

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Структурно-динамические факторы образования комплексов лед связывающих белков

Направление подготовки

04.06.01 Химические науки

Научная специальность

1.4.9. Биоорганическая химия

Аспирант _____ Олейник Г. А.

Научный руководитель _____ д.х.н. Чернонос А. А.

Новосибирск – 2025

1. Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Около 75% биосферы Земли существует в условиях низких температур, которые сохраняются в течение длительных периодов или являются постоянными: это большая часть мирового океана, Антарктида, территории Европы за Полярным кругом, горные массивы и области вечной мерзлоты [1]. Холод негативно сказывается на клеточных функциях: он нарушает целостность клеток, текучесть мембран, повышает вязкость воды, замедляет диффузию растворителей, скорость клеточных процессов, макромолекулярные взаимодействия [2, 3]. Несмотря на такие неблагоприятные условия, существуют организмы, которые адаптировались к ним, разработав в ходе эволюции уникальные биохимические механизмы для выживания. Одним из таких механизмов является синтез лед-связывающих белков.

Лед-связывающие белки выделяются своим уникальным свойством взаимодействовать со льдом и предотвращать его образование. Это свойство критически важно для выживания многих организмов, адаптированных к холоду. Механизм работы IBP заключается в их взаимодействии с поверхностью льда: молекулы белка располагаются так, чтобы соответствовать структуре кристаллической решетки льда. Это препятствует присоединению молекул воды, предотвращая дальнейший рост ледяного кристалла [4, 5].

Изучение лед-связывающих белков (IBP) на сегодняшний день является одним из важнейших направлений исследований молекулярной биологии для таких отраслей как медицина, сельское хозяйство, пищевая промышленность, аэрокосмическая отрасль. В медицинской сфере данные белки могут стать альтернативой существующим методам криоконсервации клеток и тканей [6–8]. В аграрной отрасли использование лед-связывающих белков может привести к созданию морозоустойчивых культур, что станет значительным шагом вперёд в производстве продовольствия в регионах с холодным климатом [9, 10]. В авиационной и космической индустрии IBP могут применяться в качестве компонента антиобледенительных средств [11, 12]. Кроме того, в пищевой промышленности IBP могут улучшить текстуру и сохранность замороженных продуктов [13–15].

IBP были впервые обнаружены более полувека назад, когда профессор Артур Де Врис из Университета Иллинойса идентифицировал антифризные гликопротеины у антарктических нототенионидных рыб [16]. Он выяснил, что эти белки жизненно необходимы для выживания рыб в полярных водах, так как они повышают температуру

замерзания их крови. С тех пор были обнаружены и охарактеризованы различные типы IBP у множества организмов, включая бактерии, дрожжи, диатомовые водоросли, рыб и насекомых, например LS-12 в сыворотке крови рыб вида *Myoxocephalus octodecemspinosus*, LpAFP в сыворотке крови рыб вида *Brachyopsis segaliensis* и RmAFP в гемолимфе жуков вида *Rhagium Mordax* [17–21].

В настоящее время интерес к изучению антифризных белков значительно возрос благодаря прогрессу в молекулярной биологии, развитию биоинформатики [22, 23], а также исследованиям, направленным на создание синтетических аналогов лед-связывающих белков [24–27].

Цель настоящей работы заключалась в изучении вторичной структуры лед-связывающих белков и механизмов образования комплексов лед-связывающих белков со льдом.

Задачи:

1. Оптимизировать методы выделения и очистки рекомбинантных белков LS-12, RmAFP и LpAFP;
2. Установить или подтвердить вторичную структуру лед-связывающих белков LS-12, RmAFP и LpAFP различными физико-химическими методами;
3. Определить склонность к олигомеризации лед-связывающих белков LS-12, RmAFP и LpAFP различными физико-химическими методами;
4. Получить модели олигомерных форм белков LS-12 и RmAFP и изучить их взаимодействие со льдом методом молекулярного моделирования.

Научная новизна

В рамках данной работы впервые была установлена вторичная структура белка LpAFP, также впервые были обнаружены олигомерные формы белков LS-12 и LpAFP, и олигомерные формы более высокого порядка белка RmAFP. Исследовано взаимодействие олигомеров лед-связывающих белков со льдом.

Прикладные исследования данной работы могут быть использованы для дальнейшего изучения механизма связывания олигомерных форм лед-связывающих белков со льдом с целью создания рентабельных синтетических аналогов и внедрения их в различные сферы жизни.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно наработаны, выделены, очищены и частично охарактеризованы лед-связывающие белки LS-12, RmAFP и LpAFP. Также автором проведены эксперименты и обработаны данные, полученные с помощью метода кругового дихроизма и выполнена пробоподготовка для остальных экспериментов. Анализ рекомбинантных белков и пептидов после трипсинолиза методом масс-спектрометрии был выполнен при участии к.х.н. Барановой С.В. Анализ приведенных выше белков методами изотермической титрационной калориметрии и атомно-силовой микроскопии был проведен при участии Канарской М.А. Молекулярное моделирование выполнено совместно со Ждановой П. и Котышковой Д.В. Анализ белка LS-12 методом малоуглового рентгеновского рассеяния был проведен при участии к.ф.—м.н. Рижикова Ю.Л.

Благодарности

Автор благодарит сотрудников центра масс-спектрометрического анализа института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН: с.н.с., к.х.н. Баранову С.В. и Котышкову Д.В. за помощь в работе и весь коллектив лаборатории за поддержку; м.н.с. лаборатории структурной биологии ИХБФМ СО РАН Канарскую М.А. и сотрудника Московского центра перспективных исследований, к.ф.—м.н. Рижикова Ю.Л. за помощь в экспериментах по изотермической титрационной калориметрии, атомно-силовой микроскопии и малоугловому рентгеновскому рассеянию; а также руководителя группы спектроскопии белка института белка РАН (г. Пущино), д.ф.-м.н. Мельника Б.С. за возможность приобрести опыт.

Автор отдельно хочет поблагодарить своего руководителя – в.н.с. Центра масс-спектрометрического анализа Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, д.х.н. Черносова А.А. за возможность приобрести опыт и бесконечное терпение в течение выполнения представленной работы.

2. Материалы и методы

2.1. Получение белков

Плазида, содержащая гены, кодирующие лед-связывающий белок LS-12, пептид 6His и протеазу TEV, была приобретена у ООО «Евроген» (Россия). Плазмиду трансформировали в химически компетентные клетки *E.-coli* штамм BL21 (DE3) по стандартному протоколу, описанному в работе [28]. Клетки с векторной конструкцией выращивали в среде Лурия-Бертани (LB), содержащей 50 мкг/мл сульфата канамицина при 37°C до достижения OD₆₀₀ значения 0,6. Клетки культивировали с добавлением индуктора

лактозного оперона изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (Thermo Fisher Scientific, Abingdon, UK) до конечной концентрации 0,5 мМ в течение 5 ч при 37°C (220 об/мин). После чего их лизировали в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl pH 8.0, 300 мМ NaCl, 30 мМ имидазол, с применением ультразвукового гомогенизатора клеток Sonopuls HD 4100 (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Германия), проводя на льду 16 циклов обработки ультразвуком по 15 с. Полученный гомогенат разделяли центрифугированием при 30000 g в течении 1 ч. Супернатант переносили в новую емкость и хранили при 4 °C для дальнейшей очистки, описанной в пункте 2.2.

Плазмида, содержащая гены, кодирующие лед-связывающий белок RmAFP, пептид гистидин и белок убиквитин была получена, как описано в работе [29], сотрудниками группы спектроскопии белка Института белковых исследований РАН (Пушино, Московская область, Россия) и любезно предоставлена д.ф.-м.н. Богданом Степановичем Мельником. Клетки с векторной конструкцией выращивали в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина при 37°C до достижения OD₆₀₀ значения 0,6. Клетки культивировали с добавлением индуктора лактозного оперона изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (Thermo Fisher Scientific, Abingdon, UK) до конечной концентрации 0,4 мМ в течение 6 ч при 37°C (220 об/мин). После чего их лизировали в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl pH 8.0, 300 мМ NaCl, 5 мМ имидазола, с применением ультразвукового гомогенизатора клеток Sonopuls HD 4100 (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Германия), проводя на льду 16 циклов обработки ультразвуком по 15 с. Полученный гомогенат разделяли центрифугированием при 30000 g в течении 1 ч.

Плазмида, содержащая гены, кодирующие лед-связывающий белок LpAFP, пептид 6His и белок убиквитин [30], была синтезирована в лаборатории синтетической биологии ИХБФМ СО РАН. Клетки с векторной конструкцией выращивали в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина при 37°C до достижения OD₆₀₀ значения 0,6. Клетки культивировали с добавлением изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозида (Thermo Fisher Scientific, Abingdon, UK) до конечной концентрации 0,4 мМ в течение 24 ч при 15°C (220 об/мин). После чего их лизировали в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl pH 8.0, 300 мМ NaCl, с применением ультразвукового гомогенизатора клеток Sonopuls HD 4100 (Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Германия), проводя на льду 16 циклов обработки ультразвуком по 15 с. Полученный гомогенат разделяли центрифугированием при 30000 g в течении 1 ч. После этого извлекали белок LpAFP из телец включения. Осадок растворяли в буфере (20 мМ трис-HCl, pH 8.0, 300 мМ NaCl, 8М мочевины) перемешиванием в течение 1 часа. Далее разбавляли буфером без мочевины в 2 раза и разделяли центрифугированием. Полученный

супернатант переводили в буфер без мочевины (20 мМ трис-HCl, pH 8.0, 300 мМ NaCl) методом диализа.

2.2. Очистка белков

Все белки были очищены с помощью метода FPLC (быстрая белковая жидкостная хроматография) на хроматографе AKTA Explorer 10 (GE (Cytiva), США).

Белок LS-12 очищали с использованием аффинной колонки HisTrap HP (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, США), предварительно уравновешенной буфером 20 мМ трис-HCl pH 8.0, 300 мМ NaCl, 30 мМ имидазол в 5ти объемах колонки. Белок элюировали ступенчатым градиентом: 10ю объемами колонки последовательно 10%, 65% и 100% аналогичного буфера, содержащего 500 мМ имидазола. Хроматографическое разделение проводилось со скоростью 3 мл/мин в течение 36 минут. Детекцию осуществляли на длине волны 280 нм. Фракции, содержащие целевой белок обессоливали на колонке HiTrap Desalting (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, США) с последующей дополнительной очисткой на колонке HiLoad 26/600 Superdex 75 (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, США). Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорда на приборе Biophotometer (Eppendorf, Германия). Для этого к 500 мкл образца белка добавляли 500 мкл реагента Брэдфорда (Sigma-Aldrich, США), (100 мг Coomassie G-250, 50 мл 95% этанола, 100 мл 85% ортофосфорной кислоты и доводили объем стерильной водой до одного литра) и инкубировали смесь в течение 5 мин при комнатной температуре. Измерение поглощения полученного раствора выполняли спектрофотометрически на длине волны 595 нм. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) с известной концентрацией. Коэффициент экстинкции составлял $2560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, а молекулярная масса белка – 17,5 кДа.

Рекомбинантный белок RmAFP очищали с использованием хелатирующей колонки HiTrap Chelating HP, насыщенной ионами никеля (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, США), которую предварительно уравнивали буфером 20 мМ трис-HCl pH 8.0, 300 мМ NaCl, 5 мМ имидазола в 5ти объемах колонки. Белок элюировали ступенчатым градиентом: 10ю объемами колонки последовательно 10%, 40% и 100% аналогичного буфера, содержащего 500 мМ имидазола. Хроматографическое разделение проводилось со скоростью 3 мл/мин в течение 60 минут. Детекцию осуществляли на длине волны 280 нм. После этого белок в растворе инкубировали с деубиквитиной Usp2-cc в молярном соотношении 1:10 (по оптической плотности) в течение ночи при 4°C для удаления полигистидиновой метки и убиквитина. Очистку от деубиквитиказы и убиквитина, меченных гистидином, а также недиссоциированного рекомбинантного белка проводили с

помощью аффинной колонки HisTrap HP (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, США). Замена буфера на необходимый для последующих экспериментов (20 mM натрий-фосфатный буфер, pH 6,4, 100 mM NaCl) осуществлялась на обессоливающей колонке PD-10 Sephadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences, США). Белковые растворы концентрировали с помощью Amicon Ultra-4 (3 K) (Merck KGaA, Германия). Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически на длине волны 280 нм на приборе NanoDrop One (Thermo Scientific, США). Коэффициент экстинкции составлял $1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, а молекулярная масса белка - 12,5 кДа.

Лед-связывающий белок LpAFP очищали с использованием хелатирующей колонки HiTrap Chelating HP, насыщенной ионами никеля (Cytiva, GE Healthcare Life Sciences, США), которую предварительно уравнивали буфером 20 mM трис-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl в 3х объемах колонки. Белок элюировали ступенчатым градиентом: последовательно 15ю объемами колонки 35% и 10ю объемами колонки 100% аналогичного буфера, содержащего 500 mM имидазола. Хроматографическое разделение проводилось со скоростью 3 мл/мин в течение 49 минут. Детекцию осуществляли на длине волны 280 нм. Белковые растворы объединяли и концентрировали с помощью Amicon Ultra-4 (3 K) (Merck KGaA, Германия). Замена буфера на необходимый для последующих экспериментов (20 mM Tris, pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM ДТТ) осуществлялась на обессоливающей колонке PD-10 Sephadex G-25 (GE Healthcare Life Sciences, США). Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически на длине волны 280 нм на приборе NanoDrop One (Thermo Scientific, США). Коэффициент экстинкции составлял $46830 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, а молекулярная масса белка - 28,8 кДа.

2.3. Характеризация белков

Гомогенность всех выделенных белков подтверждали методом гель-электрофореза в ПААГ (акриламид: N,N'-метиленбисакриламид (40:1), 376 mM трис-HCl, pH 8.8, 1,5% глицерин, 0,1% додецилсульфат натрия (SDS), 0,1% персульфат аммония, 0,06% тетраметилэтилендиамин) в буферном растворе с SDS (0,3% трис-HCl, 1,5% глицин, 0,1% SDS) при напряженности 12 В/см. Белковые образцы для нанесения на гель готовили в растворе, содержащем 120 mM трис-HCl, pH 6.8, 200 mM ДТТ, 4% SDS, 20% глицерин и 0,03 % бромфеноловый синий. Результаты электрофоретического разделения визуализировали при помощи окрашивания Coomassie G250.

Строение и чистоту полученных гидролизатов лед-связывающих белков после обработки трипсином или пепсином подтверждали методом хромато-масс-спектрометрии как описано ниже. После проведения гель-электрофореза в 15% полиакриламидном геле,

белковые полосы вырезали из геля и расщепляли трипсином либо в случае LpAFP пепсином на пептиды согласно методике, описанной в работах [31, 32]. Далее полученную смесь анализировали с помощью ВЭЖХ DIONEX UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., США) в тандеме с масс-спектрометром Q Exactive HF Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Inc., США). Для настройки параметров анализа и управления системой использовалось программное обеспечение Xcalibur 4.2.47 (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Хроматографическое разделение проводилось на аналитической колонке ProntoSil-120-3-C18 (2 × 75 мм, 3 мкм) (EcoNova, Россия) с предколонкой Zorbax Eclipse XBD-C18 (4,6 × 12,5 мм, 5 мкм). Скорость потока составляла 0,25 мл/мин, а элюенты представляли собой воду, содержащую 0,1% муравьиную кислоту (элюент А), и ацетонитрил, содержащий 0,1% муравьиную кислоту (элюент Б). Температура автосамплера поддерживалась на уровне 4°C, колонка находилась при комнатной температуре. Хроматографическое разделение осуществлялось в течение 36 минут с использованием следующего градиента: 2 % буфера Б с 0 до 3 минут, от 2% до 40% буфера Б в течение 8 минут и от 40% до 95% буфера Б в течение 25 минут. В настройках метода анализа на масс-спектрометре электрический потенциал был установлен на 4,2 кВ, температура капилляра была 320 °C, а нормализованная энергия столкновения составляла 30% для МС/МС. Анализ проводили в режиме МС/МС в положительном режиме, выбор ионов осуществляли исходя из 10 наиболее высоко интенсивных сигналов. Идентификация белков осуществлялась с помощью программного обеспечения Proteome Discoverer (версия 3.1, Thermo Fischer Scientific, США) с применением алгоритма SEQUEST. Поиск выполнялся в локальной базе данных, содержащей аминокислотную последовательность с модификацией, и созданной на основании баз данных Uniprot (LS-12 – P80961, LpAFP – A0ZT93, <https://www.uniprot.org>) либо PDB (RmAFP – 6XNR <https://www.rcsb.org>). Анализ выполняли со следующими настройками: допуск ошибки МС 10 ppm, допуск ошибки МС/МС 0,02 Да, протеаза – трипсин (для LpAFP - пепсин), в качестве переменной модификации окисление метионина и карбамидометил как фиксированная модификация.

Строение и чистоту выделенных рекомбинантных лед-связывающих белков подтверждали при помощи метода масс-спектрометрии MALDI-TOF как описано далее. Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре Autoflex Speed MALDI (Bruker Daltonics, Германия) с длительностью лазерного импульса 1–5 нс. Для анализа использовали матрицу 2,5-DHAP (2',5'-дигидроксиацетофенон) (Sigma-Aldrich, США). Равные объемы образца, 2% TFA (трифторуксусная кислота) (Sigma-Aldrich, США) и раствора матрицы перемешивались до начала кристаллизации, после этого 1 мкл смеси наносили на шлифованную стальную мишень MTP 384 (Bruker Daltonics, Германия) и

высушивали ее при комнатной температуре. МС-спектры получали в диапазоне 5–150 кДа в положительном режиме с помощью программного обеспечения FlexControl версии 3.3 (Bruker Daltonics, Германия) и впоследствии анализировали в программах FlexAnalysis версии 3.3 и Mmass версии 5.5.0 [33]. Прибор предварительно калибровали с применением Peptide calibration standard (Bruker Daltonic, Германия).

2.4. Физико-химические методы изучения IBP

2.4.1. Круговой дихроизм

Структуру и стабильность белка LS-12 в концентрации 0,2 мг/мл анализировали в двух буферных системах: первая содержала 20 мМ HEPES pH 7.6, а вторая – 20 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ pH 6.4 с помощью метода спектроскопии кругового дихроизма (КД). Пептидные связи детектировали в дальнем УФ-диапазоне: 200–250 нм для первого и 190–250 нм для второго буфера с использованием спектрополяриметра J600 (Jasco, Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 0,1 см (Starna Cells, США). КД-спектры получали в схожих температурных условиях: 0,2; 4; 25; 40, 60 и 70 °C в случае первого буфера и 0,2; 5; 15; 25; 40 и 60 °C в случае второго. Анализ выполняли в 10 внутривнутрипрограммных повторах со скоростью 50 нм/мин и размером шага 1 нм. Белок LS-12 инкубировали в течение 10 минут между измерениями разных температур. Вторичные структурные элементы определялись с использованием программного обеспечения BeStSel [34].

Структуру и стабильность белка RmAFP в концентрации 0,5 мг/мл анализировали в буферной системе, содержащей 10 мМ HEPES pH 7.6 с помощью метода спектроскопии кругового дихроизма. Пептидные связи детектировали в дальнем УФ-диапазоне (190–250 нм) с использованием спектрополяриметра J600 (Jasco, Япония) в кварцевой кювете с длиной пути 0,1 см (Starna Cells, США). КД-спектры получали в следующих температурных условиях: 0,2; 1; 25; 30; 40 и 70 °C. Анализ выполняли в 10 внутривнутрипрограммных повторах со скоростью 50 нм/мин и размером шага 1 нм. Белок RmAFP инкубировали в течение 10 минут между измерениями разных температур. Вторичные структурные элементы определялись с использованием программного обеспечения BeStSel [34].

Структуру и стабильность белка LpAFP в концентрации 1 мг/мл анализировали в буферной системе, содержащей 20 мМ HEPES pH 8.0 и 1 мМ ДТТ с помощью метода спектроскопии кругового дихроизма. Пептидные связи детектировали в дальнем УФ-диапазоне (185–250 нм) с использованием спектрополяриметра J600 (Jasco, Япония) в кварцевой кювете с длиной пути 0,1 мм (Starna Cells, США). КД-спектры получали в

следующих температурных условиях: 5; 10; 25; 40 и 70 °C. Анализ выполняли в 10 внутривнутрипрограммных повторах со скоростью 50 нм/мин и размером шага 1 нм. Белок RmAFP инкубировали в течение 10 минут между измерениями разных температур. Вторичные структурные элементы определялись с использованием программного обеспечения BeStSel [34].

2.4.2. Изотермическая титрационная калориметрия

Измерение процессов самоассоциации белка LS-12 выполняли с помощью метода изотермической титрационной калориметрии при температурах 15, 25 и 37 °C в 20 mM буфере HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl. Эксперимент проводили, загрузив концентрированный исходный раствор лед-связывающего белка (концентрация 0,1 mM) в инъекционный шприц, и титровали его тем же раствором с регистрацией изменения температуры при помощи изотермического титрационного калориметра Nano ITC (TA Instruments, США). Методология включала 25 инъекций шприцом объемом 50 мкл по 2 мкл раствора в ячейку для образца, содержащую 190 мкл раствора белка при постоянном перемешивании со скоростью 200 об/мин. Между каждой последовательной инъекцией была задержка с временным интервалом 300 с. Постепенное разбавление белка смещало равновесие мономер-олигомер в сторону мономера. Степень разбавления уменьшалась по мере продолжения титрования. Каждый анализ выполнялся не менее, чем в двух повторах для обеспечения достоверности, а окончательные профили связывания изотермической титрационной калориметрии получали путем вычитания буфера из основных профилей белка. Полученные данные обрабатывались с помощью программного обеспечения NanoAnalyze (TA Instruments, США).

2.4.3. Атомно-силовая микроскопия

Размеры частиц белка LS-12 определяли методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) в буферном растворе (20 mM буфер HEPES, pH 7.6, 150 mM NaCl). АСМ-визуализация проводилась с использованием атомно-силового микроскопа Multimode 8 (Bruker, Германия) в полуконтактном режиме на воздухе в режиме «ScanAsyst in Air» с применением зондов ScanAsyst-Air с типичным радиусом кривизны кончика 2 нм (Bruker, Германия) или в полуконтактном режиме с использованием кантилевера из алмазоподобного углерода серии NSG10 (NT-MDT, Россия) с радиусом кривизны кончика 1–3 нм при комнатной температуре. Образец белка разводили в указанном выше буфере с добавлением 15 mM MgCl₂ в концентрациях 10⁻⁶ M, 2 × 10⁻⁶ M или 4 × 10⁻⁶ M. Далее 10 мкл образца наносили на поверхность слюды (0,5 × 0,5 см), предварительно охлажденную льдом, на 1 мин. Затем поверхность промывали 3000 мкл сверхчистой воды (MilliQ) и

высушивали под слабым потоком аргона. В качестве контроля сканировали слюду с нанесенным на ее поверхность буфером без белка следуя тому же протоколу подготовки поверхности, что и в случае исследования белка. На поверхности высотой более 0,5 нм объектов не детектировалось. Изображения АСМ обрабатывали с помощью программного обеспечения для анализа данных АСМ Gwyddion v2.66 [35].

