

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

На правах рукописи

Борзова Вера Александровна

**МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ШАПЕРОНОВ ПРИ АГРЕГАЦИИ
БЕЛКОВ**

Специальность 03.01.04 Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители:
д.б.н. Маркосян К.А.
д.х.н., проф. Курганов Б.И.

Москва, 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Агрегация белков	8
1.2. Бычий сывороточный альбумин (БСА)	13
1.3. Альфа-лактальбумин (ЛА)	18
1.4. Глутаматдегидрогеназа (ГД)	21
1.5. Альфа-кристаллин	25
1.6. Химические шапероны	30
1.6.1. Аргинин	30
1.6.2. Производные аргинина	37
1.6.3. Пролин	38
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1. Материалы	40
2.1.1. Бычий сывороточный альбумин	40
2.1.2. α -Лактальбумин	40
2.1.3. Глутаматдегидрогеназа	40
2.1.4. α -Кристаллин	41
2.1.5. Реактивы	41
2.2. Методы исследования	41
2.2.1. Выделение α -кристаллина	41
2.2.2. Получение сшитого α -кристаллина	42
2.2.3. Получение денатурированного неагрегированного БСА	42
2.2.4. Динамическое светорассеяние	43
2.2.5. Изучение кинетики агрегации белков	45
2.2.6. Дифференциальная сканирующая калориметрия	47
2.2.7. Фракционирование в поле асимметричного потока (AF_4)	49
2.2.8. Аналитическое ультрацентрифугирование	52
2.2.9. УФ-облучение препарата α -кристаллина	54
2.2.10. Гель-проникающая хроматография	55
2.2.11. ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле	55
2.2.12. Определение показателя преломления, плотности и динамической вязкости	56
2.2.13. Измерение флуоресценции	56
2.2.14. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)	57
2.2.15. Спектроскопия кругового дихроизма (КД)	58
2.2.16. Измерение дзета-потенциала	59
2.2.17. Вычисления	59

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	60
3.1. Теория. Количественная оценка шапероноподобной активности	60
3.1.1. Определение начальной скорости агрегации белка	60
3.1.2. Оценка антиагрегационной активности химических шаперонов	63
3.1.3. Оценка антиагрегационной активности белковых шаперонов	64
3.1.4. Классификация тест-систем, используемых для оценки антиагрегационной активности шаперонов	66
3.2 Экспериментальные результаты	70
3.2.1. Механизм тепловой агрегации БСА	70
3.2.2. Влияние химических шаперонов на тепловую агрегацию БСА	96
3.2.3. Кинетический режим индуцированной дитиотреитолом (ДТТ) агрегации БСА	102
3.2.4. Оценка шапероноподобной активности пролина и производных аргинина с использованием тест-системы на основе ДТТ-индуцированной агрегации БСА.....	109
3.2.5. Сравнение шапероноподобной активности интактного и сшитого α -кристаллина с использованием тест-системы на основе ДТТ-индуцированной агрегации БСА....	114
3.2.6. Кинетика ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина	122
3.2.7. Оценка шапероноподобной активности УФ-облученного α -кристаллина с использованием тест-системы на основе ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина	129
3.2.8. Скрининг агентов, оказывающих влияние на стабильность белков с использованием тест-систем, основанных на агрегации белков в режиме нагревания с постоянной скоростью. Влияние лигандов на тепловую агрегацию глутаматдегидрогеназы.....	139
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	147
ВЫВОДЫ	149
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	151
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	153
БЛАГОДАРНОСТИ	181

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АКД – альфа-кристаллиновый домен
- АНС – 8-аминонафталин-1-сульфоновая кислота
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
- ГД – глутаматдегидрогеназа
- ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия
- ДСН – додецилсульфат натрия
- ДТТ – дитиотреитол
- КД – круговой дихроизм
- ЛА – лактальбумин
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия
- УФ – ультрафиолетовое излучение
- ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
- ADP – аденозиндифосфат
- AF₄ – asymmetric flow field-flow fractionation, фракционирование в поле асимметричного потока
- ArgAd – аргининамид
- ArgEE – этиловый эфир аргинина
- DLCA – diffusion-limited cluster-cluster aggregation, диффузионно-лимитируемая кластер-кластерная агрегация
- GdnHCl – гуанидингидрохлорид
- GLU – глутамат
- GTP – гуанозинтрифосфат
- α -KG – α -кетоглутарат
- NAD – никотинамидадениндинуклеотид
- NADH – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
- NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
- Phb – гликогенфосфорилаза *b*
- RLCA – reaction-limited cluster-cluster aggregation, реакционно-лимитируемая кластер-кластерная агрегация
- sHSP – small heat shock protein, малый белок теплового шока
- ThT – тиофлавин Т
- UVB – ультрафиолетовое излучение типа В

ВВЕДЕНИЕ

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 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 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.

Методы исследования. В работе были использованы следующие методы исследования: динамическое светорассеяние, дифференциальная сканирующая калориметрия, фракционирование в поле асимметричного потока, аналитическое ультрацентрифугирование, флуоресцентная спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма, трансмиссионная электронная микроскопия, гель-проникающая хроматография, электрофорез в полиакриламидном геле, измерение дзета-потенциала.

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. Высокореакционноспособная форма характеризуется высокой скоростью агрегации и образует первичные агрегаты. Низкореакционноспособная 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 скорость-лимитирующей стадией является слипание развернутых молекул БСА. В случае ДТТ-

индуцированной агрегации (при 45 °С) порядок реакции по белку равен 1 и скорость-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.

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

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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Агрегация белков

Агрегация белков, сопровождающаяся формированием внутриклеточных нерастворимых агрегатов и телец включения – это сложная проблема, связанная со многими биотехнологическими задачами и патогенезом различных заболеваний [Jaenicke, 1995; Fink, 1998; Dobson, 1999; Маркосян & Курганов, 2004]. Нейродегенеративные заболевания – болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, прионные энцефалопатии, боковой амиотрофический склероз, кистозный фиброз, связаны с агрегацией неправильно свернутых полипептидов, образующих цитотоксичные агрегаты и тельца включения [Goedert, et al., 1998; Carrell & Lomas, 1997].

Агрегация белков протекает как *in vivo*, так и *in vitro* в результате стрессовых воздействий, нарушающих нативную структуру белка. К таким воздействиям относятся повышение температуры, изменение pH, механическое воздействие (например, при перемешивании), циклы замораживания и оттаивания [Mahler, et al., 2009; Pekar & Sukumar, 2007]. Высокие температуры разрушают четвертичную, третичную и вторичную структуру белков. Эта дестабилизация приводит к экспонированию гидрофобных участков, в которых затем инициируется агрегация, чтобы минимизировать невыгодные взаимодействия этих участков с водным окружением. Изменения pH могут приводить к изменению заряда основных и кислых групп боковых цепочек аминокислот в белках, нарушая электростатические взаимодействия и дестабилизируя нативную структуру белков. Хаотропные агенты, подобные гуанидингидрохлориду и мочеvine, разворачивают белки путем разрушения внутримолекулярных связей [Hamada, et al., 2009]. Эффективный заряд на поверхности молекулы белка имеет значительное влияние на его коллоидную стабильность. На этот заряд влияют параметры раствора, такие как pH и ионная сила. Добавление солей обычно приводит к экранированию зарядов на поверхности белка. Это уменьшает силы отталкивания между белковыми молекулами, что, в свою очередь, увеличивает склонность к агрегации [Olsen, et al., 2009]. В процессе замораживания и оттаивания происходят сложные физические и химические процессы, включая образование поверхностей раздела между льдом и жидкостью, адсорбция и криоконцентрация белков и солей буфера [Strambini & Connelly, 2007], изменение pH в связи с кристаллизацией компонентов буфера [Pikal-Cleland, et al., 2002]. Эти изменения могут индуцировать денатурацию и агрегацию белков.

Механический стресс при перемешивании и транспортировке белковых препаратов может вызывать поверхностные эффекты, образование пузырьков, локальные изменения температуры и быстрый перенос агрегированных и адсорбированных форм с поверхности в раствор [Kiese, et al., 2008]. Увеличение концентрации белка вызывает ускорение образования агрегатов многих белков при хранении [Treuheit, et al., 2002; Shire, et al., 2004]. При высокой концентрации белка наблюдается явление молекулярного краудинга, при котором может становиться более выгодным агрегация и самосборка белка, но в то же время краудинг может уменьшать разворачивание белка, которое необходимо во многих механизмах агрегации [Minton, 2005].

Влияние на агрегацию может также оказывать контакт с различными поверхностями: стекло, силикон, пластик [Mahler, et al., 2009]. Связывание белка на относительно плоской поверхности крупных наночастиц часто вызывает нарушение его вторичной структуры, тогда как мелкие наночастицы с высокой кривизной поверхности могут помочь белку сохранить исходную структуру [Fei & Perrett, 2009]. Агрегация может быть следствием химической модификации белка, например, дезаминирования, изомеризации, гидролиза и окисления [Wang, 1999]. Освещение, окислители и ионы металлов могут вызывать окисление боковых цепей аминокислот, таких как Met, Tyr, Trp, His, Cys, что индуцирует агрегацию белка [Li, et al., 1995]. В клетках агрегация белков может быть следствием неправильного сворачивания, связанного с мутациями или ошибками при транскрипции и трансляции [Chiti, et al., 2003].

Хотя возникновение форм белка с нарушенной структурой часто является начальной стадией необратимой агрегации, молекулы белка должны затем образовать молекулярные ансамбли более высокого порядка путем белок-белковых взаимодействий. Для этого необходимо преодолеть электростатические и стерическое отталкивание, которое может ингибировать белок-белковые взаимодействия [De Young, et al., 1993].

Агрегацию белков вызывают факторы, действующие и при сворачивании белков. Это уменьшение экспонирования в раствор гидрофобных остатков, отталкивание одноименных зарядов, стерические ограничения, увеличение количества водородных связей полипептидного каркаса, энтропия цепи и Ван-дер-Ваальсовы контакты. Ковалентно связанные агрегаты могут формироваться за счет дисульфидных связей, образуемых свободными тиоловыми группами [Andya, et al., 2003] или недисульфидными сшивками, например, путем образования дитиозинов [Malencik & Anderson, 2003].

Для описания необратимой агрегации белков применяют модель двух состояний Ламри – Эйринга (рис. 1.1) [Andrews & Roberts, 2007; Li & Roberts, 2009; Roberts, et al., 2011; Wang & Roberts, 2013]. Согласно этой модели, нативный белок сначала подвергается

обратимому конформационному изменению и переходит в склонную к агрегации форму, которая затем необратимо переходит в агрегированное состояние [Mahler, et al., 2009].

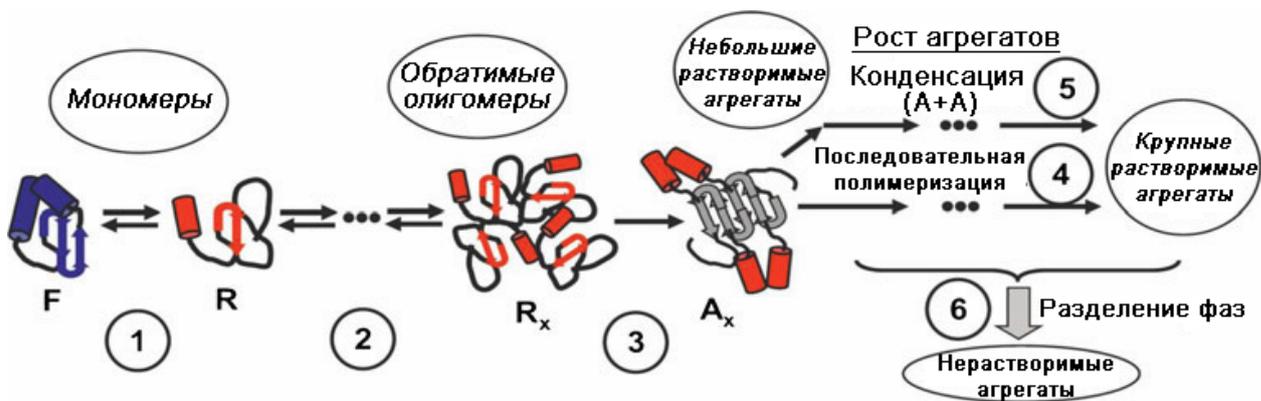


Рис.1.1. Общая схема многоэтапных путей необратимой агрегации белковых препаратов при очистке и хранении [Roberts, et al., 2011]. Главные стадии: (1) структурные изменения нативного белка, (2) обратимая самоассоциация форм с нарушенной структурой, (3) конформационные изменения, которые делают обратимую белок-белковую ассоциацию – необратимой, (4) рост агрегата путем присоединения мономеров, (5) увеличение размеров частиц за счет взаимодействия агрегатов и формирования крупных растворимых агрегатов и (6) разделение фаз и формирование нерастворимых агрегатов [Chaudhuri, et al., 2013].

Процесс полимеризации белков в более крупные структуры может включать в себя необходимые, но термодинамически невыгодные стадии, которые образуют «бутылочное горлышко» для формирования более крупных агрегатов. Эти стадии рассматриваются как составляющие процесса формирования ядра. В этом механизме мономер обладает небольшой способностью к формированию мелких и среднего размера олигомеров, однако добавление мономеров к этим небольшим олигомерам термодинамически невыгодно. Если формируется агрегат определенного размера, рост этого ядра путем добавления мономеров становится выгодным и протекает с большой скоростью. Характерной чертой процесса нуклеации является наличие лаг-периода. С термодинамической точки зрения ядро представляет собой поворотную точку в балансе уменьшения энтропии и энергией связей, агрегат считается постнуклеарным (postnuclear), если при данной концентрации мономеров добавление еще одного мономера повышает стабильность агрегата. Кинетически это означает, что после формирования ядра скорость добавления мономеров превышает скорость их потери, до формирования – наоборот. Оосава предложил подобный подход для одномерного необратимого роста и получил простые решения для кинетических уравнений [Oosawa & Kasai, 1962]. Первичным путем везде считается гомогенная нуклеация, описываемая классической теорией равновесной нуклеации [Bishop & Ferrone, 1984]. Наличие дополнительных контактов на поверхности фибрилл позволяет протекать в этих участках процессу нуклеации, известному как

гетерогенная нуклеация. Гетерогенная нуклеация ответственна за экспоненциальный рост полимеров после формирования ядра [Ferrone, et al., 1985].

Модель агрегации с формированием стартовых агрегатов предполагает образование крупных комплексов, состоящих из кластеров ядер. Они формируются по принципу «все или ничего» и содержат сотни денатурированных молекул [Markossian, et al., 2006; Golub, et al., 2007; Golub, et al., 2008]. Дальнейшая агрегация в этом случае происходит за счет слипания стартовых агрегатов в более крупные аморфные агрегаты.

Было предложено [Kodaka, 2004a; Kodaka, 2004b] анализировать процессы агрегации с помощью двух моделей – модель случайной полимеризации и модель полимеризации путем нуклеации. В модели случайной полимеризации все формы (мономеры, олигомеры, полимеры) ассоциируют линейно и случайно и формируют агрегаты (фибриллы). Во второй модели – полимеризации через стадию нуклеации – отдельные мономеры ассоциируют последовательно, формируя ядро и затем фибриллы.

Схема, представленная на рис. 1.2, обобщает модели процесса агрегации белков [Speed, et al., 1997]:

1) последовательное присоединение частиц к кластеру, при котором индивидуальные мономеры добавляются к растущей цепочке; 2) мультимерная кластер-кластерная полимеризация, при которой мультимеры любого размера образуют ассоциаты; 3) нуклеация – медленное формирование агрегата критического размера и последующая быстрая полимеризация или рост агрегата.

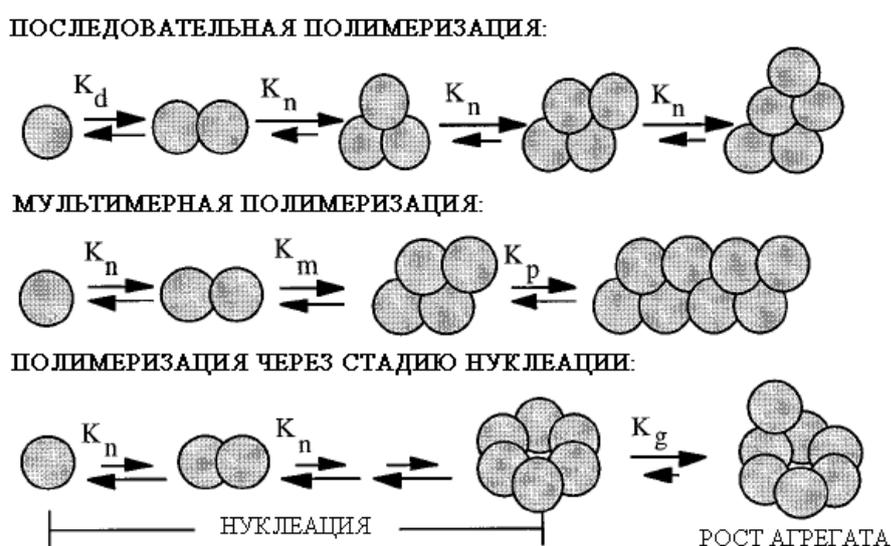


Рис. 1.2. Модели агрегации [Speed, et al., 1997].

Кажущаяся необратимость агрегации связана с тем, что интермедиаты агрегации не находятся в равновесии друг с другом. Кинетическая конкуренция между фолдингом и

агрегацией, а не термодинамическая стабильность нативного состояния или термодинамическое равновесие между интермедиатами, определяет баланс между этими процессами [Speed, et al., 1997].

Показано, что существуют два режима кинетики необратимой агрегации, определяемые вероятностью слипания частиц при их столкновении: диффузионно-лимитируемый режим (DLCA) – силы отталкивания между частицами незначительны, быстрая агрегация; реакционно-лимитируемый режим (RLCA) – силы отталкивания значительны, частицы должны их преодолеть, медленная агрегация [Weitz, et al., 1985].

Одни и те же белки, в зависимости от условий могут образовывать как аморфные, так и амилоидные агрегаты. Последние имеют упорядоченную структуру, в которой молекулы белка соединены кросс- β -контактами. Этот механизм подробно освещен в литературе [Cohen, et al., 2012], и останавливаться здесь на его описании не представляется целесообразным.

Классификация агрегатов, предложенная Малером с соавторами [Mahler, et al., 2009], включает в себя следующие категории:

- 1) по типу связи: нековалентные агрегаты и ковалентные агрегаты;
- 2) по обратимости: обратимые и необратимые;
- 3) по размеру: растворимые агрегаты небольшого размера (олигомеры), крупные олигомеры (около 10 мономеров), агрегаты диаметром от 20 нм до 1 мкм, нерастворимые частицы 1-25 мкм, видимые невооруженным глазом нерастворимые частицы;
- 4) по конформации белка: агрегаты с преобладающей нативной структурой и агрегаты с преобладающей ненативной структурой.

Аналитические методы для изучения белковых агрегатов – это прежде всего гель-проникающая хроматография, аналитическое ультрацентрифугирование, проточное фракционирование в поперечном поле и гель-электрофорез. Эти методы основаны на частичном или полном разделении различных форм белка и используются для измерения количества и размера агрегатов [Chaudhuri, et al., 2013; Pekar & Sukumar, 2007]. Кроме того, широко применяются методы на основе светорассеяния, использование флуоресцентных красителей, трансмиссионная и атомно-силовая микроскопия [Mahler, et al., 2009].

Основные направления фундаментальных и прикладных исследований агрегации белков [Murphy & Roberts, 2013]:

- 1) установление связи между аминокислотной последовательностью белка и его стабильностью, разработка методов предсказания стабильности по последовательности;

- 2) поиск агентов, стабилизирующих белки и изучение механизмов их действия;
- 3) определение стадий получения белковых препаратов, которые приводят к агрегации;
- 4) установление характеристик агрегатов и соотнесение их физико-химических и биологических свойств;
- 5) установление ключевых стадий механизмов агрегации белков для совершенствования методов получения препаратов и контроля размеров агрегатов.

1.2. Бычий сывороточный альбумин (БСА)

Бычий сывороточный альбумин – глобулярный белок массой 66 кДа, содержит 585 аминокислотных остатков и составляет примерно 60% белка плазмы крови [Carter & Ho, 1994; Peters, 1985]. Изоэлектрическая точка БСА находится в интервале pH от 4,8 до 5,6 [Peters, 1996; Tanford & Buzzell, 1956]. При нейтральных pH кристаллическая структура белка имеет сердцевидную форму (рис. 1.3). Трехмерная структура БСА состоит из трех гомологичных доменов (I, II, III), каждый из которых сформирован шестью спиралями и подразделяется на 2 субдомена [Gelamo, et al., 2002]. БСА содержит 17 дисульфидных связей, которые придают жесткость каждому субдомену, но позволяют значительные изменения формы и размера белка при разных условиях [Hirayama, et al., 1990; Ho, et al., 1993; Paris, et al., 2012]. При нейтральных pH дисульфидные связи погружены вглубь молекулы белка и не экспонированы в растворитель [Katchalski, et al., 1957]. Единственный свободный остаток цистеина (Cys-34) находится в домене I, в гидрофобном «кармане» молекулы [Militello, et al., 2003]. БСА содержит два остатка триптофана (Trp), находящиеся в двух разных доменах: Trp-134, расположенный вблизи поверхности белка, но погруженный в гидрофобный «карман» домена I, и Trp-214, расположенный во внутренней части домена II [Moriyama, et al., 2008]. Последовательность БСА на 76% гомологична последовательности человеческого сывороточного альбумина [Peters, 1985; Carter & Ho, 1994].

Одной из наиболее важных функций БСА, как и других сывороточных альбуминов, является транспорт свободных жирных кислот [Saifer & Goldman, 1961]. Сывороточный альбумин играет ключевую роль в транспорте большого числа метаболитов, билирубина, гормонов, лекарств [Peters, 1996; Brodersen, 1979; Sulkowska, et al., 2007], металлов [Bal, et al., 1998].

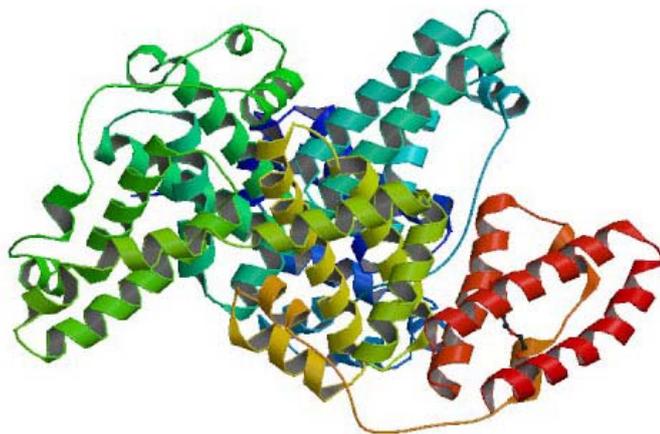


Рис. 1.3. Структура бычьего сывороточного альбумина [Вујасц, 2012].

БСА способен подвергаться обратимой конформационной перестройке при изменении pH [Tanford & Buzzell, 1956; Aoki & Foster, 1956; Rachinsky & Foster, 1957; Sogami & Foster, 1962]. Всего идентифицированы 5 конформеров БСА в разных диапазонах pH: E-форма (Extended; pH<3), F-форма (Fast; pH 3–5), N-форма (Native; pH 5–7), B-форма (Basic; pH 7–8,5) и A-форма (Aged; pH>8,5). Возможная функция такой изомеризации связана с pH-зависимым связыванием и высвобождением лигандов [Carter & Ho, 1994].

Средняя молярная масса нативного БСА при комнатной температуре составляет $6,6 \times 10^4$ г/моль, гидродинамический диаметр равен примерно 7 нм [Yohannes, et al., 2010; Atmeh, et al., 2007].

При нагревании α -спиральная структура БСА разрушается и образуются β -слои. При повышении температуры до 75 °C структура меняется на $\alpha+\beta$, состоящую из отдельных участков α - и β -структуры [Antonov & Wolf, 2005]. Известно [Kuznetsov, et al., 1975; Lin & Koenig, 1976], что при нагревании сывороточный альбумин проходит через две стадии изменения структуры. Первая стадия обратима, вторая необратима, хотя может и не приводить к полному разрушению структуры. Эксперименты по КД показали, что при температуре выше температуры плавления обратимые и необратимые изменения происходят синхронно. Денатурацию БСА в водном растворе можно наблюдать начиная с 50° C. Необратимая денатурация сывороточного альбумина при температуре выше 50° C связана с разрушением α -спиралей и появлением β -структур [Wetzel, et al., 1980; Shanmugam & Polavagaru, 2004]. Обратимое изменение происходит очень быстро, необратимое – в течение секунд [Vaiana, et al., 2004; Fu, et al., 2011]. При наступлении стадии необратимой денатурации разворачивается карман, содержащий сульфгидрильную группу Cys-34, происходит формирование дисульфидных сшивок [Antonov & Wolf, 2005].

Тепловая денатурация БСА кооперативна, существует по крайней мере одно промежуточное состояние, и ее нельзя описать одностадийным переходом (моделью двух

состояний) [Antonov & Wolf, 2005; Barone, et al., 1995]. $T_{\max} = 64,5$ °C при pH 5,3 [Antonov & Wolf, 2005], 62 °C при pH 6,7 [Ruegg, et al., 1977], 61,5 °C при pH 6,0 [Kosa, et al., 1998]. Конформационные изменения по данным ДСК начинаются при 58,1 °C (pH 8) [Poole, et al., 1987].

Изучение тепловой денатурации БСА в 0,1 М NaCl в широком диапазоне pH от 3,51 до 10,01 [Yamasaki, et al., 1990] показало, что T_{\max} и форма пиков зависит от pH. Термостабильность БСА зависит от содержания жирных кислот в молекуле белка [Michnik, et al., 2005]. Обезжиренный альбумин подвергается двухфазной денатурации в водных растворах. Вероятнее всего, два пика соответствуют плавлению структурно независимых частей молекулы, которые образуются после формирования полости (crevice) в молекуле альбумина. Гипотеза: С-концевой фрагмент, состоящий из домена III и большей части домена II плавится при более низкой температуре. Второй, N-концевой фрагмент, состоящий из домена I и меньшей части домена II, разворачивается при более высокой температуре [Michnik, 2003]. При pH 7 первым разворачивается N-концевой домен I, после него – домены II и III при более высоких температурах [Giancola, et al., 1997]. Все эти результаты дают возможность предположить, что домены I и III вовлекаются в конформационные изменения в процессе разворачивания, и что на их конформацию влияет pH [Militello, et al., 2003; Militello, et al., 2004; Vetri, et al., 2007].

При нагревании 0,1% раствора БСА при 67°C в 0,1 М фосфатный буфер, pH 6,2 в течение 25 мин наблюдалось снижение соотношения α -спираль/ β -слой и формирование частично развернутого интермедиата. При последующем быстром охлаждении до 4°C КД-спектр не менялся, подтверждая стабильность конформации интермедиата. Радиус этой формы (39 Å) близок к таковому для нативного белка (37 Å) при всех температурах [Bulone, et al., 2001].

При изучении влияния слабокислых условий на агрегацию БСА было обнаружено существование при pH 4,2 (F-форма) димера, без примеси крупных дисульфидно сшитых агрегатов. Модификация цистеина-34 реагентами с длиной цепочки более 6 Å (это глубина кармана, где расположен Cys-34), предотвращала димеризацию, следовательно, в димеризации играет роль окружение этого цистеина и сам он тоже. Формирование димеров также играет роль в тепловой агрегации, те же реагенты, что предотвращали димеризацию, ингибировали тепловую агрегацию [Brahma, et al., 2005]. Например, малеимид ковалентно связывается с цистеином-34 и ингибирует агрегацию. Похоже, что домен I, в котором расположен этот цистеин, играет ключевую роль в агрегации. Его модификация не позволяет формировать ковалентную связь [Militello, et al., 2003].

Ветри с соавторами [Vetri, et al., 2011] была предложена общая схема различных путей агрегации БСА (рис. 1.4). При рН, близких к рI, вследствие отсутствия электростатического отталкивания, за счет неспецифических, в основном, гидрофобных взаимодействий, образуются аморфные агрегаты. При более щелочных рН усиление отталкивания между молекулами замедляет агрегацию, делая более выгодной перестройку молекул и образование агрегатов на основе β -структур.

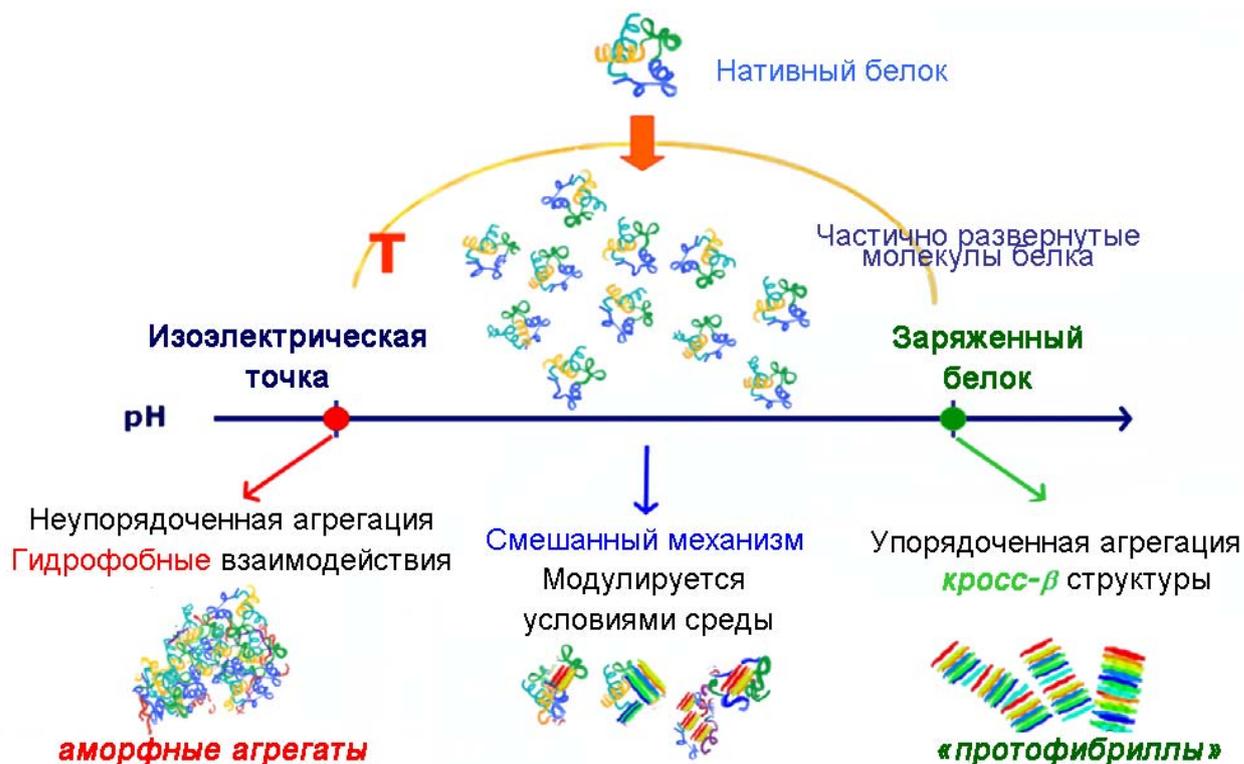


Рис. 1.4. Схема путей агрегации БСА. Повышение температуры вызывает частичное разворачивание нативной структуры белка. При различных рН процесс агрегации может протекать по пути формирования аморфных агрегатов или по пути образования амилоидоподобных фибрилл [Vetri, et al., 2011].

Механизм агрегации БСА определяется рН, скорость процесса зависит от температуры. При рН 4,7 наблюдался быстрый рост агрегатов в первые 20 минут, далее следовала более медленная фаза. При рН 5,7, наоборот, начальная фаза была медленной, последующая — быстрой. Заметных изменений во вторичной структуре БСА не происходило. Таким образом, в данном случае можно исключить агрегацию через формирование межмолекулярных β -слоев и наличие стадии нуклеации. Преобладает взаимодействие между экспонированными гидрофобными участками, приводящее к формированию неупорядоченных агрегатов [Vetri, et al., 2007]. При низких рН и высокой концентрации белка частично свернутые конформеры ассоциируют с формированием олигомеров, которые превращаются в упорядоченные амилоидоподобные фибриллы при инкубации при повышенной температуре [Bhattacharya, et al., 2011].

При тепловой агрегации БСА при рН 8,9 (62 °С) происходит увеличение электростатического отталкивания, что приводит к дестабилизации белка, изменению внутри- и межмолекулярных взаимодействий и агрегации в фибриллы, стабилизированные межмолекулярными β -слоями. Методом атомно-силовой микроскопии показано формирование вытянутых олигомеров на начальных стадиях инкубации (4 часа), через 20 часов образуются тонкие фибриллы. Наблюдается образование упорядоченных, межмолекулярных β -структур, «синий сдвиг» триптофановой флуоресценции, и снижение ее интенсивности, то есть, изменение третичной структуры при агрегации [Vetri, et al., 2011].

Отдельно следует рассмотреть тепловую агрегацию БСА при рН, близких к нейтральному значению. При агрегации БСА в 0,1 М фосфатном буфере, рН 6,2 наблюдалось образование агрегатов без лаг-периода [Militello, et al., 2004]. Выше 65 °С БСА в концентрации 10 мг/мл, 10 мМ фосфатный буфер рН 7,0, подвергался тепловой агрегации, сопровождавшейся разворачиванием вторичной структуры, разрушением третичной структуры и заметным снижением электростатического отталкивания [Su, et al., 2008].

