

Межрегиональная олимпиада школьников

«Будущие исследователи — будущее науки»

Разработка и синтез мускари-связывающих
белковых ловушек

Секция: Химия

Научный руководитель
(к.б.н., с.н.с.) с.н.с.

Тутукина М.Н.
(подпись)

Тутукина М.Н.
(расшифровка подписи)

Количество баллов,
полученных на защите

89 баллов
(заполняется председателем жюри)

Председатель жюри

Маркин А.В.
(подпись)

Маркин А.В.
(расшифровка подписи)

Работу выполнил(а)
учащийся 11 класса

ГБОУ Школа на Юго-Востоке
имени Маршала В.И. Чуйкова
(полное наименование учебного заведения)

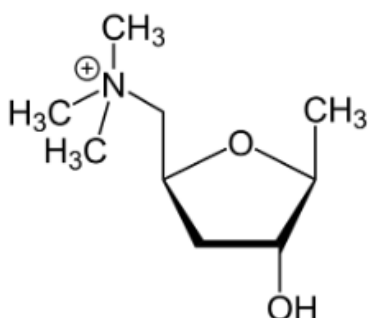
г. Москва
(название населенного пункта)

Сараев Артём Олегович
(Ф.И.О. учащегося ПОЛНОСТЬЮ)

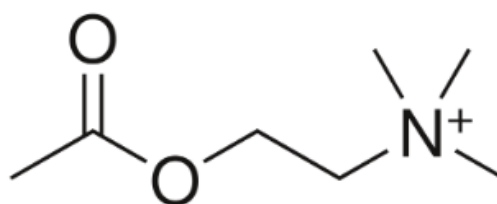
Саров
2025 год

Введение

Мухомор - род микоризообразующих пластинчатых грибов семейства аманитовые. Одни из известных его представителей: мухомор красный (*Amanita muscaria*) и мухомор пантерный (*A. pantherina*). В последнее время растет популярность народной медицины, в том числе употребление мухоморов в качестве пищевой добавки. По заявлениям продавцов таких пищевых добавок, мухоморы способны улучшить память, концентрацию, устранить проблемы со сном, а также обещают увеличение продуктивности и работоспособности. К сожалению, большинство случаев приема мухоморов в качестве пищевой добавки заканчиваются отравлением. [1] В состав яда мухоморов входит множество алкалоидов, в т.ч. мускарин. [2]



структурная формула **мускарина**



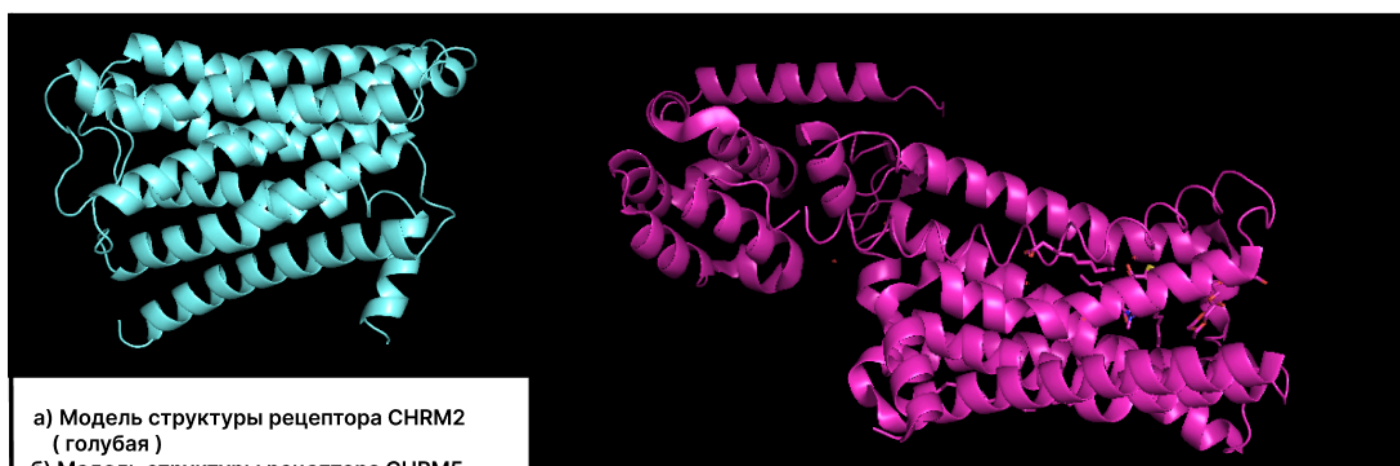
структурная формула **ацетилхолина**

Мускарин — алкалоид, содержащийся в различных грибах, одно из действующих веществ яда мухомора. Он лучше связывается с мускариновыми рецепторами, чем эндогенный лиганд **ацетилхолин**, который является нейромедиатором, осуществляющим нервно-мышечную передачу, и участвующий в парасимпатической нервной системе. Из-за плохого связывания ацетилхолина наступает нарушение передачи электрохимического импульса от нервной клетки через синаптическое пространство между нейронами или от нейронов к мышечной ткани и железистым

