

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н.БАХА**

На правах рукописи

Е. Агутина

Агутина Екатерина Юрьевна

**ОБРАЗОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ АГРЕГАТОВ, ИНДУЦИРУЕМОЕ
ПЕПТИДАМИ**

Специальность 03.01.04 Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель
д.б.н., проф. Гурвиц Б.Я.

Москва 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	13
1.1. Агрегация белков.....	13
1.2. Молекулярные шапероны.....	18
1.3. Шапероноподобные белки.....	21
1.4. Химические шапероны.....	22
1.5. Аргинин.....	26
1.5.1. Механизмы действия аргинина на агрегацию белков.....	28
1.5.2. Физиологические функции аргинина.....	31
1.6. Действие пептидов на агрегацию белков.....	32
1.7. Пептиды в биотехнологии и медицине.....	34
1.8. Функциональные амилоиды.....	39
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	46
2.1. Материалы.....	46
2.2. Методы исследования.....	46
2.2.1. Динамическое лазерное светорассеяние.....	46
2.2.2. Флуоресцентные методы исследования.....	50
2.2.2.1. Флуоресценция тиофлавина Т.....	50
2.2.2.2. Флуоресценция bis-ANS.....	51
2.2.3. Турбидиметрия.....	51
2.2.4. Спектроскопия кругового дихроизма.....	52
2.2.5. Трансмиссионная электронная микроскопия.....	53
2.2.6. Атомно-силовая микроскопия.....	54
2.2.7. Ультрафильтрация.....	55
2.2.8. Электрофорез в полиакриламидном геле.....	55
2.2.9. Аналитическое ультрацентрифугирование.....	56
2.2.10. Гель-проникающая хроматография.....	57

2.2.11.	Ядерный магнитный резонанс.....	57
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	59
3.1.	Модельные белковые субстраты.....	59
3.2.	Изучение влияния аргинина на кинетику агрегации модельных белков.....	65
3.2.1.	α -Лактальбумин.....	66
3.2.2.	Алкогольдегидрогеназа.....	69
3.2.3.	Инсулин.....	70
3.2.4.	Лизоцим.....	71
3.3.	Влияние аргинина на кинетику агрегации модельных белков в зависимости от pH среды.....	72
3.3.1.	Инсулин.....	72
3.3.2.	α -Лактальбумин.....	75
3.4.	Исследование молекулярных механизмов действия аргинина на агрегацию белков.....	75
3.4.1.	Влияние лизина на агрегацию белков.....	75
3.4.2.	Действие гуанидин гидрохлорида на агрегацию белков.....	78
3.4.3.	Флуоресцентная спектроскопия с использованием тиофлавина T ₁ bis-ANS.....	80
3.5.	Изменение вторичной структуры α -лактальбумина и инсулина в присутствии аргинина.....	82
3.6.	Исследование структурных изменений инсулина в присутствии аргинина с помощью ¹ H ЯМР-спектроскопии.....	84
3.7.	Морфологические свойства агрегатов модельных белков в присутствии аргинина и лизина.....	87
3.7.1.	Инсулин.....	87
3.7.2.	α -Лактальбумин.....	88
3.8.	Действие амфифильных пептидов на кинетику агрегации инсулина.....	91

3.8.1.	Arg-Phe.....	92
3.8.2.	АСТН (1-24).....	94
3.8.3.	Asp-Phe.....	96
3.8.4.	Lys-Leu.....	97
3.9.	Исследование влияния пептида Arg-Phe на вторичную структуру инсулина.....	99
3.10.	Морфологические свойства агрегатов инсулина в присутствии пептидов Arg-Phe или АСТН (1-24).....	100
3.11.	Гипотетическая модель агрегации перорального инсулина.....	103
3.12.	Трансформация структуры α -кристаллина в процессе его шапероноподобного действия.....	105
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	112
	ВЫВОДЫ.....	113
	СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ....	114
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	117
	БЛАГОДАРНОСТИ.....	145

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДГ	–	алкогольдегидрогеназа
АСМ	–	атомно-силовая микроскопия
ДЛС	–	динамическое лазерное светорассеяние
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН	–	додецил сульфата натрия
ДТТ	–	дитиотреитол
КД	–	круговой дихроизм
ПААГ	–	полиакриламидный гель
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
ТМАО	–	триметиламин-N-оксид
ТЭМ	–	тринсмиссионная электронная микроскопия
ФЭУ	–	фотоэлектронный умножитель
ФШ	–	фармакологические шапероны
ЭГТА	–	этиленгликольтетраацетат
ЯМР	–	ядерный магнитный резонанс
АСТН	–	адренокортикотропный гормон
АТФ	–	аденозинтрифосфат
А β -пептид	–	β -амилоидный пептид
bis-ANS	–	4,4'-дианилин-1,1'-динафталин-5,5'-дисульфоновая кислота
cAMP	–	циклический аденозинмонофосфат
GuHCl	–	гуанидин гидрохлорид
Hsp	–	heat shock proteins, белки теплового шока
sHsp	–	small heat shock proteins, малые белки теплового шока
MAVS	–	mitochondrial antiviral signaling protein, митохондриальный антивирусный сигнальный белок
MIF	–	macrophage migration inhibitory factor, фактор ингибирования миграции макрофагов
ThT	–	тиофлавин Т
TSP	–	триметилсилил-пропионовая кислота

ВВЕДЕНИЕ

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 рН 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 (АДГ) (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 гетерогенные 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. Морфологические особенности гетерогенных агрегатов, сформированных на начальных этапах процесса агрегации под действием Arg и Arg-содержащих пептидов, демонстрируются с помощью АСМ и ТЭМ.

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.

Степень достоверности полученных результатов. Выводы, представленные в этой работе, полностью подтверждены экспериментальными данными. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны.

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

Основные результаты работы были представлены на следующих научных конференциях и симпозиумах: XXIV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2012; 16 Международная пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология. Наука XXI века», Пушино, 2012; IV съезд биофизиков России, Нижний Новгород, 2012; Международная научная конференция «Актуальные проблемы развития биоорганической химии», Ташкент, 2013; XXVI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2014; 18 Международной Пушинской школа-конференция молодых ученых, Пушино, 2014; XXV Российская конференция по электронной микроскопии и 2-я Школа молодых ученых «Современные методы электронной и зондовой микроскопии в исследовании наноструктур и материалов», Черноголовка, 2014; Международная конференция по

биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию Института биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова. Москва, 2014; V съезд биофизиков России, Ростов-на-Дону, 2015 г.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Агрегация белков

В процессе фолдинга белки приобретают уникальную пространственную структуру, определяющую их биологическую активность. Однако под воздействием различных внешних условий при образовании пространственной структуры в многоэтапном процессе биосинтеза белка в клетке могут возникать развернутые или неправильно свернутые, ненативные формы белков, склонные к агрегации [Fields et al., 1992; Frydman, 2001; Hartl and Hayer-Hartl, 2002]. Кроме того, агрегацию можно наблюдать при различных стрессовых условиях, вызывающих повреждение трехмерной структуры и образование развернутых форм вновь синтезированных полипептидных цепей в результате мутаций, посттрансляционных модификаций, окислительных процессов, изменений окружающей среды (рН, температуры, УФ-облучения). Все эти факторы могут действовать как независимо друг от друга, так и одновременно [Uversky, 2014]. Белки теряют свою нативную структуру, что приводит к самоассоциации и формированию различных надмолекулярных структур: растворимых олигомеров, аморфных агрегатов и фибрилл [Dobson, 2004].

Процесс агрегации может быть описан по схеме (Рис. 1.1), где нативные белки (Н) образуют обратимые развернутые интермедиаты (И), которые затем превращаются в развернутые белки (Р) или агрегаты (А):

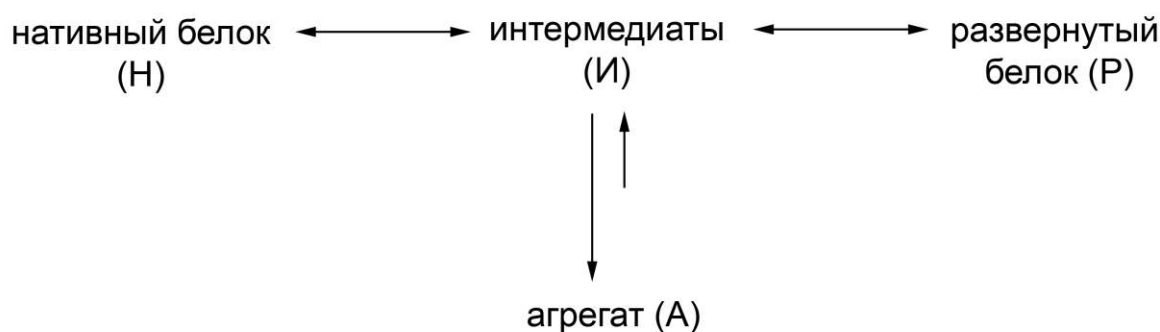


Рис. 1.1. Схема процесса агрегации белков.

Агрегация белков может быть представлена как процесс, идущий в три этапа. На первом этапе растворимые нативные белки (Н) трансформируются в склонные к агрегации интермедиаты (И), которые имеют частично развернутую конформацию. На втором этапе агрегации происходит нуклеация, предшествующая росту агрегата и характеризующаяся относительно медленной стадией формирования ядра, которая переходит в быстрый рост агрегатов. Нуклеация предполагает, что образовавшееся ядро растет путем присоединения новых молекул белка [Kodaka, 2004]. Образование нуклеатов является скорость-лимитирующим этапом лаг-фазы процесса агрегации.

Дальнейший рост белковых агрегатов может происходить в соответствии с двумя механизмами – агрегация «мономер-кластер» (добавление мономера к растущему мультимеру) и агрегация «кластер-кластер» (добавление мультимера к другому мультимеру) [Speed et al., 1997] (Рис. 1.2). Эти процессы могут проходить одновременно. Первый тип агрегации свойственен, например, нуклеазе стафилококка [Uversky et al., 1999] и процессу образования амилоидов [Tomski and Murphy, 1992; Lomakin et al., 1997]. Полимеризация «кластер-кластер» наблюдалась при агрегации белка Р22 оболочки фага во время рефолдинга *in vitro* [Speed et al., 1997]. Первоначальные белковые агрегаты растворимы, но при превышении определенного размера их растворимость ограничивается [Uversky et al., 1999].

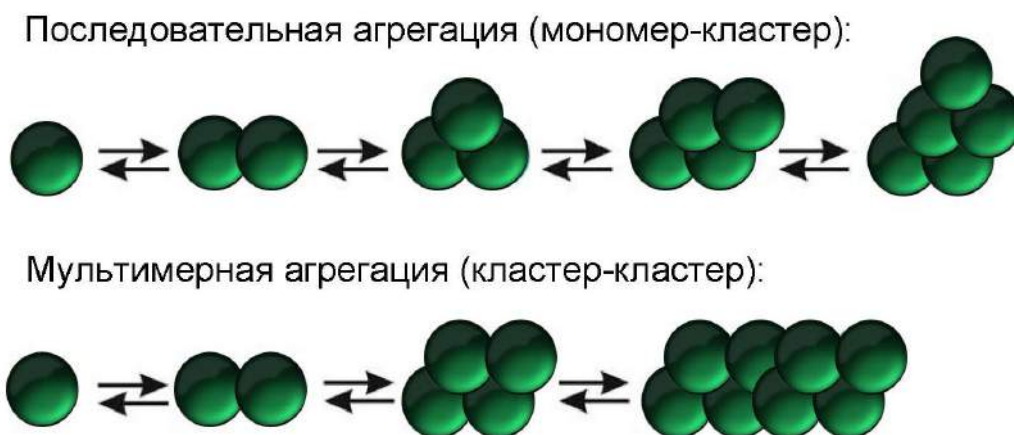


Рис.1.2. Возможные механизмы агрегации белков [Speed et al., 1997].

В результате образуются структуры с различной морфологией, возможно, вследствие того, что формирование агрегатов может происходить с участием различных механизмов, в частности, в результате агрегации мономеров с измененной конформацией, или агрегации химически модифицированных молекул, или агрегации, индуцированной на поверхности [Philo and Arakawa, 2009]. Различные пути агрегации приводят к полиморфизму образующихся структур [Fandrich et al., 2009]. Наиболее часто процесс агрегации наблюдают при превышении температуры окружающей среды выше физиологически допустимого уровня, а также при высокой концентрации белков [Hagiwara et al., 1996; Roefs and De Kruif, 1994; Arora et al., 2004]. Однако возможна и химически индуцированная белковая агрегация, в частности при образовании/обмене дисульфидной связи. Остаток цистеина в белке может легко окисляться с образованием дисульфидных связей или индуцировать тиол-дисульфидный обмен, иногда приводящий к белковой полимеризации/агрегации, как например, у β -галактозидазы [Yoshioka et al., 1993]. Кроме того, белки могут образовывать ковалентные димеры или полимеры путем недисульфидной сшивки. Было показано, что инсулин образует трансамидированные димеры и полимеры при хранении, в основном, в результате реакций с участием аминокислотных остатков Asn^{A21} и Phe^{B1} [Brange et al., 1992]. Другой путь недисульфидных сшивок включает образование дитиозинов [Malencik and Anderson, 2003]. При этом возможно изменение гидрофобности белка, что способствует его агрегации.

Было показано также, что структура белка может изменяться при его взаимодействии с клеточными мембранами с участием электростатических сил вблизи их поверхности. Мембраны могут служить денатурирующим агентом в клетке и являться причиной индуцированной агрегации на поверхности. Взаимодействие белка с мембраной может приводить к переходу белка из нативной конформации в «расплавленную» глобулу [Бычкова и др., 2014]. Предполагают, что взаимодействие гормона

поджелудочной железы, амилина, с клеточной мембраной способствует образованию преамилоидных агрегатов, что вызывает формирование амилоидных фибрилл при диабете второго типа [Hebda et al., 2014]. Другим примером может служить болезнь Альцгеймера, при которой белок «тау» образует бляшки. Предполагают, что центрами их образования в клетке могут служить отрицательно заряженные мембраны [Chirita et al., 2003].

Во многих случаях белковые агрегаты аморфны, их размеры могут изменяться от нескольких десятков нанометров до преципитатов, видимых невооруженным глазом. Белок способен образовывать различные типы агрегатов, которые могут отличаться по форме и размерам [Khurana et al., 2001]. Было показано, что β 2-микроглобулин образует фибриллы, состоящие из двух или четырех протофиламентов [Kad et al., 2001]. Некоторые белки образуют гели, такие как β -лактоглобулин и бычий сывороточный альбумин при термоагрегации [Tobitani and Ross-Murphy, 1997].

Многие белки при агрегации образуют фибриллы, например, инсулин [Brange et al., 1997], кальцитонин [Cholewinski et al., 1996], β 2-микроглобулин [Kardos et al., 2005] и другие. Фибриллы инсулина имеют диаметр от 3 до 50 нанометров и длину до нескольких микрон [Brange et al., 1997; Nielsen et al., 2001a, 2001b]. На рисунке 1.3 продемонстрирована характерная форма фибрилл инсулина.

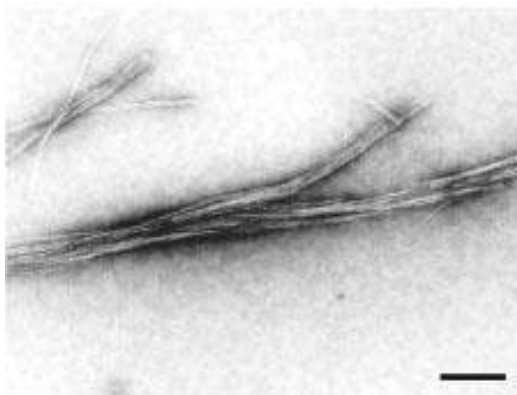


Рис. 1.3. Электронная микрофотография фибрилл бычьего инсулина, образованных при pH 1.6. Масштаб – 200 нм [Zako et al., 2009].

На морфологию белковых агрегатов влияют различные факторы. Главные – первичная структура белка [Helms and Wetzel, 1996], распределение гидрофобных поверхностей [Patro and Przybycien, 1994], экспериментальные условия [Shen et al., 1993]. Одна мутация в белке или пептиде может сильно изменить морфологию агрегатов [Fraser et al., 1994; Helms and Wetzel, 1996]. На морфологию образующихся частиц влияют температура, pH среды, концентрация белка [Fraser et al., 1994; Roefs and De Kruif, 1994; Nielsen et al., 2001a, 2001b] (Рис. 1.4). Амилоидные фибриллы могут обладать различными морфологическими свойствами также вследствие разного количества аминокислотных остатков в полипептидных цепях, которые участвуют в формировании β -слоев. Кроме того, белки могут иметь структуру, содержащую несколько амилоидогенных участков.

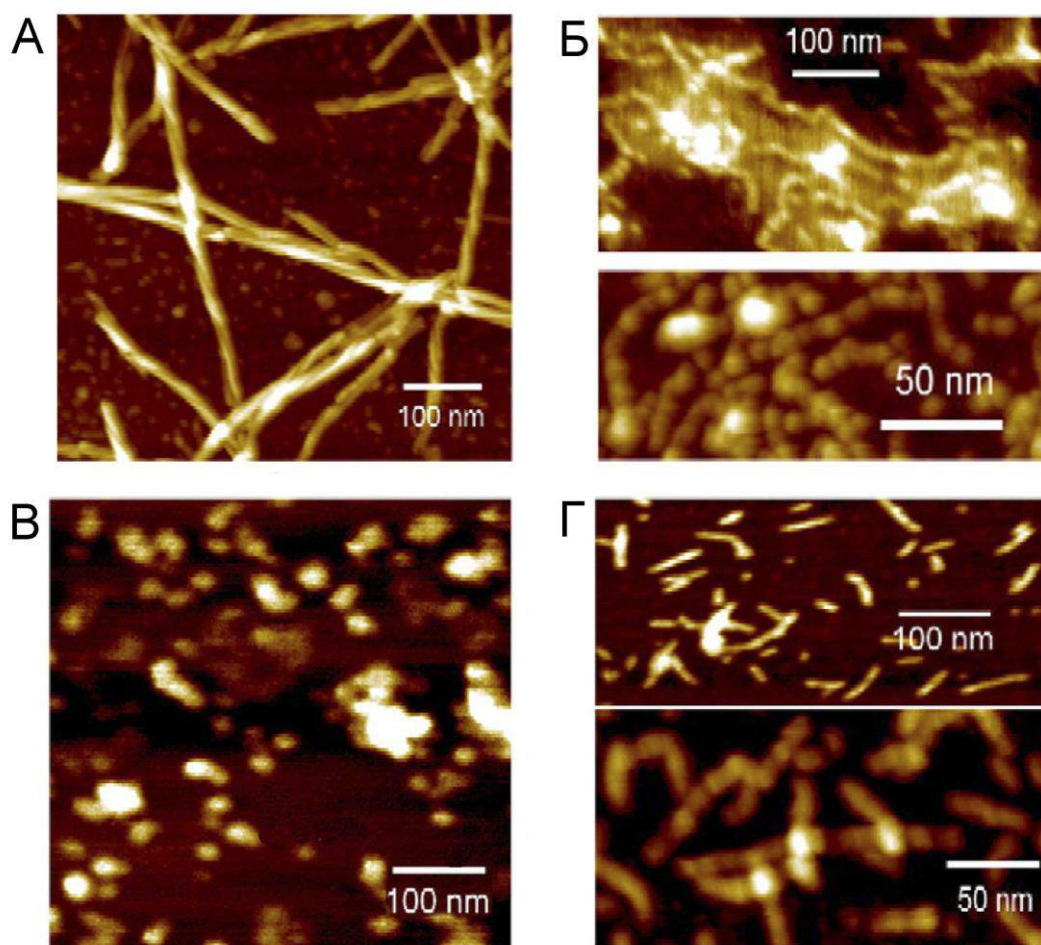


Рис. 1.4. Морфология агрегатов β 2-микроглобулина, исследованных с помощью АСМ, зрелые фибриллы при pH 2.5 (А); незрелые фибриллы при pH 3.5, в нижней панели показано, что филаменты образуются из гранул (Б); аморфные агрегаты при pH 5.0 (В); филаменты при pH 7.5 (Г) [Kardos et al., 2005].

1.2. Молекулярные шапероны

На клеточном уровне существует система контроля качества белков (protein quality control), участвующая в восстановлении и репарации поврежденных белковых структур, в которой основная роль принадлежит шаперонам. К классу шаперонов относятся белки теплового шока (Heat shock proteins, Hsp), входящие в семейства Hsp60 и Hsp70 (GroEL и DnaK у бактерий соответственно), которые способны обеспечивать правильное сворачивание полипептидных цепей в процессе их биосинтеза, а также защищать белки от посттрансляционных модификаций, используя энергию гидролиза АТФ [Hartl et al., 2011]. Шапероны семейства Hsp70 играют роль в синтезе, транспорте и хранении белков [Geething and Sambrook, 1992]. Hsp70 находится в различных клеточных компартментах (ядерном, цитозольном, митохондриальном, эндоплазматическом ретикулуме) [Flaherty et al., 1990]. Некоторые из них синтезируются только в условиях стресса, в то время как другие присутствуют в клетках и при нормальных условиях [Snutch et al., 1988; Flaherty et al., 1990]. Белки семейства Hsp60 названы шаперонинами [Hemmingsen et al., 1988]. Шаперонины имеют сложное олигомерное строение. Наиболее изучены Hsp60 митохондрий. Hsp60 эукариот синтезируются в цитоплазме и транспортируются в митохондрии, где они связываются с митохондриальной матрицей и участвуют в сохранении и транспортировке белков [Richter-Landsberg and Goldbaum, 2003]. Шаперонин GroEL из *Escherichia coli* представлен двумя кольцами, которые состоят из семи олигомеров. Кольца расположены одно над другим, в центре имеется канал, в котором происходит сворачивание полипептидной цепи. Сверху канал закрывает ко-шаперонин GroES образованный из семи субъединиц Hsp10. Полипептидная цепь, попадая в центральный канал шаперонина, оказывается полностью изолированной и получает возможность реализовывать медленные стадии сворачивания с высоким выходом нативного белка [Наградова, 1996].

Среди белков теплового шока особое место занимают малые белки теплового шока (small Heat shock proteins, sHsp), основной функцией которых является подавление агрегации неправильно свернутых форм белков. Характерными признаками данного семейства являются небольшая молекулярная масса мономеров (от 12 до 43 кДа), которые способны соединяться с образованием крупных олигомеров с молекулярной массой до 1000 кДа [Jacob et al., 1993; Lindner et al., 1997; Курганов, 2013]. Показана возможность быстрого обмена субъединицами между олигомерами sHsp [Baldwin et al., 2012; Basha et al., 2012].

sHsp не способны обеспечивать сворачивание полипептидной цепи. Они образуют комплексы с ненативными формами белков и далее передают белки на шапероны, использующие энергию гидролиза АТФ, либо транспортируют их в протеасомы для протеолитической деградации неправильно свернутых белков [Lee et al., 1997; Wang and Spector, 2000]. Белки семейства sHsp существуют в форме крупных олигомеров в виде сферического или дискообразного комплекса с пронизывающим его центральным каналом [Haslbeck et al., 2005; Nakamoto and Vigh, 2007]. Отличительным признаком семейства sHsp служит наличие консервативного домена, который соответствует структуре α -кристаллина. Каждый олигомер sHsp способен удерживать по несколько ненативных белковых субстратов [Haslbeck, 2002]. Представители семейства sHsp обнаружены практически у всех живых организмов. Мутации этих белков у человека приводят к миопатии, нейропатии и катаракте, некоторые из них проявляют противоапоптотные, иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства [Bakthisaran et al., 2015].

Шапероны регулируют изменения конформации белков во время транспортировки через мембраны, а также их включение в различные органеллы [Mathew and Morimoto, 1998]. Шапероны синтезируются в ответ на такие стрессорные факторы, как повышенная температура, УФ-облучение [Kiryama et al., 2001], бактериальные и вирусные инфекции [Deitch et al.,

1995], тяжелые металлы [Tedengren et al., 1999], пестициды [Nazir et al., 2003]. При этом активируются гены теплового шока как универсальный ответ клеток, включающий процессы транскрипции и трансляции, которые тормозятся после снятия стрессорного воздействия и возвращения клетки к нормальным условиям.

Поскольку в настоящей работе предметом исследования являются аминокислоты и пептиды в качестве компонентов защитных механизмов клетки, предотвращающих агрегацию белков, в обзоре приводятся лишь краткие сведения о молекулярных шаперонах. Однако стоит упомянуть о многофункциональном шапероне класса Hsp90, молекула которого представлена димером, состоящим из идентичных субъединиц с молекулярной массой 90 кДа. Белки теплового шока Hsp90 участвуют в сворачивании полипептидных цепей и в деградации белков. Они широко распространены и в бактериях, и в эукариотах [Pearl and Prodromou, 2006]. Они стабилизируют многие белки, в частности те, которые участвуют в злокачественной трансформации клеток. Повышение активности Hsp90 в опухолевых клетках является важным условием для активации различных сигнальных путей. Белки семейства Hsp90 участвуют также для функционирования мультибелковых комплексов, в частности стероидных комплексов рецепторов [Pratt et al., 1992].

Итак, молекулярные шапероны выполняют важные функции в поддержании клеточного гомеостаза в ответ на стресс, позволяя снизить влияние факторов внешней и внутренней среды. Шапероны предотвращают агрегацию развернутых белков с открытыми гидрофобными поверхностями, влияют на кинетику сворачивания белка, участвуют в транспорте клеточных белков между компартментами [Chesca and Viale, 1997]. Они также осуществляют многие другие важные функции, связанные с изменением конформации белков. Именно шапероны контролируют процессы рефолдинга белков в клетке. Таким образом, молекулярные шапероны

являются основными компонентами системы контроля качества белка [Lee and Tsai, 2005; Bukau et al., 2006; Anelli and Sitia, 2008].

1.3. Шапероноподобные белки

Некоторые белки, основная функция которых не связана со стабилизацией развернутых белков, обладают шапероноподобной активностью. Среди них – β -казеин [Захарченко и др., 2012], тубулин [Manna et al., 2001], фактор ингибирования миграции макрофагов (macrophage migration inhibitory factor, MIF) [Cherepkova et al., 2006], ядерные белки [Min et al., 2013] и другие. В частности, было показано, что в отсутствие β -казеина АДГ при 48 °С образует частицы размером около 1000 нм, но в его присутствии размер образуемых частиц снижался до 30–50 нм. Можно полагать, что β -казеин обладает шапероноподобной активностью, которая усиливается при увеличении молярного соотношения β -казеина к АДГ. Предполагают, что β -казеин может действовать подобно классическим шаперонам, образуя стабильные комплексы с частично развернутыми белками и блокируя гидрофобные области на его поверхности [Захарченко и др., 2012].

Было показано также, что термоагрегацию АДГ может предотвращать тубулин, связывая развернутые белковые интермедиаты [Manna et al., 2001]. Видимо, в проявлении шапероноподобной активности участвуют домены тубулина, которые взаимодействуют с гидрофобными участками молекул, склонных к агрегации [Ward and Timasheff, 1994]. Взаимодействие гидрофобных областей развернутого субстрата с тубулином ограничивает неспецифическую ассоциацию между молекулами субстрата.

Обнаружено также, что MIF обладает шапероноподобной активностью. При тепловом стрессе большие олигомеры MIF диссоциируют до мономеров, связываются с денатурированными малатдегидрогеназой и гликогенфосфоорилазой b и предотвращают агрегацию этих белков [Cherepkova et al., 2006].

Шапероноподобной активностью обладает один из высококонсервативных ядерных белков (High-mobility group box 1 protein, HMGB1). В клетках эукариот белок HMGB1 функционирует как регулятор транскрипции [Lotze and Tracey, 2005]. В различных условиях (при воспалительных процессах, окислительном стрессе) HMGB1 транспортируется в цитоплазму или секретируется в межклеточное пространство. Этот белок ингибирует индуцированную ДТТ агрегацию инсулина и лизоцима, а также термоиндуцированную агрегацию цитратсинтазы, проявляя шапероноподобную активность. HMGB1 восстанавливает активность цитоплазматической люциферазы после термического воздействия, ингибирует образование агрегатов и токсичность полиглутаминовых белков, которые являются причиной болезни Хантингтона, восстанавливает жизнеспособность клеток после токсичного воздействия этих агрегатов [Min et al., 2013].

1.4. Химические шапероны

В ответ на высокое осмотическое давление, повышенные температуры и другие стрессорные условия многие живые организмы накапливают высокие концентрации осмолитов, которые выполняют защитную функцию [Yancey and Somero, 1979; Burg and Peters, 1997; Wang and Bolen, 1997; Adams et al., 2007; Rajan et al., 2011]. Осмолиты – это низкомолекулярные соединения, которые стабилизируют трехмерную структуру белка, тормозят разворачивание белка при денатурирующих условиях, способствуют повышению выхода нативного белка при рефолдинге, т.е. играют роль молекулярных шаперонов. Их называют «химическими шаперонами». Антиагрегационная активность осмолитов проявляется, главным образом, в подавлении агрегации белков в результате взаимодействия с гидрофобными участками на поверхности развернутых белковых молекул.

Клеточные осмолиты водорастворимы, имеют относительно небольшую молекулярную массу и представлены, главным образом, тремя классами органических соединений: углеводы (глицерин, сорбитол, трегалоза, сахароза, глюкоза, раффиноза); метиламины (бетаин, саркозин и триметиламин-N-оксид (ТМАО) и аминокислоты (глицин, аланин, пролин, глутаминовая кислота).

Было показано *in vivo*, что ТМАО компенсирует повреждающее действие избытка солей и высокого гидростатического давления у глубоководных животных [Yancey et al., 2001]. В опытах на *Escherichia coli* обнаружено, что в условиях повышения осмотического давления в цитоплазме повышается количество бетаина [Cayley and Record, 2003]. Предполагают, что при экстремальных значениях температуры способность стабилизировать белки проявляет, например, сахароза [Yancey et al., 1982; Volen and Baskakov, 2001; Чеботарева, 2007].

Аминокислоты в роли осмолитов также обладают шапероноподобной активностью. Глубоководные организмы накапливают некоторые аминокислоты, в частности, пролин, для компенсации внешнего высокого осмотического давления [Yancey et al., 1982]. С этой же целью некоторые рыбы (акулы, скаты) содержат в клетках ТМАО и свободные аминокислоты, β -аланин и таурин. Было обнаружено, что данные соединения являются эффективными стабилизаторами структуры определенных белков этих рыб, частично денатурированных эндогенной мочевиной.

Осмолиты активно используют в различных исследованиях *in vivo*. Например, глицерин и ТМАО могут корректировать сворачивание белка-супрессора опухоли в клетках [Ohnishi et al., 1999]. Было показано, что трегалоза связывается с частично свернутыми полиглютаминовыми белками и стабилизирует их, облегчая болезнь Хантингтона у мышей [Davies et al., 2006]. ТМАО предотвращает мисфолдинг прионных белков [Bennion et al., 2004]. Осмолиты часто применяются при консервации биологических материалов, например, при сохранении органов для трансплантации.

В экспериментах *in vitro* было показано, что в присутствии метиламинов и аминокислот (β -аланина и таурина) происходит повышение термостабильности вторичной и третичной структур рибонуклеазы быка и скорости ренатурации лактатдегидрогеназы кролика и акулы [Yancey and Somero, 1979]. Осмолиты также используются для коррекции мисфолдинга, торможения агрегации различных белков *in vitro* и для стабилизации белковых фармацевтических препаратов, в частности, рекомбинантного интерферона человека и различных терапевтических антител [Webb et al., 2003]. Накоплено много экспериментальных данных по защитному действию осмолитов [Burg and Peters, 1997; Volen and Baskakov, 2001], однако, молекулярные механизмы их действия в значительной степени неясны [Чеботарева, 2004, 2007]. Обнаружены и противоположные эффекты осмолитов на белки. Например, показано, что ТМАО и сахароза усиливают фибриллообразование α -лактальбумина быка [Vomhoff et al., 2006].

К химическим шаперонам относят и «фармакологические шапероны» (ФШ). ФШ представляют собой небольшие молекулы, например, лобелин [Lee et al., 2010], глюкозамин [Feldhammer et al., 2009], тетрагидробиоптерин [Peu et al., 2004], пиридоксин [Hopper et al., 2008] и другие, предназначенные для избирательного взаимодействия с неправильно свернутой белковой мишенью. ФШ стабилизируют структуру белка, предотвращая его деградацию и увеличивая биологическую активность [Aumami et al., 2013]. С помощью ФШ можно также корректировать дефекты фолдинга белков [Welch and Brown, 1994]. Использование ФШ эффективно, в частности, при генетических заболеваниях. Преимуществом ФШ является то, что они действуют при относительно низких концентрациях. В отличие от ФШ, эффекты осмолитов проявляются при больших концентрациях. Они могут быть токсичны для клеток и поэтому их использование *in vivo* затруднительно [Arakawa et al., 2006].

Химическими шаперонами называют также синтетические полиэлектролиты (полианионы и поликатионы), которые оказывают ингибирующее действие на термоагрегацию олигомерных ферментов

(глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу, лактатдегидрогеназу и аспаратаминотрансферазу). Эффективность ингибирования процесса агрегации зависела от степени полимеризации цепи и плотности заряда полиэлектролита [Shalova et al., 2005].

Известно, что антиагрегационную активность проявляют циклодекстрины – циклические олигомеры глюкозы. Наличие антиагрегационных свойств у циклодекстринов объясняют их способностью образовывать комплексы с экспонированными ароматическими боковыми группами развернутых полипептидных цепей, в результате чего происходит блокирование агрегации последних [Курганов, 2013]. Механизм действия циклодекстринов аналогичен двухэтапному механизму функционирования системы GroEL. На первой стадии, в условиях, которые обычно приводят к необратимой агрегации белка (нагревание или присутствие денатурирующего агента), белок захватывается детергентом. На второй стадии проводится удаление детергента из комплекса с белком, что достигается связыванием детергента путем образования комплексов включения циклодекстрина. Эта процедура обеспечивает возможность рефолдинга белка [Курганов и Топчиева, 1998].

При исследовании полиаминов (путресцина, спермидина и спермина) в качестве шапероноподобных агентов выяснили, что путресцин и спермидин концентрационно-зависимым способом ингибируют агрегацию глутаматдегидрогеназы при повышенной температуре [Marjan et al., 2011]. Интересно, что полиамины способствуют сохранению ферментативной активности, спермидин оказался наиболее эффективным агентом для защиты вторичной структуры белка. Было показано подавление термоагрегации лизоцима [Kudou et al., 2003; Okanojo et al., 2005]. Предполагается, что полиамины предотвращают агрегацию за счет образования ионных пар с локальными отрицательно заряженными группами, увеличения суммарного заряда белка, что приводит к усилению электростатического отталкивания и ограничению межмолекулярного взаимодействия.

К химическим шаперонам можно отнести также свободные аминокислоты и их производные. Аминокислоты могут быть использованы для стабилизации белков без влияния на их биологические функции [Arakawa et al., 2007b]. Эти добавки, влияют на растворимость белков, а также на процессы агрегации и рефолдинга. На примере термоагрегации лизоцима было изучено действие различных гидрофобных и заряженных аминокислот (Ala, Val, Pro, Leu, Ile, Met, Gln, Ser, Thr, орнитин, Asp и Glu) [Shiraki et al., 2002]. Заряженные аминокислоты (Lys, Arg, Asp, Glu, орнитин) проявляли подавляющее действие на агрегацию. Что касается гидрофобных аминокислот (Ala, Val, Leu, Ile, Pro и Met), то они были менее эффективны. В случае агрегации в процессе рефолдинга лизоцима, незаряженные аминокислоты (Ser, Thr) не проявляли никакого действия на процесс агрегации, а положительно заряженные (Lys, Arg и орнитин) и гидрофобные аминокислоты тормозили агрегацию.

1.5. Аргинин

Наиболее эффективной аминокислотой, влияющей на агрегацию белков, является аргинин [Tongl and Barbul, 2004; Arakawa et al., 2010]. Было показано, что аргинин подавляет агрегацию, увеличивает обратимость сворачивания многих белков после снятия стрессорного воздействия, способствуя их рефолдингу, а также ингибирует образование частично развернутых интермедиатов, потенциально включающихся в процесс агрегации [Shiraki et al., 2002; Arakawa and Tsumoto, 2003; Baynes et al., 2005]. В частности, аргинин используется для увеличения эффективности рефолдинга рекомбинантных белков, экспрессируемых в *Escherichia coli*, которые образуют тельца включения [Arora and Khanna 1996; Tsumoto et al., 1998].

Эта положительно заряженная аминокислота повышает растворимость белков, сохраняя их активность и структуру, что продемонстрировано, например, на зеленом флюоресцентном белке и β 2-микроглобулине [Tsumoto

et al., 2003b; Umetsu et al., 2005]. В фармацевтической промышленности аргинин используют для увеличения стабильности или растворимости препаратов, например, антитромботических препаратов на основе тенектеплазы (рекомбинантного активатора плазминогена) [Melandri et al., 2009] и лактоферрина [Kim et al., 2009].

Аргинин подавляет термоагрегацию многих белков концентрационно-зависимым способом [Arakawa and Tsumoto, 2003; Reddy et al., 2005]. Он также способен тормозить неспецифическую адсорбцию в различных гель-фильтрационных колонках, что облегчает элюирование связанных белков. Поэтому эта аминокислота находит широкое применение при биохимических исследованиях белков, в биотехнологии и фармацевтике [Lee et al., 2006; Zilinskas and Sereikaite, 2011; Choi et al., 2012; Gunda et al., 2012].

Однако существует множество противоречий относительно аргинина как шапероноподобного агента. Результаты некоторых исследований свидетельствуют о том, что он способствует агрегации белков [Smirnova et al., 2013, 2015]. Было обнаружено, что аминоксилаза из почек свиньи в присутствии аргинина инактивируется и разворачивается, теряя свою нативную структуру [Xie et al., 2004]. На гормоне роста человека и интерфероне- $\alpha 2b$ было показано, что аргинин при относительно низкой концентрации (25–250 мМ) усиливает агрегацию данных белков, а также снижает температуру, при которой белки начинают агрегировать [Cirkovas and Sereikaite, 2011].

Считают, что аргинин может нарушать структуру белка из-за наличия в нем гуанидиновой группы, сходной с гуанидин гидрохлоридом (Рис. 1.5).