Тепловая агрегация БСА в концентрации 1 и 2,5 мг/мл при рН 7,4 была изучена методом фракционирования в асимметричном потоке [Yohannes, et al., 2010]. Показано образование после прогревания в течение 1 часа при 80 °С агрегатов массой $1,2 \times 10^6$ и $1,9 \times 10^6$ г/моль, соответственно. При 50 °С и 60 °С наблюдались только мономер и димер, при 63 °С появлялся третий пик, соответствовавший, по предположению авторов, развернутой форме белка. При 65 °С, 70 °С и 75 °С мономер и димер еще наблюдались, но формировались более крупные агрегаты со средним диаметром 15, 17 и 22 нм, соответственно. При 80 °С димер исчезал, мономер еще присутствовал, средний диаметр агрегатов составлял 28 нм. При повышении концентрации белка увеличивался размер агрегатов, образовывался гель.

Имеются данные о том, что при тепловой агрегации БСА (в концентрации 1-5 мг/мл, 20 мМ трис-НСl, рН 7,4) образуются короткие фибриллы с амилоидоподобной структурой [Holm, et al., 2007]. Они связывают фибрилоспецифичные красители ThT и конго красный, имеют вытянутую червеобразную форму и характерное для амилоидов рентгеновское рассеяние. Фибрилляция протекает без лаг-периода, независима от добавления зародышей и слабо зависит от концентрации, что предполагает формирование внутримолекулярных ядер агрегации. В агрегатах возрастает содержание β -слоев до 40%, однако все равно сохраняется остаточное количество α -спиральной структуры и отсутствует устойчивость к протеазам. Эти агрегаты не повышают проницаемость синтетических мембран и не

цитотоксичны (последнее может объясняться неклассической структурой). По всей вероятности, агрегаты сохраняют стабильность за счет β -структурного «шва», окруженного относительно неупорядоченной α -спиральной структурой. Эти спиральные домены служат стерическими блокаторами формирования агрегатов более высокого порядка.

Обработка молекул БСА дитиотреитолом восстанавливает S-S-связи до -SH-групп [Ueki, et al., 1985]. В результате α -спиральная структура нарушается и после разворачивания формируется β -структура [Wang & Chen, 2010]. Ни одна из дисульфидных связей БСА не доступна для восстанавливающих агентов в интервале pH 5-7, тогда как при pH от 7 до 10 приблизительно пять дисульфидных связей становятся доступны для восстановления [Katchalski, et al., 1957]. При повышении температуры от 35 до 55 °C, число восстановленных дисульфидных связей также возрастает [Davidson & Hird, 1967].

1.3. Альфа-лактальбумин (ЛА)

α -Лактальбумин – небольшой (14,2 кДа), кислый (pI = 4-5), Ca^{2+} -связывающий белок молока [Permyakov & Berliner, 2000]. α -Лактальбумин коровьего молока состоит из 123 аминокислотных остатков, гомологичен по последовательности семейству лизоцима [Nitta & Sugai, 1989]. Нативный ЛА (рис. 1.5) состоит из двух доменов: большой α -спиральный домен и маленький β -листовой домен, которые соединены кальций-связывающей петлей. α -Спиральный домен состоит из трех главных α -спиралей и двух коротких 3_{10} -спиралей. Малый домен состоит из серий петель, маленького трехполосного антипараллельного β -складчатого листа и короткой 3_{10} -спирали. Два домена разделены глубокой щелью, но удерживаются вместе дисульфидным мостиком между остатками 73 и 91, формирующим Ca^{2+} -связывающую петлю. Второй важный дисульфидный мостик 61-77 также соединяет домены. Всего структура ЛА стабилизирована четырьмя дисульфидными связями (6-120, 61-77, 73-91 и 28-111) [Permyakov & Berliner, 2000].

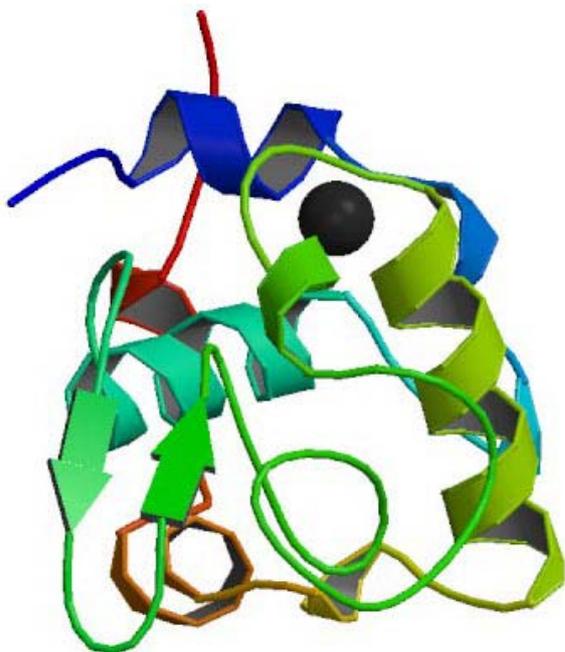


Рис. 1.5. Структура холо- α -лактальбумина коровьего молока [Pike, et al., 1996]. Черным цветом показан Ca^{2+} .

α -Лактальбумин выполняет важную функцию в молочных железах: это один из двух компонентов лактозосинтазы, которая катализирует последний этап биосинтеза лактозы в молочных железах при лактации [Hill & Brew, 1975].

Одной из наиболее интересных особенностей ЛА является его способность связывать катионы металлов. ЛА не относится к семейству «EF-hand»-белков. Петля из 10 аминокислотных остатков, пересекающая щель в структуре белка, прочно связывает Ca^{2+} [Stuart, et al., 1986; Acharya, et al., 1989; Acharya, et al., 1991], и предполагается, что она играет роль во взаимном расположении доменов. Высокоаффинный Ca^{2+} -связывающий сайт располагается в месте соединения субдоменов и состоит из участка цепи (остатки 79-88), соединяющего 3_{10} -спираль β -субдомена (остатки 77-80) и спираль НЗ спирального субдомена (остатки 86-98). Лигандами для Ca^{2+} выступают карбоксильные группы трех остатков Asp (82, 87 и 88) и двух карбонильных групп пептидного остова (79 и 84) в петле между двумя спиральями. Петли содержат на два остатка меньше, чем типичные Ca^{2+} -связывающие «EF-hand»-домены. Дополнительно две молекулы воды участвуют в прямой координации иона Ca^{2+} . Все кислородные лиганды формируют неправильную пятиугольную бипирамидную структуру [Chrysina, et al., 2000; Stuart, et al., 1986; Permyakov & Berliner, 2000].

В человеческом ЛА обнаружен вторичный сайт связывания кальция, на расстоянии 7,9 Å от первичного сайта прочного связывания. В координацию Ca^{2+} в этом сайте вовлечены четыре остатка, организованные в тетраэдр (Thr-38, Gln-39, Asp-83 и карбонильный кислород Leu-81) [Chandra, et al., 1998; Permyakov & Berliner, 2000]. ЛА также имеет несколько сайтов связывания цинка [Permyakov, et al., 1991].

Связывание Ca^{2+} с ЛА вызывает заметные изменения третичной структуры [Permyakov & Berliner, 2000]. Связывание кальция приводит к синему сдвигу триптофановой флуоресценции и снижению квантового выхода. По данным ДСК, связывание Ca^{2+} сдвигает тепловой переход в сторону более высоких температур более чем на 40 °С [Griko, et al., 1994]. В условиях стресса безкальциевая форма принимает состояние классической расплавленной глобулы [Kuwaitima, 1996]. В отсутствие Ca^{2+} денатурированный ЛА с интактными дисульфидными связями сворачивается медленно, процесс ускоряется на два порядка при связывании Ca^{2+} с интермедиатами фолдинга [Kuwaitima, et al., 1989].

Несмотря на отсутствие полного согласия, большинство авторов показали, что константа связывания находится в диапазоне $10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}$ [Permyakov, et al., 1981; Bryant & Andrews, 1984; Kuwaitima, et al., 1986; Desmet, et al., 1987; Vanderheeren, et al., 1996; Vanhooren, et al., 2002].

Предполагается [Vanderheeren, et al., 1996], что высвобождение Ca^{2+} даже при высокой температуре (65 °С) происходит только после частичного разворачивания ЛА. С этим предположением согласуется то, что производные ЛА с меньшим количеством дисульфидных связей способны связывать Ca^{2+} и сохранять свернутую структуру β -домена, даже в отсутствие нативной структуры α -домена [Hendrix, et al., 1996; Wu, et al., 1996].

При изучении восстановленных форм ЛА было показано, что форма, содержащая три дисульфидные связи, с восстановленной и карбоксиметилированной связью Cys6-Cys120, сходна с интактным ЛА по вторичной и третичной структуре. Форма с двумя дисульфидными связями, в которой восстановлены и карбоксиметилированы Cys6-Cys120 и Cys28-Cys111, сохраняет около половины вторичной и третичной структуры интактного ЛА. Оставшаяся структура способна связывать кальций и кооперативно разворачивается при нагревании, хотя и при более низкой температуре, и с более низкой энтальпией и энтропией. Предполагается, что в этой форме ЛА сохраняет Ca^{2+} -связывающий β -домен, тогда как α -домен разворачивается [Hendrix, et al., 1996].

Кинетика восстановления дисульфидных связей в интактном ЛА двухфазная. Дисульфидная связь 6-120 восстанавливается в быстрой фазе, три других связи – в медленной. Эта связь в 140 раз более реакционноспособна, чем обычные дисульфиды в полностью доступном состоянии. Изучение геометрии дисульфидной связи показывает, что суперреактивность вызывается геометрическим напряжением связи при сворачивании в нативную структуру [Gohda, et al., 1995; Kuwaitima, et al., 1990]. Полностью восстановленный ЛА принимает форму расплавленной глобулы, которая агрегирует и

преципитирует [Carver, et al., 2002]. В холо-ЛА дисульфидные связи менее доступны для ДТТ из-за стабилизации белка связанным ионом кальция, восстановление протекает гораздо медленнее [Carver, et al., 2002].

При изучении ДТТ-индуцированной агрегации ЛА [Bumagina, et al., 2010b] было показано, что разворачивание молекулы происходит сразу после добавления ДТТ. Таким образом, скорость-лимитирующая стадия – слипание развернутых молекул. Агрегация ЛА протекает с формированием стартовых агрегатов, их гидродинамический радиус был найден равным 80–100 нм. При низких концентрациях α -лактальбумина (0,2–0,8 мг/мл) зависимости гидродинамического радиуса (R_h) частиц от времени экспоненциальны, агрегация протекает в режиме RLCA. Накопление стартовых агрегатов приводит к резкому ускорению агрегации. В определенный момент времени агрегация переходит в DLCA-режим, поскольку вероятность столкновения и слипания больших частиц повышается. Необходимо отметить, что вышеописанные результаты получены при изучении агрегации апо-ЛА, однако, не существует данных, позволяющих предположить изменения в механизме агрегации при связывании Ca^{2+} .

1.4. Глутаматдегидрогеназа (ГД)

Глутаматдегидрогеназа из печени быка (ЕС 1.4.1.3), как и у других млекопитающих, является гомогексамером с массой субъединицы около 56 кДа. Она катализирует окислительное дезаминирование L-глутамата до α -кетоглутарата. Глутаматдегидрогеназа из печени быка может использовать в качестве кофермента как NAD^+ , так и NADP^+ :



Основа структуры фермента (рис. 1.6) – это димер, сложенный из двух тримеров, соединенных N-концевыми «глутамат-связывающими» доменами, имеющими в основном β -структуру. Сверху этих доменов располагаются NAD-связывающие домены, которые вращаются вокруг так называемой осевой спирали, способствуя сближению субстрата и кофермента. В отличие от бактериальной ГД, у фермента животных имеется антенна, насчитывающая 48 аминокислотных остатков и расположенная сверху от NAD-связывающего домена. Антенны трех субъединиц в составе тримера оборачиваются друг вокруг друга и подвергаются конформационным изменениям при открытии и закрытии каталитической полости [Smith, et al., 2002].

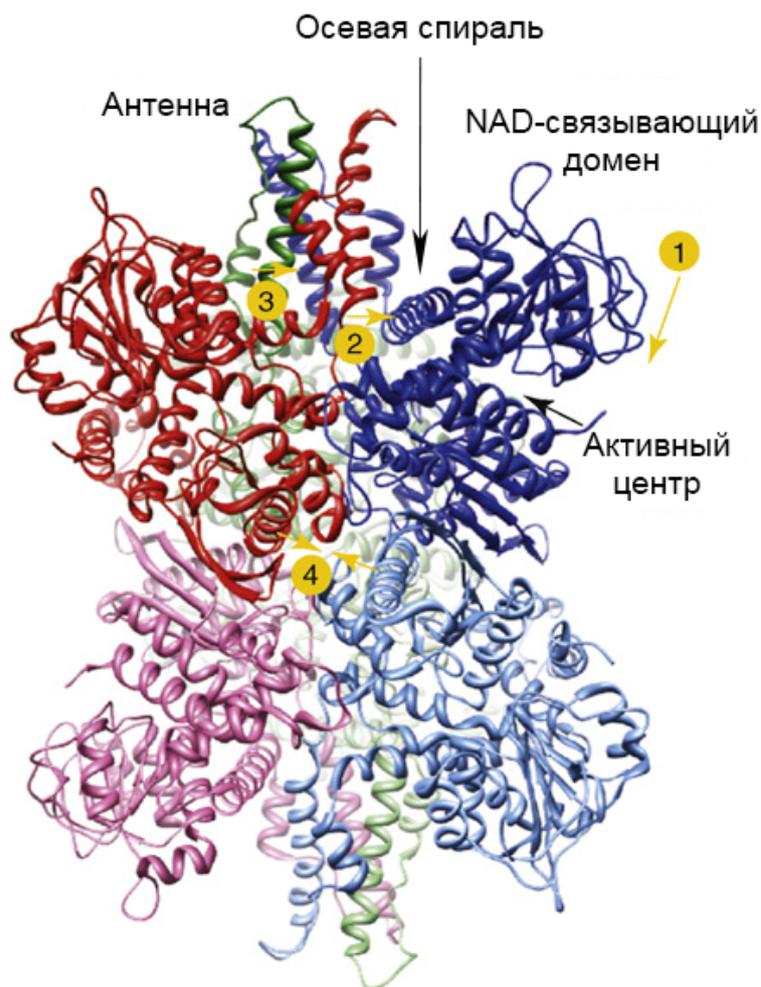


Рис. 1.6. Структура бычьей аспаратдегидрогеназы [Smith & Stanley, 2008]. Стрелками указаны направление закрытия активного центра (1), направление поворота осевой спирали (2), направление поворота антенны (3) и межсубъединичный интерфейс (4). Все субъединицы в составе гексамера показаны разными цветами.

Глутаматдегидрогеназа, в отличие от многих других белков, образует обратимые ассоциаты в форме цепочек [Olson & Anfinsen, 1952; Frieden, 1958], однако, каталитические свойства фермента не зависят от ассоциации [Fisher, et al., 1965]. ADP является агонистом процесса ассоциации, тогда как NADH и GTP – антагонистами [Frieden, 1959a; Frieden, 1959b; Colman & Frieden, 1966]. Большинство контактов между гексамерами осуществляет антенная область. В апоформе антенна одного гексамера контактирует с антенной и верхней частью NAD-связывающего домена другого [Banerjee, et al., 2003].

Шафер с соавторами [Shafer, et al., 1972] показали, что NADH связывается со стехиометрией 7-8 молекул на гексамер. Глутамат и GTP увеличивают сродство к NADH и повышают стехиометрию до 12 молекул на гексамер [Koberstein & Sund, 1973]. Показано, что NAD(H) имеет второй сайт связывания в каждой субъединице. Так как GTP и NADH связываются синергично и GTP связывается только с закрытой конформацией, можно предположить, что NAD(H) в основном связывается со вторым сайтом кофермента, когда каталитическая щель закрыта [Smith, et al., 2001; Smith, et al., 2002]. Восстановленный кофермент в этом сайте ингибирует прямую реакцию [Frieden, 1959a;

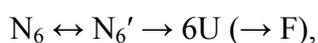
Frieden, 1959b], тогда как связывание окисленного – активирует ее [Bayley & O'Neil, 1980]. Вторая молекула NADH связывается в том же участке, где расположен сайт для ADP [Banerjee, et al., 2003], но показано, что она ингибирует фермент [Malcolm, 1972; Koberstein & Sund, 1973; Saradambal, et al., 1981; Schmidt & Colman, 1984]. NAD⁺ вызывает активацию ГД, связываясь в сайте для ADP. Это согласуется со спектроскопическими данными, из которых следует, что связывание NAD⁺ во втором сайте индуцирует конформационные изменения, близкие к таковым при связывании ADP [Bayley & O'Neil, 1980]. Таким образом, окислительно-восстановительное состояние кофермента, связанного со вторым сайтом определяет, активирует он реакцию или ингибирует [Banerjee, et al., 2003].

Два основных противодействующих аллостерических регулятора, ADP и GTP, действуют через формирование нереакционноспособных комплексов [NAD(P)H·GLU и NAD-(P)·αKG] [Frieden, 1965; George & Bell, 1980]. ADP является активатором и действует путем дестабилизации этих комплексов [Frieden, 1965; George & Bell, 1980; Bailey, et al., 1982]. Напротив, GTP – сильный ингибитор, который действует через стабилизацию вышеописанных комплексов [Iwatsubo & Pantaloni, 1967]. Связыванию GTP противодействует ADP [Dieter, et al., 1981], но оно синергично со связыванием NADH в некаталитическом сайте [Koberstein & Sund, 1973]. Известно, что GTP связывается с помощью трифосфатного остатка, так как GMP и GDP не влияют на активность ГД [Smith, et al., 2002]. ADP, напротив, связывается за счет пуринового кольца [Banerjee, et al., 2003], и предполагается, что оказывает активирующее действие через взаимодействие фосфата с остатком лизина в осевой спирали [Allen, et al., 2004]. Было установлено, что GTP связывается в области между NAD-связывающим доменом и антенной [Smith, et al., 2001]. Сайт связывания ADP находится у основания NAD-связывающего домена под осевой спиралью [Smith & Stanley, 2008]. ADP облегчает открытие каталитической щели [Li, et al., 2007; Smith, et al., 2001; Banerjee, et al., 2003]. ADP усиливает взаимодействие антенны одного гексамера с антенной и NAD-связывающим доменом другого. Связывание GTP стабилизирует закрытую конформацию, в которой NAD-связывающий домен недоступен для взаимодействия. При удалении антенны генно-инженерными методами активация ADP и ингибирование GTP исчезают [Allen, et al., 2004], хотя антенна и не вовлечена напрямую в связывание GTP или ADP.

Согласно имеющимся данным [Tomkins, et al., 1961], L-лейцин стимулирует окисление глутамата, а не обратную реакцию. Гершко и Киндлер [Hershko & Kindler, 1966] показали, что пуриновые нуклеотиды и монокарбоновые аминокислоты связываются с различными аллостерическими сайтами, так как химически различные

активаторы (L-лейцин и ADP) синергично увеличивают активность. Кроме того, лейцин – альтернативный аминокислотный субстрат для ГД [Struck & Sizer, 1960; Markau & Steinhubel, 1972]. Окисление лейцина происходит в том же активном центре, что и глутамата. Показано конкурентное ингибирование окислительного дезаминирования глутамата 100 мМ лейцином [Markau & Steinhubel, 1972], что поддерживает гипотезу об одном и том же активном центре. Тот факт, что лейцин может повышать активность по глутамату даже когда все сайты модифицированы пиридоксаль-5'-фосфатом, говорит о том, что лейцин имеет дополнительный регуляторный сайт [Syed & Engel, 1984].

L-глутаматдегидрогеназа подвергается денатурации по механизму гексамер→тример→мономер [Inoue, et al., 1984]. Установлено, что тепловая денатурация ГД необратима и кинетически контролируется одной скоростью-лимитирующей стадией, в которой не происходит диссоциации гексамера. Предложена модель денатурации ГД:



где N_6 и N_6' – нативный гексамер и гексамерный интермедиат разворачивания, соответственно, U – развернутый мономер и F – конечное агрегированное состояние белка. Первая стадия скорость-лимитирующая, приводит к частичной потере нативной структуры и ей соответствует большая часть общей теплоты денатурации. Вторым этапом – быстрая диссоциация и потеря нативной структуры без какого-либо существенного теплопоглощения. Тепло поглощается только при переходе ГД в «расплавленную глобулу», последующие шаги сопровождаются только изменением энтропии. С течением времени наблюдается резкое уменьшение размеров частиц, вероятно, соответствующее диссоциации гексамера на мономеры. Это подтверждает гипотезу о том, что диссоциация следует за плавлением.

Вероятные этапы теплового разворачивания ГД:

- 1) частичное разворачивание домена II или ADP-связывающего регуляторного сайта;
- 2) синхронная диссоциация и разворачивание субъединиц;
- 3) агрегация развернутых полипептидов.

Эта последовательность объясняет отсутствие концентрационной зависимости по белку и ADP-индуцированную стабилизацию. Энергия активации для денатурации комплекса ГД-ADP значительно выше, чем для белка. ADP увеличивает температуру предденатурационного перехода с 43 °С до 56 °С. Комплекс ГД-NADPH более термолабилен, чем свободный белок или комплекс с ADP [Singh, et al., 1996].

Было показано [Sabbaghian, et al., 2009], что взаимодействие малых молекул (коферментов, аллостерических эффекторов) с глутаматдегидрогеназой из печени быка приводит к изменениям в характере ее тепловой агрегации. NADH вызывал ускорение

агрегации, тогда как ADP нивелировал этот эффект и приводил к подавлению агрегации. NAD^+ также обладал антиагрегационным влиянием. В присутствии GTP наблюдалось слабое ускорение агрегации, L-лейцин подавлял агрегацию ГД. Однако, количественной оценки вышеописанных эффектов и сравнения данных с влиянием на термостабильность фермента проведено не было.

1.5. Альфа-кристаллин

α -Кристаллин – белок хрусталика глаза, относящийся к семейству малых белков теплового шока (small heat shock proteins, sHSPs) [Merck, et al., 1993]. sHSPs характеризуются низкой молекулярной массой субъединиц, их сборкой в полидисперсные олигомеры и наличием консервативного α -кристаллинового домена [Van Montfort, et al., 2001a; Horwitz, 2003; Haslbeck, et al., 2005].

α -Кристаллин состоит из субъединиц двух типов: αA (173 аминокислотных остатка) и αB (175 аминокислотных остатков) (рис. 1.7) массой около 20 кДа [Spector, et al., 1976; Swamy & Abraham, 1991].

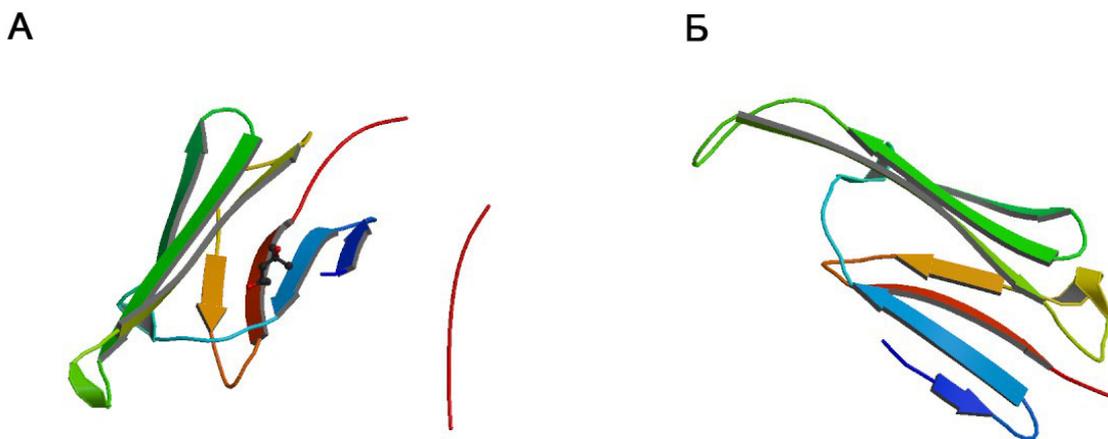


Рис. 1.7. Структура мономеров бычьего αA -кристаллина [Laganowsky, et al., 2010] (А) и человеческого αB -кристаллина [Bagneris, et al., 2009] (Б).

Субъединицы αA и αB имеют 57% гомологии последовательности [Van der Ouderaa, et al., 1974] и образуют крупные гетерогенные комплексы массой 600-800 кДа [Thampi, et al., 2002; Bloemendal, et al., 2004]. В хрусталиках большинства позвоночных αA - и αB -субъединицы содержатся в соотношении 3:1, хотя оно может варьировать видоспецифично и с возрастом [Spector, et al., 1976; Swamy & Abraham, 1991; Bloemendal, et al., 2004]. sHSPs АТФ-независимы, связывают и удерживают развернутые белки [Horwitz, 1992; Jakob, et al., 1993; Merck, et al., 1993]. Емкость связывания (стехиометрия)

зависит от природы белка-мишени [Friedrich, et al., 2004; Basha, et al., 2006]. В хрусталике α -кристаллин выполняет роль молекулярного шаперона – он предотвращает накопление склонных к агрегации белков хрусталика [Horwitz, 1992; Horwitz, 2000].

α A- и α B-кристаллины имеют разное тканевое распределение. α A-кристаллин расположен в основном в хрусталике, а также в сетчатке [Xi, et al., 2003; Rao, et al., 2008; Yaung, et al., 2008]. α B-кристаллин экспрессируется в следующих тканях и органах: хрусталике (в наибольшем количестве), сетчатке, сердце, скелетных мышцах, почках, плаценте, коже, мозге, периферических нервах, спинном мозге и печени [Bhat & Nagineni, 1989; Iwaki, et al., 1989; Iwaki, et al., 1990; Lowe, et al., 1992; De Jong, et al., 1993; Inaguma, et al., 1995; Horwitz, et al., 1999].

Присутствие высококонсервативного α -кристаллинового домена (АКД) [Kappe, et al., 2010], окруженного N- и C-концевыми регионами характерно для sHSPs. В sHSPs дикого типа АКД имеют β -листовую структуру и образуют антипараллельные гомодимеры, в которых интерфейс преимущественно состоит из длинного листа $\beta_6 + 7$, то есть отвечают за самый нижний уровень самоорганизации [Bagneris, et al., 2009; Laganowsky, et al., 2010]. C-конец имеет неупорядоченную структуру, последовательность остатков на самом конце гидрофильна [Aquilina, et al., 2005] и свободно плавает в растворе [Carver, et al., 1992; Carver & Lindner, 1998]. C-конец содержит IXI/V-мотив – участок с чередующимися остатками изолейцина/валина, который отвечает за межмолекулярное взаимодействие: IXI/V одного димера связывается с АКД другого. Это взаимодействие определяет более высокие уровни самоорганизации [Trewick, et al., 2010]. N-концевой регион – наиболее разнообразный регион sHSPs по длине и последовательности [Kim, et al., 1998; Taylor & Benjamin, 2005]. N-концы существуют во множественных взаимопревращающихся конформациях, их невозможно описать одной структурой или в одном уникальном окружении [Delbecq & Klevit, 2013]. N-концы в основном отвечают за сборку олигомеров и, вероятно, обеспечивают целостность всего комплекса [Kim, et al., 2003]. Такая гетерогенность может обуславливать связывание различных белков-мишеней [Jaya, et al., 2009].

Предполагаемые сайты связывания белков-мишеней в α -кристаллине ассоциированы с β_3 и β_4 -листами альфа-кристаллинового домена и образуют гидрофобную бороздку, взаимодействующую с C-концом соседней субъединицы [Van Montfort, et al., 2001b].

Четвертичная структура α -кристаллина в физиологических условиях характеризуется относительно быстрым обменом субъединиц и конформационной гибкостью протомеров [Vanhoudt, et al., 2000]. Структуру α -кристаллина описывают как распределение олигомеров из 24–33 субъединиц, основной тип содержит 28 субъединиц.

Наблюдались более мелкие олигомеры (10 субъединиц) и более крупные (40-50 субъединиц). Установить точную молекулярную массу и величину молекулы α -кристаллина не представляется возможным [Aquilina, et al., 2003; Baldwin, et al., 2011].

Предложено несколько моделей олигомерной структуры α -кристаллина, например, трехслойная [Siezen & Hoenders, 1979; Tardieu, et al., 1986], мицеллоподобная/двуслойная [Walsh, et al., 1991; Carver, et al., 1994; Augustein & Stevens, 1998], додекаэдрическая/октаэдрическая [Groenen, et al., 1994; Morris & Aquilina, 2010], сфера с углублениями [Smulders, et al., 1998] и полая сфера/эллипс с отростками [Vanhoudt, et al., 2000]. Путем моделирования показано, что α -кристаллин хрусталика глаза быка в растворе представляет собой полую сферу диаметром 169 Å, имеющую отверстия [Regini, et al., 2007].

Общим для sHSPs является наличие димеров в качестве «строительных блоков» более крупных олигомеров [Van Montfort, et al., 2001a; Haslbeck, et al., 2005]. Предполагается, что димеры – активные «шаперонные единицы» sHSPs [Van Montfort, et al., 2001a]. Димерная структура α -кристаллина дикого типа подтверждается избытком олигомеров с четным числом субъединиц (по данным тандемной масс-спектрометрии). α -Кристаллин дикого типа αA и αB – комбинация форм от олигомеров с мономерной субструктурой до четных олигомеров с димерной субструктурой, существует равновесие между этими двумя состояниями. Нарушение димерной субструктуры sHSPs и формирование мономерных олигомеров приводит к изменению шапероноподобной активности. В мономерной субструктуре больше экспонированы гидрофобные поверхности, и олигомеры с преобладающей мономерной субструктурой более активны, однако при полном переходе в форму с мономерной субструктурой возможна копреципитация α -кристаллина с белком-мишенью [Aquilina, et al., 2003]. Таким образом, олигомеры sHSPs существуют в двух состояниях – с высоким сродством и низким сродством к белку мишени [Gupta & Srivastava, 2004; Haslbeck, et al., 2005]. Соотношение этих двух типов субструктуры обуславливает общую шаперонную активность [Benesch, et al., 2008].

Обмен субъединицами – еще одно общее свойство олигомеров sHSPs [Bova, et al., 1997; Bova, et al., 2000; Painter, et al., 2008]. Данные о значении динамичности четвертичной структуры α -кристаллина для шапероноподобной активности противоречивы. Показано, что для проявления шаперонной функции α -кристаллина обмен субъединицами не обязателен. Бычий α -кристаллин, сшитый глутаровым альдегидом для минимизации внутримолекулярных реакций, оказывается способным ингибировать тепловую агрегацию β_L -кристаллина более эффективно, чем нативный при тех же

условиях [Augusteyn, 2004]. Хорвитц с соавторами [Horwitz, et al., 2004] показали, что нативное олигомерное состояние α -кристаллина не является необходимым для его способности подавлять неспецифическую агрегацию, поскольку полученные сшиванием тетрамеры α -кристаллина обладали той же самой шапероноподобной активностью, как и нативный олигомерный α -кристаллин. По другим данным [Sharma & Ortwerth, 1995] сшитый кристаллин обладает сниженной активностью.

Способность α -кристаллина подавлять тепловую агрегацию белков растет с повышением температуры [Wang & Spector, 1994]. При повышении температуры количество мономеров в олигомере меняется вследствие температурно зависимого обмена мономерами [Bova, et al., 1997]. α -Кристаллин подвергается двум структурным перестройкам при повышении температуры. Структурная перестройка при 30–40 °С ведет к усилению активности за счет увеличения и реорганизации гидрофобных субстрат-связывающих поверхностей [Rao, et al., 1998; Burgio, et al., 2000]. Эта перестройка включает в себя слабые изменения третичной структуры и реорганизацию четвертичной структуры в гетероагрегатах [Raman & Rao, 1997]. Вторая перестройка происходит около 55-62 °С [Surewicz & Olesen, 1995; Khanova, et al., 2005] и приводит к дополнительному экспонированию гидрофобных поверхностей.

Обычно α -кристаллин не влияет на термостабильность белков, иногда их стабилизирует. Например, α -кристаллин замедляет тепловую инактивацию цитратсинтазы из сердца свиньи [Rajaraman, et al., 2001], каталазы [Hook & Harding, 1997], сорбитолдегидрогеназы из печени овцы [Marini, et al., 2000], рестриктазы Nde I [Hess & Fitzgerald, 1998] и урацил-ДНК-гликозилазы *Chlamydia pneumoniae* [Zhang, et al., 2005]. В некоторых случаях наблюдалась дестабилизация белков α -кристаллином, например, ГАФД [Khanova, et al., 2007], митохондриальной аспаратаминотрансферазы [Markossian, et al., 2009a], Phb [Meremyanin, et al., 2008].

С α -кристаллином связывается только частично или полностью развернутый белок, склонный к агрегации [Rajaraman, et al., 1996]. Защитный эффект α -кристаллина при тепловой агрегации белков выражается в переходе кинетического режима процесса агрегации от DLCA к RLCA и снижении вероятности слипания частиц [Markossian, et al., 2009b; Golub, et al., 2009]. α -Кристаллин включается в растущие агрегаты β_L -кристаллина, уменьшение размера стартовых агрегатов говорит о том, что включение в агрегаты происходит уже на стадии нуклеации. Такие стартовые агрегаты слипаются с меньшей скоростью, наблюдается переход в RLCA-режим [Khanova, et al., 2005].

