

На правах рукописи

Е. Агутина

Агутина Екатерина Юрьевна

**ОБРАЗОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ АГРЕГАТОВ, ИНДУЦИРУЕМОЕ
ПЕПТИДАМИ**

Специальность 03.01.04 Биохимия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва 2016

Работа выполнена в лаборатории структурной биохимии белка Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Гурвиц Берта Яковлевна

Официальные оппоненты: **Муронец Владимир Израилевич**
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В.
Ломоносова», Научно-исследовательский
институт физико-химической биологии им.
А.Н. Белозерского, отдел биохимии
животной клетки, заведующий отделом

Векшин Николай Лазаревич
доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биофизики
клетки Российской академии наук,
лаборатория внутриклеточной сигнализации,
ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«Российский университет дружбы народов»

Защита состоится «25» февраля 2016 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одним из фундаментальных направлений современной биологии и биотехнологии является исследование ассоциации и агрегации белков. В процессе фолдинга белки приобретают уникальную трехмерную структуру, определяющую их биологическую активность. В результате мутаций, посттрансляционных модификаций, окислительных повреждений, изменений условий окружающей среды (рН, УФ-облучения, температуры) происходит нарушение конформации молекулы белка, приводящее к его агрегации. В результате формируются различные структуры: растворимые олигомеры, аморфные агрегаты и амилоидоподобные фибриллы, вызывающие так называемые «конформационные болезни» [Dobson, 2004; Uversky, 2014].

Однако в последние несколько десятилетий были выявлены многочисленные непатогенные белки и пептиды, которые при определенных условиях образуют ассоциаты (от аморфных агрегатов до высокоструктурированных фибрилл), сходные по морфологическим свойствам с теми, которые выявляются при «конформационных болезнях». В настоящее время общепринятым считается представление о том, что формирование белками и пептидами фибриллоподобных структур является универсальным свойством полипептидных цепей [Stefani and Dobson, 2003; Dobson, 2004]. Кроме того, взгляды на агрегацию белков как на патологический процесс, являющийся первопричиной «конформационных болезней», в значительной степени подвергаются сомнениям. Далеко не всегда можно утверждать, что именно формирование амилоидоподобных агрегатов индуцирует развитие того, или иного заболевания. Накоплено большое число фактов, свидетельствующих о том, что белковые агрегаты могут быть функционально активными и выполнять определенную биологическую роль в живой системе. Такие структуры получили название «функциональные амилоиды» [Fowler et al., 2007; Reijns et al., 2008].

В этой связи весьма актуальным представляется поиск агентов, индуцирующих формирование определенных белковых агрегатов с заданными свойствами. В отличие от торможения агрегатообразования под действием молекулярных шаперонов, защитная функция которых по отношению к белкам, утратившим нативную конформацию, достаточно хорошо изучена, в настоящее время данные о функционировании низкомолекулярных биогенных соединений, которые способны предотвращать агрегацию белков, а также

участвовать в трансформации агрегатов, весьма ограничены. На роль таких соединений могут претендовать аминокислоты и пептиды в качестве инструмента для исследования способности биогенных агентов, естественно присутствующих биологическим системам, влиять на конформацию склонных к агрегации белков. При определенных условиях подобные эффекторы могут выступать в роли регуляторов процесса агрегатообразования.

Большое внимание уделяется шапероноподобному агенту аргинину, широко используемому в биотехнологии и медицине. Однако в большинстве случаев аргинин применяется в больших концентрациях, что не всегда приемлемо. Аргинин преимущественно взаимодействует с отрицательно заряженными и ароматическими аминокислотными остатками белков [Shah et al., 2012]. При разработке новых эффективных добавок, влияющих на агрегацию белков при более низких концентрациях, представляется целесообразным исследование действия аргинина, включенного в состав коротких пептидов, проявляющих способность вступать как в электростатические, так и гидрофобные взаимодействия с развернутыми белками. Аргинин в составе амфифильных пептидов может быть более эффективным защитным агентом, предотвращающим белковую агрегацию, по сравнению со свободным аргинином. При этом решающую роль играет суммарный заряд белка, компетентного к агрегации, который подвержен изменениям под воздействием pH среды. Влияние изменения pH среды на биологические процессы является одним из основных принципов регуляции в живых системах, поэтому исследования молекулярных механизмов агрегации белков с учетом изменения pH весьма актуальны.

Цели и задачи работы. Целью данной работы является изучение механизмов защитного действия на агрегацию модельных белков L-аргинина (Arg), L-лизина (Lys) и Arg- и Lys-содержащих пептидов и сравнительное исследование морфологических характеристик белковых агрегатов, сформированных под влиянием этих агентов. В соответствии с этой целью были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать кинетику индуцируемой дитиотреитолом (ДТТ) агрегации модельных белков: α -лактальбумина коровьего молока (pI 4.8), лизоцима куриного яйца (pI 11), дрожжевой алкогольдегидрогеназы (pI 5.4) и рекомбинантного инсулина человека (pI 5.4) под действием Arg и Arg-содержащих пептидов: Arg-Phe и пептидного фрагмента адренокортикотропного гормона (АСТН 1-24), содержащего 3 остатка Arg и 4 – Lys, в сравнении с отрицательно заряженным дипептидом Asp-Phe.

2. Изучить влияние рН среды на агрегацию модельных белков и выявить различия в действии эффекторов на агрегацию белков в узком диапазоне физиологических значений от рН 7.0 до рН 8.0.
3. Исследовать действие Arg в сравнении с Lys и гуанидин гидрохлоридом (GuHCl) для определения роли гуанидиновой группы Arg в его влиянии на агрегацию модельных белков.
4. Провести сравнение действия Lys и дипептида Lys-Leu, а также пептидов Arg-Phe и Asp-Phe на кинетику агрегации инсулина.
5. Выявить различия морфологических характеристик белковых агрегатов, сформированных в отсутствие или в присутствии Arg, Lys и исследуемых пептидов.

Научная новизна. Впервые показано, что действие пептидов Arg-Phe и АСТН (1-24) на агрегацию модельных белков проявляется при концентрациях, в 100–1000 раз меньших по сравнению с эффектами Arg, известного шапероноподобного агента. Эти результаты свидетельствуют о возможности преимущественного использования Arg-содержащих дипептидов, включающих гидрофобные аминокислотные остатки, в биотехнологии и медицине вместо Arg. Кроме того, в отличие от индивидуальной аминокислоты Lys, ускоряющей агрегацию модельного белка, включение Lys в состав дипептида Lys-Leu вызывает противоположный эффект – торможение процесса агрегации.

На примерах рекомбинантного инсулина человека и α -лактальбумина коровьего молока продемонстрирована возможность изменять действия на агрегацию белков Arg и пептидов Arg-Phe, Lys-Leu и АСТН (1-24) на противоположно направленные (торможение или ускорение агрегации) путем изменения рН среды в узком диапазоне физиологических значений от рН 7.0 до рН 8.0. На модельных белках впервые показаны также разнонаправленные эффекты Arg, зависящие от его концентрации – ускорение агрегации белков при низких (10–100 мМ) и торможение при высоких (более 300 мМ) концентрациях.

С помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) и трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) выявлены морфологические особенности структур агрегатов инсулина и α -лактальбумина, образующихся на начальных этапах процесса агрегации под действием Arg, Lys, Arg-Phe или АСТН (1-24). Показано, что в присутствии пептидов формируются гранулярные частицы, соединяющиеся в длинные цепи или фибриллоподобные волокна, в отличие от аморфных частиц, наблюдаемых в отсутствие эффекторов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследования механизмов взаимодействия аминокислот и пептидов с модельными белковыми субстратами, склонными к агрегации, могут способствовать расширению представлений о фундаментальных аспектах конформационной лабильности белков и процессах самоассоциации и агрегации белков *in vivo*.

Результаты данной работы могут быть использованы при разработке новых эффективных добавок в биотехнологии при получении рекомбинантных белков, а также при создании белковых препаратов медицинского назначения. При рассмотрении защитного действия пептидов на агрегацию модельных белков выявлена возможность преимущественного использования Arg- и Lys-содержащих амфифильных дипептидов вместо Arg, поскольку для снижения начальной скорости процесса агрегации в два раза требуются концентрации пептидов, в 100–1000 раз меньшие, по сравнению с Arg. Кроме того, в работе показано, что эффекты Arg и исследуемых пептидов изменяются на противоположные при изменении pH среды в узком диапазоне физиологических значений от pH 7.0 до pH 8.0, что свидетельствует о возможности тонкой регуляции процесса агрегации белков.

Методы диссертационного исследования. В работе применялся широкий набор современных методов: динамического светорассеяния (ДЛС), спектроскопии кругового дихроизма (КД), флуориметрии с использованием флуоресцентных меток – тиофлавина Т (ThT) и 4,4'-дианилин-1,1'-динафталин-5,5'-дисульфоновой кислоты (bis-ANS), ТЭМ, АСМ и др.

Положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Arg- и Lys-содержащие амфифильные дипептиды способны подавлять агрегацию модельных белков. Для снижения начальной скорости процесса агрегации модельных белков в два раза требуются концентрации пептидов, в 100–1000 раз меньшие, по сравнению с аминокислотой Arg, что свидетельствует о возможности их преимущественного использования в биотехнологии и медицине.
2. Действия Arg и Arg-содержащих пептидов изменяются на противоположно направленные (торможение или ускорение агрегации) путем изменения pH среды в узком диапазоне физиологических значений от pH 7.0 до pH 8.0 и концентрации эффекторов.
3. Под действием Arg и Arg-содержащих пептидов изменяются морфологические характеристики белковых агрегатов, сформированных на начальных этапах процесса агрегации.