клеткам. [3] Признаки отравления включают мускарином в себя: возбуждение гладких и сердечных мышц, сужение альвеол и зрачков. [4]

В геноме человека закодировано 5 видов мускариновых рецепторов:

таблица 1				
название рецептора	место расположения	агонист	антагонист	функция
chrm1	вегетативные ганглии ЦНС головной мозг	ацетилхолин мускарин	атропин оксибутинин дифенгидрамин	двигательная активность
chrm2	клетки сердца	ацетилхолин мускарин	атропин оксибутинин дифенгидрамин	замедление сердечного ритма уменьшение сократительной силы предсердий
chrm3	гладкая мускулатура экзокринные железы	ацетилхолин мускарин	атропин оксибутинин дифенгидрамин	сокращение гладких мышц (кишечник) секреция желёз
chrm4	гладкая мускулатура	ацетилхолин мускарин	атропин оксибутинин дифенгидрамин	двигательная активность
chrm5	ЦНС, слюнные железы, радужная оболочка	ацетилхолин мускарин	атропин оксибутинин дифенгидрамин	секреция желез сокращение гладких мышц



Цель работы

Целью стала разработка белка, который будет действовать по типу *конкурентного связывания* — связывать и безопасно выводить токсичный мускарин, не мешая работе систем, связанных с ацетилхолином.

Ход работы

Был проведен поиск аминокислотных последовательностей пяти мускариновых рецепторов в базе данных NCBI [5]. Далее была проведена разработка моделей рецепторов CHRM1-5 в программах Phyre2/AlphaFold3 [6],[7]. Для поиска энергии и мест связывания был проведен молекулярный докинг рецепторов с двумя целевыми лигандами (ацетилхолином и мускарином) и с тремя для сравнения энергий связывания (дифенгидрамин, оксибутирин, атропин) с помощью программы Autodock Vina [8]. Собственно результатами являются энергия ΔG и положение лиганда в активном центре рецептора. Положение лиганда в активном центре позволяет предсказывать механизм связывания. Показатели энергий приведены в следующей таблицах:

таблица 2					
Лиганд/рецептор	CHRM1, kcal/mol	CHRM2, kcal/mol	CHRM3, kcal/mol	CHRM4, kcal/mol	CHRM5, kcal/mol
Ацетилхолин	-4.6	-4.2	-3,9	-4,2	-3.7

Мускарин	-4.9	-4.4	-4,4	-4,5	-4.6
----------	------	------	------	------	------

таблица 3			
Рецептор/лиганд	Дифенгидрамин	Атропин	Оксибутинин
CHRM1, kcal/mol	-7.8	-7.3	-7.6
CHRM2, kcal/mol	-7.8	-7.8	-7.6
CHRM3, kcal/mol	-6.7	-6.5	-7.6
CHRM4, kcal/mol	-6.7	-7.0	-6.4
CHRM5, kcal/mol	-5.6	-6.3	-5.6

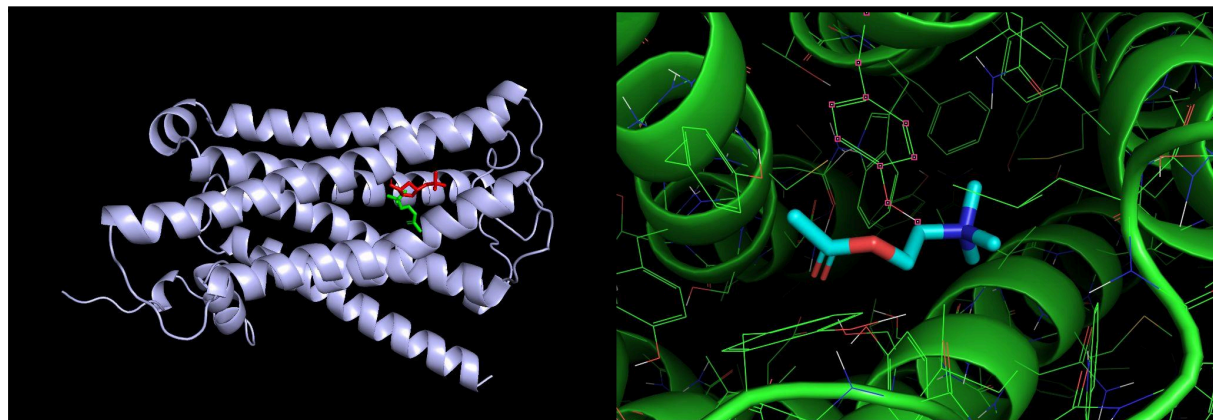
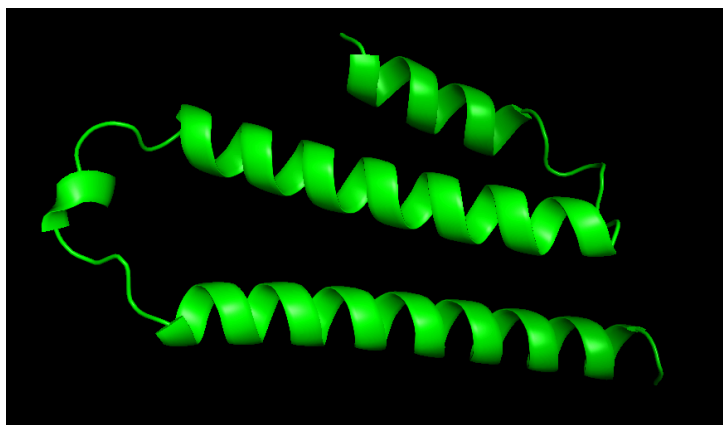