α -Кристаллин концентрационно-зависимо подавляет ДТТ-индуцированную агрегацию ЛА при 37 °С. После разворачивания ЛА, формируются его комплексы с

кристаллином, $R_h = 17,6$ нм [Bumagina, et al., 2010b]. Уже сформировавшиеся стартовые агрегаты размером 80-100 нм разрушаются при добавлении шаперона. Образуются мелкие частицы с R_h 30–50 нм, которые демонстрируют дальнейшую агрегацию только при низких концентрациях α -кристаллина [Smirnova, et al., 2013a]. Распределение частиц, полученное методом динамического светорассеяния, показывает, что комплекс ЛА– α -кристаллин – неплотное глобулярное образование [Bettelheim, et al., 1999]. С нативным ЛА кристаллин не связывается. В комплексах α -ЛА – α -кристаллин наблюдается красный сдвиг флуоресценции (по сравнению с суммой спектров обоих белков), т.е., менее компактная структура, чем у исходных белков. Комплексы ЛА– α -кристаллин динамичны, лактальбумин может адсорбироваться и десорбироваться, постепенно на поверхности могут образовываться ядра из молекул ЛА. Они действуют как точки роста агрегатов [Bumagina, et al., 2010b].

Была предложена следующая модель комплекса ЛА– α -кристаллин: α -кристаллин составляет центральное ядро комплекса, молекулы ЛА окружают его [Bettelheim, 2002]. Гидродинамический радиус и сферическая форма олигомеров α В-кристаллина почти не меняется при образовании комплексов с ЛА. Белок-мишень располагается на внешней поверхности олигомера α В-кристаллина, где он доступен для возможного рефолдинга другими молекулярными шаперонами [Regini, et al., 2010].

α -Кристаллин не влияет на кинетику восстановления дисульфидных связей в апо-ЛА, но стабилизирует расплавленную глобулу [Carver, et al., 2002]. Предполагается, что α -кристаллин взаимодействует с неупорядоченной расплавленной глобулой ЛА, которая склонна к необратимой агрегации и преципитации. α -Кристаллин не взаимодействует с расплавленной глобулой, которая стабильна в растворе, например, с восстановленным и карбоксиаминированным белком [Lindner, et al., 1997]. Существует кинетическая конкуренция между агрегацией развернутого ЛА и его взаимодействием с α -кристаллином [Lindner, et al., 2001]. После того, как комплекс насыщается лактальбумином, он высвобождает частично денатурированный ЛА, который может агрегировать в высокомолекулярные комплексы. Комплекс ЛА– α -кристаллин находится в динамическом равновесии как с мономерным, так и с агрегированным ЛА [Bettelheim, et al., 1999]. При рехроматографировании комплекса ЛА– α -кристаллин было показано наличие мономерного ЛА наряду с комплексом. Этот результат и эксперименты по равновесному диализу показали существование равновесия между мономерной частично денатурированной формой ЛА и комплексом, состоящим из ЛА и α -кристаллина [Neal, et al., 2001].

Другим примером взаимодействия белка-мишени с α -кристаллином может служить γ E-кристаллин, который при 65 °C [Clarke, et al., 2010] связывается шапероном и оказывается во внутренней полости олигомера.

α -Кристаллин способен подавлять не только аморфную агрегацию белков, но и амилоидообразование. В качестве примеров можно привести подавление формирования амилоидных фибрилл A β -(1–40) α B-кристаллином [Raman, et al., 2005]. Наблюдалось связывание α B-кристаллина с амилоидными фибриллами A β 42 [Shammas, et al., 2011] и предотвращение их дальнейшей элонгации.

В лаборатории структурной биохимии белка ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН проводилась оценка активности α -кристаллина в тест-системе на основе агрегации облученной Phb из скелетных мышц кролика. Двухфазный характер зависимости начальной скорости агрегации от концентрации кристаллина указывал на существование двух типов шаперон-субстратных комплексов, значительно различающихся сродством. Стехиометрия комплексов субстрата с α -кристаллином и α B-кристаллином была близка к 1 молекуле на 1 субъединицу кристаллина [Roman, et al., 2012].

1.6. Химические шапероны

Низкомолекулярные соединения, способные неспецифически предотвращать агрегацию белков, стабилизировать их структуру и облегчать рефолдинг получили название «химических шаперонов» [Papp & Csermely, 2006]. К химическим шаперонам относятся, например, некоторые сахара, полиамины и аминокислоты, такие как аргинин и пролин.

1.6.1. Аргинин

L-аргинин – одна из основных протеиногенных аминокислот, с pI около 10,8. Аргинин в растворе может находиться в заряженной или цвиттер-ионной форме. Молекула аргинина способна образовывать водородные связи за счет гуанидиновой, карбоксильной и аминогруппы. Аргинин используют для подавления агрегации, а также белок-белковых взаимодействий и взаимодействий белков с поверхностью при рефолдинге и выделении белков, создании медицинских препаратов белковой природы [Lange & Rudolph, 2009]. Аргинин стабилизирует белковые препараты при хранении [Tsumoto, et al., 2004]. Аргинин улучшает сольubilизацию из телец включения, конечный

выход при хроматографии и рефолдинге антител [Tsumoto, et al., 2005], гормонов роста норки и свиньи [Bajorunaite, et al., 2007; Cirkovas & Sereikaite, 2011], тетрамерной бета-галактозидазы [Fujimoto, et al., 2010], рекомбинантного человеческого гамма-интерферона [Aroga & Khanna, 1996] и рекомбинантного интерферона IFN β -1b [Fazeli, et al., 2014], рекомбинантного человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора [Zhao, et al., 2015], зеленого флуоресцентного белка [Tsumoto, et al., 2003]. Добавление аргинина увеличивало срок хранения препаратов интерферона [Fazeli, et al., 2014], облегчало солюбилизацию миозина [Takai, et al., 2013]. Аргинин селективно дестабилизировал мутантные, неправильно свернутые формы мембранного белка кинетопластид КМР-11, влияние на правильно свернутый белок было значительно меньше [Sharma, et al., 2013].

Влияние аргинина заключается в стабилизации и подавлении агрегации частично развернутых интермедиатов [Arakawa & Tsumoto, 2003; Tsumoto, et al., 2004; Reddy, et al., 2005; Arakawa, et al., 2007; Hamada, et al., 2009]. Аргинин не ускоряет кинетику сворачивания по продуктивному пути, не меняет разность между свободными энергиями свернутого и развернутого белков, то есть термодинамической стабилизации не происходит [Reddy, et al., 2005].

Аргинин как антиагрегационный агент эффективен при высоких концентрациях, что указывает на слабое взаимодействие с белками. Влияние слабозаимодействующих добавок, таких как аргинин, на растворимость, стабильность и агрегацию белков может быть объяснено с трех разных точек зрения [Arakawa, et al., 2007]:

- 1) влияние добавки на структуру воды (изменение поверхностного натяжения);
- 2) взаимодействие с боковыми цепями аминокислот и пептидным каркасом;
- 3) предпочтительные взаимодействия (preferential interactions) добавок с белками.

Аргинин увеличивает поверхностное натяжение воды [Kita, et al., 1994; Arakawa, et al., 2007], предпочтительно взаимодействует с большинством аминокислотных боковых цепочек и пептидными связями, как и GdnHCl [Arakawa, et al., 2007].

В основном влияние на агрегацию относят к взаимодействию с ароматическими аминокислотами. Наблюдалось взаимодействие гуанидиновой группы аргинина с остатками Trp, Tyr и Phe в белках в двух различных конформациях – параллельной и T-образной [Shah, et al., 2012]. Аргинин сильно взаимодействует с кислотными остатками (Asp и Glu) [Melo, et al., 1999]. Гуанидиновая группа может взаимодействовать сразу с двумя карбоксилатами, такие контакты могут вести к ускорению агрегации путем образования аргининовых мостиков [Shah, et al., 2011]. Гидрофобные и Ван-дер-

Ваальсовы взаимодействия делают предпочтительным параллельное, а не Т-образное расположение гуанидиновой группы [Mason, et al., 2007; Vondrásek, et al., 2009].

Моделирование взаимодействия аргинина с гидрофобными частицами фуллеренов, структура поверхности которых напоминает ароматические кольца, показало, что при связывании с гуанидиновыми группами, образуется слой сольватации вокруг частицы. Дальнейшая ассоциация аргинина с этим слоем еще больше затрудняет агрегацию. Аналогичное взаимодействие предполагается и для белков [Li, et al., 2010].

Методом моделирования молекулярной динамики показано взаимодействие аргинина с ароматическими и заряженными остатками на поверхности белка с помощью катион- π -взаимодействий и формирования солевых мостиков, соответственно [Shukla & Trout, 2010].

При проведении кристаллографических исследований взаимодействия аргинина с лизоцимом были найдены 3 молекулы аргинина поблизости от ароматических остатков на поверхности белка. Связывание аргинина увеличивалось с повышением концентрации и снижало доступную площадь поверхности ароматических остатков на 40%, для заряженных остатков эта площадь повышалась на 10%. Это может препятствовать агрегации [Ito, et al., 2011].

Добавки с высаливающим и стабилизирующим эффектом предпочтительно исключаются с поверхности нативного белка, всаливающие и дестабилизирующие – наоборот, предпочтительно связываются. Аргинин демонстрирует более сложное взаимодействие с белками [Arakawa, et al., 2007]. Современные данные о коэффициенте предпочтительного взаимодействия говорят о том, что этот коэффициент варьирует от нейтрального при низких концентрациях до сильного исключения при высоких [Schneider & Trout, 2009; Shukla & Trout, 2011]. Коэффициент предпочтительного взаимодействия изменяется по квадратичной зависимости от концентрации аргинина в растворе при низких концентрациях, и линейно – при высоких. Нелинейность этой зависимости отличает аргинин от других добавок (мочевина, глицерин, GdnHCl). Нелинейность может быть объяснена неравномерным распределением молекул аргинина между раствором и поверхностью белка. Когда все аргинин-связывающие сайты белка становятся насыщенными, и кластеризация в растворе становится постоянной, коэффициент предпочтительного взаимодействия начинает линейно зависеть от концентрации [Shukla & Trout, 2011].

Связывание аргинина с белками зависит от размера белковой молекулы. При концентрациях аргинина ниже 0,5 М (для БСА 0-0,3 М, по данным осмометрии) коэффициент предпочтительного взаимодействия для аргинина примерно равен нулю, то

есть не происходит предпочтительного связывания или исключения. При концентрациях выше 0,5 М аргинин предпочтительно исключен с поверхности белка. Это результат баланса между сродством аргинина к пептидному остову и некоторым аминокислотам и отталкиванием за счет поверхностного натяжения и исключенного объема [Arakawa, et al., 2007]. Это же может объяснять, почему аргинин не влияет на процесс фолдинга, но подавляет агрегацию.

Еще одной теорией, объясняющей влияние аргинина на агрегацию белков, является теория так называемого «эффекта промежутка» (“gap effect”). Она заключается в том, что при ассоциации двух молекул белка между ними формируется промежуток, слишком маленький для проникновения молекулы добавки, но достаточный для молекул воды. При этом увеличивается свободная энергия комплекса из-за исключения добавки из этого промежутка. Важным следствием такого феномена является то, что добавки, которые предпочтительно не связаны и не исключены, могут кинетически замедлять ассоциацию белков. Такие гипотетические молекулы называют «нейтральными краудерами» [Baynes & Trout, 2004], их поведение сравнимо с поведением аргинина, который является в этом смысле уникальной добавкой. Аргинин не меняет равновесие сворачивания большинства белков, но подавляет агрегацию, ингибируя белок-белковые взаимодействия. В экспериментах, проведенных Бэйнсом и Траутом, влияние гидрохлорида аргинина на ассоциацию, диссоциацию и агрегацию белков показало согласие с предсказаниями модели «эффекта промежутка» [Baynes, et al., 2005].

Дас с соавторами [Das, et al., 2007] предположили, что наличие алифатических $(\text{CH}_2)_3$ - групп в молекуле аргинина может играть роль в механизме его действия. В кристаллической структуре гидрохлорида L-аргинина молекулы аргинина связаны друг с другом с помощью водородных связей «голова – хвост», алифатические атомы углерода расположены вдоль оси кристалла (см. рис. 1.9). Это уникальное свойство основано на взаимодействии соседних гуанидиновых и карбоксильных групп. Предполагается, что молекулы аргинина могут образовывать гидрофобные поверхности в растворе путем взаимодействия, и это маскирует гидрофобные области белка. Идея основана на взаимодействии молекул аргинина в кристаллах и на непрямых данных по связыванию гидрофобных красителей и светорассеянию.

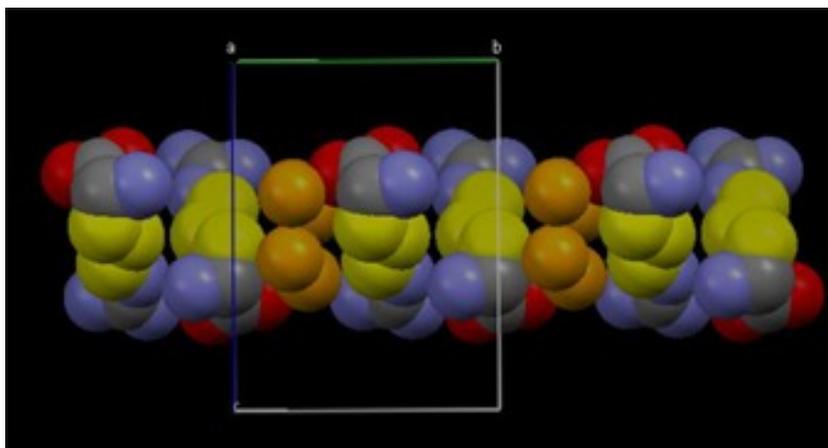


Рис. 1.9. Кластеризация молекул аргинина в кристаллической форме. Метиленовые группы показаны желтым цветом [Das, et al., 2007].

Доказательство существования кластеров было получено масс-спектрометрически. Были обнаружены ионы, соответствующие кластерам, содержащим до 24 молекул аргинина и 4 зарядов [Meng & Fenn, 1991; Julian, et al., 2001].

Идея о взаимодействии молекул аргинина и его влияние на агрегацию белков были изучены методом моделирования молекулярной динамики (рис. 1.10). Молекулы аргинина не только могут взаимодействовать друг с другом через водородные связи «голова – хвост», но также и через стэкинг гуанидиновых групп в растворе [Vondrásek, et al., 2009]. Гуанидиновая группа имеет плоскую структуру, стороны этой плоскости гидратированы слабо, и молекулы могут соединяться в стопки несмотря на отталкивающие электростатические взаимодействия [Mason, et al., 2003].

В связи с присутствием трех заряженных групп существует несколько возможных конфигураций взаимодействия молекул аргинина. При высоких концентрациях кластеры ассоциируют между собой и с оставшимися свободными молекулами. Водородные связи молекул аргинина друг с другом прочнее, чем с водой, следовательно, процесс ассоциации энтальпийно выгоден.

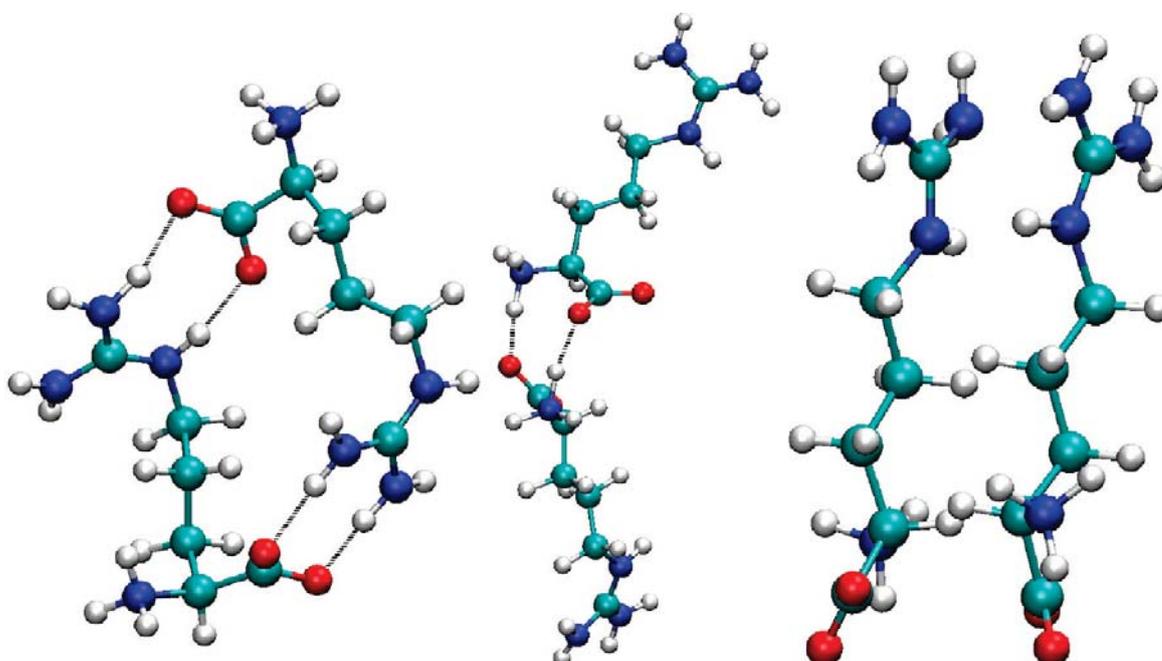


Рис. 1.10. Возможные конфигурации, в которых могут взаимодействовать молекулы аргинина, формирующие димер: образование водородных связей между гуанидиновой группой и карбоксильной группой (слева); образование водородных связей между N- и C-концами молекул аргинина (в центре); димеризация путем стэкинг-взаимодействия гуанидиновых групп (справа). Атомы углерода представлены голубым цветом, кислорода – красным, водорода – белым, азота – синим [Shukla & Trout, 2010].

При низких концентрациях аргинина преобладают мономеры и димеры, с повышением концентрации формируются n-меры все большего размера (нанометровый диапазон), связанные водородными и ионными связями и стэкингом гуанидиновых групп [Shukla & Trout, 2010]. Крупные кластеры затрудняют белок-белковые взаимодействия за счет краудинга.

Кластеризация катионов аргинина (Arg^+) на поверхности белка была изучена при моделировании взаимодействия аргинина с лизоцимом. Начинается кластеризация связыванием отдельных ионов аргинина со специфическими локусами на поверхности белка через кооперативное взаимодействие гуанидиновой и карбоксильной группы. Затем в связывание вовлекаются другие ионы Arg^+ . На поверхности белка формируются динамические кластеры протяженностью более чем 10 Å. Примерно половина ионов Arg^+ у поверхности белка имеет характеристическое время пребывания около 7 нс, тогда как другая половина – около 50 нс. Они обозначены как ионы Arg^+ класса I и II, соответственно. Arg^+ класса II обычно связываются с поверхностью белка на десятки наносекунд и служат «якорями» для кластеров [Vagenende, et al., 2013].

В литературе имеются многочисленные данные по влиянию аргинина на агрегацию белков. При изучении влияния аргинина на тепловую агрегацию алкогольдегидрогеназы и ДТТ-индуцированную агрегацию инсулина было продемонстрировано концентрационно-

зависимое подавление агрегации для обоих белков при очень низких концентрациях аргинина (0,1-10 мМ). Заметный эффект наблюдался также при физиологических концентрациях аргинина (1-10 мМ) [Lyutova, et al., 2007].

Подавление тепловой агрегации БСА аргинином изучали при 80 °С и рН 7,4-7,5. После 15-минутной инкубации в присутствии аргинина наблюдалось снижение среднего гидродинамического радиуса частиц по сравнению с контрольными образцами. Добавление 500 мМ аргинина не влияло на вторичную структуру белка по данным КД-спектроскопии и флуоресцентной спектроскопии [Ghosh, et al., 2009].

Наблюдалось подавление агрегации РНКазы А и лизоцима в диапазоне концентраций аргинина 0,1-2 М, при нейтральных и высоких рН. При нейтральных рН аргинин имеет два положительных заряда, а при рН 10 – один (гуанидиновая группа). Поскольку подавление агрегации было отмечено и при нейтральных и при высоких рН, предполагается, что за это подавление отвечает гуанидиновая группа [Arakawa & Tsumoto, 2003]. Аргинин подавлял агрегацию IgG1 при нейтральных значениях рН, но ускорял при кислых или при повышении температуры. Подавление агрегации коррелировало со снижением гидрофобности белка. Подавление агрегации было приписано взаимодействию с гидрофобными остатками, ускорение – взаимодействию с кислыми остатками [Fukuda, et al., 2014].

В некоторых источниках описано двойное влияние аргинина на агрегацию белков, показано ускорение агрегации при определенных условиях. Так, с использованием динамического светорассеяния показано, что аргинин в концентрации 10-100 мМ ускоряет ДТТ-индуцированную агрегацию лактальбумина. При концентрациях 200 мМ и выше наблюдалось подавление агрегации, полное подавление наступало при концентрации аргинина 1 М. В случае алкогольдегидрогеназы наблюдалось ускорение агрегации при концентрациях аргинина до 100 мМ [Smirnova, et al., 2013b]. При низких концентрациях аргинин ускорял агрегацию человеческого гормона роста и интерферона [Cirkovas & Sereikaite, 2011]. Аргинин может усиливать тепловую агрегацию концентрированных растворов БСА и лактоглобулина. Усиление агрегации наблюдалось при добавлении 100 мМ аргинина. Высокие концентрации – до 700 мМ – приводили к монотонному снижению агрегации, выше 700 мМ начиналось подавление агрегации относительно контроля. Усиление агрегации аргинином происходило только при относительно высоком отношении белок : аргинин [Shah, et al., 2011].

1.6.2. Производные аргинина

Некоторые производные аргинина более эффективны при подавлении агрегации, например, этиловый эфир аргинина подавляет агрегацию лизоцима сильнее, чем аргинин [Shiraki, et al., 2004]. Было изучено подавление агрегации белков аргинином (Arg), гомоаргинином (HArg), этиловым эфиром аргинина (ArgEE) и метиловым эфиром аргинина (ArgME). Связывание производных аргинина с белков происходит в основном за счет водородных связей и катион- π -взаимодействий гуанидиновой группы. Формирование кластеров по данным масс-спектрометрии возрастает в ряду ArgEE (мономеры 56%), ArgME (33%), HArg (26%), Arg (14%). Arg и HArg в основном формируют кольцевые кластеры «голова – хвост», тогда как ArgME и ArgEE образуют менее стабильные линейные кластеры за счет стэкинга гуанидиновых групп, они не могут участвовать во взаимодействиях «голова – хвост», так как карбоксильная группа замещена эфирной связью. Кластеры «голова – хвост» имеют кольцевую форму и более сильный краудинг-эффект, поскольку они стерически больше. В случае линейных кластеров наблюдается дополнительная компактизация за счет взаимодействия алифатических гидрофобных атомов. Показано, что взаимодействие аргинина и его производных с лизоцимом тем сильнее, чем больше содержание мономера в растворе – мономеры могут непосредственно взаимодействовать с белком незанятыми гуанидиновыми группами и не имеют стерических ограничений. Взаимодействие ArgME и ArgEE с лизоцимом сильнее, чем взаимодействие Arg и HArg. Сильное взаимодействие ArgEE с белком – причина его высокой эффективности как суппрессора агрегации [Gao, et al., 2013].

Следует отметить, что если для подавления агрегации белков обычно используют >1 M Arg, аргининамид (ArgAd) действует в субмолярных концентрациях [Matsuoka, et al., 2007]. ArgAd имеет более высокий положительный заряд в связи с наличием неионизированной амидной группы. ArgAd может, вероятно, взаимодействовать с интермедиатами фолдинга и нейтрализовать локальные отрицательные заряды, что приводит к усилению электростатического отталкивания. В случае ArgEE гидрофобная этиловая группа взаимодействует с гидрофобными участками развернутого полипептида и также усиливает электростатическое отталкивание [Hamada & Shiraki, 2007].

1.6.3. Пролин

Аминокислота пролин – природный осмолит, обладающий криопротекторными свойствами [Rudolph & Crowe, 1985; Troitzsch, et al., 2008a] и накапливающийся в растениях в условиях обезвоживания [Hellebust, 1976], что вызывает интерес к его защитным функциям и роли в стабильности белков. Пролин обладает высокой растворимостью, необычно низкой точкой замерзания [Schobert, 1977] и очень высокой вязкостью при концентрациях выше 3,5 М [Chilson & Chilson, 2003]. Это объясняют способностью пролина формировать частично упорядоченные надмолекулярные ансамбли в растворе [Schobert, 1977]. Идея поддерживается гипотезой о стэкинг-взаимодействии пирролидиновых колец молекул пролина с образованием амфифильных структур с гидрофобным остовом и гидрофильными боковыми группами, которые могут путем гидрофобных взаимодействий с экспонированными участками поверхности белка предотвращать агрегацию и преципитацию последнего [Schobert & Tschesche, 1978]. Непрямые доказательства из калориметрических экспериментов [Rudolph & Crowe, 1986], связывания гидрофобных красителей и данных светорассеяния [Samuel, et al., 2000] поддерживают эту идею. Однако прямого механистического объяснения тому, как эти структуры, если они существуют, обеспечивают вышеописанные свойства, не дано.

Кристаллическая структура показывает упорядоченную упаковку (стэкинг) слоев пирролидиновых колец [Kayushina & Vainshtein, 1983]. Молекулярные ансамбли могут стабилизироваться межмолекулярными водородными связями между иминогруппой одной молекулы пролина и карбоксильной группой другой [Samuel, et al., 2000]. Однако по данным моделирования молекулярной динамики не показано наличия кластеров пролина в растворе, аномальная вязкость растворов объясняется способностью пролина сильно структурировать воду за счет образования множественных водородных связей с молекулами растворителя и водородных связей между молекулами пролина в растворе [Civera, et al., 2005]. Возможно образование димеров пролина с помощью водородных связей [Troitzsch, et al., 2008b]. Могут существовать нестабильные диффузные ассоциаты, что объясняет данные светорассеяния, но моделирование молекулярной динамики в сопряжении с методами нейтронной дифракции и малоуглового нейтронного рассеяния не подтверждают наличия крупных кластеров [McLain, et al., 2007; Troitzsch, et al., 2007].

Показано, что относительно низкие концентрации пролина (0,1 М) обладают незначительным ускоряющим эффектом на тепловую агрегацию Phb из скелетных мышц кролика при 48 °С. Подавление агрегации при более высоких концентрациях пролина может быть вызвано стабилизирующим влиянием на разворачивание по данным ДСК

[Eronina, et al., 2009]. Кроме того, пролин повышает термостабильность апоформы Phb при тепловой агрегации при 37 °С и способствует реконструкции холофермента из апоформы и кофактора [Chebotareva, et al., 2013; Eronina, et al., 2014]. При температуре выше 55 °С пролин не может предотвращать агрегацию белков, что было объяснено разрушением кластеров при нагревании [Samuel, et al., 2000]. Показано, что пролин ингибирует агрегацию лизоцима при рефолдинге [Samuel, et al., 2000] и агрегацию при экспрессии белков *in vivo* [Ignatova & Gierasch, 2006].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы

2.1.1. Бычий сывороточный альбумин

БСА (очищенный от жирных кислот, номер по каталогу A7638, степень чистоты 99%) был приобретен в Sigma-Aldrich (США) и использован без дальнейшей очистки. Образцы БСА готовили путем растворения сухого БСА в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0. Раствор белка центрифугировали при 20000 g и 4 °C в течение 30 мин для осаждения нерастворимых агрегатов. Концентрацию БСА определяли спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициент поглощения $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 6,58$ [Gill & von Hippel, 1989].

2.1.2. α -Лактальбумин

α -Лактальбумин из коровьего молока (номер по каталогу L5385, насыщенный кальцием) был приобретен в Sigma-Aldrich (США) и использован без дальнейшей очистки. Образцы α -лактальбумина готовили путем растворения белка в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 6,8. Раствор белка центрифугировали при 20000 g и 4 °C в течение 30 мин для осаждения нерастворимых агрегатов. Концентрацию α -лактальбумина определяли спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициент поглощения $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 20,1$ [Kronman, et al., 1964].

2.1.3. Глутаматдегидрогеназа

ГД из печени быка (номер по каталогу G2501) была приобретена в Sigma-Aldrich (США) и использована без дальнейшей очистки. Образцы ГД готовили путем растворения белка в 0,1 М Na-фосфатном буфере pH 7,6. Раствор белка центрифугировали при 20000 g и 4 °C в течение 30 мин для осаждения нерастворимых агрегатов. Концентрацию ГД определяли спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициент поглощения $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 9,7$ [Sabbaghian, et al., 2009].

2.1.4. α -Кристаллин

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). Концентрацию α -кристаллина определяли спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициент поглощения $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 8,5$ [Putilina, et al., 2003].

2.1.5. Реактивы

L-аргинина моногидрохлорид (Arg), L-аргинина этиловый эфир (ArgEE), L-аргининамид (ArgAd), L-пролин (Pro), DL-дитиотреитол (чистота 99%), тиофлавин Т (ThT), 8-аминонафталин-1-сульфоновая кислота (АНС), ADP, NAD, NADH, L-глутамат, L-лейцин и другие реактивы были приобретены в Sigma-Aldrich (США) и использованы без дальнейшей очистки. Все растворы для экспериментов были приготовлены с использованием деионизованной воды, полученной с помощью системы Easy-Pure II RF (Barnstead, США).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Выделение α -кристаллина

α -кристаллин выделяли из свежих хрусталиков глаз 2-х летних быков (*Bos taurus*). Кору декапсулированных хрусталиков гомогенизировали при 0 °С в 40 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,0, содержащем 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 3 мМ NaN₃. Гомогенат центрифугировали при 27000 g в течение 1 часа при 4 °С, супернатант, содержащий растворимые кристаллины, фракционировали методом гель-проникающей хроматографии с использованием колонки TSK-gel HW-55 fine 2,5 × 90 см (Тоуо Soda, Япония). Оптическую плотность элюента при 280 нм измеряли с помощью детектора LKB Pharmacia 2138 Uvicord S. Пик, соответствующий α -кристаллину собирали, концентрировали ультрафильтрацией (дисковая мембрана Millipore РТТК, предел отсекания молекулярных масс 300000) и рехроматографировали на той же колонке.

Концентрацию α -кристаллина определяли спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициент поглощения $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 8,5$ [Putilina, et al., 2003].

2.2.2. Получение сшитого α -кристаллина

Получение сшитого α -кристаллина проводили совместно с 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). Сшивание α -кристаллина выполняли по методу Аугустейна [Augusteyn, 2004] с некоторыми модификациями. Интактный белок (0,03 мМ) инкубировали с 3 мМ глутаральдегидом в 40 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,0, содержащем 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 3 мМ NaN₃, при 20 °С в течение 30 ч. Процесс останавливали добавлением 3 мМ ДТТ. Затем белок диализовали против того же буфера. Полученные образцы центрифугировали при 14500 g в течение 30 мин в центрифуге MiniSpin+ (Eppendorf, Германия). Супернатант хроматографировали на колонке TSK-gel HW-55 fine 2,5 × 90 см (Toyo Soda, Япония) для отделения высокомолекулярных фракций. Концентрацию сшитого α -кристаллина определяли микробиуретовым методом [Itzhaki & Gill, 1964].

2.2.3. Получение денатурированного неагрегированного БСА

Аликвоты БСА добавляли к предварительно прогретому при 60 °С 0,1 М Na-фосфатному буферу, pH 7,0 до конечной концентрации белка 1 мг/мл и инкубировали при 60 °С в течение 12 часов. Затем образцы охлаждали до комнатной температуры (23 °С) и концентрировали на микропробирках Microcon (предел отсекаания молекулярных масс 50000) центрифугированием при 14000 g в течение 10 мин. Собранный супернатант анализировали методом динамического светорассеяния, чтобы подтвердить отсутствие агрегации. Хроматографическое разделение фракций БСА проводили совместно с 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). Образцы белка наносили на колонку (Sephacryl S100 HR) и разделяли на фракции при скорости потока 2,5 мл/мин (20 °С). Колонка была предварительно откалибрована следующими белками (Sigma-Aldrich, США): тироглобулин (660 кДа), каталаза (440 кДа), альдолаза (158 кДа), БСА (67 кДа), γ -

кристаллин (20 кДа). Относительная ошибка определения массы белка составляла 4%. Концентрацию БСА определяли спектрофотометрически при 280 нм, используя коэффициент поглощения $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 6,58$ [Gill & von Hippel, 1989].

2.2.4. Динамическое светорассеяние

Динамическое светорассеяние (еще называемое квазиупругим светорассеянием, quasielastic light scattering, QELS) широко используется для определения размера частиц и макромолекул. Коллоидные частицы или макромолекулы, суспендированные в жидкости, находятся в хаотическом броуновском движении, которое вызывает микроскопические флуктуации их локальной концентрации. В свою очередь, эти флуктуации приводят к локальным неоднородностям показателя преломления среды. При прохождении лазерного луча через такую среду часть света будет рассеяна на этих неоднородностях. Таким образом, возникают флуктуации интенсивности рассеянного света. Анализ флуктуаций производится с помощью автокорреляционной функции $\langle A(0), A(t + \tau) \rangle$, описывающей изменение сигнала во времени относительно самого себя за промежуток времени τ (рис. 2.1А):

$$\langle A(0), A(\tau) \rangle = \langle A \rangle^2 + [\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2] \exp(-\tau/\tau_c), \quad (2.1)$$

где τ_c — корреляционное время флуктуирующего сигнала (рис. 2.1Б).