Размеры частиц белка LpAFP в буферном растворе (20 мМ буфер Tris-HCl, pH 8.0, 300 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ) определяли методом атомно-силовой микроскопии. АСМ-визуализация проводилась с использованием атомно-силового микроскопа Multimode 8 (Bruker, Германия) в полуконтактном режиме на воздухе в режиме «ScanAsyst in Air» с применением зондов ScanAsyst-Air с типичным радиусом кривизны кончика 2 нм (Bruker, Германия) или в полуконтактном режиме с использованием кантилевера из алмазоподобного углерода серии NSG10 (NT-MDT, Россия) с радиусом кривизны кончика 1–3 нм при комнатной температуре. Образец белка разводили в указанном выше буфере с добавлением 15 мМ $MgCl_2$ в концентрациях 10^{-6} М, 2×10^{-6} М или 4×10^{-6} М. Далее 10 мкл образца наносили на поверхность слюды ($0,5 \times 0,5$ см), предварительно охлажденную льдом, на 1 мин. Затем поверхность промывали 3000 мкл сверхчистой воды (MilliQ) и высушивали под слабым потоком аргона. В качестве контроля сканировали слюду с нанесенным на ее поверхность буфером без белка следуя тому же протоколу подготовки поверхности, что и в случае исследования белка. На поверхности высотой более 0,5 нм объектов не детектировалось. Изображения АСМ обрабатывали с помощью программного обеспечения для анализа данных АСМ Gwyddion v2.66 [35].

2.4.4. Малоугловое рентгеновское рассеяние

Особенности вторичной структуры белка LS-12 (39 мкМ) в 15 мМ фосфатном буфере, pH 6.3, 67 мМ NaCl изучали методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Предварительные измерения были выполнены с помощью источника рентгеновского излучения Rigaku MicroMax-007HF (Rigaku Oxford Diffraction, Техас, США). Данные МУРР были собраны на линии пучка BL19U2 Национального центра науки белка в Шанхае в Шанхайском центре синхротронного излучения (SSRF, Шанхай, Китай) [36]. Синхротрон работал, обеспечивая линию пучка BL19U2 и длину волны (λ) 1,03 Å. Анализ образцов (соответствующий диапазон передачи импульса $q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$ составлял 0,006–0,456 Å⁻¹, где 2θ — угол рассеяния, а λ — длина волны рентгеновского излучения) проводили с применением детектора Pilatus3 2M (DECTRIS Ltd., Швейцария), расположенного на расстоянии 2,67 м от образца. Данные рассеяния фиксировали со временем экспозиции кадра 1 с и 20 последовательными экспозициями для одного и того же образца.

Полученные значения были интегрированы и усреднены (с учетом базовой линии) для получения профилей SAXS и дальнейшей обработки с использованием BioXTAS RAW [37] и ATSAS [38]. Из вычтенных данных были получены функции распределения парных расстояний $P(r)$, с помощью косвенного преобразования Фурье с программами: GNOM, доступной в пакете программного обеспечения ATSAS [39] и BIFT (байесовское косвенное преобразование Фурье), доступной в RAW [40]. Трехмерную модель белка строили на основании данных распределения $P(r)$ с помощью программы DAMMIN [41] из программного пакета ATSAS [42]. Данная программа позволяет получать *ab initio* форму структуры на основе комбинации жестких сфер. Аппроксимацию данных SAXS с помощью простых моделей осуществляли с использованием программы SasView [43].

2.5. Молекулярное моделирование

2.5.1. Молекулярное моделирование мономерной формы белка

Построение трехмерной структуры белка LS-12 осуществляли с помощью молекулярно-динамического (МД) моделирования. Для построения модели гомологии последовательность LS-12 (UniProt ID: P80961) получали в формате FASTA из базы данных UniProt и импортировали в серверы AlphaFold [44] и SWISS-MODEL [45]. Моделирование молекулярной динамики пространственной структуры белка выполняли с использованием пакета программного обеспечения Amber20 [46] с ускоренным кодом для GPU [47, 48] и силовыми полями ff14SB для белка при температуре 273 К в течение 100 нс. Сначала системы минимизировали для релаксации молекул белка. Далее постепенно нагревали до 273 К и снова проводили релаксирование системы. Анализ полученных траекторий проводили с помощью программы Chimera 1.16.1 [49] и модуля CPPTRAJ [50] из AmberTools.

Построение трехмерной структуры белка LpAFP осуществляли моделированием по гомологии на основе белка 2ZIB с помощью веб-сервера SWISS-MODEL. Моделирование МД проводилось с использованием программного обеспечения Amber22 [51] с ускоренным кодом для GPU в силовом поле ff19SB и неявном растворителе. Сначала системы минимизировали для релаксации молекул белка. Далее постепенно нагревали систему до 273 К и снова релаксировали. Молекулярную динамику проводили при температуре 273 К в течение 100 нс. Анализ полученных траекторий проводили с помощью программы Chimera 1.17.1 и модуля CPPTRAJ из AmberTools.

2.5.2. Молекулярное моделирование олигомерных форм белка

Трехмерные структуры олигомерных форм белка LS-12 были получены с помощью программ GalaxyWeb [52] и AlphaFold2 [53], для которых в качестве входных данных

использовалась аминокислотная последовательность LS-12. Аналогичным образом были получены олигомерные формы белков RmAFP и LpAFP с учетом обнаруженных комплексов другими методами. Далее полученные олигомерные формы анализировали на устойчивость и жизнеспособность структур для последующих экспериментов со льдом.

2.5.3. Молекулярное моделирование белка со льдом

В эксперименте с белком LS-12 структуру поверхности льда генерировали с помощью программы GenIce2 [54] и модели воды TIP5P [55], т.к. она наравне с моделью TIP4P является одной из наиболее близких к реальным температурам плавления. Моделирование молекулярной динамики белка и его комплекса со льдом проводилось в явной модели растворителя. Общее время моделирования составляло 50 нс. Протокол включал в себя минимизацию энергии в системе с целью релаксации молекулы белка в неявной модели растворителя. Далее белок, лед и комплекс для сольватации помещали в водный контейнер модели воды TIP5P. Затем выполняли два этапа минимизации энергии: релаксацию молекулы растворителя с удержанием белка и льда, и релаксацию всей системы с последующим нагревом до 269 К. Дополнительно белок нагревали до 300 К. Молекулярную динамику проводили при этих же параметрах в течение 50 нс. Анализ полученных траекторий проводили с помощью модуля CPPTRAJ из AmberTools и программы Chimera 1.16.1.

Изучение особенности взаимодействия белка LpAFP с поверхностью льда проводили с помощью программы GenIce2 [56] и модели воды TIP4P после получения структуры Ih льда. Данная система включает в себя белок в явной модели растворителя (TIP4P-D) и лед. Между белком и льдом предусмотрено расстояние в 10 Å, которое заполнено растворителем для имитации квазижидкости.

Моделирование комплекса белка RmAFP со льдом выполнялось с одной моделью из предложенных олигомерных структур (гептамер). Структура льда Ih (76×71×32 Å) была получена с помощью программы GenIce2. Для получения комплекса гептамера RmAFP со льдом использовалась программа визуализации Chimera 1.16.1.

3. Результаты и обсуждения

Лед-связывающим белкам отведена особая роль в выживании организмов при достаточно низких отрицательных температурах (-1°C – -25°C) [16, 57]. Эти белки различными способами предотвращают повреждение клеток кристаллами льда при снижении температуры. Они были обнаружены у некоторых видов бактерий, грибов, водорослей, растений, насекомых и рыб.

В последнее время в зависимости от способа взаимодействия со льдом выделяют три категории лед-связывающих белков: *лед-нуклеирующие белки* – контролируют образование кристаллов льда при высоких отрицательных температурах, *антифризные белки* – повышают температуру замерзания жидкостей в организме для избежания замерзания, *белки ингибирования перекристаллизации* – обладают незначительной термически гистерезисной активностью и предотвращают образование более крупных кристаллов льда [5]. Белки, соотнесенные в данные категории, могут функционировать как раздельно, так и совместно.

Антифризные белки (AFP) антарктических и арктических обитателей в зависимости от их первичной и третичной структуры делят на четыре группы: I, II, III и IV. AFP I типа характеризуются прямой α -спиральной геометрией и повторяющимися мотивами, где Thr и Asn/Asp присутствуют в равноудаленном друг от друга положении, а также высоким содержанием остатков Ala в аминокислотной последовательности [58]. II тип белков антифризов представлен белками, гомологичными углеводному распознающему домену Ca^{2+} -зависимых (C-типа) лектинов и на основании их Ca^{2+} -активности подразделяются на: Ca^{2+} независимый и Ca^{2+} -зависимый [59]. AFP III типа описываются как компактные глобулярные белки, выделяющиеся своеобразной внутренней двукратной симметрией [60]. В IV тип выделяют липопроотеиноподобные белки с высоким содержанием α -спиралей (около 60 %) [61].

Отдельную группу составляют антифризные гликопротеины, которые содержат разное количество трипептида AAT, где в случае Thr гидроксильная группа связана с дисахаридом (β -D-галактозил-(1,3)- α -D-N-ацетилгалактозамин). При таких условиях углеводная часть занимает около 60 % массы [61].

Антифризные белки, вырабатываемые растениями, так же, как и насекомыми, относятся к двум отдельным группам. В случае растений повреждения связаны с образованием кристаллов льда в апопласте при замерзании. AFP растений препятствуют росту и перекристаллизации льда, образующегося в межклеточном пространстве [62]. Антифризные белки насекомых содержат белки с термической гистерезисной активностью от 5 °C до значительно превышающей такую у рыб [63]. Их также называют гиперактивными антифризными белками. Этим белкам свойственны многократные tandemные повторы в аминокислотной последовательности [64].

В качестве объектов исследования были выбраны антифризные белки, которые относятся ко II (LrAFP) и IV группам (LS-12) и в природе встречаются у рыб вида

Brachyopsis segaliensis и *Myoxocephalus octodecemspinosus*, соответственно. Еще одним объектом стал гиперактивный антифризный белок RmAFP, который был найден у жуков вида *Rhagium mordax*. Рыбы вида *Brachyopsis segaliensis* обитают в ареалах от юга Охотского моря до севера Японского моря и тихоокеанского побережья северной Японии. В этих местах температура воды зимой колеблется от 0 до -2 °С, а летом местами достигает 20 °С. Ареал обитания рыб вида *Myoxocephalus octodecemspinosus* располагается от Ньюфаундленда и залива Святого Лаврентия до Вирджинии, где температура зимой может достигать -0,8 °С. Жуки вида *Rhagium mordax* имеют достаточно широкую область распространения: Западная и Восточная Европа, от Западной Сибири до Енисея включительно, в Алтае и Западном Казахстане. Например, для обитания в Западной Сибири этому виду нужно выживать при низких температурах около -20– -30 °С. Таким образом, эти организмы объединяет относительно низкотемпературная среда обитания и делает их интересным объектом для исследований.

3.1. Получение и очистка белков

3.1.1. Белок LS-12

Лед-связывающий белок LS-12 был получен рекомбинантным методом. Для удобства очистки данного белка плазмиды содержала целевой ген, сшитый с 6His и ген протеазы TEV.

Гомогенность белка LS-12 подтверждали методом гель-электрофореза в 18%-м полиакриламидном геле (рисунок 1А). Строение и чистоту выделенного рекомбинантного лед-связывающего белка подтверждали методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (рисунок 1Б). Масса белка LS-12, определяемая при разделении в полиакриламидном геле с добавлением SDS и детектируемая методом масс-спектрометрии, согласуется как между собой, так и с теоретической массой, рассчитанной с использованием онлайн-сервиса ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>) по аминокислотной последовательности – 17,5 кДа.

А	Б
---	---

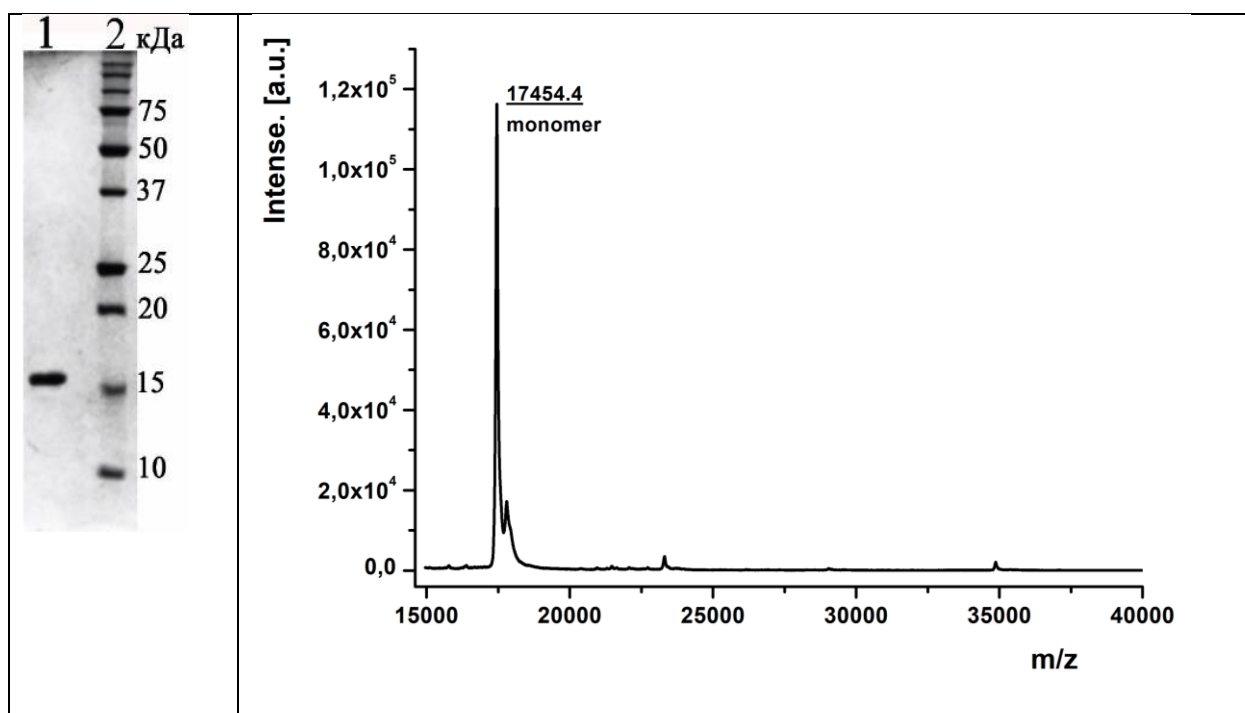


Рисунок 1. Характеризация полученного белка LS-12: (А) Электрофоретический анализ гомогенности: 1 – белок LS-12 молекулярной массой 17,5 кДа (масса белка приведена с His-tag и сайтом расщепления протеазы TEV); 2 – белковые маркеры молекулярной массы; (Б) Масс-спектр белка.

Подтверждение строения и чистоты полученного препарата белка LS-12 после обработки трипсином проводили методом хромато-масс-спектрометрии. Белковую полосу, соответствующую массе белка, вырезали из геля и гидролизовали трипсином по пептидным связям, образованным карбоксильными группами лизина и аргинина. После ферментативного расщепления полученную смесь пептидов анализировали методом хромато-масс-спектрометрии на масс-спектрометре высокого разрешения Orbitrap Q Exactive HF (Thermo Scientific Inc., США). Диапазон измеряемых масс пептидов составлял от 140 до 2100 m/z. По полученным спектрам пептидов проводили идентификацию белка с помощью программы Proteome Discoverer (v 3.0, Thermo Fischer Scientific). Поиск выполняли по локальной базе данных, в которую предварительно загружали последовательности белка LS-12 в виде FASTA-файла из базы Uniprot (ID: P80961). В результате проведения поиска в системе идентификации белков Sequest с допуском 10 ppm получили 99 % покрытия белка (рисунок 2).

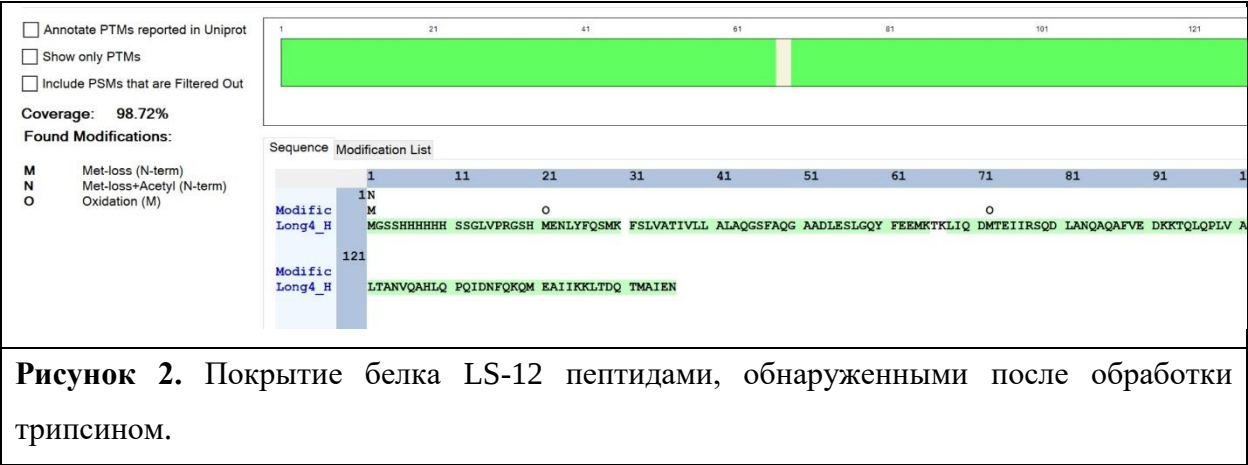


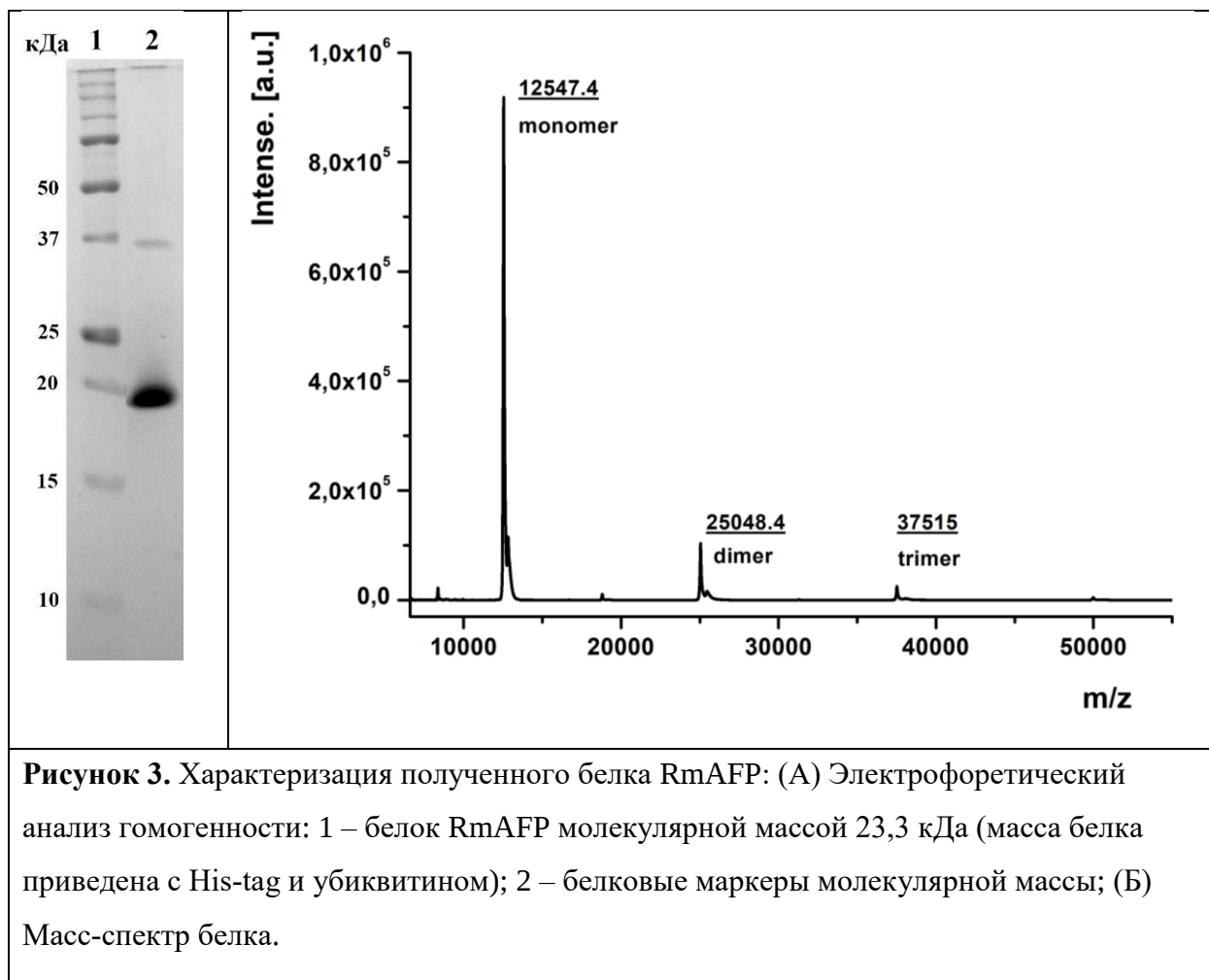
Рисунок 2. Покрытие белка LS-12 пептидами, обнаруженными после обработки трипсином.

3.1.2. Белок RmAFP

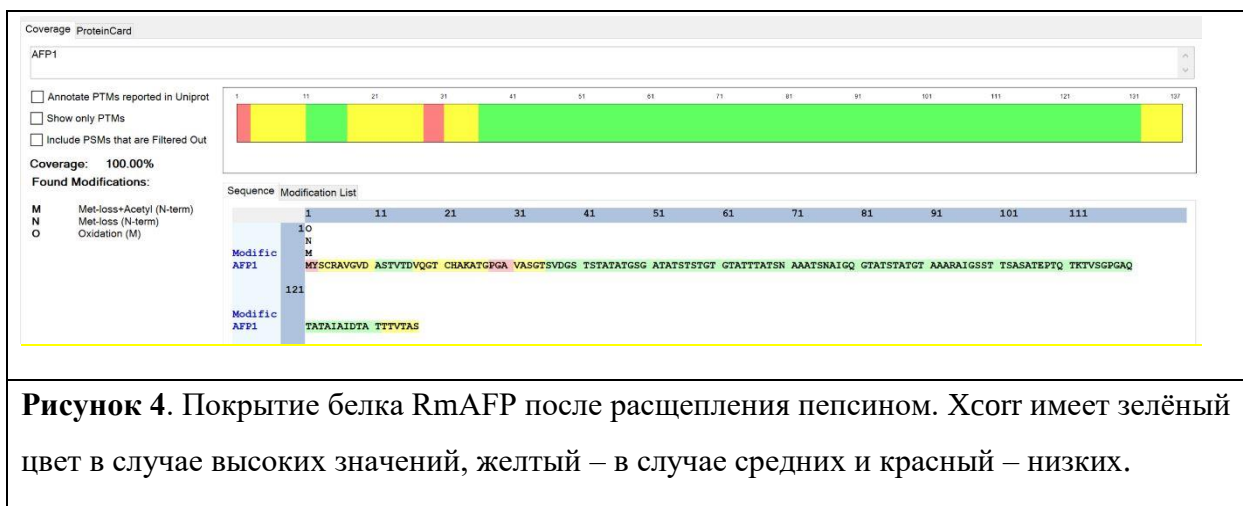
Другим объектом исследований являлся белок RmAFP, также полученный рекомбинантным методом. Для удобства очистки, белок на N-конце содержал гистидиновый хвост и убиквитин, который удалялся при обработке ферментом деубиквитиназой.

Гомогенность белка RmAFP подтверждали методом гель-электрофореза в 15%-м полиакриламидном геле (рисунок 3А). Строение и чистоту выделенного рекомбинантного лед-связывающего белка подтверждали методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (рисунок 3Б). Масса белка, определяемая при разделении в полиакриламидном геле с добавлением SDS, отличается от массы, детектируемой методом масс-спектрометрии и рассчитанной с использованием онлайн-сервиса ProtParam по аминокислотной последовательности – 12,5 кДа. Причина такой разницы может быть связана с особенностями конформации данного белка, например, в случае его более компактной формы относительно белка, который использовался в качестве маркера. Также повлиять на миграцию белка RmAFP в геле могло присутствие SDS, т.к. некоторые белки способны связывать больше молекул SDS. Помимо этого, на полиакриламидном геле наблюдается белковая полоса на уровне 37 кДа (рисунок 3А), что предположительно свидетельствует о наличии димерной формы белка.