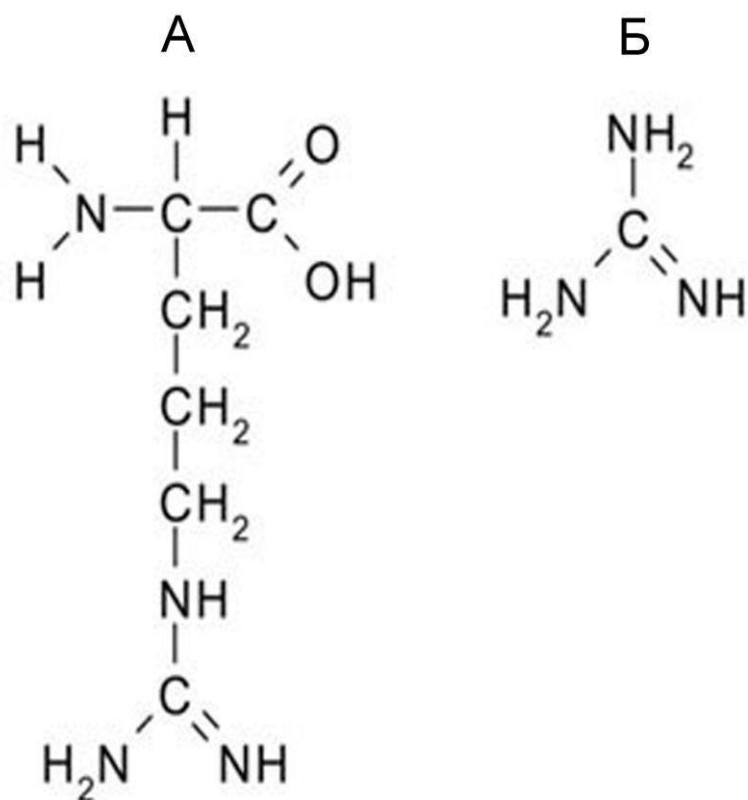


Рис. 1.5. Структура аргинина (А) и гуанидина (Б).

1.5.1. Механизмы действия аргинина на агрегацию белков

Несмотря на эффективность подавления агрегации белков с помощью аргинина, механизмы его действия не выяснены. Было показано, что взаимодействие белка с аргинином качественно отличается от взаимодействий с другими аминокислотами [Lin and Timasheff, 1996]. Его связывание с белками тормозит развитие их агрегации. Считается, что это способствует супрессии белок-белковых взаимодействий. Предполагают, что аргинин связывается с интермедиатами фолдинга, что приводит к подавлению агрегации [Tsumoto et al., 2003a].

Эффекты аргинина рассматривали с точки зрения специфических взаимодействий химических групп в его молекуле с аминокислотными остатками белков [Arakawa et al., 2007c; Nakakido et al., 2009]. В некоторых работах стабилизирующее поведение аргинина связывают с наличием в его структуре гуанидиновой группы [Ishibashi et al., 2005; Ghosh et al., 2009]

(Рис. 1.5). Известно, что гуанидиновая группа взаимодействует с ароматическими сайтами белков [Kita et al, 1994] и участвует в катион-π взаимодействиях [Pellequer et al., 2000]. Исследования 20 аминокислот и некоторых модельных пептидов показали, что ароматические боковые группы большинства аминокислот белков взаимодействуют с аргинином [Zacharias and Dougherty, 2002; Dougherty, 2007].

При сравнении действия аргинина и гуанидин гидрохлорида, было показано, что последний взаимодействует с гидрофобными аминокислотами лизоцима куриного яйца [Mande and Sobhia, 2000]. Во взаимодействии аргинина с белком участвуют слабые гидрофобные, электростатические и катион-π взаимодействия. По сравнению с гуанидиновой группой, амино- и карбоксильные группы аргинина образуют слабые водородные связи с денатурированным белком и водой. Таким образом, аргинин может выступать в качестве ингибитора агрегации вследствие ее связывания с белками [Matsuoka et al., 2009; Ito et al., 2011; Yamaguchi and Masaya, 2014]. Алифатическая группа аргинина может взаимодействовать с гидрофобными участками на белковой поверхности, однако, расположенные на противоположных концах молекулы аргинина заряженные карбоксильная и гуанидиновая группы, затрудняют взаимодействие алкильной цепи с белком [Vagenende et al., 2009].

Образование кластеров аргинина может также играть роль в механизме его действия [Das et al., 2007]. В структуре кристалла аргинин гидрохлорида, молекулы аргинина связаны водородными связями друг с другом в соответствии с моделью «голова-к-хвосту» [Das et al., 2007] (Рис. 1.6).

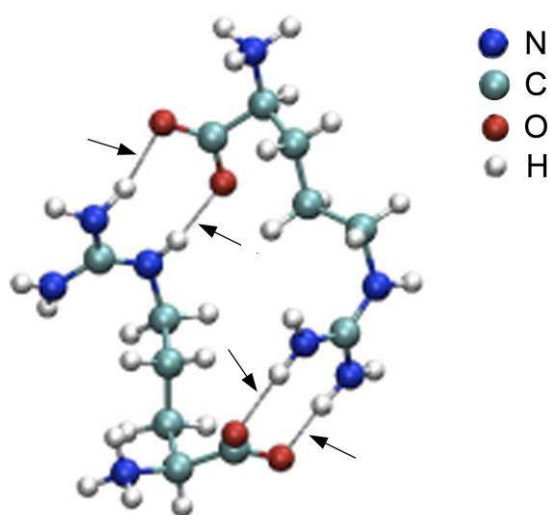


Рис. 1.6. Две молекулы аргинина, ориентированные «голова-к-хвосту». Такая ориентация с участием четырех водородных связей может приводить к образованию кластеров [Shukla et al., 2011]. Водородные связи показаны стрелками.

Было предположено, что взаимодействия молекул аргинина между собой могут приводить к формированию ориентированных гидрофобных поверхностей в растворе. Однако дальнейшие исследования растворов аргинина не показали образования больших гидрофобных поверхностей, которые могли бы взаимодействовать с открытыми гидрофобными остатками белков [Shukla and Trout, 2010]. Тем не менее, выявлена корреляция между кластеризацией аргинина и подавлением агрегации белков [Shukla et al., 2011].

Было исследовано также действие производных аминокислот на дестабилизированные белки. Показано, что эфиры Gly, Arg, Lys эффективно подавляют термоиндуцированную агрегацию лизоцима. Этиловый эфир аргинина предотвращал термо-индуцированную инактивацию и агрегацию лизоцима куриного яйца более эффективно, чем аргинин или гуанидин [Shiraki et al., 2004]. Сильное взаимодействие между этиловым эфиром аргинина и белком приводило к более эффективному подавлению агрегации, чем действие аргинина [Gao et al., 2013]. Предполагают, что алкильная группа эфиров аминокислот связывается с гидрофобными поверхностями белков, увеличивая суммарный заряд молекул, что способствует их электростатическому отталкиванию, и предотвращению межмолекулярных взаимодействий [Shiraki et al., 2005].

При сравнении действия аргинина, гомоаргинина, метилового и этилового эфиров аргинина на агрегацию лизоцима было показано, что наряду с мономерными формами аргинин и гомоаргинин могут образовывать большие кластеры – пентамеры, гексамеры и гептамеры, в то время как эфиры образуют димеры и тримеры. Среди данных добавок аргинин обладает наибольшей способностью образовывать кластеры, а эфиры аргинина – наименьшей [Gao et al., 2013].

Показано, что мономеры аргинина играют преимущественную роль во взаимодействиях с белком благодаря гуанидиновой группе и небольшому размеру, в отличие от кластеров, которые слабо взаимодействуют с белком. Аргинин и гомоаргинин эффективны в супрессии агрегации, однако, кластеры тоже могут проявлять способность к подавлению агрегации белка и тормозить белок-белковые взаимодействия вследствие их большого размера.

1.5.2. Физиологические функции аргинина

В медицинской практике большое внимание уделяется аминокислотам, обладающим терапевтическим действием [Darmaun et al., 1986; Daly et al., 1992; Лейдерман, 2003]. Аргинин – предшественник других биологически активных соединений (орнитина, цитрулина, глутамата, глутамина, глутатиона, гамма-аминомасляной кислоты, спермидина и других), поэтому недостаток этой аминокислоты в организме приводит к быстрому развитию патологических процессов.

Аргинин – одна из самых поляризованных аминокислот. Его метаболизм может осуществляться следующими альтернативными путями: NO-синтазным с образованием L-цитрулина и NO и аргиназным с образованием L-орнитина и мочевины. Возможно одновременное протекание этих двух процессов. Известно, что аргинин и аргинин-содержащие пептиды обладают противомикробным действием, изменяя структуру и

проницаемость мембран бактерий. При этом снижается рост патогенной микрофлоры, что способствует заживлению гнойных ран [Степанов и др., 2004]. Аргинин играет важную роль в синтезе ряда анаболических гормонов, полиаминов и окиси азота. Длительное применение аргинина вызывает вазодилатацию.

Аргинин является условно незаменимой аминокислотой для взрослых и незаменимой – для детей. Дефицит аргинина в питании замедляет рост организма, так как он стимулирует продукцию соматотропного гормона [Ванин, 2000]. Эта аминокислота проявляет позитивное психотропное действие, улучшает настроение, значительно редуцирует симптомы депрессии, улучшает внимание и память [Данилова и др., 1999; Каменский и Савельева, 2002]. Аргинин укрепляет иммунную систему, увеличивая активность Т-клеточного иммунитета и устраняя иммунодефицитные состояния, а также вызывает замедление развития опухолей, улучшает азотистый баланс у раковых больных [Daly et al., 1988; Brittenden et al., 1994; Лейдерман, 2002].

Аргинин повышает концентрацию инсулина и инсулиноподобного фактора роста в плазме крови. Дефицит аргинина повышает риск развития невосприимчивости организма к инсулину. Различные пептиды, обогащенные аргинином, являются эффективными переносчиками белков через биологические мембраны [Futaki, 2002]. Разностороннее участие аргинина в метаболизме определяет широкий спектр его терапевтического действия и эффективность использования в составе диетических добавок.

1.6. Действие пептидов на агрегацию белков

Пептиды можно также считать эффективным средством, влияющим на агрегацию белков *in vivo* и *in vitro*. Количество используемых пептидов и способов их доставки быстро растет, что вызывает необходимость создания больших библиотек биогенных и синтетических пептидов [Funke and

Willbord, 2012]. Некоторые фрагменты Аβ-пептида, подавляющие агрегацию Аβ-пептида и его токсичные эффекты, были исследованы на модели болезни Альцгеймера животных. Было показано, что короткий фрагмент Аβ16-20, KLVFF, связывается с Аβ-пептидом и предотвращает образование фибрилл [Tjernberg et al., 1996]. Результаты молекулярного моделирования показали, что ассоциация Аβ-пептида и пептида KLVFF приводит к образованию антипараллельной β-складчатой структуры, стабилизирующейся с помощью Lys16, Leu17 и Phe20. Пептид RGKLVFFGR и другие фрагменты Аβ-пептида (Аβ15-22, Аβ16-23, Аβ17-24) также ингибируют фибрилlogenез Аβ-пептида [Matsunaga et al., 2004; Austen et al., 2008; Taylor et al., 2010]. Был выявлен и другой ингибитор агрегации Аβ-пептида, основанный на последовательности Аβ31-34, IIGL. На основании этой последовательности был синтезирован пептид RIIGL, который ингибирует образование Аβ-фибрилл и снижает цитотоксичность [Fulop et al., 2004].

Аналогичную стратегию использовали для подавления агрегации инсулина. Был исследован пептид VEALYL, соответствующий фрагменту инсулина В12-17. Показано, что данный пептид в модифицированной форме RRRRRRLVEALYLV в концентрации 2 мМ значительно снижал скорость агрегации инсулина, в то время как пептид LVEALYLVERRRRR, а также пептиды ALYLVERRRRR, GSHLVEALRRRRR и RRRRRRGSHLVEAL лишь незначительно тормозили агрегацию инсулина [Gibson and Murphy, 2006].

Было также показано, что пептидный фрагмент АДГ40-60, YSGVCHTDLHAWHGDWPLPVK, может проявлять шапероноподобные свойства. Этот пептид предотвращает индуцированную ДТГ агрегацию инсулина, β-кристаллина, γ-кристаллина и АДГ. Замена пролина на гистидин в этом пептиде приводила к уменьшению антиагрегационной активности [Bhattacharyya et al., 2003].

Также было исследовано действие пептидных фрагментов α-кристаллина на агрегацию белков. Показано, что αА-кристаллин образует

стабильные комплексы с частично развернутыми белками, в частности, с АДГ. Было обнаружено, что фрагмент α А-кристаллина 70-88 также обладает шапероноподобной активностью, сходной с активностью целой молекулы α А-кристаллина. При этом он подавлял агрегацию не только АДГ, но и В-цепи инсулина, и цитратсинтазы [Sharma et al., 2000]. Однако при исследовании других пептидных фрагментов α -кристаллина было обнаружено противоположное действие на процесс агрегации. Например, фрагмент α А-кристаллина 66-80, наоборот, способствовал образованию агрегатов. При низкой концентрации этот пептид взаимодействовал с α А-кристаллином, снижая его шапероноподобную активность, и усиливал самоассоциацию его субъединиц. При высокой концентрации пептида происходит агрегация α -кристаллина и других белков сетчатки глаза, что приводит к развитию катаракты. Было показано также, что пептиды α А 66-75, α А 67-75, α А 67-80 и α В 1-18 обладают свойствами, аналогичными пептиду α А 66-80 [Santhoshkumar et al., 2011].

1.7. Пептиды в биотехнологии и медицине

Исследования пептидов, которые способны в процессе самоассоциации формировать агрегаты, обладающие морфологическими особенностями, представляющими интерес для биотехнологии, постоянно расширяются. В качестве биоматериалов для получения клеточных подложек в тканевой инженерии обычно используют гидрогели, состоящие из сополимеров поливинилового спирта и коллагена (для регенерации нервной ткани), коллагена и глюкозаминогликана (для регенерацию кожи), а также гели альгината и агарозы. Однако, размер волокон, которые образуют данные соединения, составляет примерно 10–50 мкм в диаметре, что сопоставимо с размерами большинства клеток (5–20 мкм в диаметре). Преимущество подложек для клеток, образованных пептидами, заключается в том, что в

этом случае диаметр волокон составляет около 10 нм. В таких условиях клеткам легче мигрировать, образовывать межклеточный матрикс, взаимодействовать друг с другом, расти и дифференцироваться [Zhang et al., 2005]. Также предполагают возможное использование пептидных подложек для высвобождения лекарственных средств. Например, было показано, что пептид EFK16, способный к самоассоциации, стабилизирует и увеличивает эффективность эллиптицина (лекарства против рака) [Fung et al., 2008]. Так как многие противораковые средства нестабильны или нерастворимы в воде, для их эффективной доставки могут быть использованы разработки самоассоциирующихся пептидов.

Амфифильные самоассоциирующиеся пептиды в зависимости от аминокислотной последовательности и физико-химических условий образуют различные наноструктуры (мицеллы, нанотрубки, везикулы). Например, было показано, что отрицательно заряженный пептид G6D2 образует пальцеобразные структуры (Рис. 1.7), а пептид V6D – нанотрубки [Zhang, 2012].

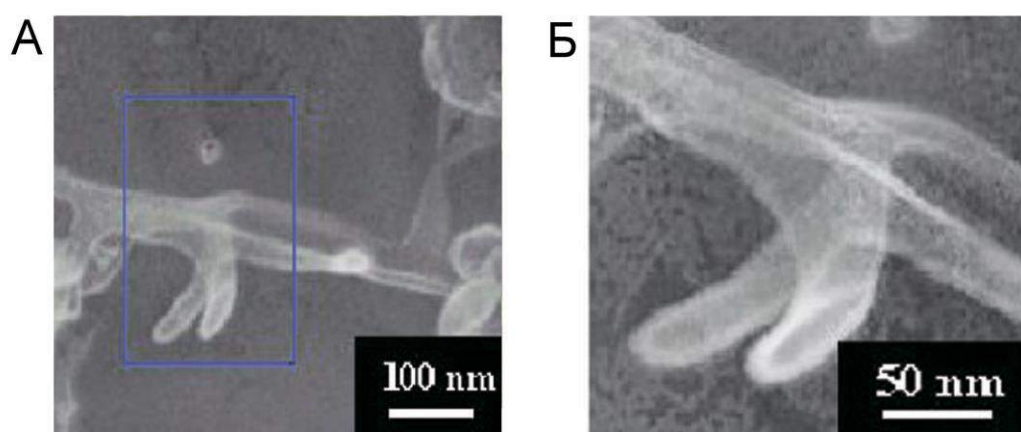


Рис. 1.7. Микрофотографии структур, полученных при самоассоциации пептида G6D2. А – пальцеобразные структуры. Выделенный участок показан на Б при большем увеличении [Zhang, 2012].

При исследовании положительно заряженных пептидов A6K, KA6 были получены нановезикулы (Рис. 1.8). Отрицательно заряженные пептиды A6D и DA6 при самоассоциации также образуют нановезикулы, которые затем образуют кластеры.

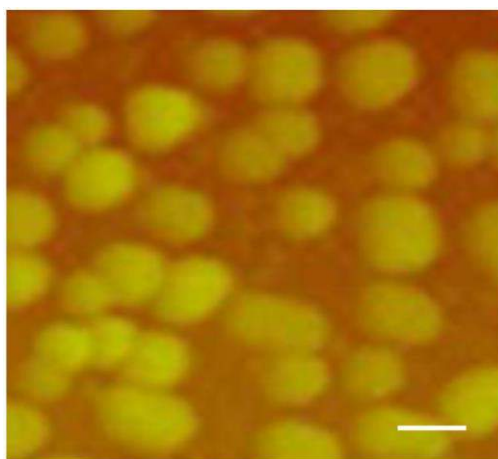


Рис. 1.8. АСМ-изображение нановезикул, полученных при ассоциации пептида КА6. Масштаб – 200 нм [Fatouros et al., 2014].

Предполагают, что пептидные нановезикулы могут быть использованы для внутривенного введения в качестве системы доставки лекарственных препаратов к органам-мишеням [Fatouros et al., 2014]. Синтетический амфифильный пептид A12R2 образует антипараллельные димеры, которые способны формировать закрученные фибриллы шириной 5 нм [Hamley et al., 2013]. При сборке такого пептида было обнаружено, что антипараллельные кросс- β -слои, аналогичные тем, которые характерны для амилоидных фибрилл, образуются за счет упаковки аланиновых остатков (Рис. 1.9).

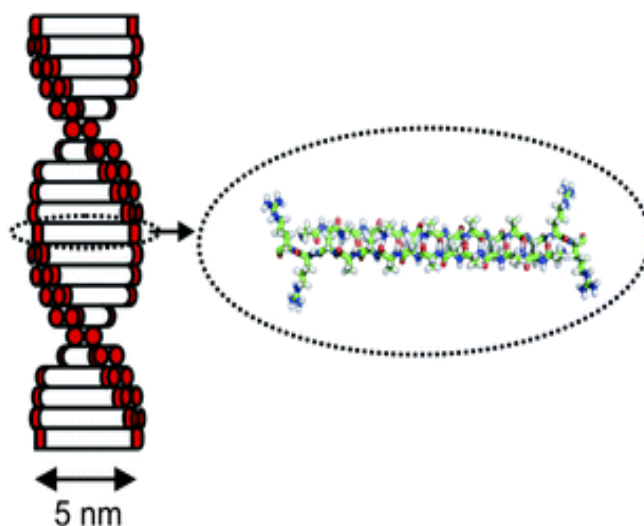


Рис. 1.9. Предполагаемая модель фибриллы (слева) шириной, равной антипараллельной структуре димера A12R2 (справа). Блоки R2 показаны красным. Шаг спирали составляет около 10 нм. Показаны два вертикальных ряда фибрилл.

В биотехнологии могут использоваться и другие самоассоциирующиеся пептиды. Например, пептид АЕАЕАКАКАЕАЕАКАК в результате спонтанной самоассоциации может образовывать макроскопические мембраны в воде, которые не разрушаются при нагревании, обработке кислотами и щелочами, растворами додецилсульфата натрия, мочевины, гуанидин гидрохлорида, или при действии различных протеолитических ферментов [Zhang et al., 1992]. При помощи электронной микроскопии было обнаружено, что такие мембраны создают сеть из переплетенных филаментов, диаметром 10–12 нм. Эти материалы используются в качестве подложки для клеток, а также для остановки кровотечения [Luo et al., 2011]. Пептид KLDLКLDLКLDL был использован для опытов на культуре бычьих хондроцитов, которые на подложке такого типа длительное время были способны продуцировать коллаген и глюкозаминогликаны [Hauser and Zhang, 2010].

Другой пептид RADARADARADARADA (RADA16-I) образует устойчивую β -структуру. Он самоассоциируется с образованием нановолокон и, в конечном итоге, формирует гидрогель, который на 95% состоит из воды (Рис. 1.10). Такие волокна используют для восстановления поврежденных тканей, главным образом, нервной ткани [Ellis-Behnke et al., 2006].

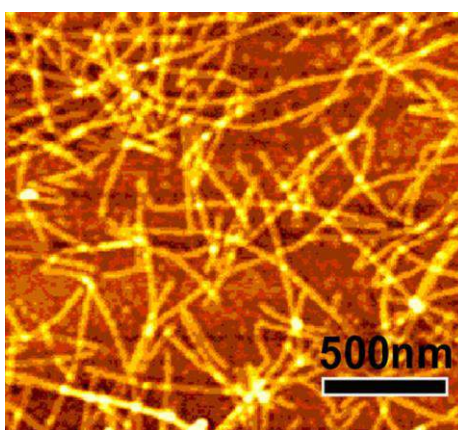


Рис. 1.10. АСМ-изображение фибрилл, полученных при самоассоциации пептида RADA16-I [Sun and Zhao, 2012].

Была исследована ассоциация противоположно заряженных амфифильных пептидов с участием электростатических взаимодействий.

Например, ассоциация пептидов, состоящих из трех аминокислотных остатков лизина и трех – глутамина, приводит к образованию нановолокон, которые устойчивы к воздействию высоких температур [Behanna et al., 2005]. Были также исследованы пептиды, связанные с липидной цепью, C16-ETTES, содержащий два анионных аминокислотных остатка и C16-KTTKS, содержащий два катионных остатка. Ассоциация этих амфифильных пептидов приводит к образованию нанолент [Dehsorkhi et al., 2014] (Рис. 1.11).

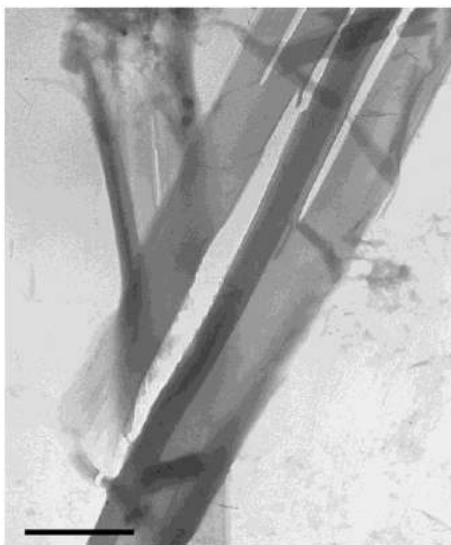


Рис. 1.11. Электронная микрофотография, на которой показаны лентообразные структуры, образованные смесью пептидов C16-ETTES и C16-KTTKS. Масштаб – 1 мкм [Dehsorkhi et al., 2014].

Было показано, что даже дипептиды способны к образованию упорядоченных структур. Например, из дифенилаланина формируются наноструктуры в виде трубок [Reches and Gazit, 2005] (Рис. 1.12, А), в то время как дифенилглицин и трипептид CFF образуют наносферы (Рис. 1.12, Б) [Reches and Gazit, 2004]. Пептид Ile-Phe образует прозрачный гидрогель из сети фибриллярных структур [De Groot et al., 2007]. Таким образом, даже короткие пептиды, содержащие ароматический мотив, способны к образованию надмолекулярных структур.

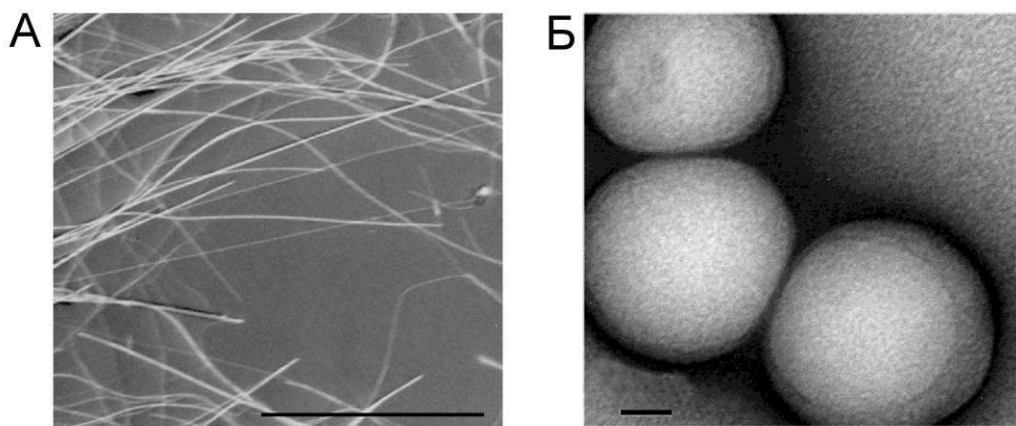


Рис. 1.12. Электронные микрофотографии структур, образованных из дифенилаланина, масштаб – 100 мкм (А), и из трипептида CFF, масштаб – 50 нм (Б) [Reches and Gazit, 2004, 2005].

1.8. Функциональные амилоиды

Общепринятым считается представление о том, что в основе развития таких патологических состояний, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и диабет 2 типа, лежит агрегация белков [Uversky and Fink, 2004; Chiti and Dobson, 2006]. Например, белок α -синуклеин при болезни Паркинсона или А β -пептид при болезни Альцгеймера претерпевают структурные изменения, приводящие к формированию амилоидных фибрилл. Гораздо реже говорят о том, что фибриллоподобные структуры могут выполнять важные биологические функции в живых системах. В последние десятилетия выяснили, что некоторые амилоидные структуры бактерий [Barnhart and Chapman, 2006], грибов [Maddelein et al., 2002], насекомых [Iconomidou et al., 2000] и человека [Fowler et al., 2006] проявляют непатогенную биологическую активность. Такие амилоиды были названы функциональными – functional amyloids [Fowler et al., 2007]. Ниже приводятся некоторые примеры биологически активных функциональных амилоидов.

Белок хориона оболочки яйца шелкопряда, благодаря образованию нативной антипараллельной β -структуры, характерной для амилоидных фибрилл, обладает экстраординарными механическими и химическими свойствами. Такие характеристики позволяют защищать ооцит и

развивающийся эмбрион от температурных колебаний, механического давления, вирусов и бактерий [Iconomidou et al., 2000].

Белок Pmel17, находящийся в меланосомах клеток эпидермиса, участвует в ковалентной полимеризации меланина, который является важнейшим биополимером, защищающим от ультрафиолетового света [Fowler et al., 2006]. Протеолитическое расщепление Pmel17 способствует образованию амилоидогенного фрагмента M α и трансмембранного фрагмента M β [Berson et al., 2001]. Фрагменты M α и M β остаются соединенными дисульфидной связью, что препятствует самоассоциации M α . Предполагают, что далее M α высвобождается из комплекса после деградации M β , тем самым, инициируя образование амилоидов [Fowler et al., 2007]. Pmel17 не обладает способностью к образованию волокон в таких клеточных компартментах, как эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи, что по-видимому защищает эти органеллы от повреждающих ассоциатов M α [Berson et al., 2003].

Митохондриальный противовирусный сигнальный белок (Mitochondrial Antiviral Signaling Protein, MAVS), расположенный на внешней мембране митохондрий, обладает способностью к формированию функциональных агрегатов в инфицированных клетках. Попадание вирусной РНК в цитозоль клеток индуцирует сигнальный каскад реакций, приводящий к образованию больших агрегатов MAVS. В агрегированном состоянии белок активирует реакции, приводящие к синтезу β -интерферона [Hou et al., 2011].

Недавние исследования показали, что некоторые пептидные и белковые гормоны накапливаются в амилоидоподобной конформации в секреторных гранулах гипофиза (Рис. 1.13). В такой форме они могут сохраняться в секреторных гранулах долгое время, так как эти структуры достаточно стабильны [Maji et al., 2009; Ranganathan et al., 2012].

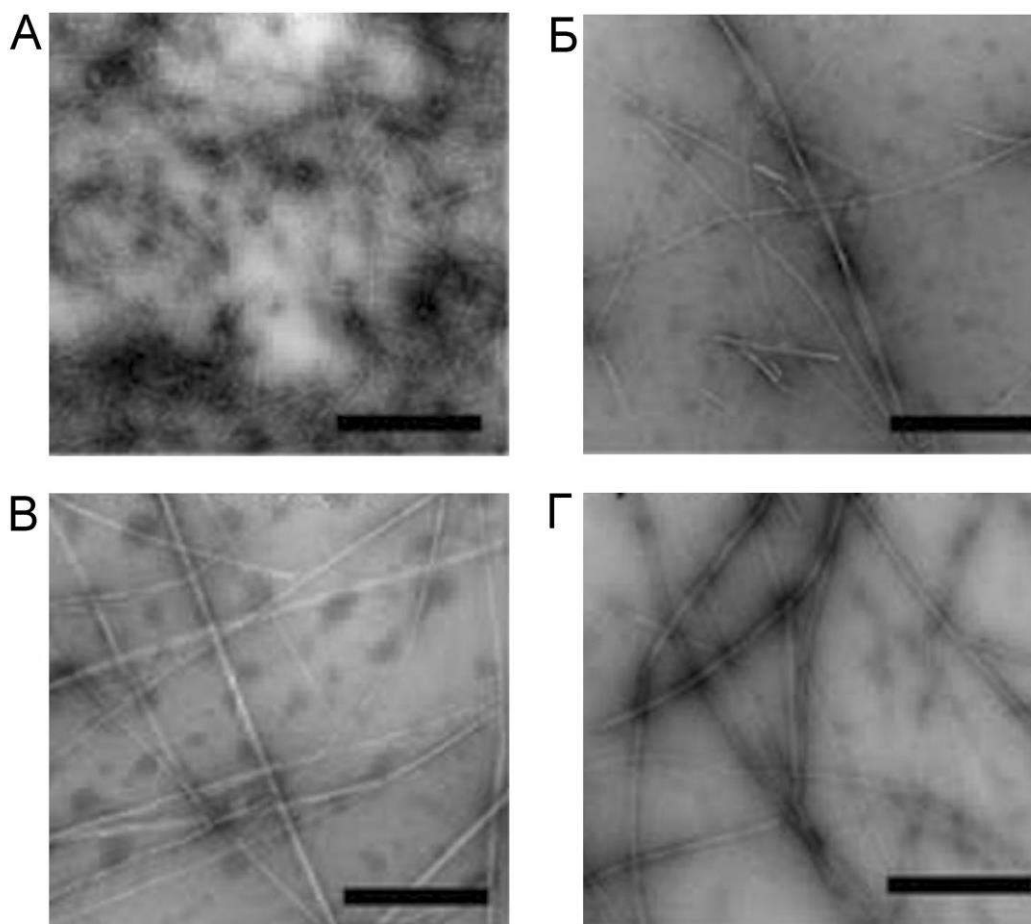


Рис. 1.13. ТЭМ-изображения фибрилл гормонов: кортикотропин-релизинг фактор (А); глюкагоноподобный пептид (Б); бомбезин (В); β -эндорфин (Г). Масштаб – 500 нм [Maji et al., 2009].

Адренокортикотропный гормон (АСТН) представляет собой одноцепочечный полипептид, состоящий из 39 аминокислотных остатков. Для полного проявления биологической активности гормона необходимы 24 N-концевые аминокислоты, которые гомологичны у разных видов животных, в то время как С-концевые аминокислоты значительно варьируют. АСТН (1-24) играет главную роль в физиологических эффектах АСТН (1-39).

Секреция АСТН находится под контролем кортикотропин-релизинг гормона гипоталамуса. АСТН, в свою очередь, стимулирует продукцию кортикостероидов корой надпочечников. Широкий спектр биологической активности АСТН включает и поджелудочную железу в качестве органа-мишени. В частности, было показано, что АСТН участвует в стимуляции секреции инсулина из поджелудочной железы [Borelli et al., 1994; Gagliardino

et al., 1995; Al-Majed et al., 2004], а также что АСТН вызывает гипогликемию [Lebovitz et al., 1965].

Было обнаружено, что при связывании АСТН с рецепторами плазматических мембран происходит значительное увеличение уровня внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата (сАМР). Интересно, что аналоги сАМР имитировали физиологические эффекты АСТН [Mountjoy et al., 1992]. Поэтому было предположено участие сАМР в реализации действия АСТН на β -клетки поджелудочной железы. Однако, было установлено, что одним из ключевых факторов, участвующих в секреции инсулина является концентрация внутриклеточного кальция и что изменения его уровня влияют на стимуляцию секреции инсулина из β -клеток поджелудочной железы под действием АСТН [Gronda et al., 1992, Gagliardino et al., 1995]. Регуляция уровня АСТН осуществляется по механизму отрицательной обратной связи, включающей кортиколиберин и глюкокортикоиды, причем, избыточные количества АСТН могут тормозить продукцию кортиколиберина.

Важная роль в регуляции образования и секреции АСТН принадлежит центральной нервной системе. В этом процессе принимает участие ряд нейромедиаторов, в том числе норадреналин, ацетилхолин и серотонин. Скорее всего, именно нейромедиаторы опосредуют участие АСТН в адаптации к стрессу. АСТН стимулирует продукцию глюкокортикоидов, необходимых для адаптации человека к стрессорным реакциям различного типа, возникающих, в частности, при физических нагрузках, хирургических операциях, физических или эмоциональных травмах.

Исследования показали, что АСТН не образует амилоидов *in vitro*. Однако он образует амилоидоподобные агрегаты в присутствии β -эндорфина и агрегирует вместе с ним [Maji et al., 2009]. АСТН локализуется вместе с β -эндорфином в секреторных гранулах и в тканях гипофиза крыс (Рис. 1.14). Возможно, накопление АСТН в секреторных гранулах в амилоидной форме

осуществляется в результате его взаимодействия с β -эндорфином [Ranganathan et al., 2012].

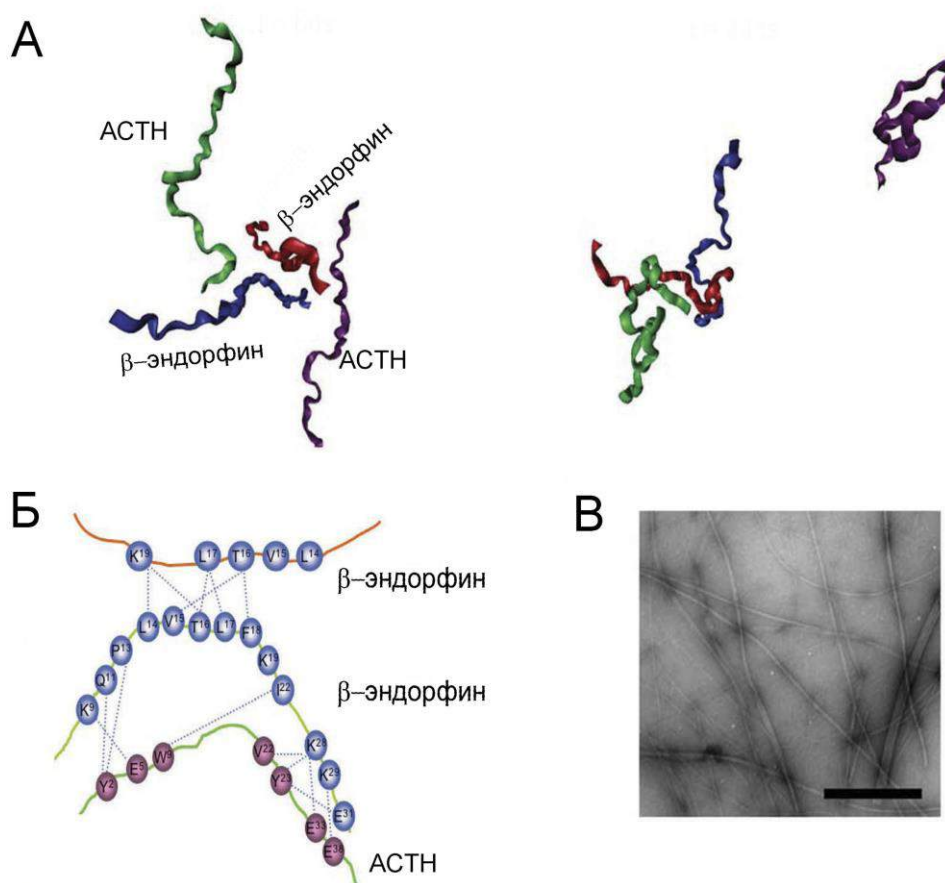


Рис. 1.14. Моделирование взаимодействия между АСТН и β -эндорфином. (А) Взаимодействие двух молекул АСТН и двух молекул β -эндорфина. Слева – схематическое представление индивидуальных пептидов, справа – их комплекса. (Б) Схематическое представление водородных связей, образуемых между пептидами. (В) ТЭМ-изображение амилоидного комплекса АСТН и β -эндорфина. Масштаб – 500 нм. [Ranganathan et al., 2012].

Исследования взаимодействия гормонов поджелудочной железы – инсулина и амилина, а главное – амилоидогенеза амилина важны для понимания патогенеза и лечения сахарного диабета 2 типа [Laybutt et al., 2007; Lin et al., 2007]. Согласно общепринятой точке зрения фибриллообразование амилина может являться причиной сахарного диабета 2 типа. Инсулин экспрессируется и секретируется вместе с амилином *in vivo*. При нормальных условиях мономер амилина растворим. Молярное соотношение амилин:инсулин в здоровых β -

клетках составляет 1:100, однако, у больных сахарным диабетом 2 типа это соотношение изменяется до 1:20 [Hull et al., 2004].

В секреторных гранулах инсулин в форме гексамеров стабилизируется ионами цинка [Hutton, 1989; Smith et al., 2003]. Обычно инсулин занимает 80–90% объема секреторной гранулы при его концентрации около 40 мМ, образуя плотное ядро. Остальное содержимое, включая амилин, располагается по периферии гранулы. Таким образом, в здоровых β -клетках содержание амилина составляет 0,8–4 мМ, однако, исследования *in vitro* показали, что уже при наномолярных концентрациях образуются фибриллы [Knight and Miranker, 2004; Knight et al., 2008]. Амилин образует фибриллы шириной около 10 нм и длиной 200–400 нм (Рис. 1.15, А). На рисунке 1.15, Б продемонстрирован плотный слой агрегированных фибрилл амилина.

