

Борзова Вера Александровна

**МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ШАПЕРОНОВ ПРИ АГРЕГАЦИИ
БЕЛКОВ**

03.01.04 Биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва, 2016

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

Научные руководители:

доктор биологических наук
Маркосян Кира Андреевна

доктор химических наук, профессор
Курганов Борис Иванович

Официальные оппоненты:

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

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

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования «Российский университет дружбы
народов» Министерства образования и науки
Российской Федерации

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

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

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

С проблемой агрегации белков сталкиваются биотехнологи, которые занимаются выделением и очисткой рекомбинантных белков, созданием, производством и хранением медицинских препаратов белковой природы, а также медицинские биохимики, занимающиеся изучением развития заболеваний, связанных с неправильным сворачиванием белков. Механизмы, обеспечивающие подавление агрегации белков в клетке, реализуются с участием шаперонов белковой природы (малых белков теплового шока) и низкомолекулярных химических шаперонов. Поиск агентов, предотвращающих агрегацию белков, является одной из важных задач современной биотехнологии и медицинской биохимии. Для оценки защитного действия антиагрегационных агентов широко используются тест-системы на основе агрегации модельных белков. При интерпретации экспериментальных результатов должны учитываться механизмы агрегации и особенности кинетики агрегации выбранных белков-мишеней. В связи с этим особую актуальность приобретают исследования, направленные на определение кинетического режима агрегации модельных белков, и разработка методов количественной оценки антиагрегационной активности шаперонов на основе установленных закономерностей протекания процесса агрегации.

Цель и задачи работы

Основной целью настоящей работы было установить механизмы агрегации модельных белков и механизмы подавления агрегации белков шаперонами белковой природы и химическими шаперонами.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. С использованием методов динамического светорассеяния, аналитического ультрацентрифугирования, дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и фракционирования в поле асимметричного потока (AF₄) изучить механизмы агрегации белков-мишеней, используемых для тест-систем следующего типа: тепловая агрегация бычьего сывороточного альбумина (БСА); агрегация БСА и альфа-лактальбумина (ЛА), индуцируемая восстановлением дисульфидных связей дитиотреитолом (ДТТ);
2. Изучить защитное действие молекулярных шаперонов при агрегации белков: белкового шаперона – альфа-кристаллина (нативного, сшитого глутаровым альдегидом и облученного ультрафиолетовым светом) и химических шаперонов – пролина, аргинина и его производных (аргининамида и этилового эфира аргинина);
3. Провести анализ влияния специфических лигандов глутаматдегидрогеназы (ГД) из печени быка и альфа-кристаллина на тепловую денатурацию и агрегацию фермента;
4. Разработать и апробировать новые методы количественной оценки антиагрегационной активности белковых и химических шаперонов.

Научная новизна

Впервые проведено сопоставление кинетики тепловой и дитиотреитол-индуцированной агрегации модельного белка (бычьего сывороточного альбумина), изученной двумя методами – методом фракционирования в поле асимметричного потока и методом динамического светорассеяния. Определены соотношения между начальной скоростью агрегации и кинетическим параметром, характеризующим скорость прироста интенсивности светорассеяния для начальных участков кинетических кривых агрегации, и определен кинетический режим процессов агрегации. Показана важность установления кинетического режима агрегации модельного белка для интерпретации эффектов, характеризующих защитное действие молекулярных шаперонов, и для выяснения механизмов их антиагрегационной активности.

Практическая значимость работы

Разработаны методы количественной оценки антиагрегационной активности белковых и химических шаперонов. Эти методы могут быть применены для поиска агентов, проявляющих высокую антиагрегационную активность, и для изучения влияния различных

факторов (например, химической модификации или действия ультрафиолетового излучения) на активность белковых шаперонов.

Связь работы с государственными программами

Работа поддержана грантами РФФИ (11-04-00932-а, 11-04-01271-а, 12-04-00545-а, 14-04-01530-а), Программой «Молекулярная и клеточная биология» Президиума Российской академии наук, Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (госконтракт № П1356).

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.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. Установлен механизм тепловой агрегации бычьего сывороточного альбумина. При тепловой денатурации БСА происходит образование форм белка, различающихся по способности к агрегации. Высокреакционноспособная форма характеризуется высокой скоростью агрегации и образует первичные агрегаты. Низкреакционноспособная форма вовлекается в процесс агрегации путем присоединения к первичным агрегатам с образованием вторичных агрегатов, а также способна к самоагрегации с образованием стабильных агрегатов небольшого размера. Дальнейшая агрегация протекает путем слипания вторичных агрегатов.

2. Установлен кинетический режим тепловой и ДТТ-индуцированной агрегации БСА. В случае тепловой агрегации (при 70 °С) порядок реакции по белку равен 2 и скоростью-лимитирующей стадией является слипание развернутых молекул БСА. В случае ДТТ-индуцированной агрегации (при 45 °С) порядок реакции по белку равен 1 и скоростью-лимитирующей стадией является разворачивание молекул белка.

3. Показано существование предельной длительности лаг-периода при увеличении концентрации белка для ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина, связанное с наличием стадий, предшествующих образованию стартовых агрегатов.

4. Разработана и апробирована методология количественной оценки антиагрегационной активности белковых и химических шаперонов. В качестве меры антиагрегационной активности для белковых шаперонов предложена адсорбционная емкость шаперона по отношению к белку-мишени (AC_0), для химических шаперонов – концентрация полунасыщения $[L]_{0,5}$.

5. Предложена и апробирована методология оценки антиагрегационной активности белковых шаперонов и специфических лигандов при тепловой агрегации глутаматдегидрогеназы из печени быка в режиме нагревания с постоянной скоростью.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих научных конференциях: V и VI российские симпозиумы «Белки и пептиды»; IV Съезд биофизиков России; 38th FEBS Congress and YSF 2013; 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; 6th International Conference and Exhibition on Analytical & Bioanalytical Techniques.

Работа представлена на межлабораторном семинаре Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук 24 декабря 2015 г.

Публикации

По результатам работы опубликовано 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 7 тезисов в материалах отечественных и международных конференций.

Структура и объем работы

Диссертация имеет стандартную структуру и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты (теория и экспериментальные результаты) и их

обсуждение, выводы, заключение, список литературы, содержащий 356 ссылок. Работа объемом 181 страница проиллюстрирована 83 рисунками и 4 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре литературы обсуждаются факторы, вызывающие агрегацию белков, модели агрегации и классификация агрегатов, основные физико-химические характеристики, функции и особенности денатурации и агрегации использованных в работе белков-мишеней (БСА, α -лактальбумин коровьего молока, ГД из печени быка), основные физико-химические характеристики и функции белкового шаперона α -кристаллина, свойства и применение химических шаперонов (аргинина, его производных и пролина) и современные представления о механизмах функционирования белковых и химических шаперонов.

Материалы и методы исследования

Материалы. БСА (очищенный от жирных кислот, степень чистоты 99%), α -лактальбумин из коровьего молока (насыщенный кальцием) и ГД из печени быка были приобретены в Sigma-Aldrich (США). α -Кристаллин из хрусталиков глаза молодых бычков был любезно предоставлен д.б.н. К.О. Мурановым (лаборатория физико-химических основ биорегуляции, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук). L-аргинина моногидрохлорид (Arg), L-аргинина этиловый эфир (ArgEE), L-аргининамид (ArgAd), L-пролин (Pro), ДТТ, ADP, NAD, NADH, L-глутамат, L-лейцин и другие реактивы были приобретены в Sigma-Aldrich (США). Все растворы для экспериментов были приготовлены с использованием деионизованной воды, полученной с помощью системы Easy-Pure II RF (Barnstead, США).

Методы.

Получение сшитого α -кристаллина. Сшивание α -кристаллина выполняли по методу Аугустейна (Augusteyn, 2004). Концентрация глутарового альдегида составляла 3 мМ, концентрация ДТТ – 3 мМ, концентрация белка – 0,03 мМ. Сшивание проводили при 20 °С в течение 30 часов.

УФ-облучение препарата α -кристаллина осуществляли ртутной лампой высокого давления с мощностью 1000 Вт (ДРШ-1000, Россия) с 15-сантиметровым водяным фильтром и УФС-2-фильтром с интервалом 260-380 нм (Институт биологического приборостроения РАН, Пущино, Россия).

Динамическое светорассеяние. Измерения динамического светорассеяния проводили при помощи фотометра рассеянного лазерного света Photocor (Photocor Instruments Inc., США) с He-Ne лазером мощностью 10 мВт и длиной волны падающего света 632,8 нм (Coherent, модель 31-2082, США). Температуру контролировали с помощью пропорционально-интегрально-дифференциального регулятора PhotoCor-TC с точностью до $\pm 0,1$ °С. Фотоприемник состоял из сменных апертур разного диаметра, фотоэлектронного умножителя с низким уровнем шумов и усиливающего фотодетектора. Рассеянный свет собирали под углом 90°. Сигнал анализировался 288-канальным коррелятором Photocor-FC, выполняющим накопление корреляционной функции интенсивности рассеянного света и обработку данных в реальном времени. Работу прибора контролировали с помощью программы Photocor версии 6.0.2. Анализ корреляционных функций выполняли в программе DynaLS (Alango, Израиль), версия 2.8.3.

Дифференциальная сканирующая калориметрия. Изучение тепловой денатурации БСА, ГД, интактного, сшитого и УФ-облученного α -кристаллина проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем калориметре ДАСМ-4М (Институт биологического приборостроения РАН, Пущино, Россия) с платиновой капиллярной ячейкой. Растворы белков нагревали с постоянной скоростью 1 °С/мин от 20 до 90 °С при постоянном

давлении 2,2 атмосферы.

Фракционирование в поле асимметричного потока. Для фракционирования в асимметричном потоке использовали разделительную систему Eclipse 3 (Wyatt Technology Corporation, США) на основе насоса Agilent для высокоэффективной жидкостной хроматографии (Agilent Technologies, США). Образцы вводили в канал для разделения с помощью автоинъекционной системы Agilent (Agilent Technologies, США), последовательно соединенный с УФ-детектором (Agilent Technologies, США), детектором многоугольного и динамического светорассеяния (DAWN HELEOS II, Wyatt Technology Corporation, США) и дифференциальным рефрактометром (Optilab T-rEX, Wyatt Technology Corporation, США). Данные обрабатывали в программе ASTRA 5.3.4 (Wyatt Technology Corporation, США).

Аналитическое ультрацентрифугирование. Эксперименты по скоростной седиментации проводили в аналитической ультрацентрифуге Model E (Beckman Coulter Inc., США), оборудованной абсорбционной оптической сканирующей системой, фотоэлектрическим сканером, монохроматором и компьютером. Значения коэффициентов седиментации рассчитывали в программе SEDFIT (Schuck, 2000; Brown and Schuck, 2006).

Кроме того, в работе были использованы следующие методы: гель-проникающая хроматография, ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле, определение показателя преломления, плотности и динамической вязкости, флуоресцентная спектроскопия (измерение собственной флуоресценции белков, флуоресценции тиофлавина Т и 8-аминонафталин-1-сульфоновой кислоты), трансмиссионная электронная микроскопия, спектроскопия кругового дихроизма, измерение дзета-потенциала.

Результаты

Теоретические подходы к количественной оценке шапероноподобной активности.

