

**РОЛЬ СТРУКТУРНОГО СОСТОЯНИЯ БЕТА-КАЗЕИНА В ЕГО СВЯЗЫВАЮЩИХ И СОЛЮБИЛИЗАЦИОННЫХ СВОЙСТВАХ ПО ОТНОШЕНИЮ К РЕТИНОЛУ**

Коннова Т.А., Файзуллин Д.А., Зуев Ю.Ф.  
Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН  
ул. Лобачевского д.2/31 а/я 30, г. Казань, 420111, РФ  
e-mail:tatiana.a.konnova@gmail.com

**Аннотация.** Использование комплекса взаимодополняющих биофизических методов (флуоресцентная, КД- и ИК-спектроскопия, динамическое светорассеяние) позволило изучить корреляцию между агрегатным состоянием (мономеры, ассоциаты), реологическими свойствами белка и вторичной структурой природной и рекомбинантных форм бета-казеина. Получен массив экспериментальных данных о механизмах самоассоциации бета-казеина, уточняющий границы его коллоидного состояния, определены температуры переходов мономер-мицелла, размеры агрегатов природной и модифицированных форм белка. Охарактеризована мицеллообразующая способность и солубилизационная емкость мицелл бета-казеина по отношению к гидрофобному витамину ретинолу. Проанализировано влияние ионной силы раствора на связывание и термодинамическую стабильность комплексов бета-казеина с гидрофобным лигандом. Рассчитанные константы связывания подтверждают, что связывание в комплексах ретинол-бета-казеин зависит от конформации белковой молекулы и ионной силы раствора. Полученные представления о механизмах конформационных переходов, самоассоциации, взаимодействия бета-казеина с целевыми лигандами на молекулярном уровне, способствуют разработке и созданию эффективных белковых носителей биоактивных добавок, лекарственных препаратов.

**Ключевые слова:** бета-казеин, мицеллы, самоассоциация, критическая концентрация мицеллообразования, константа связывания.

**THE ROLE OF BETA-CASEIN STRUCTURAL STATE IN BINDING AND SOLUBILIZATION OF RETINOL**

Konnova T.A., Faizullin D.A., Zuev Yu.F.  
Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics KazSC RAS  
Lobachevsky str., 2/31, Kazan, 420111, Russia  
e-mail:tatiana.a.konnova@gmail.com

**Abstract.** The correlation between the aggregate state (monomers, associates), rheological properties and the secondary structure of the native and recombinant beta-caseins was studied by the complex of biophysical methods (fluorescence, CD and IR spectroscopy, dynamic light scattering). The experimental data on the mechanisms of beta-casein self-association that specifies its colloidal state limits was obtained, the temperature of monomer-micelle transitions, the size of aggregates of protein native and modified forms were determined. Micelle-forming ability and micellar solubilization capacity of beta-casein micelles towards hydrophobic vitamin retinol were characterized. The effect of the low ionic strength of the solution on the binding and thermodynamic stability of beta-casein complexes with a hydrophobic ligand was analyzed. The resulting binding constants confirm that the binding in retinol-beta-casein complexes depends on the conformation of the protein molecule and the ionic strength of the solution. The obtained insights on the mechanisms of conformational transitions, self-association, interaction of beta-casein with target ligands at the molecular level, contribute to the design and development of effective protein carriers of bioactive additives and drugs.