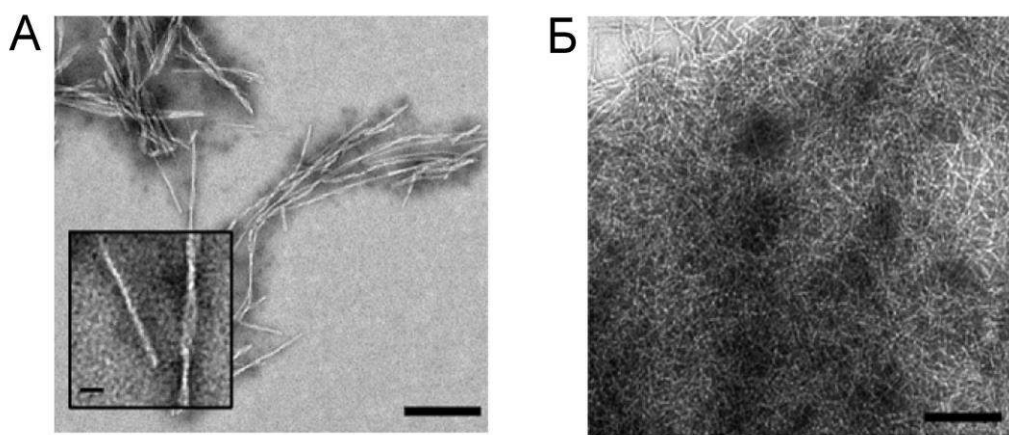


Рис. 1.15. Электронные микрофотографии волокон амилина. (А) фибриллы амилина, (Б) плотный слой фибрилл амилина. Масштаб – 200 нм, во вставке – 20 нм. [Larson and Miranker, 2004].

В предотвращении образования фибрилл участвуют С-пептид, проинсулин, инсулин, действия которых зависят от ионной силы и рН среды. Эффекты инсулина продемонстрированы во многих исследованиях *in vitro* [Jaikaran et al., 2004; Knight and Miranker, 2004; Gilead et al., 2006; Knight et al., 2008; Cui et al., 2009], однако механизмы ингибирования инсулином фибриллообразования амилина изучены недостаточно. Предполагают, что взаимодействие цинка с амилином может стабилизировать его в форме

растворимого мономера [Brender et al., 2010]. Было показано также, что инсулин способен стабилизировать амилин в мономерном неамилоидогенном состоянии при молярном стехиометрическом соотношении 1:1 в течение длительного времени за счет образования гетерогенных кластеров инсулина и амилина. Один мономер амилина связывает до трех мономеров инсулина [Susa et al., 2014]. Не исключается взаимодействие инсулина с олигомерами амилина, которое может приводить к ингибированию фибриллообразования амилина [Knight et al., 2008; Cui et al., 2009; Wang and Raleigh, 2014].

Было показано также, что ингибирование агрегации амилина зависит от олигомерного состояния инсулина, которое зависит от концентрации цинка в секреторных гранулах β -клетки [Nedumpully-Govindan and Ding, 2015]. При снижении концентрации цинка равновесие сдвигается в сторону растворимых мономеров и димеров инсулина. Связывание мономеров амилина с мономерами и димерами инсулина конкурирует с димеризацией амилина. Способность мономеров и димеров инсулина при высокой концентрации связывать мономеры амилина, ингибировать образование гомодимеров амилина и его агрегацию снижает риск развития сахарного диабета 2 типа [Nedumpully-Govindan and Ding, 2015].

Амилоиды гормонов не токсичны, они сохраняются внутри секреторных гранул, формирование которых может строго регулироваться. Регуляция может включать процессинг прогормонов, которые агрегируют более медленно, чем сам гормон [Yonemoto et al., 2008]. Более того, эти амилоидные фибриллы диссоциируют при секреции. Такая регуляция зависит от гомеостаза. Если белковый гомеостаз изменяется, например, при определенной диете, стрессе или старении, агрегация гормона может выйти из-под контроля, что вызывает развитие патологических состояний, индуцируемых образованием амилоидных фибрилл [Maji et al., 2009]. Сведения о регуляции агрегации белков, которые содержат области, склонные к агрегации, ограничены [Gsproner and Babu, 2012]. Тем не менее, для некоторых функциональных амилоидов были обнаружены контрольные механизмы, регулирующие процессы агрегации [Fowler et al., 2007; Maji et al., 2009].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

В работе использовали α -лактальбумин коровьего молока, дрожжевую АДГ, рекомбинантный инсулин человека, пептиды Arg-Phe, Asp-Phe, Lys-Leu и АСТН (1-24), L-аргинин моногидрохлорид, L-лизин моногидрохлорид, ДТТ, этиленгликольтетраацетат (ЭГТА), ThT, bis-ANS, натриевая соль триметилсилил-пропионовой кислоты (TSP), GuHCl фирмы Sigma (США); додецилсульфат натрия (ДСН) фирмы Bio-Rad (США); лизоцим куриного яйца фирмы ApplyChem (США), акриламид, N,N'-метиленбисакриламид фирмы MP Biomedicals (США), персульфат аммония, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, стандарты молекулярной массы фирмы Serva (Германия). α -Кристаллин из хрусталиков глаза быка был любезно предоставлен д.б.н. К.О. Мурановым (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук). Для ультрафильтрации использовали центрифужные фильтры Ultra-0.5, 100 кДа, а также центрифужные фильтры – Microcon, 30 кДа фирмы Amicon (США) и фильтры Anotop 10 Whatman, 20 нм (США). Остальные реактивы были отечественного производства марки х.ч. или о.с.ч. Использовали воду, деионизованную с помощью системы Easy-Pure II RF фирмы Barnstead (США).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Динамическое лазерное светорассеяние

Динамическое лазерное светорассеяние широко используется для изучения кинетики агрегации белков и определения размеров агрегатов.

Представленная ниже зависимость автокорреляционной функции $G(\tau)$ флуктуаций интенсивности рассеянного света (Рис. 2.1) есть функция от времени τ , которая может быть представлена в виде дифференциального уравнения первого порядка:

$$G(\tau) = b[1 + \varepsilon \exp(-\tau/\tau_c)] , \quad (1)$$

где базовый уровень корреляции b пропорционален интенсивности I . Коэффициент ε зависит от количества рассеянного света и от апертуры, этот коэффициент всегда меньше единицы.

Коэффициент диффузии D частиц, главным образом, связан со скоростью затухания τ_c корреляционной функции, зависящей от времени:

$$D = \frac{1}{2\tau_c k^2} , \quad (2)$$

где k – модуль волнового вектора рассеяния, $k = \frac{2\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$, n – показатель преломления растворителя, λ – длина волны рассеиваемого излучения в вакууме и θ – угол регистрации рассеянного света.

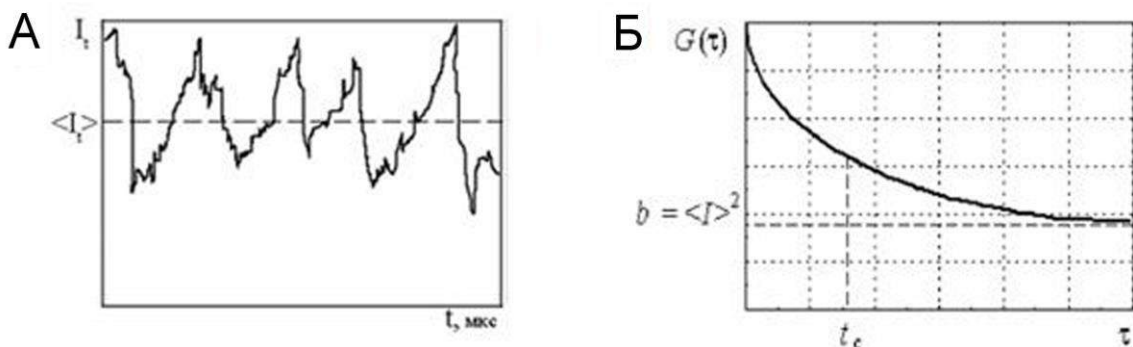


Рис. 2.1. Схематическое представление флуктуаций интенсивности светорассеяния, регистрируемых в малом объеме в микросекундном временном интервале (А) и автокорреляционной функции $G(t)$ (Б).

Для сферических частиц одинакового размера, находящихся в среде с известной динамической вязкостью η , можно определить величину гидродинамического радиуса R , используя соотношение Стокса-Эйнштейна:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}, \quad (3)$$

где k_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость растворителя при температуре T .

Размер частицы, вычисляемый из уравнения (3), назван гидродинамическим радиусом, так как его размер превышает размер простой частицы вследствие возможного образования слоев растворителя или адсорбируемых ионов. В большинстве случаев эти слои вносят незначительную поправку к размеру, за исключением измерения частиц малых размеров. Уравнения (1) и (2) действительны для невзаимодействующих сферических частиц. Если частицы вовлечены в процесс агрегации, эти уравнения можно применять для оценки изменения кажущегося размера частицы в том случае, когда характерное время кинетики агрегации намного больше времени измерений.

Измерения проводили при помощи коммерческой установки фотометра рассеянного лазерного света Photocor (Photocor Instruments Inc., США, www.photocor.com) с He-Ne лазером мощностью 10 мВт и длиной волны падающего света 632,8 нм (Coherent, США, модель 31-2082). Температуру образцов поддерживали при помощи пропорционально-интегрально-дифференциального регулятора PhotoCor-TC в пределах $\pm 0,1$ °С; такой регулятор позволяет также осуществлять нагрев образца с постоянной скоростью. Сигнал светорассеяния от образца наблюдали под углом 90°. Кросскорреляционная система и быстрый коррелятор дают возможность измерять частицы в очень широком диапазоне от 1 нм до 5 мкм. Особенность установки Photocor состоит в том, что это – многофункциональное

оборудование для изучения как статического (интенсивность) так и динамического (корреляционная функция, зависящая от времени) светорассеяния [Yudin et al., 1997]. Автокорреляционные функции измеряли при помощи Photocor-FC в режиме multiple-tau с логарифмическим расположением точек корреляции во времени. Персональный компьютер выполняет анализ данных и контролирует работу прибора с помощью установленной программы PhotoCor версии 5.3.3. Обработку автокорреляционных функций и расчёт размеров гидродинамического радиуса R_h проводили при помощи программы DynaLS (Alango, Израиль) версии 2.5.2.

He-Ne лазер и фокусирующая система установки зафиксированы на оптической платформе (Рис. 2.2). Термостат и кюветодержатель анализируемого образца расположены симметрично на гониометре. Фотоприемник (счетчик фотонов модели “PhotoCor-PC3”) находится на вращающемся рычаге гониометра и состоит из сменной системы отверстий, необходимой для подбора апертуры нужного диаметра, фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) с низким уровнем шумов и усиливающего фотодетектора. Чтобы избежать последующих искажений поступающего сигнала, используется квазикорреляционная схема с двумя ФЭУ.



Рис. 2.2. Установка Photocor – прибор для измерения статического и динамического лазерного светорассеяния.

При изучении кинетики агрегации раствор белка помещали в стеклянную кювету цилиндрической формы и предварительно прогревали ее в течение 10 минут при заданной температуре. Инкубацию проводили при 37 °С в 25 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7.0) в присутствии 150 мМ NaCl и 10 мМ ДТТ. При инкубации α -лактальбумина в среду добавляли 1 мМ ЭГТА. При необходимости в некоторых экспериментах изменяли рН буфера, концентрацию NaCl или ДТТ. Агрегацию регистрировали с момента внесения ДТТ в кювету с раствором белка. Конечный объем исследуемого образца в кювете составлял от 0,3 до 0,5 мл. Регистрация каждой пробы производилась автоматически, каждые 60 секунд. Эксперименты повторяли 3–5 раз, при обработке результатов относительную интенсивность представляли как среднее значение \pm стандартная ошибка.

Концентрацию белков определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты экстинкции A_{280} (0,1%) равные 1,28; 2,01; 2,65 для АДГ (UniProt, P00331), α -лактальбумина (P00711), лизоцима (P00698) соответственно, [ExPASy Proteomics Server, http://au.expasy.org](http://au.expasy.org) и $\epsilon_{280 \text{ нм}} = 1,0 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для инсулина (Gill and von Hippel, 1989). Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Nanophotometer P330 Implen (Германия).

2.2.2. Флуоресцентные методы исследования

2.2.2.1. Флуоресценция тиофлавина Т

В работе использовали флуоресцентный спектрофотометр Cary Eclipse (Varian), оснащенный Пельтье-контролируемым кюветодержателем и термодатчиком, и кварцевые кюветы 1×1 см. Ширина щелей возбуждающего и анализирующего монохроматоров варьировалась в зависимости от условий эксперимента (главным образом, 5 и 2,5 нм соответственно). Спектры флуоресценции записывали при постоянной температуре. Данный прибор позволяет регистрировать спектры флуоресценции одновременно для

четырёх образцов и использовать при этом две длины волны возбуждения и регистрации флуоресценции.

Флуоресценцию ThT возбуждали светом с длиной волны 440 нм и регистрировали значения интенсивности флуоресценции при 485 нм. Концентрация ThT составляла 50 мкМ.

2.2.2.2. Флуоресценция bis-ANS

Для анализа гидрофобных свойств агрегатов белков и их комплексов с аминокислотами и пептидами использовали гидрофобный зонд bis-ANS. Флуоресценцию bis-ANS возбуждали светом с длиной волны 395 нм и регистрировали значения интенсивности флуоресценции при 400 нм. Ширина щелей возбуждающего и анализирующего монохроматоров варьировалась в зависимости от условий эксперимента (главным образом, 5 и 2,5 нм соответственно). Образцы белка инкубировали при постоянной температуре. Эксперименты проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian), оснащённом Пельтье-контролируемым кюветодержателем и термодатчиком. Концентрация bis-ANS составляла 5 мкМ.

2.2.3. Турбидиметрия

Образование агрегатов приводит к повышению мутности раствора. Этот процесс контролировали, измеряя светорассеяние на флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse (Varian). Образцы инкубировали при постоянной температуре и длине волны 360 нм. Ширина щелей возбуждающего и анализирующего монохроматоров – 5 нм.

2.2.4. Спектроскопия кругового дихроизма

Основу метода КД составляет взаимодействие поляризованного света с оптически активными молекулами. С помощью дихрографа измеряли разницу между молярными коэффициентами поглощения для лево- и правовращающего света ($\Delta\epsilon$), выраженную в $M^{-1}\cdot cm^{-1}$. Другой единицей измерения КД является молярная эллиптичность (θ , мград), при исследовании белков часто используют молярную эллиптичность, приведенную на один аминокислотный остаток, которая также обозначается θ и рассчитывается по формуле:

$$[\theta] = (M \cdot \theta_\lambda) / 10 \cdot d \cdot C ,$$

где θ_λ – молярная эллиптичность, M – средняя молекулярная масса одного аминокислотного остатка (110 Да), d – длина оптического пути в см, C – концентрация белка в г/л. Полученная величина имеет размерность $град \cdot см^2 \cdot дмоль^{-1}$.

Для получения информации о третичной и вторичной структурах белков используют спектры КД в ближнем (250–300 нм) и дальнем (<250 нм) ультрафиолете соответственно. На спектр КД в ближней ультрафиолетовой области влияет асимметричность окружения ароматических остатков, тогда как на спектр КД в дальней ультрафиолетовой области влияет вторичная структура белка (α -спирали, β -складки и неупорядоченные структуры). При этом α -спиральные структуры имеют отрицательные максимумы поглощения при 222 и 208 нм, а также положительный максимум при 192 нм; β -складчатые структуры имеют отрицательный максимум при 215 нм и положительный при 198 нм [Sreerama and Woody, 2000, 2004].

Спектры КД в дальней ультрафиолетовой области регистрировали при 37 °С в интервале 190–260 нм на приборе Chirascan Circular Dichroism Spectrometer (Applied Photophysics, Великобритания). Оптическая система

данного прибора обеспечивает максимальное светопропускание, особенно в дальнем ультрафиолете. Система сбора и обработки информации позволяет регистрировать максимально точные, неискаженные спектры.

Образцы готовили в 25 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7.0 или 8.0), содержащем 150 мМ NaCl. Для индукции агрегации белков добавляли 5 или 10 мМ ДТТ. Использовали кюветы с длиной оптического пути 0,1 или 0,2 мм. Спектры снимали от 3-х до 10-ти раз, усредняли и вычитали спектр буфера. Работа проводилась совместно с к.б.н. Шубиным В.В., Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), институт биохимии им. А.Н. Баха.

2.2.5. Трансмиссионная электронная микроскопия

Для исследования морфологических свойств образцов с помощью электронной микроскопии каплю материала (5–8 мкл) помещали на 2–3 минуты на медные сетки (300-mesh), покрытые пленкой из формвара. Затем сетки снимали, избыток жидкости удаляли и укладывали их на 1–2 минуты на каплю контрастера, в качестве которого использовали 2% фосфорновольфрамовую кислоту (pH 7.2) или 1% уранилацетат. Затем с сеток удаляли лишнюю жидкость и досушивали их на воздухе при комнатной температуре. Полученные образцы исследовали на электронном микроскопе JEOL JEM-100CX (Япония) при 80 кV и номинальном увеличении 30000–50000 и фотографировали на негативную пленку Kodak Camera EL. Полученные микрофотографии сканировали, используя планшетный сканер Umax Astra 6700 с разрешением изображения 600 dpi. Работа проводилась совместно с к.б.н. Штейн-Марголиной В.А., Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), институт биохимии им. А.Н. Баха.

2.2.6. Атомно-силовая микроскопия

АСМ – разновидность зондовой микроскопии; в основе метода лежит силовое взаимодействие атомов материала зонда и исследуемого образца. Зонд (игла) расположен на свободном конце кантилевера. Зонды в основном изготавливают из таких материалов, как кремний Si и Si₃N₄. Кантилевер – это упругая пластинка, по отклонению которой можно судить о силе взаимодействия иглы с образцом. В зависимости от расстояний от иглы до образца, используемых для получения АСМ-изображений, возможны следующие режимы работы АСМ: контактный, бесконтактный и полуконтактный. При контактном режиме расстояние от иглы до образца составляет нескольких десятых нанометра, при этом игла АСМ находится в мягком физическом контакте с образцом и подвержена действию сил отталкивания. Взаимодействие между иглой и образцом заставляет кантилевер изгибаться, повторяя топографию поверхности. АСМ проводили на сканирующем зондовом микроскопе SmartSPM фирмы ООО «АИСТ-НТ», Россия (Рис. 2.3).



Рис. 2.3. Сканирующий зондовый микроскоп SmartSPM фирмы АИСТ-НТ.

Важную роль в получении изображения в АСМ играет приготовление образцов. При работе с биохимическими веществами их обычно адсорбируют на подложке. В наших экспериментах для исследования образцов с помощью АСМ каждый образец разбавляли Na-фосфатным буфером (1:2), затем наносили по 5 мкл раствора на поверхность очищенной слюды и высушивали.

Работа проводилась совместно с к.б.н. Сафенковой И.В., Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), институт биохимии им. А.Н. Баха.

2.2.7. Ультрафильтрация

Для разделения агрегатов α -лактальбумина и α -кристаллина по размерам использовали центрифужные фильтры, имеющие порог отсечения молекулярной массы 100 кДа фирмы Amicon (США). Фракционирование агрегатов проводили с помощью центрифуги Centrifuge tipe MPW-310 (Польша). При этом 100–150 мкл исследуемой смеси помещали на фильтр и центрифугировали пробирки при 9000 g до уменьшения объема раствора над фильтром примерно вдвое. Отобранные образцы фильтрата и ретентата использовали для определения в этих фракциях концентрации белка, а также исследовали с помощью электрофореза в ПААГ.

2.2.8. Электрофорез в полиакриламидном геле

Для анализа белкового состава образцов использовали метод Леммли [Laemmli, 1970] в градиентной буферной системе на геле толщиной 1 мм, в мини-системе для электрофореза Mini VE (Amersham Biosciences, США). В качестве стандартов использовали белки с молекулярной массой, кДа: ферритин, 450; каталаза, 240; альдолаза, 160; бычий сывороточный альбумин, 67; овальбумин, 45; ингибитор трипсина, 20; α -лактальбумин, 14,2. Белок окрашивали раствором Кумасси Синего R-250.

Для электрофореза в неденатурирующих условиях использовали гомогенный 10% разделяющий гель. Полимеризацию инициировали добавлением персульфата аммония и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина до конечной концентрации 0,1%. Пробы готовили добавлением 1/4 объема 4-х

кратного буфера для образцов (0,25 М трис-НСl, 40% глицерин, 0,004% бромфеноловый синий, 5% меркаптоэтанол, рН 6,8). Для электрофореза в денатурирующих условиях использовали 12,5% разделяющий полиакриламидный гель аналогичного состава с добавлением 0,4 % ДСН. Буфер для образцов содержал 4 % ДСН. После добавления буфера пробы кипятили при 100 °С в течение 5 мин. Электрофорез проводили при силе тока, равной 20 мА, на гель, толщиной 1 мм и шириной 10 см, до входа лидирующего красителя в разделяющий гель и 40 мА на гель после входа индикатора в разделяющий гель.

При окрашивании раствором Кумасси гель помещали в фиксирующий раствор (10% уксусная кислота, 40% этанол) на 30 мин для фиксации белков и удаления ДСН. После этого гель окрашивали раствором Кумасси (0,4% Кумасси, 40% этанол, 10% уксусная кислота) в течение часа, а избыток красителя удаляли, нагревая окрашенный гель в водяной бане в дистиллированной воде с добавлением уксусной кислоты. Полученные гели сканировали, используя сканер Epson Perfection 4180.

2.2.9. Аналитическое ультрацентрифугирование

Использование аналитического ультрацентрифугирования позволяет исследовать олигомерное состояние белков, а также его изменения в результате взаимодействия белок–лиганд. Эксперименты по скоростной седиментации были выполнены на аналитической ультрацентрифуге «Spinco» Model E (Beckman, США) с использованием абсорбционной оптической системы, фотоэлектрического сканнера, монохроматора и компьютера. Ротор выдерживали в течение ночи в термостате при 37 °С. Растворы белков помещали в предварительно нагретый ротор. Профили седиментации α -лактальбумина, α -кристаллина и их смеси регистрировали путем измерения оптической плотности при 285 нм против буфера, содержащего 20 мМ ДТТ, при скорости вращения ротора 52000 об/мин.

Интервал времени между сканированиями составлял 2,5 мин. Коэффициенты седиментации приводили к стандартным условиям (растворитель с плотностью и вязкостью воды при 20 °С) и рассчитывали с помощью программ SEDFIT и SEDNTERP. Результаты представлены в виде дифференциальных распределений коэффициентов седиментации [с(s) против S]. Работа проводилась совместно с д.б.н. Чеботаревой Н.А., Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), институт биохимии им. А.Н. Баха.

2.2.10. Гель-проникающая хроматография

Смесь α -лактальбумина (1 мг/мл) и α -кристаллина (0,4 мг/мл) инкубировали в присутствии ДТТ в конечном объеме 6 мл при 37 °С при условиях, аналогичных для экспериментов с использованием ДЛС. В конце процесса инкубации образцы охлаждали в ледяной бане и центрифугировали при 14500 g в течение 15 минут с использованием центрифуги MiniSpin Eppendorf (Германия). Супернатант наносили на колонку (GE HealthCare, Sephacryl S200 superfine, 25×900 mm) и проводили гель-фильтрацию при скорости потока 0,6 мл/мин при 20 °С. Фракции основных пиков были собраны и проанализированы с помощью электрофореза в ПААГ. Работа проводилась совместно с д.б.н. Мурановым К.О. и к.б.н. Полянским Н.Б., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

2.2.11. Ядерный магнитный резонанс

Современные возможности спектроскопии ЯМР позволяют исследовать не только пространственное строение вещества и механизмов протекания химических процессов, но и внутри- и межмолекулярные

перегруппировки. В ряду этих процессов особый интерес вызывает изучение конформационных превращений молекул белка в растворах, возникающих в результате его взаимодействия с лигандами, и динамических свойств образующихся комплексов, поскольку в роли лигандов часто выступают лекарственные препараты.

^1H ЯМР-спектры были получены с помощью спектрометра Bruker Avance 600 (Германия) с резонансной частотой 600 МГц, оснащенного тройным резонансом (^1H , ^{13}C и ^{15}N) в импульсном режиме с градиентом поля. Опыты проводились при 25 °С в 25 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7.0, или 8.0, содержащем инсулин в конечной концентрации 0,6 мг/мл (~ 0,1 мМ), 150 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ в отсутствие или в присутствии аргинина в концентрации 100 мМ. Каждый образец содержал 90% H_2O /10% D_2O . TSP в концентрации 15 мкМ был добавлен в качестве внутреннего стандарта. Общий объем составлял 0,35 мл в ЯМР-ампуле Shigemi диаметром 5 мм. ЯМР-спектры были измерены с помощью одномерной последовательности импульсов с вычетом резонанса воды с помощью биномиальной процедуры WATERGATE W3 [Piotto, 1992].

ЯМР-спектры были обработаны и проанализированы с помощью программного обеспечения Mnova (Mestrelab исследования, Испания). Работа проводилась совместно с д.х.н. Польшаковым В.И. и к.х.н. Жоховым С.С., Центр магнитной томографии и спектроскопии факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Модельные белковые субстраты

α -Лактальбумин – небольшой, кислый, глобулярный Ca^{2+} -связывающий белок молока, состоящий из 123 аминокислотных остатков и содержащий 4 дисульфидные связи и ни одной свободной тиоловой группы [Christina et al., 2000; Permyakov and Berliner, 2000]. Его молекулярная масса составляет 14,6 кДа. По данным рентгеноструктурного анализа трехмерная структура α -лактальбумина аналогична структуре лизоцима [Acharya et al., 1994]. Нативный белок содержит два домена – большой α -спиральный домен и малый β -складчатый домен (Рис. 3.1). Структура α -лактальбумина стабилизируется дисульфидными связями и катионом кальция. Его часто используют в качестве модели Ca^{2+} -связывающего белка, поскольку он обладает сильным Ca^{2+} -связывающим центром [Hiraoka et al., 1980; Permyakov et al., 1981]. Связывание кальция приводит к сильным изменениям четвертичной структуры белка [Пермяков и др., 1982; McKenzie and White, 1987; Anderson et al. 1997]. С помощью дифференциальной сканирующей калориметрии показано, что связывание кальция сдвигает температуру плавления к более высоким значениям [Grigo et al., 1994; Veprintsev et al, 1997].

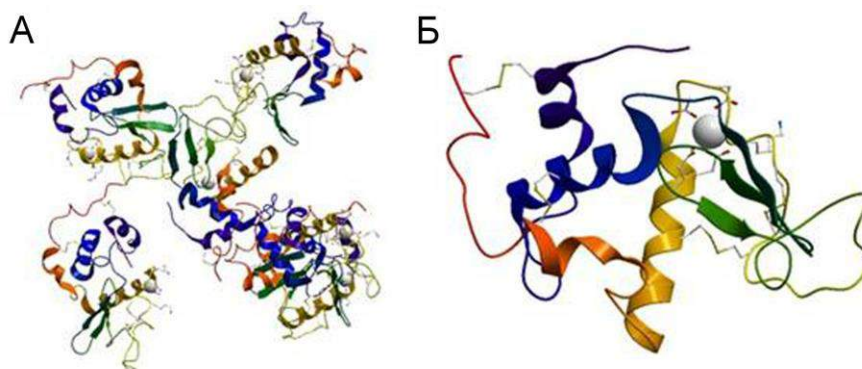


Рис. 3.1. Трехмерная структура α -лактальбумина: гексамер (А) и мономер (Б). Показаны основные элементы вторичной структуры и ион Ca^{2+} (серый шарик) (UniProt, P00771).

α -Лактальбумин – один из активно используемых модельных субстратов. Он играет важную роль в секреторных клетках молочных желез,

являясь одним из двух компонентов лактозосинтазы, катализирующей последний шаг биосинтеза лактозы в молочной железе [Hill and Brew, 1975]. Вторым компонентом лактозосинтазы является галактозилтрансфераза. Сам по себе этот белок способен переносить галактозу с уридиндифосфат-галактозы на N-ацетилглюкозамин. α -Лактальбумин меняет специфичность галактозилтрансферазы, и лактозосинтаза переносит галактозу не на N-ацетилглюкозамин, а на глюкозу, что приводит к образованию лактозы. Галактозилтрансфераза присутствует в большинстве органов и тканей, в то время как α -лактальбумин обнаруживается только в лактирующей молочной железе [Permyakov and Berliner, 2000; Horwich, 2002]. Предполагают, однако, что этот белок может выполнять много других важных функций. В частности, было показано, что некоторые формы α -лактальбумина могут индуцировать апоптоз опухолевых клеток [Hakansson et al, 1995; Svensson et al., 1999].

α -Лактальбумин имеет несколько частично свернутых промежуточных состояний, которые вызывают интерес исследователей, занимающихся проблемами фолдинга белка. При кислом значении pH в апо-состоянии при повышенных температурах α -лактальбумин является классической «расплавленной глобулой» [Dolgikh et al., 1981; Permyakov et al., 1981; Kuwajima, 1996].

Лизоцим (КФ 3.2.1.17) – щелочной глобулярный белок с молекулярной массой 14,6 кДа, состоящий из 129 аминокислотных остатков. В организме человека он был обнаружен в селезенке, легких, почках, лейкоцитах, молоке, слезах и слюне. Лизоцим катализирует гидролиз β -1,4 гликозидных связей между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином мукополисахаридов бактериальной стенки.

С тех пор, как лизоцим был обнаружен Флемингом в 1922 году, он используется в качестве модели для исследований фолдинга белка. Обширные исследования сворачивания лизоцима показали, как различные области этого белка взаимодействуют друг с другом. Пространственная структура лизоцима

хорошо изучена (Рис. 3.2), разработаны методы, позволяющие исследовать изменение структуры лизоцима в различных условиях. Большое количество информации, полученное при индукции/ингибировании агрегации лизоцима в различных условиях *in vitro*, делает лизоцим идеальным модельным белком для исследования механизмов агрегации и фибриллообразования [Swaminathan, 2011], а также для испытания новых фармакологических препаратов для борьбы с амилоидозами [Merlini and Belotti, 2003].

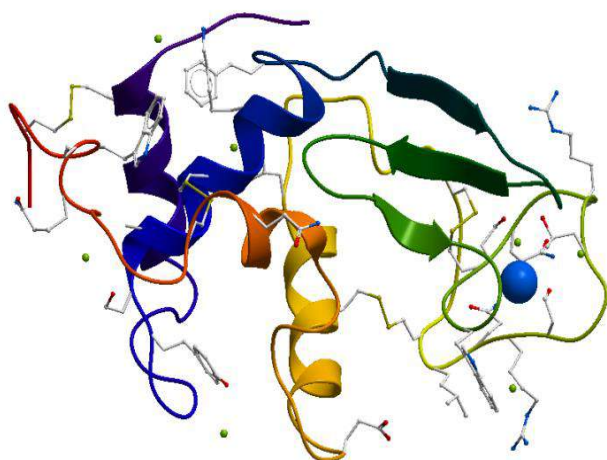


Рис. 3.2. Трехмерная структура лизоцима. Показаны основные элементы вторичной структуры, ион Na^+ (большой синий шарик) и ионы хлора Cl^- (маленькие шарики) (UniProt, P00698).

Исследования самоассоциации и агрегации лизоцима приобрели особую важность после того, как было обнаружено, что точечные мутации в лизоциме человека коррелируют с наследственными системными амилоидозами, главным образом, в печени и почках [Perys et al., 1993]. Понимание механизмов агрегации лизоцима важно для разработки терапевтических подходов к лечению системного амилоидоза. Были разработаны условия *in vitro*, вызывающие фибриллообразование лизоцима куриного яйца. При изучении влияния pH и температуры на фибриллогенез лизоцима было показано, что для образования фибрилл лизоцима человека и куриного яйца необходимо повышение температуры до 55–65 °C и снижение pH до 2.0–2.5 [Arnaudov and de Vries, 2005].

В переходных состояниях, предшествующих фибриллогенезу лизоцима куриного яйца, α -домен этого белка остается структурированным, в то время

как β -домен теряет свою вторичную структуру. Поэтому было сделано предположение, что именно β -домен играет ключевую роль в процессе фибриллогенеза [Horwich, 2002]. Это предположение было подтверждено результатами работы, свидетельствующей о том, что фрагмент β -домена лизоцима куриного яйца, содержащий аминокислотные остатки 49–63 (GSTDYGILQINSRWWS), способен формировать фибриллы [Krebs et al., 2000]. При определенных условиях образование фибрилл лизоцима куриного яйца может происходить при полном восстановлении дисульфидных связей в этом белке [Cao et al., 2004].

Интересно, что в биотехнологических исследованиях лизоцим использовался в качестве модели для восстановления активного рекомбинантного белка из телец включения с использованием аргинина. Около 95% активного белка было получено из денатурированного лизоцима в присутствии 0,75–1 М аргинина [Hevehan and Clark, 1997]. Аргинин в концентрации около 1 М подавлял агрегацию лизоцима [Reddy et al., 2005].

Алкогольдегидрогеназа млекопитающих (алкоголь: NAD⁺оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.1) является гомоолигомером, состоящим из субъединиц с молекулярной массой 36,7 кДа и содержащим ионы Zn²⁺. Установлено, что АДГ животных преимущественно находится в форме димера [Зимин и др., 2001; Зимин и Соловьева, 2009]. Для некоторых ферментов из бактерий и дрожжей характерны тетрамерные формы АДГ (Рис. 3.3).

Дрожжевая АДГ состоит из одинаковых субъединиц, на субъединицу приходится 2 иона цинка, один – в каталитическом центре [Veillon and Sytkowski, 1975], другой стабилизирует петлю [Magonet et al., 1992]. В каталитическом центре атом цинка связывает три аминокислотных остатка (Cys-46, His-67 и Cys-174). При удалении цинка активный сайт становится менее стабильным [Янг и Жоу, 2001]. В каждой субъединице имеются

области, участвующие в образовании центров связывания субстрата и кофермента – NAD.

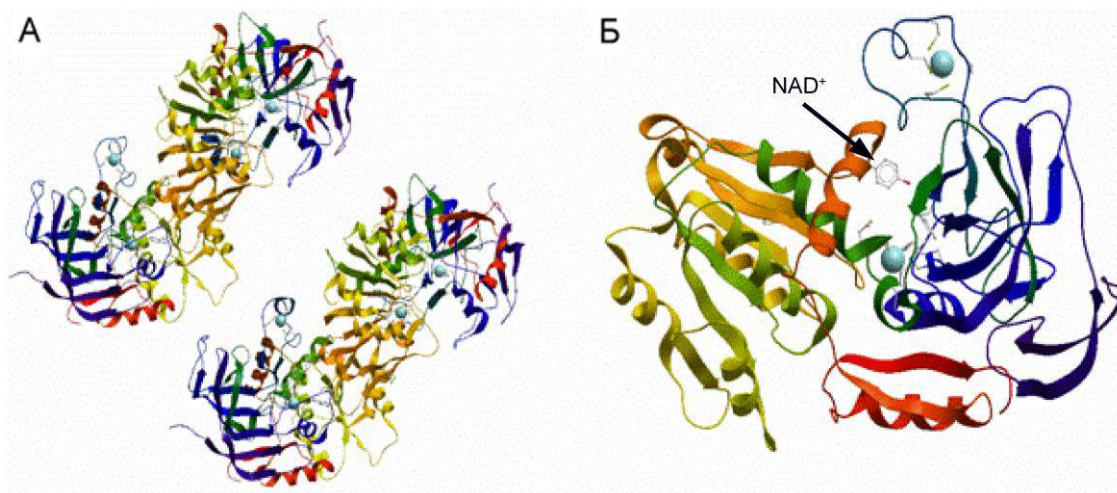


Рис. 3.3. Трехмерная структура дрожжевой алкогольдегидрогеназы: тетрамер (А) и мономер (Б). Показаны основные элементы вторичной структуры, ионы Zn^{2+} (голубые шарики) и NAD^+ (показан стрелкой) (UniProt, P00331).

АДГ может существовать в двух состояниях – восстановленном и окисленном. Восстановленная молекула АДГ быстро инактивируется, в то время как окисленная – более стабильна. Инкубация фермента с ДТТ приводит к восстановлению дисульфидных связей и удалению структурного цинка, не влияя на атомы цинка в каталитическом центре [De Bolle et al., 1995; Янг и Жоу, 2001]. Это не влияет на активность фермента, однако он становится более чувствительным к термической денатурации [Le et al., 1996].

АДГ катализирует окисление спиртов и восстановление альдегидов в присутствии коферментов NAD и NADH:



В физиологических условиях ферментативная реакция сдвинута в сторону образования эндогенного этанола, а не ацетальдегида [Ашмарин, 2003].

Фермент широко распространен в природе, он выделен из различных органов человека и животных [Han et al., 2010; Herdendorf, 2011]. АДГ человека

локализуется в желудочно-кишечном тракте, почках, эндокринных железах, мозге. Фермент сосредоточен преимущественно в цитозольной фракции, не исключается возможность его взаимодействия с мембранами субклеточных органелл, в частности, митохондрий [Зимин и др., 2012].

АДГ является популярным модельным белком для исследований, связанных с агрегацией и действием шаперонов [Sharma et al., 2000; Bukach et al., 2004]. Было показано также, что сахара защищают этот фермент от необратимой инактивации, индуцированной повышенной температурой [Miroliaeli and Nemat-Gorgani, 2001]. Было показано, что этим свойством обладает и аргинин [Lutova et al., 2007].

Инсулин – белковый гормон, состоящий из 51 аминокислотных остатков, контролирующей уровень глюкозы в крови. С инсулином связано одно из тяжелых заболеваний – сахарный диабет. Выделяют сахарный диабет 1 типа, при котором нарушается секреция инсулина β -клетками поджелудочной железы, и сахарный диабет 2 типа, характеризующийся хронической гипергликемией, развивающейся в результате нарушения взаимодействия инсулина с рецепторами клеток-мишеней. При развитии сахарного диабета 2 типа наблюдается амилоидогенез амилина.

Инсулин состоит из А-цепи (21 аминокислотных остатков) и В-цепи (30 аминокислотных остатков), соединенных двумя дисульфидными связями. В нативном состоянии инсулин представлен в виде мономеров, димеров, тетрамеров и гексамеров [Nettleton et al. 2000; Hua and Weiss 2004; Gibson and Murphy, 2006]. Физиологическая форма инсулина в поджелудочной железе представлена гексамером, связанным с Zn^{2+} , который образуется при ассоциации трех димеров (Рис. 3.4).