Для оценки антиагрегационной активности шаперонов необходимо сравнить начальную скорость агрегации модельного белка-мишени в отсутствие и в присутствии шаперона. Начальные участки кинетических кривых агрегации, зарегистрированных по увеличению интенсивности светорассеяния (I), анализировали с помощью эмпирического уравнения [Курганов, 1998]

$$I = I_0 + [K_{LS}(t - t_0)]^2, \quad (t > t_0) \quad (1)$$

В этом уравнении K_{LS} – константа, которую можно рассматривать как меру начальной скорости агрегации, I_0 – начальное значение интенсивности светорассеяния при $t = 0$ и t_0 – продолжительность лаг-периода на кинетической кривой. Зависимость I от времени можно линеаризовать в координатах $\{(I - I_0)^{0.5}; t\}$ в соответствии со следующим уравнением:

$$(I - I_0)^{0.5} = K_{LS}(t - t_0). \quad (2)$$

Наклон линейной зависимости $(I - I_0)^{0.5}$ от времени дает значение K_{LS} , а отрезок, отсекаемый на оси абсцисс прямой линией, соответствует значению t_0 . При снижении интенсивности светорассеяния на начальном участке кинетической кривой невозможно точное определение начального значения интенсивности (I_0). В таком случае применима дифференциальная форма уравнения (1):

$$dI/dt = 2K_{LS}^2(t - t_0), \quad (t > t_0). \quad (3)$$

Следующий шаг в анализе кинетики агрегации состоит в установлении соотношения между параметром K_{LS} , который рассчитывается из начальных участков кинетических кривых агрегации, и начальной концентрацией белка-мишени $[P]_0$. Достаточно хорошей аппроксимацией является степенная функция: $K_{LS} = \text{const}[P]_0^a$. Отсюда следует, что $(K_{LS})^{1/a}$ является линейной функцией $[P]_0$:

$$(K_{LS})^{1/a} = \text{const}[P]_0. \quad (4)$$

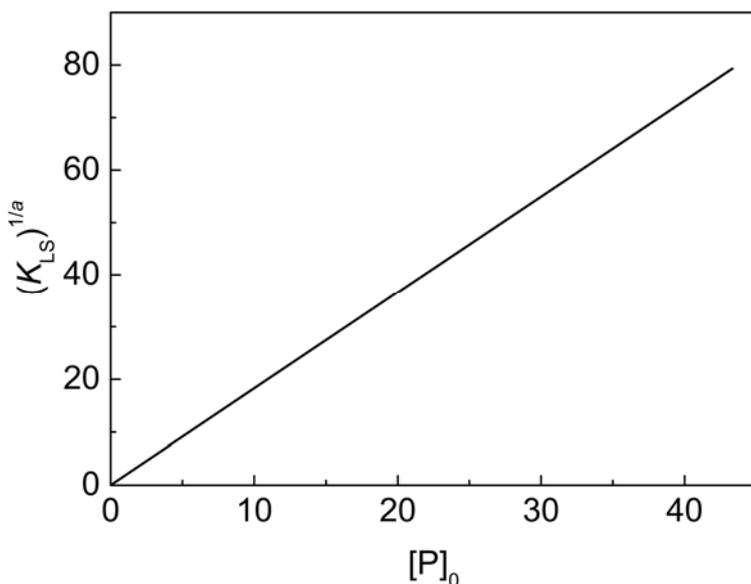


Рис. 1. Линейное соотношение между $(K_{LS})^{1/a}$ и $[P]_0$.

Линейное соотношение между $(K_{LS})^{1/a}$ и $[P]_0$ (рис. 1) является *ключевым* при разработке методов количественной оценки антиагрегационной активности шаперонов. Это соотношение аналогично линейному соотношению между начальной скоростью ферментативной реакции и начальной концентрацией белка при описании кинетики ферментативных реакций [Webb, 1963].

Рассмотрим подавление агрегации модельного белка химическим шапероном (L), образующим обратимо диссоциирующий комплекс с белком-мишенью. Поскольку комплексообразование белка-мишени с химическим шапероном «выводит» белок-мишень из процесса агрегации и поскольку между $(K_{LS})^{1/a}$ и начальной концентрацией белка существует прямая пропорциональность, снижение концентрации белка-мишени, участвующего в агрегации, в два раза, то есть до величины «концентрации полунасыщения» $[L]_{0,5}$, происходит при уменьшенной в два раза величине $(K_{LS,0})^{1/a}$ ($K_{LS,0}$ – значение параметра K_{LS} в отсутствие шаперона). Таким образом, при $[L] = [L]_{0,5}$ имеем: $(K_{LS})^{1/a} = (K_{LS,0})^{1/a}/2$. В общем случае для нахождения концентрации полунасыщения $[L]_{0,5}$ предлагается использовать уравнение Хилла:

$$(K_{LS} / K_{LS,0})^{1/a} = 1 / \{1 + ([L]/[L]_{0,5})^h\}. \quad (5)$$

Параметр $[L]_{0,5}$ можно рассматривать как меру сродства шаперона к белку-мишени: чем ниже значение $[L]_{0,5}$, тем выше сродство шаперона к белку-мишени.

Основное допущение при анализе эффективности действия белкового шаперона состоит в том, что комплекс белковый шаперон–белок-мишень является достаточно прочным. Подавление агрегации обычно изучают при значительном превышении константы диссоциации шаперон–белкового комплекса начальными концентрациями шаперона и белка-мишени. Это позволяет рассматривать кривые зависимости $(K_{LS})^{1/a}/(K_{LS,0})^{1/a}$ от концентрации белкового шаперона как кривые титрования. Относительная скорость агрегации $(K_{LS})^{1/a}/(K_{LS,0})^{1/a}$ определяется отношением концентраций шаперона и белка-мишени, $[шаперон]/[белок-мишень]$. Если комплексообразование приводит к образованию комплекса определенного состава, то зависимость $(K_{LS})^{1/a}/(K_{LS,0})^{1/a}$ от отношения $[шаперон]/[белок-мишень]$ является линейной и отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, соответствует обратному значению адсорбционной емкости (AC_0) шаперона по отношению к белку-мишени:

$$(K_{LS} / K_{LS,0})^{1/a} = 1 - x / AC_0, \quad (6)$$

где x – отношение $[шаперон]/[белок-мишень]$. Параметр AC_0 может быть использован для сопоставления антиагрегационной активности различных белковых шаперонов и для характеристики изменения антиагрегационной активности белкового шаперона при различных воздействиях (УФ-облучение, химическая модификация).

Классификация тест-систем, используемых для оценки антиагрегационной активности шаперонов. Если экспериментатор имеет в своем распоряжении методы прямого определения количества агрегированного (или неагрегированного) белка, то это позволяет определить начальную скорость агрегации (v) и далее из зависимости начальной скорости агрегации от начальной концентрации белка рассчитать порядок агрегации по белку (n) в соответствии с уравнением:

$$v = \left(\frac{d[P]_{\text{agg}}}{dt} \right)_0 = \text{const}[P]_0^n. \quad (7)$$

В этом выражении $[P]_{\text{agg}}$ – концентрация агрегированного белка. Знание порядка агрегации по белку важно для установления кинетического режима процесса агрегации и для интерпретации полученных данных по оценке эффективности действия шаперонов. Тест-системы условно могут быть разделены на два типа. Один из типов соответствует кинетическому режиму, в котором скорость-лимитирующей стадией является стадия разворачивания белка ($n = 1$). Другой тип соответствует кинетическому режиму, в котором скорость-лимитирующей стадией общего процесса агрегации является стадия агрегации развернутого белка ($n = 2$ или $n > 1$).

Экспериментальные результаты

Механизм тепловой агрегации БСА. Для изучения кинетики тепловой денатурации БСА в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0, использовали метод ДСК. Предполагается, что теплота денатурации (Q), выражаемая как площадь под профилем ДСК, пропорциональна количеству нативного белка. В таком случае соотношение Q/Q_0 (Q_0 – теплота денатурации для исходного препарата БСА) дает долю белка, оставшегося в нативном состоянии (γ_{nat}) в ходе предварительного нагревания. Зависимости γ_{nat} от времени, демонстрирующая кинетику необратимой денатурации БСА при 60 °С, 65 °С, 70 °С и 80 °С, описываются эмпирическим уравнением, содержащим две экспоненты:

$$\gamma_{\text{nat}} = B \cdot \exp(-k_{1,\text{den}}t) + (1 - B) \cdot \exp(-k_{2,\text{den}}t), \quad (8)$$

где B – амплитуда экспоненты, соответствующей константе скорости $k_{1,\text{den}}$. Пример зависимости γ_{nat} от времени при 65 °С показан на рис. 2.

Для сравнения термостабильности БСА при разных температурах может быть использован параметр $t_{0,5}^{\text{den}}$ – время полупревращения. При повышении температуры от 60 °С до 80 °С наблюдается уменьшение $t_{0,5}^{\text{den}}$ от 19 ± 1 мин до $1,5 \pm 0,1$ мин.

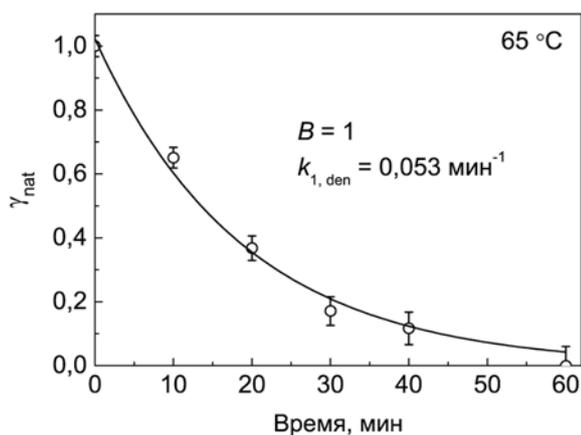


Рис. 2. Кинетика тепловой денатурации БСА при 65 °С (0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0, концентрация БСА 1 мг/мл, скорость сканирования 1 °С/мин). Зависимость доли нативного белка от времени прогревания. Точки соответствуют экспериментальным данным, сплошная кривая вычислена по уравнению (8) при значениях параметров, данных на рисунке.

При изучении кинетики тепловой агрегации БСА долю неагрегированного белка ($\gamma_{\text{non-agg}}$) определяли методом АF₄. Общая площадь под пиками мономера, димера и тримера на фрактограммах дает количество интактного (неагрегированного) БСА (рис. 3А). В случае предварительно прогретых образцов БСА белок, количество которого соответствует площади под фрактограммой в интервале времен элюции от 12 до 17 мин, был назван «неагрегированным». Зависимость доли неагрегированного белка ($\gamma_{\text{non-agg}}$) от времени, полученная при 65 °С, представлена на рис. 3Б.

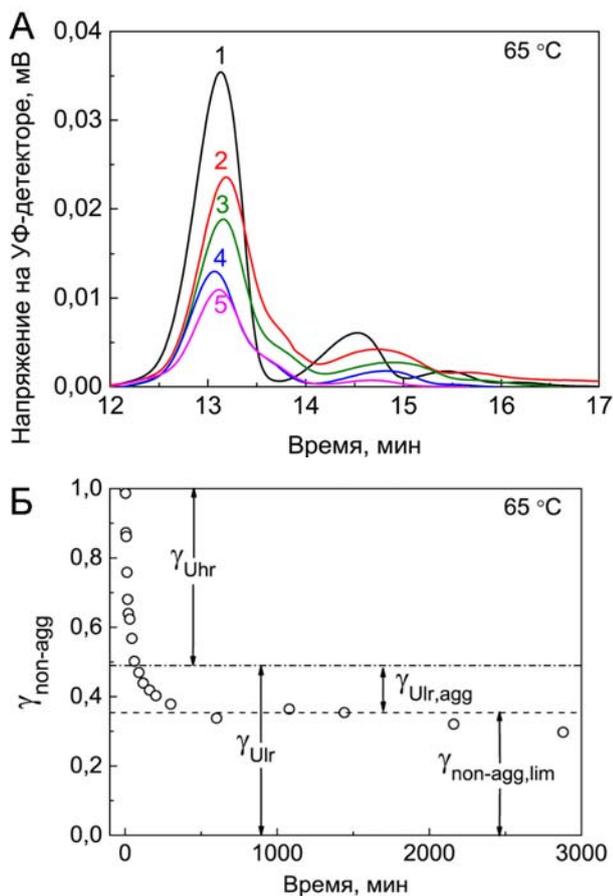


Рис. 3. Кинетика тепловой агрегации БСА при 65 °С. (А) Фрактограммы БСА (1 мг/мл), предварительно прогретого при 65 °С. Времена нагревания были следующими: 0 (1), 5 (2), 15 (3), 90 (4) и 600 мин (5). (Б) Зависимость доли неагрегированного белка ($\gamma_{\text{non-agg}}$) от времени. Пунктирная горизонтальная линия соответствует значению $\gamma_{\text{non-agg,lim}}$. Штрих-пунктирная линия соответствует значению $\gamma_{\text{Uhr}} = 1 - \gamma_{\text{Uhr}}$.