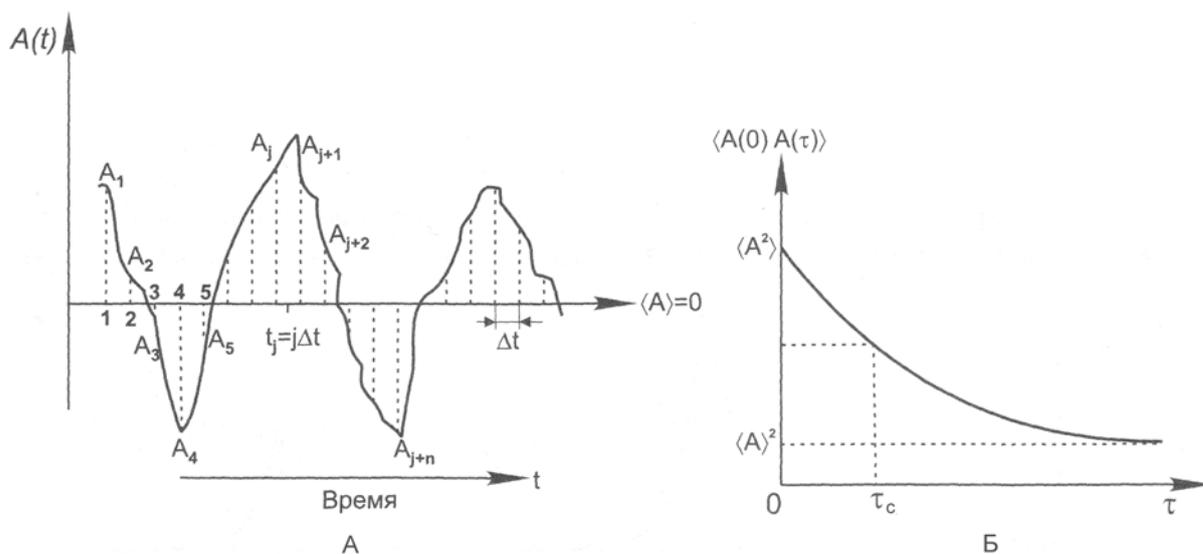


Рис. 2.1. Пример флуктуаций $A(t)$ во времени (А) и описывающей их автокорреляционной функции (Б) [Сердюк, et al., 2010].

Автокорреляционная функция флуктуаций электрического поля рассеянного света называется функцией первого порядка $A^{(1)}(\tau)$, но на практике измеряется автокорреляционная функция интенсивности — функция второго порядка $A^{(2)}(\tau)$. Она связана с функцией флуктуаций поля следующим образом:

$$A^{(1)}(\tau) = [(A^{(2)}(t) - A^{(2)}(\infty)) / A^{(2)}(\infty)]^{1/2}, \quad (2.2)$$

или

$$A^{(2)}(\tau) = 1 + |A^{(1)}(\tau)|^2, \quad (2.3)$$

где $A^{(2)}(\tau)$ - базовый уровень корреляции (базовая линия) $\langle A \rangle^2$, обусловленный статическим рассеянием света и характеристиками измерительного прибора (рис. 2.1Б).

В условиях гауссовой статистики и в отношении частиц с размерами, меньшими чем длина волны рассеянного света, основным вкладом в флуктуации интенсивности является вклад, обусловленный диффузией. Тогда автокорреляционная функция может быть записана в виде:

$$A^{(2)}(\tau) = 1 + a \exp(-2Dq^2\tau_c), \quad (2.4)$$

где q – модуль волнового вектора рассеяния, $q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$, n – показатель преломления растворителя, λ - длина волны рассеиваемого излучения в вакууме, и θ - угол регистрации рассеянного света (рис. 2.2).

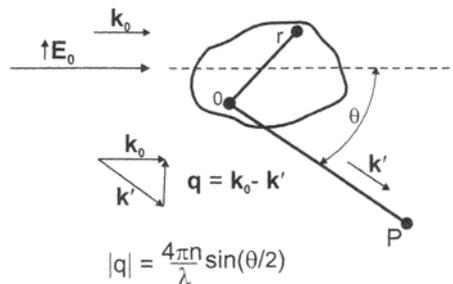


Рис. 2.2. Геометрия рассеяния света [Сердюк, et al., 2010].

Такой подход действителен для невзаимодействующих сферических частиц. Если частицы вовлечены в процесс агрегации, эти уравнения можно применять для оценки изменения кажущегося («эффективного») размера частицы в том случае, если характерное время кинетики агрегации намного больше времени измерений.

Гидродинамический радиус R_h частицы – это радиус гидродинамически эквивалентной сферы с таким же коэффициентом диффузии, как у исследуемой частицы.

Величина R_h и коэффициент диффузии для сферических частиц связаны между собой соотношением Стокса-Эйнштейна:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}, \quad (2.5)$$

где k_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость растворителя при температуре T . На практике расчет R_h производится методом кумулянт или методом регуляризации с нахождением взвешенного по интенсивности распределения частиц по размерам [Сердюк, et al., 2010].

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. Для мониторинга температуры образца в реальном времени использовали платиновые термометры с временной константой 1 с. 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.

2.2.5. Изучение кинетики агрегации белков

2.2.5.1. ДТТ-индуцированная агрегация α -лактальбумина и БСА

Кинетику ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина изучали в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 6,8, при 37 °С. Кинетику ДТТ-индуцированной агрегации БСА изучали в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0, при 45 °С. Буфер помещали в цилиндрическую виалу с внутренним диаметром 6,3 мм и предварительно инкубировали в течение при 5 мин при соответствующей температуре. Виалы закрывали пробками для предотвращения испарения. Процесс агрегации инициировали добавлением аликвоты ДТТ к раствору белка до конечного объема 0,5 мл. Рассеянный свет собирали под углом 90°. Для изучения влияния α -кристаллина и химических шаперонов на ДТТ-индуцированную агрегацию α -лактальбумина и БСА, их добавляли к предварительно прогретому раствору белка перед внесением ДТТ.

Для описания начальных участков зависимостей гидродинамического радиуса (R_h) белковых агрегатов от времени использовали следующее уравнение [Khanova, et al., 2005; Golub, et al., 2009; Bumagina, et al., 2010b]:

$$R_h = R_{h,0} \left\{ \exp \left[\frac{\ln(2)}{t_{2R}} (t - t_0) \right] \right\}, \quad (2.6)$$

где t_0 – момент появления стартовых агрегатов с $R_h = R_{h,0}$, и t_{2R} – промежуток времени, за который величина R_h возрастает вдвое (т.е., $R_h = 2R_{h,0}$ при $t = t_0 + t_{2R}$).

В случае протекания агрегации по механизму, не включающему в себя образование стартовых агрегатов, уравнение (2.6) было записано в виде

$$R_h = R_{h,initial} \left\{ 1 + K \left[\exp \left(\frac{(t - t_0)}{t_{2R}} \ln \left\{ \frac{(1 + K)}{K} \right\} \right) - 1 \right] \right\}, \quad (2.7)$$

где t_0 – длительность лаг-периода, $R_{h,initial}$ – значение R_h при $t = t_0$, t_{2R} – промежуток времени, за который величина R_h возрастает вдвое и K – константа.

2.2.5.2. Тепловая агрегация БСА

Кинетику тепловой агрегации БСА изучали в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0, при 60 °С, 65 °С, 70 °С и 80 °С. Буфер помещали в цилиндрическую виалу с внутренним диаметром 6,3 мм и предварительно инкубировали в течение при 5 мин при соответствующей температуре. Виалы закрывали пробками для предотвращения испарения. Процесс агрегации инициировали добавлением аликвоты раствора БСА к предварительно прогретому буферу до конечного объема 0,5 мл. Рассеянный свет собирали под углом 90°. Для изучения влияния химических шаперонов на тепловую агрегацию БСА при 70 °С, их добавляли к предварительно прогретому буферу перед внесением белка.

2.2.5.3. Тепловая агрегация глутаматдегидрогеназы

Кинетику тепловой агрегации ГД изучали в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,6, в режиме нагревания с постоянной скоростью 1 °С/мин от 20 °С до 100 °С. Буфер помещали в цилиндрическую виалу диаметром 6,3 мм и инкубировали в течение 5 мин при 20 °С. Виалы закрывали пробками для предотвращения испарения. Процесс агрегации инициировали добавлением аликвоты ГД до конечного объема 0,5 мл. Рассеянный свет собирали под углом 90°. Для изучения влияния лигандов на тепловую агрегацию ГД в

режиме нагревания с постоянной скоростью, их добавляли к предварительно прогретому буферу перед внесением белка.

Для описания начальных участков зависимостей гидродинамического радиуса (R_h) белковых агрегатов от времени использовали уравнение (2.7).

2.2.6. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) — один из основных методов изучения денатурации белков. Она позволяет напрямую измерять зависимость парциальной удельной теплоемкости макромолекул от температуры при постоянном давлении, $C_p(T)$, и получать полное термодинамическое описание белка в растворе в изучаемом температурном диапазоне с помощью соотношений:

$$\Delta H = \int \Delta C_p(T) dT \quad (2.8)$$

и

$$\Delta S = \int \frac{\Delta C_p(T)}{T} dT, \quad (2.9)$$

где ΔH , ΔC_p и ΔS — изменения энтальпии, теплоемкости и энтропии, соответственно, сопровождающие денатурацию белка [Сердюк, et al., 2010].

Простейшей моделью, описывающей необратимую денатурацию белков, является модель Ламри — Эйринга [Lumry & Eyring, 1954]:



где U — частично развернутая форма белка, k_1 , k_{-1} и k_2 — константы скорости соответствующих стадий. Частный случай модели Ламри – Эйринга — одностадийная необратимая модель:



Она реализуется в двух случаях: 1) скорость второй фазы намного больше скорости первой фазы; 2) скорость первой фазы больше, чем скорость второй фазы, но при этом равновесие смещено в сторону образования нативной формы белка [Любарев & Курганов, 2000].

Константа скорости k подчиняется уравнению Аррениуса:

$$k = A \exp(-E_a / RT), \quad (2.12)$$

где A — предэкспоненциальный множитель, E_a — энергия активации для перехода.

Кинетика убывания доли нативного белка γ_N описывается уравнением

$$\frac{d\gamma_N}{dT} = -\left(\frac{1}{\nu}\right)k\gamma_N, \quad (2.13)$$

где ν — скорость изменения температуры в ходе эксперимента (скорость сканирования).

Текущее количество теплоты, поглощенной в процессе денатурации белка можно выразить как:

$$Q = (1 - \gamma_N)\Delta H \quad (2.14)$$

Изменение избыточной парциальной удельной теплоемкости белка при необратимой денатурации:

$$C_p^{ex} = \frac{dQ}{dT} = k\gamma_N \frac{\Delta H}{\nu} \quad (2.15)$$

Система уравнений (2.13) и (2.15)

$$\begin{cases} \frac{d\gamma_N}{dT} = -\frac{k\gamma_N}{\nu} \\ C_p^{ex} = Q \frac{k\gamma_N}{\nu} \end{cases} \quad (2.16)$$

позволяет описать данные ДСК в рамках модели одностадийной необратимой денатурации [Lyubarev, et al., 1999].

Калориметрические исследования тепловой денатурации БСА, ГД, интактного, сшитого и УФ-облученного α -кристаллина выполняли совместно с к.б.н. С.Ю. Клейменовым (лаборатория структурной биохимии белка, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук).

Использовали 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0 для БСА, 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,6 для ГД, и 40 мМ Na-фосфатный буфер pH 7,0, содержащий 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 3 мМ NaN₃ для УФ-облученного и сшитого α -кристаллина. Все образцы белков центрифугировали перед измерениями. Для изучения кинетики тепловой денатурации БСА образцы белка сначала прогревали в термостате при 60 °С, 65 °С, 70 °С и 80 °С в течение необходимого промежутка времени, затем охлаждали до 20 °С, контролируя температуру раствора внешним термометром. Нагревание и охлаждение проводили в стеклянных виалах диаметром 6,3 мм. Эксперименты проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем калориметре ДАСМ-4М (Институт биологического приборостроения, Пушкино, Россия) с платиновой капиллярной ячейкой объемом 0,47 мл (капиллярная конструкция ячейки предотвращает появление артефактов, связанных с преципитацией белка). Растворы белков нагревали с постоянной скоростью 1 °С/мин от 20 до 90 °С при постоянном давлении 2,2 атмосферы. Повторное сканирование

показало необратимый характер денатурации для БСА, ГД и α -кристаллина. Температурную зависимость избыточной теплоемкости в дальнейшем анализировали с помощью программы OriginPro 8.0 SR0 (OriginLab Corporation, США).

2.2.7. Фракционирование в поле асимметричного потока (AF₄)

Фракционирование в асимметричном потоке (asymmetric flow field-flow fractionation, AF₄) является разновидностью однофазовой хроматографии. Разделение частиц происходит в вытянутом плоском канале за счет перемещения частиц под действием сравнительно слабого продольного потока, а также перпендикулярного к нему более сильного потока. Канал, в котором происходит разделение, ограничен с двух сторон пластинами, зафиксированными на определенном расстоянии друг от друга с помощью разделителя. Одна из пластин сделана из пористого материала, через эти поры создается перпендикулярный движению частиц поток. Пористая пластина покрыта полупроницаемой мембраной.

В связи с неоднородностью у стенок и по центру канала поток имеет параболический профиль:

$$v(x) = 6\langle v \rangle \left(\frac{x}{w} - \frac{x^2}{w^2} \right), \quad (2.17)$$

где $\langle v \rangle$ — средняя скорость потока в поперечном сечении канала, x — вертикальная координата канала, w — толщина канала (рис.2.3).

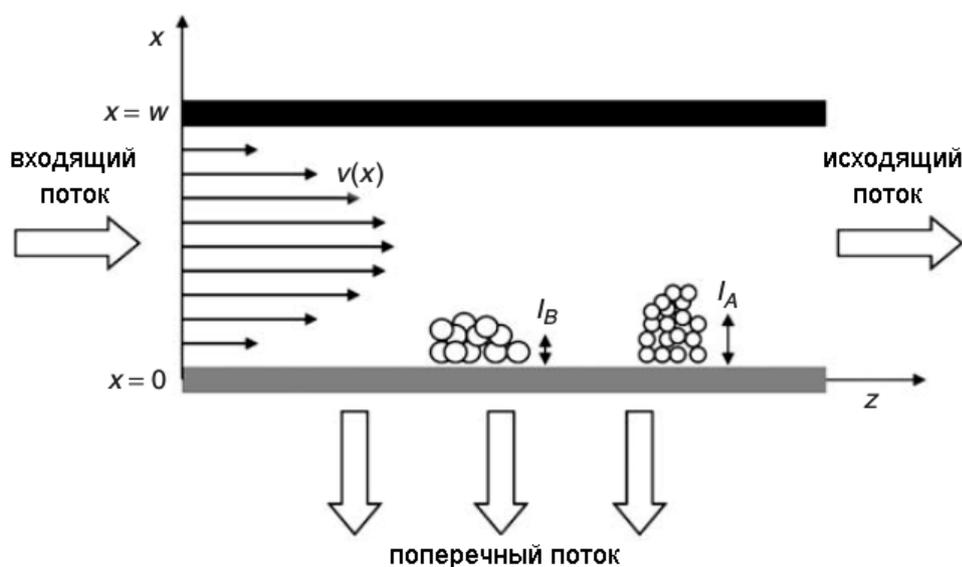


Рис. 2.3. Схема, иллюстрирующая метод разделения в асимметричных потоках [Podzimek, 2011].

Скорость поперечного потока в поперечном сечении канала описывается уравнением:

$$u(x) = u_0 \left(1 - \frac{3x^2}{w^2} + \frac{2x^3}{w^3} \right), \quad (2.18)$$

где u_0 — скорость поперечного потока у дна канала. Профиль поперечного потока представлен на рис. 2.4. Асимметричный характер изменения скорости поперечного потока дал название методу.

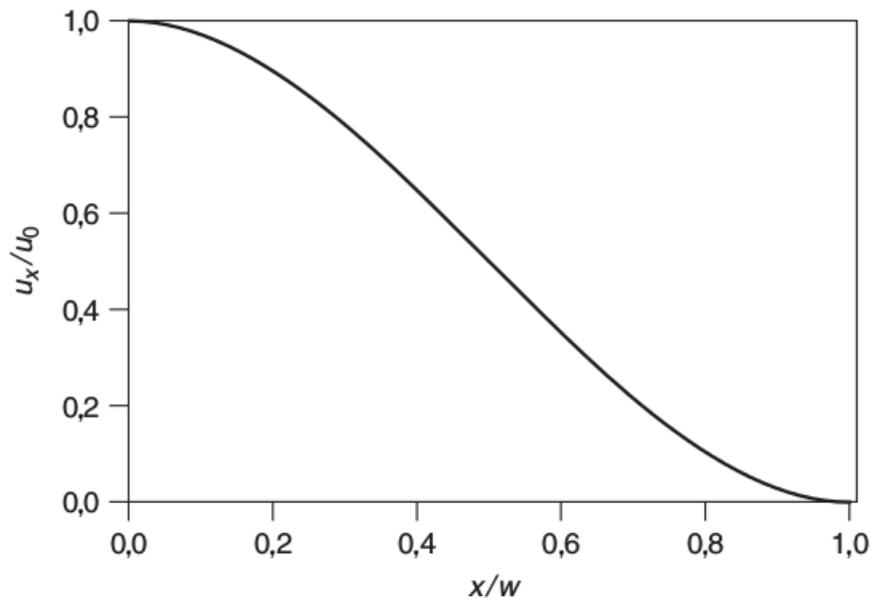


Рис. 2.4. Профиль поперечного потока в канале [Podzimek, 2011].

В продольном сечении канала характер поперечного потока не меняется, тогда как скорость продольного потока описывается уравнением:

$$\langle v \rangle = \langle v \rangle_0 - \left(\frac{u_0}{w} \right) z, \quad (2.19)$$

где $\langle v \rangle_0$ — скорость продольного потока на входе в канал, z — продольная координата канала. Для предотвращения падения скорости потока, каналу придают трапециевидную форму, сужающуюся к концу.

Разделяемые частицы придавливаются к пористой пластине, удерживаясь вблизи ее поверхности, и не проникают внутрь благодаря мембране. Вызываемая хаотичным броуновским движением диффузия направлена от стенки канала к его центру. Более мелкие частицы, способные легче диффундировать, достигают равновесного положения ближе к середине канала, где продольный поток быстрее, чем у стенок. Профиль концентрации образца как функция расстояния от дна канала описывается уравнением:

$$c = c_0 \exp\left(-\frac{x}{l}\right), \quad (2.20)$$

где c_0 — концентрация на дне канала, l — расстояние от дна канала до центра тяжести слоя образца. Для полидисперсного образца профиль концентрации складывается из профилей концентрации отдельных компонентов. За счет распределения в градиенте скоростей потоков достигается разделение частиц различных размеров. Мелкие частицы переносятся по каналу и вымываются быстрее крупных частиц. Такой механизм разделения называется нормальным, или броуновским. Существует второй механизм разделения, называемый гиперслоино-стерическим, который реализуется для частиц размером более 1 мкм. При гиперслоино-стерическом разделении вклад коэффициентов диффузии невелик и более крупные частицы оказываются ближе к центру канала за счет действия гидродинамической подъемной силы. Порядок элюции инвертируется и первыми из канала выходят более крупные частицы.

Процедура разделения состоит из трех этапов. Первые два этапа – инжектирование образца и его фокусировка проводятся при следующей конфигурации потоков. Продольный поток разделен на два и подается через входное и выходное отверстия таким образом, чтобы потоки с обеих сторон встречались в области введения образца. В результате, в этой области поток направлен исключительно через мембрану. После быстрого введения образец концентрируется и придавливается к мембране. Время фокусировки не зависит от скоростей потоков, но зависит от природы образца:

$$t_f \approx -\frac{[w^2 \ln(1-f)]}{6D}, \quad (2.21)$$

где f — параметр со значениями меньше единицы, D — коэффициент диффузии. В режиме элюирования буфер подается через входное отверстие в сторону выходного отверстия. Скорость потоков на практике выражается не линейными, а объемными величинами, измеряющимися в мл/мин:

$$u_0 = \frac{V_c}{bL}, \quad (2.22)$$

и

$$\langle v \rangle_0 = \frac{V_{in}}{bw}, \quad (2.23)$$

где V_c — объемная скорость поперечного потока, V_{in} — объемная скорость продольного потока на входе в канал, L , b и w — длина, ширина и высота канала. На выходе из канала устанавливаются необходимые для работы детекторы [Podzimek, 2011].

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). Для изучения тепловой агрегации БСА растворы белка (1 мг/мл) в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0, предварительно прогревали при 60 °С, 65 °С, 70 °С и 80 °С в течение 0-48 ч и охлаждали до комнатной температуры (23 °С). Для изучения ДТТ-индуцированной агрегации БСА растворы белка (0,5, 1 и 2 мг/мл) в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0, предварительно прогревали при 45 °С в присутствии 2 мМ ДТТ в течение 0-3 ч и охлаждали до комнатной температуры (23 °С). Образцы БСА (20-80 мкл) вводили в канал для разделения с помощью автоинъекционной системы Agilent (Agilent Technologies, США). Канал длиной 21,4 см с разделителем толщиной 350 мкм и мембраной для ультрафильтрации из регенерированной целлюлозы с пределом отсекаания молекулярных масс 10 кДа (Wyatt Technology Corporation, США) был последовательно соединен 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). Элюцию проводили при 23 °С 0,1 М Na-фосфатным буфером, pH 7,0, 3 мМ NaN₃, при следующих скоростях потоков: осевой поток 1 мл/мин, фокусирующий поток 5 мл/мин, поперечный поток 5 мл/мин в течение 10-14 мин и затем его линейное снижение до 0,1 мл/мин в течение 20 мин, после чего скорость поперечного потока составляла 0 мл/мин еще в течение 8 мин. Данные обрабатывали в программе ASTRA 5.3.4 (Wyatt Technology Corporation, США).

2.2.8. Аналитическое ультрацентрифугирование

Метод аналитического ультрацентрифугирования позволяет определять размер и форму макромолекул, а также дает информацию о взаимодействии между ними. Ультрацентрифугирование основано на осаждении (седиментации) молекул в гравитационном поле вращающегося ротора центрифуги:

$$g = w^2 r, \quad (2.24)$$

где w — угловая скорость ротора (радиан/с), r — радиальное расстояние от оси вращения. Двухсекторная ячейка с окошками из кварца или сапфира и оптический детектор позволяют определять поглощение отдельных компонентов.

На молекулу в гравитационном поле действуют три силы: гравитационная $F_c = m\omega^2 r$, выталкивающая $F_b = -m_0\omega^2 r$ и сила трения $F_d = fu$, где m — масса частицы, m_0 — масса вытесненного растворителя, f — коэффициент трения, u — скорость частицы (рис. 2.5).

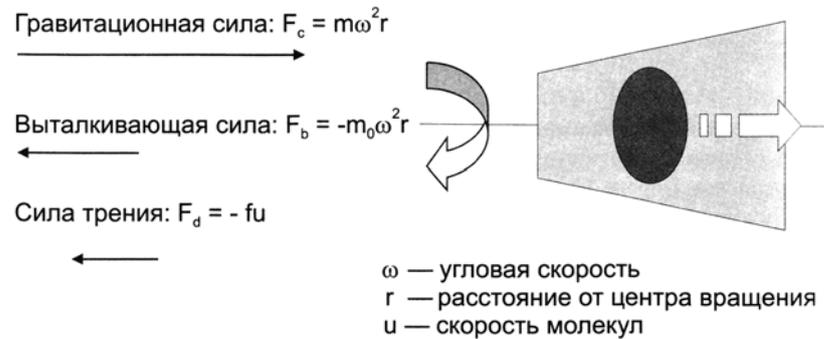


Рис. 2.5. Силы, действующие на частицу в ячейке центрифуги [Сердюк, et al., 2010].

Частица достигает постоянной скорости, когда результирующая всех сил равна нулю:

$$F_c + F_b + F_d = 0, \quad (2.25)$$

или

$$m\omega^2 r(1 - \bar{v}\rho_0) = fu, \quad (2.26)$$

где \bar{v} — парциальный удельный объем частицы, ρ_0 — плотность растворителя.

Преобразованием уравнения (2.26) и умножением его на число Авогадро N_A можно получить выражение для коэффициента седиментации частицы:

$$s \equiv u / \omega^2 r = M(1 - \bar{v}\rho_0) / N_A f, \quad (2.27)$$

Таким образом, коэффициент седиментации — это отношение скорости частицы к ее ускорению в центрифуге. Единица измерения константы седиментации — 1 единица Сведберга равна $1 \cdot 10^{-13}$ с [Сердюк, et al., 2010].

Получив коэффициенты седиментации (s) и диффузии (D) макромолекулы, можно вычислить ее молекулярную массу с помощью уравнения Сведберга:

$$M = \frac{s}{D} \frac{RT}{(1 - \bar{v}\rho_0)} \quad (2.28)$$

где T — температура, R — универсальная газовая постоянная.

Эксперименты по скоростной седиментации были выполнены совместно с д.б.н. Н.А. Чеботаревой (лаборатория структурной биохимии белка, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук). Изучение седиментационного поведения

белков методом скоростной седиментации проводили при 20-45 °С в аналитической ультрацентрифуге Model E (Beckman Coulter Inc., США), оборудованной абсорбционной оптической сканирующей системой, фотоэлектрическим сканером, монохроматором и компьютером, при скоростях вращения ротора от 34000 до 52000 об/мин. Использовали 4-канальный титановый ротор An-F, 12 мм двухсекторные ячейки. Ротор предварительно прогревали в термостате в течение ночи перед экспериментом. Профили седиментации для интактного БСА, агрегированного БСА, α -кристаллина и смесей БСА с α -кристаллином (0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0, 10 mM NaCl, при изучении ДТТ-индуцированной агрегации буфер содержал 2 mM ДТТ) записывали путем измерения поглощения при 285 нм. Все ячейки сканировали синхронно против буфера, содержавшего те же добавки. Интервал времени между сканами составлял 3 мин. Значения коэффициентов седиментации рассчитывали исходя из дифференциальных распределений коэффициентов седиментации [$c(s)$ vs s] или [$c(s, f/f_0)$ vs s], которые анализировали в программе SEDFIT [Schuck, 2000; Brown & Schuck, 2006]. Средние величины коэффициентов седиментации отдельных форм были получены интегрированием пиков дифференциального распределения. Анализ $c(s)$ выполняли методом регуляризации с достоверным уровнем 0,68 и переменным фрикционным соотношением, базовой линией и положением мениска. В коэффициенты седиментации внесли поправку на стандартные условия (растворитель с плотностью и вязкостью воды при 20 °С) с помощью программ SEDFIT и SEDNTERP [Laue, et al., 1992].

2.2.9. УФ-облучение препарата α -кристаллина

Эксперименты по облучению α -кристаллина выполняли совместно с 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). УФ-облучение α -кристаллина (5 мг/мл) проводили в кварцевой ячейке с длиной оптического пути 1 см при комнатной температуре и перемешивании. Объем образца составлял 2 мл. Температуру образца в ячейке контролировали миниатюрным термометром. Она не превышала 25 °С. УФ-облучение 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 (ИБП РАН, Пущино, Россия). Облучение выполняли световым пучком диаметром 4 см. Центр пучка совпадал с центром образца. Суммарная мощность в интервале 260-305 нм, падающая на образец равнялась $3,0 \pm 0,4$ мВт/см². Падающая на образец энергия в

интервале 260-305 нм полностью поглощалась α -кристаллином в использованной концентрации.

Вследствие конструктивных особенностей лампы ДРШ-1000 (расстояние между электродами составляет 19 мм) мощность исходящего света сильно флуктуирует. Поэтому для получения одинаковых доз ультрафиолета мощность светового пучка измеряли с помощью оптического спектрометра-радиометра AvaSpec-2048 (Avantes AB, Нидерланды). Для измерения использовали два детектора. Первый детектор был расположен непосредственно за ячейкой с образцом, тогда как второй детектор размещался под кюветой на уровне ее передней стенке. Верхний детектор использовали для измерения мощности ультрафиолетового света до облучения, нижний – для измерения падающей на образец дозы излучения. Так как интенсивность светового потока уменьшается к краю пучка, была использована поправка для измерения корректных значений световой энергии. Концентрацию УФ-облученного α -кристаллина определяли микробиуретовым методом [Itzhaki & Gill, 1964].

2.2.10. Гель-проникающая хроматография

Хроматографическое разделение интактного, сшитого глутаровым альдегидом и УФ-облученного α -кристаллина, α -кристаллина проводили совместно с 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). Препараты белков наносили на колонку Toyopearl TSK-gel HW-55 fine; 2,5 см \times 90 см (Toyo Soda, Япония) и разделяли на фракции при скорости потока 1,7 мл/мин (20°C). Колонка была предварительно откалибрована следующими белками (Sigma-Aldrich, США): тироглобулин (660 кДа), каталаза (440 кДа), альдолаза (158 кДа), БСА (67 кДа), цитохром С (14,5 кДа). Относительная ошибка определения массы белка составляла 4%.

2.2.11. ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле

Полипептидный состав образцов БСА, сшитого и УФ-облученного α -кристаллина в сравнении с интактным α -кристаллином анализировали с помощью электрофореза в 15% и 12% полиакриламидном геле, соответственно, в присутствии ДСН и ДТТ [Laemmli, 1970]. В качестве стандартов использовали следующие белки (Sigma-Aldrich, США): α -лактальбумин (14,2 кДа), ингибитор трипсина (20,1 кДа), карбоангидраза (29 кДа),

овальбумин (45 кДа) и БСА (66 кДа). Пробы для электрофореза готовили следующим образом: к раствору белка добавляли равный объем 2-х кратного буфера для образцов (0,125 М трис-НСl, 4% ДСН, 20% глицерин, 0,002% бромфеноловый синий, 0,2 М ДТТ, рН 6,8) и инкубировали при 95 °С в течение 5 мин. Для электрофоретического разделения использовалась мини-камера Sigma (США). По окончании электрофореза гель помещали в 10%-ную уксусную кислоту на 30 мин для фиксации белков и удаления ДСН. После этого гели окрашивали раствором Кумасси (0,2% Кумасси Синий R-250, 20% этанол, 10% уксусная кислота) в течение часа. Избыток красителя удаляли кипячением в дистиллированной воде. Гели сканировали на фотосканере Epson Perfection 4180. Изображения анализировали в программе ImageJ 1.41n.

2.2.12. Определение показателя преломления, плотности и динамической вязкости

Значения показателя преломления растворов разных концентраций Arg, ArgEE, ArgAd и Pro (0,1 М Na-фосфатный буфер рН 7,0) при 45 °С и 70 °С определяли с помощью рефрактометра АВВЕМАТ 500 (Anton Paar, Австрия).

Эксперименты по определению плотности и вязкости растворов проводили совместно с к.б.н. В.Ф. Макеевой (лаборатория структурной биохимии белка, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук). Плотность растворов Arg, ArgEE, ArgAd и Pro определяли денситометром DMA 4500 (Anton Paar, Австрия). Динамическую вязкость растворов определяли автоматическим микровискозиметром (Anton Paar, Австрия) в системе 1,6/1,500 мм при 45 °С и 70 °С. Значения коэффициента преломления и динамической вязкости растворов использовали при расчете гидродинамических радиусов агрегатов, полученных методом динамического светорассеяния в присутствии Arg, ArgEE, ArgAd и Pro при соответствующих температурах.

2.2.13. Измерение флуоресценции

2.2.13.1 Собственная флуоресценция белка

Спектры испускания флуоресценции α -кристаллина регистрировали при 25 °С с помощью спектрофлуориметра Shimadzu RF-5301PC, оборудованного циркуляционной водяной баней. Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 295 нм, и

регистрировали в интервале 300 – 400 нм. Ширина щели для возбуждения флуоресценции была 1,5 нм, для эмиссии – 3 нм. Спектры испускания флуоресценции БСА регистрировали с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, США) в кварцевой кювете 1 × 1 см при 25 °С. Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 298 нм и регистрировали в интервале 300 – 600 нм. Ширина щелей возбуждающего и анализирующего монохроматоров была равна 5 нм. Во всех экспериментах концентрация белка составляла 0,1 мг/мл.

2.2.13.2. Флуоресценция тиофлавина Т (ThT)

Спектры флуоресценции ThT регистрировали с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, США). Образцы БСА (1 мг/мл) были предварительно проинкубированы в течение 12 ч при 60, 65, 70 и 80 °С и охлаждены до комнатной температуры. Интенсивность флуоресценции несвязанного ThT и ThT, инкубированного с предварительно прогретым БСА (0,4 мг/мл) в течение 30 мин при комнатной температуре, измеряли при длине волны возбуждающего света 450 нм (ширина щели 5 нм).