4. В торможении агрегации белков под действием Arg существенную роль играет гуанидиновая группа Arg.
5. В отличие от свободной аминокислоты Lys, ускоряющей агрегацию модельного белка, включение Lys в состав дипептида Lys-Leu вызывает противоположный эффект – торможение процесса агрегации при pH 7.0.
6. Действия дипептидов Arg-Phe и Asp-Phe на агрегацию модельных белков зависят от их заряда. Демонстрируется ускорение агрегации противоположно заряженных, но торможение агрегации одноименно заряженных белков.

Апробация работы. По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей в зарубежных журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК РФ, и 9 тезисов в материалах конференций.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 283 ссылки. Работа изложена на 145 листах печатного текста, содержит 62 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. В обзоре литературы описаны процессы белковой агрегации и механизмы клетки, входящие в систему контроля качества белков, в которой основную роль играют молекулярные и химические шапероны. Особое внимание уделено действию Arg и пептидных фрагментов белков на агрегацию, а также использованию синтетических пептидов в биотехнологии и медицине.

Материалы и методы. В работе использовали α -лактальбумин коровьего молока, дрожжевую алкогольдегидрогеназу, рекомбинантный инсулин человека, L-аргинин моногидрохлорид, L-лизин моногидрохлорид, пептиды Arg-Phe, Asp-Phe, Lys-Leu и АСТН (1-24) фирмы Sigma (США); лизоцим куриного яйца фирмы ApplyChem (США).

Методом ДЛС проводили исследования кинетики агрегации белков на установке Photocor Complex (Photocor Instruments Inc., США) с He-Ne лазером (Coherent, США, Model 31-2082, 632,8 нм, 10 мВ) в качестве источника света. Расчет размеров гидродинамического радиуса (R_h) проводили при помощи программы DynaLS (Alango, Израиль).

Флуоресценцию ThT и bis-ANS регистрировали на флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse (Varian, США).

Электронные микрофотографии получали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEOL JEM-100CX (Япония) при 80 кВ и номинальном увеличении 33000. Микроскопию и обработку электронных микрофотографий проводили в сотрудничестве с к.б.н. В.А. Штейн-Марголиной. АСМ проводили на сканирующем зондовом микроскопе SmartSPM фирмы ООО «АИСТ-НТ». Микроскопию и обработку микрофотографий проводили в сотрудничестве с к.б.н. И.В. Сафенковой.

Спектры КД в дальней ультрафиолетовой области регистрировали в интервале 190–260 нм на приборе Chirascan Circular Dichroism Spectrometer (Applied Photophysics, Великобритания). Работа проводилась совместно с к.б.н. В.В. Шубиным.

Эксперименты проводили, главным образом, в 25 мМ Na-фосфатном буфере, рН 7.0 или 8.0, в присутствии 150 мМ NaCl и 10 мМ ДТТ при 37 °С. В некоторых экспериментах изменяли рН буфера, концентрацию NaCl или ДТТ. В экспериментах с α -лактальбумином в среду добавляли 1 мМ ЭГТА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Действие аргинина на кинетику агрегации модельных белков

Методом ДЛС с использованием α -лактальбумина в качестве модельного белка было показано, что Arg в концентрациях 10–100 мМ вызывал ускорение агрегации (Рис. 1, А). Максимальный эффект наблюдали в присутствии 100 мМ Arg (Рис. 1, Б). При концентрациях, превышающих 200 мМ, Arg ингибировал агрегацию. Полное торможение процесса наблюдали в присутствии 1 М Arg. Интересно отметить, что Arg в концентрации 200 мМ играет одновременно роли активатора и супрессора белковой агрегации. В роли активатора Arg снижал лаг-период агрегации, а в роли супрессора – уменьшал интенсивность светорассеяния и размеры гидродинамических радиусов. Аналогичные эффекты, зависящие от концентрации Arg, были получены с использованием других модельных белков – инсулина и алкогольдегидрогеназы (результаты не показаны).

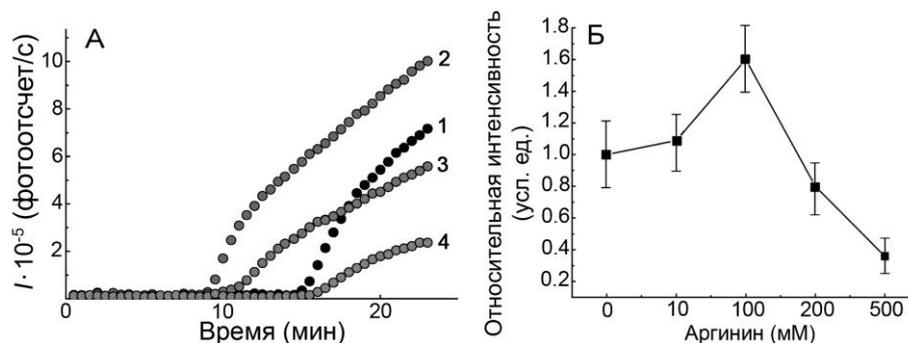


Рис. 1. Действие Arg на кинетику агрегации α -лактальбумина. (А) Зависимости интенсивности светорассеяния (I) от времени инкубации α -лактальбумина (2 мг/мл) в отсутствие (1) или присутствии Arg в концентрациях 100, 200 и 500 мМ (2, 3 и 4 соответственно) в 25 мМ фосфатном буфере, рН 7.0, содержащем 150 мМ NaCl и 10 мМ ДТТ и 1 мМ ЭГТА, при 37 °С. (Б) Зависимость относительной интенсивности светорассеяния агрегатов α -лактальбумина, образованных при инкубации белка в течение 20 мин, от концентрации Arg. Интенсивность светорассеяния в отсутствие Arg принята за 1.

При условиях, когда в отсутствие Arg агрегация субстрата не проявлялась в течение длительного времени, добавление 100 мМ Arg в инкубационную смесь через некоторое время после начала инкубации вызывало индукцию процесса агрегатообразования (Рис. 2).

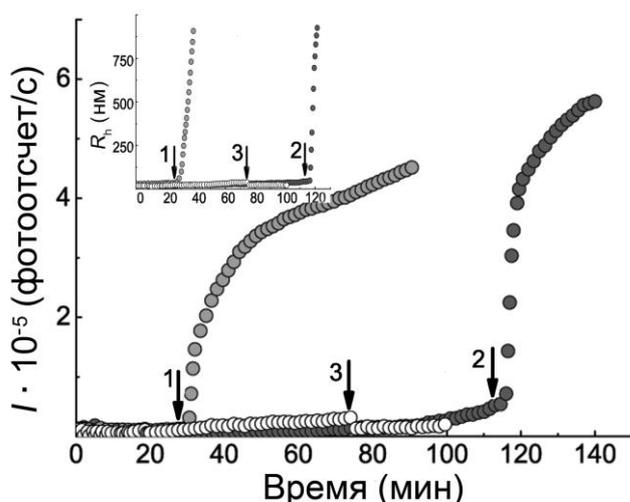


Рис. 2. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) и значений гидродинамического радиуса (R_h) (вставка) от времени инкубации α -лактальбумина в отсутствие Arg, или при добавлении Arg в конечной концентрации 100 мМ после инкубации белка в присутствии ДТТ в течение 25 или 115 мин (показано стрелками 1 и 2 соответственно). В качестве контроля вместо Arg добавляли буфер (показано стрелкой 3).

Однако Arg подавлял агрегацию щелочного белка лизоцима концентрационно-зависимым способом (Рис. 3), что свидетельствует о решающей роли суммарного заряда модельного субстрата в процессе агрегации.

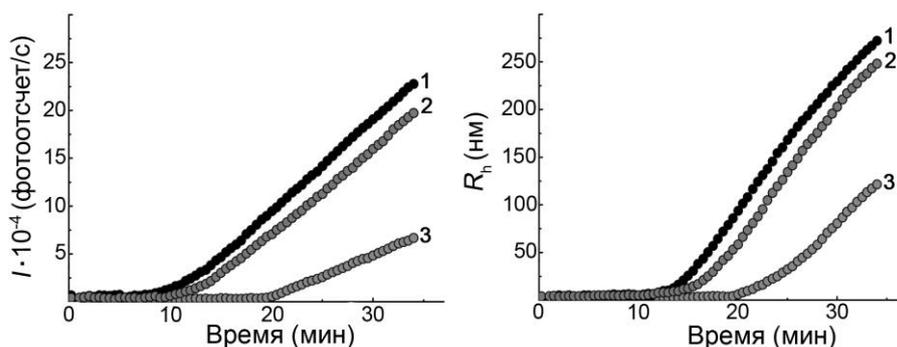


Рис. 3. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) и значений гидродинамического радиуса (R_h) от времени инкубации лизоцима (0,2 мг/мл) в отсутствие (1) или присутствии Arg в концентрациях 10 и 100 мМ (2 и 3 соответственно).

Влияние pH на кинетику агрегации модельных белков

Было обнаружено, что изменения pH среды в диапазоне физиологических значений влияют на способность Arg подавлять агрегацию белков. Пример изменения интенсивности светорассеяния и значений гидродинамического радиуса (R_h) агрегатов инсулина при титровании раствора в области pH 7.0–8.0 в отсутствие или в присутствии Arg продемонстрирован на рисунке 4.

В условиях данного эксперимента при pH 7.0 Arg подавлял, а при pH 8.0 – ускорял агрегацию инсулина, в то время как при промежуточном значении pH 7.5 действие Arg на агрегацию белка не проявлялось (Рис. 4, А-В). Более наглядно данные эффекты Arg можно продемонстрировать по изменению относительной интенсивности светорассеяния агрегатов инсулина при титровании инкубационной смеси в области pH 7.0–8.0 (Рис. 4, Г). Интересно, что при pH в диапазоне 7.3–7.5 значения относительной интенсивности светорассеяния в отсутствие и в присутствии Arg были идентичными, однако, повышались в 2 раза в присутствии Arg при увеличении pH от 7.7 до 8.0. Аналогичные результаты получены при использовании в качестве модельного белка α -лактальбумина. Таким образом, показано, что при изменении pH среды в узком диапазоне значений от 7.0 до 8.0 действие Arg на агрегацию белков изменяется на противоположно направленное: вместо торможения наблюдается ускорение агрегации.