Интересно, что при больших значениях времени доля неагрегированного белка при каждой температуре приближается к предельному значению, отличному от нуля ($\gamma_{\text{non-agg,lim}}$). Эти предельные значения были найдены экстраполяцией $\gamma_{\text{non-agg}}$ к $1/t \rightarrow 0$ в координатах $\{\gamma_{\text{non-agg}}, 1/t\}$. Значения $\gamma_{\text{non-agg,lim}}$, вычисленные таким образом, соответствуют доле белка, остающегося не включенным в состав крупных агрегатов длительное время. Важная информация о начальной стадии агрегации БСА может быть получена из графиков, показывающих соотношение между долей агрегированного белка и долей денатурированного белка. Доля агрегированного белка (γ_{agg}) была вычислена как $(1 - \gamma_{\text{non-agg}})$, а доля денатурированного белка (γ_{den}) – как $(1 - \gamma_{\text{nat}})$. На рис. 4 показано соотношение между γ_{agg} и γ_{den} при 65 °С. При данной температуре это соотношение линейно, и развернутый белок быстро агрегирует без накопления в растворе (скорость агрегации существенно превосходит скорость денатурации). Отрезок, отсекаемый на вертикальной линии, проходящей через $\gamma_{\text{den}} = 1$, линейной зависимостью γ_{agg} от γ_{den} дает долю развернутого белка, участвующего в быстрой стадии агрегации (γ_{Uhr} , доля высокореакционноспособного развернутого белка). При 65 °С γ_{Uhr} равна $0,51 \pm 0,03$ (табл. 1).

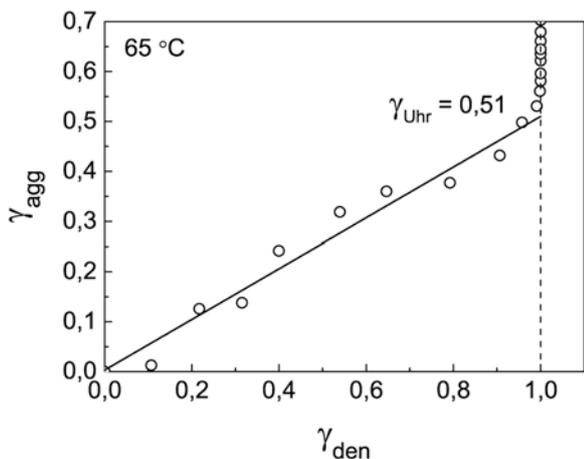


Рис. 4. Взаимосвязь между долей агрегированного белка (γ_{agg}) и денатурированного белка (γ_{den}) при 65 °С. Значения $\gamma_{\text{den}} = 1 - \gamma_{\text{nat}}$ вычислены из уравнения (8). График в координатах $\{\gamma_{\text{agg}}, \gamma_{\text{den}}\}$ при 65 °С использовали для определения доли высокореакционноспособной формы БСА (γ_{Uhr}) при данной температуре.

Оставшийся белок, соответствующий величине $(1 - \gamma_{U_{hr}})$, вовлечен в процесс агрегации с относительно низкой скоростью и может быть обозначен как низкорекреационноспособная форма развернутого белка ($\gamma_{U_{lr}}$). При 65 °С $\gamma_{U_{lr}}$ равна 0,49. Принимая во внимание, что при этой температуре $\gamma_{non-agg,lim} = 0,35$, можно заключить, что доля низкорекреационноспособного развернутого белка, вовлеченного в формирование крупных агрегатов ($\gamma_{U_{lr,agg}}$) равна $1 - \gamma_{U_{hr}} - \gamma_{non-agg,lim} = 0,14$ (табл. 1). Образование нескольких форм развернутого БСА в ходе инкубации при высоких температурах может происходить вследствие перестройки дисульфидных связей в процессе разворачивания белка [Rombouts, 2015].

Таблица 1. Параметры тепловой агрегации БСА ([БСА] = 1 мг/мл, 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0).

$T, ^\circ\text{C}$	$\gamma_{non-agg,lim}$	$\gamma_{U_{hr}}$	$\gamma_{U_{lr,agg}}$	$R_{h,1}, \text{нм}$	$R_{h,2}, \text{нм}$
60	$0,51 \pm 0,01$	$\gamma_{U_{hr}} + \gamma_{U_{lr,agg}} = 0,49 \pm 0,01$		–	$11,1 \pm 0,1$
65	$0,35 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,03$	$0,14 \pm 0,03$	$10,3 \pm 0,3$	$12,8 \pm 0,3$
70	$0,05 \pm 0,01$	$\gamma_{U_{hr}} + \gamma_{U_{lr,agg}} = 0,95 \pm 0,01$		$10,4 \pm 0,4$	$15,1 \pm 0,4$
80	$0,06 \pm 0,01$	$\gamma_{U_{hr}} + \gamma_{U_{lr,agg}} = 0,94 \pm 0,01$		–	–

Обозначения: $\gamma_{non-agg,lim}$ – доля не включенной в крупные агрегаты низкорекреационноспособной денатурированной формы (эта форма соответствует стабильным агрегатам небольшого размера на рис. 5), $\gamma_{U_{hr}}$ – доля высокорекреационноспособной денатурированной формы, $\gamma_{U_{lr,agg}}$ – доля низкорекреационноспособной денатурированной формы, участвующей в формировании вторичных агрегатов, $R_{h,1}$ и $R_{h,2}$ – гидродинамический радиус первичных и вторичных агрегатов, соответственно.

Как упомянуто выше, высокорекреационноспособная развернутая форма полностью переходит в агрегированное состояние на момент завершения денатурации. Полученные агрегаты называются первичными агрегатами (рис. 5).

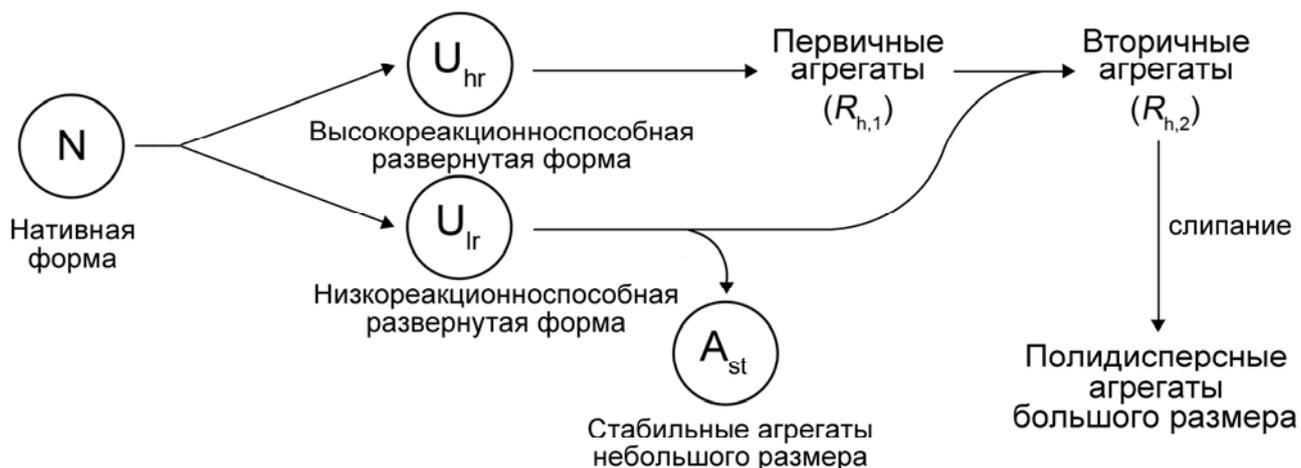


Рис. 5. Механизм тепловой агрегации БСА. Первая стадия процесса агрегации – разворачивание нативной формы (N), приводящее к образованию двух форм денатурированного белка с разной склонностью к агрегации. Одна из форм (высокорекреационноспособная форма, U_{hr}) характеризуется высокой скоростью агрегации; ее агрегация ведет к формированию первичных агрегатов с гидродинамическим радиусом ($R_{h,1}$). Вторая форма (низкорекреационноспособная форма, U_{lr}) способна участвовать в процессе агрегации путем присоединения к первичным агрегатам, образованным формой U_{hr} , и обладает способностью к самоагрегации с формированием стабильных агрегатов малого размера (A_{st}). При полном израсходовании формы U_{lr} образуются вторичные агрегаты с

гидродинамическим радиусом ($R_{h,2}$). Дальнейшая агрегация белка происходит в результате слипания вторичных агрегатов.

Дополнительная информация о кинетике тепловой агрегации БСА была получена методом динамического светорассеяния. Для оценки гидродинамического радиуса первичных агрегатов ($R_h = R_{h,1}$), был построен график зависимости R_h от доли денатурированного белка (γ_{den}) (рис. 6А). Как указано выше, при 65 °С часть низкорекреационноспособной развернутой формы ($\gamma_{U_{lr,agg}}$) может вовлекаться в процесс агрегации путем присоединения к ранее образовавшимся агрегатам. В рамках предложенного механизма агрегации предполагается, что U_{lr} присоединяется к первичным агрегатам, и этот процесс завершается формированием вторичных агрегатов после полного исчезновения U_{lr} . Формирование вторичных агрегатов может рассматриваться как процесс, который инициируется гетерогенной нуклеацией [Ferrone, et al., 1985]. Для вычисления гидродинамического радиуса вторичных агрегатов ($R_h = R_{h,2}$) был построен график зависимости R_h от γ_{agg} . Значение $(\gamma_{U_{hr}} + \gamma_{U_{lr}})$ на оси абсцисс соответствует завершению стадии формирования вторичных агрегатов (рис. 6Б).

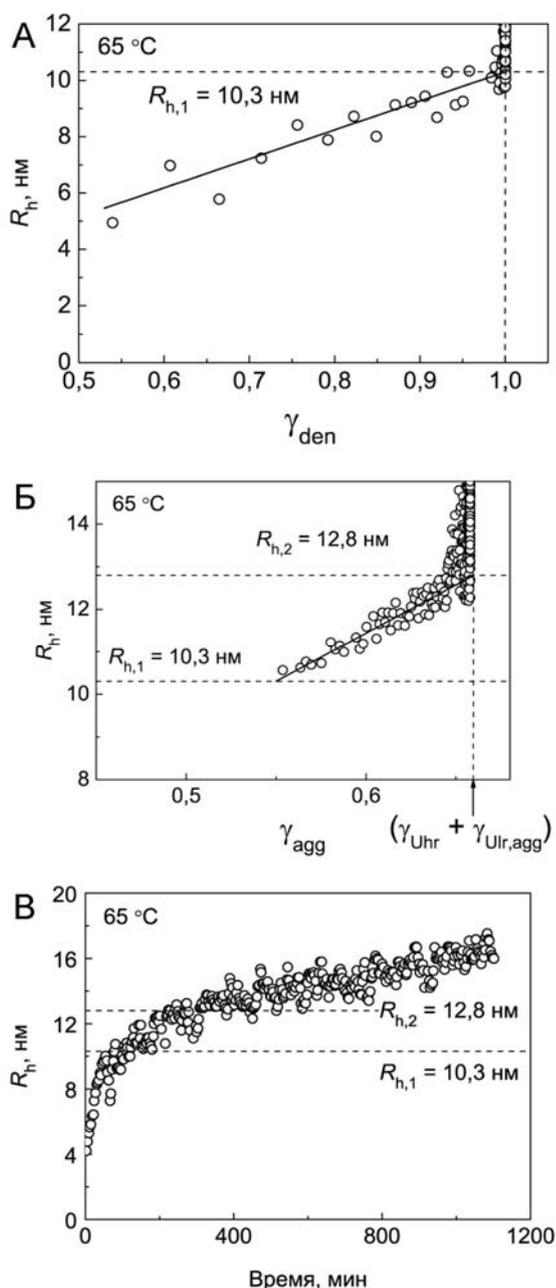


Рис. 6. (А) Зависимости гидродинамического радиуса (R_h) от доли денатурированного белка (γ_{den}) для агрегации БСА при 65 °С. Значения γ_{den} были вычислены из уравнения (8). (Б) Зависимости гидродинамического радиуса (R_h) от доли агрегированного белка (γ_{agg}) для агрегации БСА при 65 °С. Вертикальные пунктирные линии соответствуют $\gamma_{agg} = \gamma_{U_{hr}} + \gamma_{U_{lr,agg}}$. (В) Зависимость гидродинамического радиуса (R_h) от времени для агрегации БСА при 65 °С. Пунктирные горизонтальные линии соответствуют значениям $R_{h,1}$ и $R_{h,2}$, вычисленным из зависимостей R_h от доли денатурированного или агрегированного БСА, соответственно.