2.2.13.3. Флуоресценция 8-аминонафталин-1-сульфоновой кислоты (АНС)

Спектры флуоресценции АНС регистрировали с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, США). Интенсивность флуоресценции свободной АНС (конечная концентрация 40 мМ) измеряли при длине волны возбуждающего света 445 нм (ширина щели 5 нм). Интенсивность флуоресценции АНС (конечная концентрация 10 мкМ), проинкубированной в течение 1 часа при комнатной температуре с нативным БСА (0,1 мг/мл) и неагрегированным денатурированным БСА (0,1 мг/мл), измеряли при длине волны возбуждающего света 380 нм (ширина щели 5 нм).

2.2.14. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)

Эксперименты по трансмиссионной электронной микроскопии проводили совместно с к.б.н. В.А. Штейн-Марголиной (лаборатория структурной биохимии белка, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук).

Аликвоты БСА добавляли к предварительно прогретому 0,1 М Na-фосфатному буферу, pH 7,0, до конечной концентрации белка 1 мг/мл и инкубировали при 65 °С в течение 110 или 330 мин. Образцы охлаждали до комнатной температуры и диализовали против деионизованной воды при 4–8 °С в течение 16 часов. Отдельно отобранные аликвоты каждого образца БСА разбавили деионизованной водой в 100 раз.

Капли разбавленных и неразбавленных образцов БСА наносили на покрытые углеродом медные сетки. К некоторым образцам добавляли капли раствора, содержащего вирус табачной мозаики, как объект с известным диаметром (15–18 нм). Избыток жидкости удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Сетки, содержащие неразбавленный образец, дополнительно промывали в капле деионизованной воды.

Сетки контрастировали 2% (w/v) фосфорновольфрамовой кислотой, pH 7,2 (избыток раствора удаляли фильтровальной бумагой) и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Изображения с увеличением в 30000 раз были получены с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEOL-JEM100-CX при ускоряющем напряжении 80 кВ.

2.2.15. Спектроскопия кругового дихроизма (КД)

Эксперименты по спектроскопии кругового дихроизма проводили совместно с к.б.н. В.В. Шубиным (лаборатория биохимии хлоропластов, Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук). Спектры кругового дихроизма и спектры поглощения необработанного раствора БСА и денатурированного неагрегированного БСА в интервале длин волн 185–320 нм (с шагом 0,5 нм) получали с помощью спектрометра Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания). Использовали ширину щели 1,5 нм, длина оптического пути была равна 0,1 см. Все измерения проводили в 0,01 М Na-фосфатном буфере, pH 7,0. Точную концентрацию белка определяли, используя коэффициенты поглощения пептидной связи при 205, 210 и 215 нм [Kelly, et al., 2005]. Все измерения проводили при 20 °С. Содержание элементов вторичной структуры вычисляли с помощью программного обеспечения, доступного онлайн на сервере DichroWeb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>). Для вычислений использовали алгоритмы анализа CONTIN [Provencer & Glockner, 1981] и SELCON [Sreerama & Woody, 1993], с двумя наборами белков (set 3 и SP175, 190–240).

2.2.16. Измерение дзета-потенциала

Дзета-потенциал нативного БСА и денатурированного неагрегированного БСА измеряли с помощью прибора Photocor Compact-Z (Photocor Instruments, Inc., США). В качестве источника света использовали лазер с длиной волны 654 нм. Измерения проводили при значении напряжения электрического поля 5 В/см и 23 °С в цилиндрических стеклянных виалах с одноразовыми золотыми электродами. Расстояние между электродами составляло 0,4 см. Рассеянный свет собирали под углом 20°, время накопления автокорреляционной функции доплеровского сигнала составляло 40-80 с. Концентрация БСА во всех экспериментах была равна 1 мг/мл (0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0).

2.2.17. Вычисления

Для вычислений использовали программу OriginPro 8.0 SR0 (OriginLab Corporation, США). Для характеристики соответствия между экспериментальными данными и расчетными величинами использовали коэффициент смешанной корреляции R^2 (без учета статистического веса результатов измерений):

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (Y_i^{\text{obs}} - \bar{Y}^{\text{obs}})^2 - \sum_{i=1}^{i=n} (Y_i^{\text{obs}} - Y_i^{\text{calc}})^2}{\sum_{i=1}^{i=n} (Y_i^{\text{obs}} - \bar{Y}^{\text{obs}})^2}, \quad (2.29)$$

где $\bar{Y}^{\text{obs}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} Y_i$ – среднее экспериментальных данных (Y_i^{obs}), Y_i^{calc} – теоретически вычисленное значение функции Y , n – число измерений.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Теория. Количественная оценка шапероноподобной активности

3.1.1. Определение начальной скорости агрегации белка

Для оценки антиагрегационной активности шаперонов нужно сравнить начальную скорость агрегации модельного белка-мишени в присутствии и в отсутствие шаперона. Белковые агрегаты обладают большей способностью к рассеиванию света, чем неагрегированные молекулы белка, поэтому при изучении влияния молекулярных шаперонов на агрегацию белков-мишеней для регистрации кинетики агрегации широко используются методы, основанные на измерении интенсивности светорассеяния (I) или кажущейся оптической плотности (A) в видимой области. Достоинством этих методов является возможность непрерывной регистрации кинетических кривых.

Шапероноподобную активность α -кристаллина обычно оценивают путем измерения шаперонной эффективности (chaperone efficiency, CE), которая определяется как процент защитного действия по отношению к денатурированному субстрату и рассчитывается по следующему уравнению [Raman & Rao, 1994; Palmieri, et al., 2013]:

$$CE = \frac{I_s(t^*) - I_{sa}(t^*)}{I_s(t^*)} 100\%, \quad (3.1)$$

где $I_s(t^*)$ – интенсивность светорассеяния для белкового субстрата при $t = t^*$ (например, при $t^* = 60$ или 80 мин), и $I_{sa}(t^*)$ – интенсивность светорассеяния для того же субстрата в присутствии α -кристаллина при $t = t^*$. Такой способ оценки антиагрегационной активности α -кристаллина имеет существенный недостаток. Параметры $I_s(t^*)$ и $I_{sa}(t^*)$ обычно относятся к разным участкам кинетических кривых агрегации. Значение $I_s(t^*)$ может относиться к области предельных значений интенсивности светорассеяния, тогда как значение $I_{sa}(t^*)$ может соответствовать начальному участку кинетической кривой.

Б.И. Курганов предложил описывать начальные участки кинетических кривых агрегации, зарегистрированных по увеличению интенсивности светорассеяния (I), эмпирическим уравнением следующего вида [Курганов, 1998]:

$$I = I_0 + \text{const} (t - t_0)^2, \quad (t > t_0) \quad (3.2)$$

или

$$A = A_0 + \text{const} (t - t_0)^2, \quad (t > t_0) \quad (3.3)$$

где I_0 и A_0 — начальные значения интенсивности светорассеяния и кажущейся оптической плотности, соответственно, при $t = 0$ и t_0 — продолжительность лаг-периода на кинетической кривой (t_0 — момент времени, в который интенсивность светорассеяния или кажущаяся оптическая плотность начинает возрастать). Стоит отметить, что визуальное установление длительности лаг-периода практически невозможно, тогда как использование уравнений (3.2) или (3.3) позволяет надежно определить продолжительность лаг-периода. Константа из данных уравнений может использоваться как мера начальной скорости агрегации.

Запишем уравнение (3.2) следующим образом:

$$I = I_0 + [K_{LS}(t - t_0)]^2, \quad (t > t_0) \quad (3.4)$$

В этом эмпирическом уравнении K_{LS} — константа, которую можно рассматривать как меру начальной скорости агрегации. Зависимость I от времени можно линеаризовать в координатах $\{(I - I_0)^{0.5}; t\}$ в соответствии со следующим уравнением:

$$(I - I_0)^{0.5} = K_{LS}(t - t_0). \quad (3.5)$$

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 .

В некоторых случаях на кинетических кривых агрегации белка-мишени может наблюдаться протекающее во времени начальное снижение интенсивности светорассеяния в присутствии шаперона, например, α -кристаллина. Такой характер кинетических кривых продемонстрирован для тепловой агрегации цитратсинтазы при 43°C [Bhattacharyya, et al., 2007] и β -амилоида при 60°C [Sgarbossa, et al., 2008]. Повышенные температуры индуцируют диссоциацию α -кристаллиновых частиц и, соответственно, уменьшение интенсивности рассеяния света, что объясняет необычную кинетику агрегации на начальных участках. Данные, полученные ранее в лаборатории структурной биохимии белка ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН [Khanova, et al., 2007; Meremyanin, et al., 2008; Chebotareva, et al., 2009; Markossian, et al., 2010] подтверждают этот вывод. При снижении интенсивности светорассеяния на начальном участке кинетической кривой невозможно точное определение начального значения интенсивности (I_0). В таком случае применима дифференциальная форма уравнения (3.5):

$$dI/dt = 2K_{LS}^2(t - t_0), \quad (t > t_0) \quad (3.6)$$

Применимость квадратичного уравнения продемонстрирована для тепловой агрегации Phb [Курганов, 1998; Eronina, et al., 2009; Eronina, et al., 2010a; Eronina, et al., 2010b], ГАФД [Maloletkina, et al., 2009; Maloletkina, et al., 2010a; Maloletkina, et al., 2012] и

креатинкиназы [Maloletkina, et al., 2010b] из скелетных мышц кролика и ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина [Bumagina, et al., 2010b] и инсулина [Bumagina, et al., 2010a].

Следующий шаг в предлагаемом подходе состоит в установлении соотношения между параметром K_{LS} , который рассчитывается из начальных участков кинетических кривых агрегации, и начальной концентрацией белка-мишени $[P]_0$. На основании анализа экспериментальных зависимостей K_{LS} от начальной концентрации белка-мишени $[P]_0$ для ряда белков-мишеней [Курганов, 1998; Khanova, et al., 2005; Sabbaghian, et al., 2009] можно полагать, что достаточно хорошей аппроксимацией является степенная функция:

$$K_{LS} = \text{const}[P]_0^a. \quad (3.7)$$

Из уравнения (3.7) следует, что $(K_{LS})^{1/a}$ является линейной функцией $[P]_0$:

$$(K_{LS})^{1/a} = \text{const}[P]_0. \quad (3.8)$$

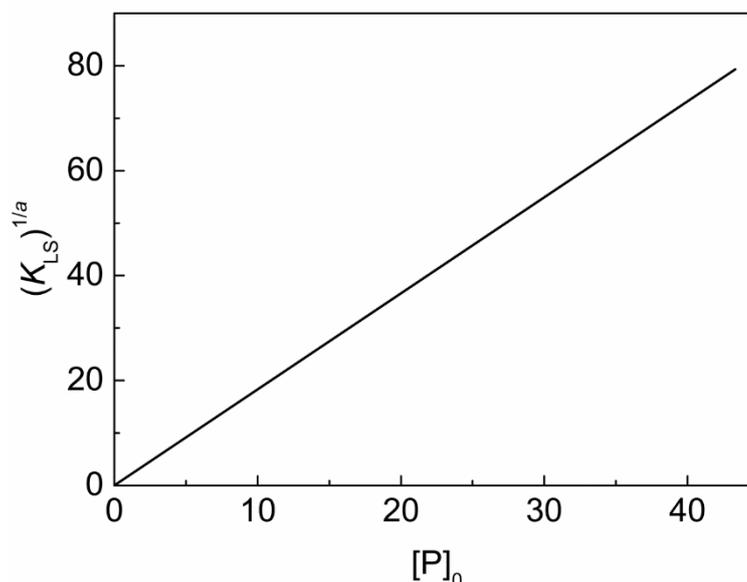


Рис. 3.1. Линейное соотношение между $(K_{LS})^{1/a}$ и $[P]_0$.

Линейное соотношение между $(K_{LS})^{1/a}$ и $[P]_0$ (рис. 3.1) является *ключевым* при разработке методов количественной оценки антиагрегационной активности шаперонов. Это соотношение аналогично таковому между начальной скоростью ферментативной реакции и начальной концентрацией белка при описании кинетики ферментативных реакций [Webb, 1963].

3.1.2. Оценка антиагрегационной активности химических шаперонов

Обсудим использование линейного соотношения между $(K_{LS})^{1/a}$ и $[P]$ для количественной оценки антиагрегационной активности химических шаперонов, образующих обратимо диссоциирующие комплексы с белком-мишенью. Допустим, что комплекс химического шаперона (L) с белком-мишенью теряет способность к агрегации. Иначе говоря, при насыщении белка-мишени химическим шапероном скорость агрегации становится равной нулю. Это допущение легко проверяется экспериментально и на нем строится анализ влияния химического шаперона на агрегацию белка-мишени. Обозначим через $(K_{LS,0})^{1/a}$ значение $(K_{LS})^{1/a}$ в отсутствие химического шаперона. 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, т.е. до величины «концентрации полунасыщения» $[L]_{0,5}$, происходит при уменьшенной в два раза величине $(K_{LS,0})^{1/a}$. Таким образом, при $[L] = [L]_{0,5}$ имеем: $(K_{LS})^{1/a} = (K_{LS,0})^{1/a}/2$.

Поскольку химический шаперон образует обратимо диссоциирующие комплексы с белком-мишенью, можно ожидать, что зависимость скорости агрегации от концентрации химического шаперона будет гиперболической:

$$v = \frac{v_0}{1 + [L]/K_d} \text{ или } \frac{v}{v_0} = \frac{1}{1 + [L]/K_d}, \quad (3.9)$$

где v – начальная скорость агрегации белка-мишени, v_0 – начальная скорость агрегации в отсутствие шаперона, K_d – константа диссоциации комплекса химический шаперон – белок-мишень.

Уравнение (3.9) можно записать с использованием отношения $(K_{LS})^{1/a}/(K_{LS,0})^{1/a}$:

$$\frac{(K_{LS})^{1/a}}{(K_{LS,0})^{1/a}} = \left(\frac{K_{LS}}{K_{LS,0}} \right)^{1/a} = \frac{1}{1 + [L]/[L]_{0,5}}. \quad (3.10)$$

Заметим, что параметр $[L]_{0,5}$ соответствует константе диссоциации комплекса шаперон–белок-мишень. Предполагается, что молярная концентрация химического шаперона существенно превышает молярную концентрацию шаперон-связывающих центров.

Следует учитывать возможные отклонения от гиперболического закона, например, в случае неэквивалентных центров связывания химического шаперона на поверхности белка-мишени или при кластеризации молекул химического шаперона в локусе

связывания на поверхности белка-мишени, что можно ожидать в случае аргинина [Vagenende, et al., 2013]. Поэтому в общем случае для нахождения концентрации полунасыщения $[L]_{0,5}$ можно использовать уравнение Хилла (рис. 3.2) [Kurganov, 1982]:

$$\frac{(K_{LS})^{1/a}}{(K_{LS,0})^{1/a}} = \left(\frac{K_{LS}}{K_{LS,0}} \right)^{1/a} = \frac{1}{1 + ([L]/[L]_{0,5})^h}. \quad (3.11)$$

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

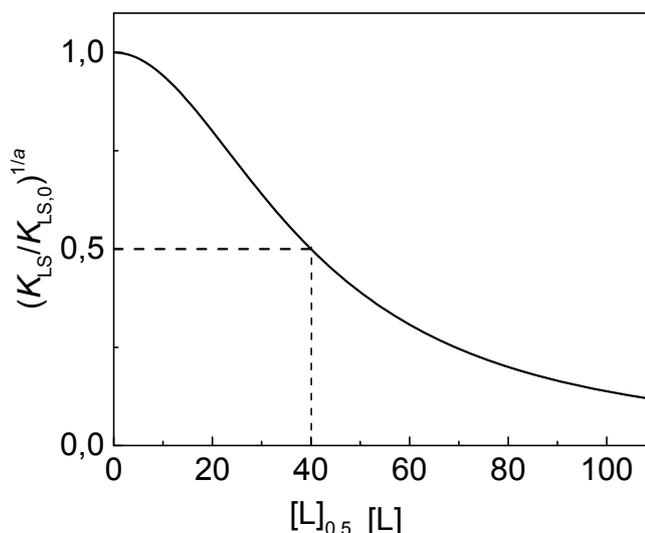


Рис. 3.2. Подавление агрегации белка-мишени химическим шапероном (L). $[L]_{0,5}$ – концентрация полунасыщения, при которой относительная начальная скорость агрегации $(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/a} = 0,5$.

Важно отметить, что при сделанных допущениях форма зависимости начальной скорости агрегации от концентрации шаперона и величина $[L]_{0,5}$ не должны зависеть от начальной концентрации белка-мишени.

3.1.3. Оценка антиагрегационной активности белковых шаперонов

Обсудим использование параметра $(K_{LS})^{1/a}$ для количественной оценки антиагрегационной активности белкового шаперона. Основное допущение при анализе эффективности действия белкового шаперона состоит в том, что комплекс белковый шаперон–белок-мишень является достаточно прочным. Константы диссоциации для комплекса шаперон–белок-мишень составляют несколько наномоль на литр [Maug, et al., 2000]. 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.

Как и в случае химического шаперона допустим, что комплексообразование белка-мишени с шапероном приводит к полному блокированию процесса агрегации. Это означает, что связывание белка-мишени шапероном приводит к уменьшению концентрации свободного белка-мишени и к пропорциональному снижению величины $(K_{LS})^{1/a}$. Относительная скорость агрегации $(K_{LS})^{1/a}/(K_{LS,0})^{1/a}$ определяется соотношением концентраций шаперона и белка-мишени, $[\text{шаперон}]/[\text{белок-мишень}]$. Если комплексообразование приводит к образованию комплекса определенного состава, то зависимость $(K_{LS})^{1/a}/(K_{LS,0})^{1/a}$ от отношения $[\text{шаперон}]/[\text{белок-мишень}]$ является линейной (рис. 3.3А).

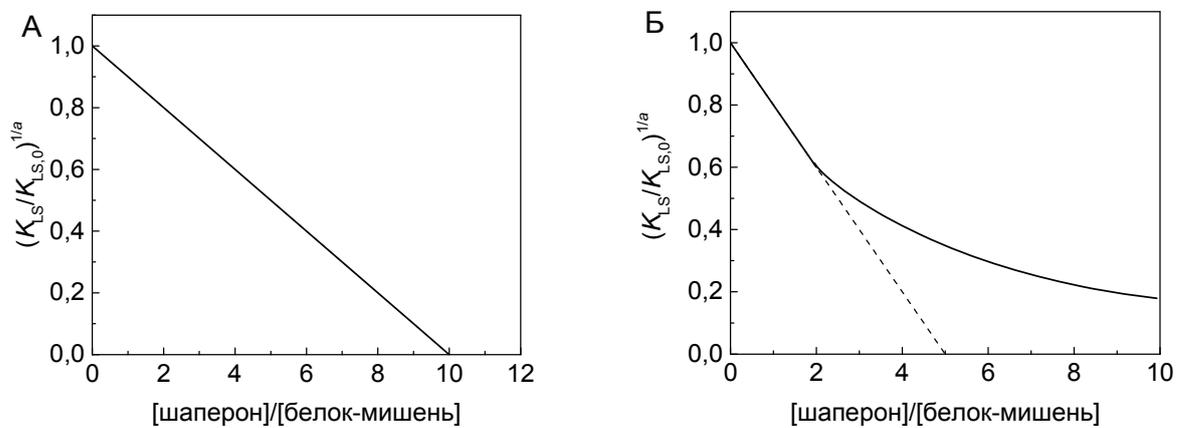


Рис. 3.3. Подавление агрегации белка-мишени белковым шапероном: (А) случай, когда образуется комплекс шаперон–белок-мишень постоянного состава; (Б) случай, когда образуются комплексы переменного состава.

Следует, однако, учитывать, что малые белки теплового шока обладают динамичной четвертичной структурой, и стехиометрия образующихся комплексов меняется при варьировании отношения $[\text{шаперон}]/[\text{белок-мишень}]$. Это приводит к нелинейной зависимости $(K_{LS})^{1/a}/(K_{LS,0})^{1/a}$ от отношения $[\text{шаперон}]/[\text{белок-мишень}]$ (рис. 3.3Б). Начальный линейный участок этой зависимости соответствует комплексам диссоциированных форм sHSP с белком-мишенью. Для оценки антиагрегационной активности предлагается использовать линейный участок зависимости $(K_{LS})^{1/a}/(K_{LS,0})^{1/a}$ от отношения $[\text{шаперон}]/[\text{белок-мишень}]$:

$$\frac{(K_{LS})^{1/a}}{(K_{LS,0})^{1/a}} = \left(\frac{K_{LS}}{K_{LS,0}} \right)^{1/a} = 1 - x / AC_0, \quad (3.12)$$

где x – отношение [шаперон]/[белок-мишень], AC_0 – адсорбционная емкость шаперона по отношению к белку мишени.

На начальном участке зависимости $(K_{LS})^{1/a}/(K_{LS,0})^{1/a}$ от отношения [шаперон]/[белок-мишень] адсорбционная емкость постоянна. Нелинейный участок соответствует формированию комплексов sHSP – белок-мишень с меньшей адсорбционной емкостью шаперона по отношению к белку-мишени.

Таким образом, для оценки эффективности подавления агрегации белка-мишени белковым шапероном может использоваться адсорбционная емкость шаперона по отношению к белку-мишени, рассчитываемая в соответствии с уравнением (3.12).

Необходимо отметить следующее обстоятельство. Если белок-мишень используемой тест-системы представлен денатурированной формой белка (например, белком, денатурированным ультрафиолетовым светом), то предлагаемый способ расчета адсорбционной емкости (AC_0) дает истинное значение числа денатурированных молекул, способных связаться с субъединицей шаперона. Однако если белок-мишень используемой тест-системы в начальный момент времени представлен нативной формой белка, которая претерпевает денатурационные изменения с последующей агрегацией денатурированных молекул, то мы получаем завышенное значение AC_0 , т.е. завышенное значение числа денатурированных молекул, способных связаться с субъединицей шаперона. Важно отметить, что рассчитываемую предлагаемым способом адсорбционную емкость шаперона по отношению к белку-субстрату (AC_0) предлагается использовать, в первую очередь, для сопоставления антиагрегационной активности различных шаперонов или для оценки изменения антиагрегационной активности исследуемого шаперона при его модификации (например, при химической модификации или повреждении ультрафиолетовым светом).

3.1.4. 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:

$$v = \left(\frac{d[P]_{\text{agg}}}{dt} \right)_0 = \text{const}[P]_0^n. \quad (3.13)$$

В этом выражении $[P]_{\text{agg}}$ – концентрация агрегированного белка.

Представим уравнение (3.13) в следующем виде:

$$(v)^{1/n} = \text{const}[P]_0. \quad (3.14)$$

Из сопоставления уравнения (3.14) с уравнением (3.8) получаем

$$(v)^{1/n} = \text{const}(K_{\text{LS}})^{1/a}. \quad (3.15)$$

Из этого уравнения видно, что при $n = a$ параметр K_{LS} можно рассматривать как меру начальной скорости агрегации ($v = \text{const} \cdot K_{\text{LS}}$). Если $n \neq a$, параметр K_{LS} пропорционален $v^{a/n}$.

При использовании относительной начальной скорости агрегации ($v = v_0$, где v_0 – значение начальной скорости агрегации в отсутствие шаперона) и относительного значения параметра K_{LS} , соотношение (3.15) может быть переписано следующим образом:

$$\left(\frac{v}{v_0} \right)^{1/n} = \left(\frac{K_{\text{LS}}}{K_{\text{LS},0}} \right)^{1/a}. \quad (3.16)$$

На основании вышесказанного можно заключить, что для количественной оценки антиагрегационной активности шаперонов может быть использована относительная величина параметра K_{LS} , а именно $(K_{\text{LS}}/K_{\text{LS},0})^{1/a}$. На первый взгляд, определение порядка агрегации по белку необязательно. Однако, на самом деле, знание порядка агрегации по белку важно для установления кинетического режима процесса агрегации и для интерпретации полученных данных по оценке эффективности действия шаперонов.

Анализ зависимости начальной скорости агрегации от начальной концентрации белка-мишени, $[P]_0$, позволяет определить порядок агрегации по белку и сделать вывод о скорость-лимитирующей стадии процесса агрегации

При интерпретации влияния шаперона на скорость агрегации белка-мишени, необходимо понимать, в каком кинетическом режиме протекает процесс агрегации. Условно тест-системы могут быть разделены на два типа. Один из типов соответствует кинетическому режиму, в котором скорость-лимитирующей стадией является стадия разворачивания белка ($n = 1$, системы типа А). Другой тип соответствует кинетическому режиму, в котором скорость-лимитирующей стадией общего процесса агрегации является стадия агрегации развернутого белка ($n > 1$, системы типа В).

Рассмотрим действие агентов, способных формировать обратимо диссоциирующие комплексы с белком-мишенью. При использовании системы типа А нужно понимать, что

агенты, оказывающие какое-либо влияние на стабильность нативной формы белка-мишени, будут вследствие этого влиять на начальную скорость агрегации. Вещества, стабилизирующие структуру белка, будут замедлять агрегацию, тогда как дестабилизирующие – ускорять ее. Для правильной интерпретации влияния разных агентов на агрегацию белка-мишени, необходимы дополнительные эксперименты по изучению стабильности белка в присутствии данных агентов. Стоит отметить, что системы типа А могут быть использованы для скрининга лигандов, специфически взаимодействующих с белками, на основе измерения скорости агрегации в присутствии изучаемых лигандов [Senisterra, et al., 2006; Senisterra, et al., 2010; Eronina, et al., 2011; Kurganov, 2013].

При использовании системы типа В наблюдаемые эффекты характеризуют прямое влияние изучаемого агента на стадию агрегации. Например, Шах с соавторами изучали влияние аргинина на тепловую агрегацию БСА при 90 °С [Shah, et al., 2011]. Было показано, что относительно низкие концентрации аргинина усиливают тепловую агрегацию БСА, тогда как высокие концентрации аргинина подавляют процесс агрегации. Двойной эффект аргинина был также показан Смирновой с соавторами [Smirnova, et al., 2013b] при изучении ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина.

Что касается шаперонов белковой природы, формирующих прочные комплексы с белком-мишенью, они будут проявлять антиагрегационную активность во всех тест-системах, независимо от того, какая стадия общего процесса агрегации (разворачивание белка или слипание развернутых белковых молекул) является скоростью-лимитирующей.

Для преодоления затруднений в интерпретации механизма подавления агрегации белков молекулярными шаперонами, предлагается использовать тест-системы на основе тепловой агрегации белков, денатурированных ультрафиолетовым излучением [Roman, et al., 2011; Maloletkina, et al., 2012; Roman, et al., 2012]. Преимуществом таких тест-систем (тип С) является возможность оценить влияние шаперонов напрямую на агрегацию белка-мишени. Эффективность подавления агрегации химическим шапероном в тест-системе типа А определяется его сродством к нативной форме белка-мишени, тогда как в случае тест-системы типа С определяющим является сродство химического шаперона к развернутой форме белка-мишени.

Целесообразно отметить, что в случае тепловой агрегации белков-мишеней, повышение температуры может привести к смене кинетического режима и переходу в кинетический режим типа В при высоких температурах [Fedurkina, et al., 2006; Shah, et al., 2011].

Подводя итог, при анализе антиагрегационной активности молекулярных шаперонов, необходимо принимать во внимание кинетический режим агрегации для используемой тест-системы. Это справедливо как в случае тест-систем на основе разворачивания белка и последующей агрегации развернутых белковых молекул, так и в случае тест-систем на основе агрегации, сопровождающей рефолдинг белка-мишени после денатурации мочевиной или GdnHCl.

3.2 Экспериментальные результаты

3.2.1. Механизм тепловой агрегации БСА

Для изучения кинетики тепловой денатурации БСА в 0,1 М Na-фосфатном буфере рН 7,0 использовали метод ДСК. На рис. 3.4 в качестве примера показаны результаты изучения термостабильности БСА при 60 °С.

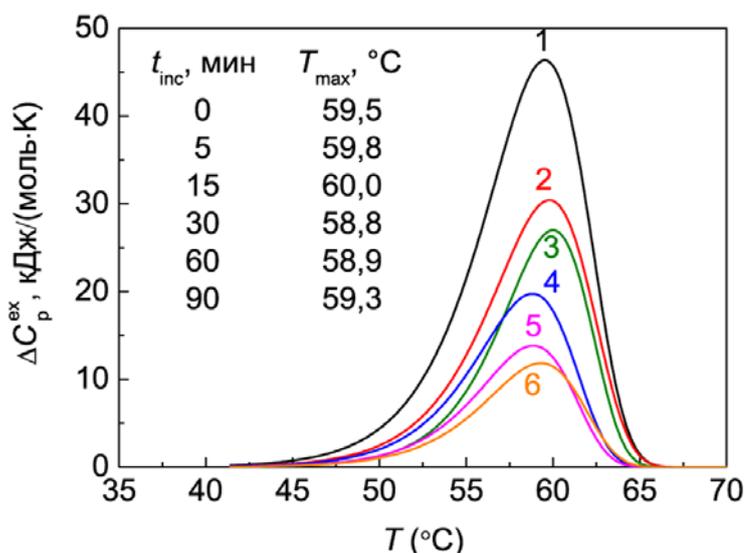


Рис. 3.4. Профили ДСК для БСА (1 мг/мл), предварительно прогретого при 60 °С. Зависимости избыточной удельной теплоемкости (ΔC_p^{ex}) от температуры для БСА, предварительно прогретого при 60 °С в течение разных промежутков времени (t_{inc}): 0 мин (1), 5 мин (2), 15 мин (3), 30 мин (4), 60 мин (5) и 90 мин (6). В таблице на вставке даны значения T_{max} .

Кривая 1 на этом рисунке соответствует профилю ДСК для исходного препарата БСА. Положение максимума (T_{max}) на зависимости избыточной теплоемкости от температуры составляет $59,5 \pm 0,1$ °С. Растворы БСА прогревали при 60 °С в течение интервалов времени от 0 до 90 мин. Предварительно прогретые растворы охлаждали до комнатной температуры. Количество белка, оставшегося в нативном состоянии, определяли методом ДСК. Кривые 2-6 на рис. 3.4 соответствуют профилям ДСК для предварительно прогретых образцов БСА. Значения T_{max} для этих профилей ДСК попадают в интервал от 58,8 до 60,0 °С (см. вставку на рис. 3.4) и, таким образом, близки к значению T_{max} для необработанного образца БСА. 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.

Зависимость γ_{nat} от времени, демонстрирующая кинетику необратимой денатурации БСА при 60 °С, 65 °С, 70 °С и 80 °С, представлена на рис. 3.5. Эти зависимости описываются эмпирическим уравнением, содержащим две экспоненты:

$$\gamma_{\text{nat}} = B \cdot \exp(-k_{1,\text{den}} t) + (1 - B) \cdot \exp(-k_{2,\text{den}} t), \quad (3.17)$$

где B – амплитуда экспоненциального выражения, соответствующего константе скорости $k_{1,\text{den}}$. Значения параметров B , $k_{1,\text{den}}$ и $k_{2,\text{den}}$, вычисленные по уравнению (3.17), даны рядом с кривыми на рис. 3.5А-Г. Уравнение (3.17) может быть использовано для интерполяции значений γ_{nat} при разных временах. 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 $t_{0,5}^{\text{den}}$ в 12,7 раз (табл. 3.1).

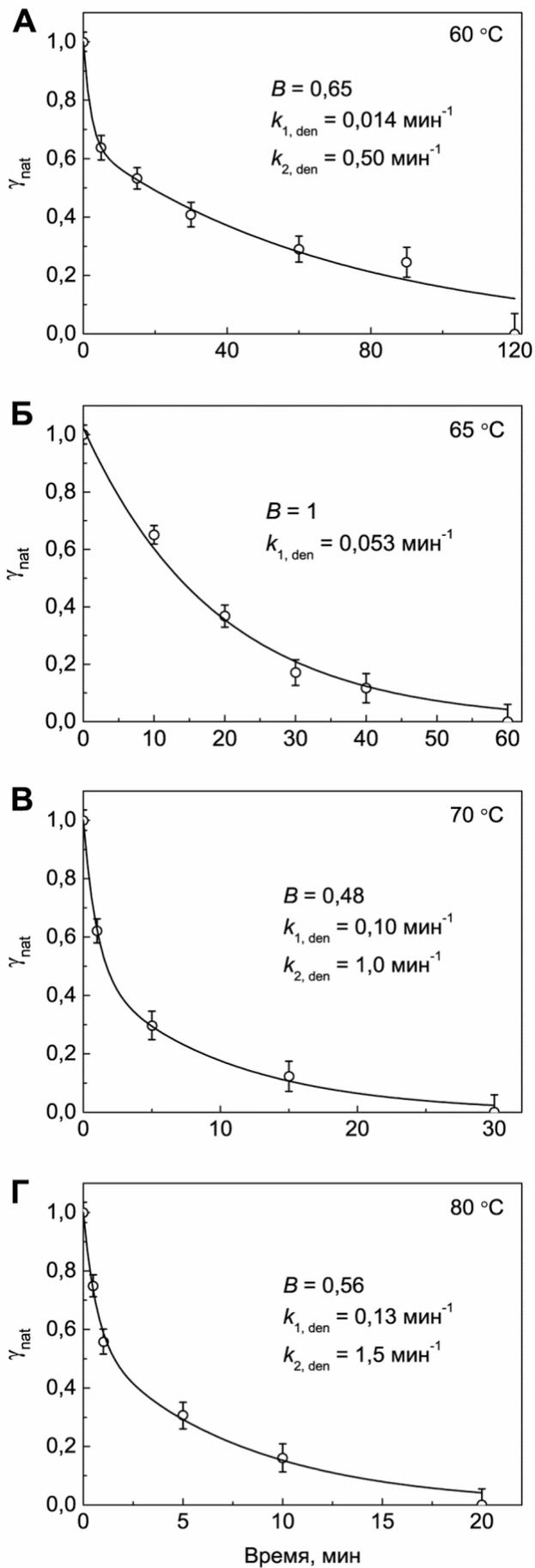


Рис. 3.5. Кинетика тепловой денатурации БСА (1 мг/мл) при 60 °C (А), 65 °C (Б), 70 °C (В) и 80 °C (Г). Зависимости доли нативного белка (γ_{nat}) от времени. Величина γ_{nat} была вычислена как соотношение Q/Q_0 (Q_0 и Q – теплоты денатурации, определенные из площадей под профилями ДСК). Сплошные кривые были рассчитаны по уравнению (3.17).