**Key words:** beta-casein, micelle, self-association, critical micelle concentration (CMC), binding constant

На сегодняшний день многие понимают, что можно улучшить здоровье и снизить риск развития заболеваний, изменив рацион питания. Последние тенденции в области здорового питания заключаются в отказе от искусственных добавок, жиров и переходе к потреблению обезжиренной пищи, особенно молочных продуктов. Уменьшение количества жиров в рационе одновременно исключает из рациона гидрофобные микроэлементы, например жирорастворимые витамины и незаменимые жирные кислоты [1]. Жирорастворимые витамины участвуют в регуляции биохимических процессов в живых организмах; они не синтезируются внутри организма, поэтому должны поступать в организм извне [2]. Витамин А (ретинол) выполняет 2 ключевые роли в физиологии животных, это хромофор зрительного пигмента, а также витамин необходим для поддержания правильной дифференцировки и пролиферации многих эпителиальных тканей. Дефицит витамина А может вызвать серьезные расстройства, такие как ночная слепота и ксерофтальмия [3]. Включение жирорастворимых витаминов в обезжиренные и с низким содержанием жира продукты, проблематично, поскольку витамины плохо растворимы в воде и химически нестабильны, кроме того очень чувствительны к воздействию кислорода, ультрафиолетового излучения или физико-химическим воздействиям при технологических обработках [4]. Плохая растворимость препаратов часто приводит к ограниченному поглощению, желудочно-кишечной токсичности, низкой и непостоянной биодоступности, низкой стабильности, и т.д. [5]. В связи с этим возникает потребность в нелипидных носителях для доставки и повышения стабильности жирорастворимых витаминов в нежирных продуктах [1]. Белковые комплексы (мицеллы, наночастицы, гели) считаются идеальными для применения в качестве средств доставки гидрофобных препаратов благодаря своим свойствам [6-8]. Бета-казеин представляется привлекательной естественной альтернативой синтетических блок-сополимеров для построения пероральной системы доставки гидрофобных витаминов, благодаря уникальному сочетанию его свойств. Это природный нетоксичный полимер, легко расщепляемый ферментами организма;

заряженный амфифил, образующий мицеллы, размер которых позволяет аккумулировать лиганды; белок с нативно неупорядоченной структурой, что обуславливает его конформационную гибкость, а также способность неспецифически взаимодействовать с кофакторами различной химической структуры.

Работа была посвящена поиску закономерностей и взаимосвязи между структурой бета-казеина, ассоциативными, реологическими свойствами и солубилизационными свойствами по отношению к низкомолекулярным гидрофобным лигандам, на примере витамина ретинола. Были рассмотрены возможные способы солубилизации ретинола в мицеллярных и домицеллярных растворах белка, изучена структурная и термодинамическая стабильность, а также физико-химические свойства бета-казеина в зависимости от состава и свойств среды. В работе были использованы рекомбинантные белки с включением одного – двух цистеинов в заданные участки полипептидной последовательности, что приводило к формированию межмолекулярных или внутримолекулярных дисульфидных связей, и как следствие, изменению полярности, смещению гидрофильно-гидрофобного баланса молекулы бета-казеина, и в результате к изменению свойств его мицеллярных агрегатов.

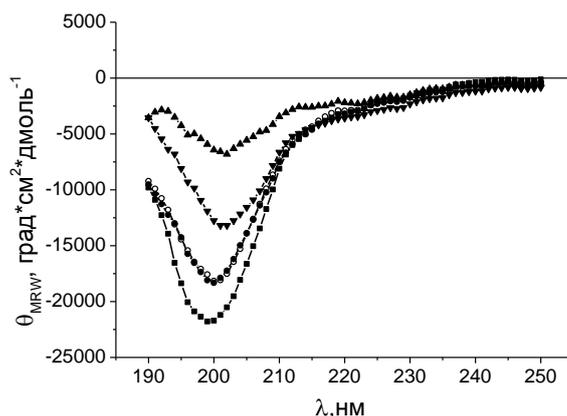


Рисунок 1 – Спектры КД рекомбинантных бета-казеинов, олигомерные формы белка. ■ - WT, ● - C0, ○ – C30, ▲ – C208, ▼ - C0-208 (цифрами обозначены место введения/замены аминокислоты на цистеин)

Олигомерные и мономерные формы рекомбинантных бета-казеинов имеют спектры КД, характерные для неупорядоченной структуры с небольшой долей других структур (см. рис. 1). Показано уменьшение интенсивности сигнала на 198 нм и рост на 222 нм в ряду WT>C0=C30>C0-208>C208 (олигомеры) и WT>C0=C0-208>C30>C208 (момеры). Если считать, что указанные изменения в спектрах рекомбинантных бета-казеинов отражают рост упорядоченности и образование менее гидратированной структуры, а также принимая во внимание результаты расчета доли вторичных структур, то наибольшей структурированностью обладает мутант C208, как в димерной, так и в мономерной формах, а наименьшей – WT. Одинаковую степень внутренней упорядоченности имеют димеры C0 и C30, а среди мономеров – C0, C30 и C0-208. Таким образом, точечное введение цистеина способствует росту упорядоченности вторичной структуры, при этом наибольшее влияние оказывают замены, затрагивающие гидрофобный домен. Игруют ли роль межмолекулярные сшивки – неясно, так как изменения такой же интенсивности протекают и в мономерной форме.