А	Б
---	---



Подтверждение строения и чистоты полученного препарата белка RmAFP после обработки пепсином проводили методом хромато-масс-спектрометрии на высокоразрешающем масс-спектрометре Orbitrap Q Exactive HF (Thermo Scientific Inc., США). Диапазон измеряемых масс пептидов составлял от 140 до 2100 m/z. По полученным спектрам пептидов проводили идентификацию белка с помощью программы Proteome Discoverer (v 3.0, Thermo Fischer Scientific). В программе применяется показатель взаимной корреляции Xcorr для оценки схожести экспериментальных и теоретических спектров и чем он выше, тем достовернее идентифицированные пептиды. Поиск выполняли по локальной базе данных, в которую предварительно загружали последовательности белка RmAFP в виде FASTA-файла из базы PDB (ID: 6XNR). В результате проведения поиска пептидов по локальной базе данных получили 100 % покрытия белка (рисунок 4).



3.1.3. Белок LpAFP

Следующий объект исследований – белок LpAFP, аналогично полученный рекомбинантным методом. Для удобства очистки, LpAFP на N-конце содержал гистиридиновый хвост и белок убиквитин, который удалялся при обработке ферментом деубиквитиназой.

Гомогенность белка LpAFP подтверждали методом гель-электрофореза в 15%-м полиакриламидном геле (рисунок 5А). Масса белка LpAFP, определяемая при разделении в полиакриламидном геле с добавлением SDS и детектируемая методом масс-спектрометрии, согласуется с теоретической массой, рассчитанной с использованием онлайн-сервиса ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>) по аминокислотной последовательности – 28,9 кДа.

Подтверждение строения и чистоты полученного препарата белка LpAFP после обработки трипсином проводили методом хромато-масс-спектрометрии. Белковую полосу, соответствующую массе белка, вырезали из геля и гидролизовали трипсином по пептидным связям, образованным карбоксильными группами лизина и аргинина. После ферментативного расщепления полученную смесь пептидов анализировали методом хромато-масс-спектрометрии на высокоразрешающем масс-спектрометре Orbitrap Q Exactive HF (Thermo Scientific Inc., США). Диапазон измеряемых масс пептидов составлял от 140 до 2100 m/z. По полученным спектрам пептидов проводили идентификацию белка с помощью программы Proteome Discoverer (v 3.0, Thermo Fischer Scientific). Поиск выполняли по локальной базе данных, в которую предварительно загружали последовательности белка LpAFP в виде FASTA-файла из базы Uniprot (ID: AOZT93). В результате проведения поиска в системе идентификации белков Sequest с допуском 10 ppm получили 82 % покрытия белка (рисунок 5Б).

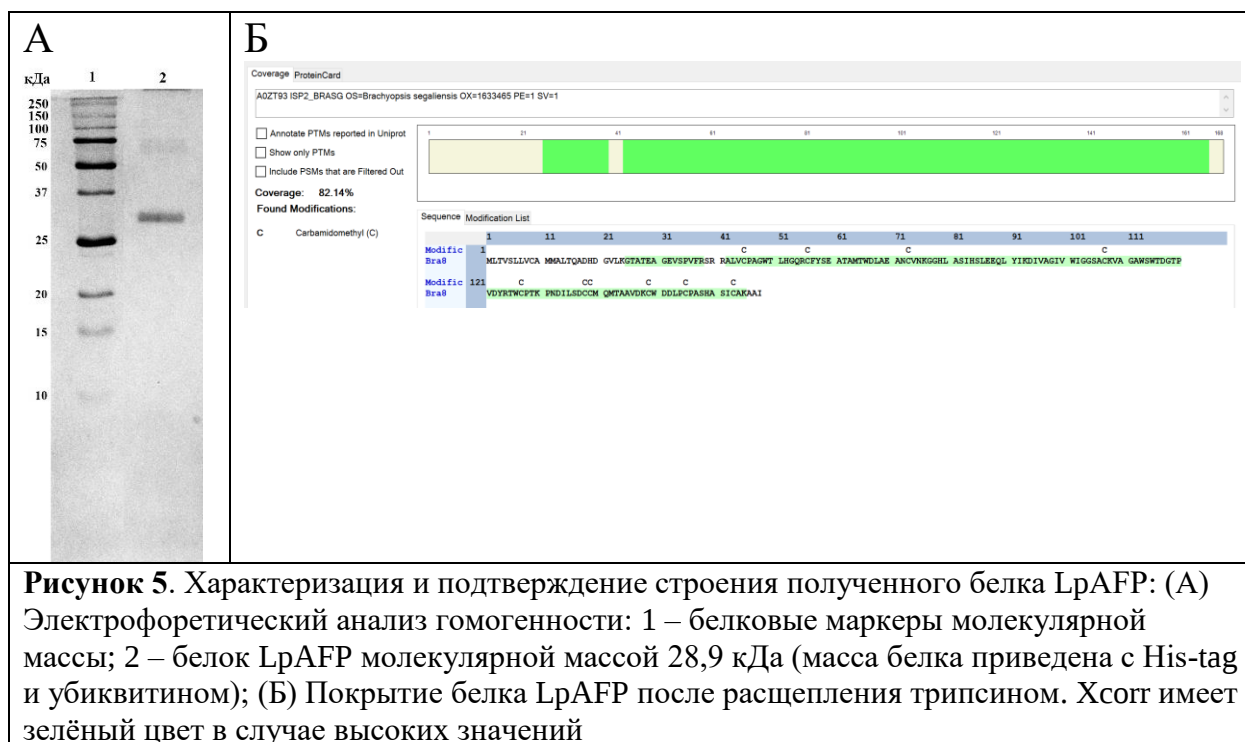


Рисунок 5. Характеризация и подтверждение строения полученного белка LpAFP: (А) Электрофоретический анализ гомогенности: 1 – белковые маркеры молекулярной массы; 2 – белок LpAFP молекулярной массой 28,9 кДа (масса белка приведена с His-tag и убиквитином); (Б) Покрытие белка LpAFP после расщепления трипсином. Хсорт имеет зелёный цвет в случае высоких значений

3.2. Вторичная структура лед-связывающих белков

Структуру белка можно изучать несколькими типами экспериментальных методов: спектроскопическими (круговой дихроизм, инфракрасная спектроскопия и т.д.) и структурными (рентгеноструктурная кристаллография, ЯМР-спектроскопия, криоэлектронная микроскопия и т.д.). Также широкое применение получили компьютерные методы анализа вторичной структуры белков. С помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД) определяют вторичную или третичную структуры биомолекул, например, белков, в растворе. Метод масс-спектрометрии (МС) позволяет подтвердить строение анализируемого образца, наличие или отсутствие модификаций, определить мономерные и олигомерные формы белков. С помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) можно оценить структурные особенности биологических макромолекул в растворе, получить трёхмерные (3D) структурные модели низкого разрешения и описать состояния сборки и конформации. Метод изотермической титрационной калориметрии (ИТК) позволяет охарактеризовать молекулярные взаимодействия между лигандами и макромолекулами, а также подтвердить склонность к самоассоциации белков. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) – это метод, с помощью которого можно охарактеризовать широкий спектр материалов, в том числе белки, основываясь на визуализации особенностей их поверхности и анализе их механических,

электрических и магнитных свойств. С помощью метода молекулярного моделирования можно получить трехмерную структуру молекулы, ее химические и физические свойства, сравнить одну структуру молекулы с другими; визуализировать взаимодействие различных комплексов, например, антифризного белка со льдом. Сочетание данных методов обеспечивает более глубокое понимание пространственной организации и взаимодействия белков со льдом. Таким образом, целостное и объективное представление о структуре лед-связывающих белков может быть получено исключительно при комплексном применении различных методов исследования.

3.2.1. Анализ вторичной структуры методом кругового дихроизма

Оценка вторичного строения лед-связывающих белков выполнялась с помощью спектроскопии кругового дихроизма (КД).

3.2.1.1. Белок LS-12

Лед-связывающий белок LS-12 (UniProt: P80961) был выбран в качестве объекта исследования, т. к. для него отсутствует экспериментально определенная структура, в базе данных UniProt существует только предсказанная сервисом AlphaFold вторичная структура. КД спектры белка LS-12 в концентрации 0,2 мг/мл (11,4 мМ) в буфере (20 мМ HEPES pH 7.6, 100 мМ NaCl) при нагревании от 0,2 до 35 °C содержат два отрицательных пика на длинах волн 208 и 222 нм (рисунок 6), что характерно для α -спиральных белков [65]. Последующее нагревание белка до 80 °C привело к изменениям в структуре и денатурации LS-12 при 70 °C. Обработка КД-спектров в программе BeStSel (таблица 1) позволила установить преобладание α -спиралей и неструктурированных элементов во вторичной структуре белка LS-12, что соответствует данным полученным ранее авторами Deng G. и Laursen A. R. в 0,1 М NH_4HCO_3 буфере [66]. Помимо этого, структуру данного белка изучали в фосфатном буфере (pH 7.4), 100 мМ NaCl. Полученные спектры были обработаны с помощью онлайн-сервиса DichroWeb [67] и в этих условиях белок LS-12 также характеризовался структурой, преимущественно в виде α -спиралей [68].

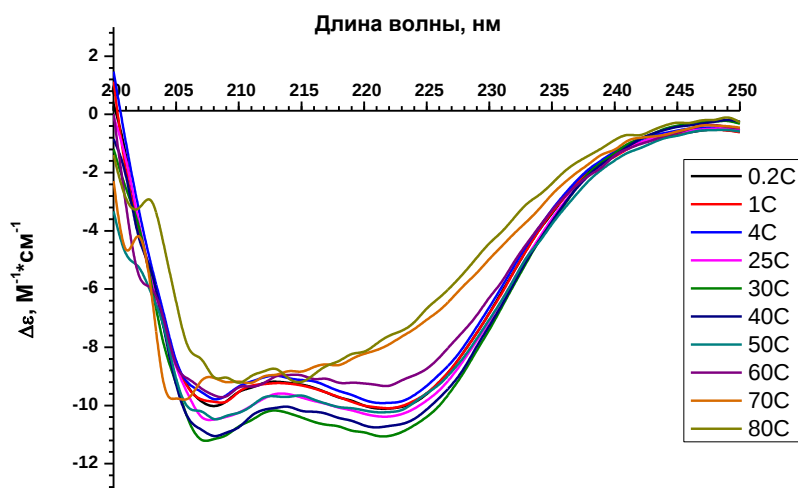


Рисунок 6. Спектры КД белка LS-12 в концентрации 0,2 мг/мл в буфере (20 mM HEPES pH 7.6, 100 mM NaCl) при различных температурах в диапазоне длин волн 200-250 нм.

Наряду с экспериментальными методами исследования вторичной структуры, широкое применение получило построение теоретических моделей белков, например, моделирование методом молекулярной динамики (AMBER, GROMACS, CHARMM и т.д.) и методы прогнозирования вторичной структуры (PSIPRED, RaptorX-Property, Jpred 4 и т.п.). С помощью онлайн сервисов теоретического предсказания вторичной структуры белка (PSIPRED 4.0 и RaptorX-Property) на основе первичной последовательности было спрогнозировано преобладание α -спиралей (77%) и наличие неструктурированных участков (22%) в структуре (рисунок 7 и 8, соответственно), что согласуется с данными, представленными выше и в таблице 1.

Таблица 1. Процентное соотношение вклада элементов во вторичную структуру белка LS-12

Температура Структура	0,2 °C	1 °C	4 °C	25 °C	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
α -спираль, %	65,7	62,3	65,0	74,3	82,1	82	70,3	63,6	79,3	58,9
β -лист, %	0,4	0,6	1,1	2,4	11,3	10,5	22,6	10,8	9,5	34,2
Повороты, %	8,6	7,9	8,6	9,3	6,6	7,5	5,2	6,9	11,2	6,8
Неструктурированные элементы, %	25,3	29,3	25,4	13,9	0	0	2	18,7	0	0

до темно-синего цвета, где белый – самый недостоверный, темно-синий – наиболее вероятный сценарий; (Б) Модель, полученная в результате прогнозирования с помощью DMPFold 2.0.

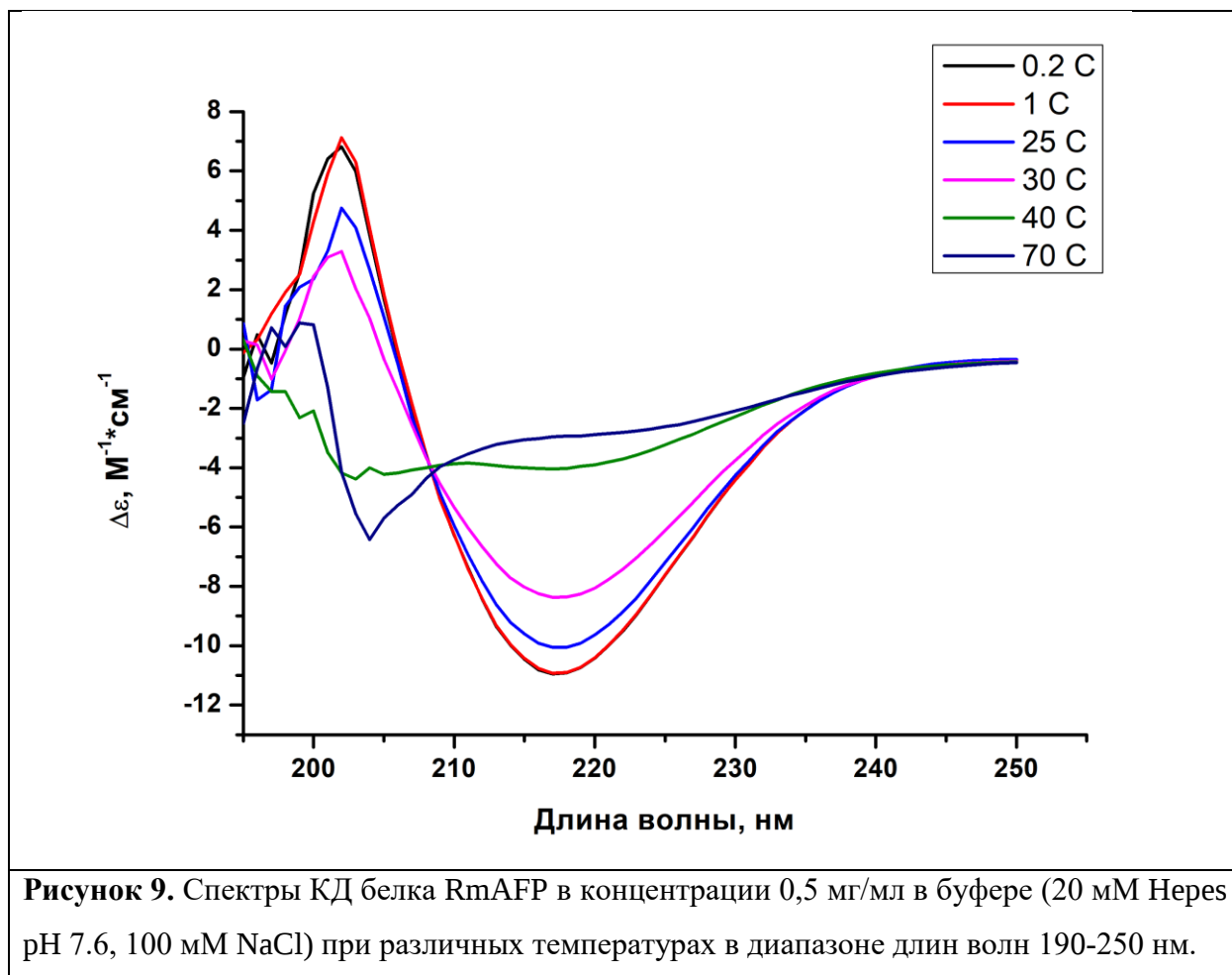
	1	11	21	31	41	51	61	71
SEQ	MGSSNNNNNN	SSGLVPRGSH	MENLYFQSMK	FSLVATIVLL	ALAQGSFAQG	AADLESIGQY	FEEMKTKLIQ	DMTEIIRSQD
SS3	CCCCCCCC	CCCCCCCC	CCCCNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNCCCC	CCCCNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
SS8	LLLLLLLL	LLLLLLLL	LLLLNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNTTLLL	LLLLNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
ACC	EEEEEEEE	EEEEEEEE	EEEEENNEE	EBBBBBBBBB	BBBBEWEEEE	EEEEEEBEE	BEEBWEEME	EBEEEEEEEE
DISO	*****	*****	*****					
	81	91	101	111	121	131	141	151
SEQ	LANQAQAFVE	DKKTQLQPLV	AQIQEQMKTV	ATNVEEQIRP	LTANVQAHLQ	PQIDNFQKQM	EAIKKLTDQ	TMAIEN
SS3	NNNNNNNN	NNNNNNNN	NNNNNNNN	NNNNNNNN	NNNNNNNN	NNNNNNNN	NNNNNNNN	NNNNCC
SS8	NNNNNNNN	NNNNNNNN	NNNNNNNN	NNNNNNNN	NNNNNNNN	NNNNNNNN	NNNNNNNN	NNNNLL
ACC	E EEEEE	E EEEEE	EEEEEEEE	EEEEEEEE	EEEEEEEE	EBEEEEEE	EEEEEEEE	EEEEEE
DISO								

Рисунок 8. Предсказанная структура белка LS-12 с использованием онлайн сервиса RaptorX-Property: Графические выходные данные PSIPRED, полученные в результате прогнозирования лед-связывающего белка LS-12. Строка SEQ, включает последовательность белка; SS3 – прогноз вторичной структуры по трем элементам: α -спирали (H), β -листы (E) и неструктурированные элементы (C); SS8 – прогноз вторичной структуры с учетом восьми возможных стабильных элементов: α -спираль (H), тройная спираль (G), 5- α -спираль (I), β -лестница (E), β -мост (B), поворот (T), изгиб (S) и петля (L); ACC предполагает доступность растворителя: открытое состояние (B), открытое состояние (E) и средняя доступность для растворителя (M); DISO – предполагает неупорядоченные участки в структуре (в строке они обозначены *).

3.2.1.2. Белок RmAFP

Изучение лед-связывающего белка RmAFP (PDB: 6XNR) обусловлено тем, что его структура была изучена только методом дифракции рентгеновских лучей, что отражает строение в фиксированном кристаллическом состоянии, а также отсутствовала информация о механизме его связывания со льдом. КД спектры белка RmAFP в концентрации 0,5 мг/мл (40 мМ) в буфере (20 мМ HEPES pH 7.6, 100 мМ NaCl) при нагревании от 0,2 до 30 °C имеют отрицательный пик на длине волны 218 нм (рисунок 9), что является индикатором содержания β -листов в структуре белка [65]. Последующее нагревание белка до 70 °C привело к изменениям в структуре и денатурации RmAFP при 40 °C. В результате обработки КД-спектров в программе BeStSel (таблица 2) было установлено преобладание β -листов и неструктурированных элементов во вторичной структуре белка RmAFP, что соотносится с данными полученным ранее авторами Friis D.S., Johnsen J. L. et al. при

концентрации белка RmAFP 0,25 мг/мл в буфере: 10 mM Na₂HPO₄, (pH 7.4) 137 mM NaCl [69].



С помощью онлайн сервисов теоретического предсказания вторичной структуры белка (PSIPRED 4.0 и RaptorX-Property) на основе первичной последовательности было спрогнозировано небольшое процентное преобладание β-листов (56%) относительно неструктурированных участков (43%) (рисунок 10 и 11, соответственно), что значительно отличается от данных, представленных выше и в таблице 2. Из данного наблюдения следует, что на основании только первичной последовательности не всегда можно получить корректный и достоверный прогноз пространственной структуры, поэтому результаты, полученные экспериментальным путем остаются приоритетными.

Таблица 2. Процентное соотношение вклада элементов во вторичную структуру белка RmAFP

Температура	0,2 °C	1 °C	25	30	40	70
Структура						
α-спираль, %	6,10	7,1	3,7	2,90	7,1	13,3
β-лист, %	85,75	85,40	78,20	62,90	23,80	18,10

Повороты, %	0,00	0,00	0,00	3,4	10,5	12,0
Неструктурированные элементы, %	8,15	7,5	18,1	30,8	58,6	56,6

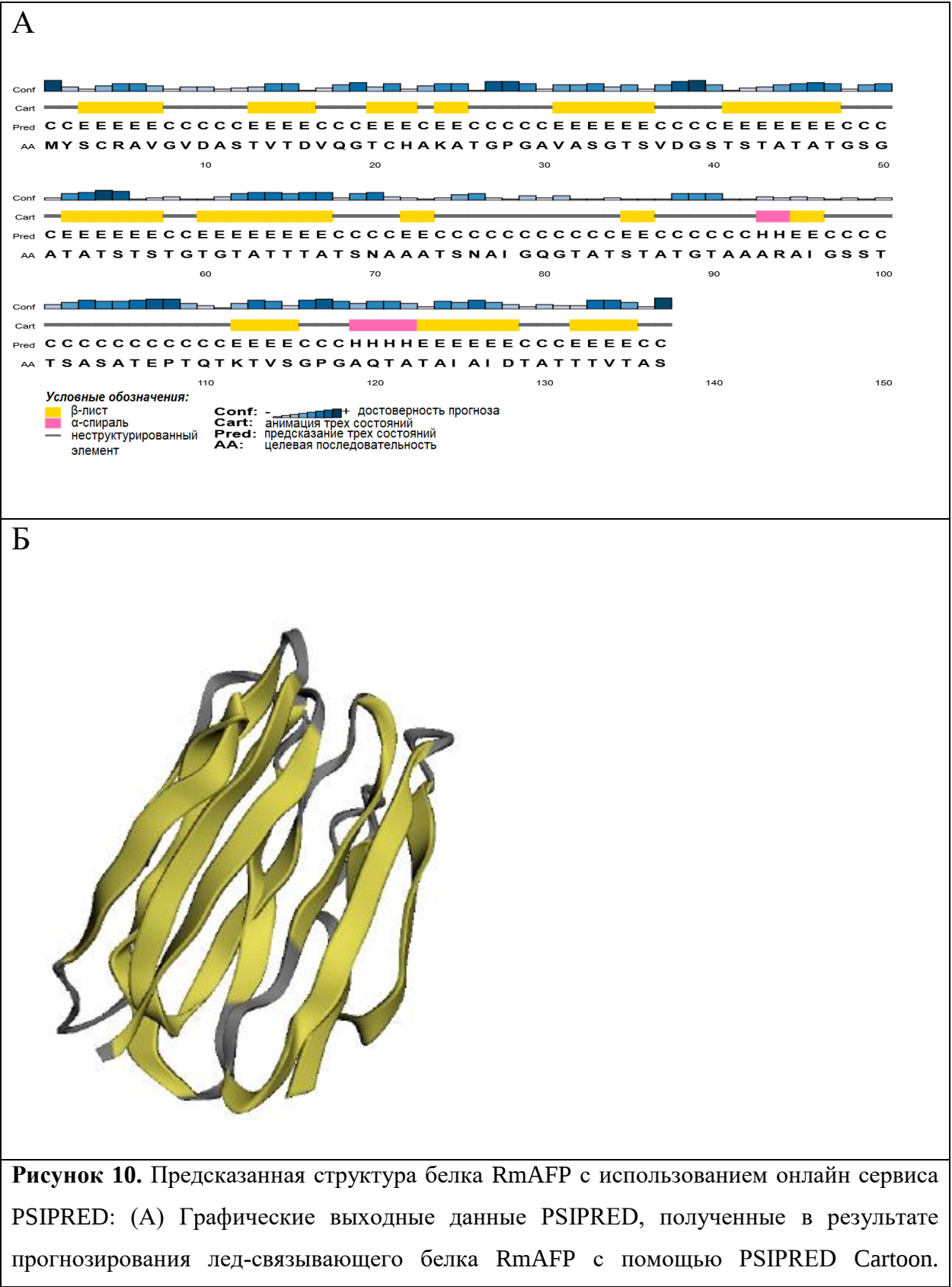


Рисунок 10. Предсказанная структура белка RmAFP с использованием онлайн сервиса PSIPRED: (А) Графические выходные данные PSIPRED, полученные в результате прогнозирования лед-связывающего белка RmAFP с помощью PSIPRED Cartoon.

