Zn(II) або Hg(II) [39].

1.3. Механізми взаємодії іонів важких металів з білками.

Загальновідомо, що взаємодія металів з білками може призвести до утворення металопротеїнів, металокомплексів та наночастинок. Зокрема, металопротеїни утворюються завдяки координаційним зв'язкам між іонами металів та функціональними групами амінокислот білків, наприклад, карбоксильними групами, що вбудовуються у структуру білка [40]. Ці функціональні групи білків формують спеціальні місця зв'язування у вигляді "порожнин", що визначаються четвертинною структурою білка та його біологічною активністю. Металопротеїн також може взаємодіяти з іонами металів, утворюючи металокомплекси або наночастинок металів/оксидів металів [40]. Металокомплекс є штучною системою, визначеною слабкими

взаємодіями, такими як електростатичні взаємодії, водневі зв'язки, сили Ван дер Ваальса або донорно-акцепторні зв'язки, які сильніші за попередні взаємодії. Афініть зв'язування іонів металів до білка у металокомплексі також може визначатися індуктивними (штучними) місцями зв'язування та колективною силою слабких взаємодій. На відміну від металопротеїнів, взаємодії, що ведуть до утворення металокомплексів, відбуваються переважно через сорбцію або внутрішньочасткову дифузю, тоді як іон металу в металопротеїні вбудований або "занурений" у структуру білка, утворюючи природну систему, як, наприклад, у гемоглобіні та трансферині [40]. Взаємодії білка та іонів металів з активними функціональними групами амінокислот можуть бути зворотними та лабільними, що призводить до утворення наночастинок, як було показано у дослідженні ЛТФ та іонів срібла [41]. Утворена система, що складається з металопротеїну, металокомплексу та наночастинок, може вважатися наноконкомпозитом.

З теоретичної точки зору статистично різні типи взаємодій іона металу з різними функціональними групами білка можуть відбуватися одночасно, однак кінцевий результат залежить від умов такої взаємодії (температура, рН тощо), що визначають конформацію білка, його згортання/розгортання та, таким чином, формування місць зв'язування для іона металу, орієнтацію функціональних груп білка (стеричний фактор для взаємодії). Це також пояснює сильні координаційні зв'язки іона металу з білком у металопротеїні, оскільки багато факторів можуть призвести до утворення "порожнин" як місць зв'язування для іона металу, які досить важко відтворити у штучній системі, що робить можливим синтез переважно металокомплексів, тоді як металопротеїни утворюються переважно природним шляхом. Наприклад, сорбція на поверхні білка, що характерно для металокомплексів, може відбуватися через слабкі нековалентні взаємодії, які є нестабільними і оборотними. Координаційні зв'язки, що дозволяють вбудовувати метал у структуру білка, є сильнішими. Поліпептидні ланцюги білків зазвичай координуються з іоном металу, а бічні ланцюги з функціональними групами

можуть виступати додатковими місцями зв'язування для металів, включаючи імідазольну групу гістидину, карбоксильну групу аспартату та глутамату, фенольне кільце тирозину, та азотні атоми в бічних ланцюгах лізину та аргініну [42]. Водневі, електростатичні та гідрофобні зв'язки, а також взаємодії Ван дер Ваальса мають важливе значення для взаємодії металів з білками, що суттєво впливає на стабілізацію білкових структур. Фактори, що впливають на зв'язування металу з білками, включають також і властивості металу, такі як валентний стан, іонний радіус, здатність приймати заряд та концентрація вільного металу в відповідному біологічному середовищі [43].

Потрібно зазначити, що при взаємодії іонів металів з білками принципово важливими є декілька факторів [44].:

- 1) Ступінь протонування амінокислотних груп білка, оскільки реакція між іоном металу та амінокислотою зазвичай включає амінні та карбоксильні групи.
- 2) Наявність бічних ланцюгів, оскільки цистеїн і гістидин мають особливо сильну спорідненість до певних металів.
- 3) Стереохімія комплексу. Білкова система, яка реагує з іоном металу, повинна бути присутня у правильній тетраедричній, октаедричній або квадратно-планарній конфігурації для забезпечення сильної координації. Так, наприклад, стереохімічний фактор важливий при зв'язуванні Cd^{2+} з білком. Наприклад, діаметр Cd^{2+} становить 1.94 Å у порівнянні з 1.48 Å для Zn^{2+} ; діаметри гідратованих іонів складають приблизно 4.8 Å та 4.4 Å відповідно. Місця зв'язування певних розмірів можуть вміщувати як іон металу, так і іон у різних станах гідратації [44].

Примітно, що під дією металів також може відбуватися агрегація білків, що призводить до втрати біологічної активності та осадження. Агрегації білків, спричинену металами, можна пояснити теорією Дерягіна–Ландау–Фервея–Овербека (DLVO) про внутрішньочасткові взаємодії, яка розглядає стабільність біологічної системи в термінах балансу між силами Ван дер

Ваальса та відштовхуючими силами подвійного електричного шару [45].
Додавання іонів металів зміщує баланс у бік збільшення сил притягання, посилюючи взаємодію між білковими одиницями, що призводить до утворення великих агрегатів [45].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Молекулярний докінг

Метод молекулярного докінгу є майже незамінним інструментом у галузі медичної хімії та біоінформатики. Цей метод вчені використовують для більш детального вивчення взаємодії між біомолекулами, зокрема між білками-мішенями та ліками. Для комплексного вирішення структурних проблем під час молекулярного докінгу використовуються різноманітні комп'ютерні алгоритми та математичні моделі. Даними, якими зазвичай користуються в процесі докінгу, є тривимірні структури макромолекул. Молекулярний докінг працює на принципі пошуку найбільш енергетично вигідних конформацій та орієнтацій молекул, що забезпечують найкращу взаємодію між лігандом та мішеневим білком. Для досягнення цього використовуються методи перебору різноманітних конформаційних просторів та оптимізації, щоб знаходити енергетично стабільні комплекси. віртуальне моделювання великої кількості молекул.

Для вивчення різних важливих моментів взаємодії з білками було розроблено багато різноманітних інструментів, які прогнозує структуру білків, таких як Vspred, QUARK, та які можуть прогнозувати ділянки зв'язування лігандів CHED, GRID, COACH, Metaldetector, SeqCHED.

2.2. Сервер прогнозування зв'язування іонів металів MIB

Для визначення найбільш енергетично вигідних місць зв'язування іонів важких металів на білках були проведені молекулярні докінгові дослідження з використанням сервера прогнозування та моделювання місць зв'язування іонів металів MIB2 [46]. MIB - це сервер для прогнозування докінгу та сайтів зв'язування іонів металів, який надає досить точний та інтегрований підхід до пошуку залишків у металозв'язуючих сайтах з використанням методу трансформації фрагментів, порівнянні зі структурою білка у базі даних PDB

для виявлення металозв'язуючих залишків. Для кожного залишку досліджуваного білка надається оцінка зв'язування, що враховує показники збереженості структури та послідовності. При перевищенні оцінкою зв'язування залишку певного порогу цей залишок визнається металозв'язуючим. За допомогою локального вирівнювання 3D-структур між досліджуваним шаблоном, який зв'язує іон металу і білком, іон металу у шаблоні може бути адаптований до структури досліджуваного білка. Після прогнозування МІВ також має можливість візуалізувати докінг іонів металу. При розробці МІВ були зібрані структури білкових комплексів з принаймні одним іоном Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cu^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} чи Zn^{2+} з бази даних PDB [46]. За допомогою цих металозв'язуючих білків МІВ було визначено шаблони металозв'язуючих залишків. Кожний шаблон відображав місцеву структуру металозв'язуючих залишків, тобто залишків, які хоча б частково знаходилися в межах $3,5 \text{ \AA}$ від іона металу. Поліпептидний ланцюг, що містить металозв'язуючі місця, описувався як білок, який взаємодіє щонайменше з одним визначеним іоном металу. У випадку взаємодії металозв'язуючого поліпептидного ланцюга з двома або більшою кількістю іонами металів, для кожного іона металу будувалися свої шаблони металозв'язування.