При нагреве растворов нативного и дикого типа бета-казеинов происходит переход из молекулярного состояния со средним гидродинамическим диаметром частиц 7-8 нм в мицеллярное с размером частиц 17-18 нм (см. рис. 2). Положение точки мицеллярного перехода на температурной шкале зависит от концентрации бета-казеина. Для димеров бета-казеинов C0, C30 и C208 отмечено снижение температуры мицеллярного перехода по сравнению с безцистеиновыми формами. Олигомеры двойного мутанта находились в форме мицеллярных ассоциатов во всем исследованном температурном интервале. В присутствии восстанавливающего агента профили изменения размеров частиц цистеинсодержащих белков аналогичны профилям бета-казеинов нативного и дикого типа. При этом мицеллярные ассоциаты восстановленных форм, содержащих цистеин в начале полипептидной цепи, оказываются неустойчивыми к действию повышенных температур. Аналогичная данным светорассеяния картина самоассоциации бета-казеина наблюдается методом триптофановой флуоресценции. Триптофановый остаток, расположенный в гидрофобной части молекулы, при самоассоциации, погружаясь вглубь мицелл, оказывается в менее полярном окружении, что проявляется в «голубом» сдвиге максимума флуоресценции. Наличие или отсутствие мицеллярного перехода согласуется с данными светорассеяния. Таким образом, формирование внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей, и, как следствие, димеризация и олигомеризация оказывают значительное влияние на поведение бета-казеина в процессе самоассоциации.

Согласно некоторым авторам, ККМ бета-казеина варьирует между 0.01 и 0.2% w/v (0.1 и 2 мг/мл), в зависимости от температуры, pH и ионной силы [9, 10, 11]. Portnaya *et al.* [12] сообщают, что ККМ нативного бета-казеина в Na-фосфатном буфере низкой ионной силы, pH 7.0 при температуре 24°C составила около 0.038мМ (0.912 мг/мл), 26°C – 0.027 мМ (0.648 мг/мл). В нашей работе по данным поверхностного натяжения и динамического светорассеяния ККМ бета-казеина нативного и дикого типа составила около 0.2 мг/мл.

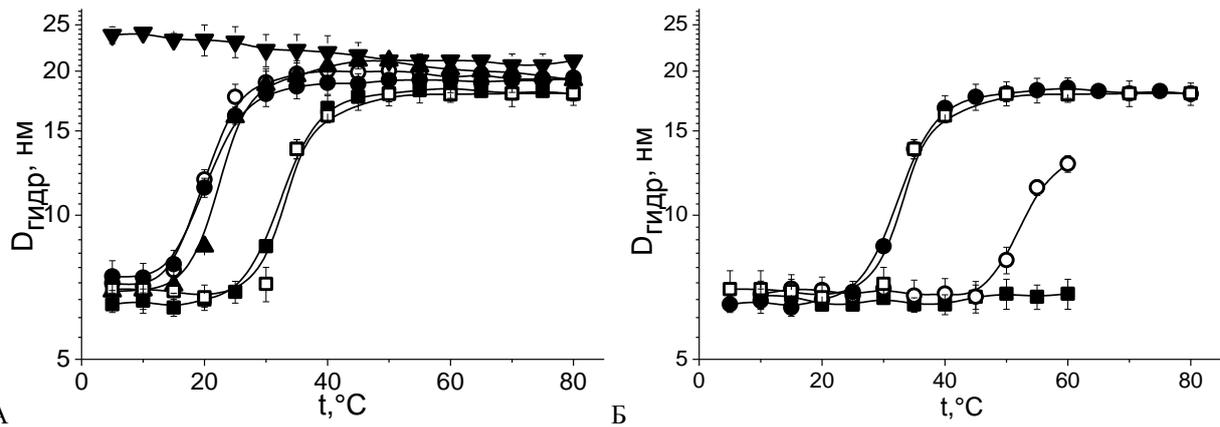


Рисунок 2 – Температурная зависимость гидродинамического диаметра частиц рекомбинантных бета-казеинов (концентрация 0.4 мг/мл), А – олигомерные формы, ■ - WT, □ – нативный, ● - C0, ○ – C30, ▲ – C208, ▼ - C0-208, Б – нативного и рекомбинантного бета-казеина дикого типа от концентрации белка: бета-казеин дикого типа ■ – 0.1 мг/мл, ○ – 0.2 мг/мл, ● – 0.4 мг/мл; □ – нативный бета-казеин 0.4 мг/мл