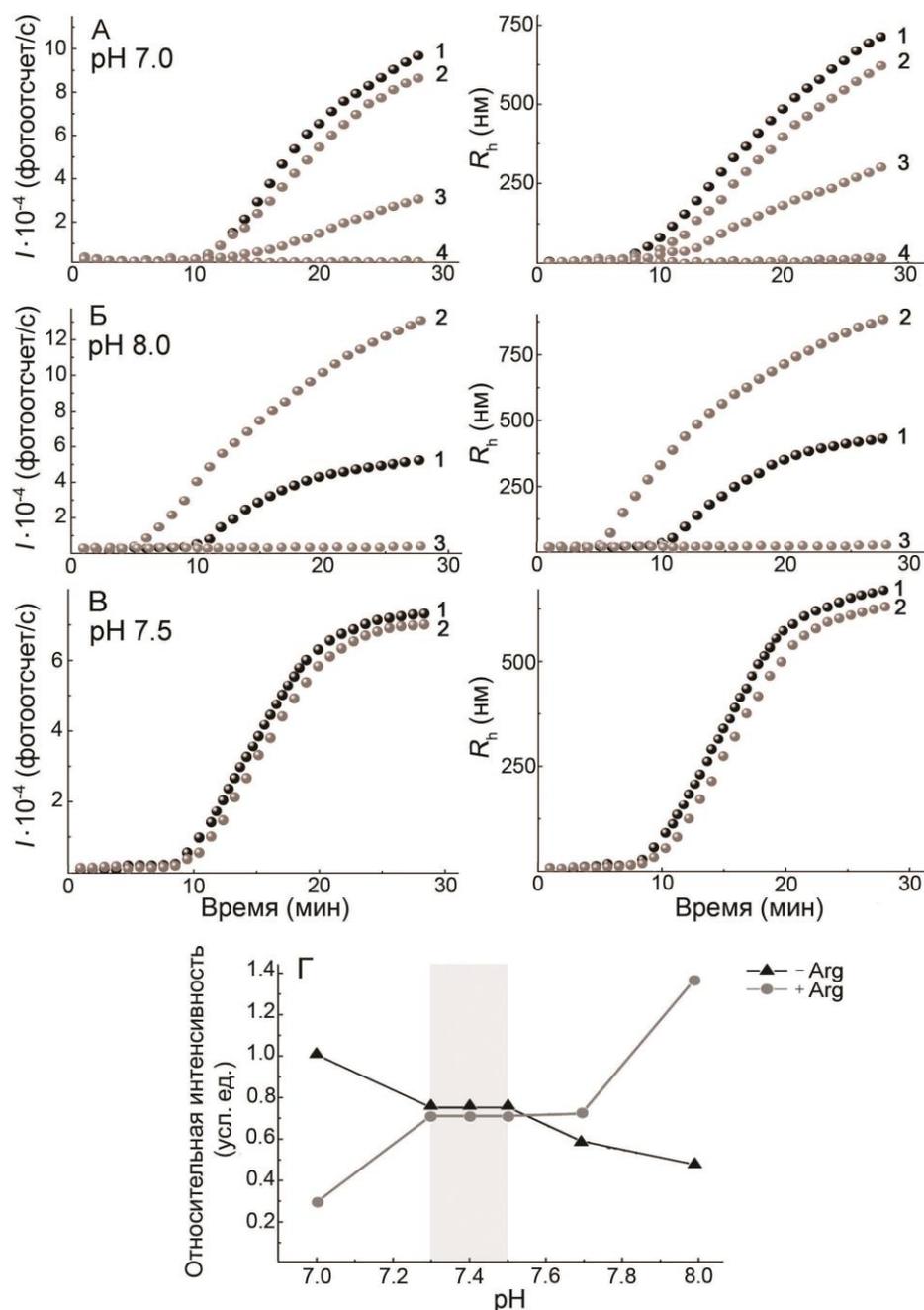


Рис. 4. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) и значений гидродинамического радиуса (R_h) от времени инкубации инсулина (0,2 мг/мл) (А) в отсутствие (1) или в присутствии Arg в концентрациях 10, 100 и 500 мМ (2, 3 и 4 соответственно) при pH 7.0; (Б) в отсутствие (1) или в присутствии Arg в концентрациях 100 и 500 мМ (2 и 3 соответственно) при pH 8.0; (В) в отсутствие (1) или в присутствии 100 мМ Arg (2) при pH 7.5. (Г) Относительная интенсивность светорассеяния агрегатов инсулина, образованных при инкубации белка в течение 30 мин, при титровании инкубационной смеси в области pH 7.0–8.0 в отсутствие или присутствии 100 мМ Arg. Интенсивность светорассеяния агрегатов инсулина в отсутствие Arg при pH 7.0 принята за 1.

Исследование роли гуанидиновой группы аргинина в его действии на агрегацию белков

Была исследована кинетика агрегации некоторых модельных белков в отсутствие или присутствии другой положительно заряженной аминокислоты

– Lys, не содержащей гуанидиновой группы, в отличие от Arg. С использованием инсулина в качестве модельного субстрата было показано, что при добавлении Lys интенсивность светорассеяния и размеры агрегатов значительно увеличиваются концентрационно-зависимым способом как при pH 7.0, так и при pH 8.0 (Рис. 5).

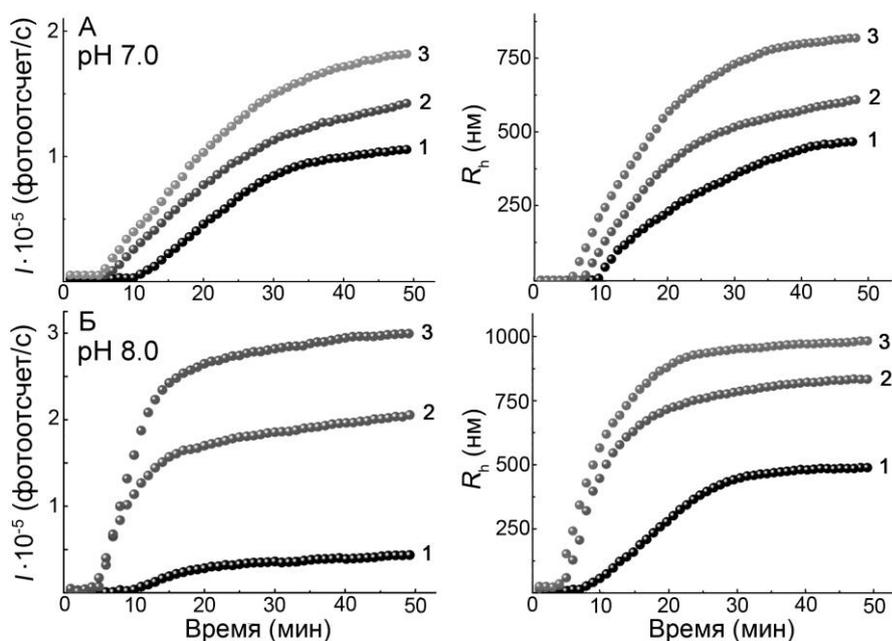


Рис. 5. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) и значений гидродинамического радиуса (R_h) от времени инкубации инсулина (0,2 мг/мл) при pH 7.0 (А) и 8.0 (Б) в отсутствие (1) или присутствии Lys в концентрациях 100 и 500 мМ (2 и 3 соответственно).

В противоположность действию Arg, подавления агрегации инсулина не наблюдалось, даже при высокой концентрации Lys (500 мМ), однако, стимулирующий эффект Lys был гораздо более сильный при pH 8.0, чем при pH 7.0. Аналогичный результат был получен при использовании другого модельного белка α -лактальбумина. Концентрационно-зависимое ускорение агрегации белков в присутствии Lys показывает, что наличие гуанидиновой группы в молекуле аминокислоты не является обязательным условием для проявления стимулирующих эффектов на агрегацию белка. Было показано также, что GuHCl при концентрации 100 мМ вызывает значительное увеличение скорости агрегации α -лактальбумина и уменьшение лаг-периода, а при концентрации 500 мМ – ингибирует процесс агрегации (Рис. 6).

При исследовании действия GuHCl на кинетику агрегации инсулина показано, что GuHCl ингибирует или ускоряет процесс при pH 7.0 или pH 8.0 соответственно (Рис. 7, А и Б). Противоположно направленные эффекты

GuHCl аналогичны действию Arg, что может свидетельствовать об участии основной гуанидиновой группы Arg в рассматриваемых процессах.

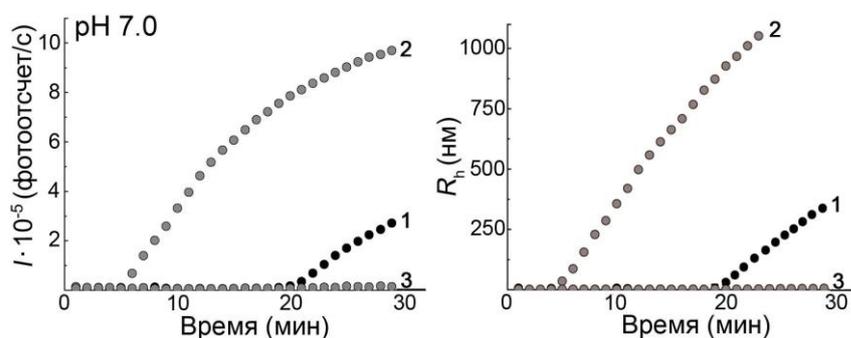


Рис. 6. Зависимости интенсивности светорассеяния и значений гидродинамического радиуса (R_h) от времени инкубации α -лактальбумина (1 мг/мл) при pH 7.0 в отсутствие (1) или присутствии GuHCl в концентрациях 100 и 500 мМ (2 и 3 соответственно).