Процесс агрегации не останавливается на стадии формирования вторичных агрегатов БСА и продолжается в результате слипания вторичных агрегатов (рис. 6В).

Анализ графиков зависимости интенсивности светорассеяния (I) от доли агрегированного белка (γ_{agg}) показал, что эта зависимость подчиняется квадратичному закону: $I = I_0 + [(I_2 - I_0) / (\gamma_{Uhr} + \gamma_{Ulr})^2] \cdot \gamma_{agg}^2$,

где I_2 – значение интенсивности светорассеяния в момент завершения формирования вторичных агрегатов. Тот факт, что интенсивность светорассеяния и доля агрегированного белка связаны квадратичным уравнением, позволяет нам перевести экспериментально полученную зависимость I от времени в кинетическую кривую накопления агрегированного белка: $\gamma_{agg} = \text{const} \cdot (I/I_0 - 1)^{0.5}$. Такой подход может быть использован для вычисления начальной скорости агрегации и, следовательно, для скрининга агентов, подавляющих агрегацию белков.

Влияние химических шаперонов на тепловую агрегацию БСА. Для изучения влияния химических шаперонов на тепловую агрегацию БСА была выбрана тест-система на основе агрегации БСА при 70 °С ([БСА] = 1 мг/мл, 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0). Чтобы использовать тест-систему для количественной оценки антиагрегационной активности, необходимо было определить порядок агрегации по белку, скорость-лимитирующую стадию общего процесса агрегации и соотношение между параметром K_{LS} и начальной скоростью агрегации, измеренной прямым методом (AF₄). Было показано, что K_{LS} прямо пропорциональна квадрату начальной концентрации белка: $K_{LS} = \alpha[\text{БСА}]^2$. Определение порядка агрегации по белку методом AF₄ продемонстрировано на рис. 7. Показано, что убыль неагрегированного белка описывается кинетикой реакции второго порядка $1/c = 1/c_0 + k_{II}t$, где c_0 и c – начальная и текущая концентрации неагрегированного белка, k_{II} – константа скорости второго порядка. Для тепловой агрегации БСА при 70 °С $k_{II} = 62 \pm 2$ л·моль⁻¹·с⁻¹. Был сделан вывод, что начальная стадия тепловой агрегации БСА – стадия нуклеации – является бимолекулярной реакцией.

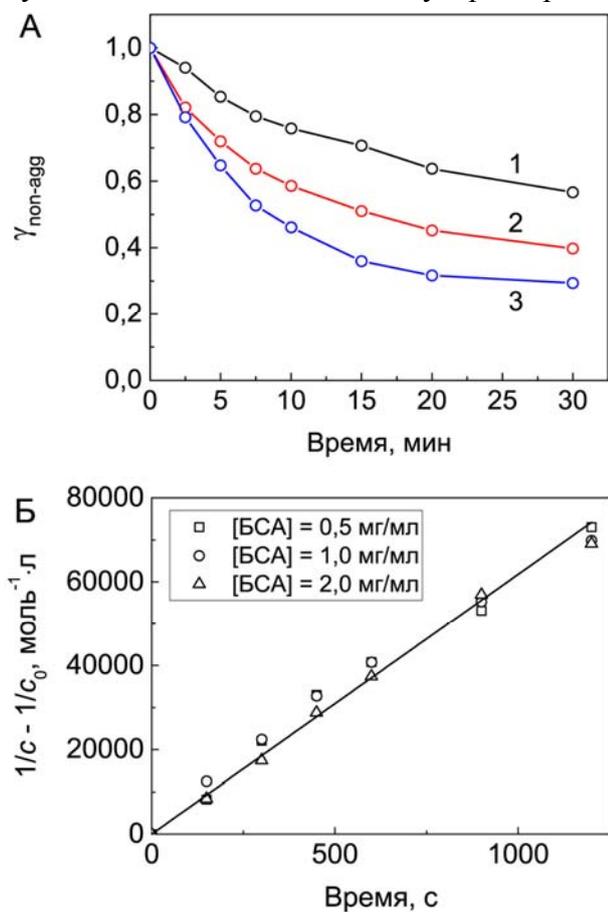


Рис. 7. Кинетика тепловой агрегации БСА при 70 °С (0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0). (А) Зависимости убыли неагрегированного белка от времени, полученные методом AF₄ при следующих концентрациях БСА: 0,5 мг/мл ($7,6 \cdot 10^{-6}$ М) (1), 1,0 мг/мл ($1,5 \cdot 10^{-5}$ М) (2) и 2,0 мг/мл ($3 \cdot 10^{-5}$ М) (3). (Б) Кинетика тепловой агрегации БСА при разных концентрациях белка в координатах, соответствующих реакции второго порядка ($n = 2$). Константа скорости второго порядка $k_{II} = 62$ л·моль⁻¹·с⁻¹.

Таким образом, начальная скорость тепловой агрегации БСА пропорциональна квадрату концентрации белка: $v_0 = k_{II} \cdot [\text{БСА}]^2$. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что для тепловой агрегации БСА при 70 °С параметр K_{LS} прямо пропорционален начальной скорости агрегации, измеренной прямым методом.

Было изучено влияние аргинина (Arg), аргининамида (ArgAd) и этилового эфира аргинина (ArgEE) на тепловую агрегацию БСА при 70 °С методом динамического светорассеяния. На рис. 8А показаны зависимости интенсивности светорассеяния от времени для тепловой агрегации БСА в присутствии аргинина. Для вычисления параметра K_{LS} использовали уравнение (2) при $t_0 = 0$ вследствие отсутствия лаг-периода на кинетических кривых агрегации. Зависимости отношения $K_{LS}/K_{LS,0}$ от концентрации химических шаперонов показаны на рис. 8Б.

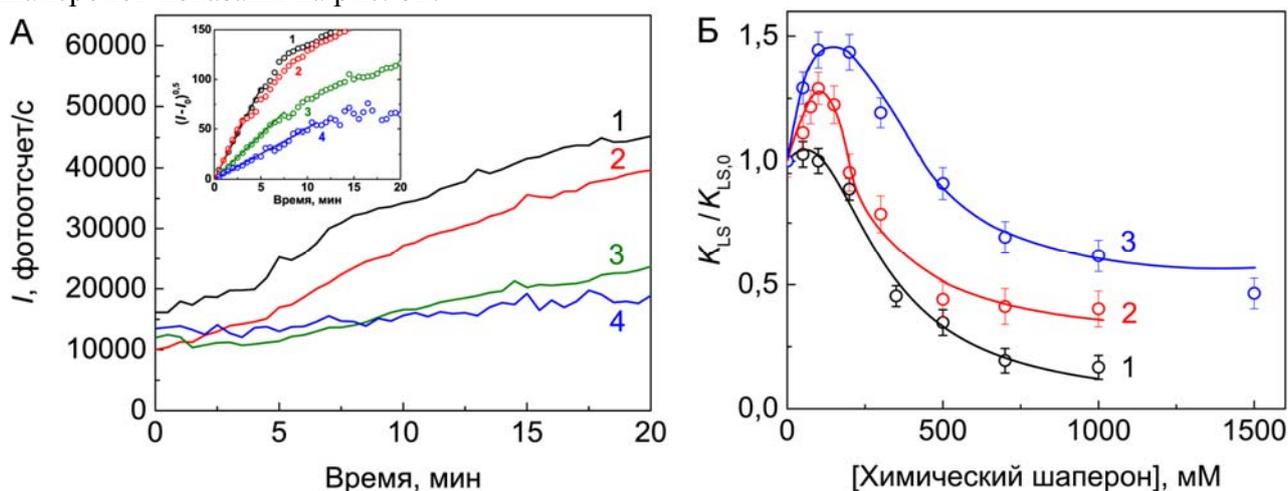


Рис. 7. Влияние аргинина на скорость тепловой агрегации БСА ($[\text{БСА}] = 1,0$ мг/мл, 70 °С). (А) Зависимости интенсивности светорассеяния от времени в отсутствие (1) и в присутствии 50 мМ (2), 350 мМ (3) и 700 мМ (4) аргинина. На вставке показаны линейные анаморфозы, построенные в соответствии с уравнением (2) при $t_0 = 0$. (Б) Зависимости отношения $K_{LS}/K_{LS,0}$ от концентрации Arg (1), ArgAd (2) и ArgEE (3).

При определенных концентрациях химического шаперона наблюдается эффект видимого ускорения агрегации по сравнению с агрегацией БСА в отсутствие шаперона. Подобный феномен описан в ряде работ, посвященных влиянию аргинина на агрегацию белков [Shah, et al., 2011; Smirnova, et al., 2013]. Изучение зависимостей R_h от времени в отсутствие и в присутствии химических шаперонов показало образование уже на начальных стадиях агрегации (рис. 9) частиц с $R_h > R_{h,1}$. Это дало возможность предположить изменение механизма агрегации БСА в присутствии аргинина и его производных.

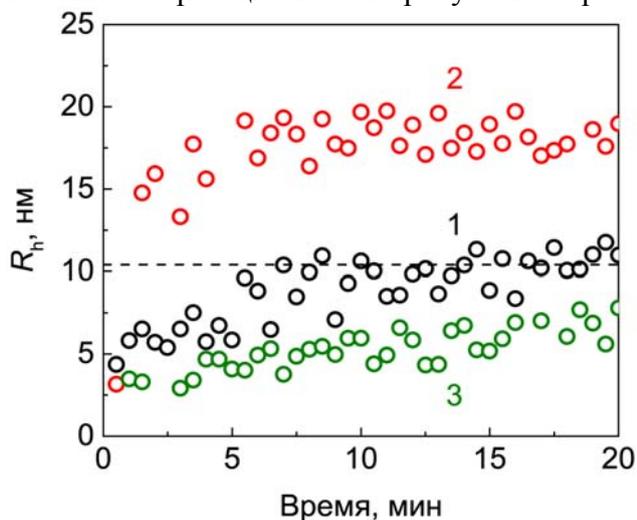


Рис. 9. Зависимость гидродинамического радиуса (R_h) от времени для агрегации БСА при 70 °С в отсутствие (1) и в присутствии 200 мМ (2) и 700 мМ (3) аргинина. Пунктирная линия соответствует значению гидродинамического радиуса первичных агрегатов при 70 °С в отсутствие химических шаперонов ($R_{h,1} = 10,4$ нм).

Для дальнейшей интерпретации данных и подтверждения гипотезы об изменении

механизма тепловой агрегации БСА в присутствии Arg, была изучена кинетика агрегации БСА при различных концентрациях белка методом AF₄. На рис. 10 показаны зависимости доли неагрегированного белка от времени в отсутствие и в присутствии аргинина. Полученные кривые убывания неагрегированного белка в присутствии химического шаперона при различных концентрациях белка (1 и 2 мг/мл) совпадают, что говорит об изменении механизма агрегации и смене скорость-лимитирующей стадии при добавлении Arg.

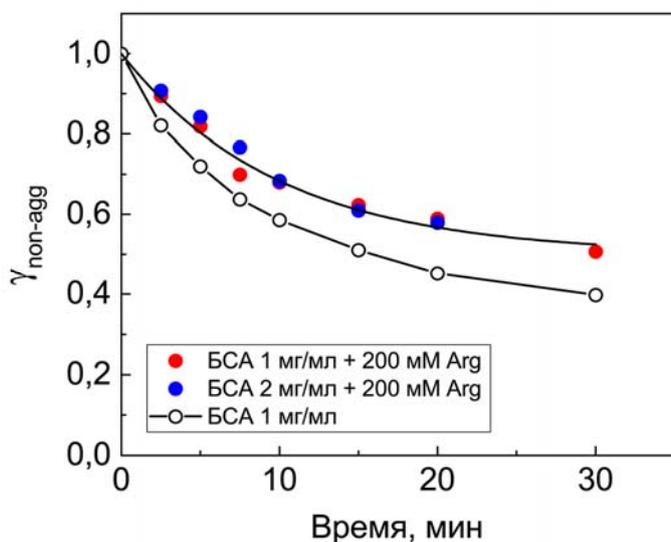


Рис. 10. Снижение доли неагрегированного белка ($\gamma_{\text{non-agg}}$) при тепловой агрегации БСА при 70 °C.