рис.1: а) Места связывания лигандов после проведения молекулярного докинга CHRM1 с ацетилхолином (зеленый) и мускарином (красный)
б) Редактирование последовательности CHRM1 в визуализаторе PyMol

Чтобы сделать “ловушку” была выбрана тактика дестабилизации связи рецептор-ацетилхолин путем замещения аминокислот, участвующих в связывании, на нейтральные или противоположно заряженные. Поэтому, в программе PyMOL [9] были получены аминокислотные последовательности участвующие в связывании с лигандами. Для селективного захвата мускарина были ухудшены

связи ацетилхолин - рецептор путем замены аминокислот на противоположные. Например, для chrM2 были заменены Asp(-) на Lys(+), Val, Tyr на Ala; Trp, Tyr, Cys на Ala, для уменьшения полярности. Для chrM1 был селективно вырезан сайт связывания мускарина. Затем с помощью программ Pyre2/AlphaFold3 [6],[7] были получены модели белков-ловушек для дальнейшего изучения. Молекулярный докинг моделей ловушек с мускарином и ацетилхолином показал значения энергий, представленные в таблице:

таблица 4		
Лиганд/рецептор	trap_CHRM1, kcal/mol	trap_CHRM2, kcal/mol
Ацетилхолин	-3.6	-4.1
Мускарин	-4.6	-4.9



Компьютерная модель
ловушки

После редактирования полученных последовательностей были заказаны праймеры: chrM1_BamH1_F, chrM1_EcoR1_R, chrM2_BamH1_F, chrM2_EcoR1_R (таблица 5).

Таблица 5. Праймеры для амплификации и клонирования chrM1 и chrM2

Название	Последовательность
Chrm1_BamH1_F	AAC CGG ATC CCC ACC TAG CCA CCA

Chrm1_EcoR1_R	GTG GAG AAT TCC AGG AGA GGG GAC TAT CA
Chrm2_BamH1_F	CCT GGG ATC CAC AAG TCC TTA
Chrm2_EcoR1_R	TTG TGA ATT CTA TGT TGA AGT CAT G

Затем был выделен образец ДНК из слюны с помощью набора Biolabmix для выделения ДНК из крови и биологических жидкостей.

Методика выделения днк:

1. Отбор 200 мкл пробы в пробирку.
2. Добавить 750 мкл лизирующего буфера
3. Перемешать образец на вортексе 5-10 с.
4. Инкубировать 10 мин при комнатной температуре
5. Перенести на колонку 800 мкл лизата, далее центрифугировать 30 с 10000 гsf. Удалить фильтрат
- 6.Промывка колонки промывочными буферами на основе 70% этанола. На этой стадии происходит освобождение образца от остаточных солей.
- 7.Элюция ДНК. Добавить 200 мкл буфера для элюции, а затем инкубация 3 минуты при комнатной температуре для лучшей гидратации ДНК и центрифугирование в течение 1 минуты при 10000 gsf для собственно элюции с мембраны.

После выделения образца ДНК была проведена амплификация фрагмента гена CHRM1 с праймерами chrm1_BamH1_F, chrm1_EcoR1_R и смесью qPCR-HS Sybr (Евроген) на амплификаторе DT prime 5 (ДНК-Технология)



Интерфейс программы RealTime_PCR (ДНК-технология) и результат амплификации (кривая накопления продукта).

Программа амплификации включала в себя следующие стадии:

Предварительное плавление ДНК 94°C 2 минуты

Далее 35 циклов:

94°C 20 сек

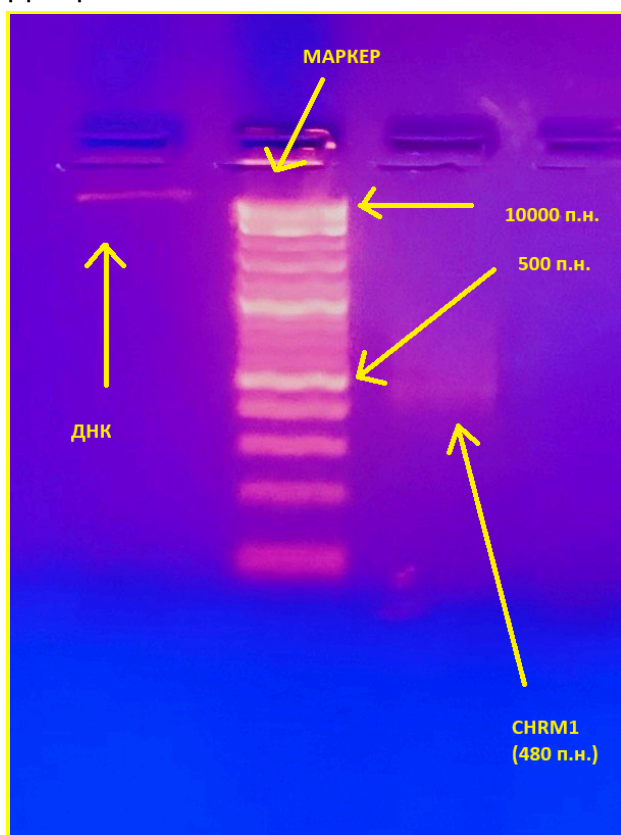
54°C 20 сек

72°C 50 минут

Детекция флуоресценции осуществлялась в конце каждого цикла.

Результат выделения ДНК и амплификации с праймерами к ловушке CHRM1 был оценен с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в 1хбуфере TAE (40мМ Трис-НСl, рН 8.3; 1мМ ЭДТА, 20мМ ацетат) с использованием источника тока Эльф (ДНК-Технология) и камеры Хеликон, напряжение 120В.

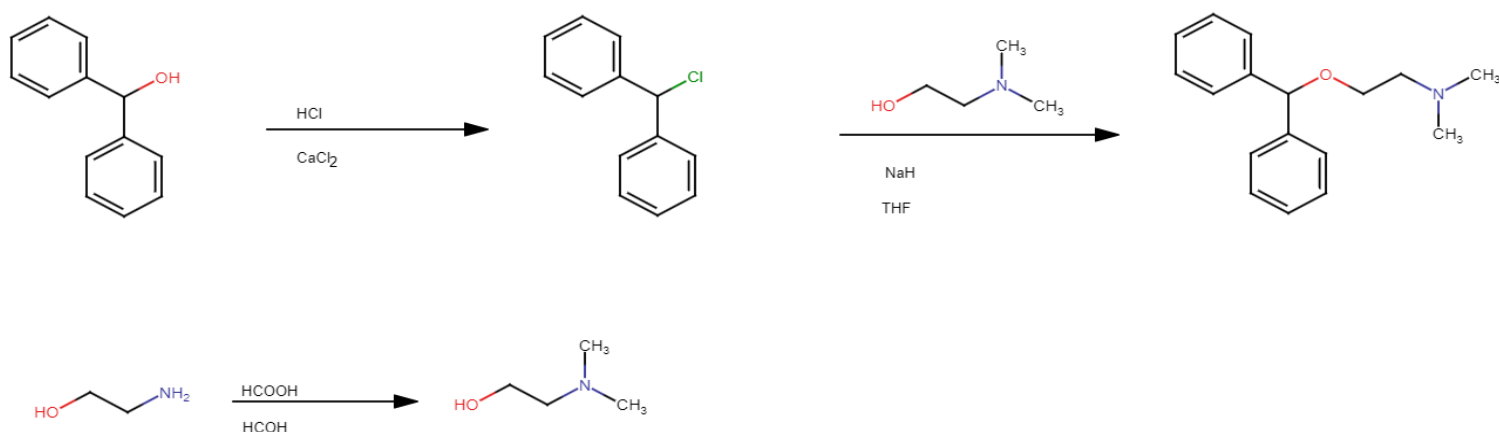
Результат был визуализирован на трансиллюминаторе Vilber в проходящем УФ-свете.



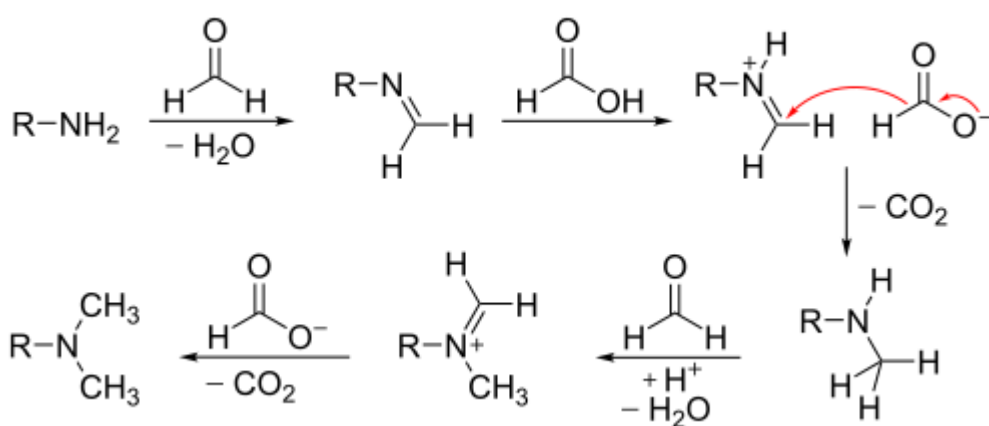
В будущем планируется клонирование фрагмента гена в плазмиду pGEX, наработка белка-ловушек в клетках *Escherichia coli*

BL21(DE3)-RIL и очистка с помощью аффинной хроматографии на GST-сефарозе с помощью колонки GSTrap.