Таблица 3.1. Параметры тепловой денатурации и агрегации БСА ([БСА] = 1 мг/мл, 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0).

$T, ^\circ\text{C}$	$t_{0,5}^{\text{den}}, \text{min}$	$\gamma_{\text{non-agg,lim}}$	γ_{Uhr}	$\gamma_{\text{Ulr,agg}}$	$R_{h,1}, \text{nm}$	$R_{h,2}, \text{nm}$	$I_2, \text{counts/s}$
60	19±1	0,51±0,01	$\gamma_{\text{Uhr}} + \gamma_{\text{Ulr,agg}} = 0,49\pm0,01$		–	11,1±0,1	$(3,2\pm0,1)\cdot 10^3$
65	13,6±0,6	0,35±0,01	0,51±0,03	0,14±0,03	10,3±0,3	12,8±0,3	$(5,1\pm0,1)\cdot 10^3$
70	1,6±0,1	0,05±0,01	$\gamma_{\text{Uhr}} + \gamma_{\text{Ulr,agg}} = 0,95\pm0,01$		10,4±0,4	15,1±0,4	$(12,1\pm0,1)\cdot 10^3$
80	1,5±0,1	0,06±0,01	$\gamma_{\text{Uhr}} + \gamma_{\text{Ulr,agg}} = 0,94\pm0,01$		–	–	–

Обозначения: $t_{0,5}^{\text{den}}$ – время полупревращения для кинетических кривых денатурации БСА, $\gamma_{\text{non-agg,lim}}$ – доля не включенной в крупные агрегаты низкорекреационноспособной денатурированной формы (эта форма соответствует стабильным агрегатам небольшого размера на рис. 3.10), γ_{Uhr} – доля высокорекреационноспособной денатурированной формы, $\gamma_{\text{Ulr,agg}}$ – доля низкорекреационноспособной денатурированной формы, участвующей в формировании вторичных агрегатов, I_2 – значение интенсивности светорассеяния, достигаемое после завершения формирования вторичных агрегатов, $R_{h,1}$ и $R_{h,2}$ – гидродинамический радиус первичных и вторичных агрегатов, соответственно.

При изучении кинетики тепловой агрегации БСА долю неагрегированного белка ($\gamma_{\text{non-agg}}$) определяли методом АF₄. На рис. 3.6 показан профиль элюции БСА (1 мг/мл, 25 °С), зарегистрированный как зависимость сигнала УФ-детектора от времени. Как видно из рисунка, профиль образца имеет широкий интервал времени элюции, что указывает на полидисперсность размеров частиц БСА: на фрактограмме наблюдали три отдельных пика. Согласно значениям молярной массы, полученным из данных многоуглового светорассеяния, пики соответствовали мономерной ($M_r = 64,5$ кДа), димерной ($M_r = 101,2$ кДа) и тримерной формам БСА. Деконволюция пиков дала следующие значения долей мономера, димера и тримера: 0,85, 0,14 и 0,01 соответственно.

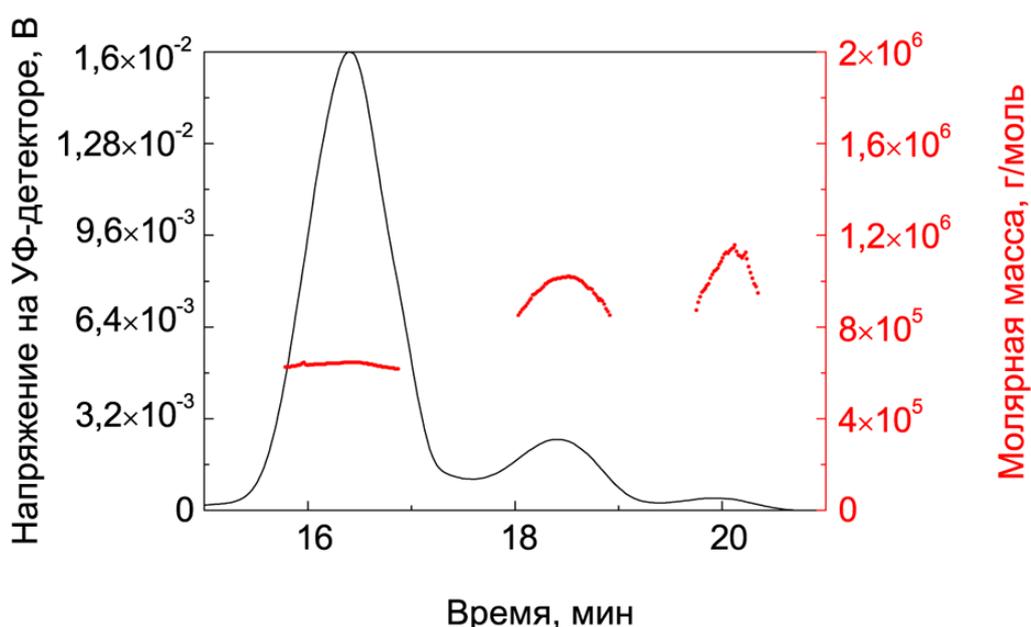


Рис. 3.6. Фрактограмма интактного БСА (1 мг/мл). График зависимости молярной массы от времени элюции (показан красным цветом) наложен на фрактограмму, полученную с помощью УФ-детектора (показана черным цветом).

В качестве примера на рис. 3.7 показаны фрактограммы интактного БСА (кривая 1) и БСА, предварительно прогретого при 65 °С в течение разных интервалов времени (кривые 2-5).

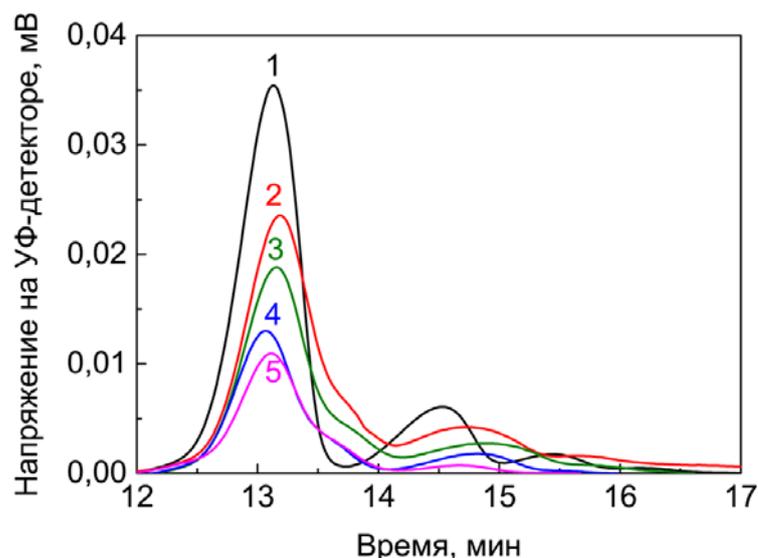


Рис. 3.7. Фрактограммы БСА (1 мг/мл), предварительно прогретого при 65 °С. Времена нагревания были следующими: 0 мин (1), 5 мин (2), 15 мин (3), 90 мин (4) и 600 мин (5).

Основной пик для интактного БСА соответствует мономерной форме. Два дополнительных пика соответствуют димерной и тримерной формам. Общая площадь под всеми пиками (в интервале времен элюции от 12 до 17 мин) дает количество интактного (неагрегированного) БСА. В случае предварительно прогретых образцов БСА белок, количество которого соответствует площади под фрактограммой в упомянутом выше интервале времен элюции, был по умолчанию назван «неагрегированным». Очевидно, что это белок, не включенный в агрегаты большого размера. Характеристики этого «неагрегированного белка» будут обсуждаться позднее.

Зависимости доли неагрегированного белка ($\gamma_{\text{non-agg}}$) от времени, полученные при 60 °С, 65 °С, 70 °С и 80 °С представлены на рис. 3.8.

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, обозначенные пунктирной линией на рис. 3.8А-Г, были найдены экстраполяцией $\gamma_{\text{non-agg}}$ к $t \rightarrow \infty$ 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. При повышении температуры инкубации с 60 °С до 80 °С, значение $\gamma_{\text{non-agg,lim}}$ снижается с 0,51 до 0,06 (Табл. 3.1).

Важная информация о начальной стадии агрегации БСА может быть получена из графиков зависимости доли агрегированного белка от доли денатурированного белка. Доля агрегированного белка (γ_{agg}) была вычислена как $(1 - \gamma_{\text{non-agg}})$, доля денатурированного белка (γ_{den}) была вычислена как $(1 - \gamma_{\text{nat}})$. На рис. 3.9 показаны графики зависимости γ_{agg} от γ_{den} , полученные при 60 °С, 65 °С, 70 °С и 80 °С.

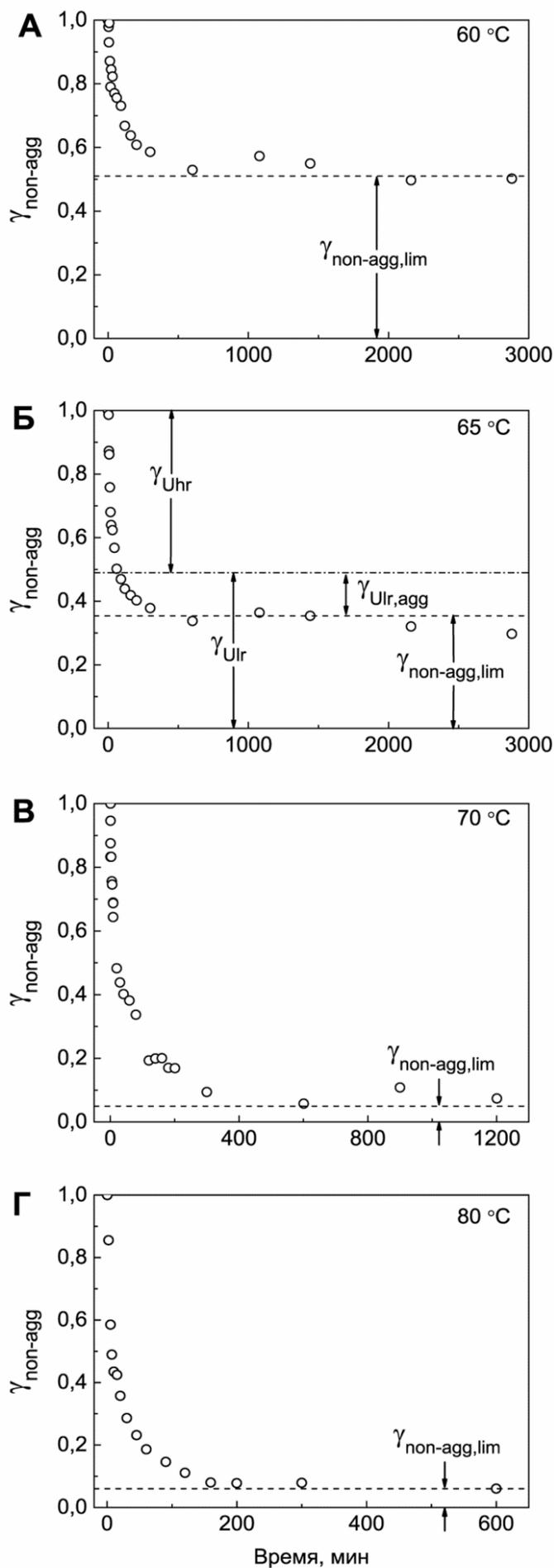


Рис. 3.8. Кинетика тепловой агрегации БСА (1 мг/мл) при 60 °C (А), 65 °C (Б), 70 °C (В) и 80 °C (Г). Зависимости доли неагрегированного белка от времени ($\gamma_{\text{non-agg}}$) от времени. Значения $\gamma_{\text{non-agg}}$ были вычислены из данных АФ₄. Пунктирные горизонтальные линии соответствуют значениям $\gamma_{\text{non-agg,lim}}$. Штрихпунктирная линия на рисунке Б соответствует значению $\gamma_{\text{Ulr}} = 1 - \gamma_{\text{Uhr}}$.

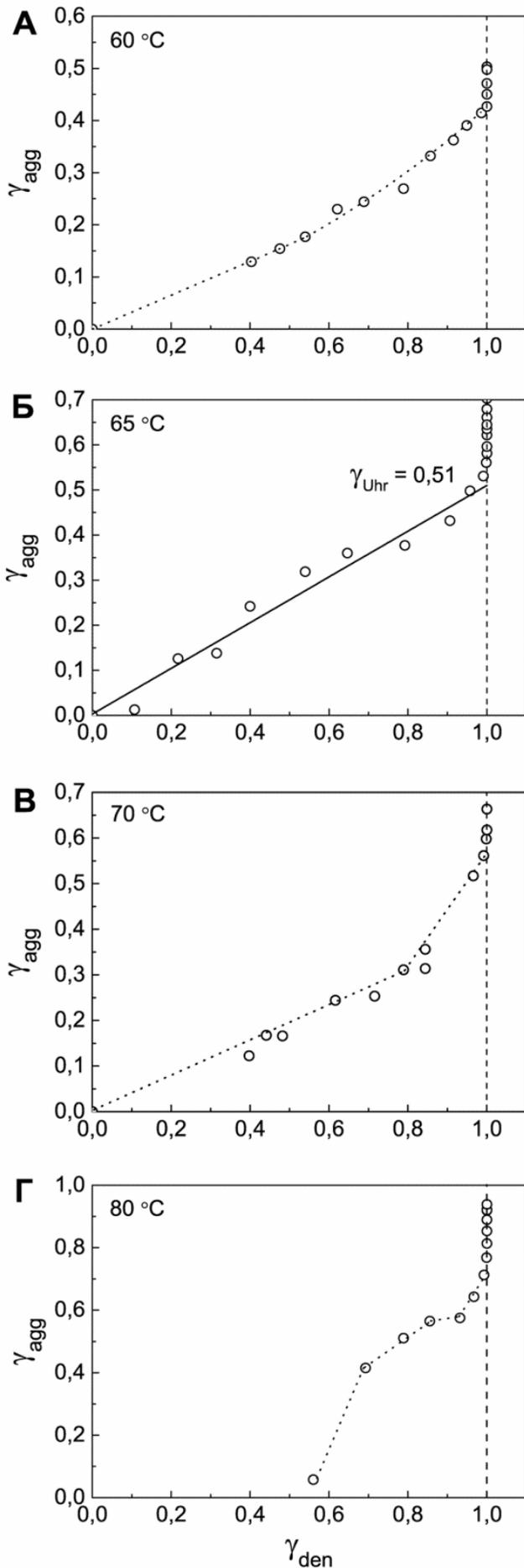


Рис. 3.9. Взаимосвязь между долей агрегированного белка (γ_{agg}) и денатурированного белка (γ_{den}). Графики γ_{agg} vs γ_{den} построены на основе анализа образцов, прогретых при 60 °C (А), 65 °C (Б), 70 °C (В) и 80 °C (Г). Концентрация БСА составляла 1 мг/мл. Значения $\gamma_{den} = 1 - \gamma_{nat}$ были вычислены по уравнению (3.17). Для каждой температуры были использованы параметры B , $k_{1,den}$ и $k_{2,den}$, показанные на соответствующих частях рис. 3.5. График γ_{agg} vs γ_{den} при 65 °C (рисунок Б) использовали для определения доли высокореакционноспособной формы БСА (γ_{Uhr}) при данной температуре.

Особое внимание стоит обратить на рис. 3.9Б (65 °С). При этой температуре зависимости γ_{agg} от γ_{den} линейна. Это означает, что развернутый белок быстро агрегирует без накопления в растворе (скорость агрегации существенно превосходит скорость денатурации). Отрезок, отсекаемый на вертикальной линии, проходящей через $\gamma_{den} = 1$, линейной зависимостью γ_{agg} от γ_{den} дает долю развернутого белка, участвующего в быстрой стадии агрегации ($\gamma_{U_{hr}}$, доля высокореакционноспособного развернутого белка). При 65 °С $\gamma_{U_{hr}}$ равна $0,51 \pm 0,03$ (табл. 3.1). Оставшийся белок ($1 - \gamma_{U_{hr}}$) вовлечен в процесс агрегации с относительно низкой скоростью и может быть обозначен как низкореакционноспособная 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 низкореакционноспособного развернутого белка, вовлеченного в формирование крупных агрегатов ($\gamma_{U_{lr,agg}}$) равна $1 - \gamma_{U_{hr}} - \gamma_{non-agg,lim} = 0,14$ (табл. 3.1).

Образование нескольких форм развернутого БСА в ходе инкубации при высоких температурах может происходить вследствие перестройки дисульфидных связей в молекуле БСА в процессе разворачивания белка [Rombouts, et al., 2015].

Предложена следующая схема тепловой агрегации БСА:

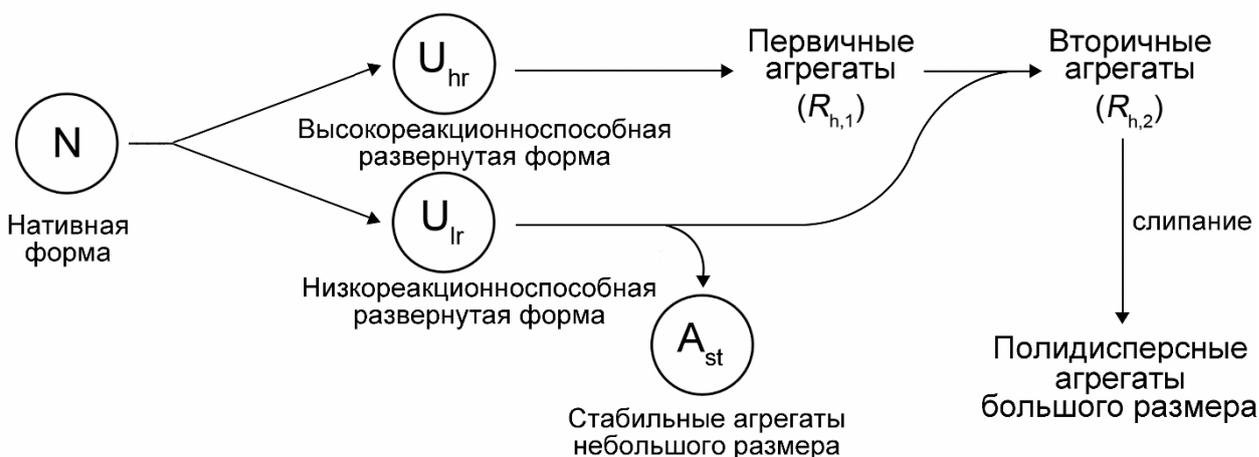


Рис. 3.10. Механизм тепловой агрегации БСА.

Первая стадия процесса агрегации – разворачивание нативной формы (N), приводящее к образованию двух форм денатурированного белка с различной склонностью к агрегации. Одна из форм (высокореакционноспособная форма, U_{hr}) характеризуется высокой скоростью агрегации; ее агрегация ведет к формированию первичных агрегатов с гидродинамическим радиусом ($R_{h,1}$). Вторая форма (низкореакционноспособная 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 – результат слипания вторичных агрегатов.

Дополнительная информация о кинетике тепловой агрегации БСА была получена методом динамического светорассеяния. Этот метод позволяет регистрировать изменения интенсивности рассеянного света и гидродинамического радиуса (R_h) белковых агрегатов в ходе агрегации. Целесообразно вначале обсудить зависимости R_h от времени. Эти зависимости представлены на рис. 3.11.

В случае тепловой агрегации БСА среднее значение гидродинамического радиуса белковых агрегатов возрастает во времени монотонно, и нет смысла предполагать образование стартовых агрегатов.

Как упомянуто выше, высокорекреационноспособная развернутая форма полностью переходит в агрегированное состояние на момент завершения денатурации. Полученные агрегаты называются первичными агрегатами (рис. 3.10). Для оценки гидродинамического радиуса первичных агрегатов ($R_{h,1}$), необходимо построить график зависимости R_h от доли денатурированного белка (γ_{den}). Эта процедура выполнима при 65 °С и 70 °С (рис. 3.12Б и В).

Отрезок, отсекаемый на вертикальной линии, проходящей через $\gamma_{den} = 1,0$, линейной зависимостью R_h от γ_{den} соответствует значению $R_{h,1}$: $R_{h,1} = 10,3 \pm 0,3$ нм при 65 °С и $R_{h,1} = 10,4 \pm 0,4$ нм при 70 °С. Стоит отметить, что при 60 °С и 80 °С (рис.3.12А и Г) определение размера первичных агрегатов невозможно.

Как указано выше, при 65 °С часть низкорекреационноспособной развернутой формы ($\gamma_{U_{lr,agg}}$) может вовлекаться в процесс агрегации путем присоединения к агрегатам большого размера. В рамках предложенного механизма 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 гетерогенная нуклеация [Ferrone, et al., 1985]. В этом случае ядро формируется на поверхности первичного агрегата, и рост агрегата продолжается в результате присоединения развернутых мономеров к гетерогенному ядру. Гетерогенная нуклеация может объяснить факт разделения во времени стадий формирования первичных и вторичных агрегатов. Последние данные литературы [Sahin, et al., 2016] подтверждают важность таких процессов, как последовательное присоединение мономеров к агрегатам и взаимодействие агрегатов друг с другом при тепловой агрегации БСА при 60-75 °С. Первичные агрегаты могут выступать как зародыши (seeds) при дальнейшем росте агрегатов.

Для вычисления гидродинамического радиуса вторичных агрегатов ($R_{h,2}$), необходимо построить график зависимости R_h от γ_{agg} . Значение ($\gamma_{U_{hr}} + \gamma_{U_{lr}}$) на оси абсцисс соответствует завершению стадии формирования вторичных агрегатов. Таким образом,

отрезок, отсекаемый линейной зависимостью R_h от γ_{agg} на вертикальной линии, проходящей через $\gamma_{agg} = (\gamma_{Uhr} + \gamma_{Ulr})$, дает значение $R_{h,2}$ ($11,1 \pm 0,1$ нм при 60°C , $12,8 \pm 0,3$ нм при 65°C и $15,1 \pm 0,4$ нм при 70°C ; рис. 3.13А-В, табл. 3.1).

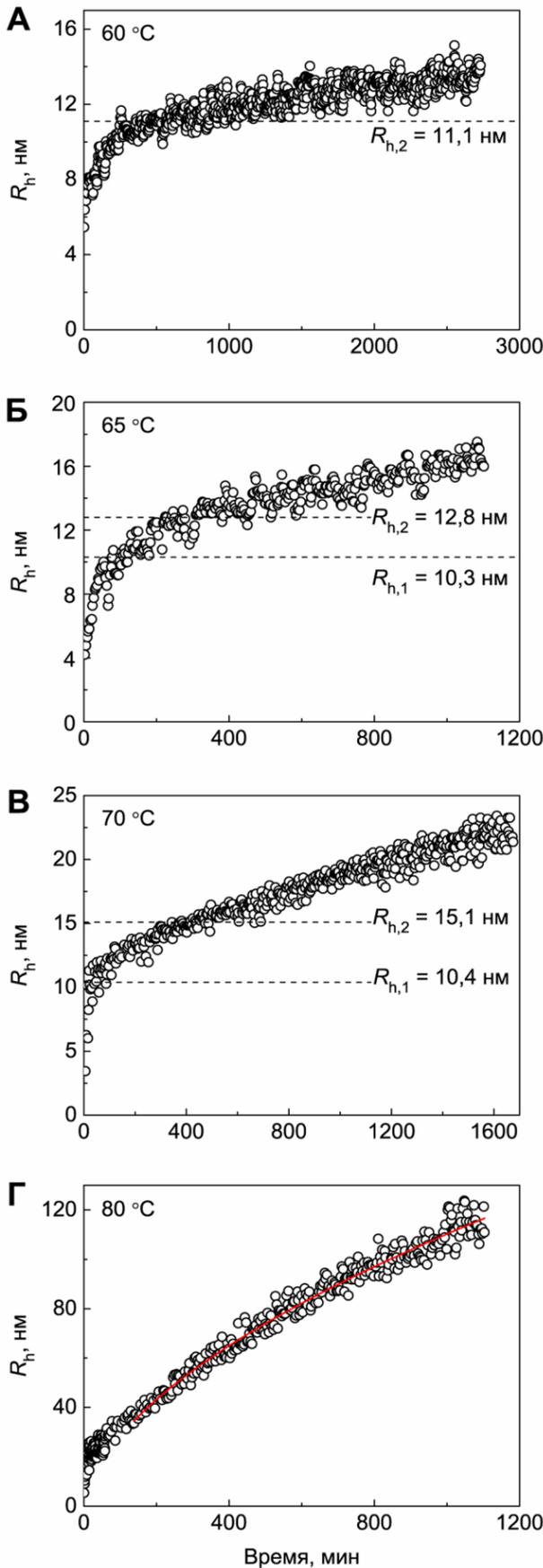


Рис. 3.11. Зависимость гидродинамического радиуса (R_h) от времени для агрегации БСА при 60°C (А), 65°C (Б), 70°C (В) и 80°C (Г). Концентрация БСА составляла 1 мг/мл. Пунктирные горизонтальные линии на рисунках А, Б и В соответствуют значениям $R_{h,1}$ и $R_{h,2}$, вычисленным из зависимостей R_h от долей денатурированного и агрегированного БСА, соответственно. Сплошная кривая на рисунке Г была рассчитана по уравнению (3.18) при $d_f = 1,76$.

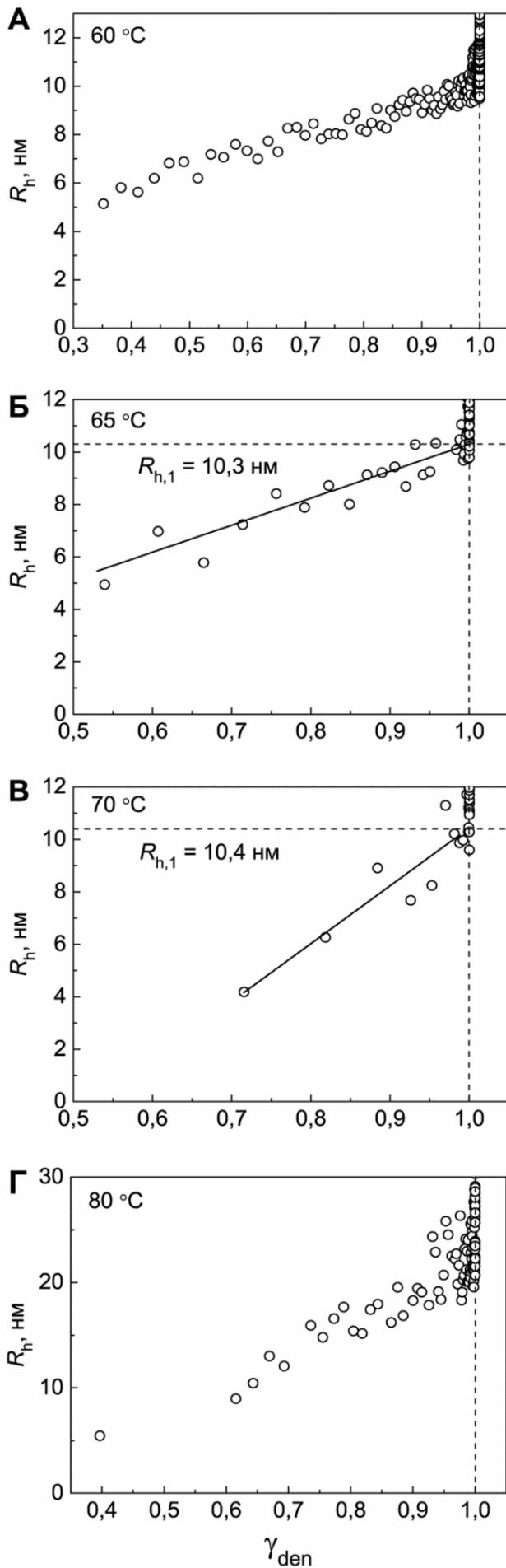


Рис. 3.12. Зависимости гидродинамического радиуса (R_h) от доли денатурированного белка (γ_{den}) для агрегации БСА при 60 °С (А), 65 °С (Б), 70 °С (В) и 80 °С (Г). Концентрация БСА составляла 1 мг/мл. Значения γ_{den} были вычислены из уравнения (3.17). Для каждой температуры были использованы параметры B , $k_{1,den}$ и $k_{2,den}$, показанные на соответствующих частях рис. 3.5. Графики R_h vs γ_{den} при 65 °С и 70 °С (рисунки Б и В) использовали для определения гидродинамического радиуса первичных агрегатов ($R_{h,1}$).

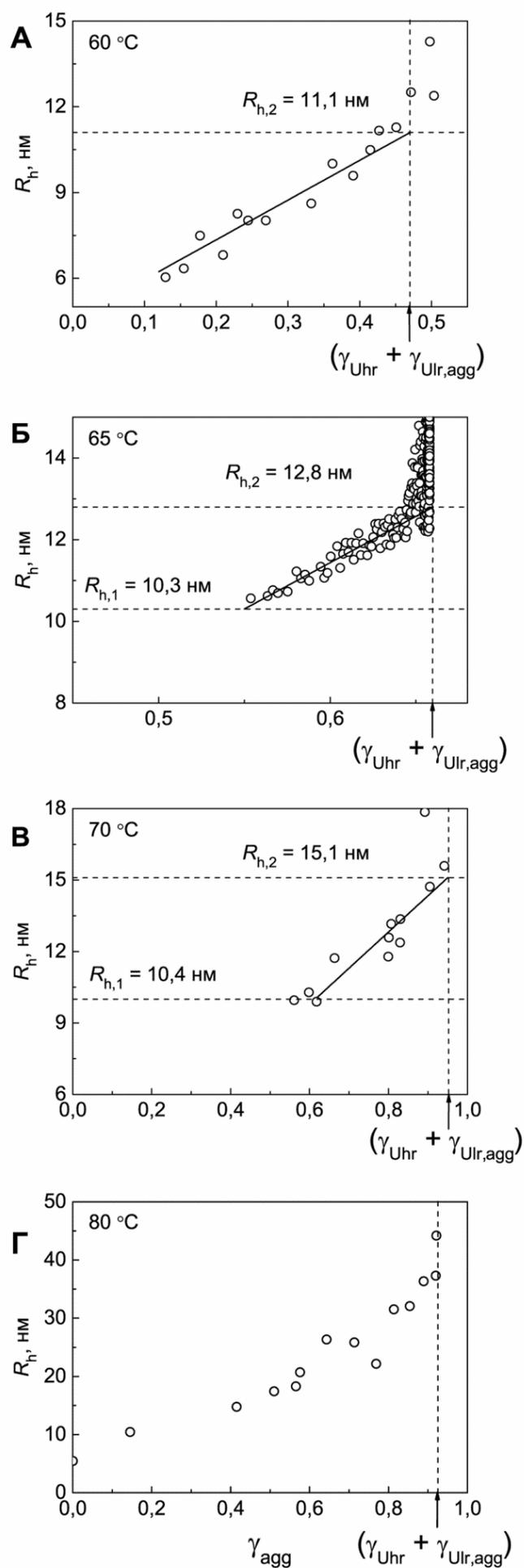


Рис. 3.13. Зависимости гидродинамического радиуса (R_h) от доли агрегированного белка (γ_{agg}) для агрегации БСА при 60 °C (А), 65 °C (Б), 70 °C (В) и 80 °C (Г). Концентрация БСА составляла 1 мг/мл. Вертикальные пунктирные линии соответствуют $\gamma_{agg} = \gamma_{Uhr} + \gamma_{Ulr,agg}$. Графики R_h vs γ_{den} при 60 °C, 65 °C и 70 °C (рисунки А-В) были использованы для определения гидродинамического радиуса вторичных агрегатов ($R_{h,2}$).

Полученные экспериментальные данные позволяют предположить, что при 65 °С процесс агрегации состоит из трех стадий, которые заметно разделены во времени: разворачивание БСА, формирование первичных агрегатов и формирование вторичных агрегатов. Это обстоятельство позволяет определить индивидуальные доли U_{hr} и U_{lr} и размер первичных и вторичных агрегатов ($R_{h,1}$ и $R_{h,2}$) при этой температуре. При 60 °С скорости денатурации и агрегации становятся сравнимы и определение долей высоко- и низкорекционноспособной форм развернутого белка становится невозможным. При 70 °С скорости формирования первичных и вторичных агрегатов становятся сравнимы. При 80 °С анализ кинетики агрегации БСА осложняется формированием крупных агрегатов. Стоит отметить, что экспериментальные данные позволяют оценить долю белка, остающегося не включенным в состав крупных агрегатов ($\gamma_{non-agg, lim}$) при всех изученных температурах (рис. 3.8А-Г). Кроме того, гидродинамический радиус вторичных агрегатов ($R_{h,2}$) при 60 °С и 70 °С может быть оценен из графиков зависимости R_h от γ_{agg} . При 80 °С определение размера вторичных агрегатов невозможно.