Диссоциация олигомерной формы до мономера необходима для проявления инсулином биологической активности. Распад гексамеров и частичное разворачивание мономеров происходит под воздействием кислых значений рН, повышенной температуры или контакта с гидрофобными

поверхностями, что приводит к агрегации и последующему образованию амилоидных фибрилл [Sharp et al., 2002; Ahmad et al., 2003; Hua and Weiss, 2004].

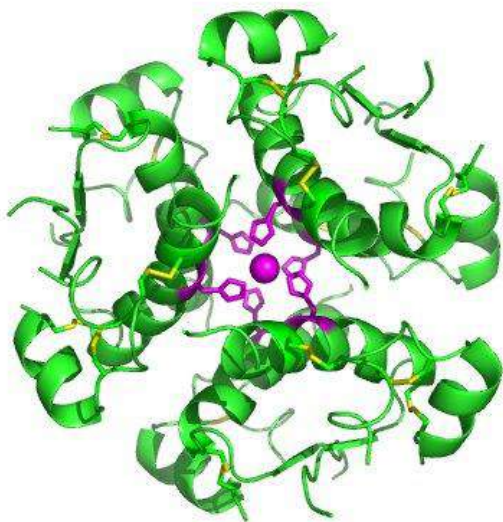


Рис. 3.4. Инсулин в виде гексамера. Показаны основные элементы вторичной структуры, атом Zn^{2+} (сиреневый шарик) и остатки гистидина (выделены сиреневым цветом) (Chang et al., 1997).

Фибриллообразование инсулина ингибируется соединениями, которые предотвращают разворачивание нативного белка или связывают частично агрегированные интермедиаты. В их числе низкомолекулярные соединения, такие как бетаин, трегалоза и цитруллин [Arora et al., 2004], а также лецитины, циклодекстрины и полимерные сурфактанты (ПАВ) [Thurrow and Geisen, 1984; Grau and Saudek, 1987; Brewster et al., 1991; Brange et al., 1997]. Эти ингибиторы агрегации являются неспецифическими, они обычно эффективны только при относительно высоких концентрациях инсулина [Gibson and Murphy, 2006].

3.2. Изучение влияния аргинина на кинетику агрегации модельных белков

Была проведена серия экспериментов, направленная на выявление участия аргинина в электростатических взаимодействиях с 4-мя модельными

белками с различным суммарным зарядом при различных экспериментальных условиях.

3.2.1. α -Лактальбумин. Выше было отмечено отличие структурной стабильности α -лактальбумина в связанной с кальцием и свободной от кальция формах. При стрессорных условиях форма α -лактальбумина в отсутствие кальция достигает классического состояния расплавленной глобулы [Kuwaita, 1996]. В серии экспериментов по определению действия аргинина на кинетику ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина белковая агрегация в отсутствие аргинина не наблюдалась (Рис. 3.5, А, кривая 1). Представленные кинетические кривые агрегации α -лактальбумина, инкубированного в 25 мМ Na-фосфатном буфере, рН 7.0, содержащем 120 мМ NaCl, 1 мМ ЭГТА и 10 мМ ДТТ, демонстрируют способность аргинина индуцировать агрегацию уже при концентрации 10 мМ. Добавление аргинина в концентрации 100 мМ приводит к ускорению процесса агрегации. При этом растут скорость агрегации и размеры гидродинамических радиусов, а также уменьшается лаг-период (Рис. 3.5, А).

При более высокой концентрации NaCl (150 мМ) наблюдалось увеличение интенсивности светорассеяния и размеров гидродинамического радиуса частиц, образуемых в растворе α -лактальбумина в отсутствие аргинина (Рис. 3.5, Б). На этом фоне продемонстрировано концентрационно-зависимое усиление процесса агрегации в присутствии аргинина при концентрациях в диапазоне 10 – 100 мМ.

При концентрациях, превышающих 200 мМ, наблюдается противоположный эффект, при котором аргинин ингибирует агрегацию. Полное торможение процесса наблюдали в присутствии 1 М аргинина. Интересно отметить, что аргинин при концентрации 200 мМ играет одновременно роли индуктора и супрессора белковой агрегации. В роли индуктора аргинин снижал лаг-период агрегации, а в роли супрессора – уменьшал интенсивность светорассеяния и размеры гидродинамических радиусов. На основании

результатов, показанных на рисунке 3.5, Б, была построена зависимость относительной интенсивности светорассеяния агрегатов от концентрации аргинина (Рис. 3.5, В). Из рисунка следует, что аргинин в концентрации 100 мМ максимально ускоряет агрегацию α -лактальбумина.

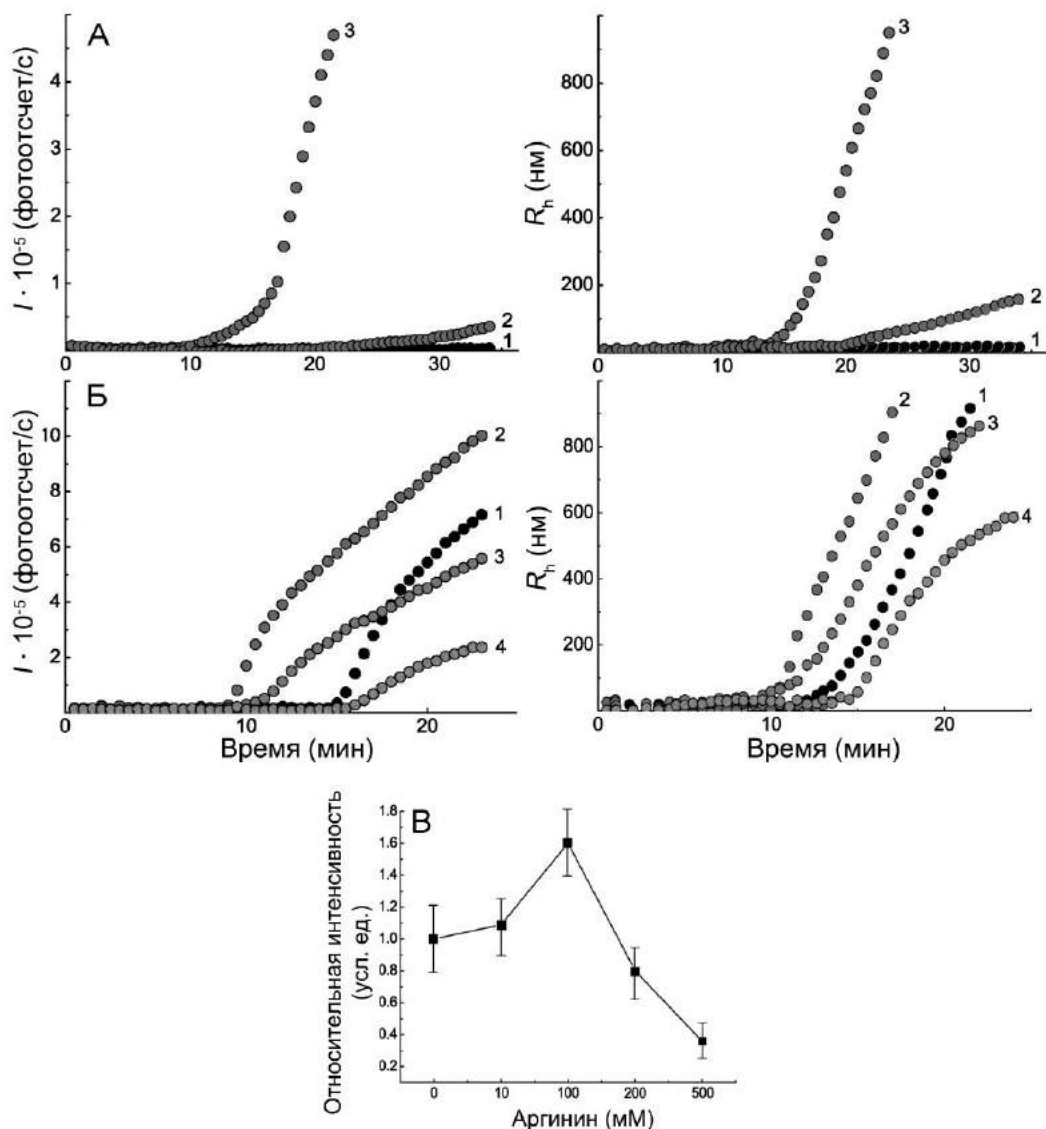


Рис. 3.5. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) и значений гидродинамического радиуса (R_h) от времени инкубации α -лактальбумина (2 мг/мл). (А) α -Лактальбумин инкубировали в отсутствие (1) или в присутствии Arg в концентрациях 10 и 100 мМ (2 и 3 соответственно) в 25 мМ фосфатном буфере (рН 7.0), содержащем 120 мМ NaCl и 10 мМ ДТТ; (Б) α -Лактальбумин инкубировали 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. (В) 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.

Был также исследован процесс агрегатообразования α -лактальбумина при добавлении аргинина в различные моменты инкубации. Даже через 60 минут

инкубации при 120 мМ NaCl агрегация белка в отсутствие аргинина была незначительной (Рис. 3.6, А). После добавления в инкубационную смесь аргинина в конечной концентрации 100 мМ, процесс агрегации значительно усиливался. Представленные результаты показывают, что при добавлении аргинина в раствор α -лактальбумина после его инкубации в присутствии ДТТ в течение 25 минут индуцируется процесс агрегации (Рис. 3.6, А). Распределение агрегатов по размерам во времени изменялось в соответствии с кинетическими кривыми интенсивности светорассеяния (Рис. 3.6, вставка). При дальнейшей инкубации размер агрегатов быстро сдвигался к уровню более высоких значений гидродинамического радиуса.

Было показано, что при добавлении аргинина (100 мМ) на более позднем этапе процесса агрегации α -лактальбумина наблюдаются аналогичные изменения в кинетике агрегации субстрата. В этом случае аргинин был добавлен в раствор α -лактальбумина после 115 минут инкубации в присутствии ДТТ. Подобную кинетику агрегации наблюдали после добавления аргинина в раствор α -лактальбумина в самом начале инкубационного процесса одновременно с ДТТ (Рис. 3.6, Б).

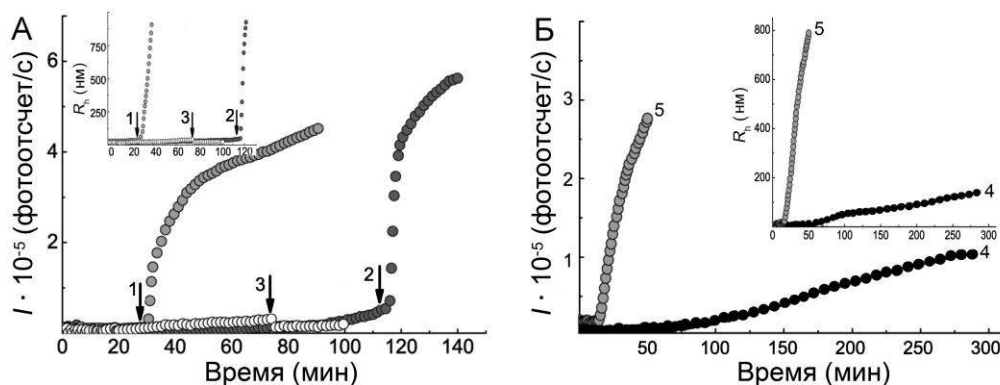


Рис. 3.6. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) (А) и значений гидродинамического радиуса (R_h) (вставка) от времени инкубации α -лактальбумина в отсутствие или присутствии Arg. Arg в конечной концентрации 100 мМ добавляли в образец α -лактальбумина (показано стрелками), инкубированного в присутствии ДТТ в течение 25 или 115 мин (1 и 2 соответственно). В контрольные пробы добавляли буфер (показано стрелкой) вместо Arg после инкубации белка в течение 72 мин (3). Зависимости интенсивности светорассеяния (I) (Б) и значений гидродинамического радиуса (R_h) (вставка) от времени инкубации α -лактальбумина (1 мг/мл) в отсутствие (4) или присутствии (5) 100 мМ Arg, добавляемого в образец в начале процесса инкубации.

В этом случае значительное увеличение интенсивности светорассеяния, индуцируемое аргинином, наблюдали после лаг-периода около 12 минут, гораздо более короткого по сравнению с контролем. При этом начальная скорость процесса агрегации значительно больше, чем в контроле. Таким образом, было продемонстрировано удивительное свойство аргинина при низких концентрациях индуцировать парадоксальное ускорение агрегации модельного белка, в противоположность общепринятому мнению об аргинине как супрессоре агрегации белков [Tsumoto et al., 2004; Arakawa et al., 2007 a; Waynes et al., 2005; Das et al., 2007].

3.2.2. Алкогольдегидрогеназа. Действие аргинина на агрегацию белков было также исследовано с использованием дрожжевой АДГ в качестве модельного субстрата. В этом случае также наблюдали противоположно направленные эффекты аргинина на кинетику агрегации АДГ: добавление аргинина в концентрации 100 мМ приводило к существенному увеличению скорости агрегации и уменьшению лаг-периода, в то время как аргинин при более высоких концентрациях ингибировал процесс агрегации (Рис. 3.7). Результаты аналогичны данным, полученным с использованием α -лактальбумина в качестве модельного субстрата. Это может быть связано с близкими значениями pI данных белков.

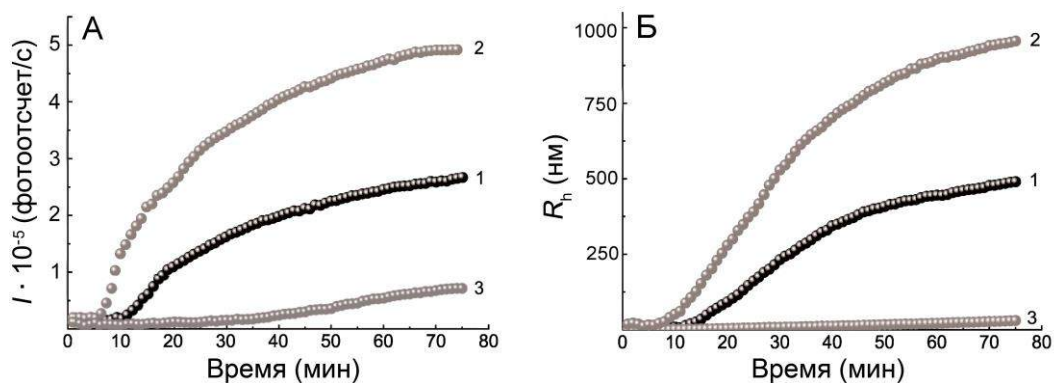


Рис. 3.7. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) (А) и значений гидродинамического радиуса (R_h) (Б) от времени инкубации АДГ (1 мг/мл) в отсутствие (1) или присутствии Arg в концентрациях 0,1 и 1 М (2 и 3 соответственно).

3.2.3. Инсулин. Была исследована также кинетика агрегации инсулина в зависимости от концентрации аргинина. При относительно низкой концентрации аргинина было продемонстрировано ускорение белковой агрегации, в то время как высокие концентрации действовали противоположным образом и приводили к подавлению процесса агрегации модельного белка (Рис. 3.8, А).

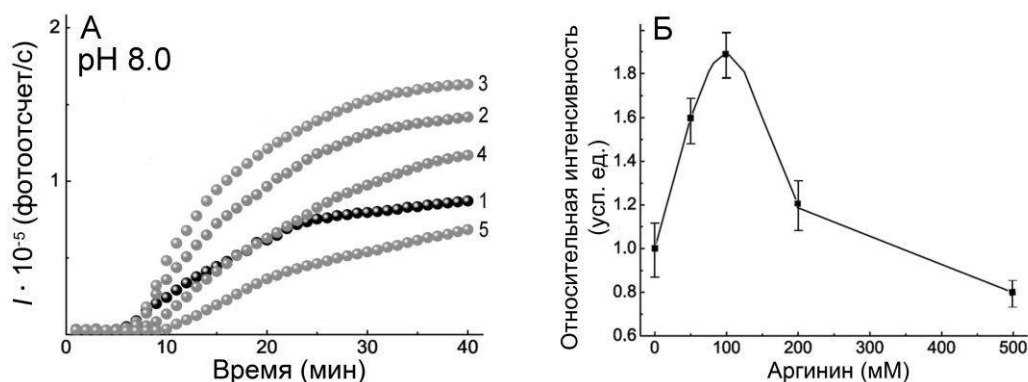


Рис. 3.8. Противоположно направленное действие различных концентраций Arg на кинетику агрегации инсулина. (А) Зависимости интенсивности светорассеяния (I) от времени инкубации инсулина (0,25 мг/мл) в отсутствие (1) или присутствии Arg в концентрациях 50, 100, 200 и 500 мМ (2, 3, 4 и 5 соответственно) при pH 8.0. (Б) Зависимость относительной интенсивности светорассеяния агрегатов инсулина, образованных при инкубации белка в течение 30 мин, от концентрации Arg. Интенсивность светорассеяния в отсутствие Arg принята за 1.

В этом случае также проявляется противоположно направленное действие аргинина, играющего роль как супрессора, так и индуктора белковой агрегации. Результаты показывают, что аргинин при низких концентрациях в диапазоне 10–100 мМ увеличивает начальную скорость агрегации инсулина концентрационно-зависимым способом. При представленных экспериментальных условиях аргинин в концентрации 100 мМ проявлял максимальный стимулирующий эффект (Рис. 3.8, Б). Противоположное действие наблюдалось при концентрации аргинина 500 мМ. Процесс агрегации полностью подавлялся в присутствии 1 М аргинина.

Интересно отметить, что в присутствии аргинина в концентрации 200 мМ увеличивается начальная скорость агрегации, но также возрастает

лаг-период. При этом аргинин играет роль как индуктора, так и супрессора агрегации. Аналогичное концентрационно-зависимое действие аргинина на агрегацию было получено на α -лактальбумине в качестве модельного субстрата (Рис. 3.5, В).

3.2.4. Лизоцим. В отдельной серии экспериментов был использован лизоцим куриного яйца в качестве модельного белка. Хотя α -лактальбумин и лизоцим содержат 123 и 129 аминокислотных остатков соответственно и имеют гомологичные трехмерные структуры, в противоположность действию α -лактальбумина, ускорения агрегации лизоцима в присутствии низких концентраций аргинина не было выявлено при аналогичных экспериментальных условиях. Аргинин в концентрациях 10 и 100 мМ тормозил агрегацию лизоцима (Рис. 3.9).

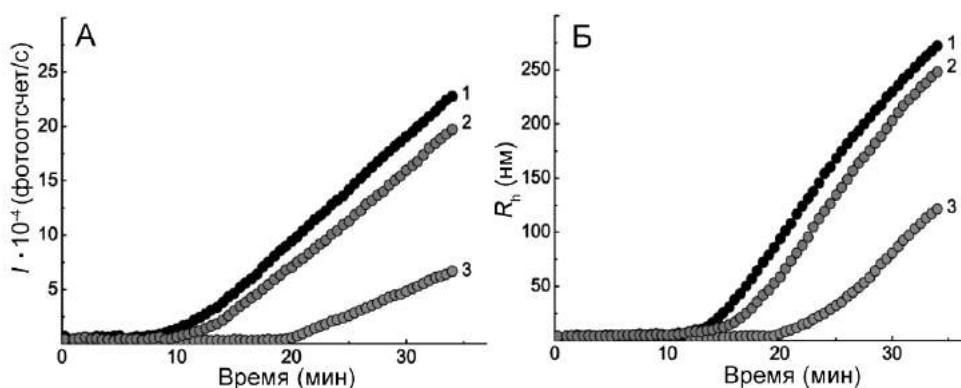


Рис. 3.9. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) (А) и значений гидродинамического радиуса (R_h) (Б) от времени инкубации лизоцима (0,2 мг/мл) в отсутствие (1) или присутствии Arg в концентрациях 10 и 100 мМ (2 и 3 соответственно).

Результаты показывают, что заряд модельного субстрата играет существенную роль в процессе агрегации, поэтому была исследована агрегация модельных белков в зависимости от pH среды.

3.3. Влияние аргинина на кинетику агрегации модельных белков в зависимости от pH среды

3.3.1. Инсулин. На модельном белке, инсулине, наблюдали разнонаправленное действие аргинина в зависимости от pH среды. Были исследованы зависимости от времени интенсивности светорассеяния и размеров гидродинамического радиуса агрегатов инсулина, образующихся в процессе инкубации при 37 °С в Na-фосфатном буфере, pH 7.0. Представленные кинетические кривые показывают, что при данных условиях аргинин в концентрациях 10, 100 и 500 мМ вызывает снижение интенсивности светорассеяния концентрационно-зависимым способом, по сравнению с агрегацией инсулина в отсутствие аргинина (Рис. 3.10, А). При концентрации аргинина 500 мМ наблюдалось полное ингибирование агрегации модельного белка. Размеры агрегатов изменялись в соответствии с кинетическими кривыми интенсивности светорассеяния.

В отдельной серии экспериментов процесс агрегации проводили при таких же условиях за исключением одного параметра – образцы инкубировали при pH 8.0. В этом случае добавление аргинина значительно ускоряло агрегацию инсулина. Представленные кинетические кривые интенсивности светорассеяния и распределения частиц по радиусам показывают, что в присутствии аргинина в концентрации 100 мМ увеличивается скорость агрегации после короткого лаг-периода (5 минут) по сравнению с контролем (Рис. 3.10, Б). Частицы с R_h более 800 нм регистрировались в системе через 30 минут после начала процесса. При дальнейшей инкубации размеры агрегатов сдвигались к более высоким значениям гидродинамического радиуса. В присутствии 500 мМ аргинина агрегация полностью подавлялась.

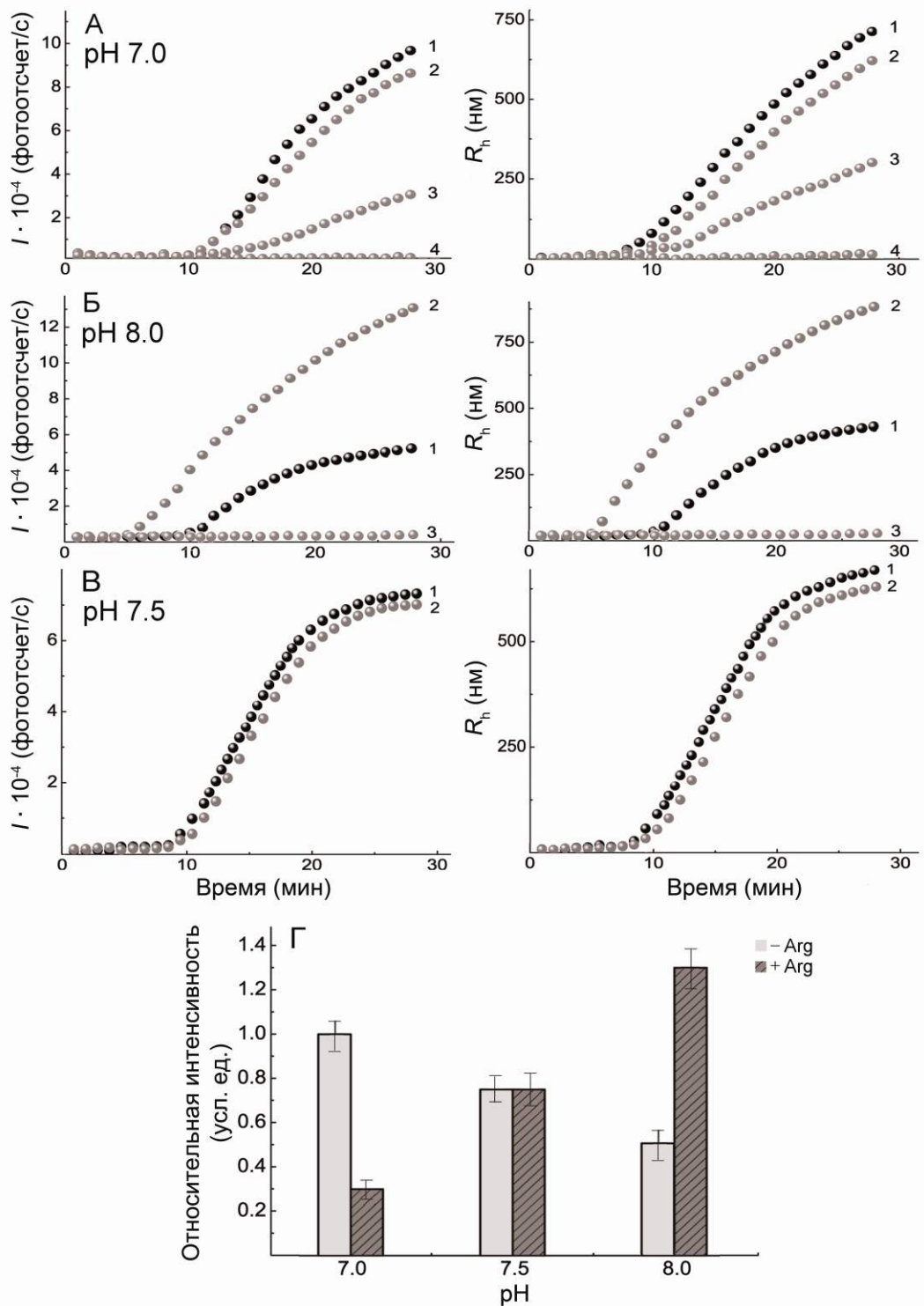


Рис. 3.10. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) и значений гидродинамического радиуса (R_h) от времени инкубации инсулина (0,2 мг/мл) (**А**) в отсутствие (**1**) или в присутствии Arg в концентрациях 10, 100 и 500 мМ (**2, 3 и 4** соответственно) при pH 7.0; (**Б**) в отсутствие (**1**) или 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**) Гистограмма pH-зависимого действия Arg. 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.

Когда инсулин инкубировали при аналогичных условиях при рН 7.5, добавление 100 мМ аргинина не изменяло скорости агрегации белка по сравнению с контролем (Рис. 3.10, В). рН-зависимые эффекты аргинина при рН 7.0, 7.5 и 8.0 наглядно представлены на гистограмме (Рис. 3.10, Г).

Изменения относительной интенсивности светорассеяния при титровании раствора при рН в области 7.0–8.0 в отсутствие или в присутствии аргинина продемонстрировано на рисунке 3.11. Важно отметить, что интенсивность светорассеяния агрегатов инсулина в отсутствие эффектора при рН 8.0 значительно ниже, чем при рН 7.0. Можно предположить, что это происходит вследствие депротонирования аминокислотных остатков при рН 8.0, которое вызывает изменения в суммарном заряде белковой молекулы. В присутствии аргинина интенсивность светорассеяния при рН 8.0 гораздо выше, чем при рН 7.0.

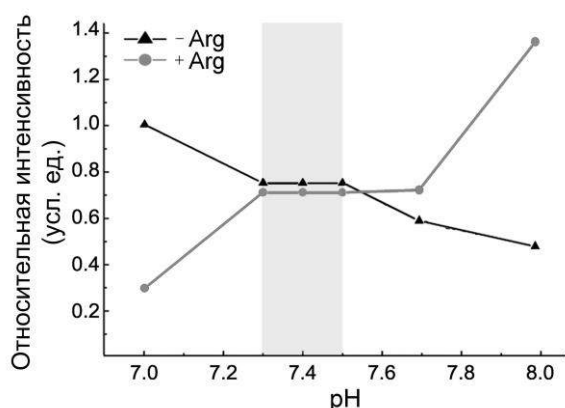


Рис. 3.11. рН-зависимая агрегация инсулина (0,2 мг/мл). Относительная интенсивность светорассеяния агрегатов инсулина, образованных при инкубации белка в течение 30 мин, при титровании инкубационной смеси в области рН 7.0–8.0 в отсутствие или присутствии Arg (100 мМ). Относительная интенсивность светорассеяния агрегатов инсулина в отсутствие Arg (контроль) при рН 7.0 принята за 1.

Интересно отметить, что в условиях эксперимента в промежуточной области рН от 7.3 до 7.5 относительная интенсивность светорассеяния агрегатов инсулина в отсутствие или в присутствии аргинина приблизительно равны. Однако интенсивность светорассеяния в присутствии аргинина повышается в 2 раза при увеличении рН от 7.7 до 8.0. Таким образом, рН среды влияет на кинетику агрегации модельных белков. Аргинин, широко используемый супрессор белковой агрегации, проявляет противоположно направленные эффекты (торможение или ускорение агрегации) при изменении рН в узком диапазоне физиологических значений.

3.3.2. α -Лактальбумин. Было исследовано также действие рН на агрегацию α -лактальбумина в отсутствие или в присутствии аргинина. В условиях данного эксперимента при рН 7.0 α -лактальбумин в отсутствие аргинина не агрегировал. При постепенном снижении рН среды интенсивность агрегации белка увеличивалась (Рис. 3.12).

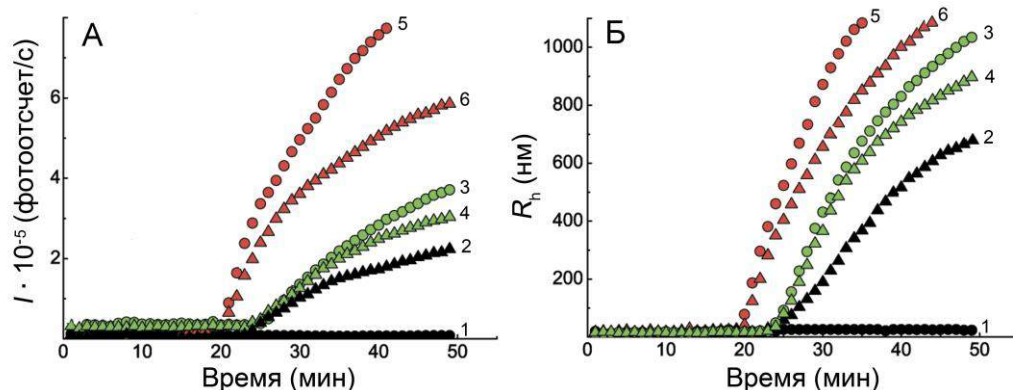


Рис. 3.12. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) (А) и значений гидродинамического радиуса (R_h) (Б) от времени инкубации α -лактальбумина (0,5 мг/мл) в отсутствие (1, 3, 5) или присутствии 100 мМ Arg (2, 4, 6) при рН – 7.0 (1, 2), 6.6 (3, 4) и 6.0 (5, 6).

При рН 6.0 аргинин подавляет агрегацию α -лактальбумина, при рН 7.0 – индуцирует агрегацию, при рН 6.6 кинетические кривые агрегации почти не отличаются от контроля. Размеры частиц изменяются в соответствии с интенсивностью светорассеяния.

3.4. Исследование молекулярных механизмов действия аргинина на агрегацию белков

3.4.1. Влияние лизина на агрегацию белков

Чтобы выявить участие гуанидиновой группы аргинина в механизме торможения или ускорения белковой агрегации, вместо аргинина использовали другую положительно-заряженную аминокислоту – лизин, не содержащий гуанидиновой группы.

Инсулин. Была исследована агрегация инсулина в отсутствие и в присутствии лизина в концентрациях 100–500 мМ (Рис. 3.13). При добавлении лизина интенсивность светорассеяния значительно увеличивается концентрационно-зависимым способом. Размеры агрегатов также увеличивались в соответствии с интенсивностью светорассеяния.

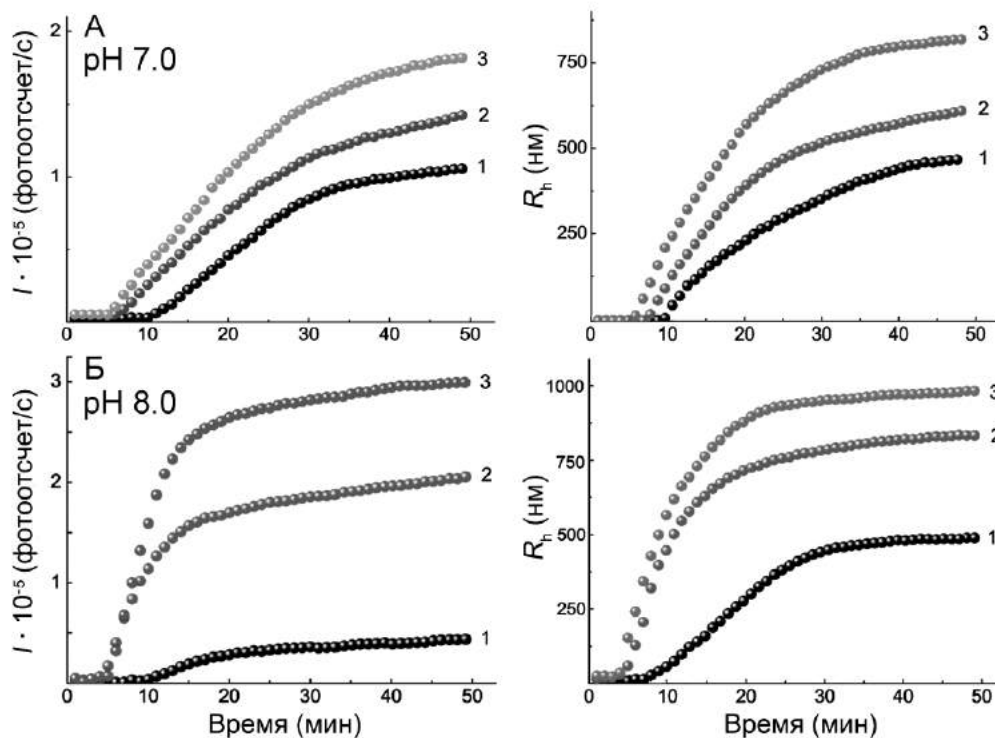


Рис. 3.13. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) и значений гидродинамического радиуса (R_h) от времени инкубации инсулина (0,2 мг/мл) при рН 7.0 (А) и 8.0 (Б) в отсутствие (1) или присутствии Lys в концентрациях 100 и 500 мМ (2 и 3 соответственно).

В противоположность действию аргинина, подавление агрегации инсулина не наблюдалось, даже при высокой концентрации лизина (500 мМ). Интересно отметить, что добавление лизина в концентрациях 100–500 мМ к раствору инсулина приводило к ускорению процесса агрегации как при рН 7.0, так и при рН 8.0, однако, стимулирующий эффект лизина был гораздо более выраженный при рН 8.0, чем при рН 7.0.

В другой серии экспериментов было исследовано действие аргинина и лизина на агрегацию инсулина в условиях, когда инсулин в отсутствие эффекторов не агрегировал в течение длительного времени инкубации (Рис. 3.14, А и Б, кривая 1). Однако при рН 8.0 добавление аргинина в концентрациях 10–100 мМ вызывало индукцию агрегации и ее быстрое

развитие концентрационно-зависимым способом. При концентрации 100 мМ лизин обладал большей способностью ускорять агрегацию инсулина, чем аргинин (Рис. 3.14, А и Б, кривые 2 и 3).

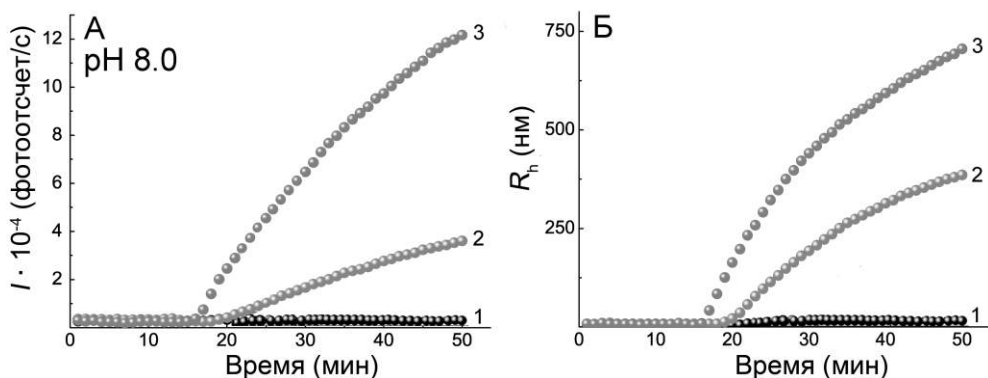


Рис. 3.14. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) (А) и значений гидродинамического радиуса (R_h) (Б) от времени инкубации инсулина (0,15 мг/мл) в отсутствие (1) или присутствии 100 мМ Arg или 100 мМ Lys (2 и 3 соответственно). Образцы инкубировали при pH 8.0 и 5 мМ ДТТ.

α -Лактальбумин. В условиях данного эксперимента, в отсутствие эффектора агрегация α -лактальбумина не проявлялась при инкубации с ДТТ в течение 90 минут (Рис. 3.15). Представленный пример кинетики агрегации показывает, что при добавлении лизина в концентрациях от 50 до 300 мМ интенсивность светорассеяния агрегатов постепенно растет, а лаг-период агрегации уменьшается концентрационно-зависимым способом (Рис. 3.15, А).

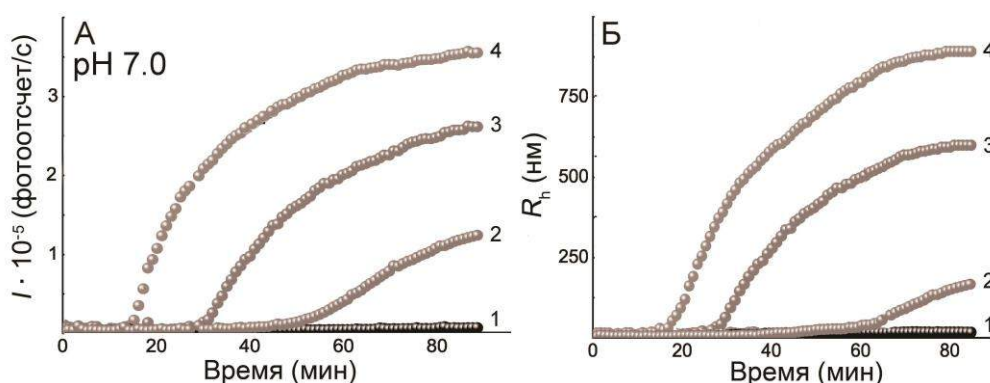


Рис. 3.15. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) (А) и значений гидродинамического радиуса (R_h) (Б) от времени инкубации α -лактальбумина (1 мг/мл) при pH 7.0 в отсутствие (1) или присутствии Lys в концентрациях 50, 100 и 300 мМ (2, 3 и 4 соответственно).

Распределение агрегатов по их размерам во времени менялось в соответствии с кинетическими кривыми интенсивности светорассеяния (Рис.

3.15, Б). При дальнейшей инкубации размеры агрегатов быстро сдвигались к большим значениям гидродинамического радиуса. Концентрационно-зависимое ускорение агрегации инсулина и α -лактальбумина в присутствии лизина показывает, что наличие гуанидиновой группы в молекуле аминокислоты не является обязательным условием для усиления агрегации.