Также была разработана схема синтеза одного из лигандов мускариновых рецепторов - Дифенгидрамина (Торговое название препарата Димедрол). Он используется в лечебной практике в качестве антигистаминного препарата. Димедрол входит в российский перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов [10].



из статьи [11] была взята методика выполнения метилирования первичных аминов до третичных с помощью реакции Эшвайлера-Кларка. Полезность этой реакции в том, что в ходе реакции не образуются соли четвертичных аминов, что упрощает синтез. Механизм данной реакции представлен на схеме ниже:



Обсуждение и выводы

- При сравнение таблиц 2 и 4 видно, что после изменений в аминокислотной последовательности энергия связи

ацетилхолин-ловушка хуже связи ацетилхолин-рецептор и энергия связи мускарин-ловушка лучше связи мускарин-рецептор. Из этого можно сделать вывод, что в теории ловушка работает исправно и не нарушает работу ацетилхолиновых систем.

- замещение отрицательно заряженных аминокислот на положительные улучшает сродство мускарина из-за образования связей по донорно-акцепторному механизму из-за неподеленных электронных пар на кислороде. А также замена аминокислот с большими заместителями на меньшие позволяет лучше связывать мускарин из-за отсутствия пространственных затруднений.
- Был получен фрагмент гена CRHM1, кодирующий селективный сайт связывания мускарина

Список и обзор литературы:

1. <https://ria.ru/20221114/mukhomory-1830915374.html>
2. Michelot, D., & Melendez-Howell, L. M. (2003). Amanita muscaria: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. Mycological Research
3. Lüllmann. Color Atlas of Pharmacology 5 ed (2018)
4. D.H. Mitchel Amanita Mushroom Poisoning
5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
6. <https://www.sbg.bio.ic.ac.uk>
7. <https://alphafoldserver.com>
8. <https://autodock-vina.readthedocs.io>
9. <https://pymol.org>
10. <https://ru.wikipedia.org/wiki/Дифенгидрамин>
11. Jian Hu. Synthesis of N,N,N-Trimethyl-1-Adamantyl Quaternary Ammonium Hydroxide and Technology Development

Межрегиональная олимпиада школьников
«Будущие исследователи – будущее науки»

Финальный тур

Шифр

X-11-6

Предмет Химия

ФИО участника (полностью) Сараев Артём Олегович

Дата рождения (дд.мм.гггг) 23.12.2006

Город Москва Область Московская

Образовательное учреждение ГБОУ Школа на Юго-Востоке
имени Маршала В.И. Чуйкова.

Класс 11

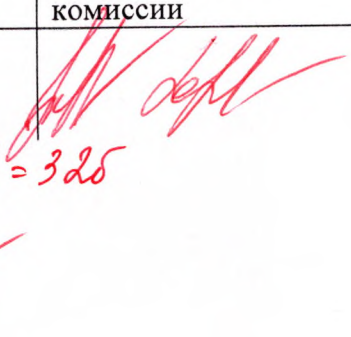
Межрегиональная олимпиада школьников
«Будущие исследователи – будущее науки»