Желтым цветом отмечены β -листы, розовым – α -спирали, серым – неструктурированные участки, диапазон достоверности прогнозирования приведен в цветовой гистограмме от белого до темно-синего цвета, где белый – самый недостоверный, темно-синий – наиболее вероятный сценарий; (Б) Модель, полученная в результате прогнозирования с помощью DMPFold 2.0.

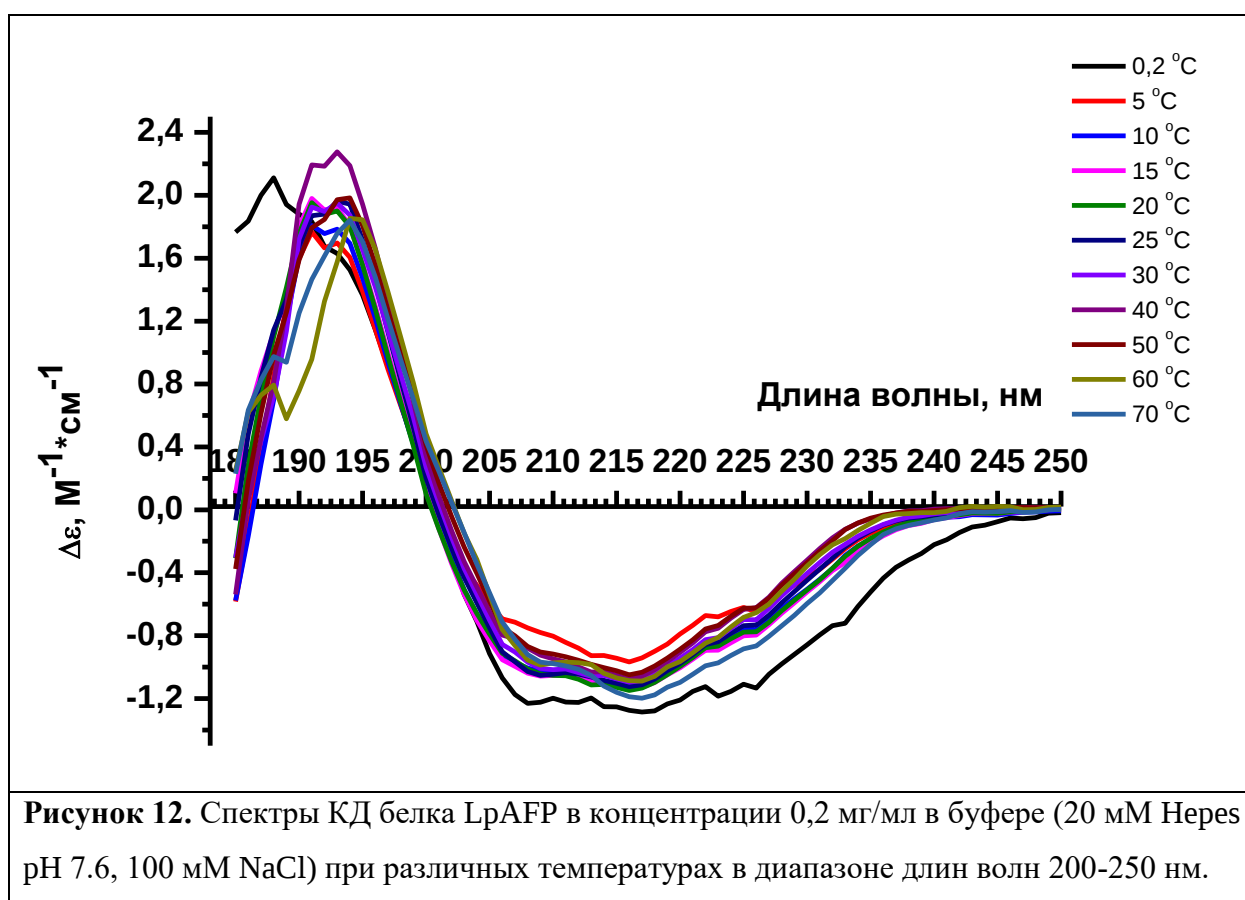
	1	11	21	31	41	51	61	71
SEQ	M Y S C R A V G V D	A S T V T D V Q G T	C H A K A T G P G A	V A S G T S V D G S	T S T A T A T G S G	A T A T S T S T G T	G T A T T A T S N	A A A T S N A I G Q
SS3	C C E E E E E E E C	C C C E E E E E E E	E E E E C C C C E	E E E E E E C C C	E E E E E E E C C	E E E E E C C C E	E E E E E E E C C	C C C C C C E E E
SS8	L L E E E E E E E L	L L E E E E E E E	E E E E L S T T E	E E E E E E T T L	E E E E E E E E E	E E E E E E E E E	E E E E E E E E L	L E L L E E E E E
ACC	E E E E E E E E E	E E E E E E E E E	E E E E E E E E E	E E E E E E E E E	E E E E E E E E E	E E E E E E E E E	E E E E E E E E E	E E E E E E E E E
DISO	* *							
	81	91	101	111	121	131		
SEQ	G T A T S T A T G T	A A A R A I G S S T	T S A S A T E P T Q	T K T V S G P G A Q	T A T A I A I D T A	T I T V T A S		
SS3	E E E E E E E C C	C C C E E E C C C C	C C C C C C C E E	E E E E C C C C C	C E E E E E C C C	C C C C C C C		
SS8	E E E E E E E E L	L L L E E E E L L L	L L L L L L L L E E	E E E E E L T T L L	E E E E E E E L L	L E E E L L L		
ACC	E E E E E E E E E	E E E E E E E E E	E E E E E E E E E	E E E E E E E E E	E E E E E E E E E	E E E E E E E		
DISO	. . . * * * * * *	* * * * * * * * *	* * * * * * * * *	* * * * * * * * *	* * * * * * * * *	* * * * * * *		

Рисунок 11. Предсказанная структура белка RmAFP с использованием онлайн сервиса RaptorX-Property: Графические выходные данные PSIPRED, полученные в результате прогнозирования лед-связывающего белка RmAFP. Строка SEQ, включает последовательность белка; SS3 – прогноз вторичной структуры по трем элементам: α -спирали (H), β -листы (E) и неструктурированные элементы (C); SS8 – прогноз вторичной структуры с учетом восьми возможных стабильных элементов: α -спираль (H), тройная спираль (G), 5- α -спираль (I), β -лестница (E), β -мост (B), поворот (T), изгиб (S) и петля (L); ACC предполагает доступность растворителя: открытое состояние (B), открытое состояние (E) и средняя доступность для растворителя (M); DISO – предполагает неупорядоченные участки в структуре (в строке они обозначены *).

3.2.1.3. Белок LpAFP

Выбор лед-связывающего белок LpAFP (UniProt: A0ZT93) в качестве объекта исследования, обусловлен тем, что в настоящее время в базе данных UniProt для него существует только вторичная структура, предсказанная сервисом AlphaFold и частично проанализированная методом дифракции рентгеновских лучей. КД спектры белка LpAFP в концентрации 1 мг/мл (34,6 мМ) в буфере, содержащем 20 мМ HEPES (pH 8.0), 100 мМ NaCl и 1 мМ ДТТ при нагревании от 0,2 до 40 °C с одной стороны имеют положительный пик на длине волны 193 нм характерный для α -спиральных белков [65], с другой стороны сложно выделить какие-то четкие отрицательные пики (рисунок 12), поэтому визуально определить преобладающий элемент структуры не представляется возможным. Последующее нагревание белка до 70 °C не привело к значительным изменениям в

структуре. КД-спектры были обработаны в программе BeStSel (таблица 3). В результате было установлено преобладание β -листов и неструктурированных элементов во вторичной структуре белка LrAFP. Подобные работы по исследованию данного белка методом кругового дихроизма за последние 10 лет не проводились, так же, как и других лед-связывающих белков, относящимися ко II типу классификации лед-связывающих белков рыб. Только в одной статье 1981 года авторы Slaughter D., Fletcher G. L. et al [70] сообщают об анализе другого белка этого типа, который был обнаружен в рыбах вида Атлантическая волосатка. В их работе диапазон детектирования КД-спектров от 200 до 240 нм в буфере 0,1 М KCl pH 6.5, который отличается от используемого в данной работе, однако есть выраженный отрицательный пик на длине волны 213 нм, который схож с представленным.



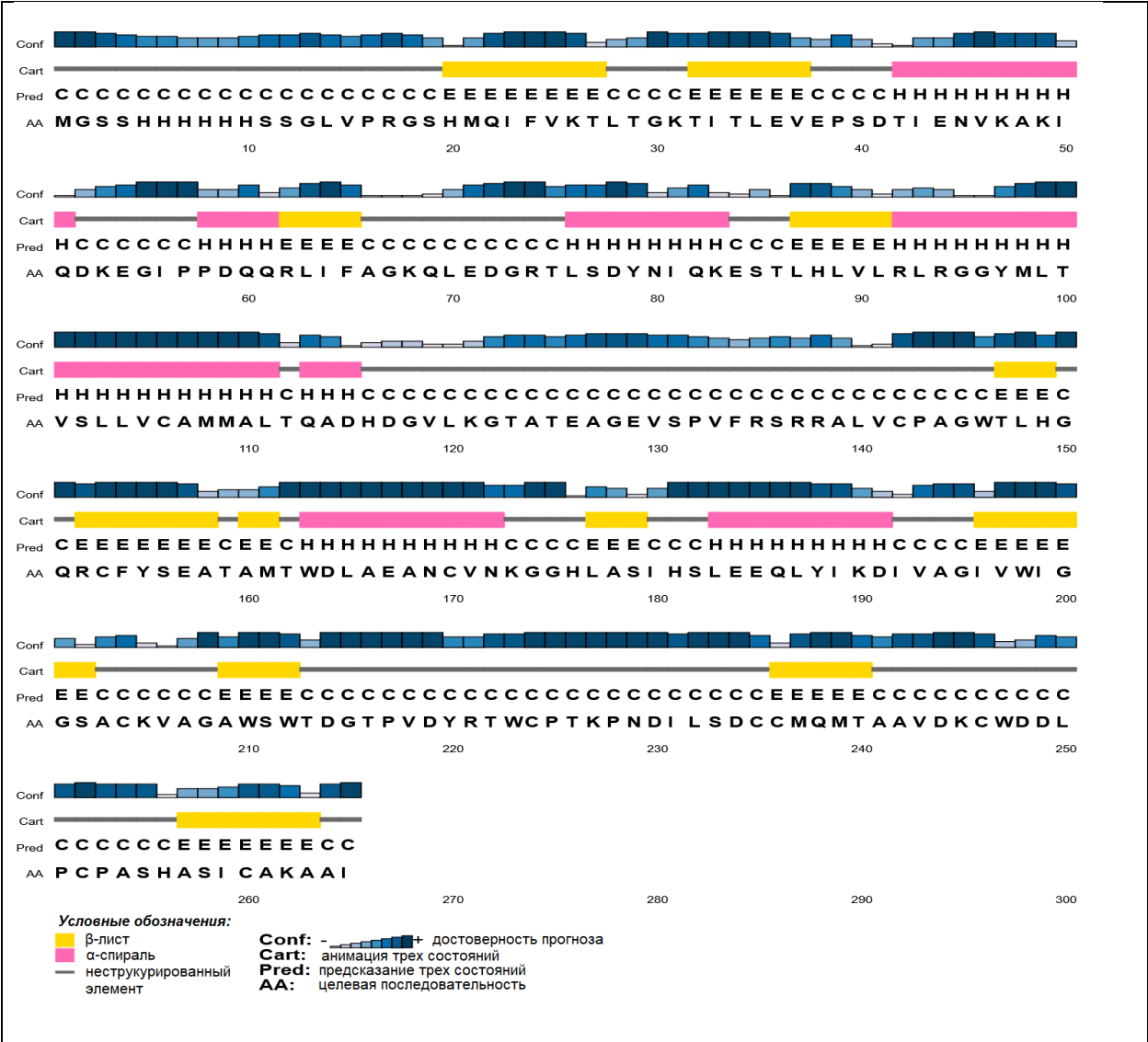
С помощью онлайн сервисов теоретического предсказания вторичной структуры белка (PSIPRED 4.0 и RaptorX-Property) на основе первичной последовательности было спрогнозировано преобладание неструктурированных участков (57%), наличие β -листов (24%) и, в меньшей степени, α -спиралей (18%) в структуре (рисунок 13 и 14, соответственно). Данные, полученные методом кругового дихроизма и спрогнозированные онлайн серверами сходятся в процентах неструктурированных элементов, однако при сравнении с результатами из таблицы 3 наблюдается почти равный вклад в структуру β -

листов и лишь небольшой процент присутствия α -спиралей в отличие от теоретических предположений серверов PSIPRED 4.0 и RaptorX-Property. Поэтому результаты исследования вторичной структуры белка LpAFP требуется подтвердить или опровергнуть другими методами.

Таблица 3. Процентное соотношение вклада элементов во вторичную структуру белка LpAFP

Температура Структура	0,2	5	10	15	20	25	30	40	50	60	70
α -спираль, %	4,4	0	0,7	0,7	0	0	0	0	0	0	0
β -лист, %	32,4	43,4	41,1	39,5	41,6	42,4	41,2	43,5	46,7	40,5	41,2
Повороты, %	14,9	12,4	14,1	15	13,4	13,7	15,5	13,9	12	17,6	16
Неструктурированные элементы, %	48,3	44,2	44,1	44,8	44,9	44	43,2	42,6	41,4	41,9	42,8

А



Б

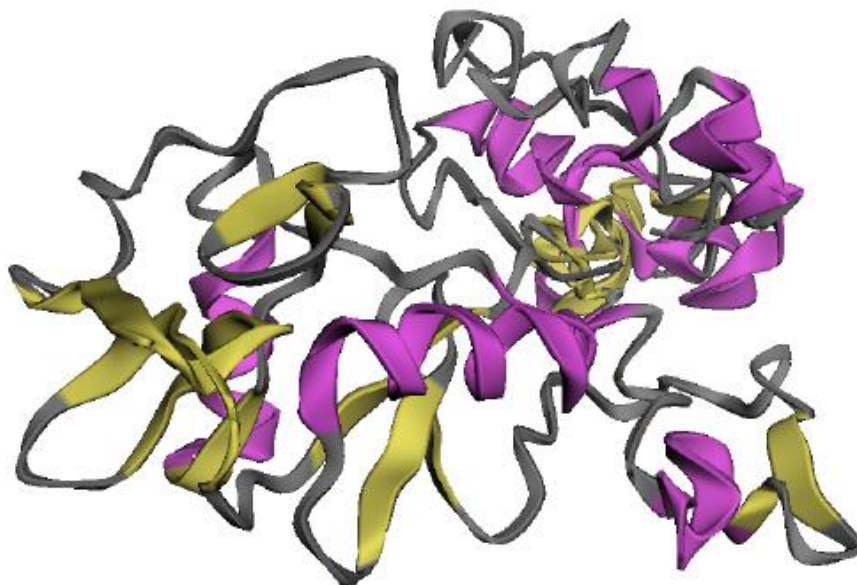


Рисунок 13. Предсказанная структура белка LrAFP с использованием онлайн сервиса PSIPRED: (А) Графические выходные данные PSIPRED, полученные в результате прогнозирования лед-связывающего белка LrAFP с помощью PSIPRED Cartoon. Желтым цветом отмечены β -листы, розовым – α -спирали, серым – неструктурированные участки, диапазон достоверности прогнозирования приведен в цветовой гистограмме от белого до темно-синего цвета, где белый – самый недостоверный, темно-синий – наиболее вероятный сценарий; (Б) Модель, полученная в результате прогнозирования с помощью DMPFold 2.0.

	1	11	21	31	41	51	61	71
SEQ	MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MQIFVKTLTG	KTITLEVEPS	DTIENVKAKI	QDKEGIPPDQ	QRLIFAGKQL	EDGRTLSDYN
SS3	CCCCCCCC	CCCCCCCC	EEEEEE	CCCC	CHHHHHHH	HHHCCCC	EEEECC	CCCCCCCC
SS8	LLLLLLLL	LLLLLLLL	EEEEEL	TTT	SBHHHHHH	HHHLL	GGG	EEEEET
SS8	EEEEEEEE	EEEEEEEE	BM	B	MB	MB	MB	MB
DISO	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	81	91	101	111	121	131	141	151
SEQ	IQKESTLHLV	LRLRGGYMLT	VSLLVCAMMA	LTQADHDGVL	KGTATEAGEV	SPVFRSRRAL	VCPAGWTLHG	QRCFYSEATA
SS3	CCCC	EEEE	EE	CCCC	HHH	CCCC	CCCC	CCCC
SS8	LL	TT	LE	EEEE	HHH	LLLL	LLLL	TTTT
SS8	EEEE	MM	MB	MB	MB	MB	MB	MB
DISO	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	161	171	181	191	201	211	221	231
SEQ	MTWDLAEANC	VNKGGHLASI	HSLEEQLYIK	DIVAGIVWIG	GSACKVAGAW	SWIDGTPVDY	RTWCPTKPNP	ILSDCCMQMT
SS3	CHHHHHHH	HHCCCC	CCCC	CHHHHHHH	HHCCCC	EEEE	CCCC	CCCC
SS8	LLHHHHHH	HH	TT	LE	LLLL	LS	HHHHHH	HHH
SS8	EEEE	MM	MB	MB	MB	MB	MB	MB
DISO	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	241	251	261					
SEQ	AAVDKCWDDL	PCPASHASIC	AKAAI					
SS3	CCCC	EEEE	EEEE					
SS8	EL	TT	LE	EEEE				
SS8	EEEE	MM	MB	MB				
DISO	*****	*****	*****					

Рисунок 14. Предсказанная структура белка LpAFP с использованием онлайн сервиса RaptorX-Property: Графические выходные данные PSIPRED, полученные в результате прогнозирования лед-связывающего белка LpAFP. Строка SEQ, включает последовательность белка; SS3 – прогноз вторичной структуры по трем элементам: α -спирали (H), β -листы (E) и неструктурированные элементы (C); SS8 – прогноз вторичной структуры с учетом восьми возможных стабильных элементов: α -спираль (H), тройная спираль (G), 5- α -спираль (I), β -лестница (E), β -мост (B), поворот (T), изгиб (S) и петля (L); ACC предполагает доступность растворителя: открытое состояние (B), открытое состояние (E) и средняя доступность для растворителя (M); DISO – предполагает неупорядоченные участки в структуре (в строке они обозначены *).

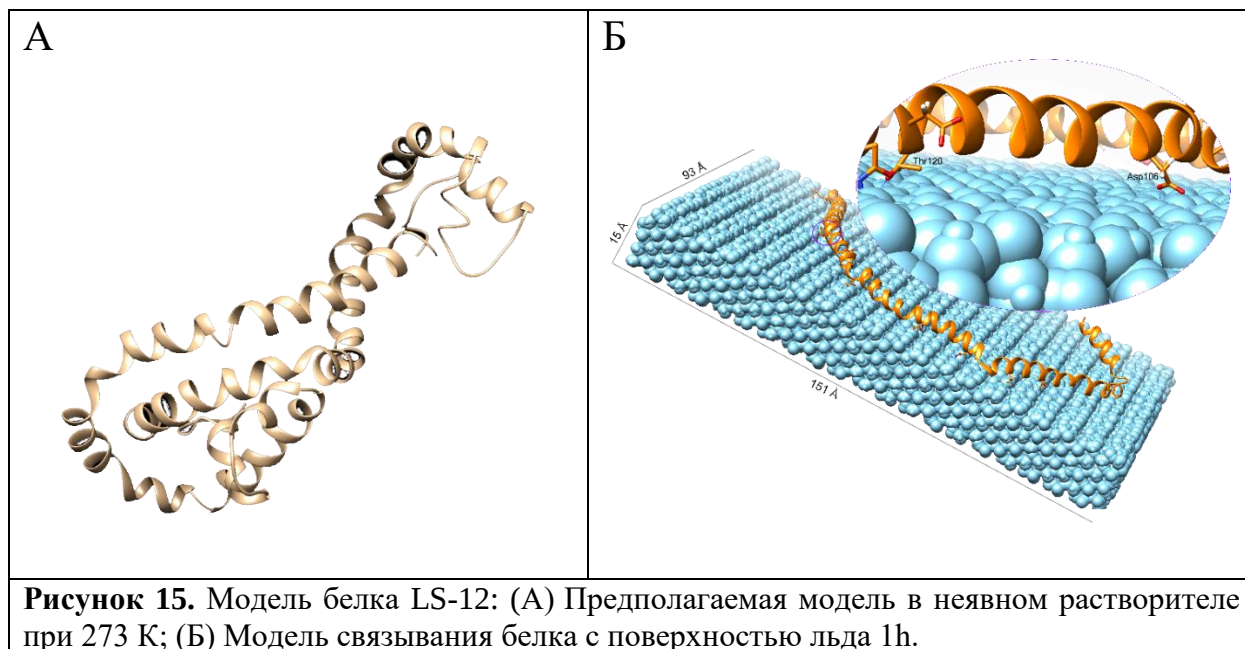
3.2.2. Молекулярное моделирование рекомбинантного белка

Поскольку эксперименты по изучению лед-связывающих белков проводятся в растворе, при анализе их структурных характеристик необходимо учитывать возможные изменения конформационного состояния молекул, в особенности те, которые происходят при изменении температуры. Одним из мощных подходов, позволяющих предложить конформационные изменения, происходящие при понижении температуры, являются методы компьютерного моделирования.

3.2.2.1. Белок LS-12

Белок LS-12 на сегодняшний день не имеет установленной структуры в базе данных PDB. Моделированием по гомологии с помощью веб-серверов AlphaFold и SWISS-MODEL получена структура белка LS-12 и его комплекс со льдом (рисунок 15). Данные структуры использовали для проведения молекулярной динамики в неявной модели растворителя в силовом поле ff14SB. Белок флуктуировал на протяжении всех 50 нс молекулярной динамики. Согласно литературным данным, наиболее близкими к реальным температурам плавления обладают модели воды TIP4P /ice и TIP5P [71]. В данном случае использовали модель TIP5P. Изучаемые системы содержали белок в явной модели растворителя и комплекс «белок–лед». Системы на протяжении всей динамики оставались стабильными. Анализ полученных траекторий показал, что среднеквадратичное отклонение для белка в явном растворителе при 269 К достигало ~ 25 Å, хотя α -спирали оставались довольно стабильными и значение среднеквадратичного отклонения для данных структур находилось в области 5 Å. Комплекс белка со льдом, в свою очередь, проявлял большую стабильность и значение среднеквадратичного отклонения для белковой молекулы достигало 8 Å благодаря неструктурированным областям, а отклонения во вторичных структурах, взаимодействующих с поверхностью льда, было около 2 Å. На рисунке 15

также показано, что водородные связи с поверхностью льда образуют Thr, Asn, Asp, Gln и Glu в различных позициях, находящиеся на расстоянии 15–20 Å друг от друга, что согласуется с литературными данными [72]. На малых временах видимого эффекта на стабилизацию/дестабилизацию структуры льда не обнаружено.