3.4.2. Действие гуанидин гидрохлорида на агрегацию белков

α -Лактальбумин. С использованием α -лактальбумина в качестве модельного субстрата было показано, что GuHCl при низких концентрациях усиливает, а при высоких – ингибирует процесс агрегации (Рис. 3.16). Анализ интенсивности светорассеяния и размеров гидродинамического радиуса агрегатов показал, что добавление GuHCl в концентрации 100 мМ приводит к существенному увеличению скорости агрегации и уменьшению лаг-периода. Однако процесс агрегации полностью подавляется в присутствии 500 мМ GuHCl .

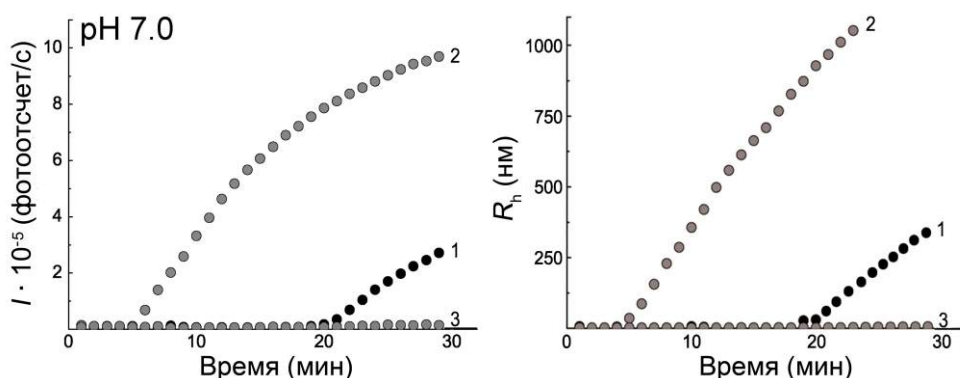


Рис. 3.16. Зависимости интенсивности светорассеяния (А) и значений гидродинамического радиуса (R_h) (Б) от времени инкубации α -лактальбумина (1 мг/мл) при pH 7.0 в отсутствие (1) или присутствии GuHCl в концентрациях 100 и 500 мМ (2 и 3 соответственно).

Инсулин. Было изучено действие GuHCl на кинетику агрегации инсулина. Результаты показали, что GuHCl ингибирует или ускоряет процесс при pH 7.0 или pH 8.0 соответственно (Рис. 3.17). Агрегацию инсулина (0,25

мг/мл) анализировали с помощью турбидиметрии путем измерения кажущейся оптической плотности при 360 нм. Результаты показывают, что добавление 300 мМ GuHCl приводит к значительному снижению скорости и уменьшению лаг-периода агрегации (Рис. 3.17, А).

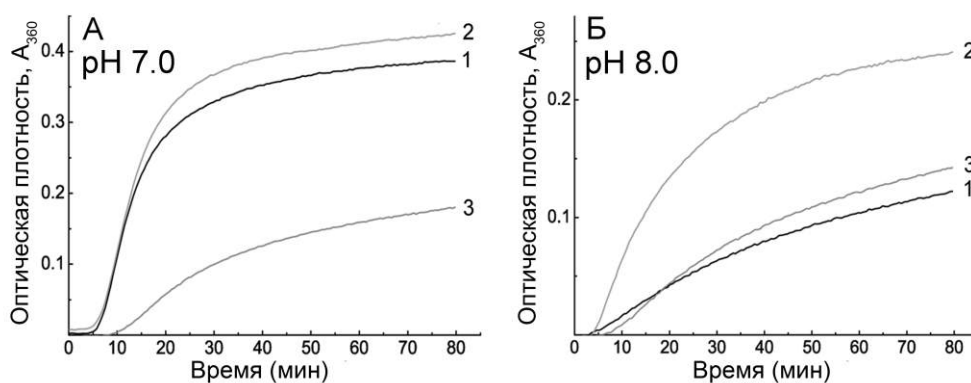


Рис. 3.17. Противоположно направленное действие GuHCl на кинетику агрегации инсулина (0,25 мг/мл) при pH 7.0 (А) и 8.0 (Б), выявленное методом турбидиметрии. Кинетика агрегации инсулина в отсутствие (1) или в присутствии GuHCl в концентрациях 100 и 300 мМ (2 и 3 соответственно).

При pH 8.0 GuHCl в концентрации 100 мМ ускоряет агрегацию инсулина по сравнению с контролем (Рис. 3.17, Б). Эти результаты показывают, что противоположно направленные эффекты GuHCl аналогичны действию аргинина, что свидетельствует об участии основной гуанидиновой группы аргинина в рассматриваемых процессах.

Тот факт, что аргинин при pH 7.0 и 8.0 проявляет противоположно направленное действие на агрегацию инсулина, может иллюстрировать компромисс между электростатическими и гидрофобными силами. Механизмы, лежащие в основе противоположно направленных эффектов аргинина, включают, с одной стороны, взаимодействие аргинина и инсулина с участием электростатических сил. При этом добавление аргинина может не только маскировать электростатическое отталкивание между заряженными группами белка, но также изменять общую гидрофобность аргинин-белкового комплекса за счет алифатической структуры аргинина, что также приводит к ускорению процесса агрегации [Mason et al., 2004].

С другой стороны, подавление агрегации инсулина может быть вызвано замедлением белок-белковой ассоциации в результате взаимодействий между гуанидиновой группой аргинина с ароматическими остатками молекулы инсулина, расположенными на поверхности молекулы при стрессовых условиях. Ранее было показано, что ароматические остатки белков сильнее взаимодействуют с гуанидиновой, чем с алифатической группой аргинина [Shah et al., 2012].

3.4.3. Флуоресцентная спектроскопия с использованием тιοфлавина Т и bis-ANS

Инкубацию инсулина проводили в присутствии широко используемого маркера кросс- β структур – ThT [LeVine, 1999; Nielsen et al., 2001b; Сулацкая и др., 2013]. Измеряя уровень связывания ThT с белковыми агрегатами, можно исследовать кинетику образования фибрилл.

Измерения флуоресценции агрегатов, образуемых в процессе инкубации инсулина в присутствии 50 мкМ ThT при pH 7.0, показали небольшое снижение интенсивности флуоресценции при 485 нм в присутствии 50 мМ аргинина по сравнению с контролем, но полное подавление флуоресценции ThT при добавлении 500 мМ аргинина (Рис. 3.18, А). При pH 8.0 добавление 100 мМ аргинина приводило к значительному росту флуоресценции ThT по сравнению с контролем (Рис. 3.18, Б).

Результаты показывают, что на начальном этапе инкубации инсулина в присутствии аргинина уровень интенсивности флуоресценции ThT небольшой. Можно предположить образование ранних форм белковых агрегатов, возможно, в виде протофибрилл.

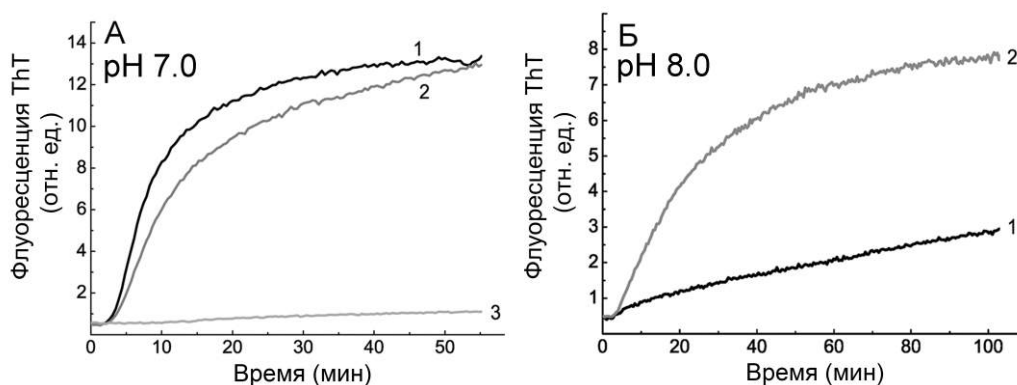


Рис. 3.18. Флуоресценция ThT, измеренная при агрегации инсулина (0,2 мг/мл). (А) Инсулин в отсутствие (1) или в присутствии Arg в концентрациях 50 и 500 мМ (2 и 3 соответственно) при pH 7.0. (Б) Инсулин в отсутствие (1) или присутствии 100 мМ Arg (2) при pH 8.0

Также были проведены эксперименты с другой флуоресцентной меткой – bis-ANS. Bis-ANS – гидрофобный флуоресцентный зонд, связывающийся с полярными кластерами белка, что приводит к значительному росту интенсивности флуоресценции зонда. Это свойство делает его чувствительным индикатором разворачивания белков и демонстрирует присутствие гидрофобных сайтов частично свернутых глобулярных белков [Shi et al., 1994; Sarkar et al., 1995]. На рисунке 3.19, А показано, что при pH 7.0 в присутствии аргинина интенсивность флуоресценции снижается концентрационно-зависимым способом, в то время как добавление аргинина при pH 8.0 приводит к значительному росту интенсивности флуоресценции bis-ANS (Рис. 3.19, Б).

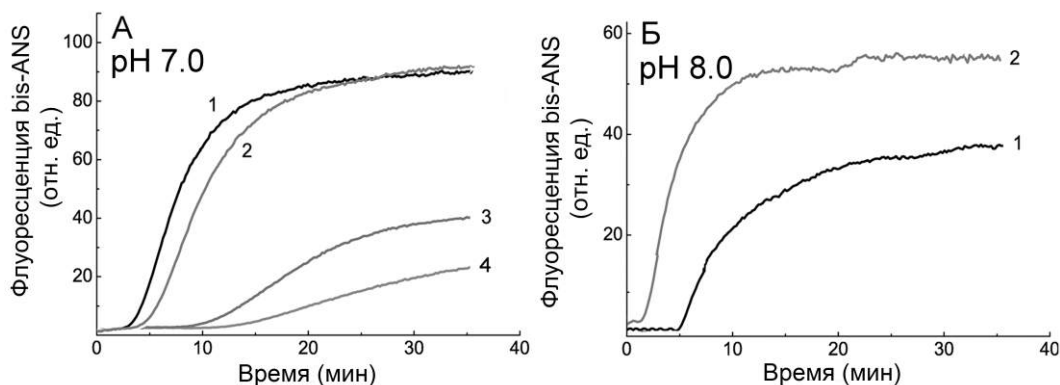


Рис. 3.19. Флуоресценция bis-ANS, измеренная при агрегации инсулина (0,2 мг/мл). (А) Инсулин в отсутствие (1) или в присутствии Arg в концентрациях 50, 300 и 500 мМ (2, 3 и 4 соответственно) при pH 7.0. (Б) Инсулин в отсутствие (1) или в присутствии 100 мМ Arg (2) при pH 8.0.

Эти результаты могут быть дополнительным подтверждением способности аргинина индуцировать изменения физико-химических свойств

и конформационного состояния инсулина при рН 8.0, в результате чего новые гидрофобные связывающие сайты интермедиатов белковой молекулы взаимодействуют с bis-ANS. Изменения гидрофобности инсулина могут ускорять образование и рост агрегатов.

3.5. Изменение вторичной структуры α -лактальбумина и инсулина в присутствии аргинина

α -Лактальбумин. Влияние аргинина на вторичную структуру модельных белковых субстратов изучали с использованием спектроскопии КД в длинноволновой УФ области (190–260 нм).

КД-спектры α -лактальбумина проявляли выраженную отрицательную эллиптичность в области 208–222 нм, характерную для структуры α -спирали (Рис. 3.20, кривая 1). Спектр α -лактальбумина, инкубированного в присутствии аргинина (кривая 2), практически не отличается от спектра в отсутствие эффектора. Можно предположить, что добавление аргинина не изменяет вторичную структуру белка.

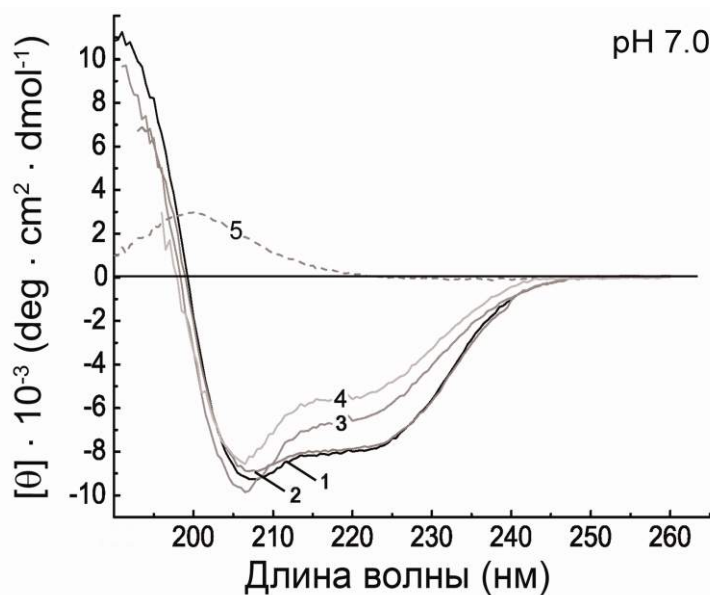


Рис. 3.20. Действие Arg на вторичную структуру α -лактальбумина. КД-спектр α -лактальбумина (2 мг/мл) (1), инкубированного при рН 7.0 с 10 мМ Arg (2) или 20 мМ ДТТ (3), или с 10 мМ Arg и ДТТ (4). Спектры 2 и 4 соответствуют разности спектров, полученных путем вычитания индивидуального спектра Arg (5) из спектра смеси α -лактальбумина и Arg, измеренных в отсутствие или присутствии ДТТ соответственно.

Инкубация α -лактальбумина с 20 мМ ДТТ в отсутствие или в присутствии 10 мМ аргинина приводит к уменьшению отрицательной эллиптичности при 222 нм (кривые 3 и 4), свидетельствуя о частичном разворачивании α -спиральной структуры на начальной стадии белковой денатурации. Эти спектры представляют переходное состояние между доминирующей α -спиралью и полностью развернутой конформацией белковой молекулы.

Инсулин. Аналогичный эксперимент был проведен с инсулином. Исследовали изменения вторичной структуры инсулина в отсутствие или в присутствии аргинина. КД-спектр нативного инсулина (0,5 мг/мл) демонстрирует отрицательную эллиптичность в области 208 – 222 нм, что характерно для белка с α -спиральной структурой (Рис. 3.21, кривая 1). Спектр инсулина в присутствии аргинина аналогичен спектру нативного инсулина, свидетельствуя о том, что добавление аргинина не изменяет вторичную структуру белка (кривая 2). При инкубации белка с 5 мМ ДТТ в отсутствие или в присутствии аргинина на начальном этапе трансформации было показано значительное уменьшение отрицательной эллиптичности при 222 нм (кривые 3 и 4).

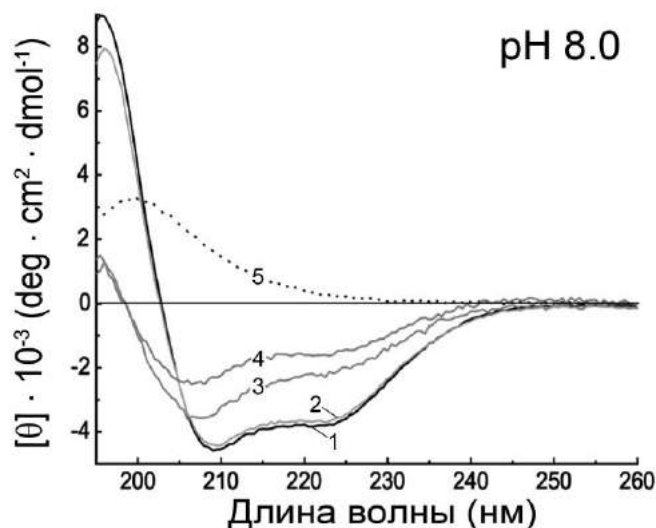


Рис. 3.21. Действие Arg на вторичную структуру инсулина. КД-спектр индивидуального инсулина (0,5 мг/мл) (1); инсулина, инкубируемого с 30 мМ Arg (2) или 5 мМ ДТТ (3); инсулина, инкубируемого с 30 мМ Arg и 5 мМ ДТТ (4). Образцы инкубировали при pH 8.0. Спектры 2, 4 получены в результате вычитания спектра Arg (5) из смеси инсулина и Arg в отсутствие или присутствии ДТТ соответственно.

Результаты, полученные с помощью спектроскопии КД с использованием двух модельных белков, очень похожи между собой. Добавление аргинина в присутствии ДТТ не приводило к значительной трансформации вторичной структуры инсулина и α -лактальбумина. Можно предположить, что сначала происходит взаимодействие аргинина с кислыми аминокислотными остатками на поверхности нативного белка, которое предрасполагает структуру последнего к трансформации в результате экранирования отрицательных зарядов. Второй этап может включать последовательную ассоциацию интермедиатов. 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 исследуемых белков.

3.6. Исследование структурных изменений инсулина в присутствии аргинина с помощью ^1H ЯМР-спектроскопии

В настоящее время возрастает значимость структурных исследований, используемых для поиска эффективного лиганда, взаимодействующего с белком-рецептором. Недостаточно изучены особенности гидрофобных и электростатических взаимодействий, а также водородных связей, определяющих сродство белка к тому или иному лиганду, не выявлено влияние динамических свойств белков на их способность связывать низкомолекулярные соединения. Поэтому использование ЯМР-спектроскопии в данной работе представляется весьма актуальным.

В специальной серии экспериментов использовали ^1H ЯМР-спектроскопию для исследования конформации инсулина в растворе и его последующих структурных перестроек в результате взаимодействия с аргинином в присутствии ДТТ. В частности, ^1H ЯМР-спектры образцов были

записаны при pH 7.0 и pH 8.0. В результате сравнения ^1H ЯМР-спектров индивидуального инсулина при pH 7.0 и pH 8.0 заметно сходство между химическими сдвигами резонансов двух спектров (Рис. 3.22, А). Однако при pH 7.0 наблюдался больший общий сигнал интенсивности белка, главным образом, в области амидных резонансов (7,0–9,5 м.д.). Также проявляются изменения интенсивности резонансов в сильном поле (0–1,2 м.д.), указывающие на pH-зависимые конформационные перестройки инсулина.

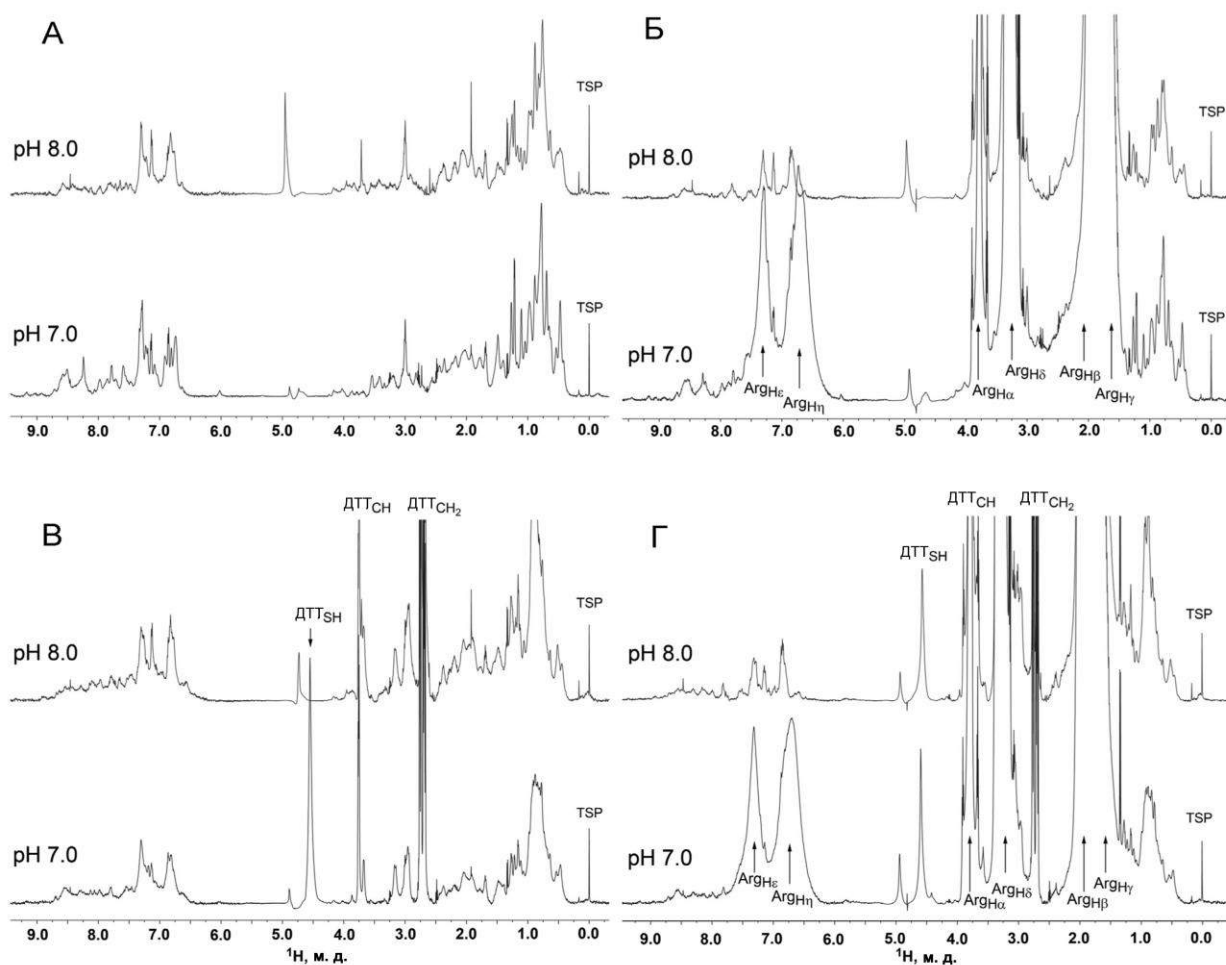


Рис. 3.22. ^1H ЯМР-спектры инсулина (0,6 мг/мл). Инсулин (А); инсулин после 30 мин инкубации в присутствии 100 мМ Arg (Б); инсулин после 10 мин инкубации с ДТТ (В) или в присутствии как Arg, так и ДТТ (Г). Показаны сигналы Arg, ДТТ и TSP. М.д. – миллионные доли.

Добавление аргинина в раствор нативного инсулина (Рис. 3.22, Б) индуцирует снижение интенсивности резонансов, особенно в области спектра сильного поля (0–1,2 м.д.). Эффект становится более выраженным при pH 8.0, указывая на pH-зависимые конформационные изменения

инсулина в присутствии аргинина. Добавление ДТТ к инсулину (Рис.3.22, В) приводит к существенному снижению интенсивности сигнала белка из-за уширения резонансных линий при рН 7.0, предполагая частичную денатурацию и трансформацию белковой структуры в состояние, склонное к агрегации. При рН 8.0, несмотря на присутствие ДТТ, наблюдалась большая интенсивность сигнала. Эти результаты в соответствии с кинетикой агрегации инсулина показывают, что интенсивность агрегации при рН 8.0 значительно ниже, чем при рН 7.0. Можно предположить, что изменения, наблюдаемые при переходе от рН 7.0 к рН 8.0, с большой вероятностью могут быть связаны с изменением состояния ионизации определенных аминокислотных остатков инсулина, главным образом, имидазольных групп гистидина.

В присутствии и ДТТ и аргинина заметное снижение наблюдалось в общей интенсивности сигнала белка при рН 8.0 (Рис. 3.22, Г), по сравнению со спектрами в отсутствие аргинина (Рис. 3.22, В). При рН 7.0 основные пики детектируются в областях 1,5–3,8 м.д. и 6,3–7,7 м.д., соответствующие резонансным сигналам аргинина, добавленного в инкубационную смесь, что было подтверждено с помощью ^1H ЯМР-спектров самого аргинина. Эти пики доминируют над всеми сигналами инсулина и поэтому усложняют интерпретацию спектров. Известно, что при рН 8.0 протоны NH-группы боковой цепи аргинина быстро обмениваются с протонами воды [Henry and Sykes, 1995], поэтому резонансный сигнал протонов NH-группы не может быть выявлен при рН 8.0.

Полученные результаты не отражают реальное конформационное распределение и нуждаются в уточнении. Одномерная спектроскопия ^1H ЯМР не позволяет получить необходимую информацию о том, какие именно аминокислотные остатки в молекуле рекомбинантного инсулина человека являются непосредственными мишенями действия аргинина. Такую информацию можно получить с использованием образцов инсулина, меченного ^{15}N и $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$, и гетероядерного двумерного ЯМР с применением

корреляционной ^1H - ^{13}C спектроскопии (Heteronuclear Single Quantum Correlation, HSQC), позволяющей, в частности, оценить магнитные взаимодействия между углеродными атомами и непосредственно связанными с ними протонами (для связей C-H). В настоящее время мы планируем экспрессию и очистку меченного ^{15}N и $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ рекомбинантного инсулина человека для проведения двумерного ЯМР. Кроме того, предполагается определение соотношения сигналов как ^{15}N , так и ^{13}C инсулина в его нативной и денатурированной формах. Аналогичные двумерные гомоядерные эксперименты на высоком качественном уровне затруднительны из-за высокого молярного избытка аргинина и ДТТ по сравнению с концентрацией инсулина.

3.7. Морфологические свойства агрегатов модельных белков в присутствии аргинина или лизина

3.7.1. Инсулин. Для исследования морфологических характеристик белковых структур, образованных в процессе агрегации инсулина, активируемой при добавлении аргинина, образцы были отобраны на начальном этапе агрегации из инкубационной смеси, содержащей все компоненты, используемые для измерений ДЛС, как описывалось выше. Образцы были исследованы с помощью АСМ или ТЭМ.

На АСМ изображениях показано образование гетерогенных надмолекулярных структур на начальных этапах процесса агрегации инсулина в отсутствие или в присутствии аргинина (Рис. 3.23). В отсутствие аргинина при рН 8.0 инсулин образует сферические частицы с диаметром от 20 до 50 нм (Рис. 3.23, А). В присутствии аргинина продемонстрировано образование дисперсных асимметричных гранул с кажущимся диаметром до 10 нм, некоторые из них ассоциированы в кластеры или короткие цепи (Рис. 3.23, Б). Изображения АСМ показывают, что наряду с частицами малого размера образуются большие цепи длиной 100–200 нм, состоящие преимущественно из частиц 10–15 нм. Возможно, короткие цепочки могут

связываться вместе «голова-к-хвосту» с образованием агрегатов, напоминающих фрагменты «ожерелья», состоящие из бусин нерегулярной формы (Рис. 3.23, Б – показаны стрелками).

Гетерогенность белковых частиц, образуемых в процессе агрегации инсулина, стимулированной аргинином, была выявлена также с помощью ТЭМ. Представленные электронные микрофотографии частиц инсулина в присутствии аргинина, демонстрируют короткие цепи длиной 30–50 нм, окруженные аморфными агрегатами диаметром 5–15 нм (Рис. 3.23, В), или цепи длиной 100–300 нм (Рис. 3.23, Г-Е).

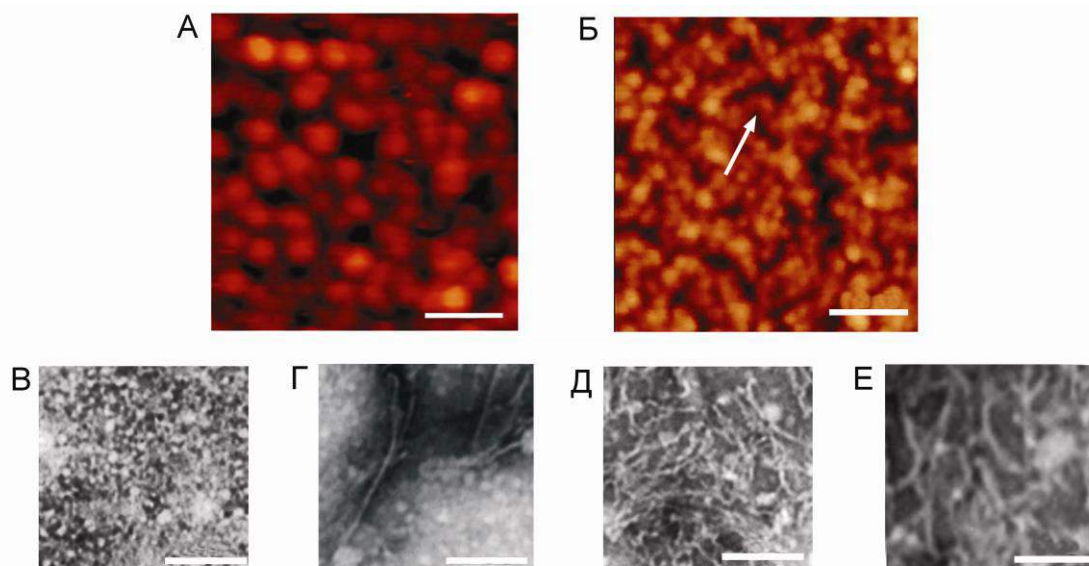


Рис. 3.23. АСМ-изображения (А, Б) и электронные микрофотографии (В, Г, Д, Е) агрегатов, образующихся на начальных стадиях инкубации инсулина при рН 8.0 в отсутствие (А) или в присутствии 100 мМ Arg (Б-Е), на Б стрелкой показана цепь, состоящая из гранул. Масштаб – 100 нм (А-Д) и 50 нм (Е).

Белковая агрегация, усиленная с помощью аргинина, быстро достигает состояния образования структур, отличающихся от аморфных агрегатов индивидуального белкового субстрата.

3.7.2. α -Лактальбумин. Образцы, содержащие α -лактальбумин и другие компоненты, используемые для измерений ДЛС, как описывалось выше, были также отобраны из инкубационной смеси на начальном этапе агрегации. Анализ АСМ изображений структур, образуемых в присутствии

аргинина, выявил формирование дисперсных асимметричных гранулярных частиц диаметром около 10 нм, некоторые из них ассоциированы в редко встречающиеся короткие цепи длиной 10–40 нм (Рис. 3.24, А). Наряду с небольшими частицами образуются неразветвленные цепи длиной 50–200 нм, состоящие преимущественно из гранулярных частиц диаметром 10 нм (Рис. 3.24, А и Б).

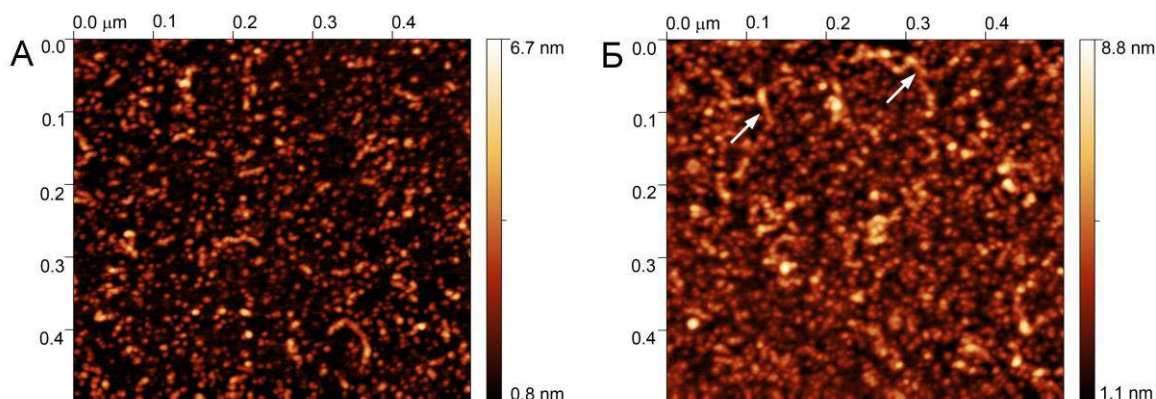


Рис. 3.24. АСМ-изображения структур, образуемых в процессе агрегации α -лактальбумина (1 мг/мл) при рН 7.0 в присутствии 100 мМ Arg. Асимметричные гранулы и короткие неразветвленные цепи (А) и агрегаты, связывающиеся в более длинные цепи (показаны стрелками на Б).

Можно предположить, что в течение длительной инкубации короткие цепи могут связываться друг с другом (Рис. 3.24, Б). Такие структуры очень похожи на агрегаты, полученные при инкубации инсулина с аргинином (Рис. 3.23). Процесс агрегации самого α -лактальбумина развивается медленнее, чем в присутствии аргинина, и структуры, образованные в контрольных образцах, отобранных из инкубационной смеси на начальной стадии процесса агрегации, проявляются в форме агрегатов от 10 до 50 нм, составленных из частиц меньшего размера (Рис. 3.25). Таким образом, в присутствии аргинина при низких концентрациях образуются морфологически гетерогенные надмолекулярные структуры, которые отличаются от саагрегатов, полученных в отсутствие аргинина.

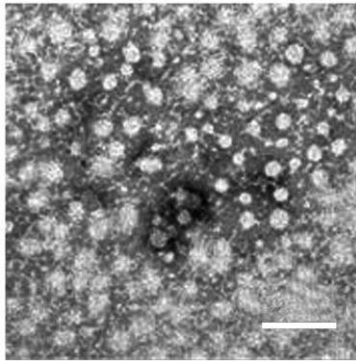


Рис. 3.25. Агрегаты α -лактальбумина (1 мг/мл) при pH 7.0 в отсутствие аргинина, полученные с помощью ТЭМ. Масштаб – 200 нм.

Структуры агрегатов α -лактальбумина в присутствии 100 мМ лизина при аналогичных условиях были получены с использованием ТЭМ. Анализ электронных микрофотографий показал образование аморфных гранулярных частиц 3–5 нм в диаметре, большинство из них соединялись в короткие цепи 10–40 нм в длину или редко встречающиеся компактные агрегаты 10–20 нм (Рис. 3.26, А).

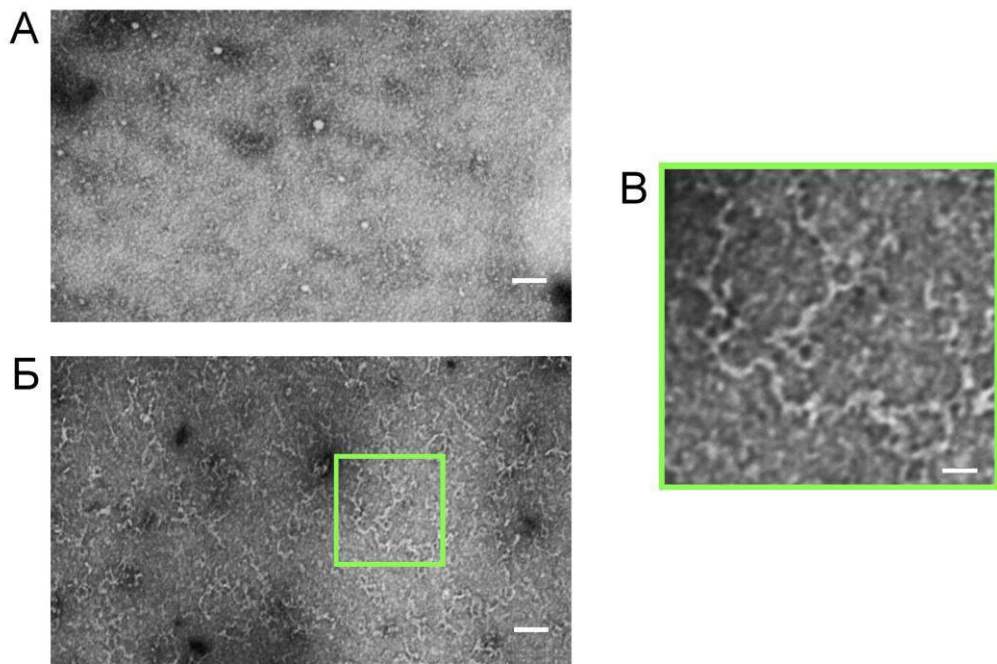


Рис. 3.26. Электронные микрофотографии агрегатов, образованных в процессе инкубации α -лактальбумина (1 мг/мл) при pH 7.0 в присутствии Lys (100 мМ). Аморфные частицы, ассоциируют в короткие (А), или более длинные (Б, В) цепи. На В показан увеличенный фрагмент, выделенный на Б. Масштаб – 100 нм (А, Б) и 35 нм (В).

Рисунок показывает образование длинных цепей размером 100–500 нм, состоящих из частиц диаметром 3–5 нм (Рис. 3.26, Б и В). Полученные

результаты демонстрируют структурное сходство и различия в размерах и форме агрегатов α -лактальбумина, полученных в присутствии аргинина и лизина.

3.8. Действие амфифильных пептидов на кинетику агрегации инсулина

Исследование действия амфифильных пептидов на кинетику агрегации белков при pH 7.0 и pH 8.0 представляет большой интерес. Для экспериментов были выбраны аргинин-содержащие положительно заряженные пептиды: Arg-Phe и фрагмент адренокортикотропного гормона, содержащий три аргинина и четыре лизина в числе 24х аминокислотных остатков, АСТН (1-24), а также пептиды Lys-Leu и Asp-Phe (структурные формулы дипептидов и аминокислотная последовательность АСТН (1-24) показаны на рисунке 3.27).

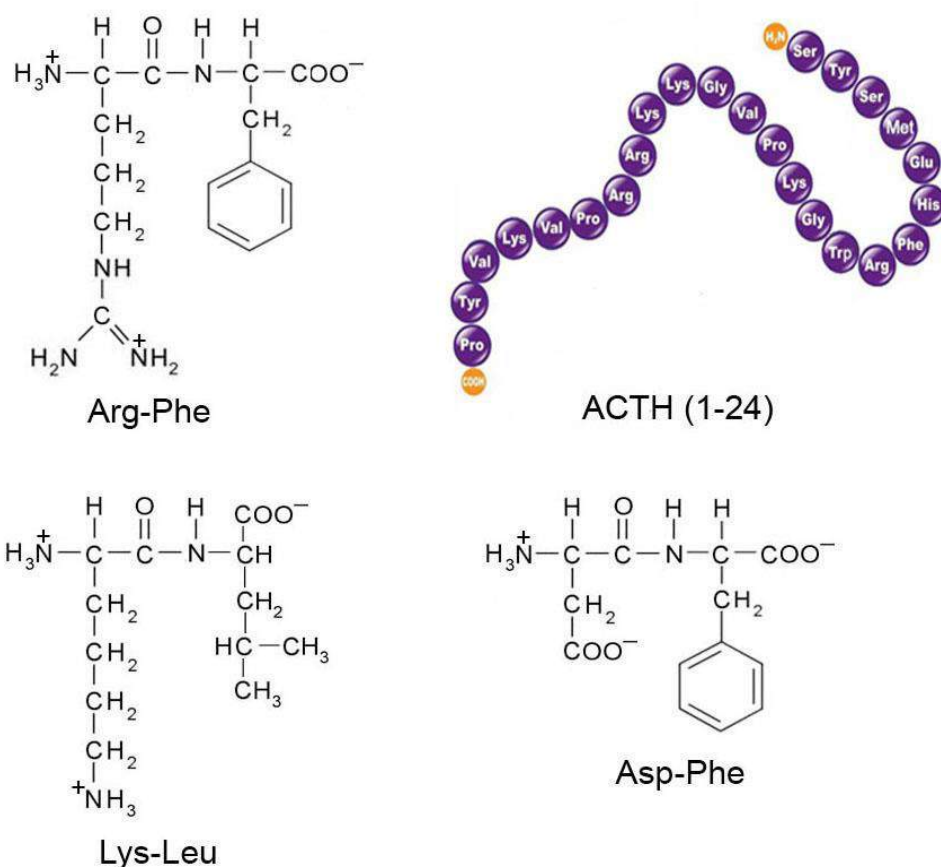


Рис. 3.27. Структурные формулы дипептидов Arg-Phe, Lys-Leu и Asp-Phe, а также аминокислотная последовательность АСТН (1-24).