Для узгодження металозв'язуючого шаблону T із білком-запитувачем S сервер МІВ використовує метод трансформації фрагментів [46]. Кожний залишок був окремою структурною одиницею, яку утворювали атоми N-C α -C цього залишку. S вказував на білок запити довжиною m , T вказує на шаблон з n залишків, а δ вказує на іон металу, який знаходиться в шаблоні T . Таким чином, шаблон T з n залишків і білок запити S довжиною m можуть бути представлені в термінах триплетів як $T = \{\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_n\}$ та $S = \{\sigma_1, \sigma_2, \dots, \sigma_m\}$, де $\tau_j = \{v_N, v_{C\alpha}, \dots, v_C\}$, $\sigma_i = \{u_N, u_{C\alpha}, \dots, u_C\}$, а v і u - координати PDB кожного атома. Після при розробці МІВ було побудовано матрицю M для залишків T та S , де кожний елемент M_{ij} - це матриця перетворення жорсткого тіла, що трансформує триплет σ_{ij} в τ_j (іншими

словами, $M_{ij}\sigma_i = \tau_j$). Декартова відстань D_{kl}^{ij} обчислювалась між перетвореним триплетом $M_{ij}\sigma_k$ та мішенню τ_l , що забезпечувало міру подібності орієнтованих пар триплетів (σ_i, τ_j) і (σ_k, τ_l) . Все це дозволило групувати частини триплетів, користуючись алгоритмом однозв'язності. Пари триплетів (σ_i, τ_j) і (σ_k, τ_l) кластеризувалися, якщо $D_{kl}^{ij} < 3 \text{ \AA}$, де $i \neq k$ та $j \neq l$. Ці процедури кластеризації повторювалися ітеративно, поки не утворювався хоча б один новий кластер. Для кожного кінцевого кластера G_μ було отримано матрицю перетворень M_{kl}^μ і вирівняну пару підструктур (S_μ, T_μ) , де $S_\mu = \cup_{\sigma_k \in G_\mu} \sigma_k$, $T_\mu = \cup_{\tau_l \in G_\mu} \tau_l$, а G_μ мав мінімальне середньоквадратичне відхилення між $M_{kl}^\mu S_\mu$ і T_μ . У додаток до цього, у запитуваному білку S положення докінгу іона металу δ' можна було визначити за формулою $\delta' = (M_{kl}^\mu)^{-1} \delta$. Цей метод дозволив вирівняти запитуваний білок з металозв'язуючими шаблонами, а потім кожний кластер був оцінений згідно з його структурною схожістю та послідовністю [46].

Для оцінки подібності послідовності застосовувалася матриця заміщень BLOSUM62, а для порівняння подібності структури використовувалося середньоквадратичне відхилення C α -атомів вирівняних кластерів [46].

2.3 Алгоритм молекулярного докінгу

1) Тривимірні рентгеноструктури білків були отримані з Банку даних білків (<https://www.rcsb.org/>) з використанням PDB ID 3AUP, 1OD5 та 1QG5 для 7S глобуліну з сої, гліциніну та бичачого β -лактоглобуліну відповідно. Для докінгових досліджень було обрано ланцюг А тривимірних рентгеноструктур 7S глобуліну та гліциніну.



Рис. 2.1 Графічне зображення білка 1AO6

2) Для визначення найбільш енергетично вигідних місць зв'язування іонів важких металів на білках були проведені молекулярні докінгові дослідження з використанням сервера прогнозування та моделювання місць зв'язування іонів металів MIB2 [31]. MIB2 використовує техніку трансформації фрагментів та базу даних структури білків AlphaFold для точного прогнозування сайтів зв'язування для 18 іонів металів, включаючи Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Cu^+ , Au^+ , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Pt^{2+} , Sm^{3+} , and Sr^{2+} [31].

3) Аналіз результатів: Оцінка результатів докінгу включає вивчення енергії зв'язування, геометрії зв'язування та впливу на структуру білка.

РОЗДІЛ 3. ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Взаємодія іонів важких металів з лактоглобуліном

β -лактоглобулін, невеликий глобулярний сироватковий білок з молекулярною масою приблизно 18,4 кДа, в даний час широко використовується в розробці нанокompозитів для виявлення іонів важких металів [9, 37]. Зокрема, Zang з колегами виявили, що β -лактоглобулін-стабілізовані флуоресцентні нанокластери золота є перспективними для селективного наномолярного виявлення Hg^{2+} у напоях, сечі та сироватці крові [37]. Peydayesh et al. продемонстрували ефективність амілоїдної фібрили β -лактоглобуліну у видаленні важких металів шляхом виготовлення гібридної мембрани з активованим вугіллям [9]. Виявлено, що іони важких металів ефективно і міцно адсорбуються на амілоїдних фібрилах β -лактоглобуліну через міцні супрамолекулярні взаємодії метал-ліганд, причому величина поглинання залежить від конкретного важкого металу [9]. Розробка наносистем на основі лактоглобуліну для виявлення та цільової доставки важких металів вимагає глибокого розуміння металозв'язувальної здатності білка. Ці знання є важливими для оптимізації дизайну та ефективності таких наносистем у різних сферах застосування. Тому ми застосували метод молекулярного докінгу для ідентифікації сайтів зв'язування β -лактоглобуліну з металами. Докінгові позиції іонів важких металів у структурі β -лактоглобуліну, що відповідають найкращим показникам докінгу, представлені на рисунку 3.1-3.3.

Білок β -лактоглобулін складається з 162 амінокислотних залишків, з одним вільним цистеїном і двома дисульфідними зв'язками [33]. Тривимірні кристалографічні дослідження показали, що β -лактоглобулін переважно має β -листову конфігурацію, яка складається з дев'яти антипаралельних β -ланцюгів (від А до І), де ланцюги А-Д утворюють одну поверхню β -бочки (чашечки), тоді як ланцюги Е-І - протилежну поверхню [33]. Єдиний α -спіральний сегмент, що складається з трьох витків, розташований на COOH -кінці і лежить на зовнішній поверхні чашечки, слідом за ниткою Н [33].

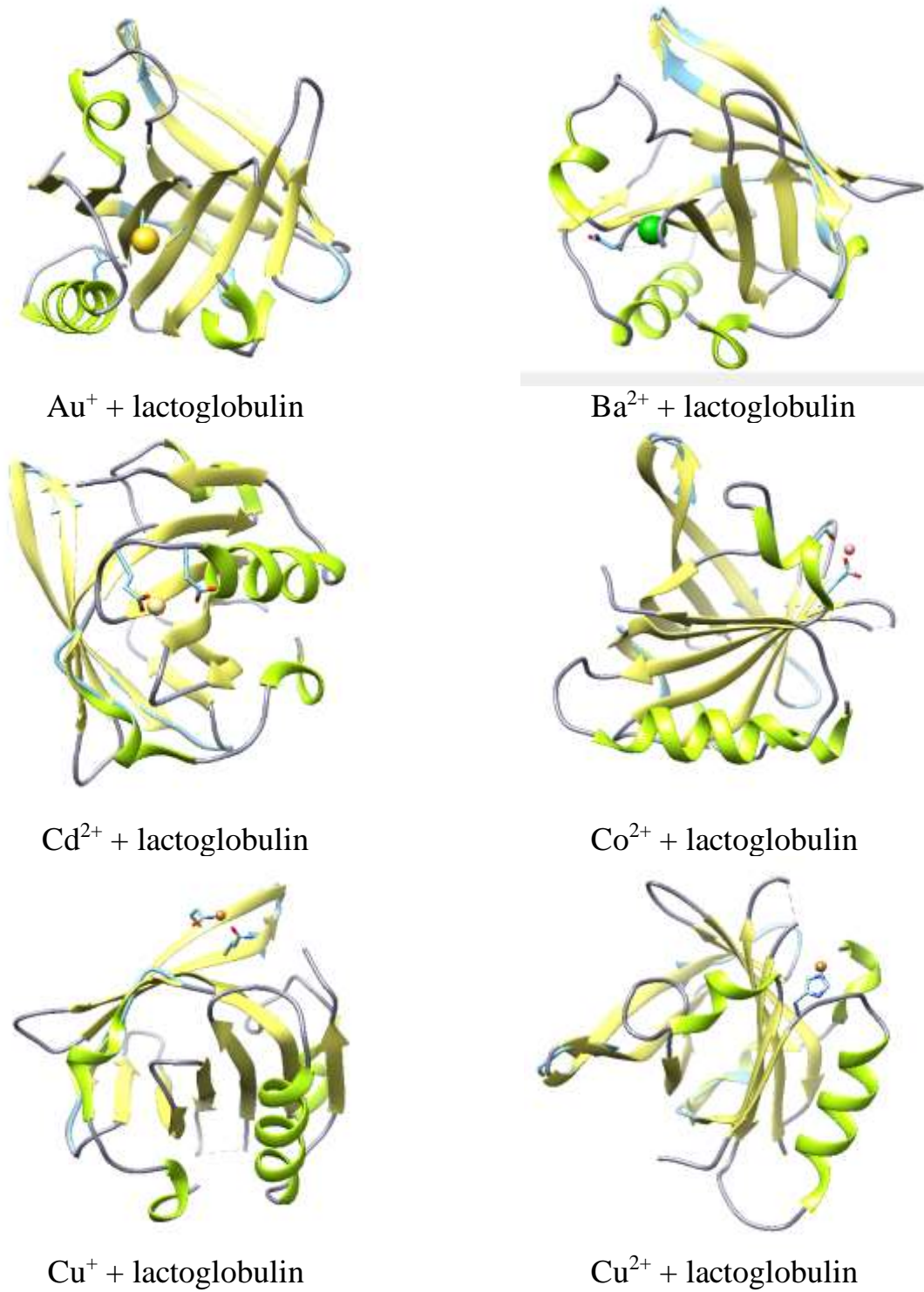
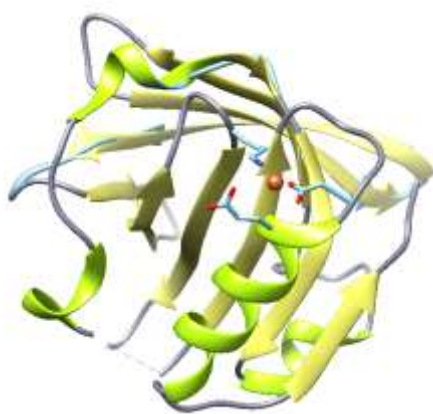


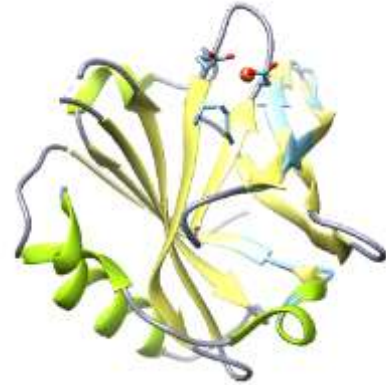
Рис. 3.1 Доковані позиції іонів важких металів з β -лактоглобуліном, що відповідає найкращій моді зв'язування.