Финальный тур

ХИМИЯ

Шифр

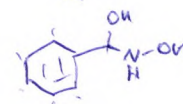
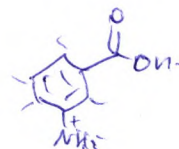
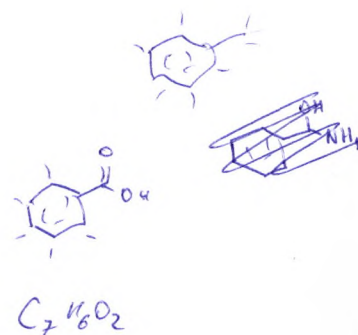
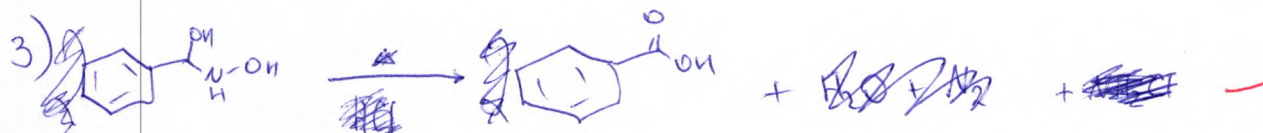
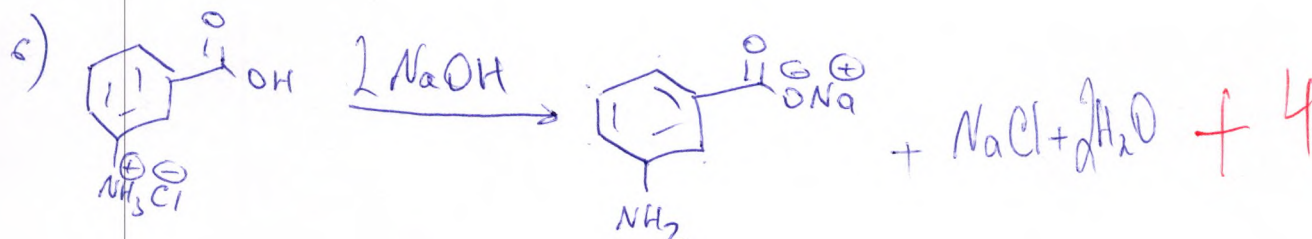
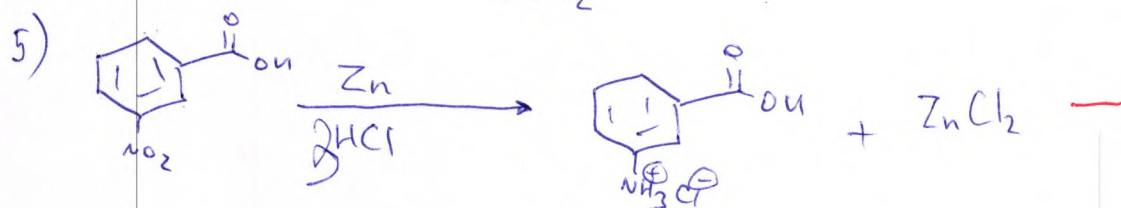
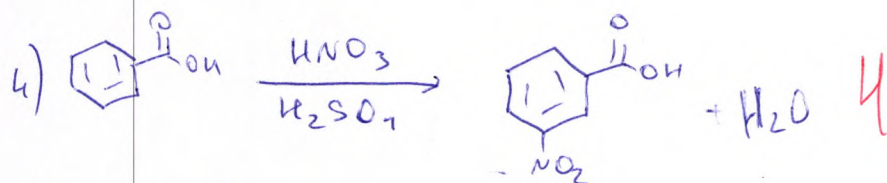
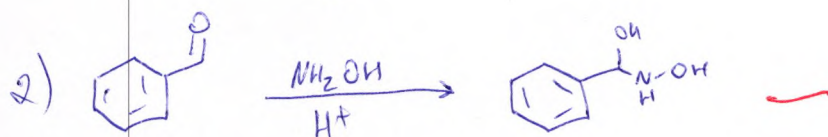
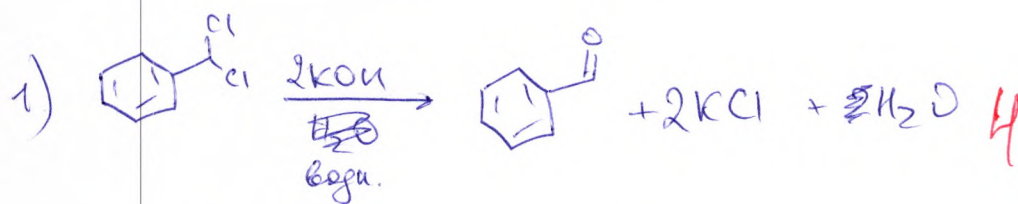
X-11-6

Задача №1	Задача №2	Задача №3	Задача №4	Итоговый балл	Подписи членов комиссии
13+2 15	8+5 13	0	4	25 30+2=325	

Межрегиональная олимпиада школьников
«Будущие исследователи – будущее науки»

Финальный тур

Задание 2



X

Межрегиональная олимпиада школьников
«Будущие исследователи – будущее науки»

Финальный тур

Задание 3

Пусть $V_{\text{см}} = 1 \text{ л.}$

$T = 530 \cdot 273$



участок:
10% - SO_2
99% - N_2
1% - O_2



$120 \cdot 1 = 2 \cdot 8,134 \cdot 144690$

2SO_2 : $120 \cdot 0,1 = 2 \cdot 8,134 \cdot 144690$

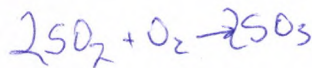
$\gamma = 1,02 \cdot 10^{-5}$

γ_{O_2} : $120 \cdot 0,01 = 2 \cdot 8,134 \cdot 144690$

$\gamma = 1,02 \cdot 10^{-6}$



$K_p = \frac{[C][D]}{[A][B]}$



$K_p = \frac{[\text{SO}_3]^2}{[\text{SO}_2]^2 \cdot [\text{O}_2]}$

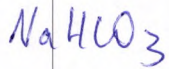
$\gamma_{\text{SO}_2} = 120 \cdot 0,03 = 2 \cdot 8,134 \cdot 144690$