3.8.1. Arg-Phe. При исследовании действия Arg-Phe на кинетику агрегации инсулина методом ДЛС наблюдали подавление процесса концентрационно-зависимым способом при рН 7.0. Представленные кинетические кривые агрегации инсулина демонстрируют способность Arg-Phe подавлять агрегацию уже при концентрации 0,5 мМ. При увеличении концентрации пептида снижалась скорость и увеличивался лаг-период агрегации по сравнению с контролем (Рис. 3.28, А). Размеры гидродинамического радиуса были меньше, по сравнению с контролем, в соответствии с интенсивностью процесса в присутствии Arg-Phe.

При рН 8.0 Arg-Phe в области концентраций 0,5–2 мМ значительно ускорял агрегацию инсулина. Размеры частиц увеличивались в соответствии с ростом интенсивности светорассеяния (Рис. 3.28, Б).

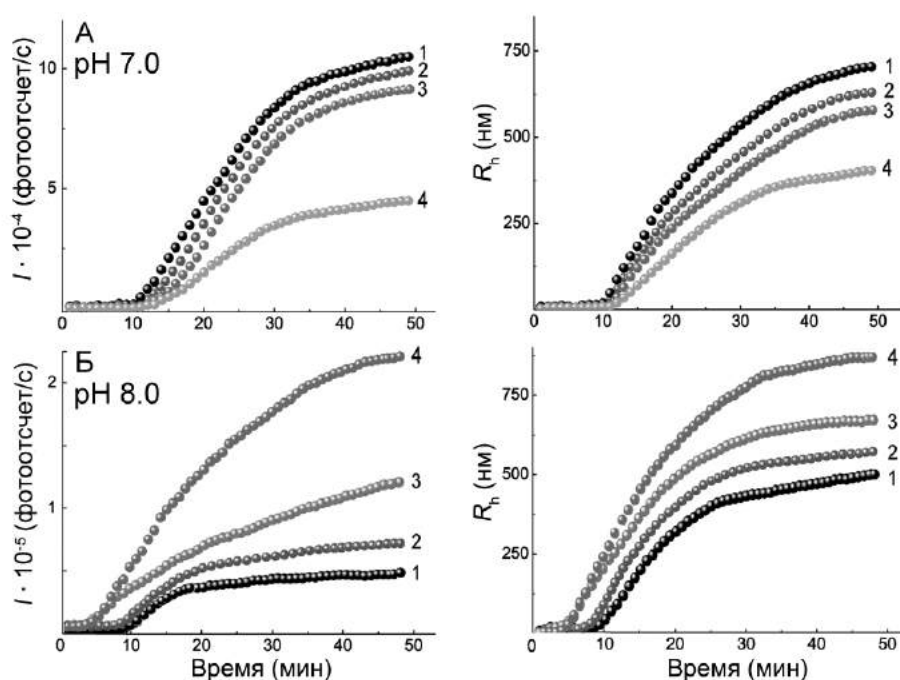


Рис. 3.28. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) и значений гидродинамического радиуса (R_h) от времени инкубации инсулина (0,2 мг/мл). (А) Инсулин в отсутствие (1) или в присутствии Arg-Phe в концентрациях 0,5, 3 и 15 мМ (2, 3 и 4 соответственно) при рН 7.0; (Б) инсулин в отсутствие (1) или присутствии Arg-Phe в концентрациях 0,5, 1 и 2 мМ (2, 3 и 4 соответственно) при рН 8.0.

При исследовании агрегации инсулина в отсутствие или присутствии Arg-Phe при различных значениях рН была получена зависимость, изображенная на рисунке 3.29.

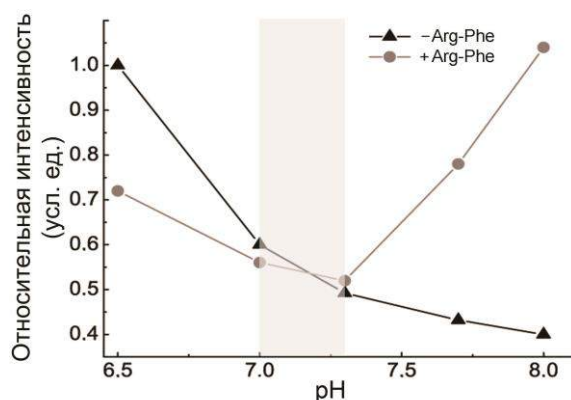


Рис. 3.29. pH-Зависимая агрегация инсулина. Относительная интенсивность светорассеяния агрегатов инсулина (0,15 мг/мл), образованных при инкубации белка в течение 30 мин, рассматриваемая при титровании инкубационной смеси в области pH 6.5–8.0, в отсутствие или присутствии 2 мМ Arg-Phe. Относительная интенсивность светорассеяния агрегатов инсулина в отсутствие Arg-Phe при pH 6.5 принята за 1.

pH-Зависимость агрегации инсулина в присутствии пептида Arg-Phe имеет определенное сходство с pH-зависимостью агрегации в присутствии аргинина. Область, в которой не изменяется относительная интенсивность агрегации белка, соответствует значениям pH 7.0–7.3 и 7.3–7.5 в присутствии пептида и аргинина соответственно.

Для исследования агрегации инсулина в отсутствие или присутствии Arg-Phe был также применен флуоресцентный анализ при pH 6.5 и 8.0 с использованием индикатора ThT (Рис. 3.30).

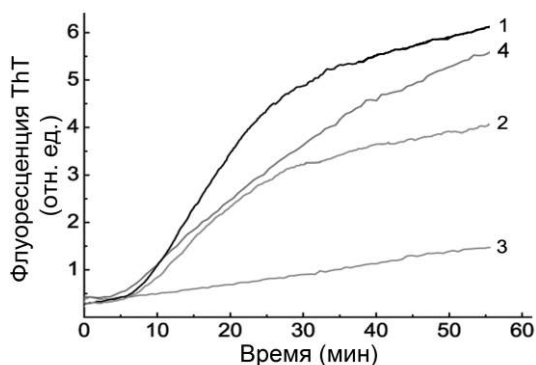


Рис. 3.30. Флуоресценция ThT при агрегации инсулина. Инсулин (0,2 мг/мл) инкубировали при pH 6.5 (1 и 2) или pH 8.0 (3 и 4), в отсутствие (1 и 3) или присутствии Arg-Phe (2 и 4) в концентрации 2 мМ.

При pH 6.5 наблюдали более низкую интенсивность флуоресценции в присутствии Arg-Phe по сравнению с контролем (Рис. 3.30, кривые 2 и 1 соответственно), в то время как при pH 8.0 интенсивность флуоресценции значительно возросла по сравнению с контролем (кривые 3 и 4). Данный результат аналогичен результатам опытов с ThT, полученным при инкубации инсулина с аргинином.

Также была исследована кинетика агрегации инсулина, когда аргинин или Arg-Phe добавлялся в инкубационную смесь не в начальный момент процесса, а по истечении определенного времени после начала агрегации. Через 15 минут в инкубационную смесь добавляли 100 мМ аргинина, или 1 мМ Arg-Phe, или буфер (для контрольных проб). Показано, что при добавлении пептида интенсивность светорассеяния и размеры частиц увеличиваются в большей степени, чем при добавлении аргинина (Рис. 3.31). При добавлении буфера процесс агрегации заметно тормозился.

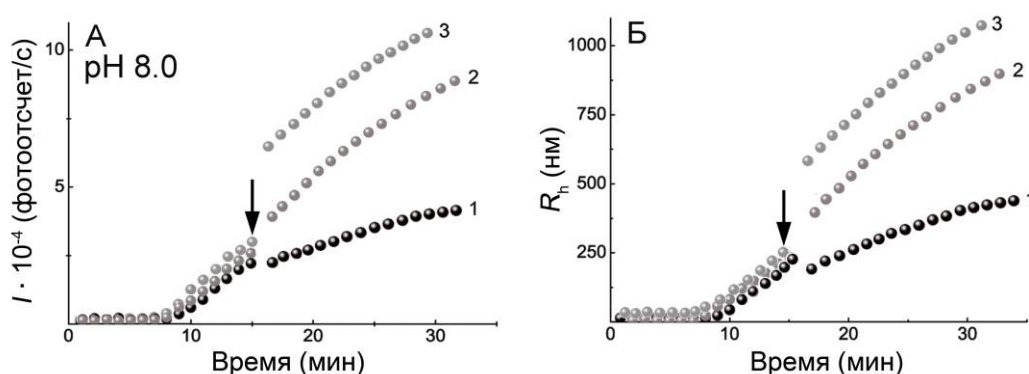


Рис. 3.31. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) (А) и размеров гидродинамического радиуса (R_h) (Б) от времени инкубации инсулина (0,15 мг/мл). Стрелкой показан момент времени инкубации инсулина, в который происходило добавление буфера, или 100 мМ Арг, или 1 мМ Arg-Phe (1, 2 и 3 соответственно). Образцы инкубировали при pH 8.0.

3.8.2. АСТН (1-24). При исследовании действия положительно заряженного аргинин-содержащего пептида АСТН (1-24) на кинетику агрегации инсулина были выявлены эффекты, похожие на действие свободного аргинина и пептида Arg-Phe. При pH 7.0 фрагмент АСТН уже при концентрации 5 мкМ проявлял способность подавлять агрегацию инсулина. При концентрации АСТН (1-24) 70 мкМ происходило еще большее снижение интенсивности процесса, при этом наблюдали образование частиц меньшего размера по сравнению с контролем (Рис. 3.32, А).

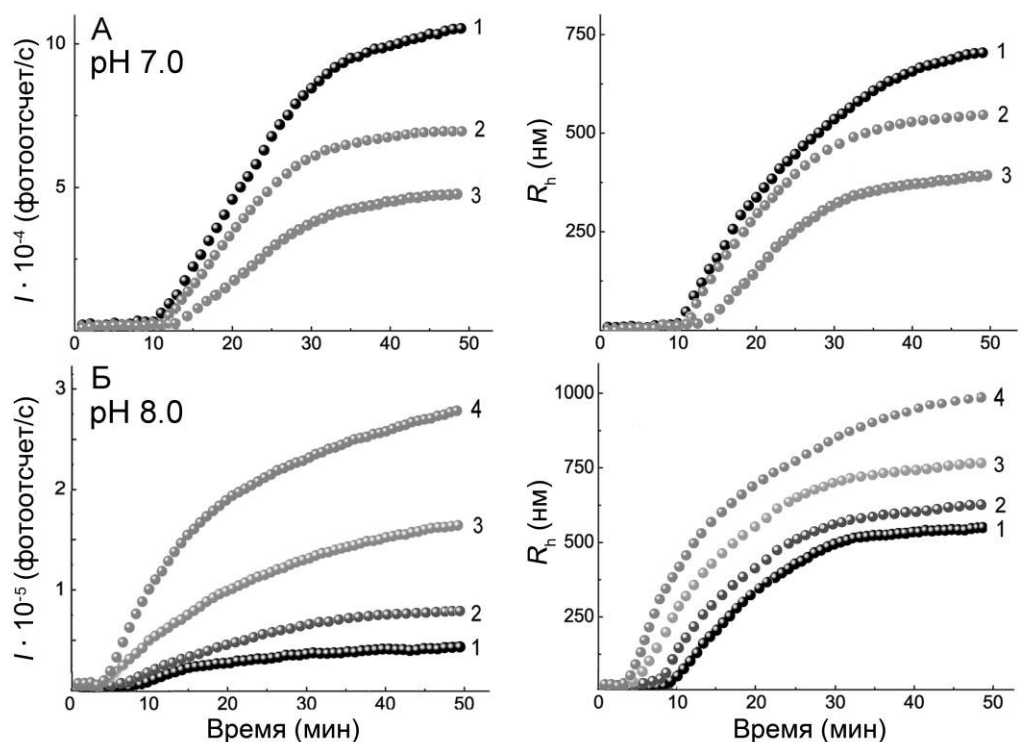


Рис. 3.32. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) и значений гидродинамического радиуса (R_h) от времени инкубации инсулина (0,2 мг/мл). (А) Инсулин в отсутствие (1) или в присутствии 5 и 70 мкМ АСТН (1-24) (2 и 3 соответственно) при рН 7.0; (Б) инсулин в отсутствие (1) или присутствии АСТН (1-24) в концентрациях 5, 30 и 70 мкМ (2, 3 и 4 соответственно) при рН 8.0.

При рН 8.0 наблюдался противоположный эффект (Рис. 3.32, Б). Инкубация инсулина в присутствии 5–70 мкМ АСТН (1-24) приводила к уменьшению лаг-периода и значительному увеличению интенсивности светорассеяния концентрационно-зависимым способом. Размеры радиусов также сдвигались к большим значениям в соответствии с интенсивностью светорассеивания. Таким образом, наблюдались сходные рН-зависимые эффекты свободного аргинина и положительно заряженных пептидов Arg-Phe и АСТН (1-24) на кинетику агрегации инсулина. Примерно одинаковая интенсивность светорассеяния агрегатов белка достигается в присутствии значительно меньших концентраций пептидов по сравнению с концентраций аргинина.

Можно полагать, что в самой структуре аргинина заложена тенденция к проявлению разнонаправленного (подавляющего или ускоряющего) действия на агрегацию белков. Поскольку аргинин 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 аргинина с ароматическими сайтами белка, которые становятся недоступными для самоассоциации развернутых белков. Аргинин 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 аргинином. Компромисс между электростатическими и гидрофобными взаимодействиями аргинин-содержащих пептидов с белками может определять проявление разнонаправленных эффектов на процессы агрегации.

3.8.3. Asp-Phe. Было исследовано также действие отрицательно заряженного пептида Asp-Phe на агрегацию инсулина (Рис. 3.33). При pH 7.0 наблюдалось подавление агрегации белка в присутствии пептида Asp-Phe концентрационно-зависимым способом. Дипептид Asp-Phe в концентрации 2 мМ практически не влиял на агрегацию белка, кинетическая кривая повторяла кривую контроля, но в присутствии 4 мМ Asp-Phe наблюдали значительное подавление агрегации модельного белка (Рис. 3.33, А).

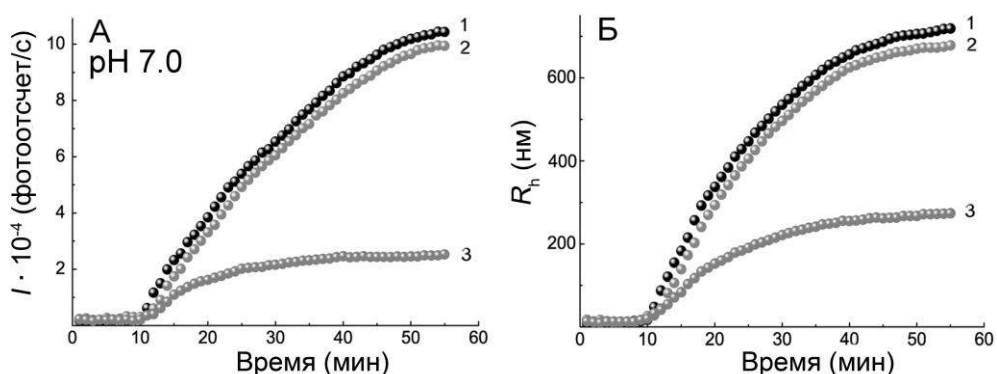


Рис. 3.33. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) (А) и значений гидродинамического радиуса (R_h) (Б) от времени инкубации инсулина (0,2 мг/мл) при pH 7.0 в отсутствие (1) или присутствии Asp-Phe в концентрациях 2 и 4 мМ (2 и 3 соответственно).

Размеры гидродинамического радиуса изменялись в соответствии с интенсивностью процесса, при инкубации с 4 мМ Asp-Phe формировались

частицы с меньшими размерами, чем в контроле. При взаимодействии отрицательно заряженного пептида с инсулином происходит взаимное отталкивание одноименно заряженных молекул, что приводит к торможению агрегации белка.

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).

3.8.4. Lys-Leu. Было исследовано действие еще одного пептида, Lys-Leu, на агрегацию инсулина. При инкубации инсулина с Lys-Leu в концентрации 10 мМ при рН 7.0 происходит значительное снижение интенсивности агрегации и образование частиц меньшего размера по сравнению с контролем (Рис. 3.34, А).

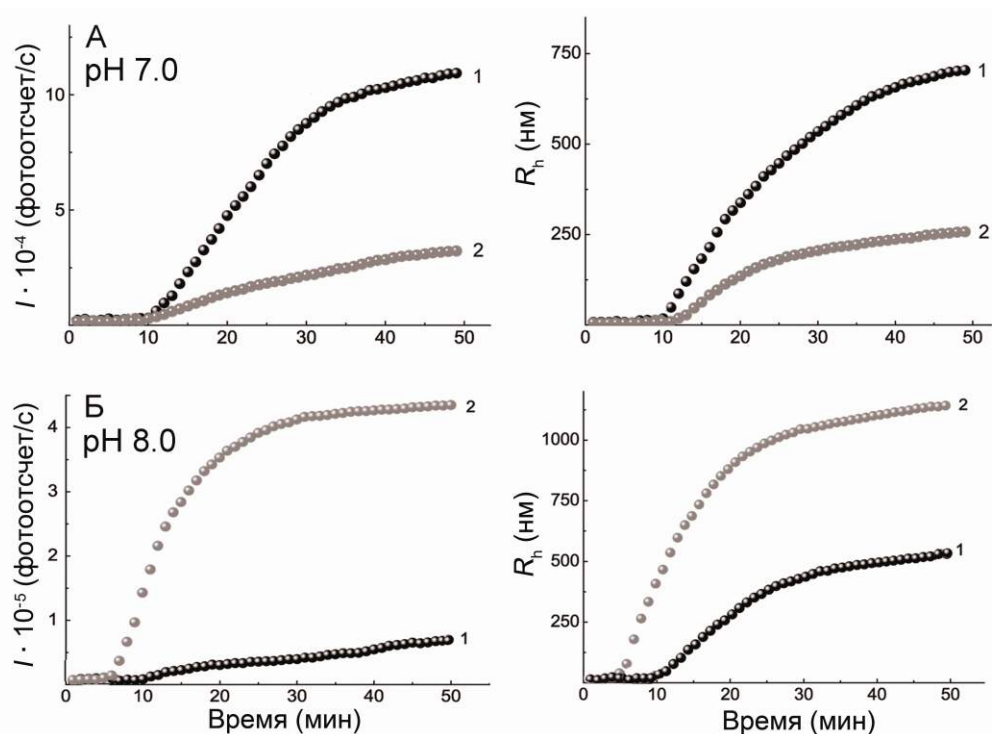


Рис. 3.34. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) и значений гидродинамического радиуса (R_h) от времени инкубации инсулина (0,2 мг/мл). (А) Инсулин в отсутствие (1) или в присутствии (2) 10 мМ Lys-Leu при рН 7.0; (Б) Инсулин в отсутствие (1) или присутствии (2) 2 мМ Lys-Leu при рН 8.0.

При рН 8.0 в присутствии 2 мМ Lys-Leu наблюдали интенсивную агрегацию белка: уменьшался лаг-период процесса и значительно

увеличивалась скорость агрегации (Рис. 3.34, Б). Интересно, что эти результаты отличаются от тех, которые были получены при исследовании влияния свободного лизина на агрегацию инсулина. Лизин ускорял процесс независимо от значения рН (Рис. 3.13). Присутствие в составе пептида гидрофобного аминокислотного остатка лейцина приводит к подавлению агрегации инсулина при рН 7.0. Такое рН-зависимое действие Lys-Leu аналогично действию аргинина и аргинин-содержащих пептидов.

В дополнительной серии экспериментов инсулин в концентрации 0,15 мг/мл при инкубации в 25 мМ Na-фосфатном буфере, рН 8,0, содержащем 5 мМ ДТТ и 150 мМ NaCl в отсутствие эффекторов не агрегировал в течение длительного времени (Рис. 3.35, А и Б, кривая 1).

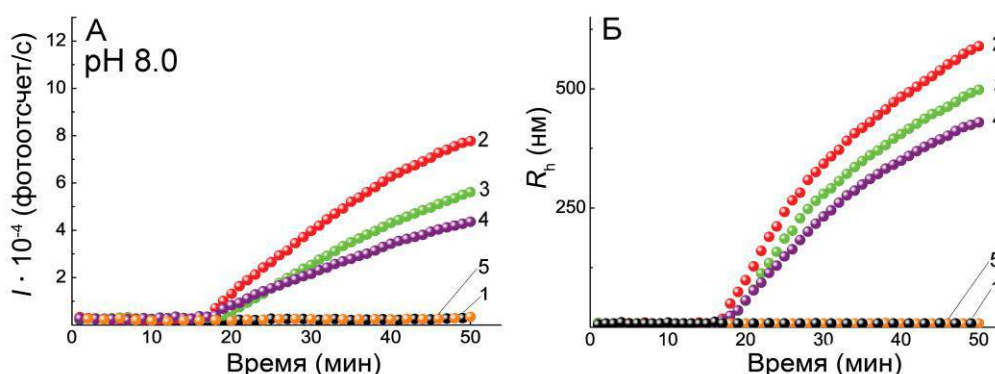


Рис. 3.35. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) (А) и значений гидродинамического радиуса (R_h) (Б) от времени инкубации инсулина (0,15 мг/мл) в отсутствие (1) или присутствии 1 мМ Lys-Leu (2), 1 мМ Arg-Phe (3), 35 мкМ АСТН (1-24) (4) или 1 мМ Asp-Phe (5). Образцы инкубировали в 25 мМ Na-фосфатном буфере, рН 8,0, содержащем 150 мМ NaCl и 5 мМ ДТТ.

Индукция агрегации инсулина наблюдалась в присутствии 1 мМ дипептидов Lys-Leu и Arg-Phe (Рис. 3.35, А и Б, кривые 2 и 3), однако отрицательно заряженный дипептид Asp-Phe не проявлял эффекта (Рис. 3.35, А и Б, кривая 5). АСТН (1-24) оказывал стимулирующий эффект на агрегацию инсулина в концентрации 35 мкМ (Рис. 3.35, кривая 4).

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что амфифильные пептиды могут участвовать в регуляции процесса агрегации

белков, подобно действию свободного аргинина, но при значительно меньших концентрациях.

3.9. Исследование влияния пептида Arg-Phe на вторичную структуру инсулина

С использованием КД-спектроскопии в дальнем УФ показано, что спектр нативного инсулина (0,5 мг/мл) проявляет отрицательную эллиптичность в области 208–222 нм (Рис. 3.36, кривая 1). В присутствии Arg-Phe в молярном стехиометрическом соотношении 10:1 увеличивается отрицательная эллиптичность при 222 нм (кривая 2). При инкубации инсулина с ДТТ (кривая 3) белок разворачивается и начинает преобладать неупорядоченная структура. Спектр инсулина в присутствии ДТТ и Arg-Phe (кривая 4) показывает, что отрицательная эллиптичность уменьшается по сравнению со спектром инсулина с ДТТ, но сохраняется форма спектра, характерная для α -спирали. Однако возможно, что такую форму спектр приобретает за счет присутствия пептида в смеси.

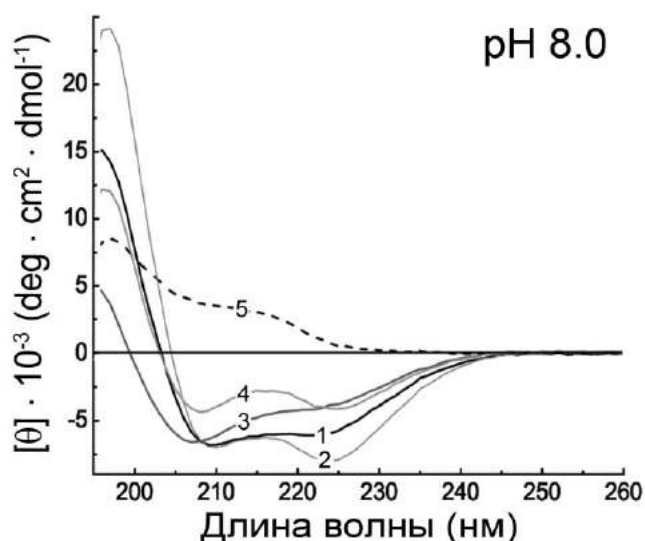


Рис. 3.36. Действие Arg-Phe на вторичную структуру инсулина при pH 8,0, контролируемое с помощью КД в дальнем УФ (190-260 нм). Спектр инсулина (0,5 мг/мл) (1); инсулина, инкубированного с 1 мМ Arg-Phe (2) или 5 мМ ДТТ (3); с 1 мМ Arg-Phe и 5 мМ ДТТ (4). Образцы инкубировали при pH 8,0. Кривая 5 соответствует спектру Arg-Phe.

При проведении расчетов было показано, что в отсутствие ДТТ, пептид Arg-Phe не изменяет вторичную структуру инсулина, что можно видеть на

рисунке 3.37, А. Спектр инсулина (кривая 1) одинаков по форме со спектром, который получен при вычитании кривой Arg-Phe из экспериментальной кривой смеси инсулина с Arg-Phe (кривая 3).

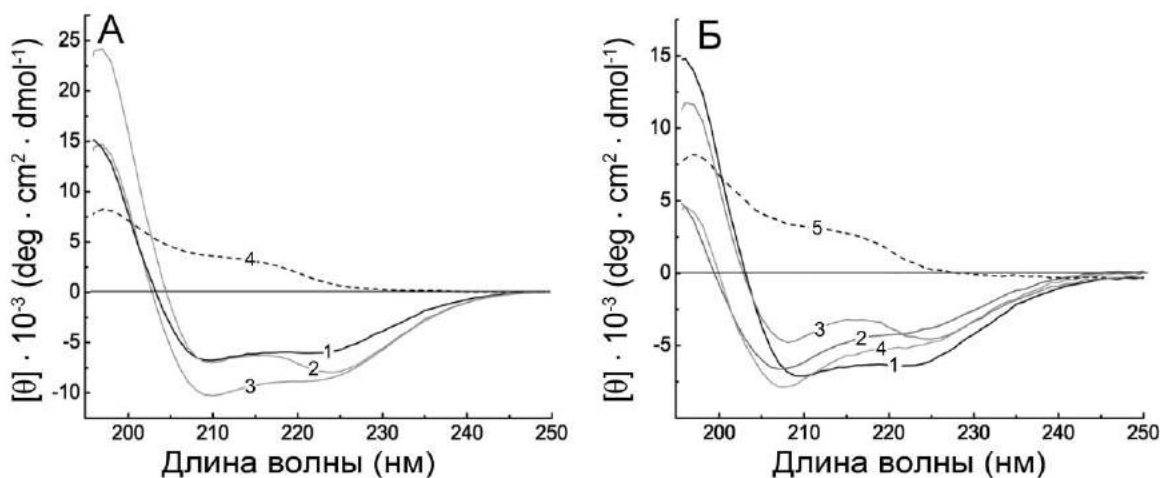


Рис. 3.37. Действие Arg-Phe на вторичную структуру инсулина при pH 8.0, контролируемое с помощью КД в дальнем УФ (190-260 нм). (А) Спектр инсулина (0,5 мг/мл) (1); инсулина, инкубированного с 1 мМ Arg-Phe (2); спектр получен в результате вычитания спектра Arg-Phe из смеси инсулина и 1 мМ Arg-Phe (3); спектр Arg-Phe (4). (Б) Спектр инсулина (0,5 мг/мл) (1); инсулина, инкубированного с 5 мМ ДТТ (2); инсулина, инкубированного с 5 мМ ДТТ и 1 мМ Arg-Phe (3); спектр получен в результате вычитания спектра Arg-Phe из смеси инсулина, 5 мМ ДТТ и 1 мМ Arg-Phe (4); спектр Arg-Phe (5).

При инкубации образцов с ДТТ преобладает неупорядоченная структура, это наблюдается в отсутствие и в присутствии Arg-Phe (Рис. 3.37, Б). Разница между экспериментальным спектром и кривой, полученной в результате вычитания спектра Arg-Phe, обусловлена некоторым различием концентраций белка или пептида в разных образцах, что было подтверждено расчетом оптической плотности растворов при 205 и 230 нм (результаты не показаны).

3.10. Морфологические свойства агрегатов инсулина в присутствии пептидов Arg-Phe или АСТН (1-24)

С помощью ТЭМ были получены изображения частиц при инкубации инсулина в присутствии пептида Arg-Phe. Образцы были отобраны из инкубационной смеси на начальном этапе агрегации, содержащей все компоненты, используемые для измерений ДЛС, как описывалось выше. Электронные

микрофотографии показаны на рисунке 3.38. В присутствии пептида Arg-Phe наблюдали образование агрегатов размером от 5 до 15–20 нм (Рис. 3.38, А), образующих волокна длиной до 300 нм и толщиной до 5 нм (Рис. 3.38, Б и В).

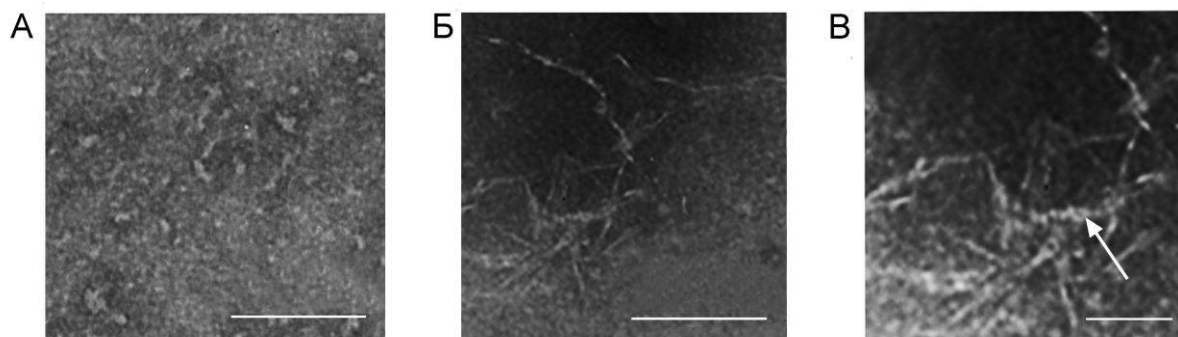


Рис. 3.38. ТЭМ-изображения, полученные при инкубации инсулина (0,2 мг/мл) в присутствии 2 mM Arg-Phe при pH 8.0. Масштаб – 150 нм (А, Б) и 50 нм (В). На В стрелкой показаны длинные цепи, состоящие из нескольких рядов агрегатов.

Были получены АСМ-изображения образцов инсулина в присутствии АСТН (1-24) (Рис. 3.39). В присутствии АСТН (1-24) инсулин образует агрегаты диаметром 20 нм и высотой до 5 нм (Рис. 3.39, А), т.е. частицы большего размера, чем в присутствии аргинина или Arg-Phe. Эти частицы могут собираться в цепочки толщиной до 30 нм и длиной до 200 нм (Рис. 3.39, Б и В). На электронной микрофотографии гранулярные структуры достигают диаметра 50 нм. Эти частицы ассоциируют в разветвленные цепи, которые образуют переплетенные «сетчатые структуры» (Рис. 3.39, Г), которые также можно увидеть на АСМ-изображениях (Рис. 3.39, В).

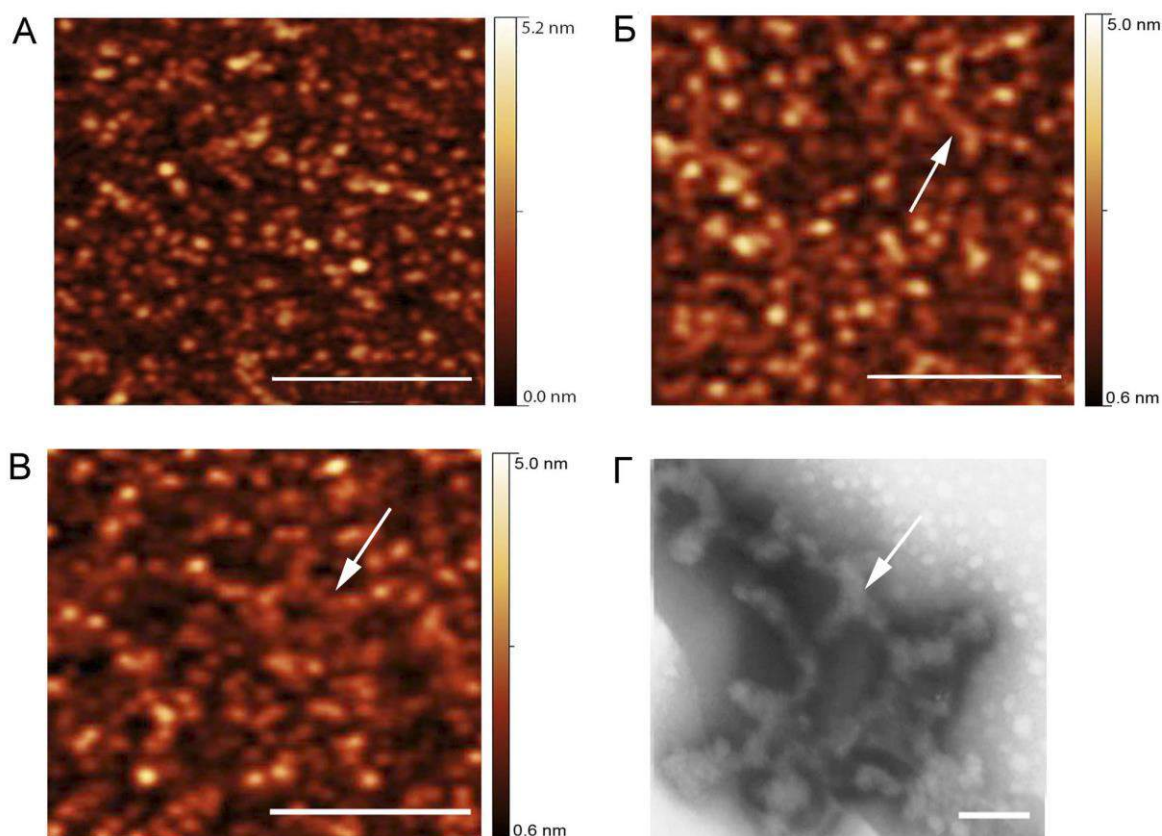


Рис. 3.39. АСМ-изображения (А, Б, В) и электронная микрофотография (Г) агрегатов инсулина (0,2 мг/мл), инкубированного в присутствии 35 мкМ АСТН (1-24) при рН 8.0. Стрелкой на Б показано образование коротких цепочек, на В и Г – образование длинных разветвленных структур. Масштаб – 200 нм (А, Б, В) и 100 нм (Г).

При сравнении изображений, полученных с помощью АСМ или ТЭМ, обнаруживаются различные частицы в зависимости от типа эффектора в инкубационной среде. В присутствии дипептида Arg-Phe образуются гранулярные частицы (5–20 нм), соединяющиеся в длинные цепи, которые могут быть образованы из нескольких тонких цепочек. Размер этих цепей превышает длину аналогичных структур, образующихся в присутствии аргинина. В присутствии фрагмента АСТН преобладают более крупные частицы (20-50 нм), которые собираются в переплетенные цепи. При этом следует учесть, что фрагмент АСТН по молекулярной массе сопоставим с В-цепью инсулина и что его содержание в инкубационной смеси преимущественно соответствовало молярному соотношению 1:1. Можно предположить, что морфологические свойства агрегатов белка зависят от структуры и концентрации эффектора.

3.11. 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.

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. 3.40).

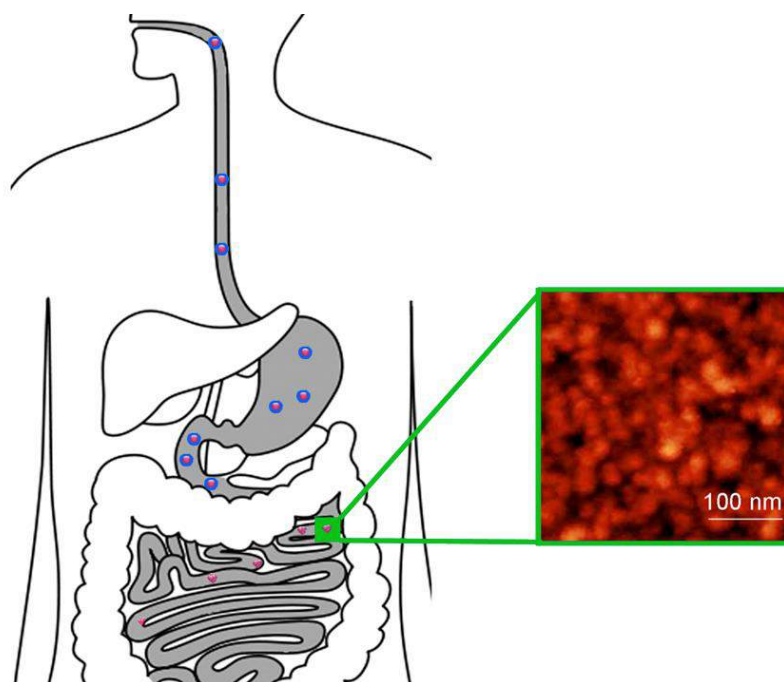


Рис. 3.40. Схема прохождения перорального препарата инсулина через желудочно-кишечный тракт с высвобождением в двенадцатиперстной кишке при щелочном рН и предполагаемого появления агрегатов белка.

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.