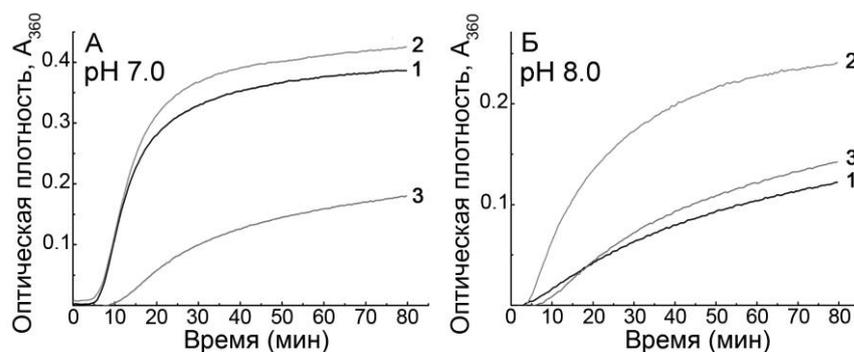


Рис. 7. Противоположно направленное действие GuHCl на кинетику агрегации инсулина (0,25 мг/мл) при pH 7.0 (А) и 8.0 (Б), выявленное методом турбидиметрии. Кинетика агрегации инсулина в отсутствие (1) или в присутствии GuHCl в концентрациях 100 и 300 мМ (2 и 3 соответственно).

Исследование агрегации инсулина под действием аргинина с использованием флуоресцентных меток

Флуоресцентный зонд ThT обычно используется для идентификации амилоидоподобных структур. Локализация ThT между β -складками приводит к повышению квантового выхода флуоресценции вследствие возникновения резонанса между двумя частями сложной ароматической структуры молекулы ThT, в которой одна часть способна вращаться относительно другой.

Измерения флуоресценции агрегатов, образуемых в процессе инкубации инсулина в присутствии 50 мкМ ThT, показали полное торможение флуоресценции при 485 нм после добавления 500 мМ Arg при pH 7.0 (Рис. 8, А). При pH 8.0 добавление 100 мМ Arg приводило к значительному росту флуоресценции ThT по сравнению с контролем (Рис. 8, Б).

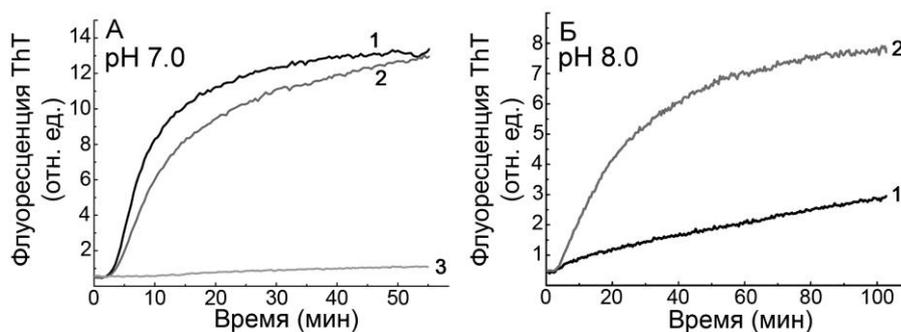


Рис. 8. Флуоресценция ThT, измеренная при агрегации инсулина (0,2 мг/мл) в отсутствие (1) или в присутствии Arg в концентрациях 50 и 500 мМ (2 и 3 соответственно) при pH 7.0 (А), или в отсутствие (1) или присутствии 100 мМ Arg (2) при pH 8.0 (Б).

Результаты показывают, что на начальном этапе инкубации инсулина в присутствии Arg уровень интенсивности флуоресценции ThT небольшой. В условиях данного эксперимента формирование амилоидоподобных структур маловероятно. Можно предположить образование ранних форм белковых агрегатов, возможно, в виде протофибрилл.

Были проведены также эксперименты с использованием другой флуоресцентной метки – bis-ANS, интенсивность флуоресценции которой резко возрастает при попадании зонда в «гидрофобные карманы», образующиеся при агрегации белка. На рисунке 9 показано, что при pH 7.0 в присутствии Arg интенсивность флуоресценции снижается концентрационно-зависимым способом, в то время как добавление Arg при pH 8.0 приводит к значительному росту интенсивности флуоресценции.

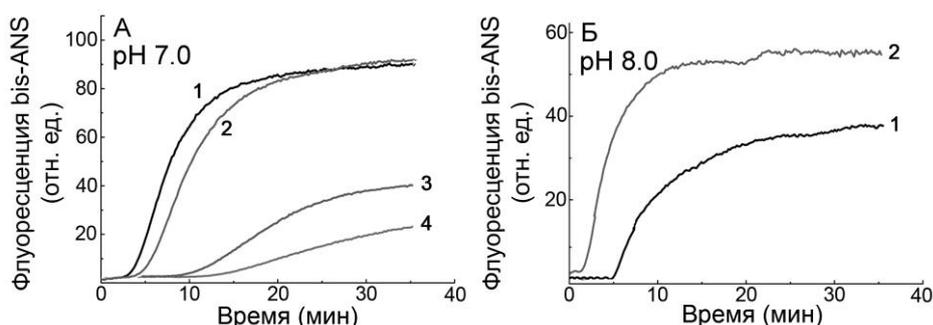


Рис. 9. Флуоресценция bis-ANS, измеренная при агрегации инсулина (0,2 мг/мл) в отсутствие (1) или в присутствии Arg в концентрациях 50, 300 и 500 мМ (2, 3 и 4 соответственно) при pH 7.0 (А), или в отсутствие (1) или в присутствии 100 мМ Arg (2) при pH 8.0 (Б).

Эти результаты могут служить дополнительным подтверждением способности Arg индуцировать изменения физико-химических свойств и конформационного состояния инсулина при pH 8.0, в результате чего гидрофобные связывающие сайты интермедиатов белковой молекулы

взаимодействуют с bis-ANS. Изменения гидрофобности инсулина могут приводить к активации образования и роста агрегатов.

Исследование морфологических свойств агрегатов инсулина и α -лактальбумина в присутствии аргинина или лизина

Анализ АСМ-изображений показал, что на начальных этапах процесса агрегации в отсутствие Arg при pH 8.0 инсулин образует аморфные частицы размером от 20 до 50 нм (Рис. 10, А). В присутствии Arg продемонстрировано образование дисперсных асимметричных гранул с кажущимся диаметром до 10 нм (Рис. 10, Б и В), некоторые из них ассоциированы в кластеры или цепи длиной до 200 нм (Рис. 10, Б). Возможно, короткие цепи могут связываться друг с другом «голова-к-хвосту» с образованием агрегатов, напоминающих фрагменты «ожерелья», состоящих из бусин нерегулярной формы.

Гетерогенность белковых частиц, образуемых в процессе агрегации инсулина в присутствии Arg, была выявлена также с помощью ТЭМ. Представленные электронные микрофотографии частиц инсулина демонстрируют цепи длиной до 300 нм (Рис. 10, Г-Е).

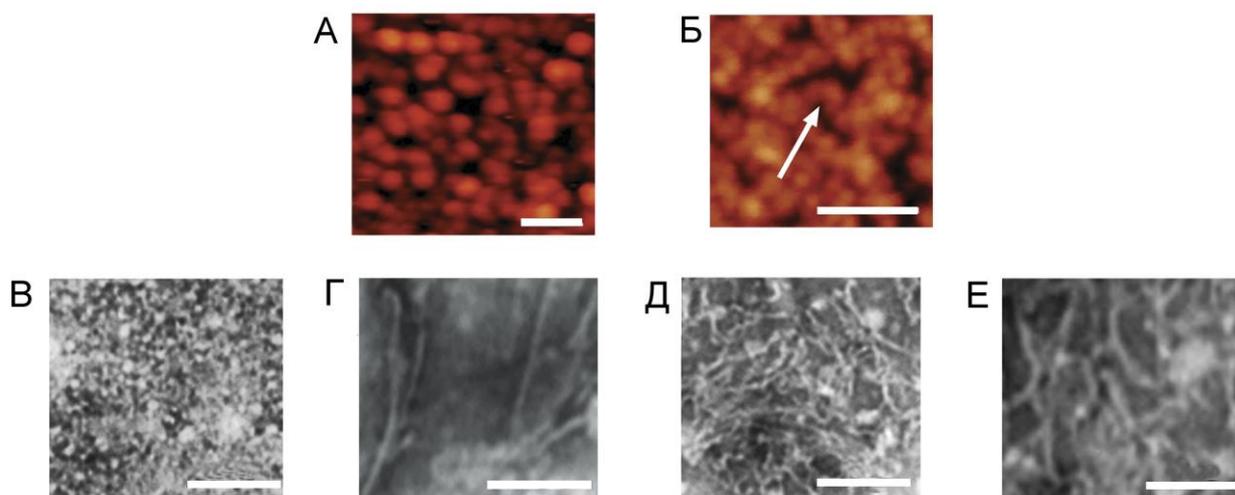


Рис. 10. АСМ-изображения (А, Б) и электронные микрофотографии (В-Е) агрегатов, образующихся на начальных стадиях инкубации инсулина при pH 8.0 в отсутствие (А) или в присутствии 100 мМ Arg (Б-Е). На Б стрелкой показана цепь, состоящая из гранул. Масштаб – 100 нм (А-Д) и 50 нм (Е).

Анализ АСМ-изображений структур агрегатов α -лактальбумина, образуемых в присутствии Arg, выявил формирование дисперсных асимметричных гранулярных частиц диаметром около 10 нм, соединяющихся в цепи длиной 50–200 нм (Рис. 11, А). Такие структуры аналогичны агрегатам, полученным при инкубации инсулина с Arg (Рис. 10, Б).