Результати докінгу вказують на те, що життєвонеобхідні та токсичні важкі метали зв'язуються з численними сайтами зв'язування β -лактоглобуліну, імовірно, на периферії β -бочки. Амінокислотні залишки, які

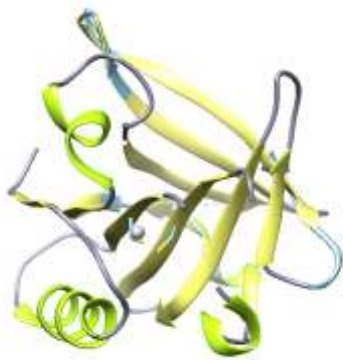
беруть участь у взаємодії іонів металів з білком, представлені в Таблиці 1. Зокрема, важкі метали, такі як Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{+} та Zn^{2+} , взаємодіють з ланцюгом А β -бочки із залишками Asp та Ser. Слід зазначити, що амінокислотні залишки, такі як Ser або Asp, містять атоми азоту або кисню, які відіграють роль електронодонорів у взаємодії ліганду з білком.



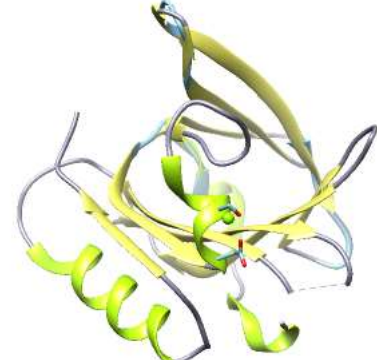
Fe^{2+} + lactoglobulin



Fe^{3+} + lactoglobulin



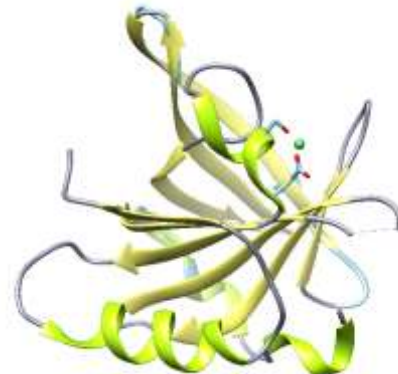
Hg^{2+} + lactoglobulin



Mg^{2+} + lactoglobulin

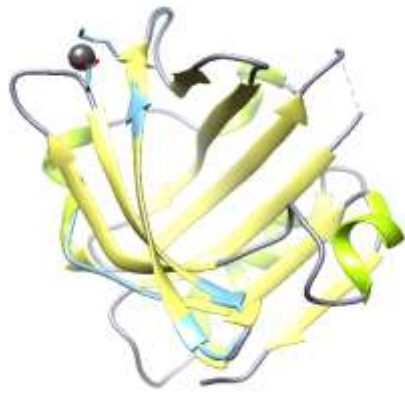


Mn^{2+} + lactoglobulin



Ni^{2+} + lactoglobulin

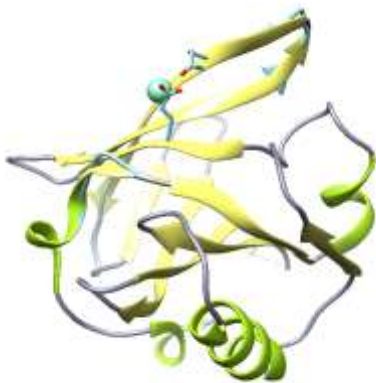
Рис. 3.2 Доковані позиції іонів важких металів з β -лактоглобуліном, що відповідає найкращій моді зв'язування.



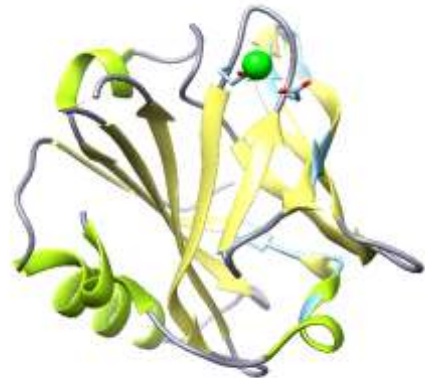
Pb^{2+} + lactoglobulin



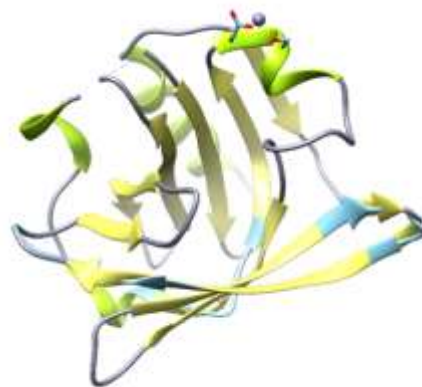
Pt^{2+} + lactoglobulin



Sm^{3+} + lactoglobulin



Sr^{2+} + lactoglobulin



Zn^{2+} + lactoglobulin

Рис. 3.3 Доковані позиції іонів важких металів з β -лактоглобуліном, що відповідає найкращій моді зв'язування.

Наявність двох наборів незалежних сайтів зв'язування цинку було експериментально виявлено для іншого сироваткового білка α -лактальбуміну [47]. Високотоксичні іони металів, такі як Pb^{2+} , Pt^{2+} і Sm^{3+} , утворюють контакти з В-ланцюгом білка, тоді як Cd^{2+} і Hg^{2+} переважно взаємодіють із

залишками біля Н-ланцюга. Негативно заряджена глутамінова кислота бере участь у комплексоутворенні іонів Pb^{2+} , Pt^{2+} , Sm^{3+} та Cd^{2+} з білком. У свою чергу, наші результати докінгу вказують на те, що високотоксичний Hg^{2+} взаємодіє з полярним цистеїном та гідрофобними валіном і лейцином.

Таблиця 3.1

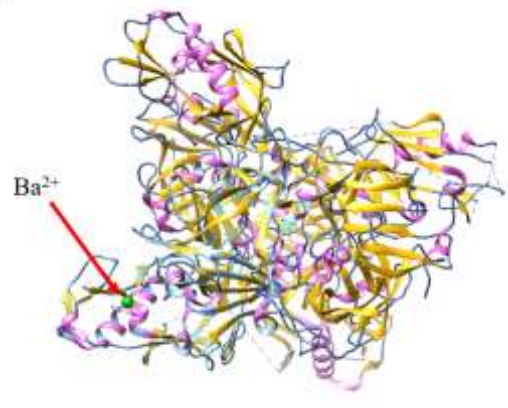
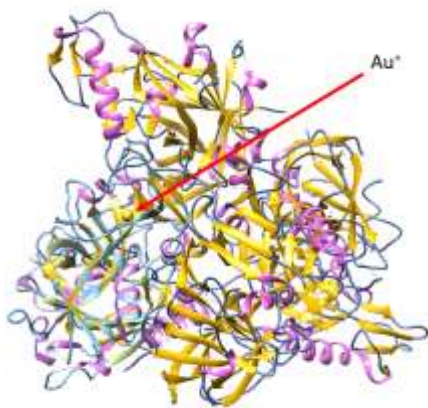
Амінокислотні залишки, що беруть участь в утворенні найбільш енергетично вигідних метало-білкових комплексів

Метал	β -лактоглобулін	гліцинін	7 S глобулін
Cu^{2+}	Pro144, His146	Gln36, His173, Glu175, His21, Asn34, His37	His23, Pro269, Cys81, His90
Fe^{3+}	Lys83, Glu89, Asp96, Asp98	His211, Gln215, Glu221	Gln69, Glu113, Cys65, Asn92
Mg^{2+}	Asp28, Ile29	Asp231, Asp232, Asp121, Glu333, Asn334	Asp114, Val115, Asp17, Ser19, Thr20
Mn^{2+}	Asp28, Ser30	Asp413, Gly414	Asp374, Arg377, His215, Asp216
Zn^{2+}	Asp28, Ser30, Asp96, Asp98	His173, Glu175, Asp20, His37	His215, Asp216, Cys65, Ser67
Cd^{2+}	Glu127, Asp129, Glu131, Lys135	Asp413, Gly414, Asp231, Glu233	Gln171, His175, Asn50, Ser140, Cys141
Fe^{2+}	Lys10, Glu127, Asp129	Lys210, His211, Gln215	His66, His76, Cys78
Ni^{2+}	Asp28, Ser30	Arg115, His116, Lys210, His211	His388, Asp396, His76, Cys78, Cys94
Hg^{2+}	Cys106, Leu117, Val118, Cys119	Phe82, Cys85, Cys327	Phe64, Cys65, Cys78
Co^{2+}	Asp28, Ser30, Glu127, Asp129	Asp20, His37, Lys210, His211	Cys81, His90, Ser389, His390
Cu^{+}	Gln59, Cys66	Cys9, Cys42, Pro425	Cys70, His76, Cys94, Cys81, His90
Au^{+}	Cys106, Lys140	Cys85, Glu323, Pro19, Gln36, His37	Cys141, Ala142, Ser187, Glu368, Cys394
Ba^{2+}	Glu108, Asn109, Gln115	Thr136, Gly137, Asp138, Glu139	Asp334, Lys335, Glu333
Pb^{2+}	Glu51, Glu52, Asp53, Glu74	Asp232, Arg234	Cys65, Cys78, Gly302, Lys303, Cys304, Cys345
Pt^{2+}	Glu51, Glu52, Met24, Arg40, Lys95	Asp232, Lys235	Gln275, Met353, His270, Met349
Sm^{3+}	Glu44, Glu45, Gln68	Asp231, Glu233, Asp232, Lys235	Asp374, Arg377, Glu52, Gln53
Sr^{2+}	Asp85, Leu87, Glu89	Asp20, His21, Thr32, Glu172, Asp157, Gln158, Thr176	Asp41, Ser265, Ser267