Молекула бета-казеина имеет один триптофановый остаток в 143м положении. Когда другие молекулы взаимодействуют с казеином, флуоресценция триптофана может изменяться в зависимости от вклада таких взаимодействий в конформацию белка [13]. Связывание ретинола бета-казеином отслеживали по тушению флуоресценции триптофана на длине волны 340 нм. Как видно из полученных значений интенсивности флуоресценции триптофана при длине волны 340 нм (см. рис. 3) четко различимых отличий в связывании ретинола нативным бета-казеином в зависимости от состава среды не выявлено. Насыщение как в мицеллярной, так и в домицеллярной концентрации бета-казеина достигается при концентрации лиганда выше 10 мкМ. Полученные нами константы связывания предполагают среднюю аффинность взаимодействия ретинол-белок (см. табл. 1, см. рис. 4). Количественные значения сайтов связывания бета-казеина с ретинолом показывают, что в среднем на 1 молекулу бета-казеина при взаимодействии приходится 1 молекула ретинола. Наибольшее связывание ретинола происходит в растворах с мицеллярной концентрацией белка, кроме того, повышение ионной силы раствора до физиологических концентраций хлорида натрия приводит к повышению константы связывания на порядок. Очевидно при концентрации бета-казеина выше ККМ, растворимость ретинола возрастает на порядок за счет сольubilизации мицеллами. В этом случае ядро мицелл служит «грузовым отсеком» для витамина, а оболочка из гидрофильных сегментов стабилизирует частицы в водных дисперсиях [14, 15]. Таким образом, мицеллярные структуры бета-казеина как нативного, так и рекомбинантного в условиях слабой ионной силы раствора, оказываются наиболее эффективны для инкапсуляции гидрофобных витаминов.

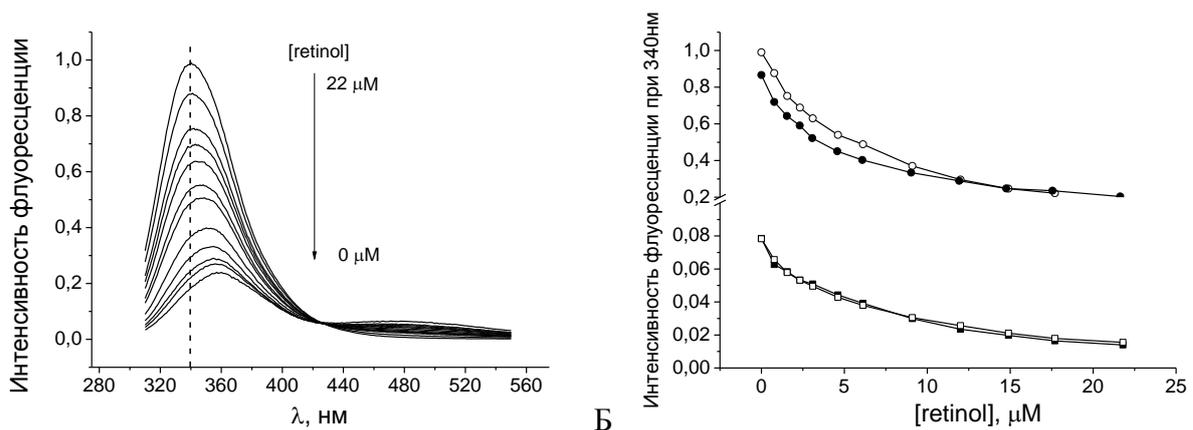


Рисунок 3 – Спектры триптофановой флуоресценции нативного бета-казеина (1 мг/мл) при титровании ретинолом, буфер содержит 0.9 % NaCl, Б – Кривая титрования нативного бета-казеина. Условные обозначения: буфер без NaCl, концентрация бета-казеина ■ – 0.1 мг/мл и ● - 1 мг/мл; буфер с 0.9% NaCl, концентрация бета-казеина □ – 0.1 мг/мл и ○ – 1 мг/мл