Тепловая денатурация БСА в присутствии химических шаперонов была изучена методом ДСК. Показано, что аргинин и его производные стабилизируют БСА: $T_{\text{max}} = 58,4 \pm 0,2$ °C для БСА в отсутствие химических шаперонов, $T_{\text{max}} = 62,1 \pm 0,1$ °C для БСА в присутствии 200 мМ Arg, $T_{\text{max}} = 63,8 \pm 0,1$ °C для БСА в присутствии 200 мМ ArgAd и $T_{\text{max}} = 62,1 \pm 0,1$ °C для БСА в присутствии 200 мМ ArgEE. Это приводит к замедлению денатурации и смене кинетического режима агрегации. В присутствии химических шаперонов скорость-лимитирующей стадией общего процесса агрегации является не стадия слипания развернутых молекул белка, а стадия денатурации. Эффект «ускорения» агрегации, наблюдающийся при использовании метода динамического светорассеяния, является кажущимся и связан с тем обстоятельством, что в присутствии аргинина и его производных происходит образование более крупных агрегатов, обладающих высокой рассеивающей способностью (рис. 9).

Таким образом, можно заключить, что в связи с изменением механизма и кинетического режима агрегации БСА при 70 °C в присутствии аргинина нарушается прямая пропорциональность между параметром K_{LS} и начальной скоростью агрегации, и, следовательно, строгая количественная оценка шапероноподобной активности на основании данных динамического светорассеяния становится невозможной. Полученный результат подчеркивает важность понимания механизма агрегации и определения кинетического режима агрегации модельного белка для интерпретации влияния изучаемых агентов на агрегацию.

Кинетический режим ДТТ-индуцированной агрегации БСА. Кинетика ДТТ-индуцированной агрегации БСА была проанализирована методом AF₄. Зависимости доли неагрегированного БСА ($\gamma_{\text{non-agg}}$) от времени инкубации БСА при 45 °C в присутствии 2 мМ ДТТ представлены на рис. 11. Эти зависимости соответствуют следующим начальным концентрациям БСА: 0,5, 1 и 2 мг/мл. Как видно из этого рисунка, все точки, полученные при разных концентрациях БСА, попадают на общую кривую, которая описывается экспоненциальной функцией:

$$\gamma_{\text{non-agg}} = \exp(-k_1 t), \quad (9)$$

где k_1 – константа скорости реакции первого порядка. Значение k_1 было найдено равным $0,045 \pm 0,001$ мин⁻¹. Можно заключить, что порядок агрегации по белку равен единице, и скорость-лимитирующей стадией общего процесса агрегации является стадия разворачивания

белковой молекулы.

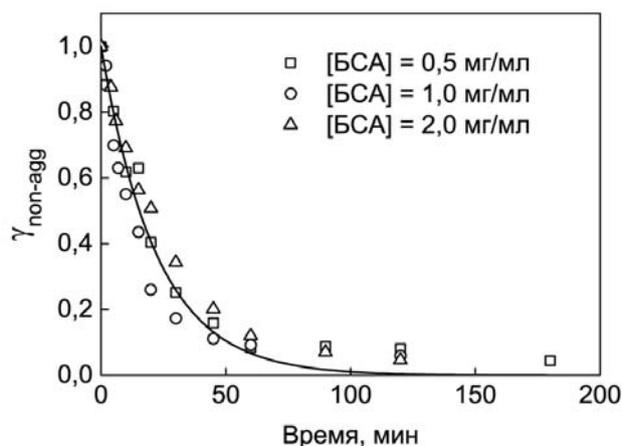


Рис. 11. Снижение доли неагрегированного белка ($\gamma_{\text{non-agg}}$) в ходе ДТТ-индуцированной агрегации БСА при 45 °С. Точками обозначены экспериментальные данные, полученные при концентрациях 0,5, 1 и 2 мг/мл. Сплошная кривая была рассчитана по уравнению (9) при $k_1 = 0,045 \text{ мин}^{-1}$.

Начальные участки зависимостей интенсивности светорассеяния от времени (рис. 12А), полученных при разных концентрациях БСА, анализировали с помощью уравнения (2). Зависимость параметра K_{LS} от концентрации БСА линейна в интервале концентраций белка от 0 до 2 мг/мл (рис. 12Б; [ДТТ] = 2 мМ): $K_{LS} = \alpha[\text{БСА}]_0$, где α – константа ($\alpha = 8,1 \pm 0,1$ (фотоотсчет/с) $^{0,5} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мл} \cdot \text{мг}^{-1}$). Линейный характер зависимости константы K_{LS} от концентрации белка позволяет предложить этот параметр в качестве меры начальной скорости агрегации. Полученные значения K_{LS} могут быть переведены в начальные скорости агрегации с использованием следующего соотношения: $v_0 = (k_1/\alpha)K_{LS}$ ($k_1/\alpha = 0,0056 \pm 0,0002$ (фотоотсчет/с) $^{0,5} \cdot \text{мл} \cdot \text{мг}^{-1}$ при [ДТТ] = 2 мМ). Таким образом, определение значений K_{LS} при разных концентрациях БСА на основании данных динамического светорассеяния позволяет оценить порядок агрегации по белку (n): $K_{LS} \propto [\text{БСА}]^n$. В случае ДТТ-индуцированной агрегации БСА $n = 1$.

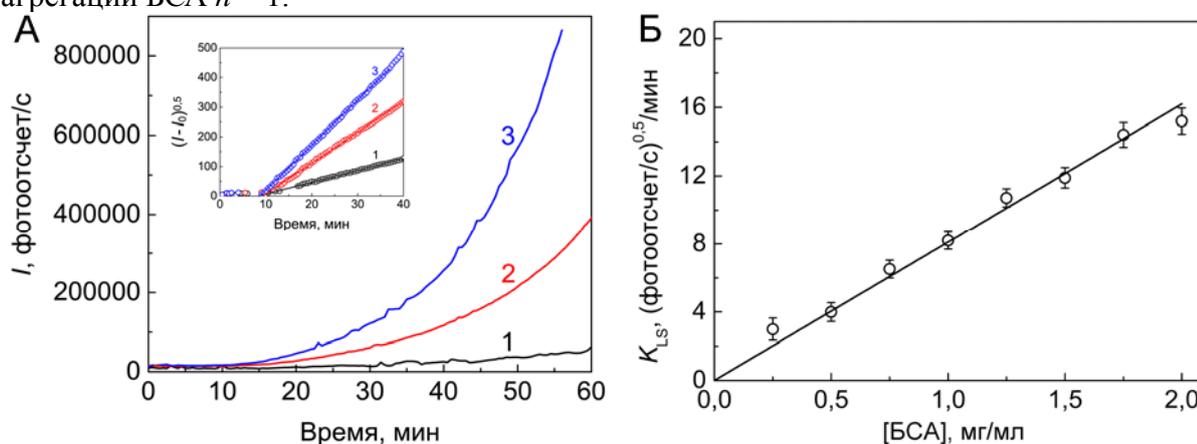


Рис. 12. Кинетика ДТТ-индуцированной агрегации БСА при 45 °С. (А) Зависимости интенсивности светорассеяния от времени при следующих концентрациях БСА: 0,5 мг/мл (1), 1,0 мг/мл (2) и 2,0 мг/мл (3). На вставке даны линейные анаморфозы, построенные по уравнению (2). (Б) Зависимость параметра K_{LS} от концентрации БСА.

Оценка шапероноподобной активности пролина и производных аргинина с использованием тест-системы на основе ДТТ-индуцированной агрегации БСА.

На рис. 13 продемонстрировано подавление ДТТ-индуцированной агрегации БСА в присутствии аргинина. Зависимость отношения $K_{LS}/K_{LS,0}$ от концентрации химического шаперона характеризует снижение начальной скорости агрегации в присутствии химического шаперона. Эта зависимость подчиняется уравнению (5). Соответствующие значения параметров $[L]_{0,5}$ и h для Arg, ArgAd, ArgEE и пролина (Pro) приведены в табл. 2.

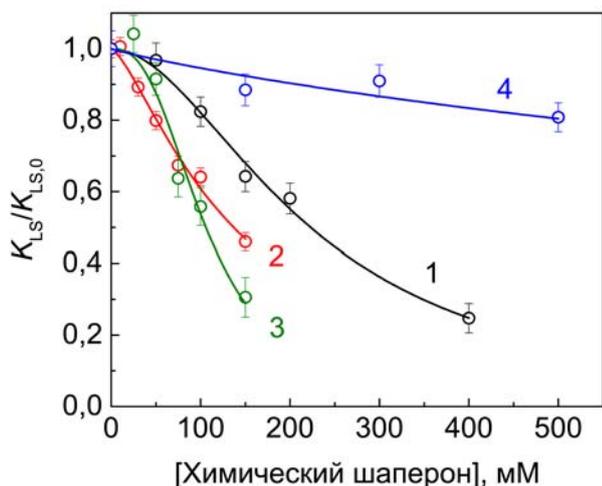


Рис. 13. Влияние химических шаперонов на скорость ДТТ-индуцированной агрегации БСА ($[БСА] = 1,0$ мг/мл, 2 мМ ДТТ). Зависимости отношения $K_{LS}/K_{LS,0}$ от концентрации Arg (1), ArgAd (2), ArgEE (3) и Pro (4). Сплошные кривые рассчитаны по уравнению (5) при значениях $[L]_{0,5}$ и h , представленных в табл.2.

Таблица 2. Значения параметров уравнения (5) для подавления ДТТ-индуцированной агрегации БСА (1 мг/мл) химическим шаперонами. $[ДТТ] = 2$ мМ.

Лиганд	$[L]_{0,5}$, мМ	h
Arg	223 ± 7	$1,9 \pm 0,1$
ArgAd	137 ± 6	$1,4 \pm 0,1$
ArgEE	106 ± 6	$2,6 \pm 0,4$
Pro	2400 ± 500	$0,9 \pm 0,1$

Сигмоидный характер графиков зависимости $K_{LS}/K_{LS,0}$ от $[Arg]$ (или $[ArgEE]$, $[ArgAd]$), то есть, случай, когда $h > 1$, может быть объяснен формированием кластеров молекул Arg в специфических участках поверхности белка. Формирование связанных с белком кластеров Arg было описано во многих работах [Shah, et al., 2011; Shukla & Trout, 2010; Vagenende, et al., 2013].

Кинетический режим ДТТ-индуцированной агрегации БСА в присутствии аргинина остается неизменным, что было подтверждено методом AF₄ (рис. 14). Зависимости доли неагрегированного белка от времени при различных концентрациях белка описываются уравнением для кинетики реакции первого порядка: $\gamma_{non-agg} = 1 - k_1 t$.

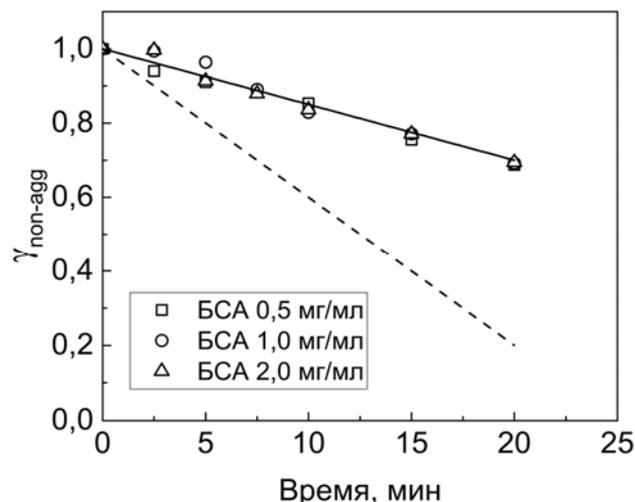


Рис. 14. Зависимости убыви неагрегированного белка ($\gamma_{non-agg}$) от времени для ДТТ-индуцированной агрегации БСА в присутствии 200 мМ аргинина (0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0, 45 °С, 2 мМ ДТТ). Пунктирной линией показана зависимость $\gamma_{non-agg}$ от времени в отсутствие аргинина ($k_1 = 0,045 \pm 0,001$ мин⁻¹).