Згідно з численними дослідженнями, важкі метали зв'язуються з білками через різні міжмолекулярні взаємодії, імовірно, електростатичні взаємодії та хелатування металів [4-10]. На зв'язування металів з білками впливають декілька факторів, серед яких і) властивості металу, такі як його валентний стан, іонний радіус та здатність до акцептування заряду та ii) властивості білка, такі як амінокислотна послідовність, доступність потенційних металозв'язуючих груп, тип взаємодій, що стабілізують комплексоутворення білок-метал, тощо [8,9, 32-36]. Згідно з теорією «тверда кислота - м'яка основа», що описує взаємодію важких металів на основі їхньої хімічної будови, білки мають вищу здатність до зв'язування «м'яких» металів (Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^+ , Au^+ , Pt^{2+}) порівняно з «твердими» металами (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+}) [48]. Така перевага пов'язана з відмінностями в механізмі їхнього зв'язування: у підтриманні структурної цілісності комплексів білок-«м'який метал» переважає хелатування металів, тоді як за зв'язування «жорстких» металів відповідають електростатичні взаємодії [35]. Як видно з таблиці 1, глютамінова кислота бере участь у комплексоутворенні іонів Pb^{2+} , Pt^{2+} , Sm^{3+} і Cd^{2+} з білками, тоді як «важкі метали» утворюють контакти, ймовірно, з негативно зарядженою аспарагіною кислотою, що добре узгоджується з теорією м'яких основ (Hard Acid Soft Base) [48]. Слід зазначити, що результати докінгу продемонстрували участь амінокислотних залишків Lys, Leu та Val у взаємодії металу з білком «м'яких» (Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^+ , Au^+ , Pt^{2+}) та граничних (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+}) кислот Льюїса, що вказує на можливу роль водневих зв'язків, гідрофобних та ван-дер-ваальсових взаємодій у стабілізації білок-металевих комплексів.

3.2. Взаємодія іонів важких металів з 7S глобуліном сої.

7S глобулін є одним з основних глобулінів, виявлених у насінні сої [49]. Незважаючи на його подвійний субодиничний склад та олігомерну збірку, 7S глобулін має компактну структуру, що складається з β -листів та декількох α -спіралей, а його найбільш помітною особливістю є 12 залишків цистеїну [49]. Ці цистеїни, консервативні серед гомологічних білків, утворюють мережу з п'яти внутрішньоланцюгових і одного міжланцюгового дисульфідного містка [49]. Нещодавно було продемонстровано, що соєвий цистеїн має відмінні металохелатні властивості [50]. Крім того, Лі та ін. показали здатність поліетиленімінового гідрогелю на основі соєвого білка селективно адсорбувати та утилізувати мідь у стічних водах [51]. Крім того, порожнисті мікросфери на основі соєвого білка виявилися високоефективними для сорбції іонів металів, причому поглинальна здатність залежала від важкого металу [8]. Незважаючи на численні дослідження, що демонструють потенціал нанокompозитів на основі соєвого білка для очищення води від важких металів, фактори, що відповідають за їх металоселективність, потребують подальшого вивчення. Намагаючись зрозуміти механізм комплексоутворення різних іонів важких металів з 7S глобуліном, ми визначили їх переважні місця зв'язування (Рис. 3.4-3.6).



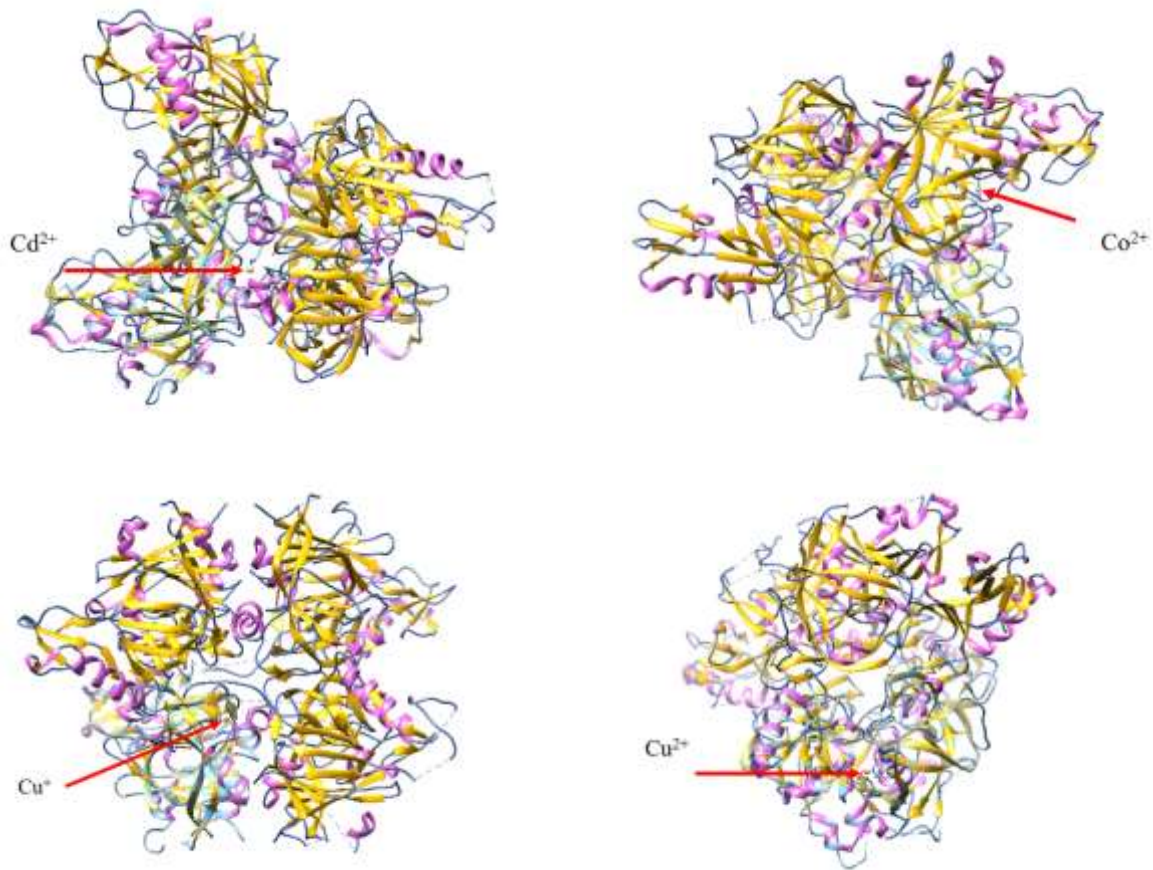


Рис. 3.4. Схематичне зображення енергетично найбільш сприятливих комплексів металів з 7S глобуліном (ланцюг А), отриманих за допомогою сервера прогнозування та моделювання сайтів іонів металів.

Результати докінгу вказують на те, що життєвоважливі та токсичні важкі метали зв'язуються з декількома сайтами зв'язування глобуліну 7S соєвого білка і мають щонайменше два високомолекулярні сайти зв'язування. Зокрема, як видно з рисунків 3.4-3.6 і таблиці 3.1, всі важкі метали (за винятком Ni^{2+} , Au^+ , Pb^{2+} , Pt^{2+} і Sm^{3+}) утворюють контакти, ймовірно, з амінокислотними залишками α -субодиниці. Токсичні метали Ni^{2+} , Au^+ , Pb^{2+} , Pt^{2+} і Sm^{3+} взаємодіють як з α -субодиницею (залишки 25-275), так і з низькомолекулярною β -субодиницею (залишки 276-427), причому перевага зв'язування надається останній. Як видно з рисунка 2, важкі метали утворювали стабільні контакти із залишками, які, ймовірно, належать до β -ланцюгів білка. Однак ми виявили, що Cd^{2+} і Fe^{2+} енергетично вигідніше

взаємодіяти з α -спіралями. Крім того, Ba^{2+} і Ni^{2+} розташовуються в 310-спіралі білка.