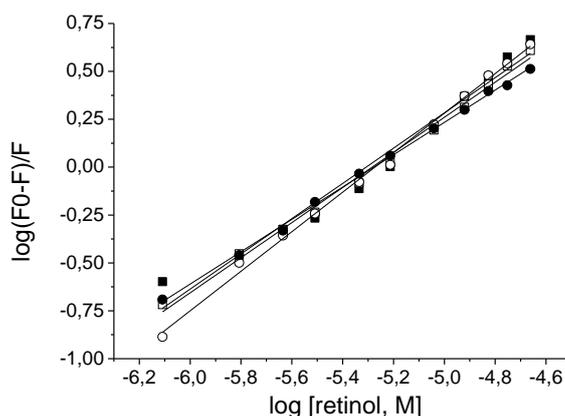


Рисунок 4 – Линейная зависимость  $\log[(F_0-F)/F]$  от  $\log[\text{ретинол}]$ . Условные обозначения: буфер без NaCl, концентрация бета-казеина ■ – 0.1 мг/мл и ● – 1 мг/мл; буфер, содержащий 0.9% NaCl, концентрация бета-казеина □ – 0.1 мг/мл и ○ – 1 мг/мл

Таблица 1. Параметры связывания ретинола и бета-казеина

Концентрация нативного бета-казеина	0mM NaCl			150mM NaCl		
	$K_a \text{ M}^{-1}$	n	$R_a$	$K_a \text{ M}^{-1}$	n	$R_a$
0.1 мг/мл	$7.6 \cdot 10^4$	0.92	0.97	$6.9 \cdot 10^4$	0.92	0.99
1 мг/мл	$2.9 \cdot 10^4$	0.84	0.998	$2.8 \cdot 10^5$	1	0.997

n – число молекул ретинола связанных на 1 молекулу бета-казеина

$R_a$  -линейный коэффициент корреляции

Проведенные исследования говорят о том, что бета-казеин обладает способностью образовывать стабильные комплексы с ретинолом. Структуры на основе ассоциатов бета-казеина могут стать эффективным решением повышения растворимости и стабилизации, придания термодинамической стабильности в водных растворах гидрофобным биоактивным компонентам. Полученные нами данные позволяют систематизировать условия взаимодействия, баланс движущих сил и характеристик, свойства комплексов для программируемого дизайна биологически-активных амфифильных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 16-34-00637.

#### Список литературы / References:

- Zimet P., Livney Y.D. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloid*, 2009, vol. 23, pp. 1120-1126.
- Olson J.A. *Vitamin A. The Handbook of Vitamins*. ed. L. Machlin, New York: Marcel Dekker, 1984, pp. 1-43.
- McLaren D.S. *Vitamin A. Human Nutrition and Dietetics*, 9th edition, eds. Garrow J.S., James W.P.T. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1993, pp 208-217.
- Zimet P., Rosenberg D., Livney Y.D. Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicles for  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 2011, vol. 25, iss. 5, pp. 1270-1276.
- Sastry S.V., Nyshadham J.R., Fix J.A. Recent technological advances in oral drug delivery - a review. *Pharm Sci Technolo Today*, 2000, vol. 3, iss. 4, pp. 138-145.
- MaHam A.H., Tang Z.W., Wu H., Wang J., Lin Y.H. Protein-Based Nanomedicine Platforms for Drug Delivery. *Small*, 2009, vol. 5, pp. 1706-1721.
- Elzoghby A.O., Samy W.M., Elgindy N.A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *J. Control Release*, 2012, vol. 161, pp. 38-49.
- Menéndez-Aguirre O., Kessler A., Stuetz W., Grune T., Weiss J., Hinrichs J. Increased loading of vitamin D2 in reassembled casein micelles with temperature-modulated high pressure treatment. *Food Research International*, 2014, vol. 64, pp. 74-80.
- Evans M.T.A., Phillips M., Jones M.N. The conformation and aggregation of bovine  $\beta$ -casein A. II. Thermodynamics of thermal association and the effects of changes in polar and apolar interactions on micellization. *Biopolymers*, 1979, vol. 18, pp. 1123-1140.
- Niki V.R., Takase K., Arima S. On the shape and size of temperature-dependent  $\beta$ -casein aggregates. *Milchwissenschaft*, 1977, vol. 32, pp. 577-582 (In Germ.).
- Takase K., Niki R., Arima S. A sedimentation equilibrium study of the temperature-dependent association of bovine beta-casein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, vol. 622, iss. 1, pp. 1-8.

12. Portnaya I., Cogan U., Livney Y.D., Ramon O., Shimoni K., Rosenberg M., Danino D. Micellization of bovine b-casein studied by isothermal titration microcalorimetry and cryogenic transmission electron microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, vol. 54, iss. 15, pp. 5555-5561.