Сравнение шапероноподобной активности интактного и сшитого α -кристаллина с использованием тест-системы на основе ДТТ-индуцированной агрегации БСА. Значения параметра K_{LS} были определены при различных концентрациях α -кристаллина. Зависимость $K_{LS}/K_{LS,0}$ от концентрации интактного α -кристаллина или $x = [\alpha\text{-кристаллин}]/[БСА]$ представлена на рис. 15А. С использованием уравнения (6) было рассчитано значение начальной адсорбционной емкости интактного α -кристаллина по отношению к белку-мишени: $AC_0 = 2,50 \pm 0,06$ молекул БСА на одну субъединицу α -кристаллина. Нелинейность

зависимости $K_{LS}/K_{LS,0}$ от концентрации α -кристаллина связана с динамическим характером четвертичной структуры α -кристаллина и переменным составом комплексов белка-мишени с шапероном. На рис. 15Б показана зависимость $K_{LS}/K_{LS,0}$ от концентрации сшитого α -кристаллина или $x = [\alpha\text{-кристаллин}]/[\text{БСА}]$. Как видно из этого рисунка, указанная зависимость линейна. Использование уравнения (6) позволяет определить адсорбционную емкость сшитого α -кристаллина: $AC_0 = 0,212 \pm 0,004$ мономеров БСА на одну субъединицу α -кристаллина. Таким образом, при сшивании адсорбционная емкость α -кристаллина по отношению к БСА снижается в 11,8 раз.

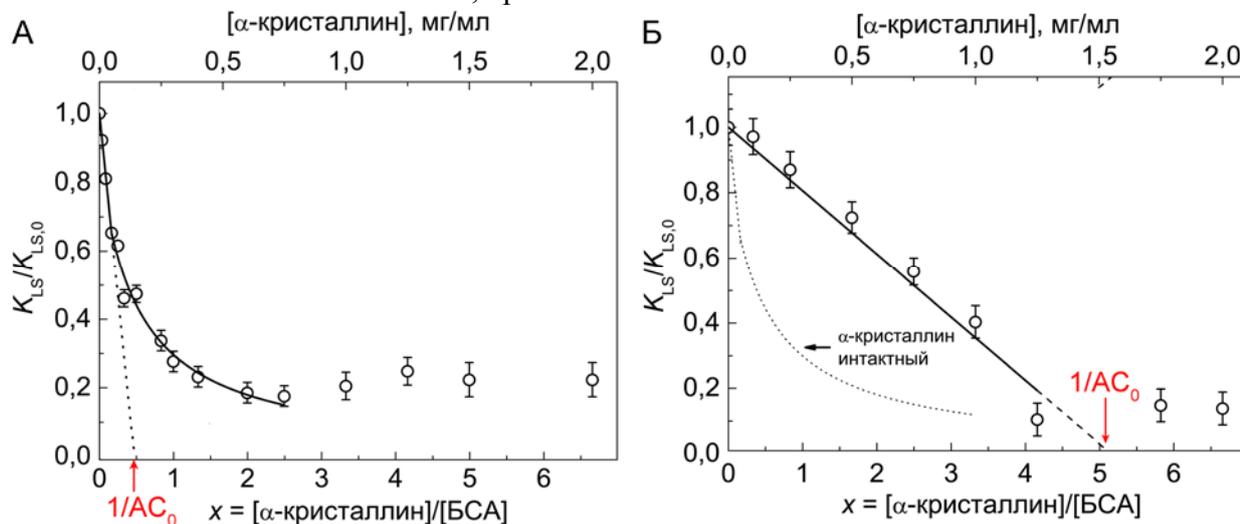


Рис. 15. Начальная скорость ДТТ-индуцированной агрегации БСА как функция отношения молярных концентраций интактного (А) и сшитого (Б) α -кристаллина и БСА. На верхней оси абсцисс дана концентрация α -кристаллина. Точки соответствуют экспериментальным данным. Пунктирная линия на рисунке (А) и сплошная линия на рисунке (Б) были вычислена по уравнению (6) при значении AC_0 , равном 2,5 и 0,212, соответственно.

Методом ДСК была определена доля α -кристаллина, остающегося в нативном состоянии после сшивания. Установлено снижение доли нативного белка γ_{nat} в 6,3 раза. Полученный результат свидетельствует о том, что основная потеря антиагрегационной активности α -кристаллина при сшивании происходит в результате денатурации белка. При этом сшивание приводит к снижению антиагрегационной активности в 1,9 раза.

Дополнительная информация о взаимодействии БСА в присутствии ДТТ с α -кристаллином получена методом аналитического ультрацентрифугирования. На рис. 16А показано распределение $c(s)$ для смесей БСА (1 мг/мл) с различными концентрациями α -кристаллина (0,05, 0,1 и 0,4 мг/мл). Сравнение распределений для БСА (пунктирная линия) и смеси БСА с α -кристаллином (0,05 мг/мл, красная линия) позволило предположить, что широкий пик со средним значением коэффициента седиментации 10,7 S в смеси соответствует комплексу шаперона с БСА. Сравнение распределения $c(s,*)$ для БСА и распределений $c(s)$ для смесей белка с более высокими концентрациями α -кристаллина показало, что дополнительные пики с коэффициентами седиментации в интервале от 6,8 до 14,5 S могут соответствовать комплексам БСА- α -кристаллин. При самой высокой концентрации α -кристаллина (0,4 мг/мл) пик с $s_{20,w} = 16,1$ S в распределении $c(s)$ может соответствовать как несвязанному шаперону, так и его комплексу с БСА. На рис. 16Б показано взаимодействие БСА (1 мг/мл) со сшитым α -кристаллином (0,05 мг/мл) при 45 °С. На распределении $c(s)$ выявлены два основных пика с $s_{20,w}$, равными 5,3 и 19,2 S. Мы предположили, что главный пик с $s_{20,w} = 5,3$ S соответствует БСА, пик с $s_{20,w} = 19,2$ S соответствует комплексу БСА со сшитым α -кристаллином. Пики с $s_{20,w}$ в интервале 6,8–14 S отсутствовали. Таким образом, в случае сшитого α -кристаллина не происходит образования комплексов с диссоциированными формами шаперона.

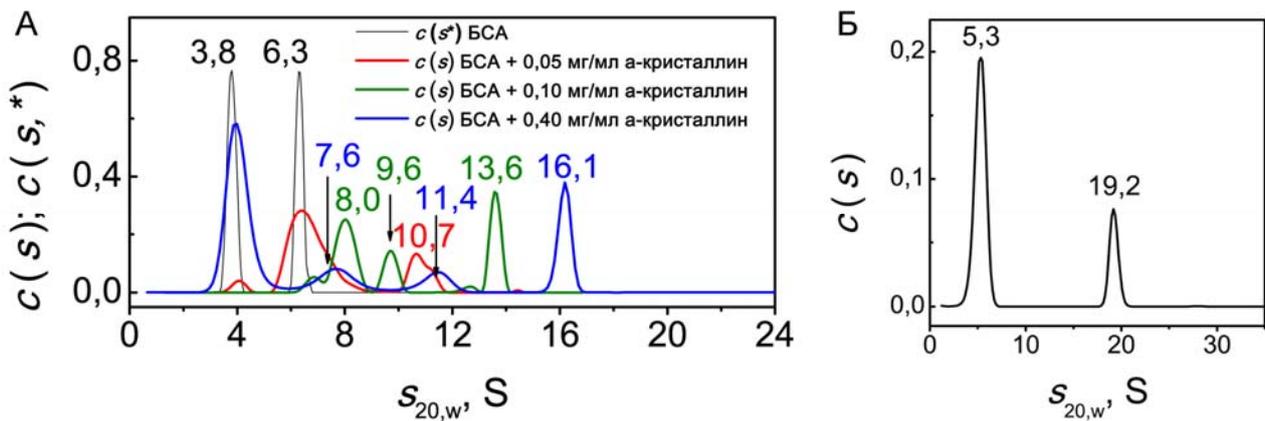


Рис. 16. Седиментационная характеристика БСА в присутствии α -кристаллина. Все образцы БСА (1 мг/мл) и смесей БСА с α -кристаллином прогревали при 45 °С в течение 1 часа в присутствии 2 мМ ДТТ. Скорость ротора была равна 34000 об/мин. (А) Седиментация БСА в присутствии интактного α -кристаллина. (Б) Седиментация БСА в присутствии сшитого α -кристаллина.

Кинетика ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина. Для установления взаимосвязи между начальной скоростью агрегации белка и длительностью лаг-периода в случае аморфной агрегации изучена кинетика ДТТ-индуцированной агрегации холо- α -лактальбумина из коровьего молока (Na-фосфатный буфер, pH 6,8; 37 °С). Кинетику агрегации α -лактальбумина регистрировали с использованием метода динамического светорассеяния (рис. 17А). Для определения показателя степени a в уравнении $K_{LS} = \text{const}[P]^a$ для ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина была построена зависимость начальной скорости агрегации (K_{LS}) от концентрации α -лактальбумина в логарифмических координатах (рис. 17Б). Эта зависимость линейна. Получено следующее значение показателя степени a : $a = 2,5 \pm 0,2$. Значение $a > 1$ указывает на то, что скорость-лимитирующей стадией процесса агрегации является стадия агрегации белка.

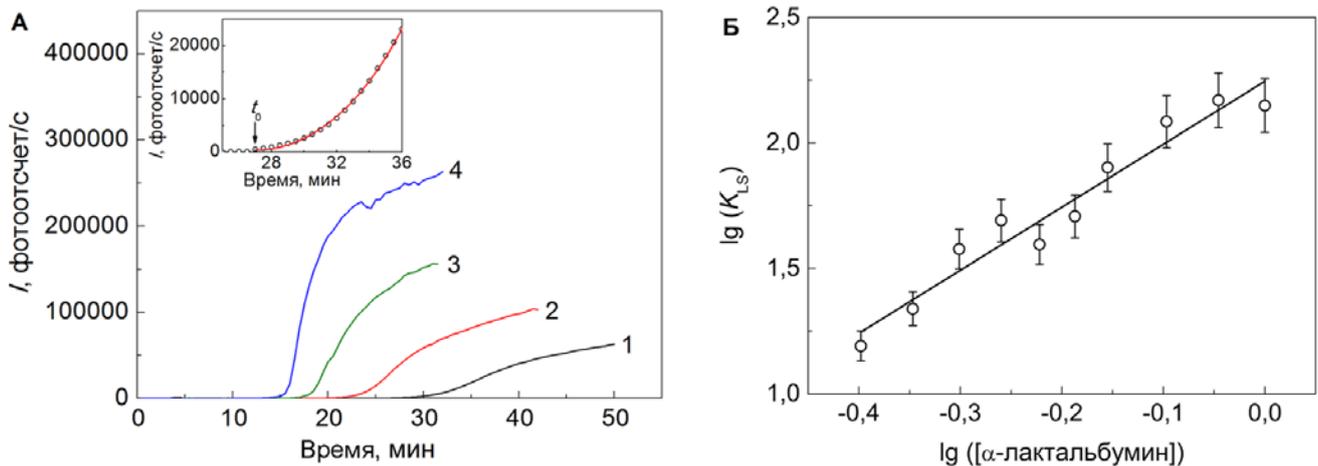


Рис. 17. Кинетика ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина при 37 °С. (А) Зависимости интенсивности светорассеяния от времени при следующих концентрациях α -лактальбумина: 0,4 мг/мл (1), 0,5 мг/мл (2), 0,7 мг/мл (3) и 1 мг/мл (4). На вставке дан пример применения уравнения (1) для расчета K_{LS} при концентрации α -лактальбумина 0,4 мг/мл. (Б) Определение показателя степени a для ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина. Зависимость начальной скорости (K_{LS}) агрегации от концентрации белка в логарифмических координатах. Размерность K_{LS} – (фотоотсчет/с)·мин⁻¹, размерность $[\alpha\text{-лактальбумин}]$ – мг/мл.