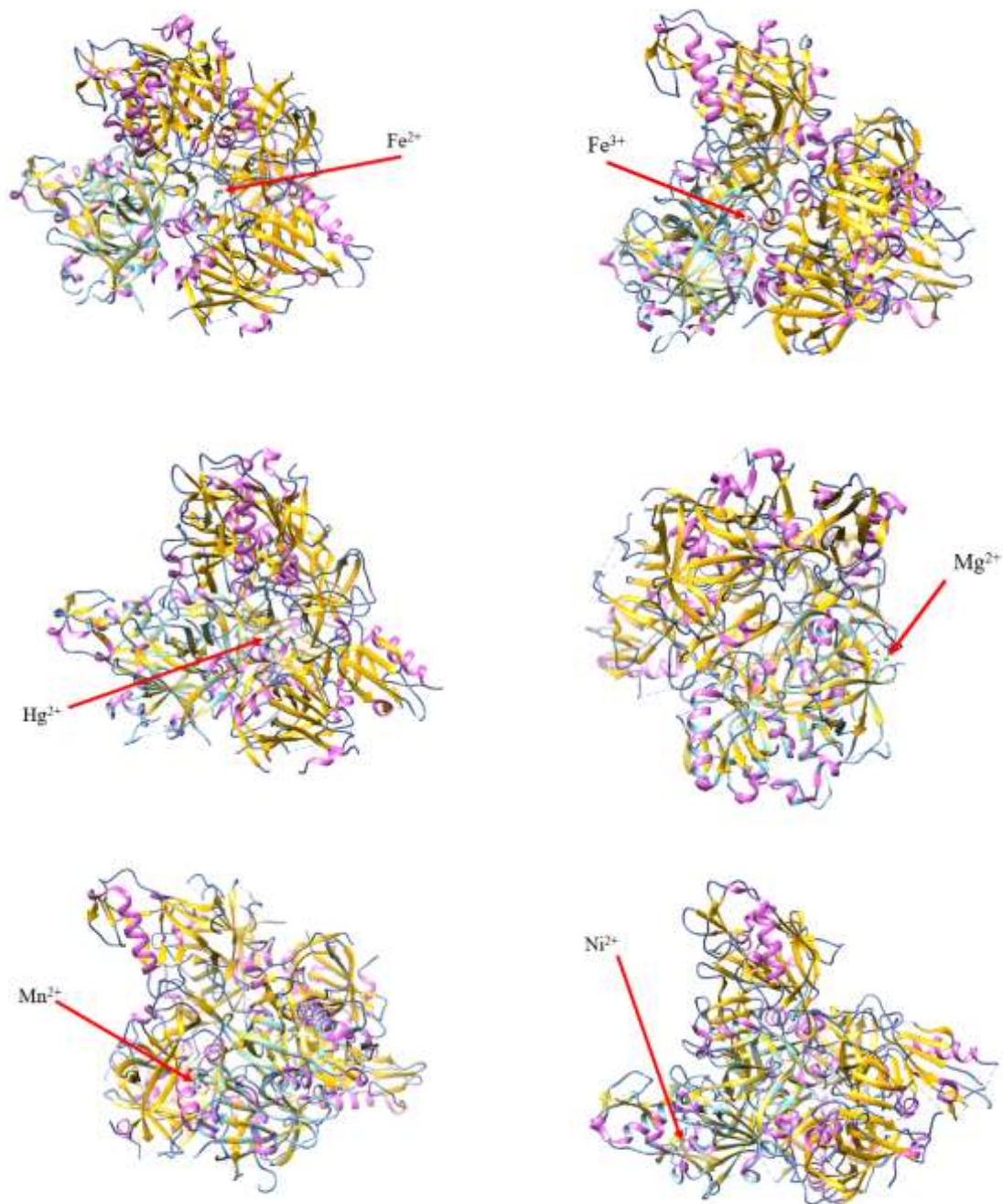


Рис. 3.5. Схематичне зображення енергетично найбільш сприятливих комплексів металів з 7S глобуліном (ланцюг А), отриманих за допомогою сервера прогнозування та моделювання сайтів іонів металів.

Важливо, що залишки цистеїну належать до амінокислотних залишків, які беруть участь у стабілізації білок-металевих комплексів для всіх металів,

окрім Mg^{2+} , Ba^{2+} та Pt^{2+} . Залишки цистеїну, що утворюють дисульфідні зв'язки в білку, відповідають за стабільність соєвого білка глобуліну 7S [49].

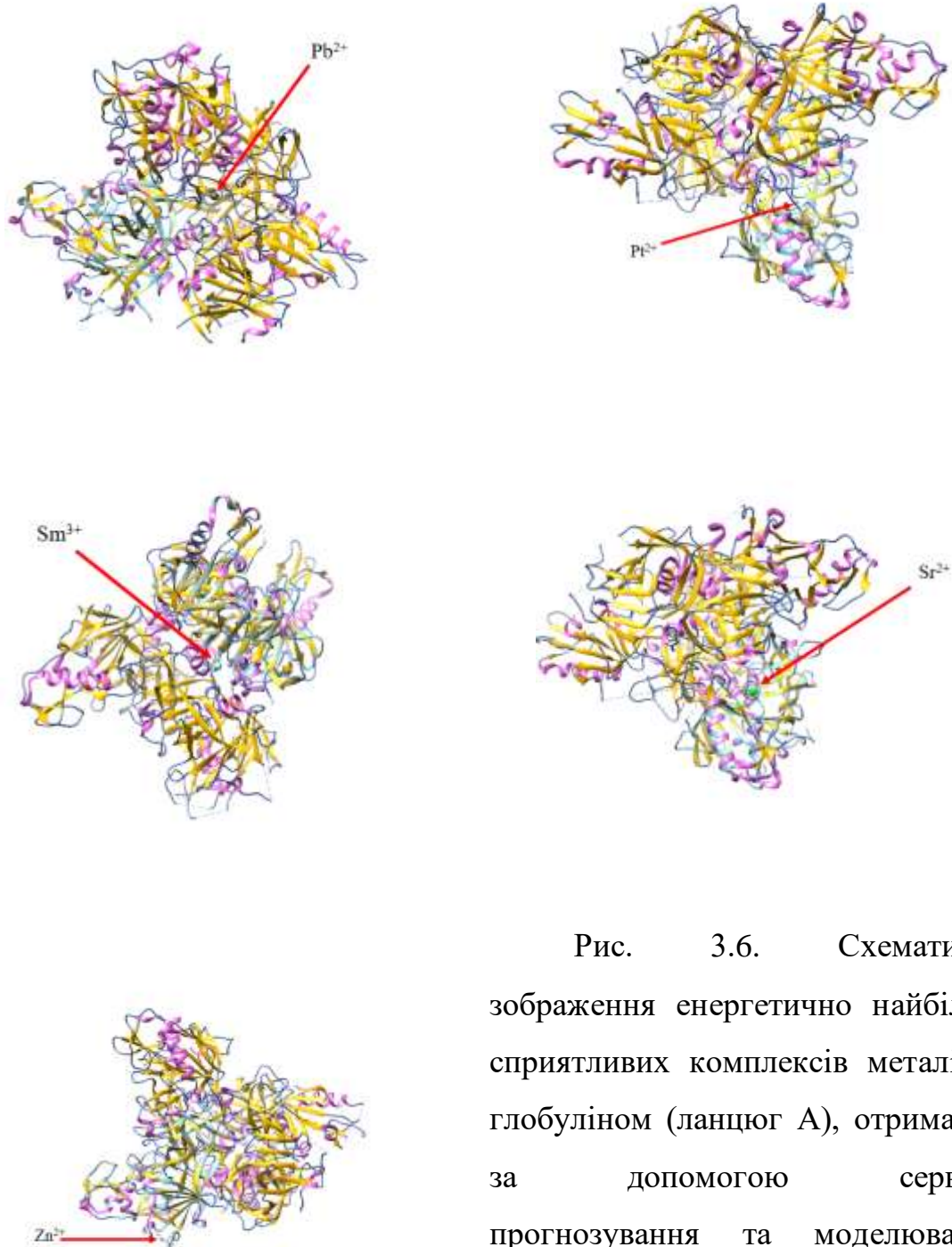
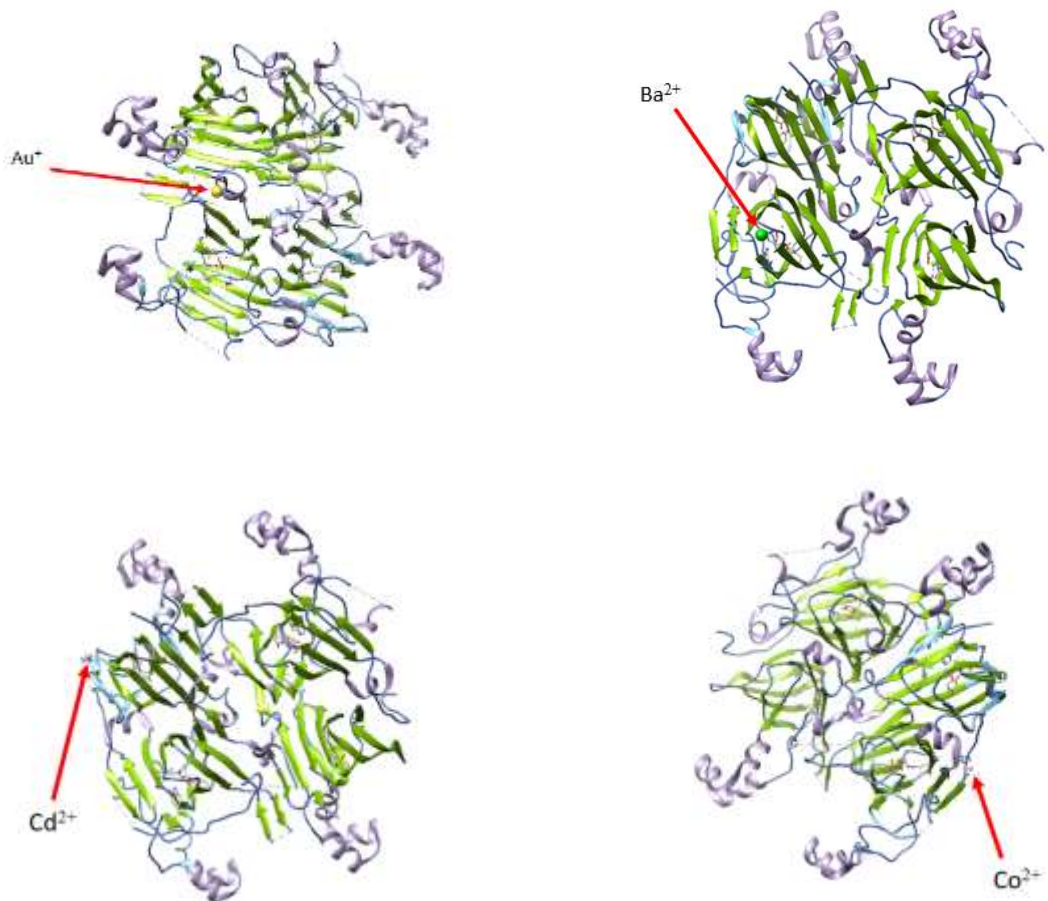