Изображение агрегатов α -лактальбумина в присутствии 100 мМ Lys при аналогичных условиях были получены с использованием ТЭМ (Рис. 11, Б). Анализ электронных микрофотографий показал формирование длинных цепей размером до 500 нм, образованных преимущественно из частиц размером около 5 нм.

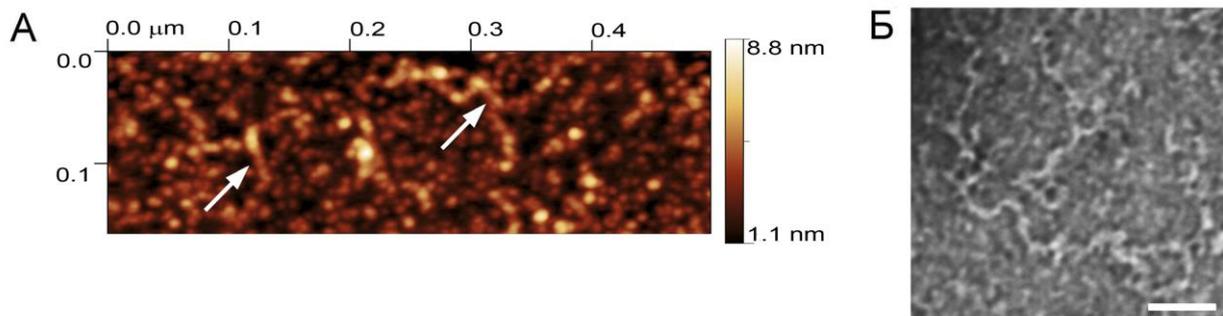


Рис. 11. АСМ-изображение агрегатов α -лактальбумина при pH 7.0 в присутствии 100 мМ Arg (А) и электронная микрофотография агрегатов, образованных в присутствии 100 мМ Lys (Б), масштаб – 70 нм.

Действие Arg-содержащих пептидов на кинетику агрегации инсулина

Были выбраны Arg-содержащие пептиды, Arg-Phe и фрагмент аденокортикотропного гормона, АСТН (1-24), для сравнения с действиями Arg и амфифильных пептидов Lys-Leu и Asp-Phe на кинетику агрегации инсулина. Структурные формулы пептидов и аминокислотная последовательность АСТН (1-24) показаны на рисунке 12.

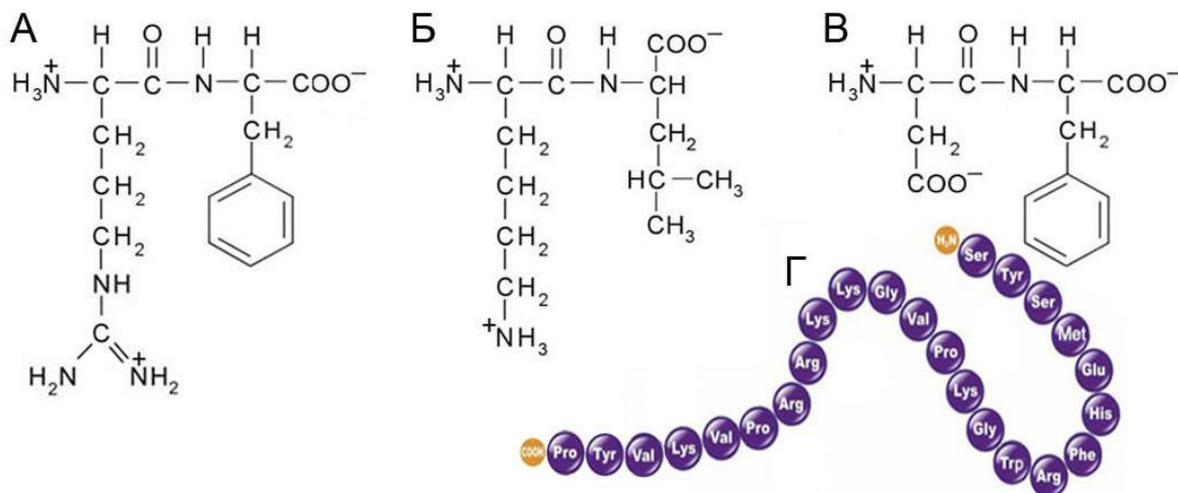


Рис. 12. Структурные формулы дипептидов Arg-Phe (А), Lys-Leu (Б) и Asp-Phe (В) и аминокислотная последовательность АСТН (1-24) (Г).

Представленные кинетические кривые демонстрируют способность пептидов Arg-Phe и АСТН (1-24) подавлять агрегацию инсулина при pH 7.0 концентрационно-зависимым способом, но ускорять процесс агрегации при pH 8.0 (Рис. 13). Результаты показывают сходные pH-зависимые эффекты

свободного Arg и пептидов Arg-Phe и АСТН (1-24) по отношению к агрегации инсулина, проявляемые, однако, при различных концентрациях эффекторов.

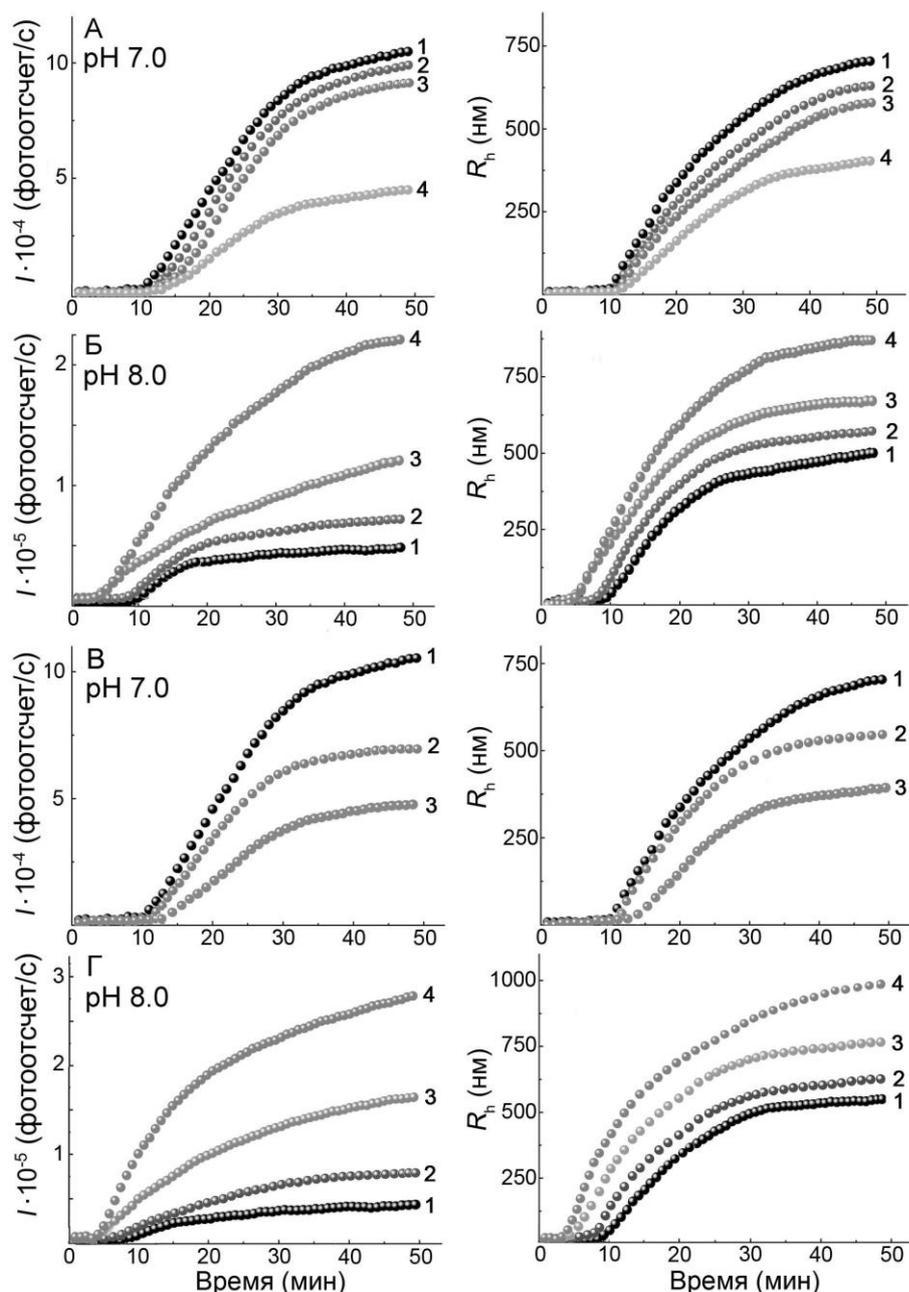


Рис. 13. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) и значений гидродинамического радиуса (R_h) от времени инкубации инсулина (0,2 мг/мл) в отсутствие (1) или в присутствии Arg-Phe в концентрациях 0,5, 3 и 15 мМ (2, 3 и 4 соответственно) при pH 7.0 (А); в отсутствие (1) или присутствии Arg-Phe в концентрациях 0,5, 1 и 2 мМ (2, 3 и 4 соответственно) при pH 8.0 (Б); в отсутствие (1) или в присутствии 5 и 70 мкМ АСТН (1-24) (2 и 3 соответственно) при pH 7.0 (В); в отсутствие (1) или присутствии АСТН (1-24) в концентрациях 5, 30 и 70 мкМ (2, 3 и 4 соответственно) при pH 8.0 (Г).