$\gamma_{\text{SO}_3} = 3,06 \cdot 10^{-6}$

$K_p = 1,02 \cdot 10^{-5}$

$\frac{(1,02 \cdot 10^{-5})^2}{(1,02 \cdot 10^{-5})^2 \cdot (1,02 \cdot 10^{-6})}$

Задание 4



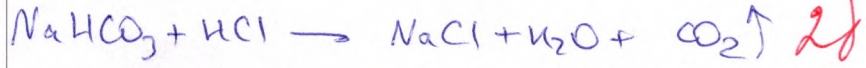
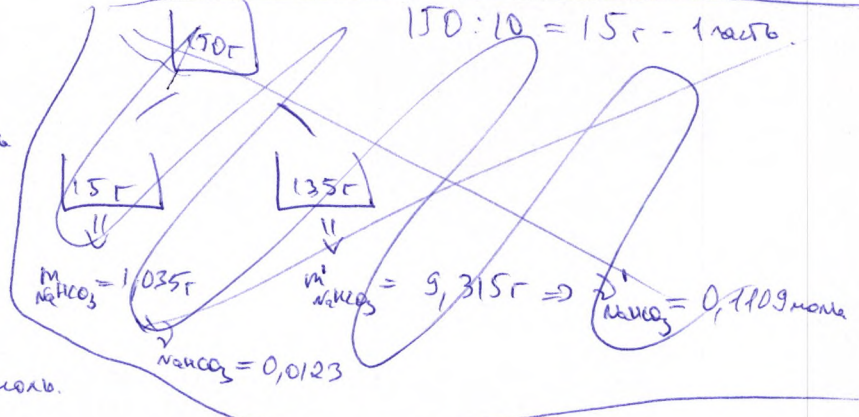
6,9 - 100 г.

$M_{\text{NaHCO}_3} = 84 \text{ г/моль}$

x - 150 г

x = 10,35 г - m NaHCO_3

$\gamma_{\text{NaHCO}_3} = \frac{10,35}{23+1+12+48} = 0,123 \text{ моль}$



$\gamma_{\text{CO}_2} = \frac{0,182}{22,4} = 5,7 \cdot 10^{-3} \Rightarrow \gamma_{\text{NaHCO}_3}$

$m = 0,4788 \text{ г.} \Rightarrow m_{\text{NaHCO}_3} = 10,35 - 0,4788 = 9,8712 \text{ г.}$



$\gamma_{\text{SO}_2} = \frac{2,24}{22,4} = 0,1 \text{ моль}$



$0,175 - 0,1 = 0,075 \text{ моль - остат}$

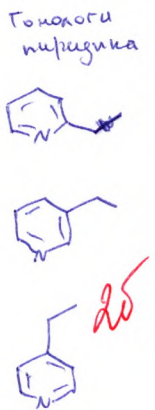
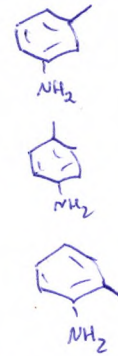
$m_{\text{NaHCO}_3} = 0,075 \cdot 84 = 6,3 \text{ г}$

Во втором р-е остались: не прореагировавший NaHCO_3

Межрегиональная олимпиада школьников
«Будущие исследователи – будущее науки»

Финальный тур

Возмож. стр. формулы:



Задача 1

$$pV \Rightarrow R \cdot T$$

Общ. формула гомологов анилина: $C_nH_{2n-5}N$

$$\frac{12n}{12n+2n-5+14} = 0,87785 \Rightarrow n = 7. \quad 65$$

C_7H_9N — формула ароматич. азотсодерж. веш-в.

$$\nu_{Br_2} = \frac{320,4\%}{160} = 0,08 \text{ моль.}$$

760 мм рт. ст. \rightarrow Па

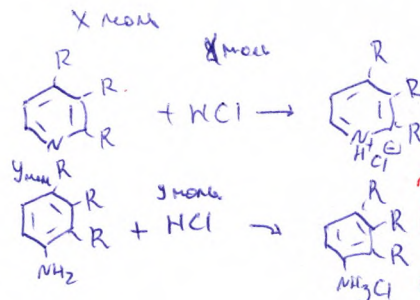
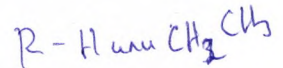
$$760 \cdot 133,3 = 101308 \text{ Па}$$

$$101308 \cdot 0,95 = 96262,6 \text{ Па}$$

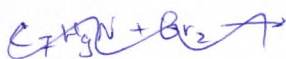
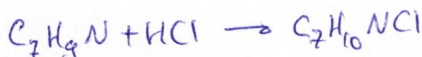
$$HCl = 0,04 \text{ моль.}$$