Рис. 3.6. Схематичне зображення енергетично найбільш сприятливих комплексів металів з глобуліном (ланцюг А), отриманих за допомогою сервера прогнозування та моделювання сайтів іонів металів.

3.2. Взаємодія іонів важких металів з гліциніном сої.

Соевий гліцинін, належить до родини 11S глобулінів, є гексамерним білком з молекулярною масою приблизно 360 кДа, що складається з п'яти субодиниць: A1aV1b, A1bV2, A2V1a, A3V4 і A5A4V3 [52]. Утворюється шляхом складання двох тримерів, кожен з яких складається з трьох субодиниць [52]. Ці субодиниці складаються з кислого поліпептиду (А) з молекулярною масою 35 кДа та основного поліпептиду (В) з молекулярною масою 20 кДа, які з'єднані дисульфідними зв'язками [52]. Протомер соєвого гліциніну складається з чотирьох видимих і чотирьох невидимих ділянок (залишки 1-6, 93-107, 179- 199 і 252-320), що включають 27 ниток і 7 спіралей, які згорнуті в два желеподібних і два спіральних домени [52].



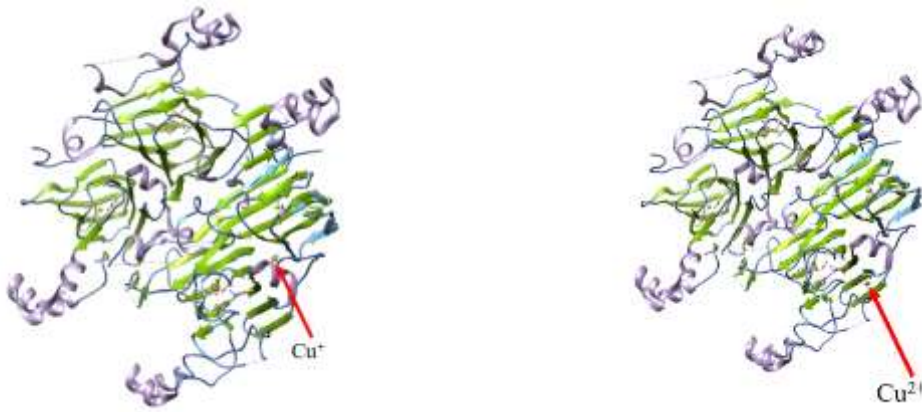


Рис. 3.7. Схематичне зображення енергетично найбільш сприятливих комплексів металів з гліциніном (ланцюг А), отриманих за допомогою сервера прогнозування та моделювання сайтів іонів металів.

Як видно з рисунків 3.7-3.9, важкі метали утворюють стабільні контакти з різними залишками, присутніми в упорядкованих ділянках гліциніну, і не взаємодіють з невпорядкованими ділянками. Основні результати, отримані в результаті молекулярних докінгових досліджень, є наступними:

I) Важкі метали, за винятком Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Pt^{2+} та Sm^{3+} мають щонайменше два енергетично вигідні сайти зв'язування;

II) Mg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} та Pt^{2+} мають тенденцію взаємодіяти із залишками Asp 232, Glu 233, Arg 234 та Lys 235, розташованими поблизу другої спіралі протомеру;

III) Fe^{3+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} та Co^{2+} виявляють переважні місця зв'язування, що включають амінокислотні залишки 211-215 (Lys, His, Gln) в області спіралі. Ni^{2+} додатково утворює високомолекулярний комплекс із залишками поблизу β -ланцюга F (Arg15 та His 116), тоді як Co^{2+} взаємодіє також із залишком β -ланцюга А.

IV) Mn^{2+} , Cd^{2+} зв'язуються з ділянкою ланцюга, що містить залишки Asp 413 та Gly 414.

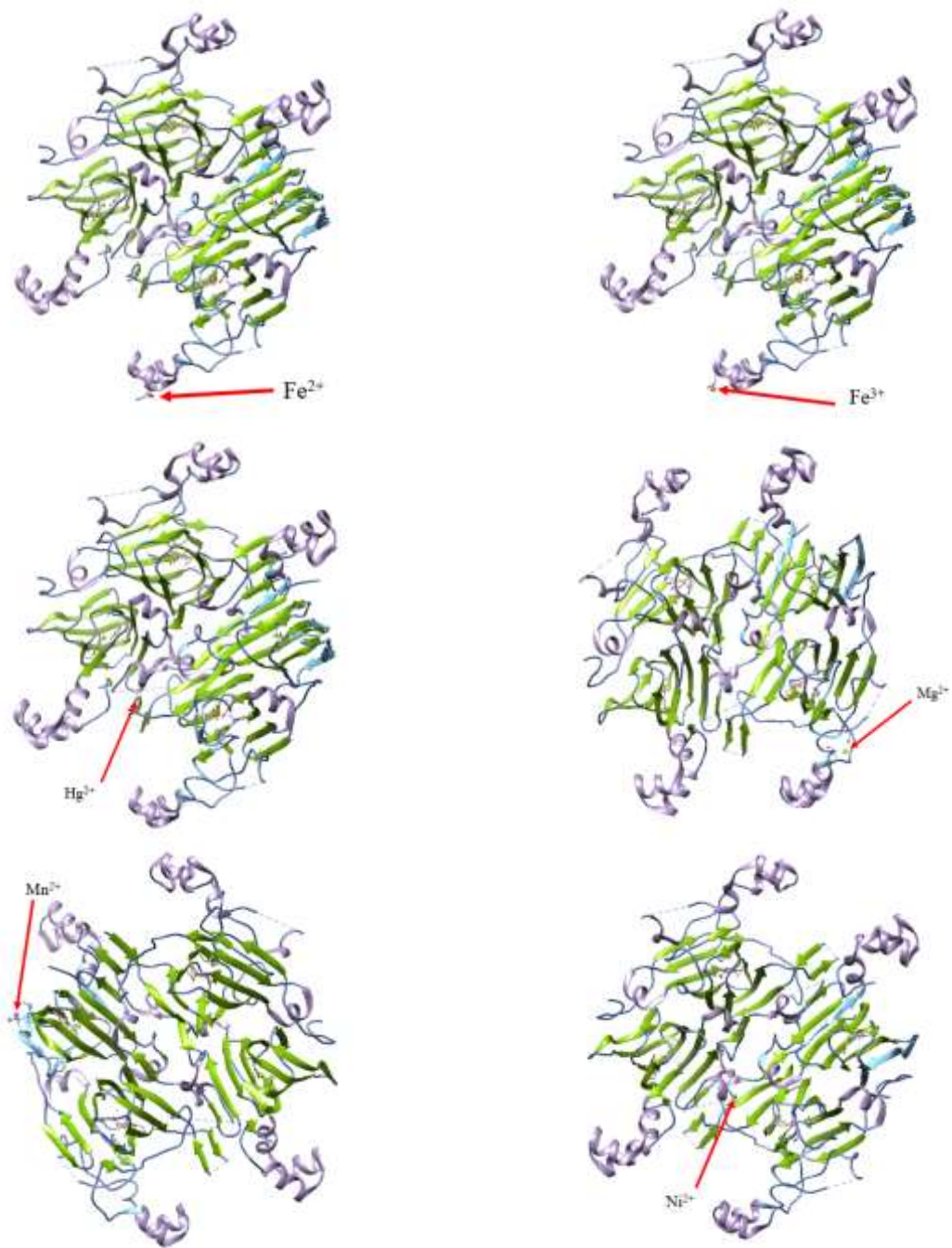


Рис. 3.8. Схематичне зображення енергетично найбільш сприятливих комплексів металів з гліциніном (ланцюг А), отриманих за допомогою сервера прогнозування та моделювання сайтів іонів металів.