13. Lakowicz J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer Science, 2006, 954 p.

14. Myrdal P.B., Yalkowsky S.H. Solubilization of drugs in aqueous media. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Marcel Dekker, 2002, vol. 3, pp. 2458-2580.

15. Adams M.L., Andes D.R., Kwon G.S. Amphotericin B encapsulated in micelles based on poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) derivatives exerts reduced in vitro hemolysis but maintains potent in vivo antifungal activity. *Biomacromolecules*, 2003, vol. 4, iss. 3, pp. 750-757.

## РОЛЬ ЛИПИДНОГО ОКРУЖЕНИЯ В ДИМЕРИЗАЦИИ СПИРАЛЬНЫХ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКОВ

Кузнецов А.С.<sup>1,2</sup>, Ефремов Р.Г.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук  
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, ГСП-7, 117997, РФ

<sup>2</sup> Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»  
ул. Мясницкая, 20, Москва, 101000, РФ  
e-mail: andrej.kuznecov@phystech.edu

**Аннотация.** Трансмембранные домены большинства мембранных белков представляют собой отдельные  $\alpha$ -спирали или их пучки. Они принимают непосредственное участие в функционировании мембранных рецепторов и ионных каналов, а также обеспечивают формирование их правильной пространственной структуры. Таким образом, спираль-спиральные взаимодействия в липидном окружении вовлечены в ключевые процессы жизнедеятельности клетки. На смену концепции мотивов димеризации, описывающей взаимодействие белков в мембране исключительно через непосредственные контакты, пришло представление о мембране как об активной среде, влияющей на поведение встроженных белков. В настоящей работе с помощью метода молекулярной динамики исследовали поведение трансмембранного сегмента гликофорина А и двух искусственных полипептидов на базе полиаланина и полилейцина в гидратированном липидном бислое. Показали, что мономеры и образуемые димеры имеют на поверхности спиральных трансмембранных фрагментов сайты взаимодействия с молекулами липидов. Для мономера гликофорина А наиболее ярко выраженный сайт связывания липидов соответствует интерфейсу его димеризации. Перераспределение связанных молекул липидов при формировании димера способствует стабилизации димерного состояния за счёт энтропийного вклада в свободную энергию ассоциации.

**Ключевые слова:** мембранные белки, гликофорин А, рецепторные тирозинкиназы, белок-белковые взаимодействия.

## THE ROLE OF LIPID ENVIRONMENT IN DIMERIZATION OF PROTEIN HELICAL TRANSMEMBRANE DOMAINS

Kuznetsov A.S.<sup>1,2</sup>, Efremov R.G.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences  
Miklukho-Maklaya Str., 16/10, Moscow, GSP-7, 117997, Russia

<sup>2</sup> National Research University Higher School of Economics  
Myasnitckaya Str., 20, Moscow, 101000, Russia  
e-mail: andrej.kuznecov@phystech.edu

**Abstract.** Transmembrane domains of the most membrane proteins consist of single  $\alpha$ -helices or their bundles. They take part in the functioning of receptors and ion channels and provide spatial structure formation. Thus, helix-helix interactions in lipid environment are involved in crucial processes of cell functioning. The concept of dimerization motifs representing protein-protein interactions as direct residue contacts is now replaced with the model of active membrane medium affecting embedded proteins. In the present work computer molecular dynamics simulations have been used to study the behavior of the transmembrane segment of glycoporphin A and two artificial polypeptides (based on polyalanine and polyleucine) in hydrated lipid bilayers. It was demonstrated that both monomers and dimers present lipid interaction sites on the surface of helical transmembrane segments. In the case of glycoporphin A monomer, the most prominent interaction site corresponds to the dimerization interface. The redistribution of bound lipid molecules during dimer formation stabilizes the dimeric state with the entropy contribution into the association free energy.

**Key words:** membrane proteins, glycoporphin A, receptor tyrosine kinases, protein-protein interactions.

Структурной основой клеточной мембраны является липидный бислой – стабильная структура, образуемая молекулами липидов в водном окружении. В то же время, в составе мембран клетки присутствует множество различных белков [1]. Трансмембранные (ТМ) домены большинства мембранных белков представлены одной или несколькими  $\alpha$ -спиралями, взаимодействующими между собой в липидном окружении. Таким образом, спираль-спиральные взаимодействия лежат в основе работы мембранных систем клетки. Нарушение этих взаимодействий из-