Как видно из рис. 3.11 и 3.13, формирование вторичных агрегатов не является финальной стадией агрегации, и размер агрегатов продолжает монотонно возрастать с течением времени. Таким образом, механизм тепловой агрегации БСА должен быть дополнен стадией слипания вторичных агрегатов.

В случае диффузионно-лимитируемой кластер-кластерной агрегации (DLCA) зависимость гидродинамического радиуса (R_h) белковых агрегатов от времени подчиняется степенному закону [Lin, et al., 1989; Khanova, et al., 2005]:

$$R_h = R_h^* [1 + K(t - t^*)]^{1/d_f}, \quad (t > t^*) \quad (3.18)$$

где t^* - момент времени, в который начинает выполняться кинетический режим, R_h^* - гидродинамический радиус при $t = t^*$, K - константа и d_f - фрактальная размерность агрегатов ($d_f = 1.8$ для кинетического режима DLCA). Формирование агрегатов большего размера становится особенно выраженным при 80 °С. При $t > t^* = 140$ мин и $R_h > R_h^* = 35$ нм зависимость R_h от времени подчиняется уравнению (3.18) с $d_f = 1,76 \pm 0,06$, что указывает на протекание агрегации в кинетическом режиме DLCA.

Рис. 3.14 демонстрирует зависимость интенсивности светорассеяния (I) от времени для агрегации БСА при 60 °С, 65 °С, 70 °С и 80 °С. Как видно, I монотонно возрастает во времени из-за того, что процесс агрегации не останавливается на стадии формирования вторичных агрегатов БСА и продолжается в результате их слипания. Чтобы оценить величину интенсивности светорассеяния (I_2), соответствующую полному переходу форм

U_{hr} и U_{lr} в агрегированное состояние, были построены графики зависимости интенсивности светорассеяния от γ_{agg} (рис. 3.15).

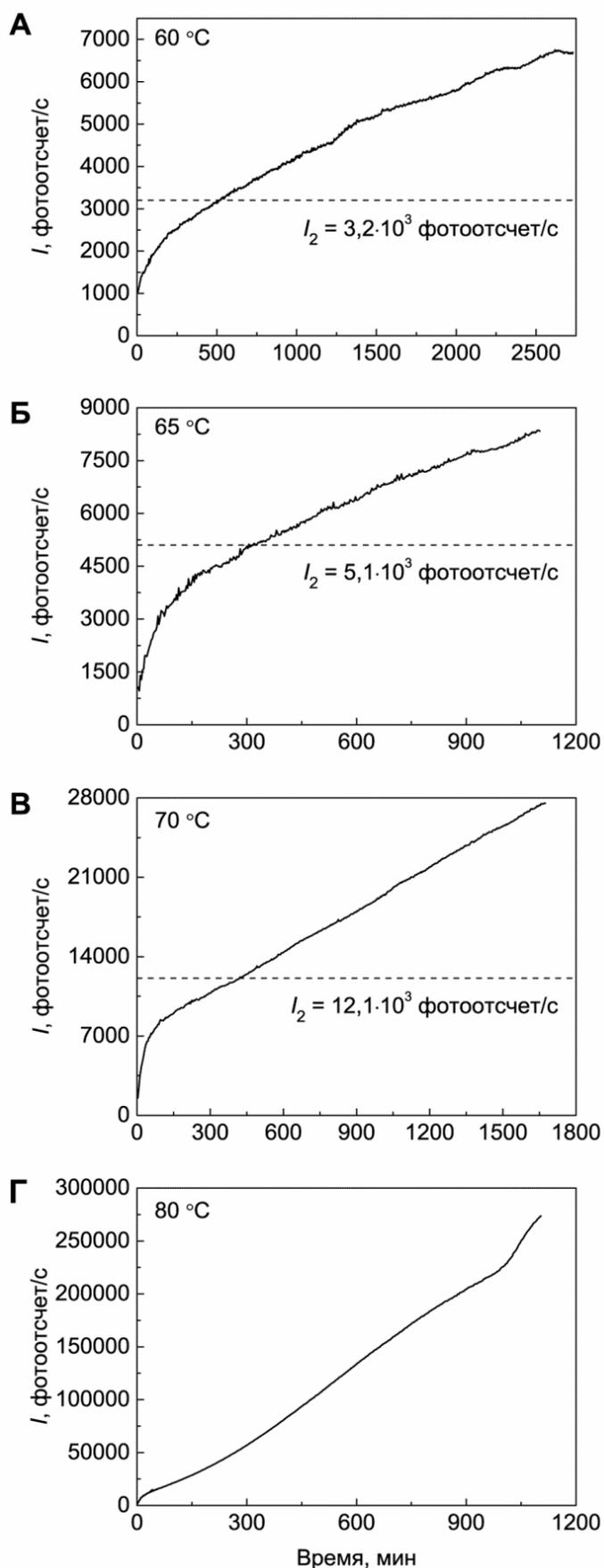


Рис. 3.14. Зависимости интенсивности светорассеяния от времени для агрегации БСА при 60 °C (А), 65 °C (Б), 70 °C (В) и 80 °C (Г). Концентрация БСА составляла 1 мг/мл. Пунктирные горизонтальные линии на рисунках А, Б и В соответствуют значениям I_2 , вычисленным из зависимостей интенсивности светорассеяния от доли агрегированного БСА.

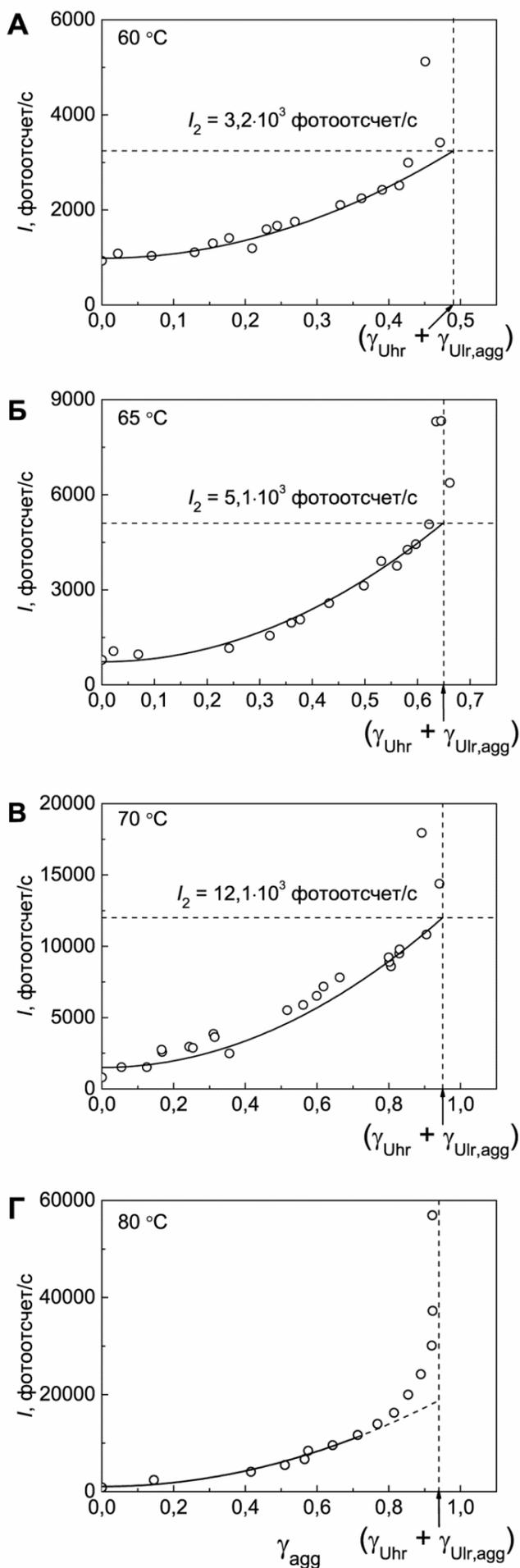


Рис. 3.15. Зависимости интенсивности светорассеяния от доли агрегированного белка (γ_{agg}) для агрегации БСА при 60 °C (А), 65 °C (Б), 70 °C (В) и 80 °C (Г). Концентрация БСА составляла 1 мг/мл. Вертикальные пунктирные линии соответствуют $\gamma_{agg} = (\gamma_{Uhr} + \gamma_{Ulr,agg})$. Графики I vs γ_{agg} при 60 °C, 65 °C и 70 °C (рисунки А-В) были использованы для определения параметра I_2 , соответствующего величине интенсивности светорассеяния после завершения образования вторичных агрегатов БСА. Сплошные линии были вычислены по уравнению (3.19).

Анализ этих графиков показал, что зависимость интенсивности светорассеяния от γ_{agg} подчиняется квадратичному закону:

$$I = I_0 + \frac{I_2 - I_0}{(\gamma_{Uhr} + \gamma_{Ulr})^2} \gamma_{agg}^2, \quad (3.19)$$

где I_0 – начальное значение интенсивности светорассеяния. Были найдены следующие значения I_2 : $(3,2 \pm 0,1) \cdot 10^3$, $(5,1 \pm 0,1) \cdot 10^3$ и $(12,1 \pm 0,1) \cdot 10^3$ фотоотсчет/с при 60 °С, 65 °С и 70 °С, соответственно. Пунктирные горизонтальные линии на рис. 3.14А-В соответствуют рассчитанным значениям I_2 . Стоит отметить, что при 80 °С надежная оценка I_2 невозможна, хотя начальная часть зависимости интенсивности светорассеяния γ_{agg} описывается квадратичным уравнением.

Тот факт, что интенсивность светорассеяния (I) и доля агрегированного белка (γ_{agg}) связаны квадратичным уравнением, позволяет 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.

Для изучения полидисперсности препаратов БСА, прогретых при высоких температурах, использовали метод аналитического ультрацентрифугирования.

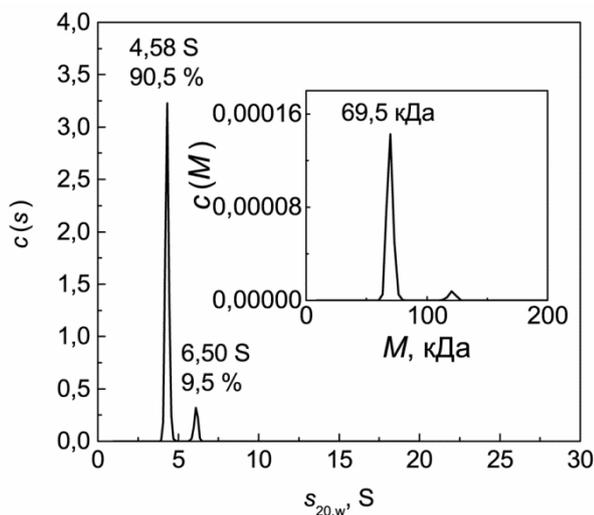


Рис. 3.16. Седиментационные свойства нативного БСА при 20 °С. Распределение дифференциальных коэффициентов седиментации $c(s)$ для БСА (1 мг/мл). На вставке показано распределение $c(M)$. Скорость ротора составляла 48000 об/мин.

На рис. 3.16 показано распределение дифференциальных коэффициентов седиментации $c(s)$ для нативного препарата БСА. Основной пик с $s_{20,w} = 4,58 \pm 0,12$ S и $M = 69,5$ кДа соответствует мономерной форме БСА. Содержание мономерной формы

составляет 90,5%. Распределение $c(s)$ также содержит минорный пик с $s_{20,w} = 6,50 \pm 0,11$ S, соответствующий димерной форме.

Распределения $c(s)$ для препаратов БСА, предварительно прогретых в течение 12 часов при 60 °C, 65 °C, 70 °C и 80 °C, представлены на рис. 3.17А-Г.

Стоит отметить, что согласно данным, показанным на рис. 3.8, при $t = 12$ часов доля неагрегированного белка достигает постоянного значения, соответствующего доле белка, не вошедшего в крупные агрегаты ($\gamma_{\text{non-agg,lim}}$), при каждой изученной температуре. В случае препарата БСА, прогретого при 60 °C (рис. 3.17А), неагрегированный белок представлен мономерной формой с $s_{20,w} = 4,9 \pm 0,4$ S (40%) и димерной формой с $s_{20,w} = 6,8 \pm 0,5$ S (9%). Кроме мономерной и димерной форм, распределение $c(s)$ содержит набор пиков, соответствующих агрегатам БСА (50,7%) с высокой полидисперсностью. Средневзвешенный коэффициент седиментации (s_{av}) для агрегатов был найден равным 16,3 S (стандартное отклонение 4,3 S). Таким образом, доля неагрегированного белка равна 0,49, что согласуется с долей белка, не вошедшего в крупные агрегаты ($\gamma_{\text{non-agg,lim}}$), определенной методом AF₄ (рис. 3.8А).

Распределения $c(s)$ для БСА, прогретого при 65 °C и 70 °C (рис. 3.17Б, В) и распределение $\text{ls-g}^*(s)$ для БСА, прогретого при 80 °C (рис. 3.17Г) содержат пики с $s_{20,w} = 5,3$ - $5,4$ S, соответствующие неагрегированному белку и состоящие из мономерной и димерной форм, а также широкие пики, соответствующие белковым агрегатам. Процент неагрегированного белка снижается с 21,6% до 2,4% при возрастании температуры инкубации с 65 °C до 80 °C.

Как видно из рис. 3.17Б-Г, более высокая температура инкубации БСА приводит к формированию более крупных агрегатов. Значения s_{av} для агрегированных форм при 65 °C, 70 °C и 80 °C были равны 21,6 S (стандартное отклонение 6,1 S), 27,8 S (стандартное отклонение 7,5 S) и 96 S (стандартное отклонение 38 S), соответственно. Вместе с возрастанием размера белковых агрегатов наблюдается увеличение количества агрегированной формы белка.

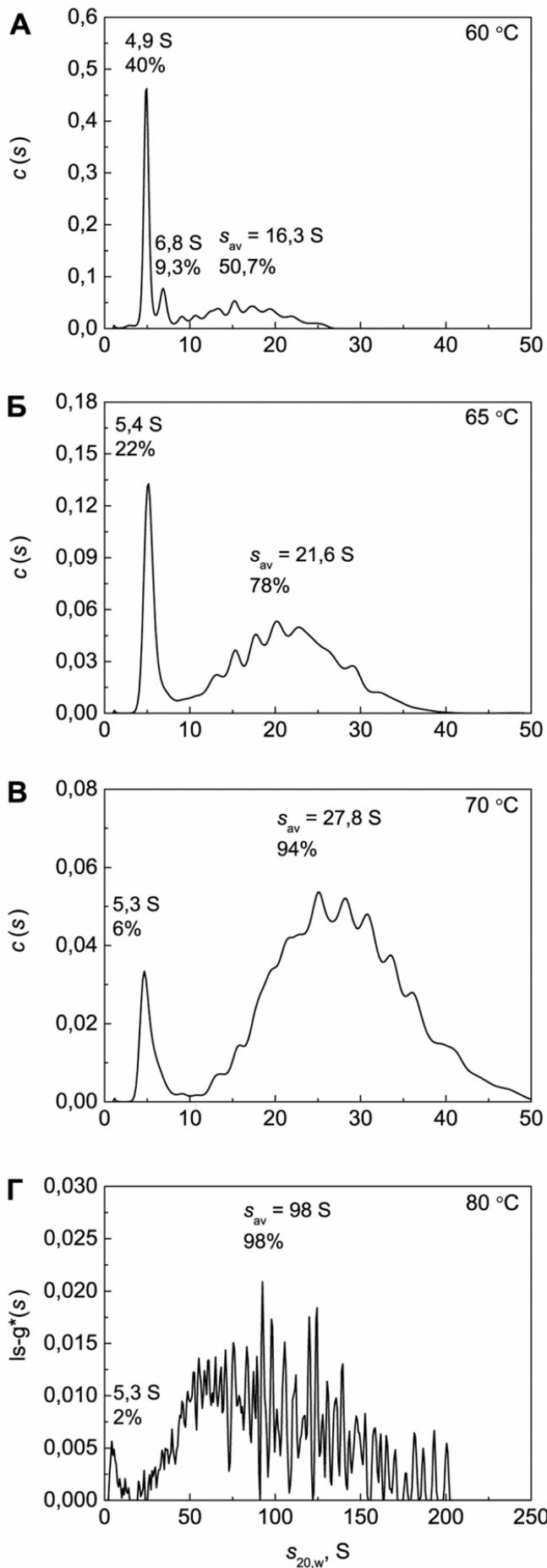


Рис. 3.17. Седиментационные свойства БСА (1 мг/мл), предварительно инкубированного в течение 12 часов при 60 °C (А), 65 °C (Б), 70 °C (В) и 80 °C (Г). Распределения $c(s)$ и $|s-g^*(s)|$ были получены при 24 °C. Скорость ротора составляла 52000 об/мин.

Чтобы охарактеризовать морфологию прогретых препаратов БСА, структура формирующихся агрегатов была изучена с помощью ТЭМ. БСА инкубировали при 65 °С в течение 110 или 330 мин. Эти временные интервалы соответствуют завершению формирования первичных и вторичных агрегатов (см. рис. 3.11Б). При времени инкубации 110 мин формируются короткие изогнутые фибриллы со средней длиной около 40 нм (рис. 3.18А). На изображении, полученном для препарата БСА, прогретого 330 мин, представлены агрегаты разнообразной формы: фибриллы, сферические частицы, фибриллы с утолщениями на конце (рис. 3.18Б). Согласно предложенному механизму, формирование этих агрегатов протекает путем присоединения развернутых молекул к первичным агрегатам.

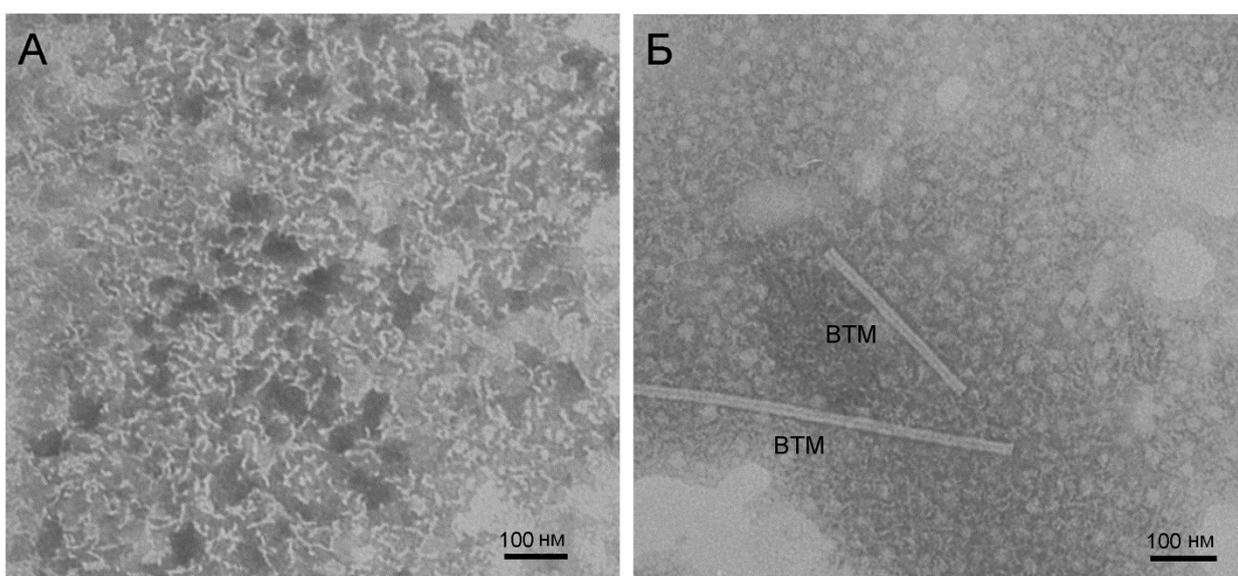


Рис. 3.18. Электронные микрофотографии препаратов БСА, предварительно прогретых при 65 °С в течение 110 мин (А) и 330 мин (Б). Концентрация БСА составляла 1 мг/мл. Препарат, прогретый в течение 110 мин был промыт деионизованной водой, препарат, прогретый в течение 330 мин был разбавлен деионизованной водой в 100 раз. Фото на рисунке Б содержит частицы вируса табачной мозаики (VTM).

Принимая во внимание литературные данные о возможности формирования фибриллоподобных агрегатов БСА при рН близких к нейтральным [Holm, et al., 2007], было интересно изучить фибрилляцию БСА в 0,1 М Na-фосфатном буфере, рН 7,0, при [BSA] = 1 мг/мл. После прогревания БСА (1 мг/мл) в течение 12 часов при 60 °С, 65 °С, 70 °С и 80 °С каждый образец БСА был инкубирован с ThT в течение 30 мин при 25 °С. Конечные концентрации БСА и ThT были равны 0,4 мг/мл и 20 мкМ, соответственно. Принято считать, что значительное возрастание флуоресценции ThT является доказательством формирования амилоидных фибрилл, обогащенных кросс-β-структурами [Nilsson, 2004].

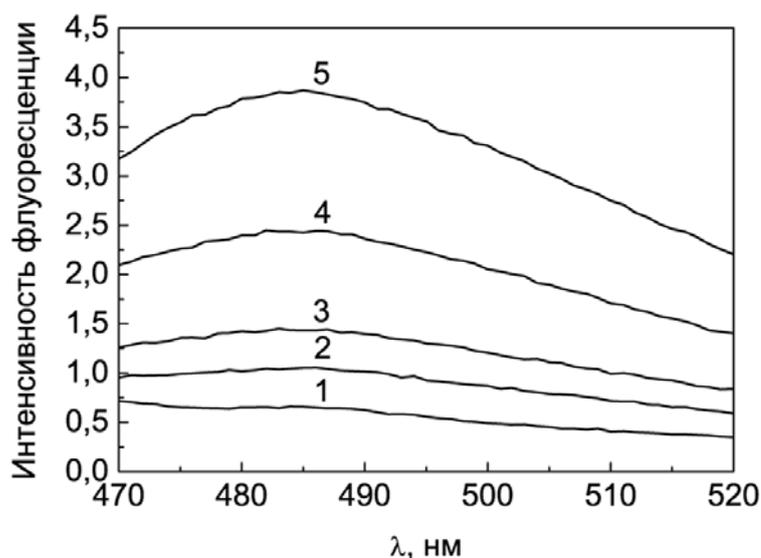


Рис. 3.19. Спектры флуоресценции ThT (20 мкМ; кривая 1) и раствора ThT, инкубированного с прогретым БСА (0,4 мг/мл) в течение 30 мин при 25 °С. БСА (1 мг/мл) был инкубирован в течение 12 ч при 60 °С, 65 °С, 70 °С и 80 °С (кривые 2-5, соответственно). Длина волны возбуждения флуоресценции была равна 450 нм. Условия: 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,0, 23 °С.

Как видно из рис. 3.19, при связывании ThT с прогретым БСА имеет место незначительное увеличение интенсивности флуоресценции ThT. Максимальный прирост интенсивности, в 6 раз, наблюдался в случае БСА, инкубированного при 80 °С. Таким образом, маловероятно, что образующиеся в данных условиях фибриллы БСА обладают выраженной амилоидной структурой.

Для выделения фракции БСА, не вошедшей в крупные агрегаты, и изучения ее свойств был выбран БСА, прогретый при 60 °С, поскольку при этой температуре $\gamma_{\text{non-agg,lim}}$ была максимальной среди других изученных температур (0,51; табл. 3.1). После 12-часового прогревания при 60 °С, образец был проанализирован методом гель-проникающей хроматографии. Полученные данные представлены на рис. 3.20.

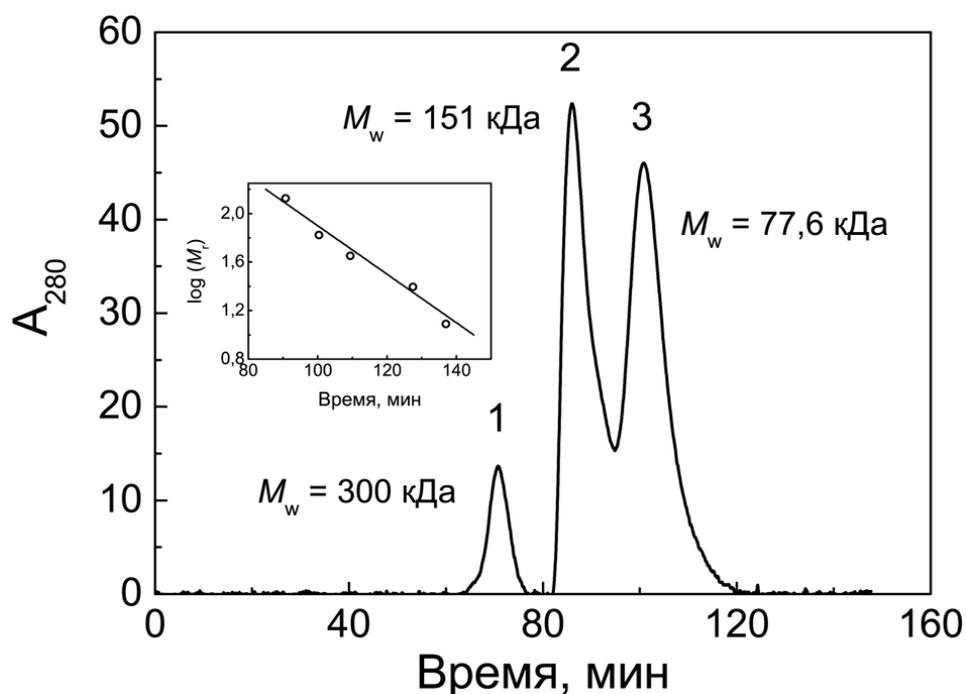


Рис. 3.20. Профиль элюции для не вошедшего в крупные агрегаты БСА после 12-часового нагревания при 60 °С. На вставке показан калибровочный график.

Пик с временем элюции 70,8 мин (пик 1) соответствует относительно крупным агрегатам БСА. Молекулярная масса этого пика, определенная с использованием калибровочного графика, равна 300 кДа. Пик со временем элюции 86 мин (пик 2) соответствует агрегатам БСА со средней молекулярной массой 151 кДа. Пик со временем элюции 100,7 мин (пик 3) соответствует фракции с молекулярной массой 77,6 кДа.

Данные аналитического ультрацентрифугирования поддерживают предположение, что пик 2 состоит из небольших агрегатов БСА. Распределение $c(s)$ для фракции с временем элюции в интервале от 82 до 94,6 мин состоит из набора пиков с $s_{20,w}$ от 5,9 до 20,7 S (рис. 3.21А). В случае фракции с временами элюции от 94,6 до 122 мин (рис. 3.21Б) наблюдался один пик с $s_{20,w} = 5,2$ S (63 %).

Можно предположить, что пик 3 на профиле элюции содержит молекулы, соответствующие мономерной форме и небольшое количество димерной формы БСА.

Динамическое светорассеяние показало, что данная фракция имеет $R_h = 6,1$ нм (рис. 3.22Б). Полученная величина R_h превосходит соответствующее значение для интактного БСА (3,4 нм; рис. 3.22А). Более высокое значение R_h для пика 3 предположительно объясняется присутствием димерной формы.

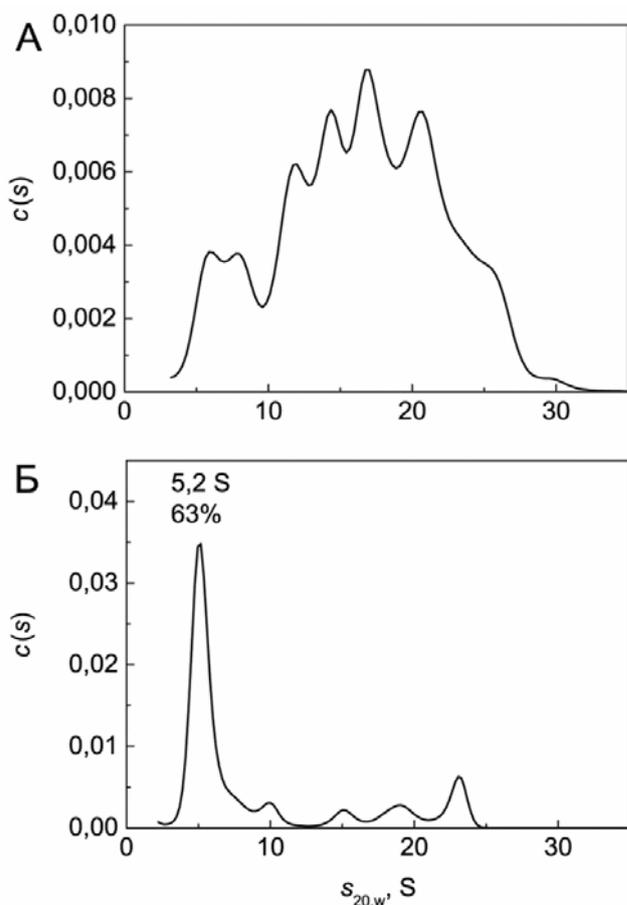


Рис. 3.21. Аналитическое ультрацентрифугирование фракций, полученных методом гель-проникающей хроматографии после 12-часового нагревания БСА при 60 °С. Распределение $c(s)$ для фракции, элюируемой в интервале от 82 до 94,6 мин (А) и для фракции, элюируемой в интервале от 94,6 до 122 мин (Б). Концентрация БСА в обеих фракциях была равна 0,15 мг/мл. Скорость ротора составляла 52000 об/мин.

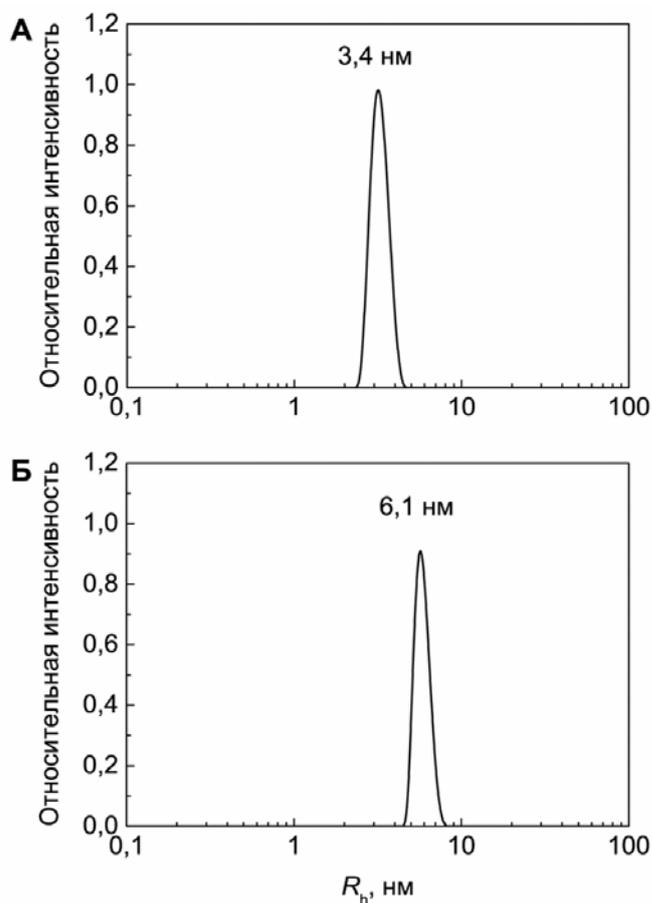


Рис. 3.22. Распределение частиц по размерам, полученное методом динамического светорассеяния. (А) Интактный БСА (0,15 мг/мл). (Б) Фракция БСА, предварительно прогретого 12 часов при 60 °С, полученная методом гель-проникающей хроматографии с временами элюции от 94,6 до 122 мин. Концентрация БСА составляла 0,15 мг/мл.

Спектр триптофановой флуоресценции фракции из пика 3 был сравнен с таковым для интактного БСА (рис. 3.23).

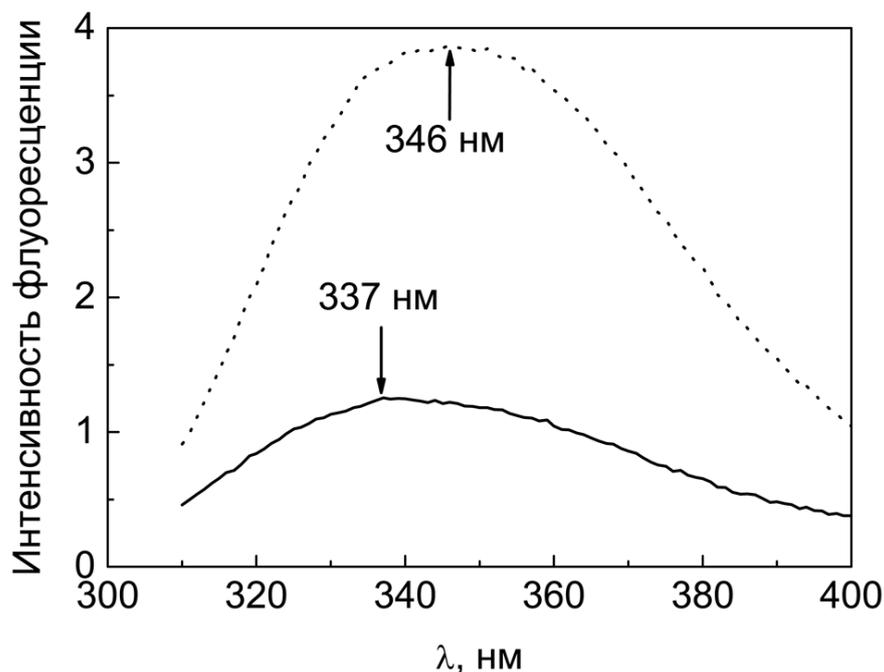


Рис. 3.23. Спектры триптофановой флуоресценции для интактного БСА (пунктирная линия) и фракции из пика 3 (сплошная кривая). Концентрация БСА составляла 0,1 мг/мл. Длина волны возбуждения флуоресценции была равна 298 нм. Условия: 0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0, 23 °С.