Порівняння зв'язувальних залишків, сприятливих для комплексоутворення важких металів між білками, вказує на те, що метали виявляють різні переваги у зв'язуванні з різними амінокислотними залишками. Зокрема, для Fe³⁺ енергетично вигідно утворювати контакти з амінокислотами Lys, Glu та

Asp β -лактоглобуліну, тоді як His, Gln та Gln, Cys відповідальні за метало-білкове комплексоутворення гліциніну та 7S глобуліну відповідно.

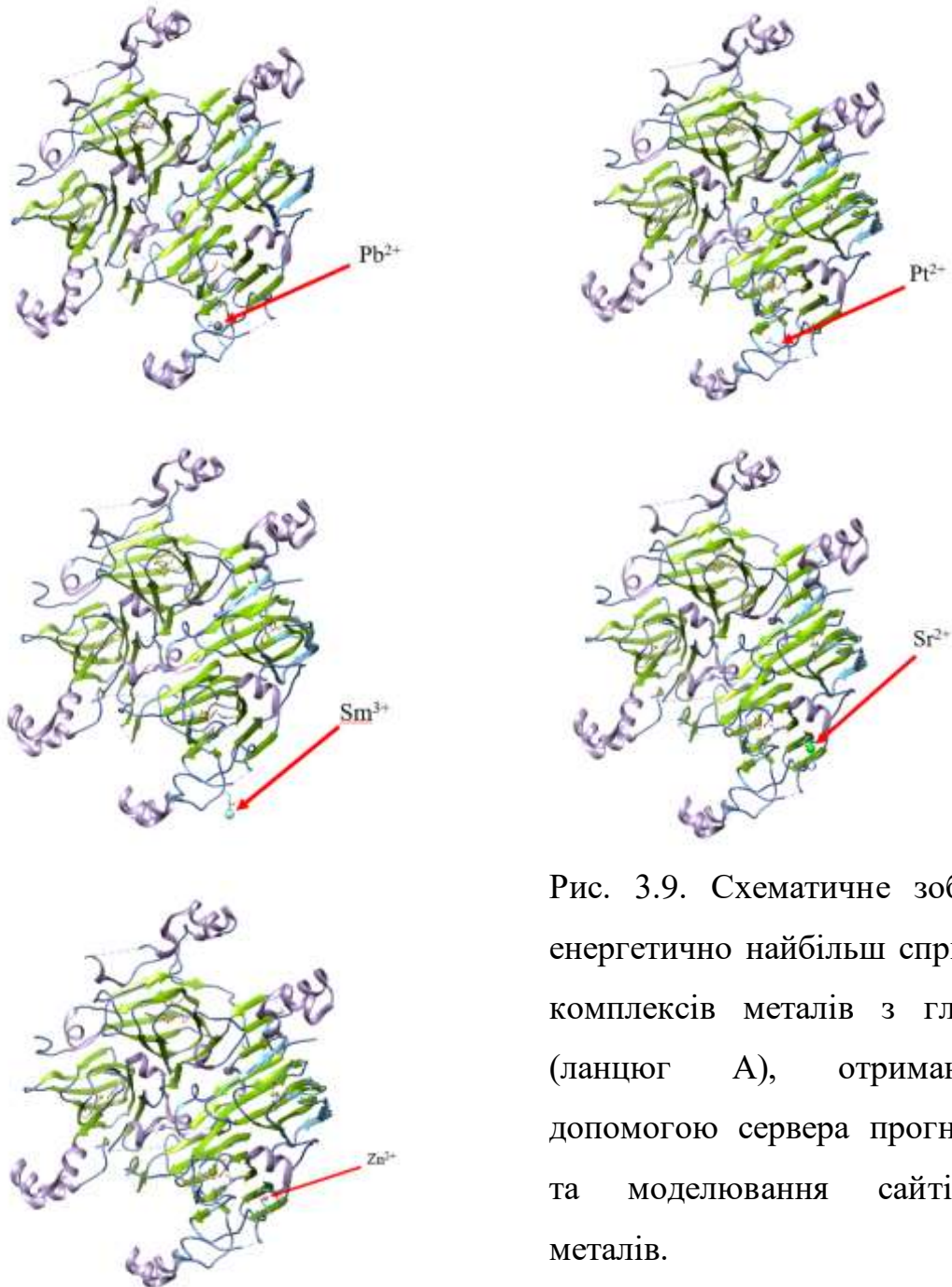


Рис. 3.9. Схематичне зображення енергетично найбільш сприятливих комплексів металів з гліциніном (ланцюг А), отриманих за допомогою сервера прогнозування та моделювання сайтів іонів металів.

Zn^{2+} взаємодіє із залишками Asp та Ser β -лактоглобуліну, His, Glu гліциніну, тоді як для 7S глобуліну в комплексоутворенні брали участь також залишки цистеїну. Хоча електростатичні взаємодії та хелатування металів є

переважними способами зв'язування металів, наші результати докінгу вказують на важливість водневих зв'язків, гідрофобних та ван-дер-ваальсових взаємодій для стабілізації білок-металевих комплексів.

ВИСНОВКИ

У роботі було проведено дослідження взаємодії іонів важких металів з білками для оцінки впливу структури білків на їхню здатність до взаємодії та селективність.

1. Варіюючи як амінокислотний склад білків (β -лактоглобулін, 7S глобулін та гліцинін з сої), так і вміст іонів важких металів (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , Cu^+ , Au^+ , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Pt^{2+} , Sm^{3+} та Sr^{2+}), методом молекулярного докінгу з використанням сервера прогнозування та моделювання місць зв'язування іонів металів MIB було ідентифіковано найбільш енергетично вигідні сайти зв'язування білок-іон.
2. Аналіз усіх комплексів показав, що життєвонеобхідні та токсичні важкі метали взаємодіють з численними сайтами зв'язування білків, насамперед через електростатичні взаємодії та хелатування металів за участю залишків цистеїну, аспарагінової кислоти, глутамінової кислоти та гістидину.
3. Порівняння зв'язувальних залишків, сприятливих для комплексоутворення важких металів між білками, вказує на те, що метали виявляють різні переваги у зв'язуванні з різними амінокислотними залишками. Зокрема, для Fe^{3+} енергетично вигідно утворювати контакти з амінокислотами Lys, Glu та Asp β -лактоглобуліну, тоді як His, Gln та Cys відповідальні метало-білкове комплексоутворення гліцинину та 7S глобуліну.
4. Хоча електростатичні взаємодії та хелатування металів є переважними способами зв'язування металів, результати молекулярного докінгу вказують на важливість водневих зв'язків, гідрофобних та Ван-дер-Ваальсових взаємодій для стабілізації білок-металевих комплексів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. D. Witkowska, J. Słowik, and K. Chilicka. Heavy metals and human health: possible exposure pathways and the competition for protein binding sites, *Molecules*, 26, 6060 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26196060>.
2. J.L. Reyes, E. Molina-Jijon, R. Rodriguez-Munoz, et al. Tight Junction Proteins and Oxidative Stress in Heavy Metals-Induced Nephrotoxicity. *Biomed Res. Int.* 2013, 730789 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/730789>.
3. C. Giaginis, E. Gatzidou, S. Theocharis. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 213, 282 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.03.008>.
4. B. Saif, and P. Yang. Metal–protein hybrid materials with desired functions and potential applications. *ACS Appl/ Bio Mater.* 4, 1156 (2021). <https://doi.org/10.1121/acsabm.0c01375>.
5. A. Beloqui, and A.L. Cortajarena. Protein-based functional hybrid bionanomaterials by bottom-up approaches. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 63, 74 (2020). <https://doi.org/10.1116/j.sbi.2020.04.005>
6. A. Aires, D. Maestro, J. Ruiz del Ro, et al. Engineering multifunctional metal/protein hybrid nanomaterials as tools for therapeutic intervention and high-sensitivity detection. *Chem. Sci*, 12, 2480 (2021). <https://doi.org/10.1039/D0SC05215A>
7. W.L. Soon, M. Peydayesh, R. Mezzenga, and A. Mizerez. Plant-based amyloids from food waste for removal of heavy metals from contaminated water. *Chem Eng. J.* 445, 136513 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.136513>
8. D. Liu, Z. Li, W. Li, Z. Zhong, J. Xu, J. Ren, and Z. Ma, Adsorption Behavior of Heavy Metal Ions from Aqueous Solution by Soy Protein Hollow Microspheres. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52(32), 11036 (2013). <https://doi.org/10.1021/ie401092f>