На рис. 18А представлен график зависимости $K_{LS}^{1/a}$ от длительности лаг-периода (t_0). Для

описания взаимосвязи между начальной скоростью агрегации и длительностью лаг-периода использовали следующее выражение:

$$K_{LS}^{1/a} = \alpha / (t_0 - t_{0,lim}), \quad (10)$$

где α – постоянная величина. Это уравнение может быть линеаризовано в координатах $\{1/K_{LS}^{1/a}; t_0\}$:

$$\frac{1}{K_{LS}^{1/a}} = -\frac{t_{0,lim}}{\alpha} + \frac{1}{\alpha} t_0. \quad (11)$$

На рис. 18Б показана линейная анаморфоза, соответствующая уравнению (11). Отрезок, отсекаемый на оси абсцисс линейной зависимостью $1/K_{LS}^{1/a}$ от t_0 , соответствует значению $t_{0,lim}$.

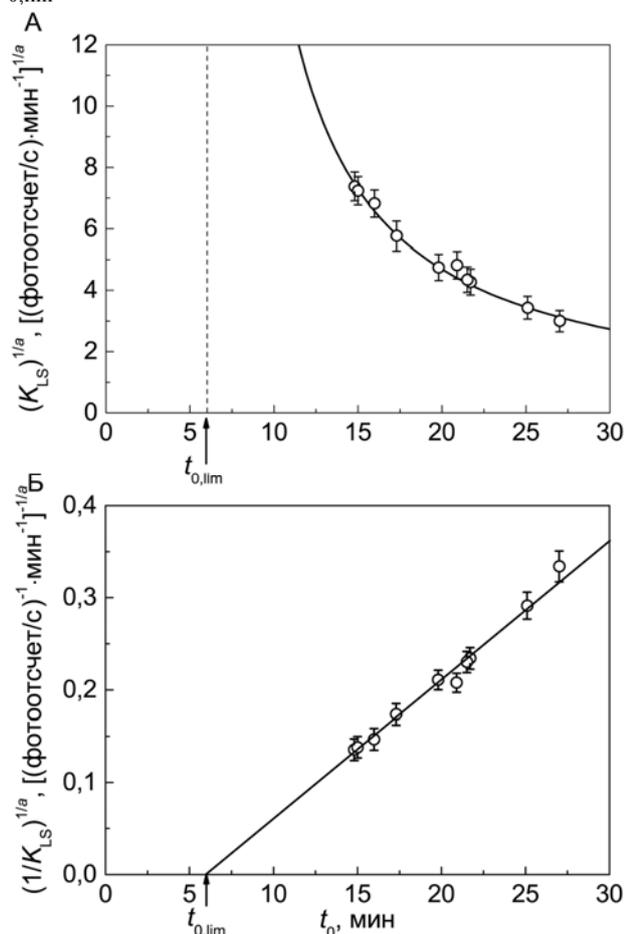


Рис. 18. Взаимосвязь между начальной скоростью (K_{LS}) ДТГ-индуцированной агрегации α -лактальбумина и длительностью лаг-периода (t_0). Экспериментальные данные представлены в координатах $\{(K_{LS})^{1/a}; t_0\}$ (А) и в координатах $\{1/(K_{LS})^{1/a}; t_0\}$ (Б). Сплошная кривая на рисунке А вычислена по уравнению (10) при:

$$a = 2,5, t_{0,lim} = 6,0 \text{ мин},$$

$$\alpha = 58 \text{ мин} \cdot [(\text{фотоотсчет/с}) \cdot \text{мин}^{-1}]^{1/a}.$$

Пунктирная вертикальная линия соответствует $t_0 = t_{0,lim}$.

Оценка шапероноподобной активности УФ-облученного α -кристаллина с использованием тест-системы на основе ДТГ-индуцированной агрегации α -лактальбумина. Для того чтобы охарактеризовать шапероноподобную активность α -кристаллина, поврежденного УФ-излучением, использовали тест-систему, основанную на ДТГ-индуцированной агрегации холо- α -лактальбумина из коровьего молока. В качестве меры антиагрегационной активности α -кристаллина использовали адсорбционную емкость α -кристаллина (AC_0) по отношению к белку-мишени (α -лактальбумину). Долю α -кристаллина, оставшегося в нативном состоянии после облучения ультрафиолетом, оценивали методом ДСК. Зависимость γ_{nat} от D подчиняется экспоненциальному закону: $\gamma_{nat} = \exp\{-[\ln(2)/D_{0,5}^{den}]D\}$, где $D_{0,5}^{den}$ – величина D , при которой $\gamma_{nat} = 0,5$ (т.е. доля денатурированного белка равна 0,5). Величина $D_{0,5}^{den}$ была найдена равной $6,3 \pm 0,4 \text{ Дж/см}^2$.

Для оценки антиагрегационной активности интактного α -кристаллина был построен график зависимости $(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/a}$ от $x = [\alpha\text{-кристаллин}]/[\alpha\text{-лактальбумин}]$ (рис. 19А, кривая 1). Из начального участка зависимости $(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/a}$ от x была вычислена начальная адсорбционная

емкость интактного α -кристаллина (AC_0) по отношению к α -лактальбумину: $AC_0 = 1,18 \pm 0,07$ молекул α -лактальбумина на одну субъединицу α -кристаллина.

Для оценки величины AC_0 для УФ-облученного α -кристаллина использовали зависимости $(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/a}$ от x . На рис. 19А (кривые 2 и 3) показаны графики зависимости $(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/a}$ от x для α -кристаллина, облученного следующими дозами УФ-излучения: 7,8 и 10,6 Дж/см². Антиагрегационная активность α -кристаллина уменьшается с увеличением дозы облучения (рис. 19Б), и зависимость AC_0 от D подчиняется экспоненциальному закону:

$$AC_0 = AC_{0, \text{intact}} \exp \left\{ -\frac{\ln(2)}{D_{0,5}^{\text{inact}}} D \right\}, \quad (12)$$

где $D_{0,5}^{\text{inact}}$ – доза облучения, при которой $AC_0 = AC_{0, \text{intact}}/2$ (доля инактивированного α -кристаллина равна 0,5). Значение $D_{0,5}^{\text{inact}}$ было найдено равным $4,3 \pm 0,6$ Дж/см².

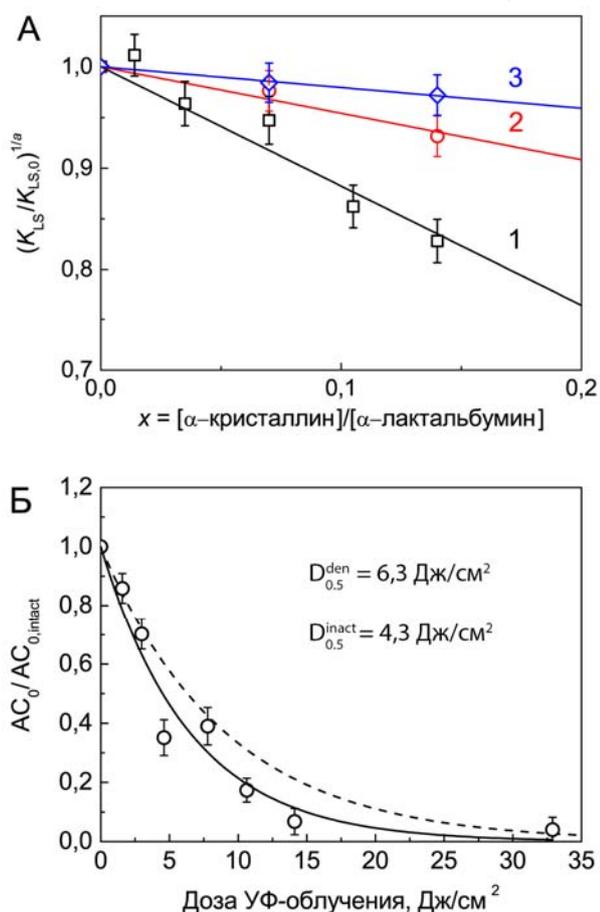


Рис. 19. Влияние УФ-облучения на антиагрегационную активность α -кристаллина. (А) Зависимости относительной начальной скорости агрегации $(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/a}$ от отношения молярных концентраций α -кристаллина и α -лактальбумина для УФ-облученного α -кристаллина. Дозы облучения были следующими: 0 (1), 7,8 (2) и 10,6 (3) Дж/см². Сплошные линии вычислены с помощью уравнения (6). (Б) Зависимость относительной адсорбционной емкости α -кристаллина по отношению к α -лактальбумина ($AC_0/AC_{0, \text{intact}}$) от дозы облучения. Сплошная линия вычислена по уравнению (12) при $D_{0,5}^{\text{inact}} = 4,3$ Дж/см². Пунктирная линия соответствует зависимости γ_{nat} от дозы облучения ($D_{0,5}^{\text{den}} = 6,3$ Дж/см²).

Снижение антиагрегационной активности α -кристаллина (AC_0) с увеличением времени УФ-облучения протекает быстрее, чем снижение доли нативного α -кристаллина (γ_{nat}). Причиной этого является, по-видимому, сшивание субъединиц, оставшихся в нативном состоянии после УФ-облучения.

Скрининг агентов, оказывающих влияние на стабильность белков с использованием тест-систем, основанных на агрегации белков в режиме нагревания с постоянной скоростью. Методология скрининга специфически взаимодействующих с белком лигандов, основанная на измерении скорости агрегации в присутствии изучаемых лигандов, была разработана Сенистеррой с соавторами [Senisterra, et al., 2006; Senisterra, et al., 2010], однако описание полных кинетических кривых агрегации недостаточно обоснованно, так как при высоких температурах может наблюдаться преципитация агрегатов. Для поиска веществ, влияющих на термостабильность белков, в настоящей работе был использован тест на основе регистрации агрегации белка в режиме нагревания с постоянной скоростью и анализа начальных участков кинетических кривых. Для описания

начальных участков кинетических кривых агрегации при изучении агрегации белка в условиях нагревания с постоянной скоростью было использовано уравнение, эквивалентное уравнению (1) [Eronina, et al., 2011]:

$$I = I_0 + K_{\text{agg}}(T - T_0)^2, \quad (T > T_0) \quad (13)$$

где T_0 – начальная температура агрегации, то есть, температура, при которой начинает возрастать интенсивность светорассеяния, и K_{agg} – параметр, характеризующий скорость агрегации. Параметры T_0 и K_{agg} могут быть использованы для количественной оценки подавления агрегации белков различными агентами.

Применимость предложенного подхода была продемонстрирована на примере тепловой агрегации ГД из печени быка, изученной в присутствии агентов разной химической природы. На рис. 20 показано влияние специфических лигандов NADH, NAD, ADP, L-глутамата (Glu) и L-лейцина (Leu) на агрегацию ГД в режиме нагревания с постоянной скоростью. Начальные участки зависимости интенсивности светорассеяния от температуры были проанализированы с помощью уравнения (13), что позволило рассчитать параметры T_0 и K_{agg} . Кроме того, было изучено влияние этих лигандов на термостабильность глутаматдегидрогеназы методом ДСК. Значения параметров K_{agg} , T_0 и T_{max} даны в табл. 3.

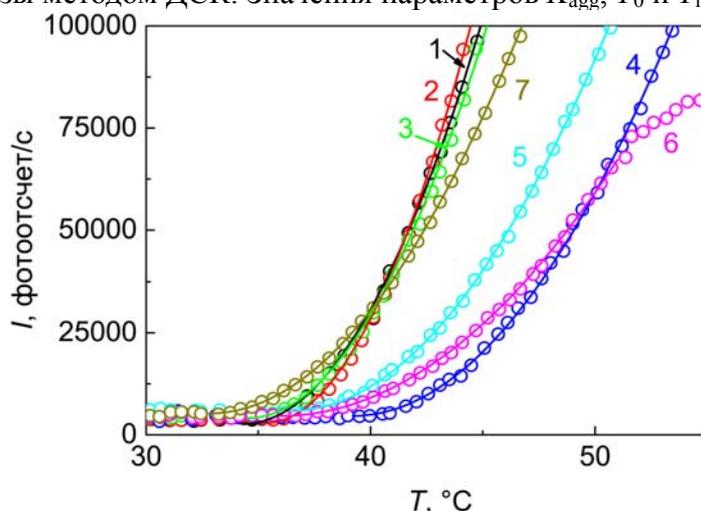


Рис. 20. Влияние специфических лигандов на тепловую агрегацию ГД (0,12 мг/мл) при нагревании с постоянной скоростью 1 °С/мин (0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,6). Зависимости интенсивности светорассеяния от температуры в отсутствие лигандов (1) и в присутствии 0,2 мМ NADH (2), 0,2 мМ NAD (3), 0,5 мМ ADP (4), 0,2 мМ NADH + 0,5 мМ ADP (5), 50 мМ Leu (6) и 50 мМ Glu (7). Точки соответствуют экспериментальным данным, сплошные кривые вычислены по уравнению (13).