3.2.2.2. Белок LpAFP

Белок LpAFP на сегодняшний день имеет структуру, предсказанную программой AlphaFold и часть структуры в базе данных PDB, у которой есть гомологичные участки с белком 2ZIB, охарактеризованным с помощью рентгеноструктурной кристаллографии. Методом моделирования по гомологии на основе белка 2ZIB с помощью веб-серверов AlphaFold3 [73], SWISS-MODEL и GalaxyWeb были предсказаны структуры мономера белка LpAFP. Все структуры представлены α -спиралями, β -листами и неструктурированными участками (рисунок 16).

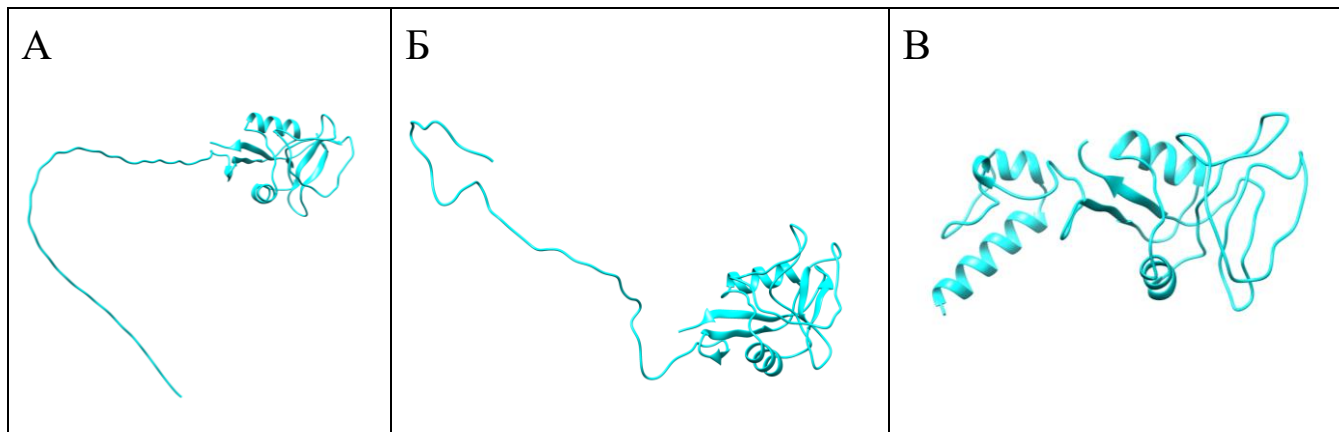
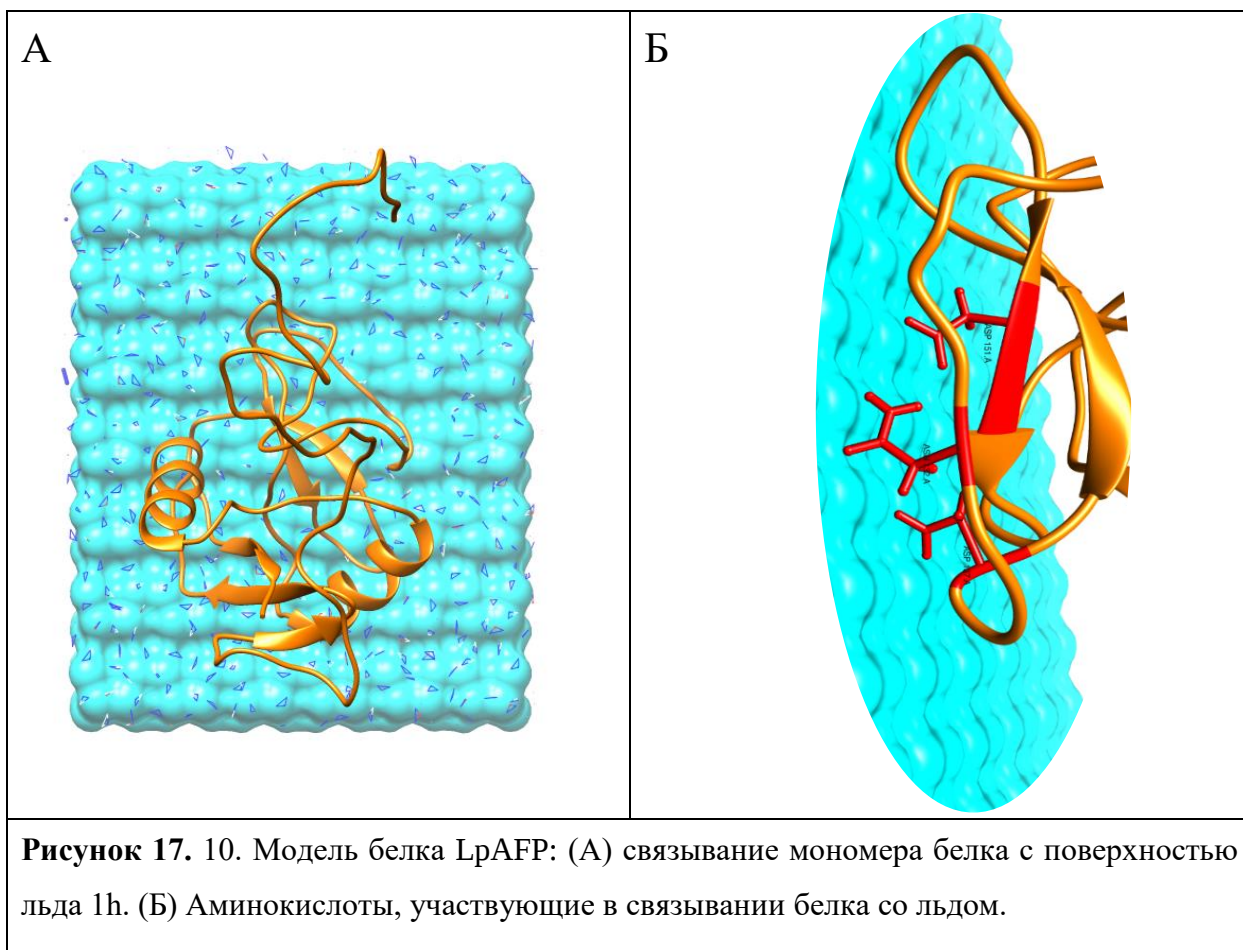


Рисунок 16. Модели мономеры белка LpAFP, полученные с помощью сервисов (А) AlphaFold3; (Б) SWISS-MODEL; (В) GalaxyWeb.

Модель, предсказанная с помощью веб-сервера AlphaFold3 (рисунок 16А), содержит в структуре две α -спирали, шесть β -листов и неструктурированный участок на N-конце; модель, полученная с использованием веб-сервера SWISS-MODEL (рисунок 16Б) – две α -спирали, пять β -листов и неструктурированный участок; и модель GalaxyWeb (рисунок 16В) представлена двумя α -спиралями в середине и на N-конце, а также двумя β -листами и неструктурированными участками. Модели, полученные разными веб-серверами, содержат две α -спирали, неструктурированные участки, что согласуется между собой, но отличаются количеством β -листов. Приведенные выше структуры использовались для моделирования молекулярной динамики, которая проводилась с использованием пакета программного обеспечения Amber22 с ускоренным кодом для GPU, в неявной модели растворителя и силовом поле ff19SB. Молекулярную динамику проводили при температуре 273 К в течение 100 нс. Все белки флуктуировали на протяжении всех 100 нс молекулярной динамики, но значение среднеквадратичного отклонения для данных структур находилось в области 2 Å на протяжении более 50 нс.

Последующее моделирование комплекса белок-лед проводилось с моделью белка, предложенной сервисом SWISS-MODEL, так как в этом случае после проведения молекулярной динамики сохраняются элементы вторичной структуры, а аминокислоты, участвующие в связи со льдом (Asp151, Asp152, Lys130, Asn132, Asp137) (рисунок 17), располагаются на открытой плоской поверхности, что согласуется с литературными данными [74]. Особенности взаимодействия белка LpAFP с поверхностью льда изучали с помощью программы GenIce2, в которой была получена структура 1h льда с использованием модели воды TIP4P-D. Данная модель водного окружения была выбрана, поскольку считается, что модели воды TIP4P и TIP5P показывают наиболее близкие к реальным температуры плавления. Изучаемая система содержит белок в явной модели растворителя (TIP4P-D) и лед (рисунок 17). Между белком и льдом есть расстояние в 10 Å, заполненное растворителем для имитации квазжидкости.



3.2.3. Масс-спектрометрия олигомерных форм IBP

3.2.3.1. Белок LS-12

В процессе анализа рекомбинантного гомогенного белка LS-12 методом MALDI-TOF масс-спектрометрии помимо массы, соответствующей массе белка были обнаружены массы более высокого порядка (рисунок 18). МС-спектры записывали, в режиме детектирования положительно ионов в диапазоне 10–75 кДа, с помощью программного обеспечения FlexControl (Bruker Daltonics) и анализировали в программах FlexAnalysis и Mmass. Были детектированы пики с массой (рисунок 18): 34840.6 кДа ($17.44 \cdot 2$) соответствующей димеру, 52223.1 кДа ($17.44 \cdot 3$) соответствующей тримеру. Таким образом впервые детектировано наличие и состав олигомерных форм белка LS-12. Согласно литературным данным, димерные формы белков-антифризов в два раза увеличивают антифризную активность по сравнению с мономерами [75]. Также сообщается, что рост антифризной активности возникает в большей степени благодаря увеличению площади поверхности, контактирующей со льдом [75]. Поэтому можно предположить, что увеличение порядка олигомерных форм приводит к росту площади взаимодействия со льдом и антифризной активности. Исходя из вышесказанного, определение олигомерного состава белка LS-12 в растворе является важным этапом исследования, необходимым для

понимания механизма действия белка в клетке организма. Так как в статьях не было упоминаний о том, что белок LS-12 склонен к самоассоциации, впоследствии были проведены исследования с целью подтвердить или опровергнуть наличие олигомерных форм у этого белка.

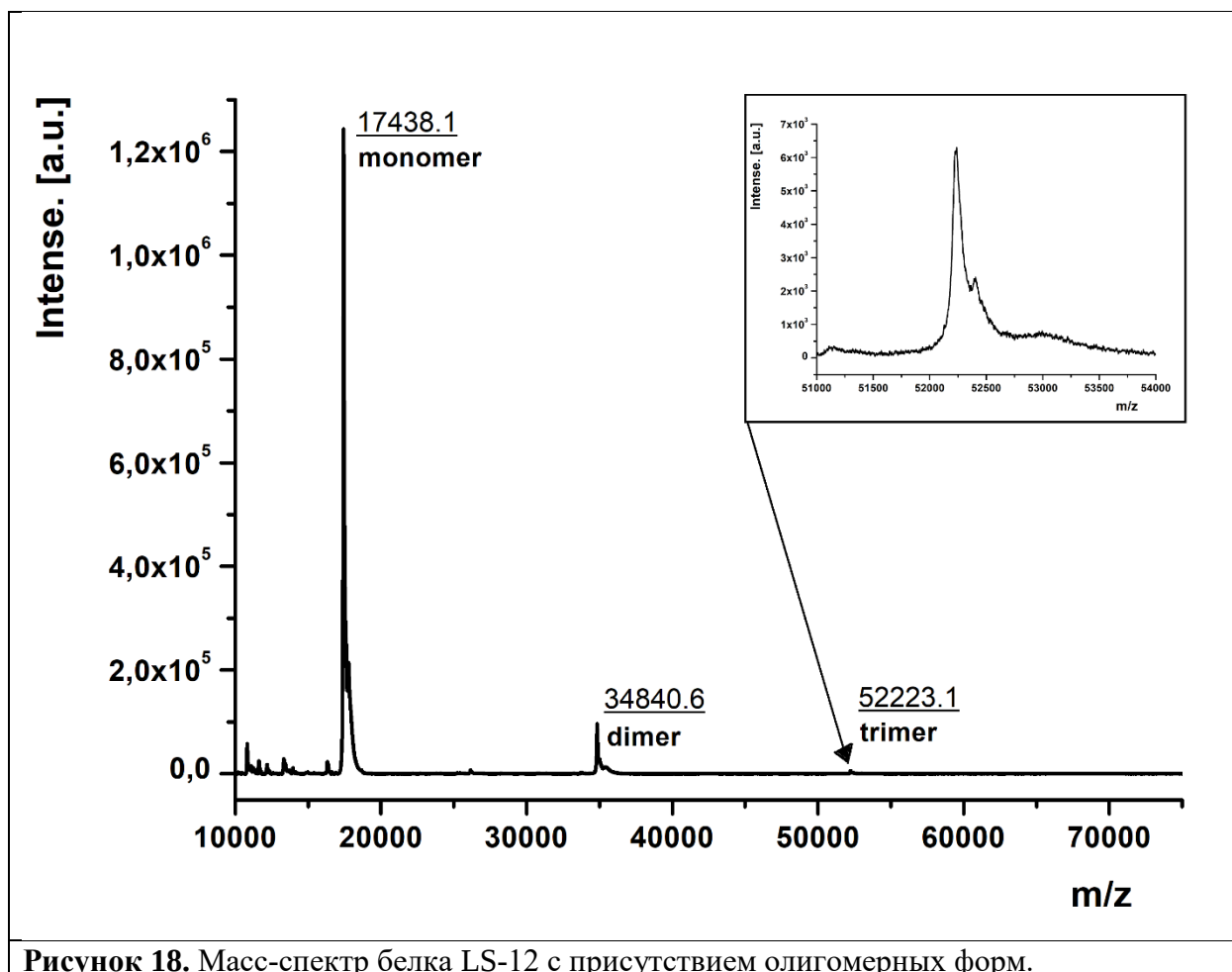
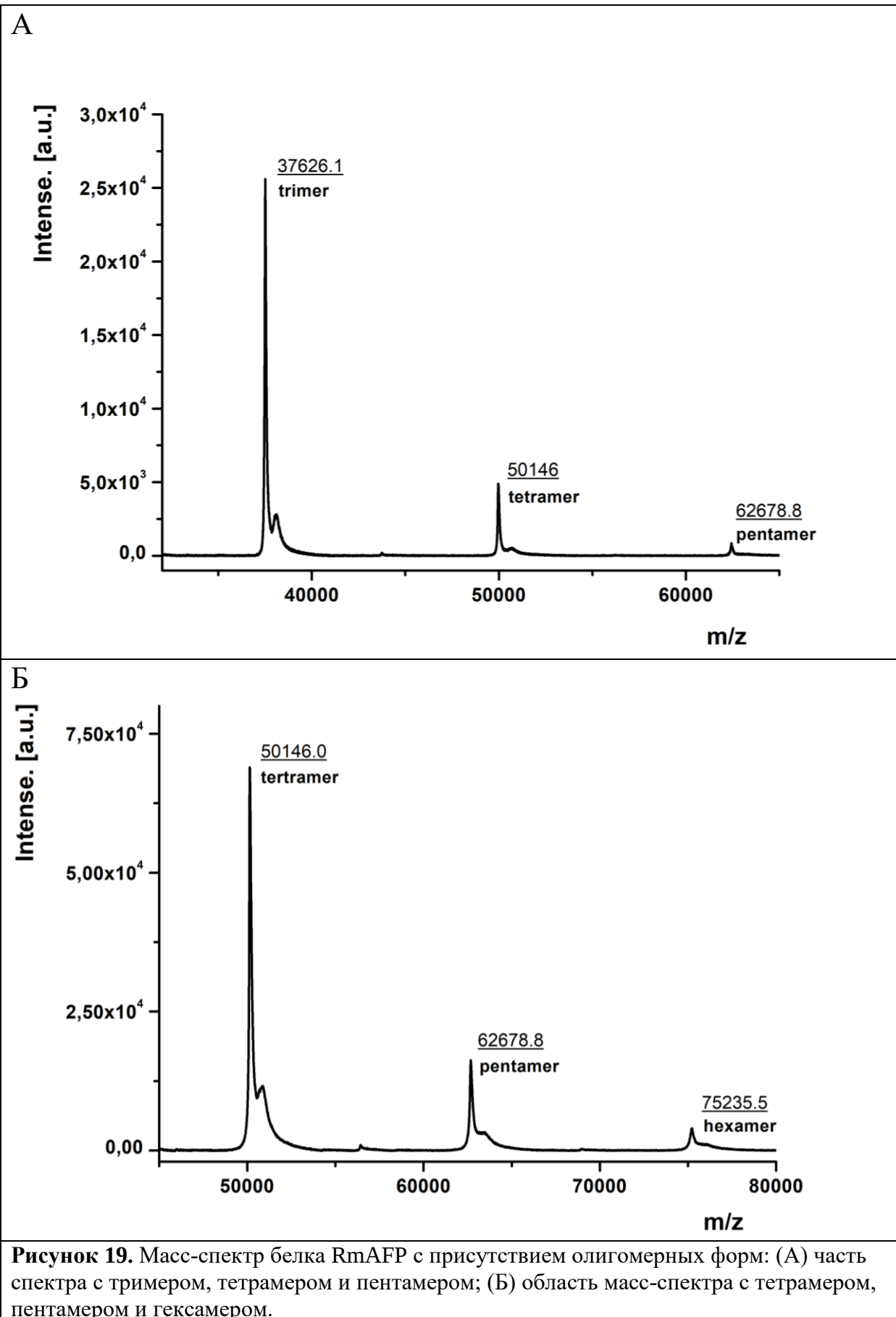


Рисунок 18. Масс-спектр белка LS-12 с присутствием олигомерных форм.

3.2.3.2. Белок RmAFP

Определение состава олигомерных форм белка RmAFP проводили с помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии. МС-спектры записывали, в режиме детектирования положительно ионов в диапазоне 25–80 кДа, с помощью программного обеспечения FlexControl (Bruker Daltonics) и анализировали в программах FlexAnalysis и Mmass. Были детектированы пики с массой (рисунок 19): 37626.1 кДа (12.55×3) – тример, 50146.0 кДа (12.55×4) – тетрамер, 62678.8 кДа (12.55×5) – пентамер и 75235.5 кДа (12.55×6) – гексамер. Таким образом впервые детектировано наличие и состав олигомерных форм белка RmAFP. Так как в литературе не было упоминаний о том, что белок RmAFP склонен к олигомеризации высокого порядка, впоследствии были проведены исследования с целью подтвердить или опровергнуть наличие олигомерных форм у этого белка.



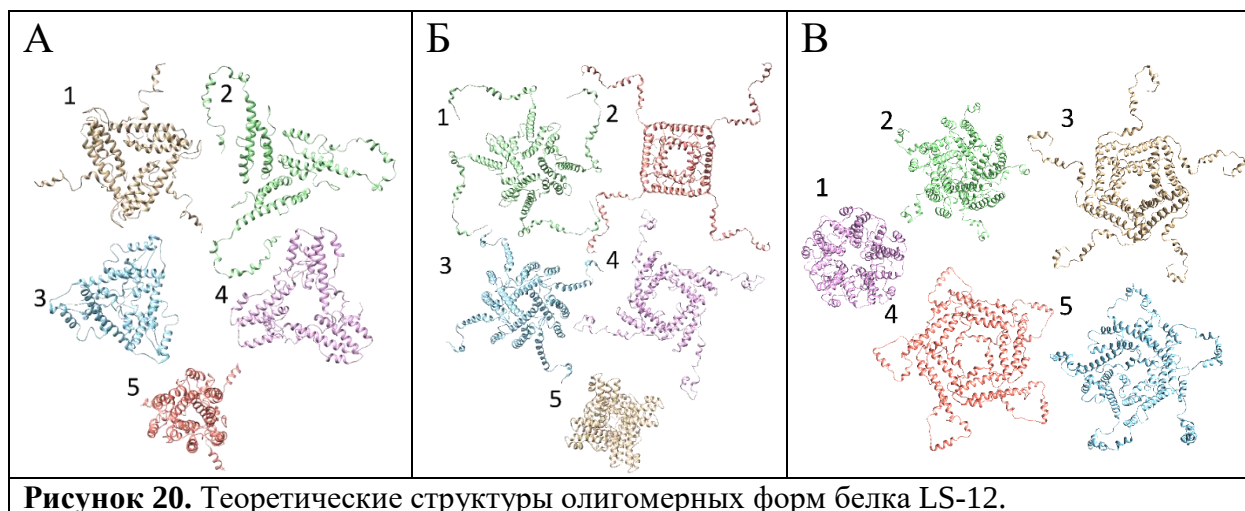
3.2.4. Молекулярное моделирование олигомерных форм белка

3.2.4.1. Белок LS-12

Методом масс-спектрометрии были обнаружены олигомерные формы белка LS-12 до третьего порядка, но есть предположение что они могут быть и более высокого порядка. Исходя из этих данных с помощью веб-сервера GalaxyWeb были получены варианты моделей для три-, тетра- и пентамеров белка LS-12 (рисунок 20).

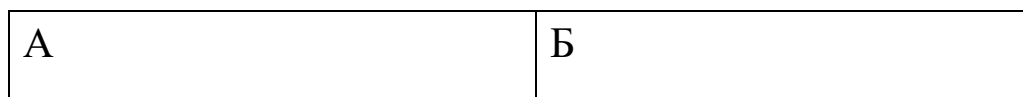
Выбор предполагаемых структур олигомерных форм белка LS-12 основывается на информации о его взаимодействии данного белка со льдом, исходя из его вторичной структуры. Белок LS-12 образует водородные связи с молекулами воды каждой из своих четырёх соседних молекул с помощью аминокислотных остатков Arg, Gln, Lys, Thr, Asp, Asp [76]. Также есть данные о том, что активность белков антифризов прямо пропорциональна площади сайта связывания льда [75].

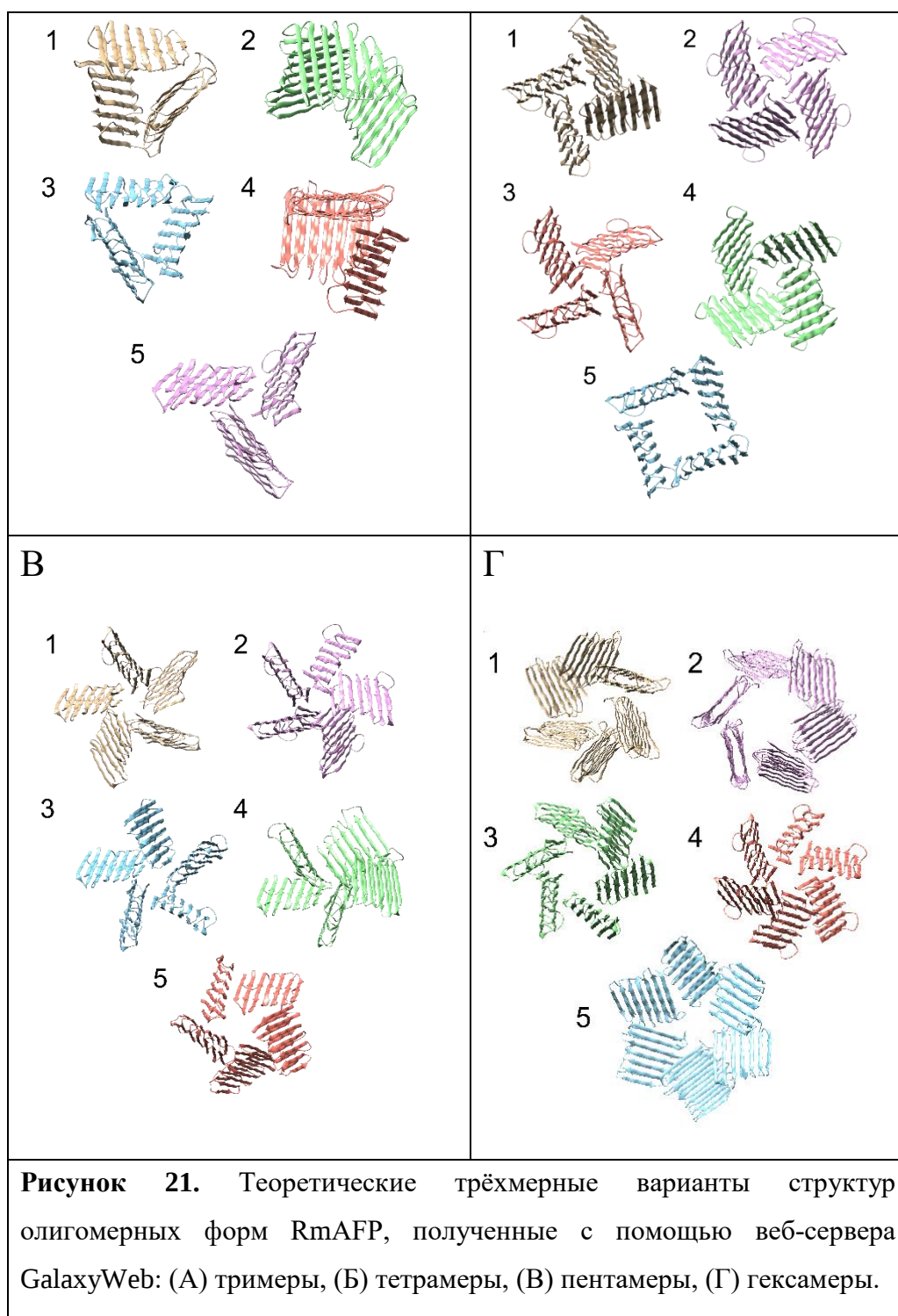
Анализ полученных трёхмерных структур, позволяет предположить, что наиболее вероятно в случае тримеров формируются модели 1 и 2 (рисунок 20А), для тетрамеров вероятнее образование моделей 2 и 4 (рисунок 20Б) и для пентамеров модели 3 и 4, представленные на рисунке 20В.