Можно полагать, что в самой структуре Arg заложена тенденция к проявлению разнонаправленного (подавляющего или ускоряющего) действия на агрегацию белков. Поскольку Arg преимущественно взаимодействует с

отрицательно заряженными и ароматическими аминокислотными остатками белков [Shah et al., 2012], ускорение агрегации может происходить в результате экранирования отрицательных зарядов белка и торможения их взаимного отталкивания, а подавление агрегации может быть следствием связывания Arg с ароматическими сайтами белка, которые становятся недоступными для самоассоциации развернутых белков. Arg в составе амфифильных пептидов, содержащих гидрофобные аминокислотные остатки, является более эффективным защитным агентом, предотвращающим белковую агрегацию при концентрациях пептидов, значительно меньших по сравнению со свободным Arg. Компромисс между электростатическими и гидрофобными взаимодействиями Arg-содержащих пептидов с белками может определять проявление разнонаправленных эффектов на процессы агрегации.

Для сравнения эффектов Arg и Arg-Phe была исследована также кинетика агрегации инсулина после добавления в инкубационную смесь Arg, или Arg-Phe, или буфера (для контрольных проб) по истечении 15 мин после начала инкубации. Показано, что 1 мМ Arg-Phe вызывает увеличение интенсивности светорассеяния и размеров агрегатов в большей степени, чем 100 мМ Arg. Однако после внесения в инкубационную смесь буфера процесс агрегации заметно тормозился (Рис. 14).

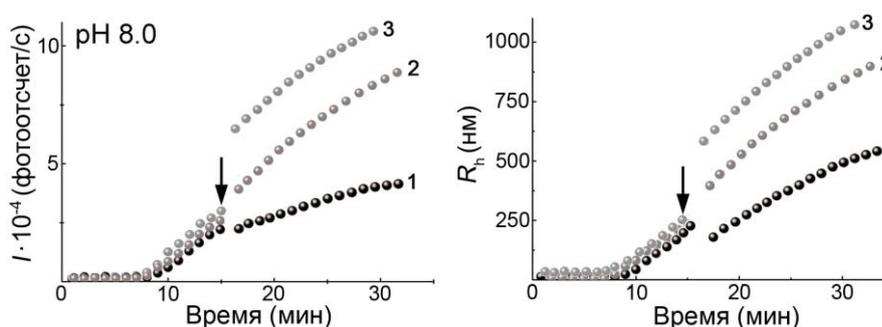


Рис. 14. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) и размеров гидродинамического радиуса (R_h) от времени инкубации инсулина (0,15 мг/мл) при pH 8.0 после добавления в среду буфера, или 100 мМ Arg, или 1 мМ Arg-Phe, кривые 1, 2 и 3 соответственно (показано стрелкой).

Было исследовано действие еще одного амфифильного пептида, Lys-Leu, на агрегацию инсулина. При pH 7.0 наблюдали торможение, а при pH 8.0 – ускорение процесса агрегации (Рис. 15). Интересно отметить, что эти результаты отличаются от тех, которые были получены при исследовании влияния свободного Lys на агрегацию инсулина. Было показано, что Lys ускоряет агрегацию, независимо от значений pH (Рис. 5), однако, в результате включения Lys в состав дипептида Lys-Leu его действие на агрегацию белка в

значительной степени изменяется. Присутствие в составе пептида гидрофобного аминокислотного остатка лейцина приводит к подавлению агрегации инсулина при pH 7.0. Влияние pH на агрегацию под действием Lys-Leu аналогично действию Arg и Arg-содержащих пептидов.

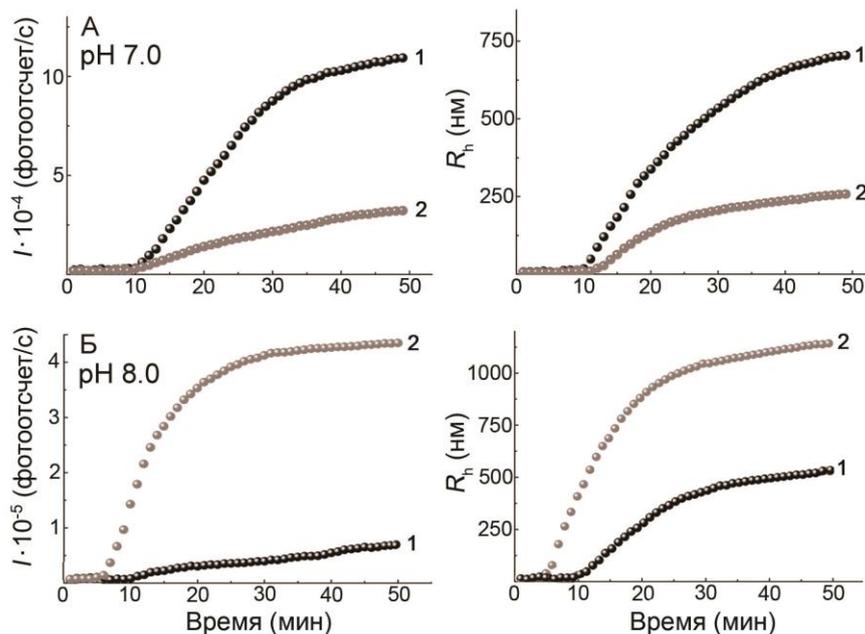


Рис. 15. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) и значений гидродинамического радиуса (R_h) от времени инкубации инсулина (0,2 мг/мл) в отсутствие (1) или в присутствии (2) 10 мМ Lys-Leu при pH 7.0 (А); в отсутствие (1) или в присутствии (2) 2 мМ Lys-Leu при pH 8.0 (Б).

При исследовании действия отрицательно заряженного пептида Asp-Phe на агрегацию одноименно заряженного модельного белка инсулина при pH 7.0 выявлено торможение процесса агрегации. Характерный пример действия Asp-Phe на кинетику агрегации инсулина приведен на рисунке 16. Однако эффекты Asp-Phe на щелочной белок лизоцим оказались аналогичными действию Arg-Phe на отрицательно заряженные белки. При этом можно было наблюдать ускорение агрегации лизоцима под действием Asp-Phe в концентрации 1 мМ (результаты не показаны).

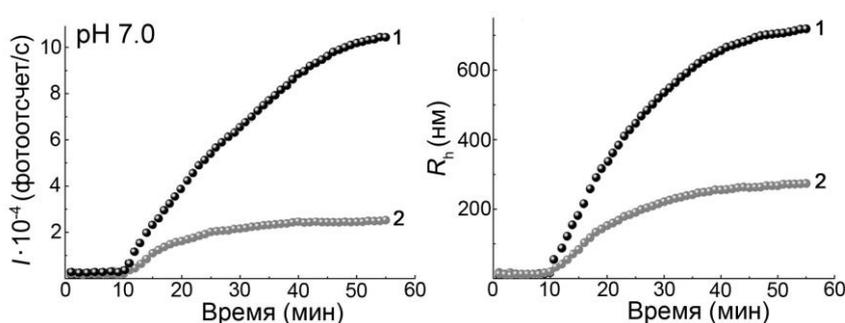


Рис. 16. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) и значений гидродинамического радиуса (R_h) от времени инкубации инсулина (0,2 мг/мл) при pH 7.0 в отсутствие (1) или присутствии 4 мМ Asp-Phe (2).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что амфифильные пептиды могут в значительной мере влиять на процессы

агрегации белков, подобно действию свободного Arg, но при значительно меньших концентрациях.

Изучение состояния вторичной структуры инсулина в присутствии Arg-Phe или аргинина

С помощью спектроскопии КД было исследовано действие пептида Arg-Phe и свободного Arg на вторичную структуру инсулина (Рис. 17, А). Для инсулина в отсутствие или в присутствии Arg-Phe характерна α -спиральная структура. При инкубации инсулина с ДТТ преобладает неупорядоченная структура, что наблюдается в отсутствие и в присутствии Arg-Phe (Рис. 17, Б). Таким образом, показано, что добавление Arg-Phe не приводит к трансформации вторичной структуры инсулина, ни в «нативном», ни в дестабилизированном с помощью ДТТ состоянии.

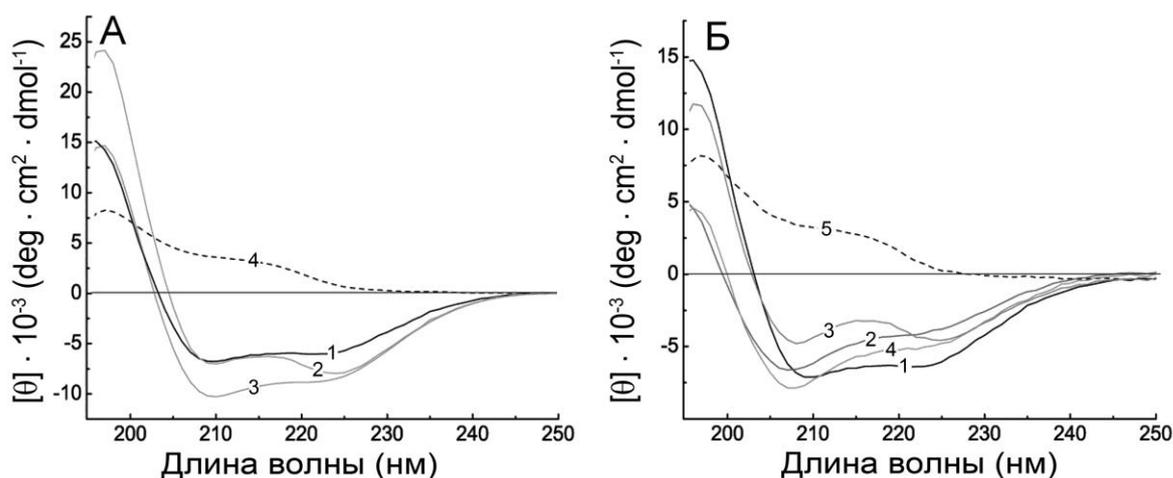


Рис. 17. Исследование действия Arg-Phe на вторичную структуру инсулина с помощью КД в дальнем УФ (190-260 нм). (А) Спектр инсулина (0,5 мг/мл) при pH 8.0 в отсутствие (1), или в присутствии 1 mM Arg-Phe (2); спектр, полученный в результате вычитания спектра Arg-Phe (4) из спектра смеси инсулина и Arg-Phe (3); (Б) Спектр инсулина (0,5 мг/мл) в отсутствие (1), или в присутствии 5 mM ДТТ (2), или в присутствии 5 mM ДТТ и 1 mM Arg-Phe (3); спектр, полученный в результате вычитания спектра Arg-Phe (5) из спектра смеси инсулина, 5 mM ДТТ и 1 mM Arg-Phe (4).