$$289,5 \text{ К} \rightarrow ^\circ\text{C}$$

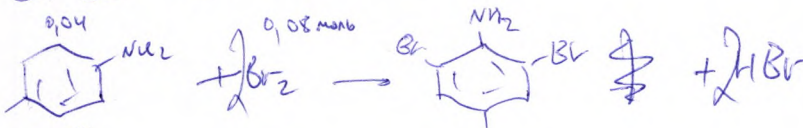
$$289,5 - 273 = 16,5$$



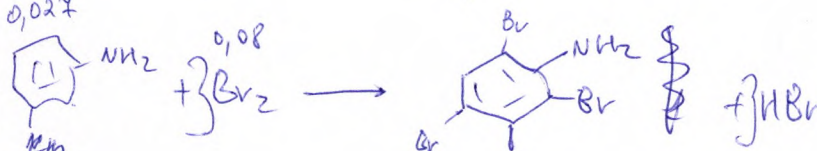
3? 4?



$$0,88 : 2 = 0,04$$

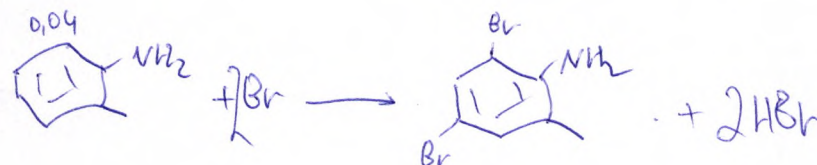


$$0,08 : 3 = 0,027$$



Подвер:

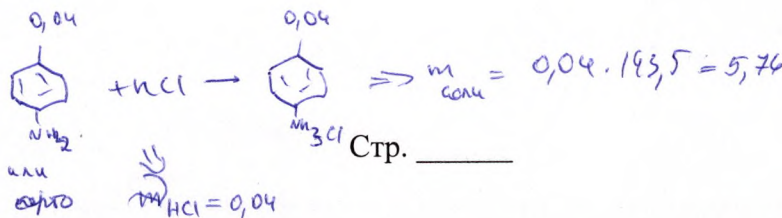
$$M = 0,04 \cdot 107 = 4,28 \text{ г}$$



$$\Sigma 135 + 25 = 155$$

$$M = 0,027 \cdot 107 = 2,89 \text{ г}$$

или метиламин

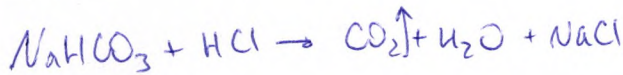


Межрегиональная олимпиада школьников
«Будущие исследователи – будущее науки»

Задание 4 проект

Финальный тур

Пр. р-т



$$\nu_{\text{CO}_2} = \frac{0,182}{22,4} = 8,125 \cdot 10^{-3} \text{ моль} \Rightarrow m_{\text{NaHCO}_3} = 0,6825 \text{ г} \Rightarrow m = 9,891 \text{ г}$$

$$\Rightarrow m = 9,891 \text{ г} \cdot 10,5735 \text{ г} \Rightarrow m = 10,5735 \cdot 9,891 = 104,615 \text{ г} \Rightarrow \nu = \frac{95,165 \cdot 0,0}{84} = 1,146 \%$$

$$= 0,078 \text{ моль.}$$

$$\nu_{\text{SO}_2} = \frac{2,24}{22,4} = 0,1 \text{ моль.} - \text{изб} \rightarrow \text{ост р-т-е.}$$



$$\omega_{\text{NaHSO}_3} = \frac{0,078 \cdot 104}{96,7215} = 8,39 \%$$

$$\omega_{\text{SO}_2} = \frac{(0,1 - 0,078) \cdot 64}{96,7215} = 1,46 \%$$

$$M_{\text{р-т}} = 95,1615 - 44 \cdot 0,078 + 0,078 \cdot 64 = 96,7215$$

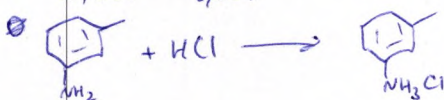
Состав р-та (2):
после реакт. NaHSO_3 (8,39%)
 SO_2 (1,46%)

Состав р-та (2):
до реакт. NaHCO_3 6,566 г

Задание 1 проект

О/п:

$$\nu_{\text{HCl}} - 0,04 \Rightarrow \nu_{\text{HCl}} \text{ ост} = 0 \Rightarrow \text{замест в } M_{\text{тг}} \text{ полож.}$$



$$\nu_{\text{HCl}} = 0,04 - 0,027 = 0,013 \text{ моль.} \Rightarrow \nu_{\text{гидроксила}} = 0,013 \text{ моль.} \Rightarrow m = 0,013 \cdot 107 = 1,391 \text{ г}$$

$$\omega_{\text{г.а}} = \frac{2,889}{2,889 + 1,391} = 67,5 \%$$

$$\omega_{\text{г.п.}} = \frac{1,391}{2,889 + 1,391} = 32,5 \%$$

Стр. _____

гидроксила
анилина

гидроксила
анилина