3.2.4.2. Белок RmAFP

Методом масс-спектрометрии были обнаружены олигомерные формы белка RmAFP до шестого порядка, однако этот метод имеет ограничения по обнаружению больших масс, поэтому можно предположить, что могут быть олигомерные формы и более высокого порядка. С помощью веб-сервера GalaxyWeb были получены варианты моделей для три-, тетра- и пента- и гексамеров белка RmAFP (рисунок 21).





Выбор тех или иных вариантов олигомерных форм белка RmAFP основывается на предположении о взаимодействии данного белка со льдом, исходя из его вторичной структуры. Данный белок так же, как и другой гиперактивный антифризный белок насекомых RiAFP имеет достаточно плоскую поверхность и содержит мотив Т-Х-Т (где Х это переменная аминокислота) [77], которые обращены друг к другу и образуют димерные формы. Мотив Т-Х-Т наблюдается и в других гиперактивных белках антифризах

насекомых [78, 79]. Он входит в гидрофобно-гидрофильный рисунок поверхности белка и водой формируется три независимых канала льда с участием гидроксильных групп [77]. Следовательно, это может быть характерной чертой димеризации гиперактивных антифризных белков насекомых.

Анализ полученных трёхмерных структур, позволяет предположить, что наиболее вероятно формируются тримеры, показанные на рисунке 21А (1 и 3); тетрамеры (рисунок 21Б) в виде структур 1 и 5; для пентамеров вероятнее всего модели 1 и 3 (рисунок 21В) и достаточно вероятно образование гексамеров в виде модели 5, представленной на рисунке 21Г. Эти структуры соответствуют ориентации треониновых мотивов и имеют наибольшую площадь контакта со льдом.

3.2.5. Малоугловое рентгеновское рассеяние

Белок LS-12

Параллельно с моделированием олигомерных форм белка LS-12 проводили анализ методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) для изучения размера, формы и структурных особенностей белка в растворе.

Профиль рассеяния $I(q)$ белка LS-12 (рисунок 22А) имеет перегиб при $q = 0,07$ и $0,12 \text{ \AA}^{-1}$, что свидетельствует об изменении кривизны интенсивности рассеяния в зависимости от вектора рассеяния (q). Это указывает на наличие структурной особенности в белке, которая может соответствовать изменению пространственного расположения доменов или субъединиц белка, или специфической структурной особенности. Например, если белок является димером, то такая точка перегиба может быть связана с расстоянием между двумя мономерами. Такое утверждение согласуется с описанными выше данными.

Функция $P(r)$ (рисунок 22Б) позволяет получить информацию о размере и форме частиц в растворе. Кривая имеет два пика: основной при $\sim 65 \text{ \AA}$ и неразрешенный при $10\text{--}15 \text{ \AA}$. Такие показатели — точка перегиба или пик в профиле $I(q)$ и вторичный пик в функции $P(r)$ на меньших расстояниях — возможны для многофазных систем (например, комплекс детергент–белок) или систем, визуализирующих длину корреляции между частями частиц [80]. Но исследуемый белок является водорастворимым и очищен без добавления детергентов, поэтому в качестве объяснения данных кривых предполагается только последний вариант.

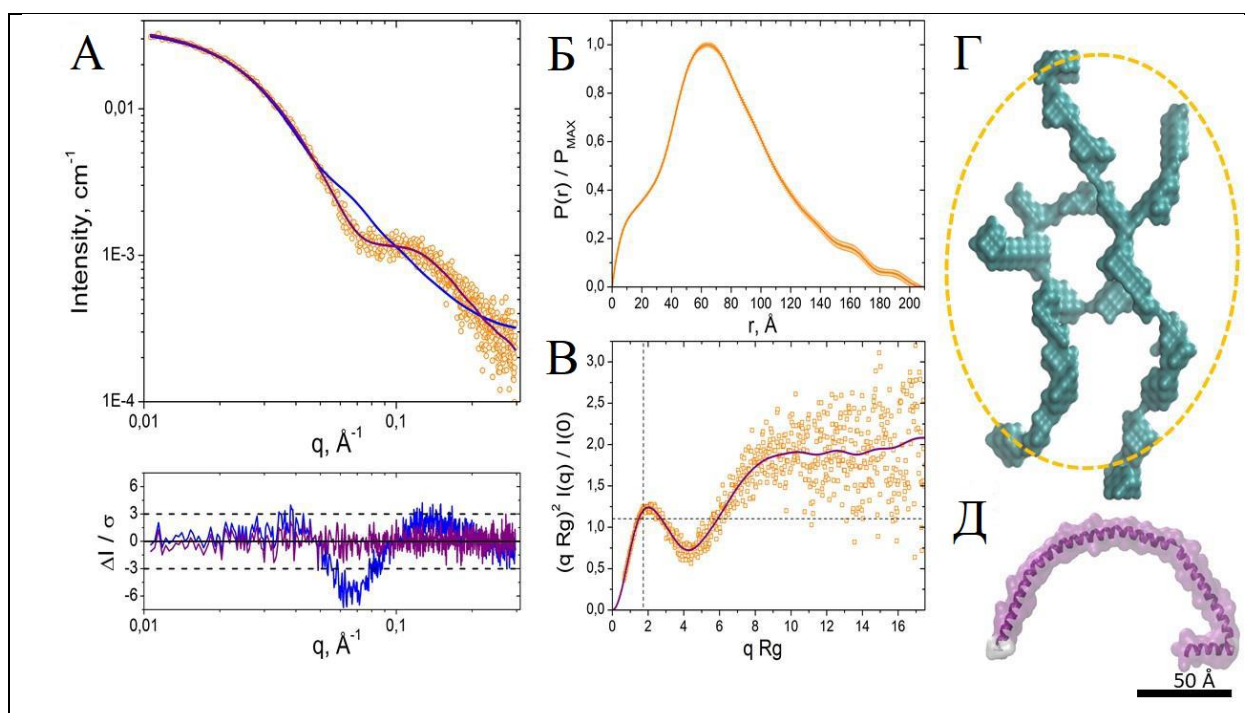
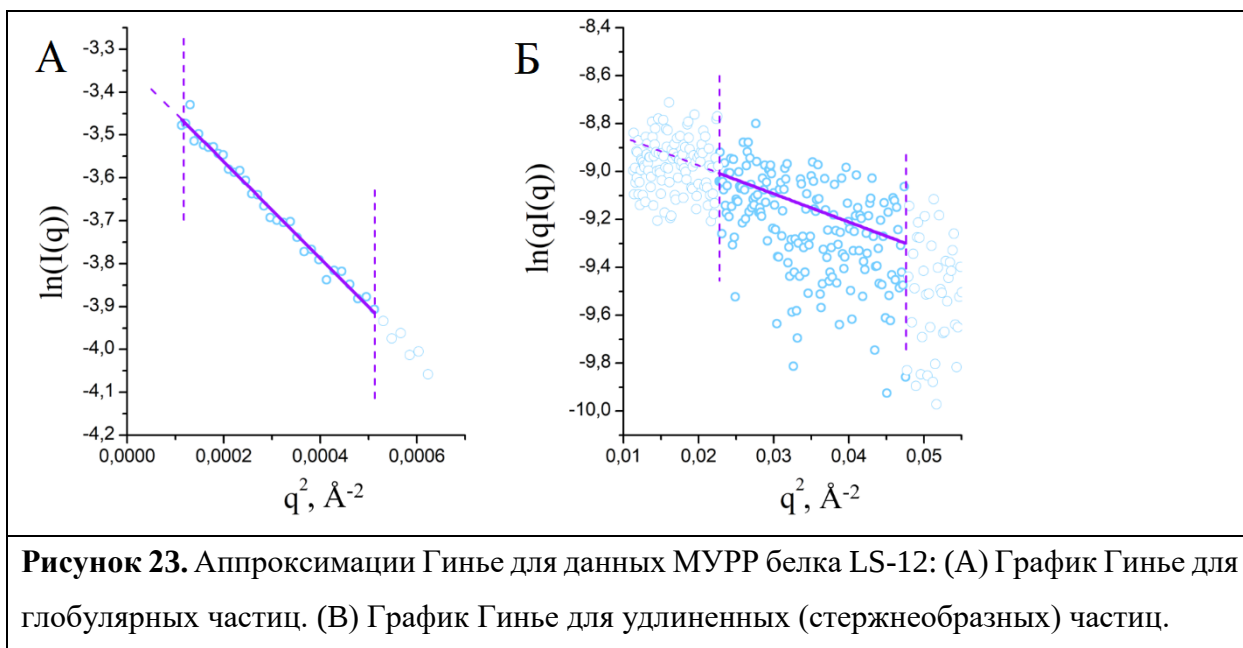


Рисунок 22. Графики и структуры белка LS-12 в растворе, полученные методом малоуглового рассеяния (МУРР): (А) Экспериментальный профиль $I(q)$ для LS-12 (оранжевые кружки). Кривая синего цвета соответствует экспериментальным данным, полученным с помощью модели эллиптического цилиндра в программе SasView. Кривая фиолетового цвета соответствует приближению DAMMIN. Снизу: нормализованный график остатков для эллиптического цилиндра и ab initio приближений DAMMIN (синий и фиолетовый цвет соответственно). (Б) Нормализованная функция распределения расстояний между парами $P(r)$. (В) Безразмерный график Кратки. Фиолетовая кривая соответствует регуляризованному $I(q)$ из приближения IFT. Пунктирные горизонтальная и вертикальная линии пересекаются в точке $(\sqrt{3}, 1.104)$. (Г) Ab initio структура DAMMIN; модель, полученная с помощью аппроксимации эллиптического цилиндра в программе SasView. (Д) Структура LS-12, предсказанная AlphaFold2, была получена из базы данных структур белков AlphaFold (AF-P80961-F1-v4, идентификатор UniProt: P80961). К панелям применена масштабная линейка 50 Å.

Радиус инерции R_g , полученный вычислением из приближения Гинье (рисунок 23) и непрямого преобразования Фурье (IFT), имеет значение близкое к 60 Å. Максимальный диаметр частицы $D_{\max}$, соответствующий фитированию IFT с помощью программы GNOM, определяется как 208 Å. Расчет $D_{\max}$ с помощью программы BIFT привел к такому же значению 204 Å. Исходя из представленных данных две самые удалённые точки в структуре белка LS-12, наблюдаемые с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния, находятся на расстоянии 208 Å друг от друга.

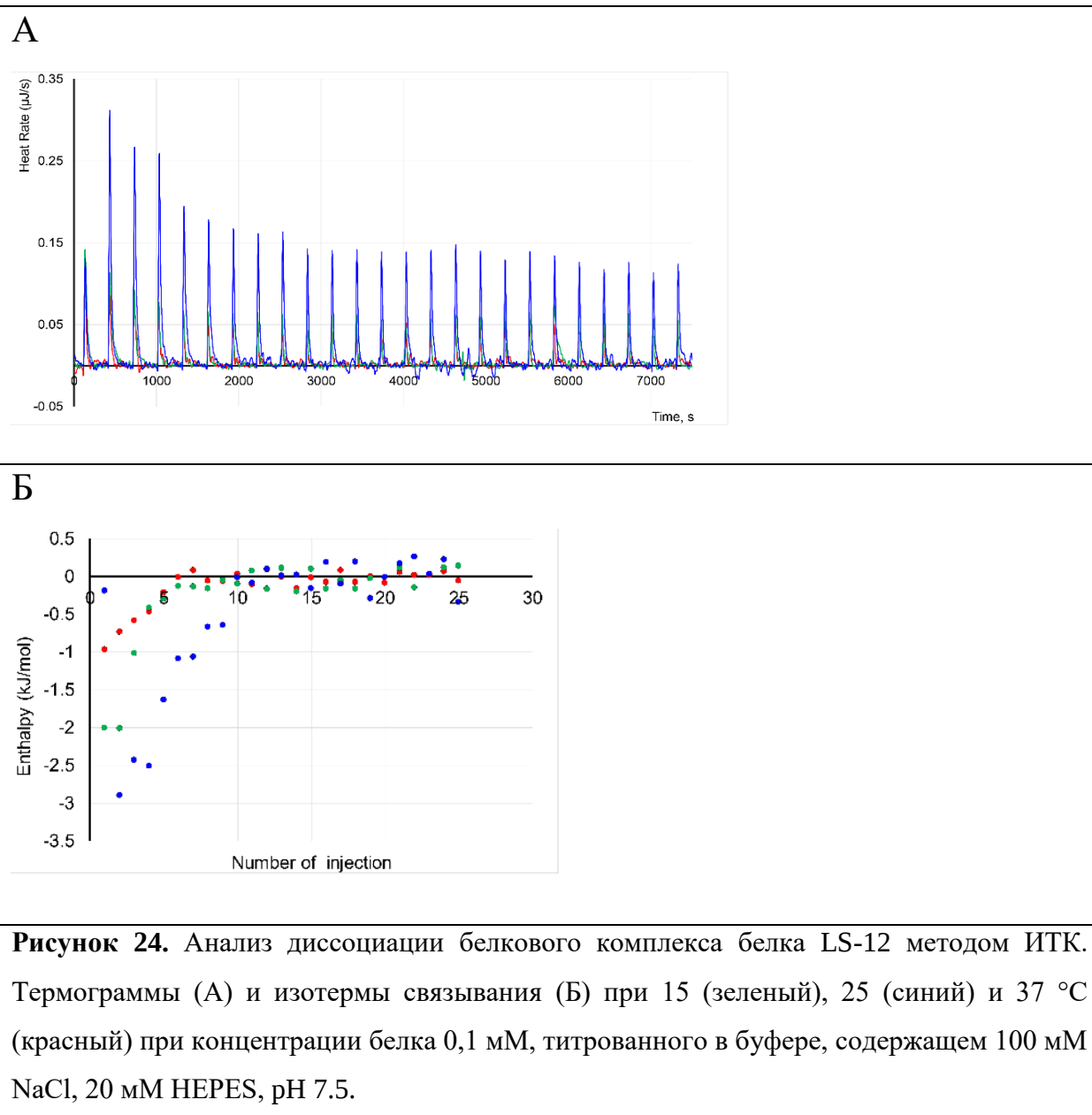


Дополнительные сведения о конформационном состоянии белка можно получить из безразмерного графика Кратки (рисунок 22В). На нем прослеживается пик в форме колокола с максимальным положением вблизи точки ($\sqrt{3}, 1.104$), который указывает на компактность структуры, и в то же время плато на высоких значениях qR_g , что соответствует гибким или неупорядоченным белкам [81]. Таким образом, в результате анализа с применением метода МУРР установлено наличие олигомерных форм (димеров, тримеров) белка LS-12 в растворе, что согласуется с данными, полученными с помощью метода масс-спектрометрии.

3.2.6. Изотермическая титрационная калориметрия

Белок LS-12

Способность к самоассоциации белка LS-12 и его стабильность в растворе изучали методом изотермической титрационной калориметрии (ИТК) при различных температурах (15°C, 25°C и 37°C). Профили титрования, полученные при указанных температурах, не имеют особых различий (рисунок 24А). Пики на термограммах положительные (экзотермические) при температурах 15°C, 25°C и 37°C, что свидетельствует о выделении тепла при взаимодействии связывающихся молекул. Изотермы связывания, выведенные из термограмм путем интегрирования тепловых сигналов от каждой инъекции с последующим построением графика зависимости общего изменения тепла (изменения энтальпии) от концентрации связывающихся молекул, представлены на рисунке 24Б. По характеру данных изотерм можно предположить слабое связывание молекул с последующим насыщением при увеличении числа инъекций.



В результате анализа белка LS-12 методом ИТК определено увеличение теплоты диссоциации белкового комплекса при понижении температуры. Такой эффект может свидетельствовать об уменьшении количества белка, участвующего в процессе образования олигомерных форм или о высоких значениях энтальпии образования олигомеров. Также впервые установлено, что в растворе лед-связывающего белка происходит динамический процесс олигомеризации.

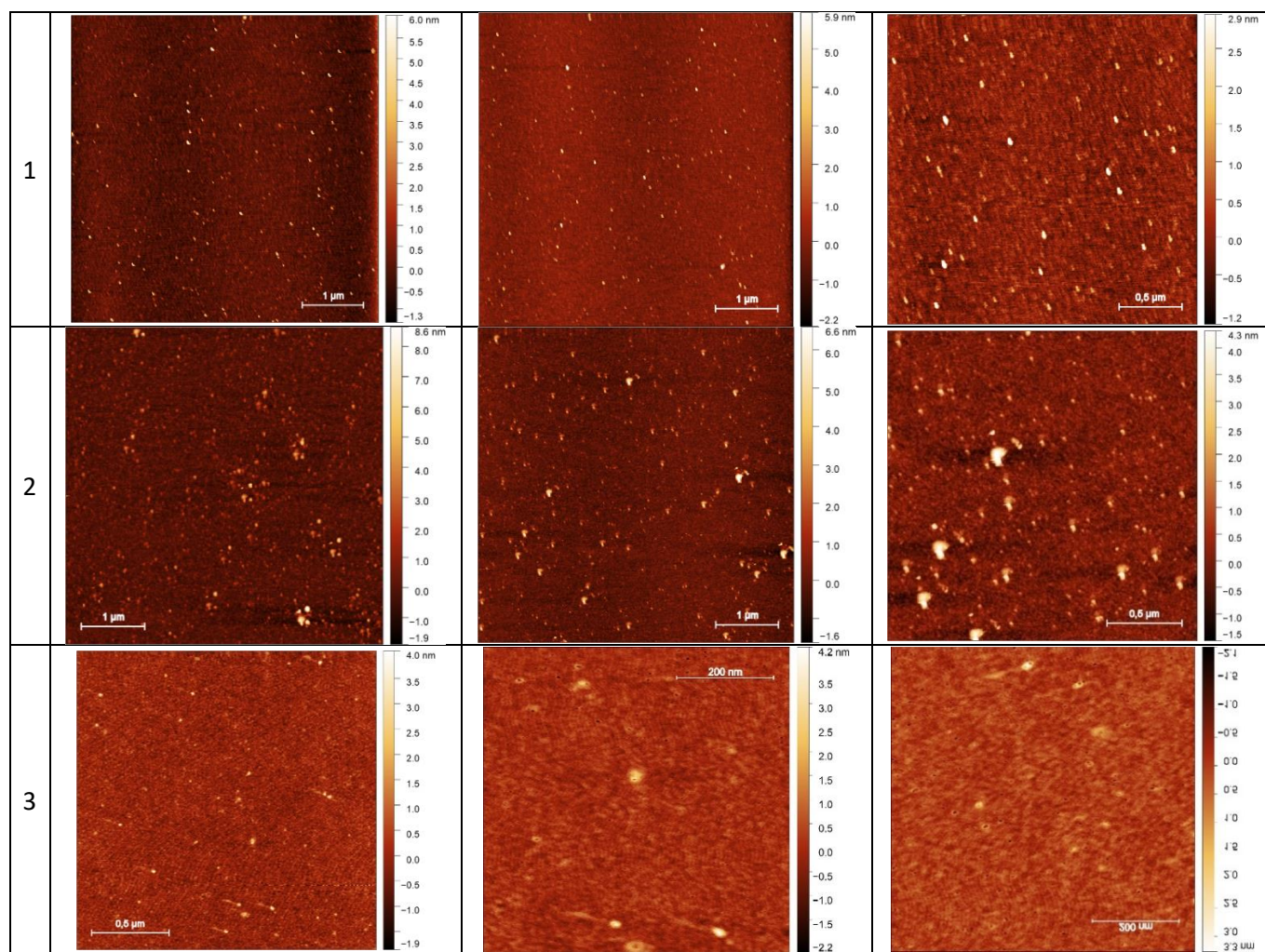
Данные о стабилизации комплекса при более низких температурах позволяют предположить потребность в большей площади поверхности для более эффективного связывания белка антифриза с кристаллами льда. Можно допустить, что белок существует в растворе в различных олигомерных формах, в том числе высокого порядка. Поскольку

олигомеры высокого порядка образуются либо за счет объединения мономерных звеньев, либо объединением различных олигомерных форм. Это было препятствием в процессе количественного анализа полученных методом ИТК данных. Для установления порядка и размера олигомерных форм, присутствующих в растворе белка было решено использовать метод атомно-силовой микроскопии (АСМ).

3.2.7. Атомно-силовая микроскопия

Белок LS-12

Размер LS-12 был исследован методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Этот метод позволяет оценивать динамику на молекулярном уровне. На рисунке 25 показаны полученные изображения после осаждения раствора белка LS-12 с концентрацией 4, 2 и 1 мкМ.



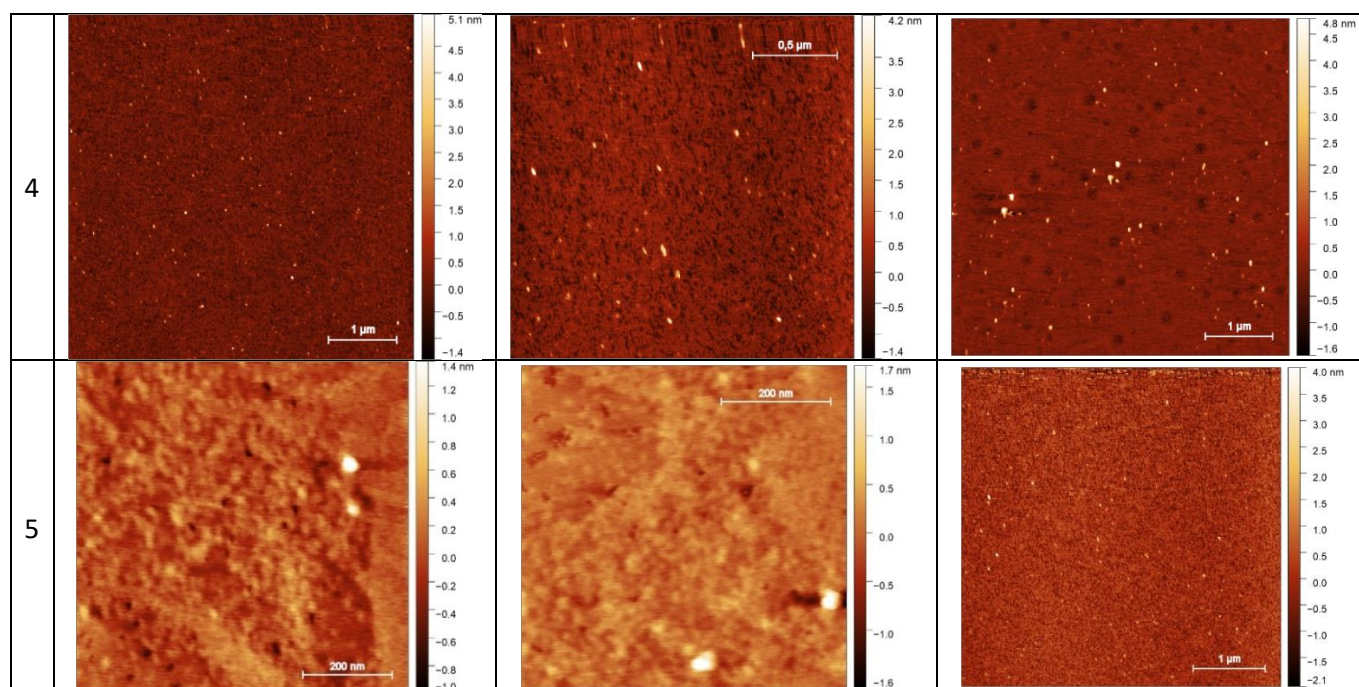


Рисунок 25. АСМ-изображения белка LS-12 нанесенного на слюду. Ряды 1–2 соответствуют концентрации образца 4 мкМ, линии 3 – 2 мкМ, линии 4–5 – 1 мкМ.