Аналогичный результат получен при исследовании действия свободного Arg на вторичную структуру инсулина (Рис. 18). Хотя имеются данные, касающиеся дестабилизирующего действия Arg на конформационную стабильность белков [Xie et al., 2004; Thakkar et al., 2012], результаты данных экспериментов с использованием КД спектрометрии показывают, что при действии Arg не происходят изменения вторичной структуры белка.

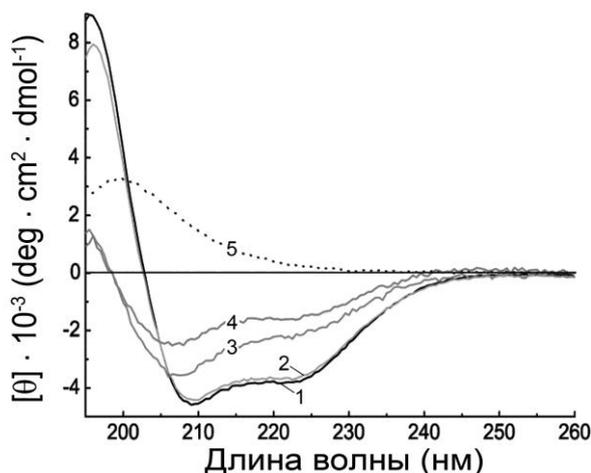


Рис. 18. Действие Arg на вторичную структуру инсулина при pH 8.0. КД-спектр инсулина (0,5 мг/мл) в отсутствии (1), или в присутствии 30 mM Arg (2) или 5 mM ДТТ (3), или с 30 mM Arg и 5 mM ДТТ (4). Спектры 2 и 4 получены в результате вычитания спектра Arg (5) из спектра смеси инсулина и Arg в отсутствие или присутствии ДТТ соответственно.

Исследование морфологических свойств агрегатов инсулина в присутствии Arg-Phe или АСТН (1-24)

С помощью ТЭМ были получены изображения агрегатов инсулина, образующихся в присутствии Arg-Phe. Выявлено образование частиц диаметром около 5 нм, которые соединяются в агрегаты размером до 50 нм (Рис. 19, А), а также волокон длиной около 300 нм (Рис. 19, Б, показано стрелкой).

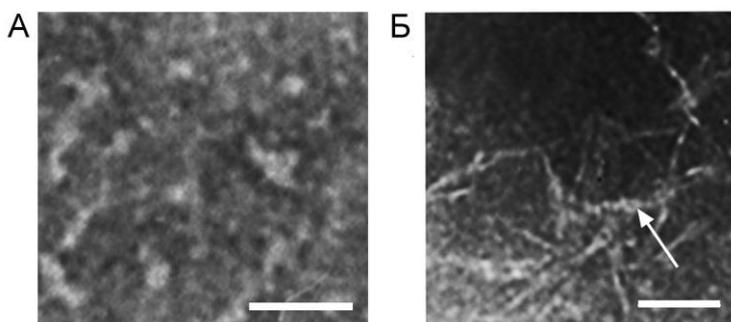


Рис. 19. Электронные микрофотографии агрегатов, полученных при инкубации инсулина (0,2 мг/мл) в присутствии 2 mM Arg-Phe при pH 8.0. Масштаб –50 нм. Стрелкой показаны длинные цепи, состоящие из нескольких рядов агрегатов.

Были также получены АСМ-изображения агрегатов инсулина, образованных под действием АСТН (1-24) (Рис. 20, А). Показано, что в присутствии АСТН (1-24) инсулин образует агрегаты большего размера, чем в присутствии Arg (Рис. 10) или Arg-Phe (Рис. 19). На электронной микрофотографии выявлены агрегаты, достигающие 50 нм в диаметре (Рис. 20, Г). Эти частицы соединяются в разветвленные цепи, которые образуют переплетенные «сетчатые структуры», подобные структурам, показанным на АСМ-изображениях (Рис. 20, В).

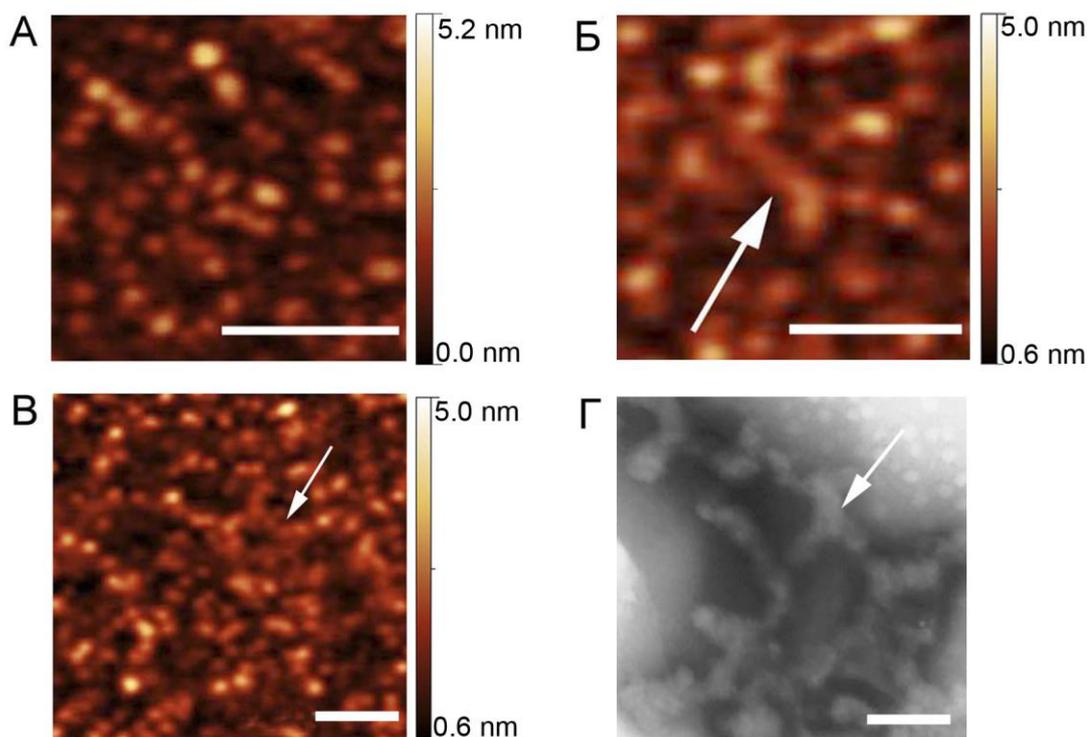


Рис. 20. АСМ-изображения (А, Б, В) и электронная микрофотография (Г) агрегатов инсулина (0,2 мг/мл), инкубированного в присутствии 35 мкМ АСТН (1-24) при рН 8.0. Стрелкой на Б показано формирование цепи, на В и Г – разветвленных «сетчатых» структур. Масштаб – 100 нм.

При сравнении изображений, полученных с помощью АСМ или ТЭМ, обнаруживаются различные морфологические свойства белковых агрегатов в зависимости от типа эффектора, присутствующего в инкубационной среде. Под действием дипептида Arg-Phe образуются гранулярные частицы, соединяющиеся в длинные цепи, которые могут быть составлены из нескольких тонких цепочек. В присутствии АСТН (1-24) преобладают более крупные частицы (диаметром до 50 нм), которые собираются в разветвленные «сетчатые структуры». При этом следует учесть, что АСТН (1-24) по молекулярной массе сопоставим с В-цепью инсулина и что его содержание в инкубационной смеси преимущественно соответствовало молярному соотношению 1:1. Полученные результаты свидетельствуют о том, что на морфологию и размеры агрегатов белка можно влиять, подбирая структуру и концентрацию эффектора.

Гипотетическая модель агрегации перорального инсулина

В данной работе большая часть экспериментов не случайно была проведена на терапевтически значимом препарате – рекомбинантном инсулине человека. Предполагается, что число больных диабетом увеличится до 366 миллионов в 2030 году, более чем в два раза по сравнению с 2000

годом [Wild et al., 2004]. Создание перорального инсулина является одним из перспективных направлений в лечении диабета.

Однако при разработке препаратов перорального инсулина возникает необходимость преодоления физиологических барьеров в желудочно-кишечном тракте. Главным препятствием является агрессивная кислотная среда в желудке, различные пищеварительные ферменты и ограничения всасывания в кишечнике. Разработано большое число защитных систем доставки, которые содержат ингибиторы протеаз, соединения для повышения абсорбции и другие компоненты, предназначенные для включения в препараты инсулина [Sonia and Sharma, 2012; Yaturu, 2013]. Средства доставки, чувствительные к изменениям pH окружающей среды, представляются наиболее эффективными [Peppas and Kavimandan, 2006]. В кислой среде такие системы стабильны и могут защищать препарат инсулина от деградации в желудке, в то время как слабощелочная среда кишечника способствует дезинтеграции «капсул» и высвобождению белка (Рис. 21).