3.12. Трансформация структуры α -кристаллина в процессе его шапероноподобного действия

При сравнении действия молекулярного шаперона α -кристаллина на агрегацию белка с эффектами аминокислот и пептидов было обнаружено, что α -кристаллин также способен проявлять не свойственную шаперону активность. На примере ДТТ-индуцированной агрегации рекомбинантного инсулина человека было обнаружено, что α -кристаллин при низких концентрациях ускоряет процесс агрегации, в то время как при высоких концентрациях – подавляет ее [Bumagina et al., 2010]. То есть наблюдалось

противоположно направленное действие шаперона на агрегацию. Было показано также, что α -кристаллин ускоряет инактивацию мышечной гликоген фосфорилазы в кролика [Meremyanin et al., 2008]. При исследовании влияния α -кристаллина на кинетику индуцируемой ДТТ агрегации α -лактальбумина был выявлен весьма сложный механизм шапероноподобного действия, включающий диссоциацию мультимерной структуры α -кристаллина в присутствии дестабилизированного белкового субстрата.

С применением различных методов: ДЛС, центрифужной ультрафильтрации, электрофореза в ПААГ, аналитического ультрацентрифугирования и других показано, что добавление α -кристаллина в различных концентрациях после инкубации α -лактальбумина (0,8 мг/мл) в присутствии ДТТ в течение 15 минут приводит к концентрационно-зависимым изменениям интенсивности светорассеяния в сторону более низких значений по сравнению с контролем (Рис. 3.41).

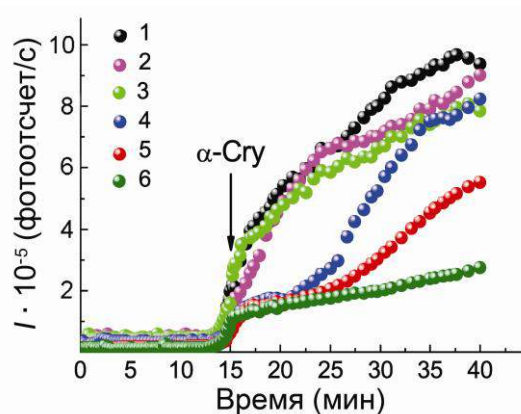


Рис. 3.41. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) от времени инкубации α -лактальбумина (0,8 мг/мл) в отсутствие (1) α -кристаллина. α -Кристаллин добавляли в образцы после инкубации α -лактальбумина в присутствии ДТТ в течение 15 минут (показано стрелкой). Конечная концентрация α -кристаллина в инкубационной смеси составляла 4, 8, 20, 40 и 60 мкМ (2, 3, 4, 5 и 6 соответственно). В контрольный образец был добавлен буфер вместо α -кристаллина.

Можно отметить, что значительное подавление агрегации белка происходит при добавлении α -кристаллина в концентрациях 40 и 60 мкМ. Эти концентрации в расчете на одну субъединицу α -кристаллина (20 кДа) сопоставимы с концентрациями АСТН (1-24) при подавлении агрегации инсулина, также в обоих случаях сопоставимы молярные стехиометрические

соотношения белковый субстрат:эффектор. В связи с этим было интересно исследовать механизмы взаимодействия α -кристаллина с дестабилизированным α -лактальбумином и образования их гетерокомплекса.

Пробы, содержащие α -кристаллин и α -лактальбумин, были отобраны из инкубационной смеси, приготовленной для ДЛС-измерений. Соотношения белковый субстрат:эффектор в смеси соответствовали молярным стехиометрическим соотношениям около 2,5:1 (для концентраций α -лактальбумина и α -кристаллина 0,8 и 0,4 мг/мл соответственно). При этом молекулярную массу одной субъединицы α -кристаллина принимали равной 20 кДа.

Разделение компонентов инкубационной смеси, содержащей белки и белково-шаперонные комплексы, было выполнено с использованием центрифужной ультрафильтрации через фильтры Amicon (США) с проницаемостью для белков с молекулярной массой до 100 кДа. Образцы, отобранные из инкубационной смеси через различные промежутки времени после добавления α -кристаллина, подвергали ультрацентрифугированию, а затем электрофорезу в ПААГ при денатурирующих и не денатурирующих условиях. Электрофореграммы показаны на рисунке 3.42.

По результатам электрофореза в ПААГ белки из образцов, взятых из смеси в начальный момент времени и после 2, 5, 10 и 20 минут инкубации после добавления α -кристаллина, соответствуют α -лактальбумину (14,2 кДа) и α -кристаллину, состоящему из α A- и α B-кристаллинов с молекулярной массой около 20 кДа каждого из них (Рис. 3.42, А). Так как использованные центрифужные фильтры имеют предел отсека по молекулярной массе 100 кДа, очевидно, что α -кристаллин только в диссоциированной форме может проникать через них. Предполагается, что в данных условиях высокомолекулярные мультимеры α -кристаллина частично распадаются, образуя олигомеры небольшого размера. При более длительной инкубации α -кристаллина с α -лактальбумином все меньшее количество низкомолекулярных

форм α -кристаллина проявляется в фильтратах и большое количество белка останется в ретентатах (Рис. 3.42, А, полосы 2–5 и 6, 7 соответственно).

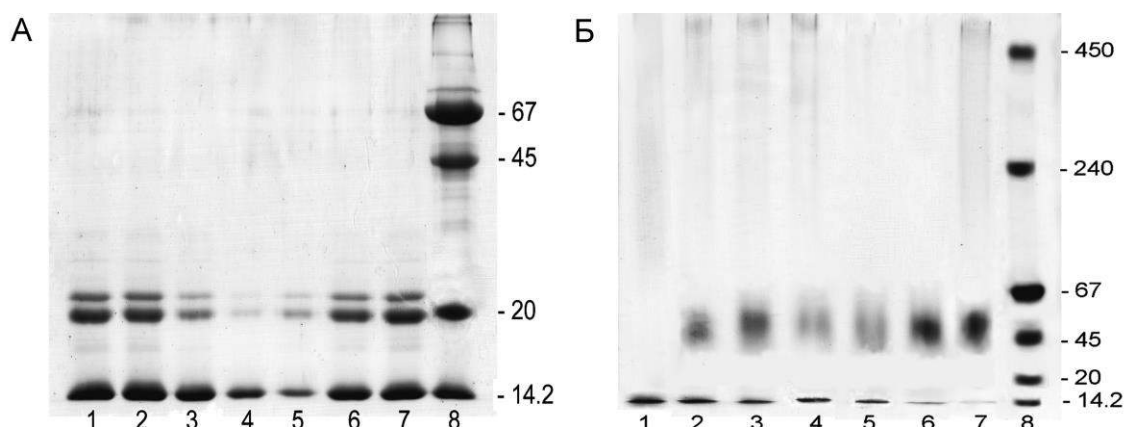


Рис. 3.42. (А) Электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН инкубационных смесей, содержащих α -лактальбумин (0,8 мг/мл) и α -кристаллин (0,4 мг/мл), отобранные на различных этапах агрегации, после ультрацентрифугирования. Полоса 1 соответствует образцу, извлеченному из смеси в начальный момент времени после добавления α -кристаллина до центрифугирования. Полосы 2–5 соответствуют образцам, взятым из смеси, инкубированной в течение 2, 5, 10 и 20 минут соответственно, после добавления α -кристаллина (фильтрат). Полосы 6 и 7 соответствуют образцам, взятым из смеси, инкубированной в течение 2 и 5 минут соответственно после добавления α -кристаллина (ретентат). Полоса 8 – маркеры молекулярной массы. α -Кристаллин добавляли в образцы через 15 минут после инкубации α -лактальбумина в присутствии ДТТ. (Б) Электрофорез в ПААГ при неденатурирующих условиях. Полоса 1 – фильтрат смеси α -лактальбумина и α -кристаллина, инкубированного в течение 5 минут в отсутствие ДТТ. Полосы 2–5 – образцы, взятые из смеси, инкубированной в присутствии ДТТ в течение 2, 5, 10 и 20 минут соответственно, после добавления α -кристаллина (фильтрат). Полосы 6 и 7 – образцы, взятые из смеси, инкубированной в течение 2 и 5 минут соответственно, после добавления α -кристаллина (ретентат). Полоса 8 – маркеры молекулярной массы. Пятна визуализированы с помощью окрашивания Кумасси R-250.

Электрофорез при неденатурирующих условиях показал, что значительное количество белковых комплексов с массой около 50–55 кДа присутствует во фракциях фильтрата и ретентата, содержащих α -кристаллин и дестабилизированный с помощью ДТТ α -лактальбумин (Рис. 3.42, Б, полосы 2–7). Образование таких низкомолекулярных комплексов лучше всего выражено в случае инкубации α -кристаллина с α -лактальбумином в течение 5 минут (Рис. 3.42, Б, полосы 3 и 7). При дальнейшей инкубации количество белка в фильтрате снижается (полосы 4 и 5), предполагая, что образующиеся высокомолекулярные комплексы, содержащие шаперон и белковый субстрат, не входят в гель.

Таким образом, α -лактальбумин в нативной форме не индуцирует изменения в олигомерной структуре α -кристаллина. В отсутствие ДТТ, α -кристаллин сохраняет свою высокую молекулярную массу и олигомерную форму, и, следовательно, не может проявляться в фильтрате (Рис. 3.42, Б, полоса 1). Следует отметить, что α -кристаллин в области концентраций 0,08–1,2 мг/мл (4–60 мкМ) при тех же условиях не обнаруживался в фильтрате и что пятна, соответствующие α -лактальбумину в ретентате, слабо окрашены (Рис. 3.42, Б, полосы 6 и 7). Можно предположить, что белковый субстрат включен в комплексы с шапероном.

Смесь α -лактальбумина (1 мг/мл) и α -кристаллина (0,4 мг/мл), инкубированных в присутствии ДТТ, разделяли с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке с Sephacryl S200 superfine и электрофореза в ПААГ. На рисунке 3.43 сплошной линией показано разделение белков смеси. Первый пик соответствует большому олигомеру α -кристаллина, в то время как второй пик – низкомолекулярному комплексу α -кристаллина с α -лактальбумином, как продемонстрировано с помощью электрофореза в денатурирующих условиях (вставки 2 и 3). α -Кристаллин присутствовал во фракциях «плеч» на левой стороне широкого пика и его вершине, α -лактальбумин проявлялся более интенсивно на электрофореграмме 3.

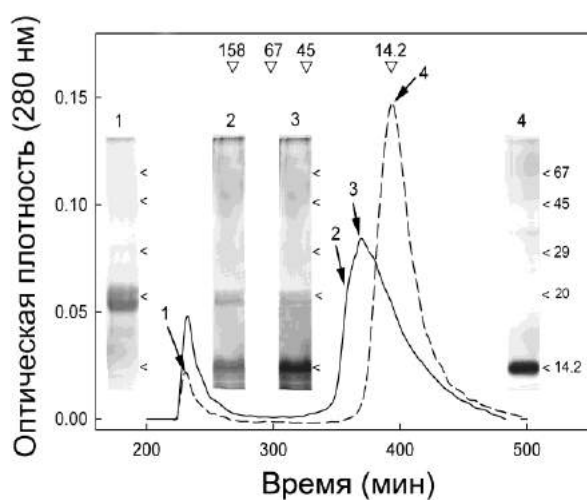


Рис. 3.43. Разделение смеси α -лактальбумина (1 мг/мл) и α -кристаллина (0,4 мг/мл), инкубированных в присутствии ДТТ, с помощью эксклюзионной хроматографии и электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях. Профиль элюции с колонки показан сплошной линией, результат разделения смеси этих белков в нативном состоянии – пунктирной линией. Во вставках показаны электрофореграммы, соответствующие пикам нативных α -кристаллина и α -лактальбумина (1 и 4 соответственно) и смеси α -лактальбумина и α -кристаллина, инкубированных в присутствии ДТТ (2 и 3 соответственно). Маркеры молекулярного веса указаны треугольниками и стрелками для профилей элюции и электрофореграмм соответственно.

С помощью аналитического ультрацентрифугирования было также показано образование белковых комплексов, образующихся при инкубации α -лактальбумина и α -кристаллина в присутствии ДТТ (Рис. 3.44). На рисунке 3.44, А показаны распределения коэффициентов седиментации $c(s)$ для α -кристаллина (0,4 мг/мл) и α -лактальбумина (0,8 мг/мл) и их смеси. Основной пик в распределении $c(s)$ с $s_{20,w}=2,3$ S может соответствовать смеси мономеров и димеров α -лактальбумина. Распределение $c(s)$ для α -кристаллина включает три минорных пика с $s_{20,w}$ 15,5; 19,1 и 22,7 S. Распределение $c(s)$ для смеси α -лактальбумина и α -кристаллина включает кроме основного пика $s_{20,w}$ 2,3 S, два минорных с $s_{20,w}$ 3,3 и 5,5 S. Можно предположить, что эти пики соответствуют комплексам денатурированного α -лактальбумина с диссоциирующими формами α -кристаллина. Эти комплексы могут содержать мономер α -лактальбумина и одну субъединицу α -кристаллина или два мономера α -лактальбумина и две субъединицы α -кристаллина.

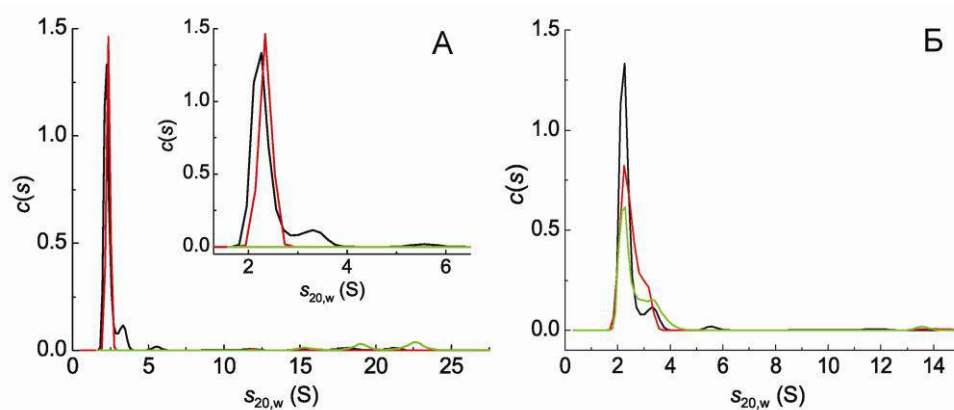


Рис. 3.44. Анализ скорости осаждения α -лактальбумина, α -кристаллина и их смеси, инкубированных в присутствии ДТТ при 37 °С. (А) Дифференциальные распределения коэффициентов седиментации $c(s)$ для α -лактальбумина (0,8 мг/мл, красная кривая), α -кристаллина (0,4 мг/мл, зеленая кривая) и их смеси (черная линия). Вставка показывает распределения $c(s)$ в области значений коэффициента седиментации 1,3–6,5 S. (Б) Распределения $c(s)$ для смеси α -кристаллина (0,4 мг/мл) и α -лактальбумина в концентрациях (1,0 мг/мл, красная кривая, 0,8 мг/мл, черная кривая, и 0,6 мг/мл, зеленая кривая).

На рисунке 3.44, Б показаны распределения $c(s)$, полученные для смеси α -кристаллина (0,4 мг/мл) и α -лактальбумина в различных концентрациях.

Все распределения $s(s)$ включают пик с коэффициентом седиментации 3,3 S, который соответствует белковым комплексам.

Полученные результаты являются новым свидетельством динамических свойств олигомерной структуры молекулярного шаперона α -кристаллина. По данным ДЛС, центрифужной ультрафильтрации, эксклюзионной хроматографии, аналитического ультрацентрифугирования и электрофореза в ПААГ добавление α -кристаллина к полностью восстановленному в присутствии ДТТ α -лактальбумину, используемому в качестве модельного белкового субстрата, приводит к диссоциации мультимерной структуры α -кристаллина. Показано, что в дополнение к высокомолекулярным олигомерам в присутствии дестабилизированного белкового субстрата образуются низкомолекулярные олигомеры с кажущейся молекулярной массой 50–55 кДа, которой может соответствовать α -кристаллин в двумерной форме в комплексе с дестабилизированным мономером α -лактальбумина. Можно предположить существование транзитного защитного механизма, при котором белок в состоянии стресса способен подстраиваться к связывающим центрам на поверхности шаперона в форме димеров.

Можно сделать вывод о более сложном механизме действия молекулярного шаперона, α -кристаллина, по сравнению с эффектами аминокислот и пептидов, в основе которых лежат, главным образом, электростатические и гидрофобные взаимодействия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в данной диссертационной работе, показывают, что аминокислоты или пептиды в качестве биогенных эффекторов, естественно присущих биологическим системам, могут влиять на агрегацию белков. Вовлекаясь в электростатические и гидрофобные взаимодействия, они участвуют в формировании агрегатов белков, подвергнутых воздействию экстремальных условий. Действия эффекторов на агрегацию белков может меняться в зависимости от их концентрации или от рН среды. Это свидетельствует о возможности тонкой регуляции процессов ассоциации и агрегации белков, что актуально в биотехнологии при получении рекомбинантных белков и при создании препаратов медицинского назначения.

ВЫВОДЫ

1. Дипептиды Arg-Phe и Lys-Leu и пептидный фрагмент аденокортикотропного 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.**, 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.
3. **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.
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 Пушинская 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». Черногловка, 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. С. 63.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Acharya K.R., Stuart D.I., Phillips D.C., McKenzie H.A., Teahan C.G. Models of the three-dimensional structures of echidna, horse, and pigeon lysozymes: calcium-binding lysozymes and their relationship with alpha-lactalbumins // *J Protein Chem.* 1994. – V. 13. – P. 569-584.
2. Adams D.R., Toner M., Langer R. Role of trehalose in prevention of vesicle adsorption and encapsulated solute leakage in anhydrobiotic preservation // *Langmuir.* 2007. – V. 23. – P. 13013-13023.
3. Ahmad A., Millett I.S., Doniach S., Uversky V.N., Fink A.L. Partially folded intermediates in insulin fibrillation // *Biochemistry.* 2003. – V. 42. – P. 11404-11416.
4. Al-Majed H.T., Jones P.M., Persaud S.J., Sugden D., Huang G.S., Amiel S., Whitehouse B.J. ACTH stimulates insulin secretion from MIN6 cells and primary mouse and human islets of Langerhans // *J Endocrinol.* 2004. – V.180. – P. 155-166.
5. Anderson P.J., Brooks C.L., Berliner L.J. Functional identification of calcium binding residues in bovine alpha-lactalbumin // *Biochemistry.* 1997. – V. 36. – P. 11648-11654.
6. Anelli T., Sitia R. Protein quality control in the early secretory pathway // *EMBO J.* 2008. – V. 27. – P. 315-327.
7. Arakawa T., Tsumoto K. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation // *Biochem Biophys Res Commun.* 2003. – V. 304, No 1. – P. 148-152.
8. Arakawa T., Ejima D., Kita Y., Tsumoto K. Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs // *Biochim Biophys Acta - Proteins and Proteomics.* 2006. – V. 1764. – P. 1677-1687.

9. Arakawa T., Ejima D., Tsumoto K., Obeyama N., Tanaka Y., Kita Y., Timasheff S.N. Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects // *Biophys Chem.* 2007a. – V. 127. – P. 1-8.
10. Arakawa T., Tsumoto K., Kita Y., Chang B. and Ejima D. Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations // *Amino Acids.* 2007b. – V. 33. – P. 587-605.
11. Arakawa T., Tsumoto K., Nagase K., Ejima D. The effects of arginine on protein binding and elution in hydrophobic interaction and ion-exchange chromatography // *Protein Expr Purif.* 2007c. – V. 54. – P. 110-116.
12. Arakawa T., Uozaki M., Koyama H.A. Modulation of small molecule solubility and protein binding by arginine // *Mol Med Rep.* 2010. – V. 3, No 5. – P. 833-836.
13. Arnaudov L.N., de Vries R. Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme // *Biophys J.* 2005. – V. 88. – P. 515-526.
14. Arora A., Ha C., Park C.B. Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules // *FEBS Lett.* 2004. – V. 564. – P. 121-125.
15. Arora D., Khanna N. Method for increasing the yield of properly folded recombinant human gamma interferon from inclusion bodies // *J Biotechnol.* 1996. – V. 52. – P. 127-133.
20. Austen B.M., Paleologou K.E., Ali S.A., Qureshi M.M., Allsop D., El-Agnaf O.M. Designing peptide inhibitors for oligomerization and toxicity of Alzheimer's beta-amyloid peptide // *Biochemistry.* 2008. – V. 47, No 7. – P. 1984-1992.
21. Aymami J., Barril X., Rodríguez-Pascau L., Martinell M. Pharmacological chaperones for enzyme enhancement therapy in genetic diseases // *Pharm Pat Anal.* 2013. – V. 2, No 1. – P. 109-124.
22. Bakthisaran R., Tangirala R., Rao Ch.M. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology // *Biochim Biophys Acta.* 2015. – V. 1854. – P. 291-319.

23. Baldwin A.J., Walsh P., Hansen D.F., Hilton G.R., Benesch J.L.P., Sharpe S., Kay L.E. Probing dynamic conformations of the high-molecular-weight α B-crystallin heat shock protein ensemble by NMR spectroscopy // *J Am Chem Soc.* 2012. – V. 134. – P. 15343-15350.
24. Barnhart M., Chapman M.R. Curli biogenesis and function // *Annu Rev Microbiol.* 2006. – V. 60. – P. 131-147.
25. Basha E., O'Neill H., Vierling E. Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions // *Trends Biochem Sci.* 2012. – V. 37. – P. 106-117.
26. Baynes B.M., Wang D.I.C., Trout B.L. Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation // *Biochemistry.* 2005. – V. 44. – P. 4919-4925.
27. Behanna H.A., Donners J.J.J.M., Gordon A.C., Stupp S.I. Coassembly of amphiphiles with opposite peptide polarities into nanofibers // *J Am Chem Soc.* 2005. – V. 127. – P. 1193-1200.
28. Bennion B. J., DeMarco M. L., Daggett V. Preventing misfolding of the prion protein by trimethylamine N-oxide // *Biochemistry.* 2004. – V. 43. – P. 12955-12963.
29. Berson J.F., Harper D.C., Tenza D., Raposo G., Marks M.S. Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies // *Mol Biol Cell.* 2001. – V. 12. – P. 3451-3464.
30. Berson, J.F., Theos A.C., Harper D.C., Tenza D., Raposo G., Marks M.S. Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis // *J Cell Biol.* 2003. – V. 161. – P. 521-533.
31. Bhattacharyya J., Santhoshkumar P., Sharma K.K. A peptide sequence – YSGVCHTDLHAWHGDWPLPVK [40–60] – in yeast alcohol dehydrogenase prevents the aggregation of denatured substrate proteins // *Biochem Biophys Res Commun.* 2003. – V. 307. – P. 1-7.

32. Bolen D.W., Baskakov I.V. The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding // *J Mol Biol.* 2001. – V. 310. – P. 955-963.
33. Bomhoff G., Sloan K., McLain C., Gogol E.P., Fisher M.T. The effects of the flavonoid baicalein and osmolytes on the Mg²⁺ accelerated aggregation/fibrillation of carboxymethylated bovine 1SS-alpha-lactalbumin // *Arch Biochem Biophys.* 2006. – V. 453. – P. 75-86.
34. Borelli M.I., Morano M.I., Estivariz F.E., Gagliardino J.J. Glucose-induced secretion of ACTH-like products by rat pancreatic islets // *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* 1994. – V. 102. – P. 17-20.
35. Brange J., Havelund S., Hougaard P. Chemical stability of insulin. 2. Formation of higher molecular weight transformation products during storage of pharmaceutical preparations // *Pharm Res.* 1992. – V. 9. – P. 727-734.
36. Brange J., Andersen L., Laursen E.D., Meyn G., Rasmussen E. Toward understanding insulin fibrillation // *J Pharm Sci.* 1997. – V. 86. – P. 517-525.
37. Brender J. R., Hartman K., Nanga R.P.R., Popovych N., Bea R.D., Vivekanandan S., Marsh E.N.G., Ramamoorthy A.J. Role of zinc in human islet amyloid polypeptide aggregation // *J Am Chem Soc.* 2010. – V. 132, No 26. – P. 8973-8983.
38. Brewster M.E., Hora M.S., Simpkins J.W., Bodor N. Use of 2-hydroxypropyl-cyclodextrin as a solubilizing and stabilizing excipient for protein drugs // *Pharm Res.* 1991. – V. 8. – P. 792-795.
39. Brittenden J., Park K.C., Heys S.D., Ross C., Ashby J., Ah-See Ak., Eremin O. L-arginine stimulates host defenses in patients with breast cancer // *Surgery.* 1994. – V. 115, No 2. – P. 205-212.
40. Bukach O.V., Seit-Nebi A.S., Marston S.B., Gusev N.B. Some properties of human small heat shock protein Hsp20 (HspB6) // *Eur J Biochem.* 2004. – V. 271. – P. 291-302.
41. Bukau B., Weissman J., Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control // *Cell.* 2006. – V. 125. – P. 443-451.

42. Bumagina Z., Gurvits B., Artemova N., Muranov K., Kurganov B. Paradoxical acceleration of dithiothreitol-induced aggregation of insulin in the presence of a chaperone // *Int J Mol Sci*. 2010. – V. 11. – P. 4556-4579.
43. Burg M.B., Peters E.M. Urea and methylamines have similar effects on aldose reductase activity // *Am J Physiol*. 1997. – V. 273. – P. F1048-F1053.
44. Cao A., Hu D., Lai L. Formation of amyloid fibrils from fully reduced hen egg white lysozyme // *Protein Sci*. 2004. – V. 13. – P. 319-324.
45. Cayley S., Record M.T. Roles of cytoplasmic osmolytes, water and crowding in the response of *Escherichia coli* to osmotic stress: the biophysical basis of osmoprotection by glycine betaine // *Biochemistry*. 2003. – V. 42. – P. 12596-12609.
46. Chang X., Jorgensen A.M.M., Bardrum P., Led J. Solution structures of the R₆ human insulin hexamer // *Biochemistry*. 1997. – V. 36. – P. 9409-9422.
47. Checa S.K., Viale A.M. The 70-kDa heat-shock protein/DnaK chaperone system is required for the productive folding of ribulose-biphosphate carboxylase subunits in *Escherichia coli* // *Eur J Biochem*. 1997. – V. 248, No 3. – P. 848-855.
48. Cherepkova O.A., Lyutova E.M., Eronina T.B., Gurvits B.Ya. Chaperone-like activity of macrophage migration inhibitory factor // *Int J Biochem Cell Biol*. 2006. – V. 38. – P. 43-55.
49. Chirita C.N., Necula M., Kuret J. Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization *in vitro* // *J Biol Chem*. 2003. – V. 278. – P. 25644-25650.
50. Cirkovas A., Sereikaite J. Different effects of L-arginine on the heat-induced unfolding and aggregation of proteins // *Biologicals*. 2011. – V. 39. – P. 181-188.
51. Chiti F., Dobson C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease // *Annu Rev Biochem*. 2006. – V. 75. – P. 333-366.
52. Choi S.P., Park Y.-C., Lee J., Sim S.J., Chang H.-N. Effects of L-arginine on refolding of lysine-tagged human insulin-like growth factor 1 expressed in *Escherichia coli* // *Bioprocess Biosyst Eng*. 2012. – V. 35. – P. 255-263.

53. Cholewinski M., Luckel B., Horn H. Degradation pathways, analytical characterization and formulation strategies of a peptide and a protein. Calcitonine and human growth hormone in comparison // *Pharm Acta Helv.* 1996. – V. 71. – P. 405-419.
54. Christina E.D., Brew K., Acharya K.R. Crystal structure of apo- and holo-bovine alpha-lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interaction // *J Biol Chem.* 2000. – V. 275. – P. 37021-37029.
55. Cui W., Ma J.-W., Lei P., Wu W.-H., Yu Y.-P., Xiang Y., Tong A.-J., Zhao Y.-F., Li Y.-M. Insulin is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amylin aggregation // *FEBS J.* 2009. – V. 276, No 12. – P. 3365-3371.
56. Daly J.M., Reynolds J., Thorn A., Kinsley L., Dietrick-Gallagher M., Shou J., Ruggieri B. Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patient // *Ann Surg.* 1988. – V. 206, No 4. – P. 512-523.
57. Daly J.M., Lieberman M.D., Goldfine J., Shou J., Weintraub F., Rosato E.F., Lavin P. Enteral nutrition with supplemental arginine, RNA, and omega-3 fatty acids in patients after operation: immunologic, metabolic and clinical outcome // *Surgery.* 1992. – V. 112. – P. 56-67.
58. Darmaun D., Matthews D.E., Bier D.M. Glutamine and glutamate kinetics in humans // *Am J Physiol.* 1986. – V. 251. – P. 117-126.
59. Das U., Hariprasad G., Ethayathulla A.S., Manral P., Das T.K., Pasha S., Mann A., Ganguli M., Verma A.K., Bhat R., Chandrayan S.K., Ahmed S., Sharma S., Kaur P., Singh T.P., Srinivasan A. Inhibition of protein aggregation: supramolecular assemblies of arginine hold the key // *PLoS One.* 2007. – V. 2, No 11. – e1176.f.
60. Davies J.E., Sarkar S., Rubinsztein D.C. Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy // *Hum Mol Genet.* 2006. – V. 15. – P. 23-31.
61. De Bolle X., Vinals C., Prozzi D., Paquet J.Y., Leplae R., Depiereux E., Vandenhoute J., Feytmans E. Identification of residues potentially involved in

the interactions between subunits in yeast alcohol dehydrogenases // *Eur J Biochem.* 1995. – V. 231. – P. 214-219.

62. De Groot N.S., Parella T., Aviles F.X., Vendrell J., Ventura S. Ile-Phe dipeptide self-assembly: Clues to amyloid formation // *Biophys J.* 2007. – V. 92. – P. 1732-1741.

63. Dehsorkhi A., Castelletto V., Hamley I.V. Self-assembling amphiphilic peptides // *J Pept Sci.* 2014. – V. 20. – P. 453-467.

64. Deitch E.A., Beck S.C., Cruz N.C., Demaio A. Induction of heat-shock gene expression in colonic epithelial cells after incubation with *Escherichia coli* or endotoxin *Escherichia coli* // *Crit Care Med* 1995. – V. 23. – P. 1371-1376.

65. Dobson C.M. Protein folding and misfolding // *Nature.* 2003. – V. 426. – P. 884-890.

66. Dobson C.M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation // *Semin Cell Dev Biol.* 2004. – V. 15. – P. 3-16.

67. Dolgikh D.A., Gilmanshin R.I., Brazhnikov E.V., Bychkova V.E., Semisotnov G.V., Venyaminov S.Y., Ptitsyn O.B. Alpha-lactalbumin – compact state with fluctuating tertiary structure // *FEBS Lett.* 1981. – V. 136. – P. 311-315.

68. Dougherty J. Cation-pi interactions involving aromatic amino acids // *J Nutr.* 2007. – V. 137. – P. 1504S-1508S.

69. Ellis-Behnke R.G., Liang Y.-X., You Si-W., Tay D.K.C., Zhang S., So K.-F., Schneider G.E. Nano neuro knitting: peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return vision // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. – V. 103, No 13. – P. 5054-5059.

70. Fandrich M., Meinhardt J., Grigorieff N. Structural polymorphism of Alzheimer A β and other amyloid fibrils // *Prion.* 2009. – V. 3. – P. 89-93.

71. Fatouros D.G., Lamprou D.A., Urquhart A.J., Yannopoulos S.N., Vizirianakis I.S., Zhang S., Koutsopoulos S. Lipid-like self-assembling peptide nanovesicles for drug delivery // *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014. – V. 6. – P. 8184–8189.

72. Feldhammer M., Durand S., Pshezhetsky A.V. Protein misfolding as an underlying molecular defect in mucopolysaccharidosis III type C // PLoS One. 2009. – V. 4, No 10. – e7434.
73. Fields G., Alonso D., Stiger D., Dill K. Theory for the aggregation of proteins and copolymers // J Phys Chem. 1992. – V. 96. – P. 3974-3981.
74. Flaherty K.M., DeLuca-Flaherty C., McKay D.B. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein // Nature. 1990. – V. 346. – P. 623-628.
75. Fowler D.M., Koulov A.V., Alory-Jost C., Marks M.S., Balch W.E., Jeffery W. Kelly J.W. Functional amyloid formation within mammalian tissue // PLoS Biol. 2006. – 4(1):e6.
76. Fowler D.M., Koulov A.V., Balch W.E., Kelly J.W. Functional amyloid—from bacteria to humans // Trends Biochem Sci. 2007. – V. 32. – P. 217-224.
77. Fraser P.E., McLachlan D.R., Surewicz W.K., Mizzen C.A., Snow A.D., Nguyen J.T., Kirschner D.A.. Conformation and fibrillogenesis of Alzheimer A beta peptides with selected substitution of charged residues // J Mol Biol. 1994. – V. 244. – P. 64-73.
78. Frydman J. Folding of newly translated proteins in vivo: The role of molecular chaperones // Annu Rev Biochem. 2001. – V. 70. – P. 603-647.
79. Fulop L., Zarandi M., Datki Z., Soos K., Penke B. Beta-amyloid-derived pentapeptide RIIGLa inhibits Abeta (1-42) aggregation and toxicity // Biochem Biophys Res Commun. 2004. – V. 324, No 1. – P. 64-69.
80. Fung S. Y., Yang H., Chen P. Sequence effect of self-assembling peptides on the complexation and *in vitro* delivery of the hydrophobic anticancer drug ellipticine // PLoS One. 2008. – V. 3. – e1956.
81. Funke S.A., Willbord D. Peptides for therapy and diagnosis of Alzheimer's disease // Curr Pharm Des. 2012. – V. 18. – P. 755-767.
82. Futaki S. Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocation mechanisms // Int J Pharm. 2002. – V. 245. – P. 1-7.

83. Gagliardino J.J., Borelli M.I., Boschero A.C., Rojas E., Atwater I. Modulatory mechanism of ACTH on insulin secretion: effect on cytosolic Ca^{2+} , membrane potential and Ca^{2+} -ATPase activity // *Arch Physiol Biochem.* 1995. – V. 103. – P. 73-78.
84. Gao M.-T., Dong X.-Y., Sun Y. Interaction between L-arginine/L-arginine derivatives and lysozyme and implications to their inhibition effects on protein aggregation // *Biotechnol Prog.* 2013. – V. 29, No 5. – P. 1316-1324.
85. Geething M.J., Sambrook J. Protein folding in the cell // *Nature.* 1992. – V. 355. – P. 33-45.
86. Ghosh R., Sharma S., Chattopadhyay K. Effect of arginine on protein aggregation studied by fluorescence correlation spectroscopy and other biophysical methods // *Biochemistry.* 2009. – V. 48. – P. 1135-1143.
87. Gibson T.J., Murphy R.M. Inhibition of insulin fibrillogenesis with targeted peptides // *Protein Sci.* 2006. – V. 15. – P. 1133-1141.
88. Gilead S., Wolfenson H., Gazit E. Molecular mapping of the recognition interface between the islet amyloid polypeptide and insulin // *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006. – V.45, No 39. – P. 6476-6480.
89. Grau U., Saudek C.D. Stable insulin preparation for implanted insulin pumps. Laboratory and animal trials // *Diabetes.* 1987. – V. 36. – P. 1453-1459.
90. Grico Y.V., Freire E., Privalov P.L. Energetics of the alpha-lactalbumin states: a calorimetric and statistical thermodynamic study // *Biochemistry.* 1994. – V. 33. – P. 1889-1899.
91. Gronda C.M., Diaz G.B., Rossi J.P., Gagliardino J.J. Correlation between Ca^{2+} -ATPase activity of rat islet cells and insulin secretion // *J Endocrinol.* 1992. – V. 134. – P. 221-225.
92. Gsponer J., Babu M. Cellular strategies for regulating functional and nonfunctional protein aggregation // *Cell Rep.* 2012. – V.2, No 5. – P. 1425-1437.
93. Gunda V., Boosani C.S., Verma R.K., Guda C., Sudhakar Y.A. L-arginine mediated renaturation enhances yield of human, $\alpha 6$ type IV collagen non-

collagenous domain from bacterial inclusion bodies // *Protein Pept Lett.* 2012. – V. 19. – P. 1112-1121.

94. Hagiwara T., Kumagai H., Nakamura K. Fractal analysis of aggregates formed by heating dilute BSA solutions using light scattering methods // *Biosci Biotechnol Biochem.* 1996. – V. 60. – P. 1757-1763.

95. Hakansson A., Zhivotovsky B., Orrenius S., Sabharwal H., Svanborg C. Apoptosis induced by a human milk protein // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995. – V. 92. – P. 8064-8068.

96. Hamley I.W., Dehsorkhi A., Castelletto V., Seitsonen J., Ruokolainen J., Iatrou H. Self-assembly of a model amphiphilic oligopeptide incorporating an arginine headgroup // *Soft Matter.* 2013. – V. 9. – P. 4794-4801.

97. Han H.Y., Yao Z.G., Gong C.L., Xu W.A. The protective effects of osmolytes on yeast alcohol dehydrogenase conformational stability and aggregation // *Protein Pept Lett.* 2010. – No 8. – P. 1058-1066.

98. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein // *Science.* 2002. – V. 295. – P. 1852-1858.

99. Hartl F.U., Bracher A., Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis // *Nature.* 2011. – V. 475. – P. 324-332.

100. Haslbeck M. sHsps and their role in the chaperone network // *Cell Mol Life Sci.* 2002. – V. 59. – P.1649-1657.

101. Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurtner D., Buchner J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins // *Nat Struct Mol Biol.* 2005. – V. 12. – P. 842-846.

102. Hauser C.A.E., Zhang S. Designer self-assembling peptide nanofiber biological materials // *Chem Soc Rev.* 2010. – V. 39. – P. 2780-2790.

103. Hebda J.A., Magzoub M., Miranker A.D. Small molecule screening in context: Lipid-catalyzed amyloid formation // *Protein Sci.* 2014. – V. 23. – P. 1341-1348.