В качестве дополнительного контроля проводили сканирование слюды с буфером без белка на поверхности по тому же протоколу, что и при исследовании белка. В результате сканирования поверхности были обнаружены объектов высотой не более 0,5 нм. При изучении белка LS-12 наблюдалось снижение количества объектов на сканированных изображениях по мере уменьшения концентрации белка. Данный результат в целом подтверждает, что пики на изображениях принадлежат белку.

На репрезентативных АСМ-изображениях наблюдаются вытянутые пятна разных размеров. Поэтому для количественной обработки изображений, были использованы данные, полученные на основе эллиптической геометрии. В процессе изучения изображений выявили распределение частиц по размерам, включающее несколько явных и менее заметных пиков. Выделили четыре диапазона размеров частиц: I (5–20 нм), II (17–27 нм), III (28–44 нм) и IV (44–60 нм) на графике распределения по размерам большой полуоси (рисунок 26). Затем частицы распределили по диапазонам и полученные числа частиц по величине каждого параметра (размеры большой и малой полуосей, их соотношение, площадь поверхности и высота) аппроксимировали функцией Гаусса. Усредненные значения и стандартное отклонение изучаемых параметров содержится в таблице 5.

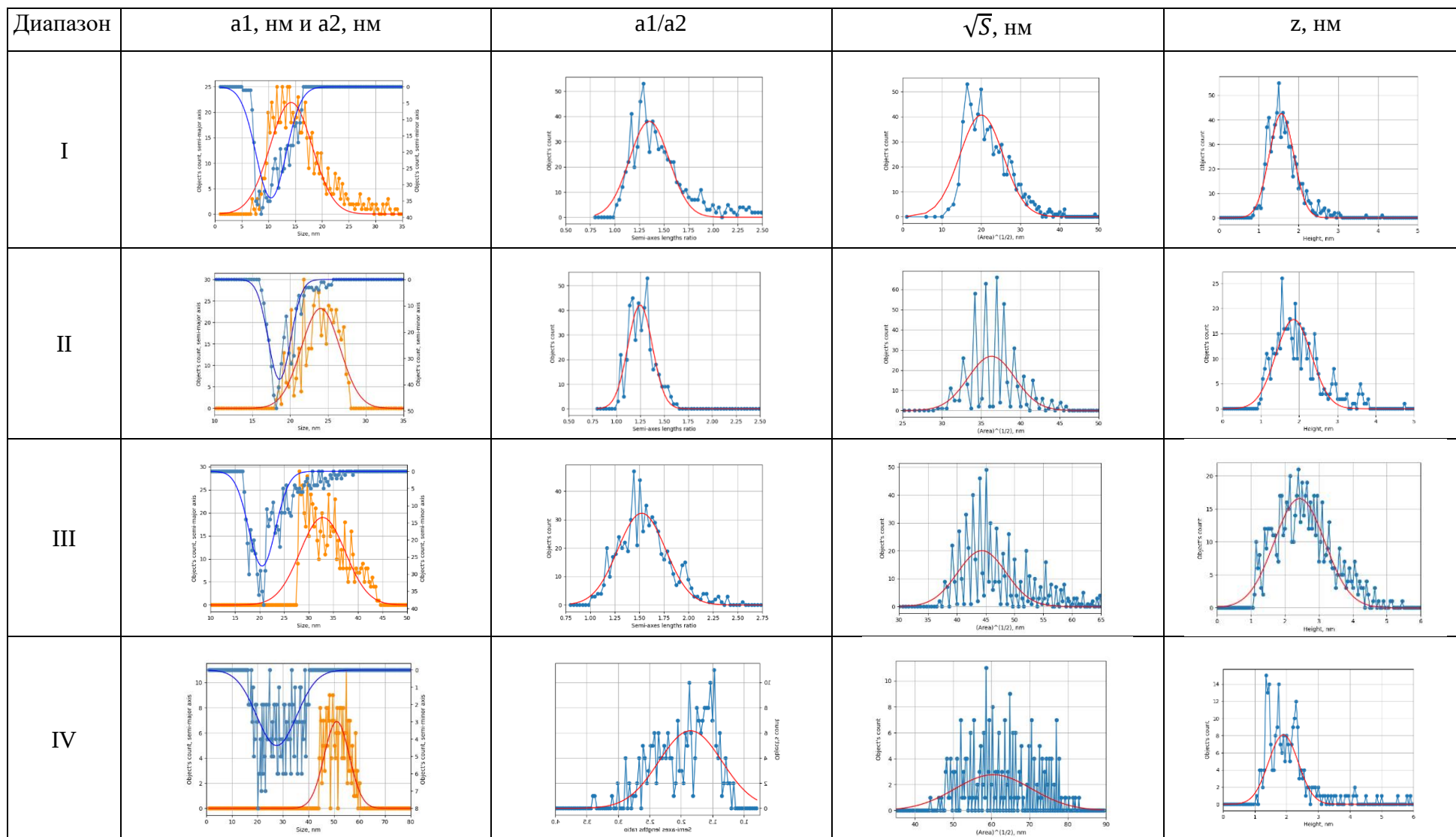


Рисунок 26. АСМ изображения, полученных экспериментально (точки) и рассчитанных методом аппроксимации Гауссова распределения параметров: a_1 — длина большой полуоси (оранжевая левая ось), a_2 — длина малой полуоси (синяя правая ось), a_1/a_2 — отношение полуосей, $\sqrt{S}$ — квадратный корень из площади, z — высота.

Таблица 5. Значения параметров комплексов белка LS-12					
Диапазон размера частиц	a1, нм	a2, нм	a1/a2	$\sqrt{S}$, нм	z, нм
I	14.2 ± 3.9	10.5 ± 2.8	1.4 ± 0.2	20.1 ± 5.5	1.57 ± 0.31
II	24.0 ± 2.5	18.6 ± 1.5	1.3 ± 0.1	36.3 ± 3.0	1.86 ± 0.46
III	32.8 ± 4.6	20.5 ± 2.7	1.5 ± 0.2	44.3 ± 4.2	2.43 ± 0.74
IV	51.1 ± 4.9	27.5 ± 7.8	1.86 ± 0.5	60.5 ± 10.1	1.90 ± 0.47

Исходя из представленных в таблице 5 данных средняя длина большой полуоси находится в диапазоне 14,2 – 51,1 нм, длина малой полуоси для каждого диапазона размеров частиц небольшая, поэтому отношение полуосей варьировалось в пределах от 1,3 до 1,86. Средняя высота объекта исследования слабо зависела от других параметров и входила в диапазон от 1,57 нм до 2,43 нм. Частицы меньшего размера (диапазоны I и II) менее вытянутые, по сравнению с частицами большего размера (диапазоны III и IV). Низкая высота частиц (1,57–2,43 нм) может быть обусловлена различными факторами, например, более плоской структурой белка, также это может указывать на мягкость диспергированных на поверхности белковых частиц или на образование планарных комплексов.

Уменьшение концентрации образца особо не приводило к изменениям морфологии, в отличие от антифризного гликопротеина AFGP 8, который описан в статье Younes-Metzler O. et al. [82]. Поверхность этого гликопротеина при самой низкой изучаемой концентрации 1.0×10^{-10} г/мл покрыта белковыми агрегатами высотой $\sim 8,1 \pm 2,5 \text{ \AA}$ и крупными частицами высотой до 5 нм в небольшом количестве с широким разделением (рисунок 27a и b). Увеличение концентрации образца гликопротеина на порядок (рисунок 27c и d) приводит к резким изменениям морфологии. После осаждения AFGP 8 осаждалась пленка со средней высотой около 14 Å, которую измеряли с использованием анализа поперечного сечения в разных местах образца. Исследователи установили, что при этой концентрации поверхность покрыта пленкой не сплошным слоем, а с образованием фрактального двумерного узора. Дальнейшее увеличение концентрации до 1×10^{-8} г/мл приводит к формированию поверхности со смешанной морфологией. Эти изображения, полученные при высокой концентрации, демонстрируют объединение молекул в более крупные агрегаты высотой до 10 нм и диаметром более 100 нм. (рисунок 27e и f). Авторы заключают

что формирование монослоя белков на поверхности слюды свидетельствует о сильном сродстве AFGP 8 к гидрофильной поверхности слюды. При сравнении результатов этой статьи с данными, представленными в текущей работе, можно предположить разнообразие форм образуемых агрегатов и способов взаимодействия антифризных белков и гликопротеинов в различных средах.

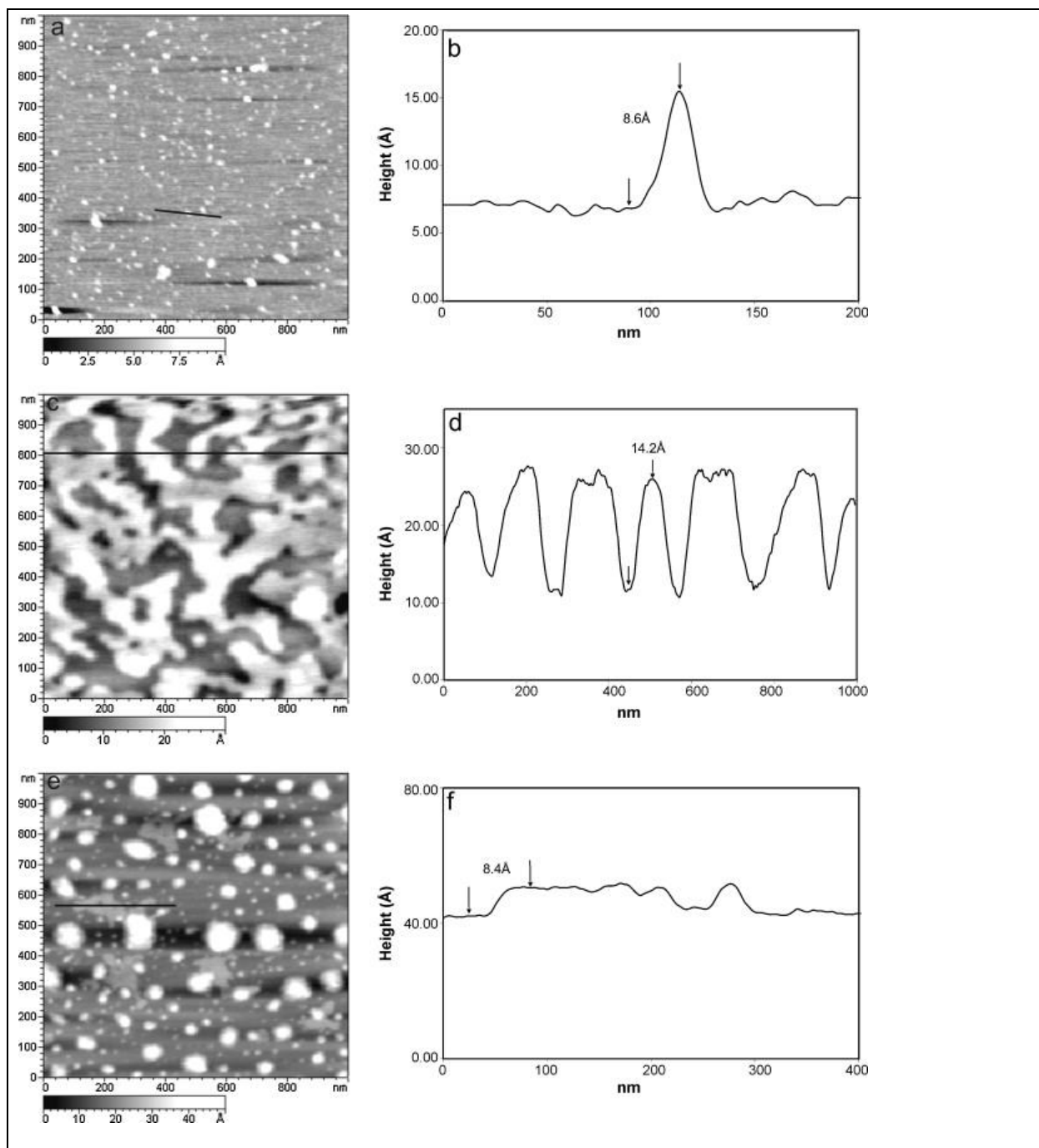


Рисунок 27. АСМ-изображения AFGP 8, нанесенного на слюду путем испарения растворителя. (а) 25 мкл раствора AFGP 8 с концентрацией $1,0 \times 10^{-10}$ г/мл, скорость сканирования 1 линия/с. (б) Профиль поперечного сечения (а). (с) 25 мкл раствора AFGP 8 с концентрацией $1,0 \times 10^{-9}$ г/мл, скорость сканирования 1 линия/с. (д) Профиль

поперечного сечения (с). (е) 25 мкл раствора AFGP 8 с концентрацией $1,0 \times 10^{-8}$ г/мл, скорость сканирования 1 линия/с. (f) Профиль поперечного сечения (е)[82].

Таким образом, анализ размера и морфологии белка LS-12 методом атомно-силовой микроскопии, свидетельствует о наличии нескольких частиц разного размера, соответствующим димеру и тримеру, что согласуется с ранее полученными данными с помощью метода МУРР.

4. Заключение

Антифризный белок LS-12 был проанализирован методом кругового дихроизма, в результате чего было установлено, что белок имеет в основном α -спиральную структуру (до 82%) и до 25% неструктурированных элементов, что согласуется с результатами, полученными с помощью онлайн-сервисов PSIPRED 4.0 и RaptorX-Property. Методом молекулярного моделирования полноразмерного белка LS-12 со льдом было показано, что комплекс белка со льдом стабилен и образовывались водородные связи с поверхностью льда остатками Thr, Asn, Asp, Gln и Glu. Методом масс-спектрометрии впервые обнаружено наличие и состав олигомерных форм белка LS-12: димер – 34840.6 кДа ($17.44 \text{ кДа} \times 2$) и тример – 52223.1 кДа ($17.44 \text{ кДа} \times 3$). С помощью метода МУРР также подтверждено наличие олигомерных форм белка в растворе. Судя по общим размерам и конфигурации модели белка LS-12, данная модель образована несколькими мономерами белка, которые представлены структурами α -спиралей (рисунок 4Д). Дальнейшее подтверждение значимости α -спиральных участков было получено при анализе графика Гинье $\ln(qI(q))$ против q^2 для вытянутых частиц, где радиус вращения R_c составил $4,86 \pm 0,35 \text{ \AA}$. Полученное значение диаметра $2 R_c \sqrt{2} = 13,7 \pm 1,0 \text{ \AA}$ хорошо согласуется с диаметром α -спирали ($\sim 12 \text{ \AA}$). Помимо этого, методом МУРР установлена способность белка LS-12 к образованию структур вытянутой формы с ограниченными межмономерными взаимодействиями. По результатам, полученных методом АСМ установлено наличие нескольких частиц разного размера (олигомерных формах) белка в растворе, что согласуется с данными полученными методом МУРР. С использованием веб-сервера GalaxyWeb получены модели три-, тетра- и пентамеров белка LS-12, что согласуется с экспериментальными данными. Исходя из полученных моделей олигомерных форм белка LS-12, а также известных данных об образовании димерных форм с помощью обращенных друг к другу мотивов T-X-T белка RmAFP можно предположить, что комплексы

представленных лед-связывающих белков образованы одинаковыми субъединицами. Эти субъединицы в свою очередь организованы изологично и это значит, что они должны олигомеризоваться с использованием другого интерфейса (например, образование димерной формы димеров с тремя осями C_2 симметрии) [83]. Кроме того, методом ИТК было определено увеличение теплоты диссоциации белкового комплекса LS-12 при снижении температуры, что может свидетельствовать о динамическом процессе олигомеризации данного лед-связывающего белка в растворе. Сведения об олигомерных формах белка LS-12, полученные с помощью этих методов подчёркивают важность разностороннего анализа для подтверждения исследуемых свойств объекта.

Лед-связывающий белок RmAFP был проанализирован методом кругового дихроизма, в результате чего было установлено, что белок, в основном представлен β -листами (до $\approx 85\%$) и это расходится с данными, полученными с помощью онлайн-сервисов PSIPRED 4.0 и RaptorX-Property – β -листы (56%), неструктурированные участки (43%). Методом масс-спектрометрии впервые обнаружено наличие и состав олигомерных форм белка RmAFP: тример – 37626.1 кДа ($12.55 \text{ кДа} \times 3$), тетрамер – 50146.0 кДа ($12.55 \text{ кДа} \times 4$), пентамер – 62678.8 кДа ($12.55 \text{ кДа} \times 5$) и гексамер – 75235.5 кДа ($12.55 \text{ кДа} \times 6$). Получены модели олигомеров белка RmAFP с использованием веб-сервера GalaxyWeb. Предполагается, что белок образует димерные формы при взаимодействии мотивов T-X-T (где X это переменная аминокислота).

Белок LpAFP был проанализирован методом кругового дихроизма, в результате чего было установлено, что белок, в основном представлен β -листами (до 43%) и неструктурированными элементами (до 48%) в отличие от спрогнозированных с помощью онлайн-сервисов PSIPRED 4.0 и RaptorX-Property, где преобладают неструктурированные участки (57%) и присутствуют β -листы (24%). Моделирование комплекса белок-лед в случае LpAFP проводилось с моделью белка, предложенной сервисом SWISS-MODEL, которая была стабильна в течение анализа и аминокислоты, участвующие в связи со льдом (Asp151, Asp152, Lys130, Asn132, Asp137), располагались на плоской поверхности. Методом АСМ было установлено наличие олигомерных форм белка LpAFP разных размеров.

5. Выводы

1. Оптимизированы методы выделения и очистки рекомбинантных белков LS-12, RmAFP и LpAFP;

2. Установлена или подтверждена вторичная структура лед-связывающих белков LS-12, RmAFP и LpAFP. Структура белка LS-12 представлена в основном α -спиральными структурами (до 82%), вторичная структура белка RmAFP преимущественно состоит из β -листов (до $\approx 85\%$), и структура белка LpAFP почти равнозначно состоит из β -листов (до 43%) и неструктурированных элементов (до 48%);
3. Обнаружена и подтверждена олигомеризация лед-связывающих белков LS-12, RmAFP и LpAFP. В случае белка LS-12 масс-спектрометрическим методом детектированы олигомерные формы: димер и тример, в процессе анализа методом МУРР получена *ab initio* модель, которая соответствует пентамеру. Наличие и состав олигомеров белка RmAFP, которые получены методом МС: тример, тетрамер, пентамер и гексамер. Наличие олигомерных форм белка LpAFP было получено методом АСМ.
4. Методом молекулярного моделирования с помощью веб-сервера GalaxyWeb получены модели олигомерных форм белков LS-12 и RmAFP. Предполагается, что комплекс белок-лед в случае белка LS-12 образует водородные связи с поверхностью льда остатками Thr, Asn, Asp, Gln и Glu. Белок RmAFP образует димерные формы при взаимодействии мотивов T-X-T (где X это переменная аминокислота). Выдвинута гипотеза о том, что олигомеры высокого порядка более выгодны для взаимодействия белка со льдом, т.к. увеличивается площадь поверхности соприкосновения.

Список литературы

1. Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies / A. Casanueva, M. Tuffin, C. Cary, D.A. Cowan // Trends in microbiology. – 2010. – Vol. 18, №8. – P.374–381.
2. Rodrigues, D.F. Coping with our cold planet / D.F. Rodrigues, J.M. Tiedje // Applied and environmental microbiology. – 2008. – Vol. 74, №6. – P.1677–1686.
3. Gualerzi, C.O. Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes / C.O. Gualerzi, A.M. Giuliadori, C.L. Pon // Journal of molecular biology. – 2003. – Vol. 331, №3. – P.527–539.
4. Davies, P.L. Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth / P.L. Davies // Trends in biochemical sciences. – 2014. – Vol. 39, №11. – P.548–555.
5. Antifreeze Proteins: A Tale of Evolution From Origin to Energy Applications / G. Gharib, S. Saeidiharzand, A.K. Sadaghiani, A. Koşar // Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2021. – Vol. 9. – P.770588.
6. Effect of antifreeze protein supplementation in vitrification medium on mouse oocyte developmental competence / J.W. Jo, B.C. Jee, J.R. Lee, C.S. Suh // Fertility and sterility. – 2011. – Vol. 96, №5. – P.1239–1245.