9. M. Peydayesh, S. Bolisetty, T. Mohammadi, and R. Mezzenga. Assessing the Binding Performance of Amyloid–Carbon Membranes toward Heavy Metal Ions. *Langmuir*, 35, 4161 (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b04234>.
10. A. Gao, K. Xie, X. Song, K. Zhang, and A. Hou, Removal of the heavy metal ions from aqueous solution using modified natural biomaterial membrane based on silk fibroin. *Ecol. Eng.* 99, 343 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.11.008>.
11. A. de Almeida, B.L. Oliveira, J.D.G. Correia, G. Soveral, and A. Casini. *Coord. Chem. Rev.* 257, 2689 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.01.031>
12. J.H. Duffus, *Pure Appl. Chem.* 74(5), 793 (2002). M. Balali-Mood, K. Naseri, Z. Tahergorabi, M. Reza Khazdair, and M. Sadeghi, *Front Pharmacol.* 12, 643972 (2021). <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643972>
13. R. Singh, N. Gautam, A. Mishra, and R. Gupta, *Indian J. Pharmacol.* 43, 246 (2011). <https://doi.org/10.4103/253-7613.81505>
14. P.B. Tchounwou, C.G. Yedjou, A.K. Patlolla, and D.J. Sutton. *Exp. Suppl.* 101, 133 (2012). https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
15. M.A. Zoroddu, J. Aaseth, G. Crisponi, S. Medici, M. Peana, and V.M. Nurchi, *J. Bioorg Chem.* 195, 120 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013>.
16. C.J. Wilson, D. Apiyo, P. Wittung-stafshede. Role of cofactors in metalloprotein folding. *Q. Rev. Biophys.* 37, 285-314 (2004).
17. Myint, Z.W., Oo, T.H., Thein, K.Z. *et al.* Copper deficiency anemia: review article. *Ann Hematol* 97, 1527–1534 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00277-018-3407-5>
18. J.-J. Kim, Y.-S. Kim, V. Kumar. *And J. Trace Elem. Med Biol.* 54, 226 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.003>
19. M. Jaishankar, T. Tseten, N. Anbalagan, B. Mathew, and K. Beeregowda, *Interdiscip Toxicol.* 7, 60 (2014). <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>

- 20.M. Valko, H. Morris, and M.T.D. Cronin, *Curr Med. Chem.* 12, 1161 (2005).
<https://doi.org/10.2174/09298670537646635>
- 21.J.G. Paithankar, S. Saini, S. Dwidevi, A. Sharma, and D.K. Chowdhuri, *Chemosphere*, 262, 128350 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128350>
- 22.Z. Fu, and S. Xi. *Toxicol. Mech. Methods.* 30, 167 (2020).
<https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594>
- 23.M.E. Morales, RS. Derbes, C.M. Ade, et al., *PloS One*, 11, e0151367 (2016).
<https://doi.org/journal.pone.0151367>
- 24.D. Witkowska, J. Słowik, and K. Chilicka, *Molecules*, 26, 6060 (2021).
<https://doi.org/10.3390/molecules26196060>
- 25.Amin NU, Siddiqi HM, Kun Lin Y, Hussain Z, Majeed N. Bovine Serum Albumin Protein-Based Liquid Crystal Biosensors for Optical Detection of Toxic Heavy Metals in Water. *Sensors (Basel)*. 2020 Jan 5;20(1):298. doi: 10.3390/s20010298. PMID: 31948064; PMCID: PMC6982898.
- 26.Jevtovic V, Alshamari AK, Milenković D, Dimitrić Marković J, Marković Z, Dimić D. The Effect of Metal Ions (Fe, Co, Ni, and Cu) on the Molecular-Structural, Protein Binding, and Cytotoxic Properties of Metal Pyridoxal-Thiosemicarbazone Complexes. *Int J Mol Sci.* 2023 Jul 25;24(15):11910. doi: 10.3390/ijms241511910.
- 27.A. Odobasic, I. Sestam, S. Begic. *Biosensors for Determination of Heavy Metals in Waters*.IntechOpen, 2019.
- 28.S. Bayram, P. Green, A. Szuchmacher Blum. Sensing of heavy metal ions by intrinsic TMV coat protein fluorescence, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 195, 2018, 21-24,
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.01.035>.
- 29.S. Kou, Z. Yang, J. Luo, F. Sun. Entirely recombinant protein-based hydrogels for selective heavy metal sequestration. *Polym. Chem.*, 2017, **8**, 6158-6164. DOI <https://doi.org/10.1039/C7PY01206C>

30. Zing Guo, Shengbo Sang, Aoqun Jian, Shuang Gao, Qianqian Duan, Jianlong Ji, Qiang Zhang, Wendong Zhang, A bovine serum albumin-coated magnetoelastic biosensor for the wireless detection of heavy metal ions, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 256, 2018, 318-324, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.040>
31. Kim, H., Lee, W. & Yoon, Y. Heavy metal(loid) biosensor based on split-enhanced green fluorescent protein: development and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 6345–6352 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09908-7>.
32. T. Li, J. Zhou, M. Peydayesh, Y. Yao, M. Bagnani, I. Kutzli, Z. Chen, L. Wang, R. Mezzenga, Plant Protein Amyloid Fibrils for Multifunctional Sustainable Materials. *Adv. Sustainable Syst.* 2023, 7, 2200414. <https://doi.org/10.1002/adsu.202200414>
33. V. Vinayagam, S. Murugan, R. Kumaresan, M. Narayanan, M. Sillanpää, Dai-Viet N. Vo, O. Kushwaha, Protein nanofibrils as versatile and sustainable adsorbents for an effective removal of heavy metals from wastewater: A review, *Chemosphere*, 301, 2022,134635, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134635>.
34. M. Peydayesh, S. Bolisetty, T. Mohammadi, and R. Mezzenga, *Langmuir*, 35, 4161 (2019) <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b04234>.
35. A. Gao, K. Xie, X. Song, K. Zhang, and A. Hou, *Ecol. Eng.* 99, 343 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.11.008>.
36. Knowles, T.P.J. and Mezzenga, R. (2016), Amyloid Fibrils as Building Blocks for Natural and Artificial Functional Materials. *Adv. Mater.*, 28: 6546-6561. <https://doi.org/10.1002/adma.201505961>.
37. Zang, C. Li, K. Zhou, H. Dong, B. Chen, F. Wang, and G. Zhao, *Anal. Chem.* 88, 10275 (2016). <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03011>
38. Cherian, S., Gupta, R.K., Mullin, B.C. and Thundat, T. (2003) 'Detection of heavy metal ions using protein-functionalized microcantilever sensors', *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 19, pp.411–416.

39. Zeng, H.H., Thompson, R.B., Maliwal, B.P., Fones, G.R., Moffet, J.W. and Fierke C.A. (2003) 'Real-time determination of picomolar free Cu(II) in seawater using a fluorescence-based fiber optic biosensor', *Analytical Chemistry*, Vol. 75, pp.6807–6812.
40. Rodzik, A.; Pomastowski, P.; Sagandykova, G.N.; Buszewski, B. Interactions of Whey Proteins with Metal Ions. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2156. <https://doi.org/10.3390/ijms21062156>
41. Pomastowski, P.; Sprynsky, M.; Žuvela, P.; Rafińska, K.; Milanowski, M.; Liu, J.J.; Yi, M.; Buszewski, B. Silver-Lactoferrin Nanocomplexes as a Potent Antimicrobial Agent. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 7899–7909.
42. K. Rembert, J. Parterova, J. Heyda, C. Hilty, P. Jungwirth, P. Cremer. Molecular mechanism of ion-specific effects on protein. *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 10039-10046. (2012).
43. Roosen-Runge, F., Zhang, F., Schreiber, F. *et al.* Ion-activated attractive patches as a mechanism for controlled protein interactions. *Sci Rep* **4**, 7016 (2014). <https://doi.org/10.1038/srep07016>.
44. K. Bruce Jacobson, J.E. Turner, The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids, *Toxicology*, Volume 16, Issue 1, 1980, 1-37, [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(80\)90107-9](https://doi.org/10.1016/0300-483X(80)90107-9).
45. M.P. Chantada-Varquez, A. Moreda-Pineiro, M.C. Barciels-Alonso, and P. Bermejo-Barrera, *Appl. Spectr. Rev.* **52**, 145 (2017). <https://doi.org/10.1080/05704928.2016.1213736>
46. Y.F. Lin, C.W. Cheng, C.S. Shin, J.K. Hwang, C.S. Yu, and C.H. Lu, *J. Chem. Inf. Model*, **56**, 2287 (2016). <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00407>
47. A. Rodzik, P. Pomastowski, G.N. Sagandykova, and B. Buszewski, *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2156 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21062156>
48. R. Pearson, *J. Chem. Educ.* **45**, 981 (1968). <https://doi.org/10.1021/ed045p581>
49. T. Hashimoto, T. Shimuzu, M. Yamabe, M. Taichi, et al. *FEBS Journal*, **278**, 1944 (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08111.x>

- 50.D. Hwang. And S. Damodaran, *Int. J. Appl. Polymer Sci.* **64**, 891 (1997).
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970502\)64:5<891::AID-APP9>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970502)64:5<891::AID-APP9>3.0.CO;2-K)
- 51.J. Liu, D. Su, J. Yao, Y. Huang, Z. Shao, and X. Chen, *J. Mat. Chem. A*, **5**, 4163 (2017). <https://doi.org/10.1039/C6TA10814H>
- 52.M. Adachi, J. Kanamori, T. Masuda, K. Yagasaki, K. Kitamura, B. Mikami, and S. Utsumi. *PNAS*, **100**, 7395 (2003).
<https://doi.org/10.1073/pnas.0832158100>