104. Helms L.R., Wetzel R. Specificity of abnormal assembly in immunoglobulin light chain deposition disease and amyloidosis // *J Mol Biol.* 1996. – V. 257. – P. 77-86.
105. Hemmingsen S.M., Woolford C., van der Vies S.M., Tilly K., Dennis D.T., Georgopoulos C.P., Hendrix R.W., Ellis R.J. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly // *Nature.* 1988. – V. 333. – P. 330-334.
106. Henry G.D., Sykes B.D. Determination of the rotational dynamics and pH dependence of the hydrogen exchange rates of the arginine guanidino group using NMR spectroscopy // *J Biomol NMR.* 1995. – V. 6. – P. 59-66.
107. Herdendorf T.J., Plapp B.V. Origins of the high catalytic activity of human alcohol dehydrogenase 4 studied with horse liver A317C alcohol dehydrogenase // *Chem Biol Interact.* 2011. – V. 191. – P. 42-47.
108. Hevehan D.L., Clark D.B.E. Oxidative renaturation of lysozyme at high concentration // *Biotechnol Bioeng.* 1997. – V. 54. – P. 221-230.
109. Hill R.L., Brew K. Lactose synthetase // *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1975. – V. 43. – P. 411-490.
110. Hiraoka Y., Segawa T., Kuwajima K., Sugai S., Murai, N. Alpha-Lactalbumin: a calcium metalloprotein // *Biochem Biophys Res Commun.* 1980. – V. 95. – P. 1098-1104.
111. Hopper E.D., Pittman A.M., Fitzgerald M.C., Tucker C.L. In vivo and examination of stability of primary hyperoxaluria-associated human alanine: glyoxylate aminotransferase // *J Biol Chem.* 2008. – V. 283, No 45. – P. 30493-30502.
112. Horwich A. Protein aggregation in disease: role for folding intermediates forming specific multimeric interactions // *J Clin Invest.* 2002. – V. 110, No 9. – P. 1221-1232.
113. Hou F., Sun L., Zheng H., Skaug B., Jiang Q.-X., Chen Z.J. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response // *Cell.* 2011. – V. 146. – P. 448–461.

114. Hua Q.X., Weiss, M.A. Mechanism of insulin fibrillation: The structure of insulin under amyloidogenic conditions resembles a protein-folding intermediate // *J Biol Chem.* 2004. – V. 279. – P. 21449-21460.
115. Hull R.L., Westermark G.T., Westermark P., Kahn S.E.J. Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes // *J Clin Endocrinol Metab.* 2004. – V. 89, No 8. – P. 3629-3643.
116. Hutton J.C. The insulin secretory granule // *Diabetologia.* 1989. – V. 32, No 5. – P. 271-281.
117. Ionomidou V.A., Vriend G., Hamodrakas S.J. Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo // *FEBS Lett.* 2000. – V. 479. – P. 141-145.
118. Ishibashi M., Tsumoto K., Tokunaga M., Ejima D., Kita Y., Arakawa T. Is arginine a protein-denaturant? // *Protein Expr Purif.* 2005. – V. 42. – P. 1-6.
119. Ito L., Shiraki K., Matsuura T., Okumura M., Hasegawa K., Baba S., Yamaguchi H., Kumasaka T. High-resolution X-ray analysis reveals binding of arginine to aromatic residues of lysozyme surface: Implication of suppression of protein aggregation by arginine // *Protein Eng Des Sel.* 2011. – V. 24. – P. 269-274.
120. Jaikaran E.T.A.S., Nilsson M.R., Clark A. Pancreatic beta-cell granule peptides form heteromolecular complexes which inhibit islet amyloid polypeptide fibril formation // *Biochem J.* 2004. – V. 377. – P. 709-716.
121. Jacob U., Gaestel M., Engel K., Buchner J., Small heat shock proteins are molecular chaperones // *J Biol Chem.* 1993. – V. 268. – P. 1517-1520.
122. Kad N.M., Thomson N.H., Smith D.P., Smith D.A., Radford S. Beta(2)-microglobulin and its deamidated variant, N17D form amyloid fibrils with a range of morphologies in vitro // *J Mol Biol.* 2001. – V. 313. – P. 559-571.
123. Kardos J., Okuno D., Kawai T., Hagihara Y., Yumoto N., Kitagawa T., Zavodszky P., Naiki H., Goto Y. Structural studies reveal that the diverse morphology of beta2-microglobulin aggregates is a reflection of different molecular architectures // *Biochim Biophys Acta.* 2005. – V. 1753. – P. 108-120.
124. Khurana R., Gillespie J.R., Talapatra A., Minert L.J., Ionescu-Zanetti C., Millett I., Fink A.L. Partially folded intermediates as critical precursors of light

chain amyloid fibrils and amorphous aggregates // *Biochemistry*. 2001. – V. 40. – P. 3525-3535.

125. Kim H.-J., Shin C. H., Kim C.-W. Stabilization of glycoprotein liquid formulation using arginine: a study with lactoferrin as a model protein // *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009. – V. 73. – P. 61-66.

126. Kiriya M.T., Oka M., Takehana M., Kobayashi S. Expression of a small heat shock protein 27 (HSP27) in mouse skin tumors induced by UV irradiation // *Biol Pharm Bull*. 2001. – V. 24. – P. 197-200.

127. Kita Y., Arakawa T., Lin T.Y., Timasheff S.N. Contribution of the surface free energy perturbation to protein-solvent interactions // *Biochemistry*. 1994. – V. 33. – P. 15178-15189.

128. Knight J.D., Miranker A.D. Phospholipid catalysis of diabetic amyloid assembly // *J Mol Biol*. 2004. – V. 341, No 5. – P. 1175-1187.

129. Knight J.D., Williamson J.A., Miranker A.D. Interaction of membrane-bound islet amyloid polypeptide with soluble and crystalline insulin // *Protein Sci*. 2008. – V. 17, No 10. – P. 1850-1856.

130. Kodaka M. Requirements for generating sigmoidal time-course aggregation in nucleation-dependent polymerization model // *Biophys Chem*. 2004. – V. 107. – P. 243-253.

131. Krebs M.R.H., Wilkins D.K., Chung E.W., Pitkeathly M.C., Chamberlain A.K., Zurdo J., Robinson C.V., Dobson C.M. Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and peptide fragment from the β -domain // *J Mol Biol*. 2000. – V. 300. – P. 541-549.

132. Kudou M., Shiraki K., Fujiwara S., Imanaka T., Takagi M. Prevention of thermal inactivation and aggregation of lysozyme by polyaminene // *Eur J Biochem*. 2003. – V. 270. – P. 4547-4554.

133. Kuwajima K. The molten globule state of alpha-lactalbumin // *FASEB J*. 1996. – V. 10. – P. 102-109.

134. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. – V. 227. – P. 680-685.

135. Larson J.L., Miranker A.D. The mechanism of insulin action on islet amyloid polypeptide fiber formation // *J Mol Biol.* 2004. – V. 335. – P. 221-231.
136. Laybutt D.R., Preston A.M., Akerfeldt M.C., Kench J.G., Busch A.K., Biankin A.V., Biden T.J. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes // *Diabetologia.* 2007. – V. 50, No 4. – P. 752-763.
137. Le W.P., Yan S.X., Li S., Zhong H.N., Zhou H.M. Alkaline unfolding and salt-induced folding of yeast alcohol dehydrogenase under high pH conditions // *Int J Pept Protein Res.* 1996. – V. 47. – P. 484-490.
138. Lebovitz H.E., Bryant K., Frohman L.A. Acute effects of corticotropin and related peptides on carbohydrate and lipid metabolism // *Ann N Y Acad Sci.* 1965. – V. 131. – P. 274-287.
139. Lee G.J., Roseman A.M., Saibil H.R., Vierling E. A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. // *EMBO J.* 1997. – V. 16. – P. 659-671.
140. Lee S., Tsai F.T. Molecular chaperones in protein quality control // *J Biochem Mol Biol.* 2005. – V. 38. – P. 259-265.
141. Lee S.-H., Carpenter J.F., Chang B.S., Randolph T.W., Kim Y.-S. Effects of solutes on solubilization and refolding of proteins from inclusion bodies with high hydrostatic pressure // *Protein Sci.* 2006. – V. 15. – P. 304-313.
142. Lee W.C., Kang D., Causevic E., Herdt A.R., Eckman E.A., Eckman C.B. Molecular characterization of mutations that cause globoid cell leukodystrophy and pharmacological rescue using small molecule chemical chaperones // *J Neurosci.* 2010. – V. 30, No 16. – P. 5489-5497.
143. LeVine H. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T // *Methods Enzymol.* 1999. – V. 309. – P. 274-284.
144. Lin C.-Y., Gurlo T., Kaye R., Butler A.E., Haataja L., Glabe C.G., Butler P.C. Toxic human islet amyloid polypeptide (h-IAPP) oligomers are intracellular, and vaccination to induce anti-toxic oligomer antibodies does not prevent h-IAPP-induced beta-cell apoptosis in h-IAPP transgenic mice // *Diabetes.* 2007. – V. 56, No 5. – P. 1324-1332.

145. Lin T.Y., Timasheff S.N. On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins // *Protein Sci.* 1996. – V. 5. – P. 372-381.
146. Lindner R.A., Kapur A., Carver J.A. The interaction of the molecular chaperone, alpha-crystallin, with molten globule states of bovine alpha-lactalbumin // *J Biol Chem.* 1997. – V. 272. – P. 27722-27729.
147. Lomakin A., Teplov D.B., Kirschner D.A., Benedek G.B. Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid β -protein // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997. – V. 94. – P. 7942-7947.
148. Lotze M.T., Tracey K.J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal // *Nat Rev Immunol.* 2005. – V. 5. – P. 331-342.
149. Luo Z., Wang S., Zhang S. Fabrication of self-assembling D-form peptide nanofiber scaffold d-EAK16 for rapid hemostasis // *Biomaterials.* 2011. – V. 32. – P. 2013-2020.
150. Lutova E.M., Kasakov A.S., Gurvits B. Ya. Effects of arginine on kinetics of protein aggregation studied by dynamic laser light scattering and turbidimetry techniques // *Biotech Prog.* 2007. – V. 23. – P. 1411-1416.
151. Maddelein M.L., Dos Reis S., Duvesin-Caubet S., Coulari-Salin B., Saupe S.J. Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. – V. 99. – P. 7402-7407.
152. Magonet E., Hayen P., Delforge D., Delaive E., Remacle J. Importance of the structural zinc atom for the stability of yeast alcohol dehydrogenase // *Biochem J.* 1992. – V. 287. – P. 361-365.
153. Maji S.K., Perrin M.H., Sawaya M.R., Jessberger S., Vadodaria K., Rissman R.A., Singru P.S., Nilsson K.P., Simon R., Schubert D. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules // *Science.* 2009. – V. 325. – P. 328-332.
154. Malencik D.A., Anderson S.R. Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe // *Amino Acids.* 2003. – V. 25. – P. 233-247.

155. Mande S.C., Sobhia M.E. Structural characterization of protein-denaturant interactions: Crystal structures of hen egg-white lysozyme in complex with DMSO and guanidinium chloride // *Protein Eng.* 2000. – V. 13. – P. 133-141.
156. Manna T., Sarkar T., Poddar A., Roychowdhury M., Das K.P., Bhattacharyya B. Chaperone-like activity of tubulin: binding and reactivation of unfolded substrate enzymes // *J Biol Chem.* 2001. – V. 276, No 43. – P. 39742-39747.
157. Marjan S., Habibib A.E., Hosseinkhanic S., Ghasemia A., Gorgani M.N. Prevention of thermal aggregation of an allosteric protein by small molecules: Some mechanistic insights // *Int J Biol Macromol.* 2011. – V. 49. – P. 806-813.
158. Mason P.E., Neilson G.W., Enderby J.E., Saboungi M.-L. Dempsey C.E, MacKerell A.D., Brady J.W. The structure of aqueous guanidiniumchloride solutions // *J Am Chem Soc.* 2004. – V. 126. – P. 11462-11470.
159. Mathew A., Morimoto R.I. Role of the heat-shock response in the life and death of proteins // *Ann N Y Acad Sci.* 1998. – V. 851. – P. 99-111.
160. Matsunaga Y., Fujii A., Awasthi A., Yokotani J., Takakura T., Yamada T. Eight-residue A β -peptides inhibit the aggregation and enzymatic activity of A β 42 // *Regul Pept.* 2004. – V. 120. – P. 227-236.
161. Matsuoka T., Hamada H., Matsumoto K., Shiraki K. Indispensable structure of solution additives to prevent inactivation of lysozyme for heating and refolding // *Biotech Prog.* 2009. – V. 25. – P. 1515-1524.
162. McKenzie H.A., White F.H. Studies of a trace cell lytic activity associated with α -lactalbumin // *Biochem Int.* 1987. – V. 14. – P. 347-356.
163. Melandri G., Vagnarelli F., Calabrese D., Semprini F., Nanni S., Branzi A. Review of tenecteplase (TNKase) in the treatment of acute myocardial infarction // *Vasc Health Risk Manag.* 2009. – V. 5, No 1. – P. 249-256.
164. Meremyanin A.V., Eronina T.B., Chebotareva N.A., Kurganov B.I. Kinetics of thermal aggregation of glycogen phosphorylase b from rabbit skeletal

muscle: mechanism of protective action of alpha-crystallin // *Biopolymers*. 2008. – V. 89. – P. 124-134.

165. Merlini G., Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis // *N Engl J Med*. 2003. – V. 349. – P. 583-596.

166. Min H.J., Ko E.A., Wu J., Kim E.S., Kwon K., Kwak M.S., Choi J.E., Lee J.E., Shin J.-S. Aggregates reducing the formation of polyglutamine group box 1 protein and its role in chaperone-like activity of high-mobility // *J Immunol*. 2013. – V. 190. – P. 1797-1806.

167. Miroliaeli M., Nemat-Gorgani M. Sugars protect native and apo yeast alcohol dehydrogenase against irreversible thermoinactivation // *Enzyme Microb Technol*. 2001. – V. 29. – P. 554-559.

168. Mountjoy K.G., Robbins L.S., Mortrud M.T., Cone R.D. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors // *Science*. 1992. – V. 257. – P. 1248-1251.

169. Nakakido M., Kudou M., Arakawa T., Tsumoto K. To be excluded or to bind, that is the question: arginine effects on proteins // *Curr Pharm Biotechnol*. 2009. – V. 10. – P. 415-420.

170. Nakamoto H., Vigh L. The small heat shock proteins and their clients // *Cell Mol Life Sci*. 2007. – V. 64. – P. 294-306.

171. Nazir A., Saxena D.K., Chowdhuri D.K. Induction of hsp70 in transgenic *Drosophila*: biomarker of exposure against phthalimide group of chemicals // *Biochim Biophys Acta*. 2003. – V. 1621. – P. 218-225.

172. Nedumpully-Govindan P., Ding F. Inhibition of IAPP aggregation by insulin depends on the insulin oligomeric state regulated by zinc ion concentration // *Sci Rep*. 2015. – V. 5. – DOI: 10.1038/srep08240.

173. Nettleton E.J., Tito P., Sunde M., Bouchard M., Dobson C.M., Robinson C.V. Characterization of the oligomeric states of insulin in self-assembly and amyloid fibril formation by mass spectrometry // *Biophys J*. 2000. – V. 79. – P. 1053-1065.

174. Nielsen L., Frokjaer S., Brange J., Uversky V.N., Fink A.L. Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants // *Biochemistry*. 2001a. – V. 40. – P. 8397-8409.
175. Nielsen L., Frokjaer S., Carpenter J.F., Brange J. Studies of the structure of insulin fibrils by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and electron microscopy // *J Pharm Sci*. 2001b. – V. 90. – P. 29-37.
176. Ohnishi T., Ohnishi K., Wang X., Takahashi A., Okaichi K. Restoration of mutant TP53 to normal TP53 function by glycerol as a chemical chaperone // *Radiat. Res*. 1999. – V. 151. – P. 498–500.
177. Okanojo M., Shiraki K., Kudou M., Nishikori S. Takagi M. Diamines prevent thermal inactivation and aggregation of lysozyme // *J Biosci Bioeng*. 2005. – V. 100. – P. 556-561.
178. Patro S.Y., Przybycien T.M. Simulations of kinetically irreversible protein aggregate structure // *Biophys J*. 1994. – V. 66. – P. 1274-1289.
179. Pearl L.H., Prodromou Ch. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery // *Annu Rev Biochem*. 2006. – V. 75. – P. 271-294.
180. Pellequer J.L., Zhao B., Kao H.I., Bell C.W., Li K., Li Q.L., Karu A.E., Roberts V.A. Stabilization of bound polycyclic aromatic hydrocarbons by a π -cation interactions // *J Mol Biol*. 2000. – V. 302. – P. 691-699.
181. Peppas N.A., Kavimandan N.J. Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles // *Eur J Pharm Sci*. 2006. – V. 29. – P. 183-197.
182. Pepys M.B., Hawkins P.N., Booth D.R., Vigushin D.M., Tennent G.A., Soutar A.K., Totty N., Nguyen O., Blake C.C.F., Terry C.J., Feast T.G., Zalin T.G., Hsuan J.J. Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis // *Nature*. 1993. – V. 362. – P. 553-556.
183. Permyakov E.A., Yarmolenko, V.V., Kalinichenko L.P., Morozova L.A., Burstein E.A. Calcium binding to alpha-lactalbumin: structural rearrangement and association constant evaluation by means of intrinsic protein

fluorescence changes // *Biochem Biophys Res Commun*. 1981. – V. 100. – P. 191-197.

184. Permyakov E.A., Berliner L.J. α -Lactalbumin: structure and function // *FEBS Lett*. 2000. – V. 473. – P. 269-274.

185. Pey A.L., Perez B., Desviat L.R., Martínez M.A., Aguado C., Erlandsen H., Gámez A., Stevens R.C., Thóroffsson M., Ugarte M., Martínez A. Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations // *Hum Mutat*. 2004. – V. 24, No 5. – P. 388-399.

186. Philo J.S., Arakawa T. Mechanisms of protein aggregation // *Curr Pharm Biotechnol*. 2009. – V. 10. – P. 348-351.

187. Piotto M., Saudek V., Sklenar V. Gradient-tailored excitation for single quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions // *J Biomol NMR*. 1992. – V. 2. – P. 661-665.

188. Pratt W.B., Hutchison K.A., Scherrer L.C. Steroid receptor folding by heat-shock proteins and composition of the receptor heterocomplex // *Trends Endocrinol Metab*. 1992. – V. 3, No 9. – P. 326-333.

189. Rajan R.S., Tsumoto K., Tokunaga M., Tokunaga H., Kita Y., Arakawa T. Chemical and pharmacological chaperones: application for recombinant protein production and protein folding diseases // *Curr Med Chem*. 2011. – V. 18. – P. 1-15.

190. Ranganathan S., Singh P.K., Singh U., Singru P.S., Padinhateeri R., Maji S.K. Molecular interpretation of ACTH- β -endorphin coaggregation: relevance to secretory granule biogenesis // *PLOS One*. 2012. – V. 7, No 3. – P. 1-12.

191. Reches M., Gazit E. Formation of closed-cage nanostructures by self-assembly of aromatic dipeptides // *Nano Lett*. 2004. – V. 4, No 4. – P. 581-585.

192. Reches M., Gazit E. Novel electrochemical biosensing platform using self-assembled peptide nanotubes // *Nano Lett*. 2005. – V. 5. – P. 183-186.

193. Reddy K.R.C., Lilie H., Rudolph R., Lange C. L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme // *Protein Sci*. 2005. – V. 14. – P. 929-935.

194. Reijns M.A., Alexander R.D., Spiller M.P., Beggs J.D. A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization // *J Cell Sci.* 2008. – V. 121. – P. 2463-2472.
195. Richter-Landsberg C., Goldbaum O. Stress proteins in neural cells: functional roles in health and disease // *Cell Mol Life Sci.* 2003. – V. 60. – P. 337-349.
196. Roefs S.P., De Kruif K.G. A model for the denaturation and aggregation of beta-lactoglobulin // *Eur J Biochem.* 1994. – V. 226. – P. 883-889.
197. Santhoshkumar P., Raju M., Sharma K.K. α A-Crystallin peptide 66SDRDKVFIFLDVKHF80 accumulating in aging lens impairs the function of α -crystallin and induces lens protein aggregation // *PLOS One.* 2011. – V. 6. – e19291.
198. Sarkar N., Mukhopadhyay K., Parrack P.K., Bhattacharyya B. Aging of tubulin monomers using 5,5'-bis(8-anilino-1-naphthalenesulfonate) as a probe // *Biochemistry.* 1995. – V. 34. – P. 13367-13373.
199. Shah D., Li J., Shaikh A.R., Rajagopalan R. Arginine-aromatic interactions and their effects on arginine-induced solubilization of aromatic solutes and suppression of protein aggregation // *Biotech Prog.* 2012. – V. 28. – P. 223-231.
200. Shalova I.N., Asryants R.A., Sholukh M.V., Saso L., Kurganov B.I., Muronetz V.I., Izumrudov V.A. Interaction of polyanions with basic proteins: influence of complexing polyanions on the thermoaggregation of oligomeric enzymes // *Macromol Biosci.* 2005. – V. 5. – P. 1184-1192.
201. Sharma K.K., Kumar R.S., Kumar G.S., Quinn P.T. Synthesis and characterization of a peptide identified as a functional element in α A-crystallin // *J Biochem.* 2000. – V. 275. – P. 3767-3771.
202. Sharp J.S., Forrest J.A., Jones R.A.L. Surface denaturation and amyloid fibril formation of insulin at model lipid–water interfaces // *Biochemistry.* 2002. – V. 41. – P. 15810-15819.
203. Shen C.-L., Scott G.L., Merchant F., Murphy R.M. Light scattering analysis of fibril growth from amino-terminal fragment beta (1–28) of beta-amyloid peptide // *Biophys J.* 1993. – V. 65. – P. 2383-2395.

204. Shi L., Palleros D.R., Fink A.L. Protein conformational changes induced by 1,1'- bis(4-anilino-5-naphthalenesulfonic acid): preferential binding to the molten globule of DnaK // *Biochemistry*. 1994. – V. 33. – P. 7536-7546.
205. Shiraki K., Kudou M., Fujiwara S., Imanaka T., Takagi M. Biophysical effect of amino acids on the prevention of protein aggregation // *J Biochem*. 2002. – V. 132. – P. 591-595.
206. Shiraki K., Kudou M., Nishikori S., Kitagawa H., Imanaka T., Takagi M. Arginine ethylester prevents thermal inactivation and aggregation of lysozyme // *Eur J Biochem*. 2004. – V. 271. – P. 3242-3247.
207. Shiraki K., Kudou M., Sakamoto R., Yanagihara I., Takagi M. Amino acid esters prevent thermal inactivation and aggregation of lysozyme // *Biotech Prog*. 2005. – V. 21. – P. 640-643.
208. Shukla D., Trout B. L. Interaction of arginine with proteins and the mechanism by which it inhibits aggregation // *J Phys Chem*. 2010. – V. 114. – P. 13426-13438.
209. Shukla D., Schneider C.P., Trout B.L. Molecular level insight into intra-solvent interaction effects on protein stability and aggregation // *Adv Drug Deliv Rev*. 2011. – V. 63. – P. 1074-1085.
210. Smirnova E., Safenkova I., Stein-Margolina V., Shubin V., Gurvits B. L-Arginine induces protein aggregation and transformation of supramolecular structures of the aggregates // *Amino Acids*. 2013. – V. 45, No 4. – P. 845-855.
211. Smirnova E., Safenkova I., Stein-Margolina V., Shubin V., Gurvits B. Can aggregation of insulin govern its fate in the intestine? Implications for oral delivery of the drug // *Int J Pharm*. 2014. – V. 471. – P. 65-68.
212. Smirnova E., Safenkova I., Stein-Margolina V., Shubin V., Polshakov V., Gurvits B. pH-responsive modulation of insulin aggregation and structural transformation of the aggregates // *Biochimie*. 2015. – V. 109. – P. 49-59.
213. Smith G.D., Pangborn W.A., Blessing R.H. The structure of T6 human insulin at 1.0 Å resolution // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2003. – V. 59. – P. 474-482.

214. Snutch T.P., Heschl M.F.P., Baillie D.L. The *Caenorhabditis elegans* hsp70 gene family: A molecular genetic characterization // *Gene*. 1988. – V. 64. – P. 241-255.
215. Sonia T.A., Sharma C.P. An overview of natural polymers for oral insulin delivery // *Drug Discov Today*. 2012. – V. 17. – P. 784-792.
216. Speed M.A., King J., Wang D.I.C. Polymerization mechanism of polypeptide chain aggregation // *Biotechnol Bioeng*. 1997. – V. 54. – P. 333-343.
217. Sreerama N., Woody R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set // *Anal Biochem*. 2000. – V. 287. – P. 252-260.
218. Sreerama N., Woody R.W. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra // *Methods Enzymol*. 2004. – V. 383. – P. 318-351.
219. Stefani M., Dobson C.M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution // *J Mol Med (Berl)*. 2003. – V. 81. – P. 678-699.
220. Sun L., Zhao X. A self-assembling peptide RADA16-I integrated with spider fibroin uncrystalline motifs // *Int J Nanomedicine*. 2012. – V.7. – P. 571-580.
221. Susa A.C., Wu C., Bernstein S.L., Dupuis N.F., Wang H., Raleigh D.P., Shea J.-E., Bowers M.T. Defining the molecular basis of amyloid inhibitors: Human islet amyloid polypeptide–insulin interactions // *J Am Chem Soc*. 2014. – V. 136. – P. 12912-12919.
222. Svensson M., Sabharwal H., Hakansson A., Mossberg A.-K., Lipniunas P., Leffler H., Svanborg C., Linse S. Molecular characterization of α -lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells // *J Biol Chem*. 1999. – V. 21, No 10. – P. 6388-6396.
223. Swaminathan R., Ravi V.K., Kumar S., Kumar M.V.S., Chandra N. Lysozyme: a model protein for amyloid research // *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2011. – V. 84. – P. 63-111.

224. Taylor M., Moore S., Mayes J., Parkin E., Beeg M., Canovi M., Gobbi M., Mann D.M., Allsop D. Development of a proteolytically stable retro-inverso peptide inhibitor of beta-amyloid oligomerization as a potential novel treatment for Alzheimer's disease // *Biochemistry*. 2010. – V. 49, No 15. – P. 3261-3272.
225. Tedengren M., Olsson B., Bradley B., Zhou L.Z. Heavy metal uptake, physiological response and survival of the blue mussel (*Mytilus edulis*) from marine and brackish waters in relation to the induction of heat-shock protein 70 // *Hydrobiologia*. 1999. – V. 393. – P. 261-269.
226. Thakkar S.V., Kim J.H., Samra H.S., Sathish H.A., Bishop S.M., Joshi S.B., Volkin D.B., Middaugh C.R. Local dynamics and their alteration by excipients modulate the global conformational stability of an IgG1 monoclonal antibody // *J Pharm Sci*. 2012. – V. 101. – P.4444-4457.
227. Thurow H., Geisen K. Stabilisation of dissolved proteins against denaturation at hydrophobic interfaces // *Diabetologia*. 1984. – V. 27. – P. 212-218.
228. Tjernberg L.O., Naslund J., Lindqvist F., Johansson J., Karlstrom A.R., Thyberg J., Terenius L., Nordstedt C. Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand // *J Biol Chem*. 1996. – V. 271, No 15. – P. 8545-8548.
229. Tobitani A., Ross-Murphy S.B. Heat-induced gelation of globular proteins. 2. Effect of environmental factors on single-component and mixed-protein gels // *Macromolecules*. 1997. – V. 30. – P. 4855-4862.
230. Tomski S.J., Murphy R.M. Kinetics of aggregation of synthetic beta-amyloid peptide // *Arch Biochem Biophys*. 1992. – V. 294. – P. 630-638.
231. Tongl B.C., Barbul A. Cellular and physiological effects of arginine // *Mini Rev Med Chem*. 2004. – V. 4. – P. 823-832.
232. Tsumoto K., Shinoki K., Kondo H., Uchikawa M., Juji T., Kumagai I. Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent-application to a human single-chain Fv fragment // *J Immunol Methods*. 1998. – V. 219. – P. 119-129.

233. Tsumoto K. D., Ejima I., Kumagai I., Arakawa T. Practical consideration in refolding proteins from inclusion bodies // *Protein Expr Purif.* 2003a. – V. 28. – P. 1-8.
234. Tsumoto K., Umetsu M., Kumagai I., Ejima D., Arakawa T. Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine // *Biochem Biophys Res Commun.* 2003b. – V. 312. – P. 1383-1386.
235. Tsumoto K., Umetsu M., Kumagai I., Ejima D., Philo J.S., Arakawa T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification // *Biotech Prog.* 2004. – V. 20. – P. 1301-1308.
236. Umetsu M., Tsumoto K., Nitta S., Adschiri T., Ejima D., Arakawa T., Kumagai I. Non-denaturing solubilization of beta2 microglobulin from inclusion bodies by arginine // *Biochem Biophys Res Commun.* 2005. – V. 328. – P. 189-197.
237. Uversky V.N., Karnoup A.S., Khurana R., Segel D.J., Doniach S., Fink A.L. Association of partially folded intermediates of staphylococcal nuclease induces structure and stability // *Protein Sci.* 1999. – V. 8. – P. 161-173.
238. Uversky V.N., Fink A.L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded // *Biochim Biophys Acta.* 2004. – V. 1698. – P. 131-135.
239. Uversky V.N. The triple power of D³: protein intrinsic disorder in degenerative diseases // *Front Biosci.* 2014. – V. 19. – P. 181-258.
240. Vagenende V., Yap M.G.S., Trout B.L. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol // *Biochemistry.* 2009. – V. 48. – P. 11084-11096.
241. Veillon C., Sytkowski A.J. The intrinsic zinc atoms of yeast alcohol dehydrogenase // *Biochem Biophys Res Commun.* 1975. – V. 67. – P. 1494-1500.
242. Veprintsev D.B., Permyakov S.E., Permyakov E.A., Rogov V.V., Cawthern K.M., Berliner L.J.L. Cooperative thermal transitions of bovine and human apo-alpha-lactalbumins: evidence for a new intermediate state // *FEBS Lett.* 1997. – V. 412, No 3. – P. 625-628.

243. Wang A., Bolen D.W. A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation // *Biochemistry*. 1997. – V. 36. – P. 9101-9108.

244. Wang H., Raleigh D.P. The ability of insulin to inhibit the formation of amyloid by pro-islet amyloid polypeptide processing intermediates is significantly reduced in the presence of sulfated glycosaminoglycans // *Biochemistry*. 2014. – V. 53, No 16. – P. 2605-2614.

245. Wang K., Spector A. α -Crystallin prevents irreversible protein denaturation and acts cooperatively with other heat-shock proteins to renature the stabilized partially denatured protein in an ATP-dependent manner // *Eur J Biochem*. 2000. – V. 267. – P. 4705-4712.

246. Ward L.D., Timasheff S.N. Cooperative multiple binding of bis-ANS and daunomycin to tubulin // *Biochemistry*. 1994. – V. 33. – P. 11891-11899.

247. Webb S.D., Cleland J.L., Carpenter J.F., Randolph T.W. Effects of annealing lyophilised and spray-lyophilised formulations of recombinant human interferon gamma // *J Pharm Sci*. 2003. – V. 92. – P. 715-729.

248. Welch W.J., Brown C.R. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding // *Cell Stress Chaperones*. 1994. – V. 1. – P. 109-115.

249. Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030 // *Diabetes Care*. 2004. – V. 27. – P. 1047-1053.

250. Xie Q., Guo T., Lu J., Zhou H.M. The guanidine like effects of arginine on aminoacylase and salt-induced molten globule state // *Int J Biochem Cell Biol*. 2004. – V. 36. – P. 296-306.

251. Yamaguchi H., Masaya M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies // *Biomolecules*. 2014. – V. 4. – P. 235-251.

252. Yancey P.H., Somero G.N. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes // *Biochem J*. 1979. – V. 183. – P. 317-323.

253. Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., Somero G. Living with water stress: evolution of osmolyte systems // *Science*. 1982. – V. 217. – P. 1214-1222.
254. Yancey P.H., Fyfe-Johnson A.L., Kelly R.H., Walker V.P., Aunon M.T. Trimethylamine oxide counteracts effects of hydrostatic pressure on proteins of deep-sea teleosts // *J Exp Zool*. 2001. – V. 289. – P. 172-176.
255. Yaturu S. Insulin therapies: current and future trends at dawn // *World J Diabetes*. 2013. – V. 4. – P. 1-7.
256. Yonemoto I.T., Kroon G.J., Dyson H.J., Balch W.E., Kelly J.W. Amylin proprotein processing generates progressively more amyloidogenic peptides that initially sample the helical state // *Biochemistry*. 2008. – V. 47. – P. 9900-9910.
257. Yoshioka S., Aso Y., Izutsu K, Terao T. Aggregates formed during storage of beta-galactosidase in solution and in the freeze-dried state // *Pharm Res*. 1993. – V. 10. – P. 687-691.
258. Yudin I.K., Nikolaenko G.L., Kosov V.I., Agayan V.A., Anisimov M.A., Sengers J.V. Simple photon-correlation spectrometer for research and education // *Int J Thermophys*. 1997. – V. 18. – P. 1237-1248.
259. Zacharias N., Dougherty D.A. Cation-pi interactions in ligand recognition and catalysis // *Trends Pharmacol Sci*. 2002. – V. 23, No 6. – P. 281-287.
260. Zako T., Sakono M., Hashimoto N., Ihara M., Maeda M. Bovine insulin filaments induced by reducing disulfide bonds show a different morphology, secondary structure, and cell toxicity from intact insulin amyloid fibrils // *Biophys J*. 2009. – V. 96, No 8. – P. 3331-3340.
261. Zhang S., Holmes T., Lockshin C., Rich A. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992. – V. 90. – P. 3334-3338.
262. Zhang S., Gelain F., Zhao X. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures // *Semin Cancer Biol*. 2005. – V. 15. – P. 413-420.

263. Zhang S. Lipid-like Self-Assembling Peptides // *Acc Chem Res.* 2012. – V. 45. – P. 2142-2150.
264. Zilinskas A., Sereikaite J. Probing of some compounds as anti-aggregatory additives in the protein refolding process from *Escherichia coli* inclusion bodies // *Biotechnol Appl Biochem.* 2011. – V. 58. – P. 277-284.
265. Ашмарин И.П. Алкогольдегидрогеназа млекопитающих – объект молекулярной медицины // *Усп биол хим.* 2003. – № 43. – С. 3-18.
266. Бычкова В.Е., Басова Л.В., Балобанов В.А. Как мембранная поверхность воздействует на структуру белков // *Усп биол хим.* 2014. – Т. 54. – С. 133-202.
267. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях // *Вестн РАМН.* 2000. – № 4. – С. 3-5.
268. Данилова Е. И., Графова В. Н., Кукушкин М. Л., Зинкевич В. А. Эффекты L-аргинина при церебрально-спинальном болевом синдроме // *Бюл эксперим биол и мед.* 1999. – № 2. – С. 160-163.
269. Захарченко Н.Л., Коннова Т.А., Гоголева Н.Е., Файзуллин Д.А., Эртле Т., Зуев Ю.Ф. Шапероноподобная активность β -казеина и термостабильность алкогольдегидрогеназы // *Биоорг химия.* 2012. – Т. 38, № 2. – С. 223-228.
270. Зимин Ю.В., Сяткин С.П., Березов Т.Т. Надмолекулярная регуляция активности некоторых оксидоредуктаз клетки в норме и патологии // *Вопр мед хим.* 2001. – Т.47, № 3. – С. 247-287.
271. Зимин Ю.В., Соловьева А.Г. Регуляторная роль надмолекулярного комплекса алкогольдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы митохондрий клетки // *Бюл эксперим биол и мед.* 2009. – № 12. С. 644-645.
272. Зимин Ю.В., Уланова А.А., Соловьева А.Г. Алкогольдегидрогеназа. Молекулярная и надмолекулярная регуляция // *Фундаментальные исследования.* 2012. – №3. – С. 527-530.
273. Каменский А. А., Савельева К.В. Оксид азота и поведение. // М.: Изд-во НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН, 2002. – 156 с.

274. Курганов Б.И., Топчиева И.Н. Рефолдинг белков с участием искусственных шаперонов // Биохимия. 1998. – №4. – С. 491-499.
275. Курганов Б.И. Антиагрегационная активность шаперонов и ее количественная оценка // Усп биол хим. 2013. – Т. 53. – С. 387-414.
276. Лейдерман Н.Н. Иммунное питание (immunonutrition) // Вестн интенсивной терапии. 2002. – № 1. – С. 57-61.
277. Наградова Н.К. Внутриклеточная регуляция формирования нативной пространственной структуры белков // Соросовский образовательный журнал. 1996. – Т. 7. – С. 10-18.
278. Пермяков Е.А., Ярмоленко В.В., Калиниченко Л.П., Морозова Л.А., Бурштейн Э.А. Связывание ионов Ca^{2+} с α -лактальбумином из коровьего молока. Исследование по изменениям собственной белковой флуоресценции // Биофизика. 1982. – Т. 27, № 3. – С. 380-385.
279. Степанов Ю.М., Кононов И.Н., Журбина А.И., Филиппова А.Ю. Аргинин в медицинской практике // Журн АМН Укр. 2004. – Т. 10, № 1. – С. 340-352.
280. Сулацкая А.И., Волова Е.А., Комиссарчик Я.Ю., Снигиревская Е.С., Маскевич А.А., Дробченко Е.А., Кузнецова И.М., Туроверов К.К. Исследование кинетики образования амилоидных фибрилл на основе инсулина // Цитология. 2013. – Т. 55, № 11. – С. 809-814.
281. Чеботарева Н.А., Курганов Б.И., Ливанова Н.Б. Биохимические эффекты молекулярного краудинга // Биохимия. 2004. – Т. 69, № 11. – С. 1522-1536.
282. Чеботарева Н.А. Влияние молекулярного краудинга на ферменты гликогенолиза // Усп биол хим. 2007. – Т. 47. – С. 233-258.
283. Янг И., Жоу Х.-М. Влияние ионов цинка на конформационную стабильность дрожжевой алкогольдегидрогеназы // Биохимия. 2001. - № 66. – С. 61-70.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность моему научному руководителю д.б.н. Белле Яковлевне Гурвиц за терпение, постоянную поддержку и неоценимую помощь в работе на всех её этапах, от планирования эксперимента до интерпретации полученных результатов.

Особую благодарность выражаю профессору Курганову Борису Ивановичу и заведующему лабораторией структурной биохимии белка, профессору Левицкому Дмитрию Ивановичу за обсуждение результатов.

Выражаю признательность к.б.н. В.А. Штейн-Марголиной за помощь в проведении электронной микроскопии и обработке электронных микрофотографий, к.б.н. И.В. Сафенковой за помощь в проведении атомно-силовой микроскопии, а также к.б.н. В.В. Шубину за помощь в проведении кругового дихроизма и интерпретации полученных результатов. Выражаю благодарность д.х.н. В.И. Польшакову за помощь в планировании и проведении экспериментов, а также интерпретации результатов ЯМР.

Выражаю благодарность сотрудникам лаборатории структурной биохимии белка за помощь, теплые отношения и дружественную обстановку, а также за полученные знания и опыт практической работы, которые мне очень пригодились при работе над диссертацией.