7. Effect of antifreeze glycoprotein 8 supplementation during vitrification on the developmental competence of bovine oocytes / S. Liang, B. Yuan, J.-W. Kwon [et al.] // *Theriogenology*. – 2016. – Vol. 86, №2. – 485-494.e1.
8. Antifreeze protein from Anatolia polita (ApAFP914) improved outcome of vitrified in vitro sheep embryos / X. Li, L. Wang, C. Yin [et al.] // *Cryobiology*. – 2020. – Vol. 93. – P.109–114.
9. Microbial Diversity of Psychrotolerant Bacteria Isolated from Wild Flora of Andes Mountains and Patagonia of Chile towards the Selection of Plant Growth-Promoting Bacterial Consortia to Alleviate Cold Stress in Plants / P. Vega-Celedón, G. Bravo, A. Velásquez [et al.] // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9, №3.
10. Electrostatics Trigger Interfacial Self-Assembly of Bacterial Ice Nucleators / F. Madzharova, M. Bregnhøj, A.S. Chatterley [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2022. – Vol. 23, №2. – P.505–512.
11. Creating Anti-icing Surfaces via the Direct Immobilization of Antifreeze Proteins on Aluminum / Y. Gwak, J.-I. Park, M. Kim [et al.] // *Scientific reports*. – 2015. – Vol. 5. – P.12019.
12. Inhibition of Defect-Induced Ice Nucleation, Propagation, and Adhesion by Bioinspired Self-Healing Anti-Icing Coatings / S. Tian, R. Li, X. Liu [et al.] // *Research (Washington, D.C.)*. – 2023. – Vol. 6. – P.140.
13. Purification and Identification of Antifreeze Protein From Cold-Acclimated Oat (*Avena sativa* L.) and the Cryoprotective Activities in Ice Cream / Y. Zhang, H. Zhang, X. Ding [и др.] // *Food and Bioprocess Technology*. – 2016. – Т.9, №10. – С.1746–1755.
14. Effect of antifreeze protein on the quality and microstructure of frozen chicken breasts / J. Chen, Y. Fan, X. Zhang [et al.] // *Food chemistry*. – 2023. – Vol. 404, №Pt A. – P.134555.
15. Evaluation of corn steep liquor as fermentation media for recombinant *Lactococcus lactis* producing antifreeze proteins / B. Byanju, S. Sen, T. Mansell, B.P. Lamsal // *Journal of the science of food and agriculture*. – 2023. – Vol. 103, №5. – P.2512–2521.
16. DeVries, A.L. Freezing resistance in some Antarctic fishes / A.L. DeVries, D.E. Wohlschlag // *Science (New York, N.Y.)*. – 1969. – Vol. 163, №3871. – P.1073–1075.
17. Raymond, J.A. An ice-binding protein from an Antarctic sea ice bacterium / J.A. Raymond, C. Fritsen, K. Shen // *FEMS microbiology ecology*. – 2007. – Vol. 61, №2. – P.214–221.
18. Kondo, H. Multiple binding modes of a moderate ice-binding protein from a polar microalga / H. Kondo, K. Mochizuki, M. Bayer-Giraldi // *Physical chemistry chemical physics : PCCP*. – 2018. – Vol. 20, №39. – P.25295–25303.
19. Evaluation of water holding capacity and breadmaking properties for frozen dough containing ice structuring proteins from winter wheat / H.-N. Xu, W. Huang, C. Jia [и др.] // *Journal of Cereal Science*. – 2009. – Т.49, №2. – С.250–253.
20. Structures of shorthorn sculpin antifreeze polypeptides / C.L. Hew, S. Joshi, N.C. Wang [et al.] // *European journal of biochemistry*. – 1985. – Vol. 151, №1. – P.167–172.
21. Molecular characterization and sequencing of antifreeze proteins from larvae of the beetle *Dendroides canadensis* / J.G. Duman, N. Li, D. Verleye [et al.] // *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*. – 1998. – Vol. 168, №3. – P.225–232.
22. Bar Dolev, M. Ice-Binding Proteins and Their Function / M. Bar Dolev, I. Braslavsky, P.L. Davies // *Annual review of biochemistry*. – 2016. – Vol. 85. – P.515–542.
23. Antifreeze Proteins and Their Practical Utilization in Industry, Medicine, and Agriculture / A. Eskandari, T.C. Leow, M.B.A. Rahman, S.N. Oslan // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10, №12.
24. Voets, I.K. From ice-binding proteins to bio-inspired antifreeze materials / I.K. Voets // *Soft matter*. – 2017. – Vol. 13, №28. – P.4808–4823.
25. Delesky, E.A. Ice-binding proteins and bioinspired synthetic mimics in non-physiological environments / E.A. Delesky, W.V. Srubar // *iScience*. – 2022. – Vol. 25, №5. – P.104286.
26. Surís-Valls, R. Peptidic Antifreeze Materials: Prospects and Challenges / R. Surís-Valls, I.K. Voets // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Vol. 20, №20.

27. Synthetic Antifreeze Glycoproteins with Potent Ice-Binding Activity / A.C. Deleray, S.S. Saini, A.C. Wallberg, J.R. Kramer // *Chemistry of materials : a publication of the American Chemical Society*. – 2024. – Vol. 36, №7. – P.3424–3434.
28. New England Biolabs. Transformation Protocol for BL21(DE3) Competent Cells (C2527I) v1 / New England Biolabs. – 2015. – .
29. Physics of Ice Nucleation and Antinucleation: Action of Ice-Binding Proteins / B.S. Melnik, K.A. Glukhova, E.A. Sokolova Voronova [et al.] // *Biomolecules*. – 2023. – Vol. 14, №1.
30. An efficient system for high-level expression and easy purification of authentic recombinant proteins / A.-M. Catanzariti, T.A. Soboleva, D.A. Jans [et al.] // *Protein science : a publication of the Protein Society*. – 2004. – Vol. 13, №5. – P.1331–1339.
31. Corporation, P. ProteaseMAX(TM) Surfactant, Trypsin Enhancer Technical Bulletin TB373 / P. Corporation. – 2015. – .
32. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels / A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann // *Analytical chemistry*. – 1996. – Vol. 68, №5. – P.850–858.
33. mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis / M. Strohal, M. Hassman, B. Kosata, M. Kodíček // *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. – 2008. – Vol. 22, №6. – P.905–908.
34. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy / A. Micsonai, F. Wien, L. Kernya [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – Vol. 112, №24. – E3095-103.
35. Nečas, D. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis / D. Nečas, P. Klapetek // *Open Physics*. – 2012. – T.10, №1. – C.181–188.
36. Upgraded SSRF BL19U2 beamline for small-angle X-ray scattering of biological macromolecules in solution / G. Liu, Y. Li, H. Wu [и др.] // *Journal of Applied Crystallography*. – 2018. – T.51, №6. – C.1633–1640.
37. Hopkins, J.B. BioXTAS RAW 2: new developments for a free open-source program for small-angle scattering data reduction and analysis / J.B. Hopkins // *Journal of Applied Crystallography*. – 2024. – Vol. 57, №Pt 1. – P.194–208.
38. ATSAS 3.0: expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis / K. Manalastas-Cantos, P.V. Konarev, N.R. Hajizadeh [et al.] // *Journal of Applied Crystallography*. – 2021. – Vol. 54, №Pt 1. – P.343–355.
39. Svergun, D.I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria / D.I. Svergun // *Journal of Applied Crystallography*. – 1992. – T.25, №4. – C.495–503.
40. Hansen, S. Bayesian estimation of hyperparameters for indirect Fourier transformation in small-angle scattering / S. Hansen // *Journal of Applied Crystallography*. – 2000. – T.33, №6. – C.1415–1421.
41. Svergun, D.I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing / D.I. Svergun // *Biophysical journal*. – 1999. – Vol. 76, №6. – P.2879–2886.
42. ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions / D. Franke, M.V. Petoukhov, P.V. Konarev [et al.] // *Journal of Applied Crystallography*. – 2017. – Vol. 50, №Pt 4. – P.1212–1225.
43. SasView version 5.0.6 / M. Doucet, J.H. Cho, G. Alina [и др.]. – 2023. – .
44. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel [et al.] // *Nature*. – 2021. – Vol. 596, №7873. – P.583–589.
45. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes / A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2018. – Vol. 46, №W1. – W296-W303.

46. D.A Case, K Belfon, I.Y Ben-Shalom, S.R Brozell, D.S Cerutti, T.E Cheatham III, VWD Cruzeiro, T.A Darden, R.E Duke, G Giambasu, M.K Gilson, H Gohlke, A.W Goetz, R Harris, S Izadi, S.A Izmailov, K Kasavajhala, A Kovalenko, R Krasny, T Kurtzman, T Lee, S LeGrand, P Li, C Lin, J Liu, T Luchko, R Luo, V Man, K Merz, Y Miao, O Mikhailovskii, G Monard, H Nguyen, A Onufriev, F Pan, S Pantano, R Qi, D.R Roe, A Roitberg, C Sagui, S Schott-Verdugo, J Shen, C.L Simmerling, N Skrynnikov, J Smith, J Swails, R.C Walker, J Wang, L Wilson, R.M Wolf, X Wu, Y Xiong, Y Xue, D.M York, P.A Kollman. Amber20 / D.A Case, K Belfon, I.Y Ben-Shalom, S.R Brozell, D.S Cerutti, T.E Cheatham III, VWD Cruzeiro, T.A Darden, R.E Duke, G Giambasu, M.K Gilson, H Gohlke, A.W Goetz, R Harris, S Izadi, S.A Izmailov, K Kasavajhala, A Kovalenko, R Krasny, T Kurtzman, T Lee, S LeGrand, P Li, C Lin, J Liu, T Luchko, R Luo, V Man, K Merz, Y Miao, O Mikhailovskii, G Monard, H Nguyen, A Onufriev, F Pan, S Pantano, R Qi, D.R Roe, A Roitberg, C Sagui, S Schott-Verdugo, J Shen, C.L Simmerling, N Skrynnikov, J Smith, J Swails, R.C Walker, J Wang, L Wilson, R.M Wolf, X Wu, Y Xiong, Y Xue, D.M York, P.A Kollman. – 2020. – .
47. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized Born / A.W. Götz, M.J. Williamson, D. Xu [et al.] // Journal of chemical theory and computation. – 2012. – Vol. 8, №5. – P.1542–1555.
48. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald / R. Salomon-Ferrer, A.W. Götz, D. Poole [et al.] // Journal of chemical theory and computation. – 2013. – Vol. 9, №9. – P.3878–3888.
49. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis / E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang [et al.] // Journal of computational chemistry. – 2004. – Vol. 25, №13. – P.1605–1612.
50. Roe, D.R. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data / D.R. Roe, T.E. Cheatham // Journal of chemical theory and computation. – 2013. – Vol. 9, №7. – P.3084–3095.
51. Amber 2022 / David A Case, H. Metin Aktulga, Kellon Belfon [и др.]. – .
52. GalaxyHomomer: a web server for protein homo-oligomer structure prediction from a monomer sequence or structure / M. Baek, T. Park, L. Heo [et al.] // Nucleic acids research. – 2017. – Vol. 45, №W1. – W320-W324.
53. Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer / R. Evans, M. O'Neill, A. Pritzel [и др.]. – 2021. – T.11.
54. Matsumoto, M. GenIce: Hydrogen-Disordered Ice Generator / M. Matsumoto, T. Yagasaki, H. Tanaka // Journal of computational chemistry. – 2018. – Vol. 39, №1. – P.61–64.
55. Khalak, Y. Improved general-purpose five-point model for water: TIP5P/2018 / Y. Khalak, B. Baumeier, M. Karttunen // The Journal of chemical physics. – 2018. – Vol. 149, №22. – P.224507.
56. Matsumoto, M. Novel Algorithm to Generate Hydrogen-Disordered Ice Structures / M. Matsumoto, T. Yagasaki, H. Tanaka // Journal of chemical information and modeling. – 2021. – Vol. 61, №6. – P.2542–2546.
57. Structural characteristics of a novel antifreeze protein from the longhorn beetle *Rhagium inquisitor* / E. Kristiansen, H. Ramløv, P. Højrup [et al.] // Insect biochemistry and molecular biology. – 2011. – Vol. 41, №2. – P.109–117.
58. Kar, R.K. Biophysical and biochemical aspects of antifreeze proteins: Using computational tools to extract atomistic information / R.K. Kar, A. Bhunia // Progress in biophysics and molecular biology. – 2015. – Vol. 119, №2. – P.194–204.
59. The ice-binding site of Atlantic herring antifreeze protein corresponds to the carbohydrate-binding site of C-type lectins / K.V. Ewart, Z. Li, D.S. Yang [et al.] // Biochemistry. – 1998. – Vol. 37, №12. – P.4080–4085.

60. Refined solution structure of type III antifreeze protein: hydrophobic groups may be involved in the energetics of the protein-ice interaction / F.D. Sönnichsen, C.I. DeLuca, P.L. Davies, B.D. Sykes // *Structure* (London, England : 1993). – 1996. – Vol. 4, №11. – P.1325–1337.
61. *Antifreeze Proteins Volume 2* / ред. H. Ramløv, D. S. Friis. – Cham: Springer International Publishing, 2020.
62. Griffith, M. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities / M. Griffith, M.W.F. Yaish // *Trends in plant science*. – 2004. – Vol. 9, №8. – P.399–405.
63. Hyperactive antifreeze protein from beetles / L.A. Graham, Y.C. Liou, V.K. Walker, P.L. Davies // *Nature*. – 1997. – Vol. 388, №6644. – P.727–728.
64. Discovery of Hyperactive Antifreeze Protein from Phylogenetically Distant Beetles Questions Its Evolutionary Origin / T. Arai, A. Yamauchi, A. Miura [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Vol. 22, №7.
65. Greenfield, N.J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure / N.J. Greenfield // *Nature protocols*. – 2006. – Vol. 1, №6. – P.2876–2890.
66. Deng, G. Isolation and characterization of an antifreeze protein from the longhorn sculpin, *Myoxocephalus octodecimspinosus* / G. Deng, R.A. Laursen // *Biochimica et biophysica acta*. – 1998. – Vol. 1388, №2. – P.305–314.
67. Whitmore, L. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data / L. Whitmore, B.A. Wallace // *Nucleic acids research*. – 2004. – Vol. 32, №Web Server issue. – W668-73.
68. Structure of an Ice-Binding Protein from *Myoxocephalus octodecemspinosus* Determined by Molecular Dynamics and Based on Circular Dichroism Spectra / G.A. Oleinik, P. Zhdanova, V.V. Koval [и др.] // *Biophysics*. – 2023. – Т.68, №4. – С.513–518.
69. Low thermodynamic but high kinetic stability of an antifreeze protein from *Rhagium mordax* / D.S. Friis, J.L. Johnsen, E. Kristiansen [et al.] // *Protein science : a publication of the Protein Society*. – 2014. – Vol. 23, №6. – P.760–768.
70. Antifreeze proteins from the sea raven, *Hemitripterus americanus*. Further evidence for diversity among fish polypeptide antifreezes / D. Slaughter, G.L. Fletcher, V.S. Ananthanarayanan, C.L. Hew // *The Journal of biological chemistry*. – 1981. – Vol. 256, №4. – P.2022–2026.
71. Vega, C. The melting temperature of the most common models of water / C. Vega, E. Sanz, J.L.F. Abascal // *The Journal of chemical physics*. – 2005. – Vol. 122, №11. – P.114507.
72. Interaction of ice binding proteins with ice, water and ions / A.S. Oude Vrielink, A. Aloï, L.L.C. Olijve, I.K. Voets // *Biointerphases*. – 2016. – Vol. 11, №1. – P.18906.
73. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 / J. Abramson, J. Adler, J. Dunger [et al.] // *Nature*. – 2024. – Vol. 630, №8016. – P.493–500.
74. Crystal structure and mutational analysis of Ca²⁺-independent type II antifreeze protein from longsnout poacher, *Brachyopsis rostratus* / Y. Nishimiya, H. Kondo, M. Takamichi [et al.] // *Journal of molecular biology*. – 2008. – Vol. 382, №3. – P.734–746.
75. Baardsnes, J. Antifreeze protein dimer: when two ice-binding faces are better than one / J. Baardsnes, M.J. Kuiper, P.L. Davies // *The Journal of biological chemistry*. – 2003. – Vol. 278, №40. – P.38942–38947.
76. Molecular dynamics-guided insight into the adsorption–inhibition mechanism for controlling ice growth/melt of antifreeze protein type IV mutant from longhorn sculpin fish / A. Eskandari, T.C. Leow, M.B.A. Rahman, S.N. Oslan // *Chemical Papers*. – 2024. – Т.78, №7. – С.4437–4454.
77. Mochizuki, K. Collective Transformation of Water between Hyperactive Antifreeze Proteins: RiAFPs / K. Mochizuki, M. Matsumoto // *Crystals*. – 2019. – Т.9, №4. – С.188.
78. A beta-helical antifreeze protein isoform with increased activity. Structural and functional insights / E.K. Leinala, P.L. Davies, D. Doucet [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2002. – Vol. 277, №36. – P.33349–33352.

79. Ice-Nucleating and Antifreeze Proteins Recognize Ice through a Diversity of Anchored Clathrate and Ice-like Motifs / A. Hudait, N. Odendahl, Y. Qiu [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2018. – Vol. 140, №14. – P.4905–4912.
80. Ambiguities in and completeness of SAS data analysis of membrane proteins: the case of the sensory rhodopsin II-transducer complex / Y.L. Ryzhykau, A.V. Vlasov, P.S. Orekhov [et al.] // Acta crystallographica. Section D, Structural biology. – 2021. – Vol. 77, №Pt 11. – P.1386–1400.
81. Brennich, M. How to Analyze and Present SAS Data for Publication / M. Brennich, P. Pernot, A. Round // Advances in experimental medicine and biology. – 2017. – Vol. 1009. – P.47–64.
82. Younes-Metzler, O. The adsorption of antifreeze glycoprotein fraction 8 on dry and wet mica / O. Younes-Metzler, R.N. Ben, J.B. Giorgi // Colloids and surfaces. B, Biointerfaces. – 2011. – Vol. 82, №1. – P.134–140.
83. Nooren, I.M.A. Diversity of protein-protein interactions / I.M.A. Nooren, J.M. Thornton // The EMBO journal. – 2003. – Vol. 22, №14. – P.3486–3492.



Отчет о проверке

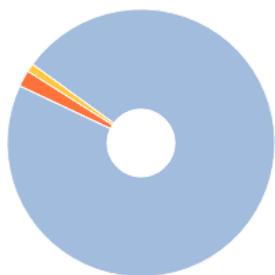
Автор: Олейник Г А

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: Олейник_wg

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

Тариф: FULL



Совпадения:
1,78%



Оригинальность:
96,99%



ИИ-контент:
0%



Цитирования:
0%



Самоцитирования:
1,23%



«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует проверенному тексту документа.

- Совпадения** — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.
- Самоцитирования** — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.
- Цитирования** — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.
- Текстовое пересечение** — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
- Источник** — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
- Оригинальный текст** — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Номер документа: 31

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 09.09.2025 11:10:53

Дата корректировки: 09.09.2025 11:17:36

Количество страниц: 53

Символов в тексте: 90129

Слов в тексте: 12177

Число предложений: 1092

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да
Исключение элементов документа из проверки: Нет
Выполнено распознавание текста (OCR): Да
Выполнена проверка с учетом структуры: Нет

Модули поиска: Цитирование, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Публикации eLIBRARY, Публикации РГБ (переводы и перефразирования), Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Переводные заимствования, Рувики, Коллекция НБУ, Перефразирования по коллекции IEEE, Шаблонные фразы, СПС ГАРАНТ: аналитика, Кольцо вузов, Публикации РГБ, СМИ России и СНГ, IEEE, Патенты СССР, РФ, СНГ, Медицина, ИПС Адилет, Диссертации НББ, Сводная коллекция ЭБС, Переводные заимствования IEEE, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Кольцо вузов (переводы и перефразирования), Интернет Плюс, Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования), Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте

❗ **Модули, недоступные в рамках тарифа:** Интернет Free

ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	8,58%	0%	СТРУКТУРА ЛЕД-СВЯЗЫВАЮЩЕГО... http://elibrary.ru	01 Янв 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики, не является плагиатом
[02]	5,92%	0%	https://sciencejournals.ru/cgi/getP... https://sciencejournals.ru	20 Сен 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики, не является плагиатом
[03]	4,8%	0%	https://sciencejournals.ru/cgi/getP... https://sciencejournals.ru	20 Сен 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики, не является плагиатом
[04]	4,7%	0%	СТРУКТУРА ЛЕД-СВЯЗЫВАЮЩЕГО... http://elibrary.ru	01 Янв 2023	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики, не является плагиатом
[05]	2,1%	0%	диплом_Ковешникова А.Д.	10 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики, не является плагиатом
[06]	2,04%	0%	диплом_Ковешникова А.Д.	10 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики, не является плагиатом
[07]	1,61%	0%	Давлетгильдеева, Анастасия Тим... http://dlib.rsl.ru	18 Сен 2024	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики, не является плагиатом
[08]	1,41%	0%	https://sciencejournals.ru/cgi/getP... https://sciencejournals.ru	20 Сен 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[09]	1,23%	1,23%	УСТАНОВЛЕНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТ... http://elibrary.ru	01 Янв 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[10]	0,77%	0%	Давлетгильдеева, Анастасия Тим... http://dlib.rsl.ru	18 Сен 2024	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[11]	0,77%	0%	davletgildeeva_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	01 Окт 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[12]	0,69%	0%	davletgildeeva_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	01 Окт 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики, не является плагиатом
[13]	0,65%	0%	ВКР Булыгин	18 Мая 2023	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.

						Стандартное описание методики, не является плагиатом
[14]	0,65%	0,65%	2019 жылға арналған есепті көші... https://ncste.kz	21 Ноя 2022	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[15]	0,64%	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[16]	0,61%	0%	TDUEx_2021_Palomino_Vasco.pdf https://dehesa.unex.es	29 Ноя 2024	Переводные заимствования	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики, не является плагиатом
[17]	0,58%	0%	ВКР Булыгин	18 Мая 2023	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики, не является плагиатом
[18]	0,57%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	16 Фев 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики, не является плагиатом
[19]	0,56%	0,56%	Изучение методами молекулярн... http://journals.tsu.ru	28 Окт 2022	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[20]	0,53%	0,03%	https://www.openbio.ru/openbio_t... https://openbio.ru	30 Дек 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[21]	0,47%	0%	openbio_tezis_2023.pdf https://openbio.ru	09 Авг 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[22]	0,45%	0%	Орлов, Юрий Александрович Тра... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2021	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики, не является плагиатом
[23]	0,44%	0%	%D0%BD%D0%B0%D1%83%D1%8... http://niboch.nsc.ru	06 Фев 2025	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[24]	0,39%	0%	medvedevke.pdf https://icgbio.ru	21 Мая 2025	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	0,33%	0%	Аксенова_диплом	25 Мая 2022	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	0,29%	0,29%	Improving Antifreeze Proteins Pred... https://ieeexplore.ieee.org	20 Дек 2024	Переводные заимствования IEEE	
[27]	0,27%	0%	Лилия_Аксенова_диплом	11 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Стандартное описание методики, не является плагиатом
[28]	0,27%	0%	УСТАНОВЛЕНИЕ ВТОРИЧНОЙ СТ... http://elibrary.ru	01 Янв 2023	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0,26%	0,26%	Diss_PGS01.pdf http://nrcki.ru	23 Окт 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[30]	0,26%	0%	Diss_PGS	23 Окт 2023	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[31]	0,23%	0%	Горбунов_антиплагиат	11 Июн 2023	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	0,22%	0%	BioTop-2024_%D0%A1%D0%B1%D... http://conf.nsc.ru	03 Мар 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0,2%	0%	ВКР	26 Мая 2025	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0,19%	0%	Ivana Hitkova.pdf http://mediatum.ub.tum.de	25 Мая 2021	Переводные заимствования	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	0,18%	0%	https://www.openbio.ru/openbio_t... https://openbio.ru	30 Дек 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[36]	0,18%	0%	openbio_tezis_2023.pdf https://openbio.ru	09 Авг 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,17%	0%	Решение Арбитражного суда Нов... http://arbitr.garant.ru	30 Ноя 2024	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,17%	0%	Государственная фармакопея Ро... http://ivo.garant.ru	21 Апр 2020	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0,17%	0%	Патентованные инновации в мо... http://elibrary.ru	01 Янв 2025	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0,17%	0%	Эффективность чрескожных коро... http://elibrary.ru	01 Янв 2018	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,17%	0%	Список кавалеров ордена Алекса... https://ru.ruwiki.ru	раньше 2011	Рувики	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0,17%	0%	ИХБФМ_ПушкарёвскаяА.А.	30 Мая 2025	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,17%	0%	Черноносков, Александр Анатоль... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2023	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	0,17%	0%	Три бердских предприятия назва... http://berdsk.bezformata.ru	07 Апр 2014	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0,17%	0%	Президент Российской Федераци... http://dou.nso.ru	02 Июл 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0,17%	0%	Дайджест решений в сфере конт... http://regionfas.ru	12 Янв 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0,17%	0%	Дайджест решений в сфере конт... http://novosibirsk.bezformata.ru	12 Янв 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,17%	0%	Средство для нейтрализации вир... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0,17%	0%	Способ получения наноразмерн... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0,17%	0%	Всероссийская конференция "Фи...	19 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,17%	0%	Формирование подходов к оценк... https://book.ru	01 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,15%	0%	Разработка биотехнологического... https://elib.nlb.by	01 Янв 2014	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,11%	0%	Чернопятнистый рагий https://ru.ruwiki.ru	раньше 2011	Рувики	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,11%	0%	Всероссийская научно-практичес... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,11%	0%	Вестник гематологии. Том IX. № 2... http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,11%	0%	Чернопятнистый рагий https://ru.wikipedia.org	05 Авг 2025	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на
объём заимствования

Олейник Галина Александровна

«Структурно-динамические факторы образования комплексов лед-
связывающих белков»

Оригинальность работы составляет 96.99%, что соответствует требованиям
порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на
заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь АК – к.б.н. С.К. Мирошниченко