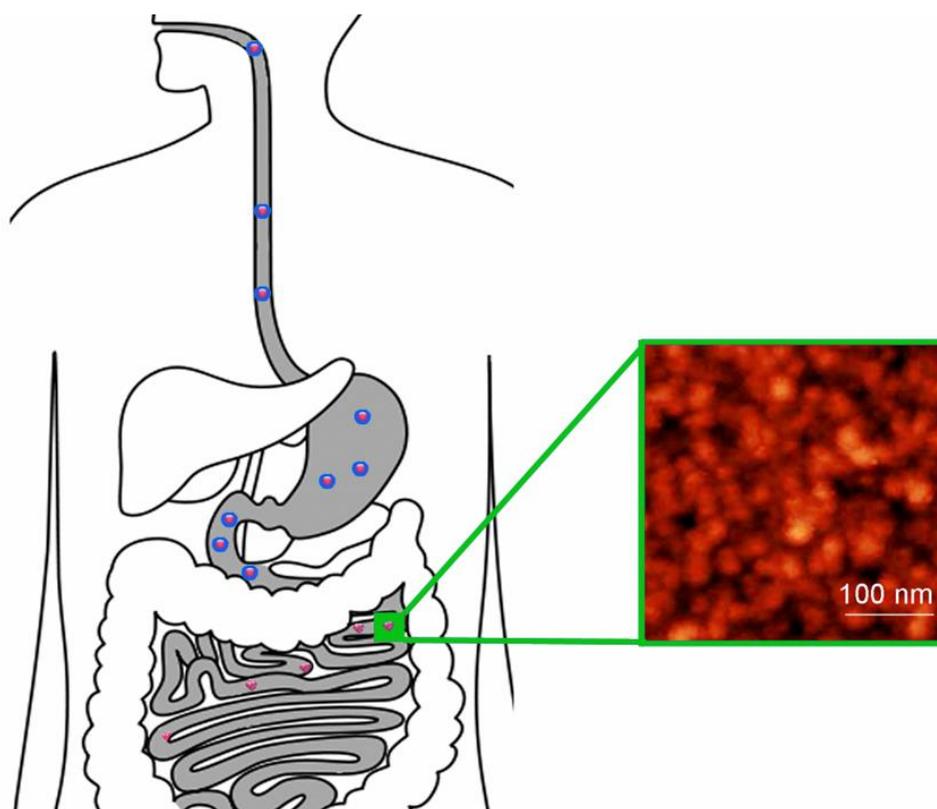


Рис. 21. Гипотетическая схема прохождения перорального препарата инсулина через желудочно-кишечный тракт с высвобождением в двенадцатиперстной кишке при щелочном pH и предполагаемого появления агрегатов белка.

Однако препараты инсулина, включая средства его доставки, формируются таким образом, что они удерживаются в кишечнике в больших

концентрациях на гидрофобных поверхностях эпителия кишечника в течение длительного времени, что может приводить к агрегации инсулина. При разработке стратегии создания подобных препаратов следует учитывать огромное число низкомолекулярных соединений, находящихся в среде кишечника в местах высвобождения инсулина (продукты перевариваемой пищи, пищевые добавки и лекарственные препараты). При стрессорных условиях молекула инсулина становится весьма чувствительной к взаимодействию с другими компонентами среды, которые могут индуцировать конформационные изменения и агрегацию белка. Инсулин, высвобождающийся в кишечнике при локальных значениях рН в диапазоне 7.0–8.0, имеет суммарный отрицательный заряд, и положительно заряженные низкомолекулярные соединения, в том числе аминокислоты и пептиды, которые «выживают» в условиях протеолиза, ограниченного присутствием ингибиторов протеаз, включаемых в препараты перорального инсулина, могут способствовать агрегации белка.

На основании результатов, полученных в рамках данной работы, представляется целесообразным снижение локальных значений щелочного рН, манипулируя средой кишечника, что может влиять на заряд инсулина и его участие в электростатических взаимодействиях с положительно заряженными молекулами окружающей среды [Smirnova et al., 2014, 2015]. Можно также предложить ограничения потребления аргинина и лизина в качестве диетических добавок с целью стандартизации пероральной системы доставки инсулина больным диабетом. Кроме того, включение в препараты инсулина отрицательно заряженных белков в качестве дополнительных мишеней для противоположно заряженных эффекторов и протеолитических ферментов представляется целесообразным.

Итак, полученные результаты могут быть использованы при создании белковых препаратов медицинского назначения, при разработке новых эффективных добавок в биотехнологии при получении рекомбинантных белков, а также при фундаментальных исследованиях функционирования инсулина в живой системе.

ВЫВОДЫ

1. Дипептиды Arg-Phe и Lys-Leu и пептидный фрагмент адренокортикотропного гормона (АСТН 1-24) проявляют концентрационно-зависимое защитное действие на агрегацию модельных белков, индуцируемую дитиотреитолом, однако, при концентрациях, в 100–1000 раз меньших по сравнению с аргинином.
2. Эффекты аргинина и пептидов Arg-Phe, Lys-Leu и АСТН (1-24) можно изменять на противоположно направленные (торможение или ускорение агрегации) путем изменения рН среды в узком диапазоне физиологических значений от рН 7.0 до рН 8.0.
3. Действие дипептидов Arg-Phe и Asp-Phe на агрегацию модельных белков зависит от их заряда; наблюдается ускорение агрегации противоположно заряженных, но торможение агрегации одноименно заряженных белков.
4. Выявлены морфологические особенности агрегатов модельных белков, образующихся на начальных этапах процесса агрегации под действием Arg, Lys, Arg-Phe или АСТН (1-24). В присутствии пептидов формируются гранулярные частицы, соединяющиеся в длинные цепи или фибриллоподобные волокна, в отличие от аморфных агрегатов, наблюдаемых в отсутствие эффекторов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Artemova N., Stein-Margolina V., **Smirnova E.**, Gurvits B. (2012) Formation of supramolecular structures of a native-like protein in the presence of amphiphilic peptides: Variations in aggregate morphology. **FEBS Letters**. V. 586. No 2. P. 186-190.
2. **Smirnova E.**, Safenkova I., Stein-Margolina V., Shubin V., Gurvits B. (2013) L-Arginine induces protein aggregation and transformation of supramolecular structures of the aggregates. **Amino Acids**. V. 45. No 4. P. 845-855.
3. **Smirnova E.**, Chebotareva N., Gurvits B. (2013) Transient transformation of oligomeric structure of alpha-crystallin during its chaperone action. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 55. P. 62-68.
4. **Smirnova E.**, Safenkova I., Stein-Margolina V., Shubin V., Gurvits B. (2014) Can aggregation of insulin govern its fate in the intestine? Implications for oral delivery of the drug. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 471. P. 65-68.
5. **Smirnova E.**, Safenkova I., Stein-Margolina V., Shubin V., Polshakov V., Gurvits B. (2015) pH-responsive modulation of insulin aggregation and structural transformation of the aggregates. **Biochimie**. V. 109. P. 49-59.

Материалы конференций:

1. **Смирнова Е.Ю.**, Гурвиц Б.Я. (2012) Изменения морфологических свойств белковых наноструктур под действием низкомолекулярных пептидов. XXIV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 7-9 февраля 2012 г. С. 96.
2. **Смирнова Е.Ю.**, Гурвиц Б.Я. (2012) Молекулярные механизмы стимулирующего действия аргинина на агрегацию белков. 16 Международная пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология. Наука XXI века». Пущино, 16-21 апреля 2012 г. С. 196-197.
3. **Смирнова Е.Ю.**, Артемова Н.В., Гурвиц Б.Я. (2012) Кинетика агрегации белков, индуцируемой амфифильными пептидами; морфологические свойства надмолекулярных белковых структур. IV съезд биофизиков России. Нижний Новгород, 20-26 августа 2012 г. С. 272.

4. **Смирнова Е.Ю.**, Гурвиц Б.Я. (2013) Парадоксальное действие аргинина и лизина на агрегацию белков. Международная научная конференция «Актуальные проблемы развития биоорганической химии». Ташкент, 15-16 ноября 2013 г. С. 6.

5. **Смирнова Е.Ю.**, Гурвиц Б.Я. (2014) Трансформация формы и размеров белковых агрегатов под действием низкомолекулярных шапероноподобных агентов. XXVI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, 10-14 февраля 2014 г. С. 37.

6. **Смирнова Е.Ю.**, Гурвиц Б.Я. (2014) Агрегация и образование надмолекулярных структур инсулина под действием L-аргинина. 18 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Пущино, 21-25 апреля 2014 г. С. 159.

7. **Смирнова Е.Ю.**, Штейн-Марголина В.А., Гурвиц Б.Я. (2014) Исследование морфологических свойств надмолекулярных структур, образуемых при агрегации белков, с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. XXV Российская конференция по электронной микроскопии и 2-я Школа молодых ученых «Современные методы электронной и зондовой микроскопии в исследовании наноструктур и материалов». Черногоровка, 2-6 июня 2014 г. С. 634-635.

8. **Smirnova E. Yu.**, Gurvits B. Ya. (2014) Aggregation of human recombinant insulin induced by arginine and arginine-containing peptides: morphological characteristics of the aggregates. Acta Naturae, Special issue № 1. International Conference on Bioorganic Chemistry, Biotechnology and Bionanotechnology dedicated to the 55th Anniversary of the M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences and the 80th Anniversary of Professor Yuri Ovchinnikov. Moscow, Russia, 15-19 September, 2014. P. 41.

9. **Агутина Е.Ю.**, Гурвиц Б.Я. (2015) Формирование гетерогенных надмолекулярных структур инсулина под действием амфифильного пептида Arg-Phe. V съезд биофизиков России. Ростов-на-Дону, 4-10 октября 2015 г. Материалы докладов, Т. 1. С. 63.

Работа поддержана программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантом РФФИ 14-04-01530-а.

Сокращения, принятые в тексте

АСМ	–	атомно-силовая микроскопия;
ДЛС	–	динамическое лазерное светорассеяние;
ДТТ	–	дитиотреитол;
КД	–	круговой дихроизм;
ТЭМ	–	трансмиссионная электронная микроскопия;
ЭГТА	–	Этиленгликольтетраацетат;
bis-ANS	–	4,4'-дианилин-1,1'-динафталин-5,5'-дисульфоновая кислота;
GuHCl	–	гуанидин гидрохлорид;
ThT	–	тиофлавин Т.