Таблица 3. Значения параметров тепловой денатурации и агрегации ГД в режиме нагревания с постоянной скоростью (1 °С/мин) в присутствии специфических лигандов.

Лиганд	$K_{\text{agg}} \cdot 10^2$, (фотоотсчет/с)·мин ⁻²	T_0 , °С	T_{max} , °С
–	8,7 ± 0,1	34,3 ± 0,1	52,4 ± 0,1
0,2 мМ NADH	11,6 ± 0,2	35,3 ± 0,1	48,3 ± 0,1
0,2 мМ NAD	8,4 ± 0,1	34,5 ± 0,1	52,0 ± 0,1
0,5 мМ ADP	4,7 ± 0,1	39,3 ± 0,1	59,2 ± 0,1
0,2 мМ NADH + 0,5 мМ ADP	4,7 ± 0,1	36,4 ± 0,1	58,4 ± 0,1
50 мМ Leu	2,8 ± 0,1	36,0 ± 0,1	64,4 ± 0,1
50 мМ Glu	4,9 ± 0,1	32,8 ± 0,1	54,0 ± 0,1

Увеличение параметра K_{agg} в присутствии 0,2 мМ NADH означает, что NADH проявляет дестабилизирующее действие на фермент. Судя по значениям K_{agg} , повышение стабильности ГД наблюдалось в присутствии аллостерических активаторов ADP и L-лейцина и в присутствии субстрата, L-глутамата. ADP (0,5 мМ) снимал дестабилизирующий эффект NADH (0,2 мМ). NAD не оказывал влияния на агрегацию ГД. Полученные данные согласуются с результатами изучения термостабильности ГД в присутствии лигандов методом ДСК (табл. 3).

Изучение кинетики агрегации белков-мишеней с использованием методов динамического светорассеяния и AF₄ позволяет сделать вывод, что в отсутствие шаперонов в изученных тест-системах параметр K_{LS} прямо пропорционален начальной скорости агрегации. В присутствии химических шаперонов необходимо проверять, сохраняется ли кинетический режим агрегации. Если изменения кинетического режима не происходит, то параметр K_{LS} может использоваться как мера скорости агрегации белка. Однако если кинетический режим изменяется, то применение параметра K_{LS} становится некорректным. При использовании тест-системы в режиме нагревания с постоянной скоростью необходим дополнительный контроль влияния изучаемого агента на денатурацию белка.

Проведенные исследования показывают, что параметр AC_0 (адсорбционная емкость белкового шаперона по отношению к белку-мишени) и концентрация полунасыщения $[L]_{0,5}$ (мера сродства химического шаперона к белку-мишени) могут быть использованы для сравнительной характеристики антиагрегационной активности химических и белковых шаперонов.

ВЫВОДЫ

1. Установлен механизм тепловой агрегации бычьего сывороточного альбумина (БСА) на основании исследования денатурации белка методом дифференциальной сканирующей калориметрии и кинетики агрегации с использованием методов динамического светорассеяния, фракционирования в поле асимметричного потока и аналитического ультрацентрифугирования. Предполагается образование двух форм ненативного белка с различной способностью к агрегации. Одна из форм характеризуется высокой скоростью агрегации, приводящей к образованию первичных агрегатов. Вторая форма вовлекается в процесс агрегации путем присоединения к первичным агрегатам и, кроме того, способна образовывать стабильные агрегаты относительно небольших размеров.

2. Установлено, что скорость-лимитирующей стадией агрегации БСА, индуцируемой дитиотреитолом при 45 °С, является стадия разворачивания белковой молекулы, а в случае тепловой агрегации БСА при 70 °С – стадия агрегации денатурированных молекул белка.

3. Анализ кинетики агрегации альфа-лактальбумина, индуцируемой дитиотреитолом, показал, что при относительно высоких концентрациях белка длительность лаг-периода достигает предельного значения, обусловленного существованием стадий, предшествующих образованию стартовых агрегатов.

4. Для оценки антиагрегационной активности шаперонов белковой природы предложено использовать адсорбционную емкость шаперона по отношению к белку-мишени, а в случае химических шаперонов – концентрацию полунасыщения, характеризующую сродство химического шаперона к белку-мишени. Применимость предложенных методов оценки антиагрегационной активности шаперонов продемонстрирована для альфа-кристаллина (нативного, сшитого глутаровым альдегидом и облученного ультрафиолетовым светом), пролина, аргинина и его производных (аргининамида и этилового эфира аргинина) с использованием тест-систем, основанных на

тепловой агрегации БСА, агрегации БСА и альфа-лактальбумина, индуцируемой восстановлением дисульфидных связей дитиотреитолом. Сделан вывод, что нелинейный характер зависимости относительной начальной скорости агрегации от отношения молярных концентраций [альфа-кристаллин]/[белок-мишень] обусловлен динамической четвертичной структурой альфа-кристаллина. Установлено, что падение антиагрегационной активности альфа-кристаллина при облучении ультрафиолетовым светом происходит в результате необратимой денатурации белковых молекул и образования межсубъединичных сшивок.

5. Разработаны подходы для количественной оценки влияния различных агентов на агрегацию белков-мишеней при нагревании раствора белка с постоянной скоростью. Применимость предложенных подходов продемонстрирована на примере глутаматдегидрогеназы из печени быка.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Eronina T., **Borzova V.**, Maloletkina O., Kleymenov S., Asryants R., Markossian K., Kurganov B. (2011) A protein aggregation based test for screening of the agents affecting thermostability of proteins. **PLoS One**. V. 6. No. 7. e: 22154.
2. **Borzova V.A.**, Markossian K.A., Kara D.A., Chebotareva N.A., Makeeva V.F., Polyansky N.B., Muranov K.O., Kurganov B.I. (2013) Quantification of anti-aggregation activity of chaperones: a test-system based on dithiothreitol-induced aggregation of bovine serum albumin. **PLoS One**. V. 8. No. 9. e: 74367.
3. **Borzova V.A.**, Markossian K.A., Kurganov B.I. (2014) Relationship between the initial rate of protein aggregation and the lag period for amorphous aggregation. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 68. P. 144–150.
4. **Borzova V.A.**, Markossian K.A., Muranov K.O., Polyansky N.B., Kleymenov S.Yu., Kurganov B.I. (2015) Quantification of anti-aggregation activity of UV-irradiated alpha-crystallin. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 73. P. 84-91.
5. **Borzova V.A.**, Markossian K.A., Kara D.A., Kurganov B.I. (2015) Kinetic regime of dithiothreitol-induced aggregation of bovine serum albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 80. P. 130-138.

Материалы научных конференций, конгрессов и симпозиумов:

1. **Борзова В.А.** (2011) Тепловая агрегация бычьего сывороточного альбумина. V Российский симпозиум «Белки и пептиды». Петрозаводск, 8-12 августа 2011 г. С. 270.
2. **Борзова В.А.**, Маркосян К.А., Курганов Б.И. (2012) Кинетика агрегации бычьего сывороточного альбумина, индуцированной дитиотреитолом. Испытание агентов, обладающих антиагрегационной активностью. IV Съезд биофизиков России. Нижний Новгород, 20-26 августа 2012 г. С. 46.
3. **Борзова В.А.**, Маркосян К.А., Кара Д.А., Чеботарева Н.А., Муранов К.О., Полянский Н.Б., Makeeva В.Ф., Курганов Б.И. (2013) Количественная оценка антиагрегационной активности шаперонов белковой природы и химических шаперонов. VI Российский симпозиум «Белки и пептиды». Уфа, 11-15 июня 2013 г. С. 225.
4. **Borzova V.**, Markossian K., Kara D., Chebotareva N., Muranov K., Polyansky N., Makeeva V., Kurganov B. (2013) Study of the mechanisms of antiaggregation activity of a-crystallin and chemical chaperones using a test system based on dithiothreitol-induced aggregation of bovine serum albumin. 38th FEBS Congress and YSF 2013. Saint Petersburg, Russia, July 6-11,

2013. **FEBS J.** V. 280. Suppl. 1. P. 483 – 484.

5. **Borzova V.A.** (2014) Anti-aggregation activity of alpha-crystallin and its quantification. 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, September 15-19, 2014. **Acta Naturae**. Special issue №1. P. 53.

6. Markossian K.A., **Borzova V.A.**, Kleimenov S.Yu., Chebotareva N.A., Shubin V.V., Muranov K.O., Polyansky N.B., Kurganov B.I. (2014) Kinetics of heat-induced aggregation of bovine serum albumin. 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, September 15-19, 2014. **Acta Naturae**. Special issue №1. P. 32.

7. **Borzova V.A.** (2015) Thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin. 6th International Conference and Exhibition on Analytical & Bioanalytical Techniques. Valencia, Spain, September 1-3, 2015. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**. V. 6, No. 4. P. 100.

Список основных сокращений

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГД – глутаматдегидрогеназа

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ДСН – додецилсульфат натрия

ДТТ – дитиотреитол

УФ – ультрафиолетовый свет

ADP – аденозиндифосфат

AF₄ – asymmetric flow field-flow fractionation, фракционирование в поле асимметричного потока

Arg – аргинин

ArgAd – аргининамид

ArgEE – этиловый эфир аргинина

NAD – никотинамидадениндинуклеотид

NADH – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

Pro – пролин

Список цитированной литературы

1. Eronina T., Borzova V., Maloletkina O., Kleymenov S., Asryants R., Markossian K., Kurganov B. A protein aggregation based test for screening of the agents affecting thermostability of proteins // PLoS One. 2011. – V.6. – E: 22154.
2. Ferrone F.A., Hofrichter J., Eaton W.A. Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. II. A double nucleation mechanism // J Mol Biol. 1985. – V. 183. – P. 611-631.
3. Rombouts I., Lagrain B., Scherf K.A., Koehler P., Delcour J.A. Formation and reshuffling of disulfide bonds in bovine serum albumin demonstrated using tandem mass spectrometry with collision-induced and electron-transfer dissociation // Sci Rep. 2015. – V. 5. – P. 12210.
4. Senisterra G.A., Markin E., Yamazaki K., Hui R., Vedadi M., Awrey D.E. Screening for ligands using a generic and high-throughput light-scattering-based assay // J Biomol Screen. 2006. – V. 11. – P. 940-948.
5. Senisterra G.A., Ghanei H., Khutoreskaya G., Dobrovetsky E., Edwards A.M., Privé G.G., Vedadi M. Assessing the stability of membrane proteins to detect ligand binding using differential static light scattering // J Biomol Screen. 2010. – V. 15. – P. 314-320.
6. Shah D., Shaikh A.R., Peng X., Rajagopalan R. Effects of arginine on heat-induced aggregation of concentrated protein solutions // Biotechnol Prog. 2011. – V. 27. – P. 513-520.
7. Shukla D., Trout B.L. Interaction of arginine with proteins and the mechanism by which it inhibits aggregation // J Phys Chem B. 2010. – V. 114. – P. 13426-13438.
8. Smirnova E., Safenkova I., Stein-Margolina B., Shubin V., Gurvits B. L-arginine induces protein aggregation and transformation of supramolecular structures of the aggregates // Amino Acids. 2013. – V. 45. – P. 845-855.
9. Vagenende V., Han A.X., Mueller M., Trout B.L. Protein-associated cation clusters in aqueous arginine solutions and their effects on protein stability and size // ACS Chem Biol. 2013. – V. 8. – P. 416-422.
10. Webb J.L. Enzyme and metabolic inhibitors. – New York: Academic Press, 1963 – V. 1. – P. 1-951.
11. Курганов Б.И. Кинетика тепловой агрегации белков // Биохимия. 1998. – Т. 63. – С. 430-432.