Как видно, не вошедший в крупные агрегаты белок обладает более низкой интенсивностью эмиссии триптофана и демонстрирует сдвиг максимума флуоресценции (λ_{\max}) с 346 до 337 нм. Такой «синий сдвиг» необычен, т.к. разворачивание белков чаще всего приводит к сдвигу λ_{\max} в сторону больших длин волн [Duy & Fitter, 2006; Lakowicz, 2006]. Существуют литературные данные о том, что при повышении температуры наблюдается смещение спектра триптофановой флуоресценции БСА в более коротковолновую область [Wen, et al., 2015; Sahin, et al., 2016]. «Синий сдвиг» спектра триптофановой флуоресценции при тепловой денатурации α -амилазы из поджелудочной железы свиньи [Duy & Fitter, 2006] и субфрагмента миозина 1 [Markov, et al., 2010] объясняется тем фактом, что остатки Trp попадают в более гидрофобное окружение в результате изменений конформации белка, сопутствующих его разворачиванию. Можно предположить, что «синий сдвиг» λ_{\max} в случае БСА вызван переносом остатков Trp в более гидрофобное окружение вследствие димеризации развернутых мономеров.

Дополнительная информация об изменениях доступности гидрофобных сайтов в молекуле БСА при тепловой обработке может быть получена с использованием

флуоресцентного зонда. Положение λ_{\max} спектра испускания флуоресценции свободного АНС при длине волны возбуждающего света 445 нм соответствует 528 нм (рис. 3.24А).

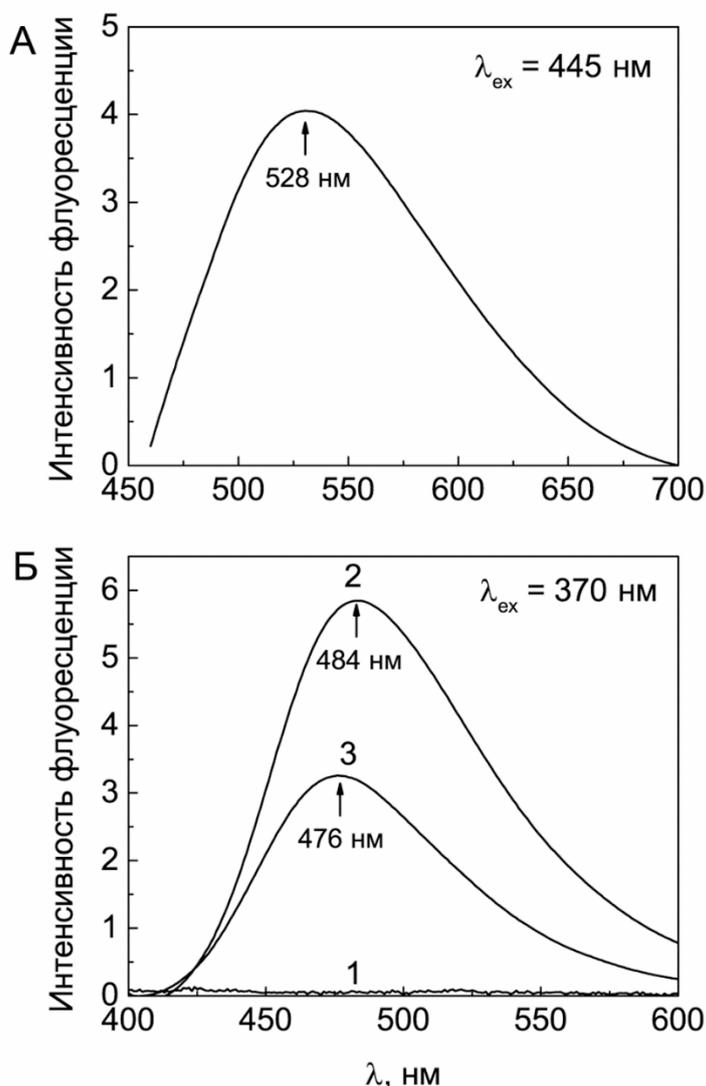


Рис. 3.24. Спектры флуоресценции (А) свободного АНС (10 мкМ), (Б) АНС (10 мкМ) в отсутствие белка (кривая 1), в присутствии интактного БСА (0,1 мг/мл; кривая 2) и в присутствии БСА из фракции, соответствующей пику 3 (0,1 мг/мл; кривая 3). Длина волны возбуждения флуоресценции была равна 380 нм. Условия: 0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,0, 23 °С.

В изучаемых условиях флуоресценция АНС незначительна, тогда как в присутствии интактного БСА происходит заметное повышение интенсивности флуоресценции АНС. Это позволяет предположить, что в молекуле БСА имеются множественные сайты связывания АНС. Связывание АНС с гидрофобными сайтами в молекуле БСА приводит к сдвигу положения λ_{\max} до 484 нм (кривая 1 на рис. 3.24Б). Интересно, что увеличение флуоресценции АНС в присутствии БСА из фракции, соответствующей пику 3 (кривая 2) значительно меньше, чем в случае с нативным БСА и $\lambda_{\max} = 476$ нм. Таким образом, форма белка, не вошедшая в крупные агрегаты (см. рис. 3.10), не образует дополнительных гидрофобных сайтов.

Для оценки коллоидной стабильности нативного БСА и БСА, не вошедшего в крупные агрегаты, измерили дзета-потенциал обоих препаратов. Значения дзета-потенциала были найдены равными $-20,9 \pm 0,8$ и $-9,2 \pm 0,4$ мВ соответственно. Дзета-потенциал нативного БСА при рН и ионной силе, использованных в данной работе,

согласуется с данными литературы [Jachimiska, et al., 2008]. Более низкое абсолютное значение дзета-потенциала для белка, не вошедшего в крупные агрегаты, позволяет предположить, что эта форма склонна к агрегации из-за более слабого электростатического отталкивания. Ее неспособность образовывать агрегаты в использованных экспериментальных условиях объясняется, вероятно, отсутствием дополнительных гидрофобных сайтов при разворачивании, как показали эксперименты с флуоресценцией АНС.

Данные, полученные при расчете содержания элементов вторичной структуры даны в табл. 3.2. Нормализованное среднее квадратичное отклонение (NRMSD) в обоих случаях не превышало 0,1 [Kelly, et al., 2005].

Таблица 3.2. Содержание элементов вторичной структуры, рассчитанное из КД-спектров нативного БСА и БСА, не вошедшего в крупные агрегаты после предварительного прогревания в течение 12 часов при 60 °С (0,1 М Na-фосфатный буфер, pH 7,0).

Элемент вторичной структуры	α -спираль	β -слой	Петля	Неупорядоченная структура
CONTIN, Set 3				
Нативный БСА	0,49	0,11	0,16	0,25
Неагрегированный денатурированный БСА	0,31	0,14	0,18	0,31
SELCON, Set 3				
Нативный БСА	0,49	0,10	0,16	0,25
Неагрегированный денатурированный БСА	0,38	0,16	0,20	0,28

Данные, полученные с помощью алгоритмов CONTIN и SELCON показали, что доля α -спиралей во вторичной структуре необработанного БСА равна 0,49. Предварительное прогревание при 60 °С в течение 12 часов ведет к значительному снижению доли α -спиралей на 22-37 % и увеличению доли β -слоев на 27-60%, доли петель на 13-25% и доли неупорядоченных структурных элементов на 12-24 %. Наблюдаемые изменения в содержании α -спиралей характерны для альбумина, подвергнутого тепловой обработке. Литературные данные демонстрируют, что нагревание БСА до 65 °С с постоянной скоростью [Gayen, et al., 2008] или инкубация при 90 °С в течение 10 мин [Pearce, et al., 2007] сопровождаются снижением доли α -спиралей. Показано [Zhang, et al., 2014], что вторичная структура БСА может восстанавливаться после нагревания до 79,42 °С и последующего охлаждения до комнатной температуры. Следует напомнить, что тепловая

денатурация БСА имеет обратимую и необратимую стадии [Michnik, 2003]. В использованных в данной работе экспериментальных условиях (12-часовое нагревание при 60 °С) БСА денатурирует полностью и необратимо, как показывают данные на рис. 3.5А, описывающем необратимую стадию денатурации.

На основе анализа данных, полученных при изучении свойств фракции БСА, не включенного в агрегаты крупного размера, можно заключить, что эта фракция представляет собой небольшие стабильные агрегаты, вероятнее всего димеры (см. рис. 3.10).

3.2.2. 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, рН 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 (рис. 3.25):

$$K_{LS} = \alpha[\text{БСА}]^2, \quad (3.20)$$

Коэффициент α был найден равным $27,1 \pm 0,6$ (фотоотсчет/с)^{0,5}·мин⁻¹·мл·мг⁻¹

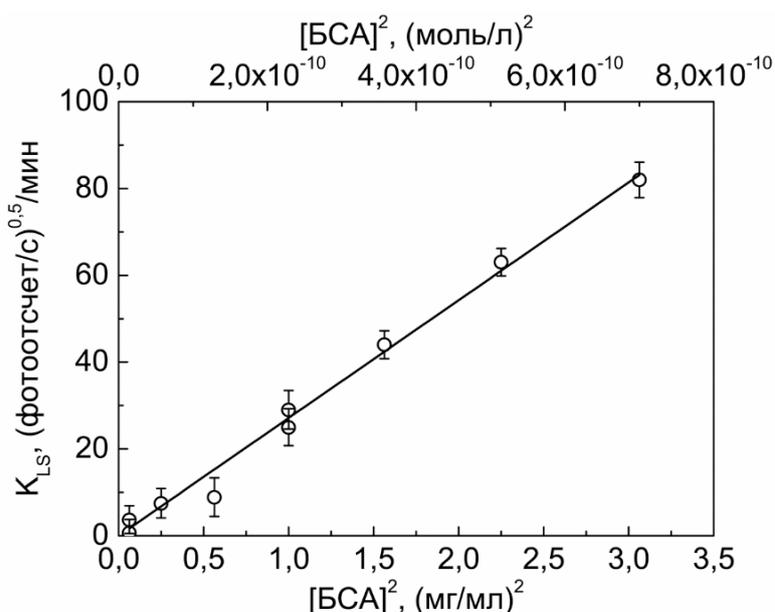


Рис. 3.25. Зависимость начальной скорости тепловой агрегации БСА при 70 °С от квадрата концентрации белка. На верхней оси абсцисс дана молярная концентрация БСА. Сплошная кривая была рассчитана по уравнению 3.20 при $\alpha = 27,1$ (фотоотсчет/с)^{0,5}·мин⁻¹·мл·мг⁻¹.

Определение порядка агрегации по белку методом АF₄ продемонстрировано на рис. 3.26. Показано, что убыль неагрегированного белка описывается кинетикой реакции второго порядка:

$$1/c = 1/c_0 + k_{II}t, \quad (3.21)$$

где c_0 и c – начальная и текущая концентрации неагрегированного белка, k_{II} – константа скорости второго порядка. Для тепловой агрегации БСА при 70 °С $k_{II} = 62 \pm 2 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$. Был сделан вывод, что начальная стадия тепловой агрегации БСА – стадия нуклеации – является бимолекулярной реакцией.

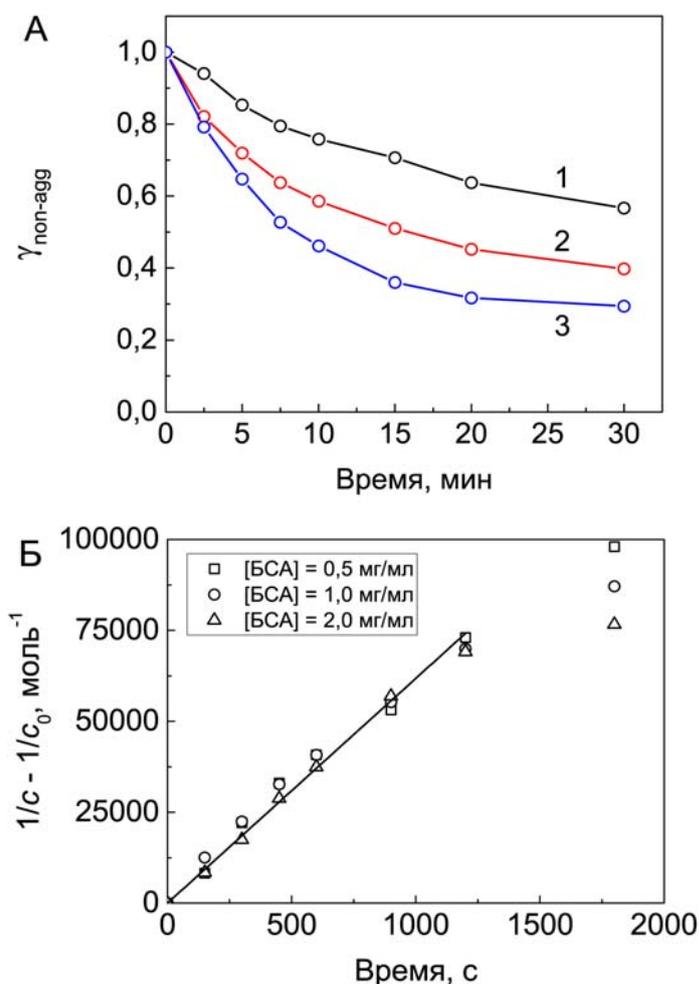


Рис. 3.26. Кинетика тепловой агрегации БСА при 70 °С. (А) Зависимости убыли неагрегированного белка от времени, полученные методом АF₄ при следующих концентрациях БСА: 0,5 мг/мл ($7,6 \cdot 10^{-6}$ М) (1), 1,0 мг/мл ($1,5 \cdot 10^{-5}$ М) (2) и 2,0 мг/мл ($3 \cdot 10^{-5}$ М) (3). (Б) Кинетика тепловой агрегации БСА при разных концентрациях белка в координатах, соответствующих реакции второго порядка ($n = 2$). Сплошная линия была рассчитана по уравнению (3.21) при $k_{II} = 62 \text{ л}\cdot\text{моль}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$.

Таким образом, начальная скорость тепловой агрегации БСА пропорциональна квадрату концентрации белка: $v_0 = k_{II}[\text{БСА}]^2$. 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. 3.27 показаны зависимости интенсивности светорассеяния от времени для тепловой агрегации БСА в присутствии аргинина.

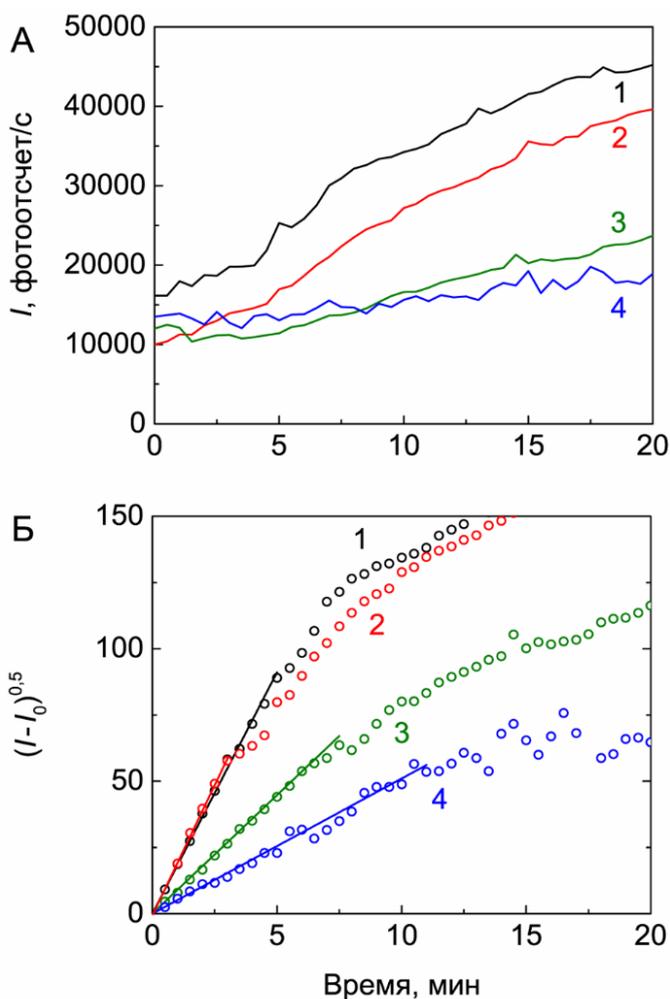


Рис. 3.27. Влияние аргинина на скорость тепловой агрегации БСА ($[BSA] = 1$ мг/мл, 70 °С). (А) Зависимости интенсивности светорассеяния от времени в отсутствие (1) и в присутствии 50 мМ (2), 350 мМ (3) и 700 мМ (4) аргинина. (Б) Зависимость интенсивности светорассеяния от времени в координатах $\{(I - I_0)^{0.5}; t\}$. Точками обозначены экспериментальные данные. Сплошная кривая была рассчитана по уравнению (3.5) при $t_0 = 0$ в отсутствие (1) и в присутствии 50 мМ (2), 350 мМ (3) и 700 мМ (4) аргинина.

Для вычисления параметра K_{LS} использовали уравнение (3.5) при $t_0 = 0$ вследствие отсутствия лаг-периода на кинетических кривых агрегации.

Аналогичным образом были проанализированы зависимости интенсивности светорассеяния от времени при тепловой агрегации БСА (1 мг/мл, 70 °С) в присутствии аргининамида в диапазоне концентраций от 0 до 1 М и этилового эфира аргинина в диапазоне концентраций от 0 до 1,5 М.

Зависимости отношения $K_{LS}/K_{LS,0}$ от концентрации химических шаперонов показаны на рис. 3.28.

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., 2013b]. Изучение зависимостей R_h от времени в отсутствие и в присутствии химических шаперонов показало образование уже на начальных стадиях агрегации (рис. 3.29) частиц с $R_h > R_{h,1}$. Это дало возможность предположить изменение механизма агрегации БСА в присутствии аргинина и его производных.

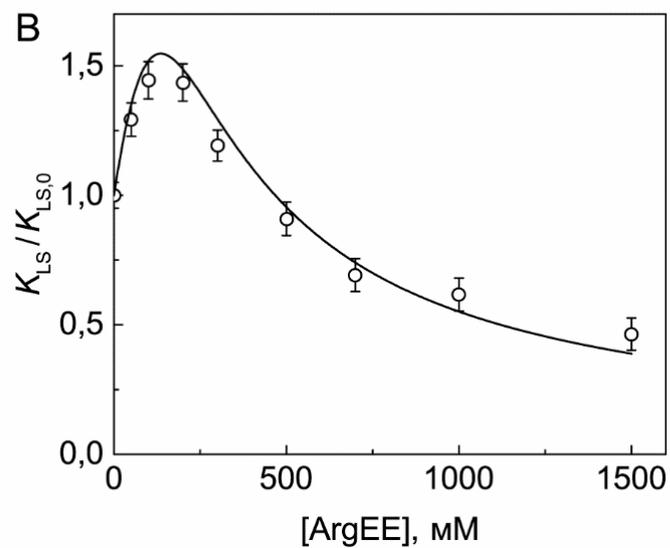
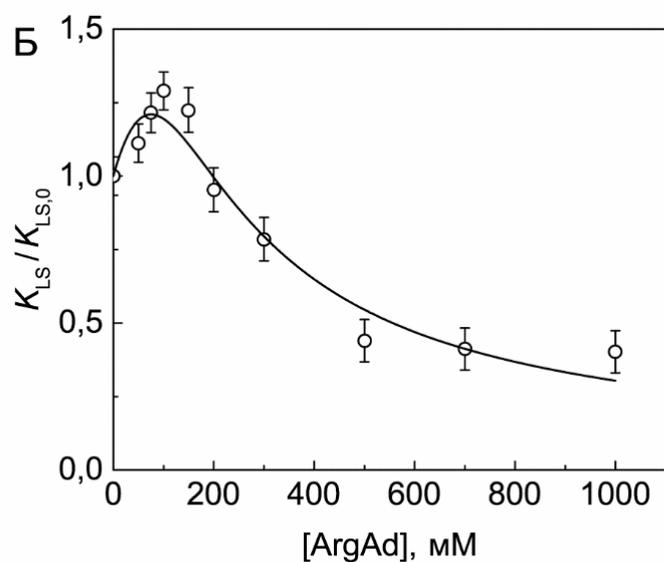
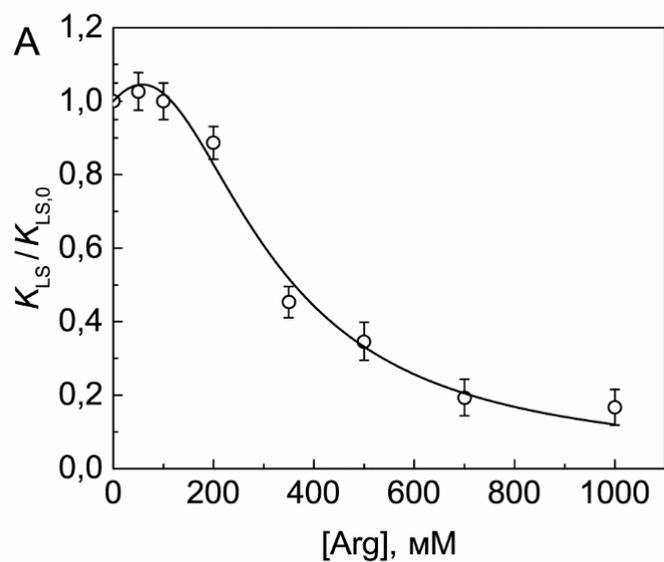


Рис. 3.28. Влияние химических шаперонов на скорость тепловой агрегации БСА ([БСА] = 1 мг/мл, 70 °С). Зависимости относительной начальной скорости агрегации $K_{LS}/K_{LS,0}$ от концентрации аргинина (**А**), аргининамида (**Б**) и этилового эфира аргинина (**В**).

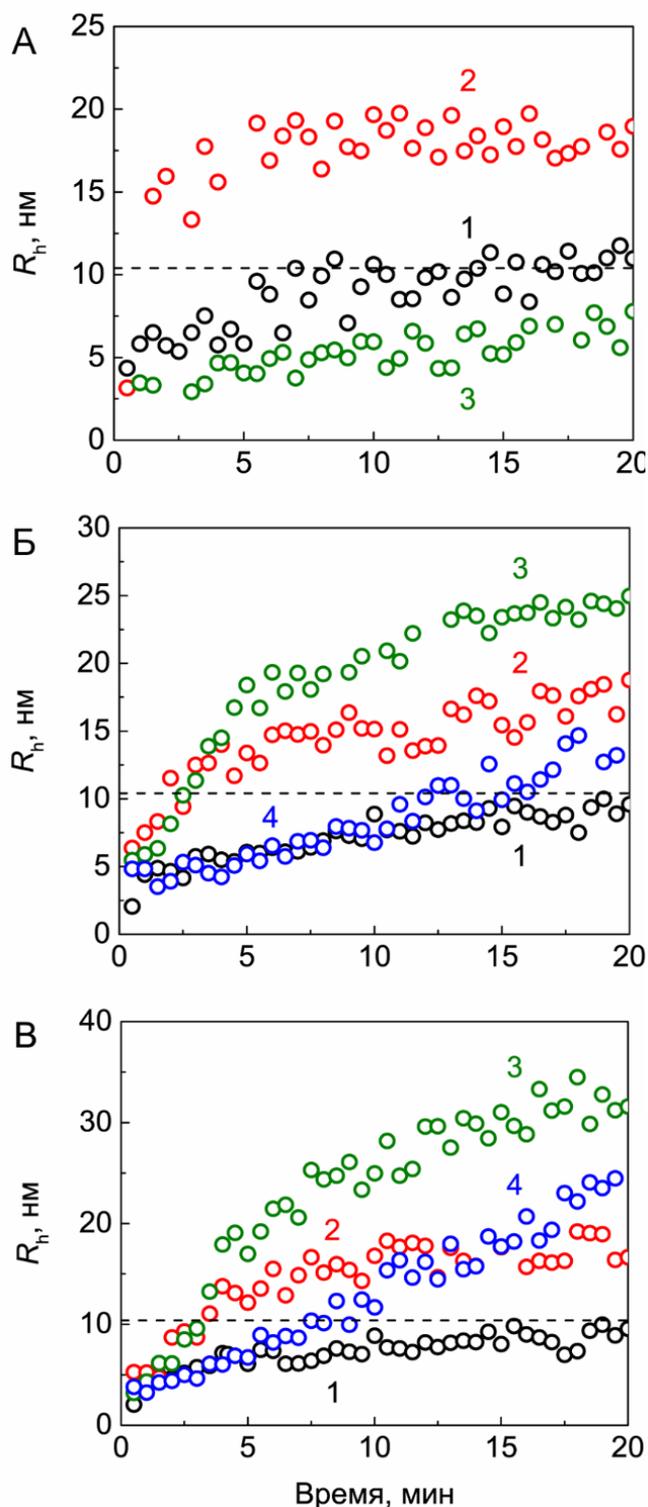


Рис. 3.29. Влияние химических шаперонов на гидродинамический радиус (R_h) частиц при тепловой агрегации БСА ($[БСА] = 1 \text{ мг/мл}$, $70 \text{ }^\circ\text{C}$). Пунктирные линии на рис.А-В соответствуют значению гидродинамического радиуса первичных агрегатов при $70 \text{ }^\circ\text{C}$ в отсутствие химических шаперонов ($R_{h,1} = 10,4 \text{ нм}$). (А) Зависимости R_h от времени для агрегации БСА в отсутствие (1) и в присутствии 200 мМ (2) и 700 мМ (3) аргинина. (Б) Зависимости R_h от времени для агрегации БСА в отсутствие (1) и в присутствии 50 мМ (2) 200 мМ (3) и 700 мМ (4) аргининамида. (В) Зависимости R_h от времени для агрегации БСА в отсутствие (1) и в присутствии 50 мМ (2) 200 мМ (3) и 1,5 М (4) этилового эфира аргинина.

Тепловая денатурация БСА в присутствии химических шаперонов была изучена методом ДСК. Показано, что аргинин и его производные стабилизируют БСА (рис. 3.30). T_{max} для БСА в присутствии различных концентраций химических шаперонов даны на вставках на рис. 3.30А-В.

Повышение термостабильности БСА приводит к замедлению денатурации и смене кинетического режима агрегации. В присутствии химических шаперонов скоростью-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. 3.29А-В).

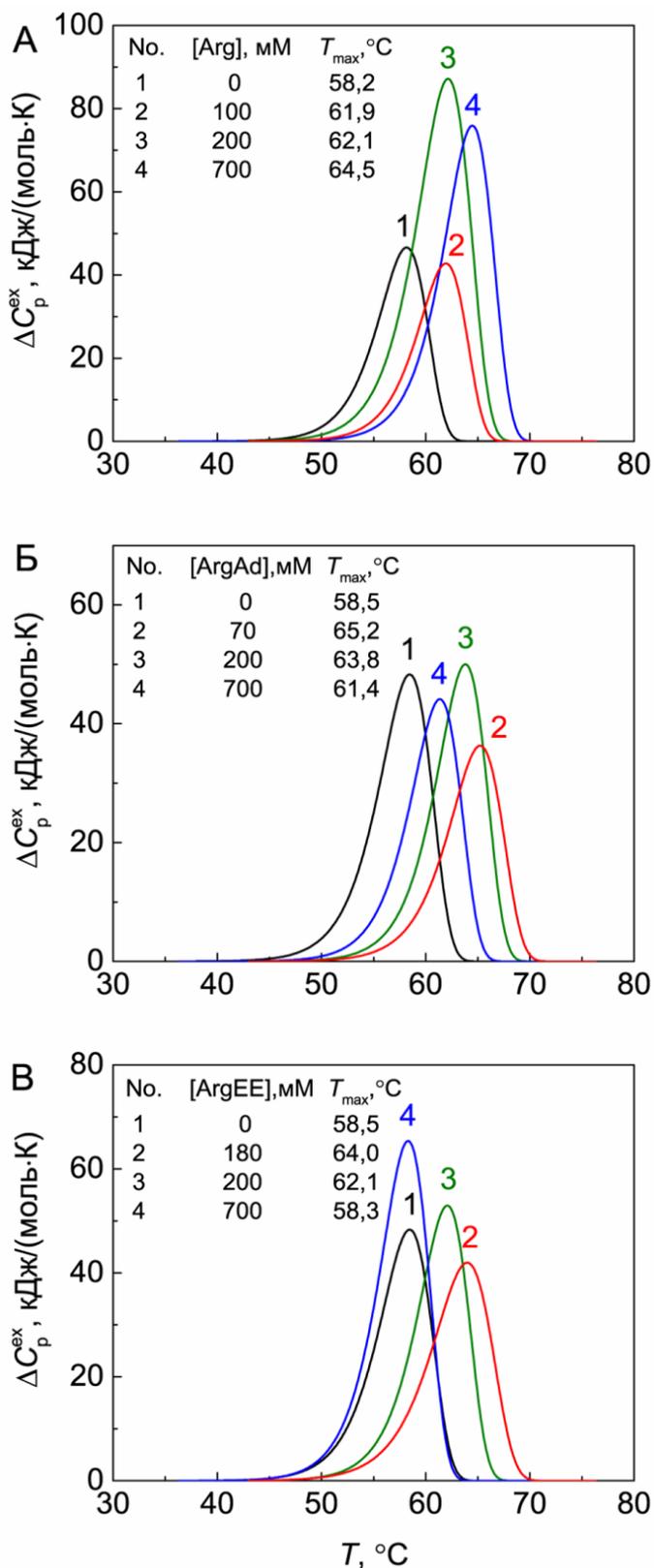


Рис. 3.30. Влияние химических шаперонов на тепловую денатурацию БСА ([БСА] = 1,0 мг/мл). Зависимости избыточной удельной теплоемкости (ΔC_p^{ex}) от температуры в присутствии различных концентраций аргинина (А), аргининамида (Б) и этилового эфира аргинина (В). На вставках даны использованные концентрации химических шаперонов и значения T_{max} для соответствующих профилей ДСК.

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. 3.31 показаны зависимости доли неагрегированного белка от времени в отсутствие и в присутствии аргинина. Полученные кривые убыли 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.

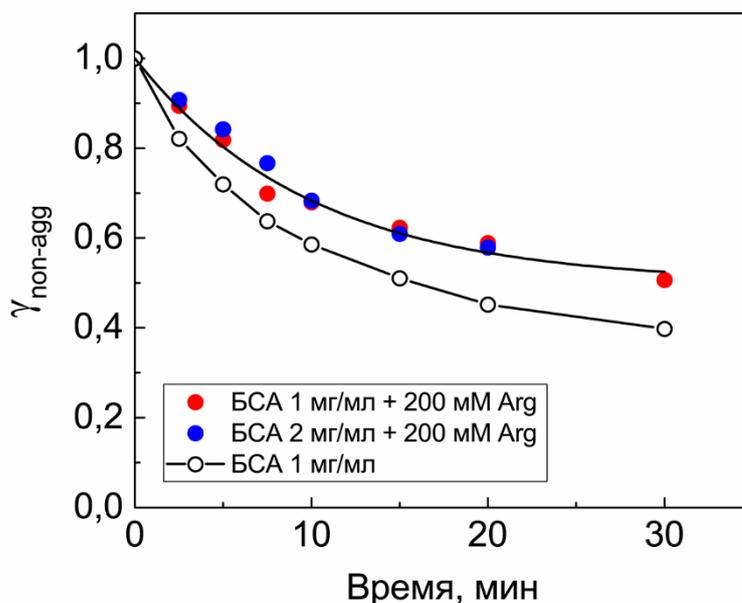


Рис. 3.31. Снижение доли неагрегированного белка ($\gamma_{\text{non-agg}}$) при тепловой агрегации БСА при 70 °C для различных концентраций белка в отсутствие и в присутствии аргинина.

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.

3.2.3. Кинетический режим индуцированной дитиотреитолом (ДТТ) агрегации БСА

Кинетика ДТТ-индуцированной агрегации БСА была проанализирована методом AF₄. На рис. 3.32А показаны профили элюции, полученные как зависимости сигнала УФ-

детектора от времени, для интактного БСА и препаратов БСА, прогретых при 45 °С в присутствии 2 мМ ДТТ. Профиль элюции интактного БСА (кривая 1) содержит три пика, соответствующие мономерной, димерной и тримерной формам белка. ДТТ-индуцированная агрегация БСА при 45 °С приводит к снижению количества неагрегированного белка, представленного этими пиками (кривые 2-6). Для оценки количества неагрегированного белка мы рассчитывали площадь пиков в интервале времен элюции от 11 до 15 мин.

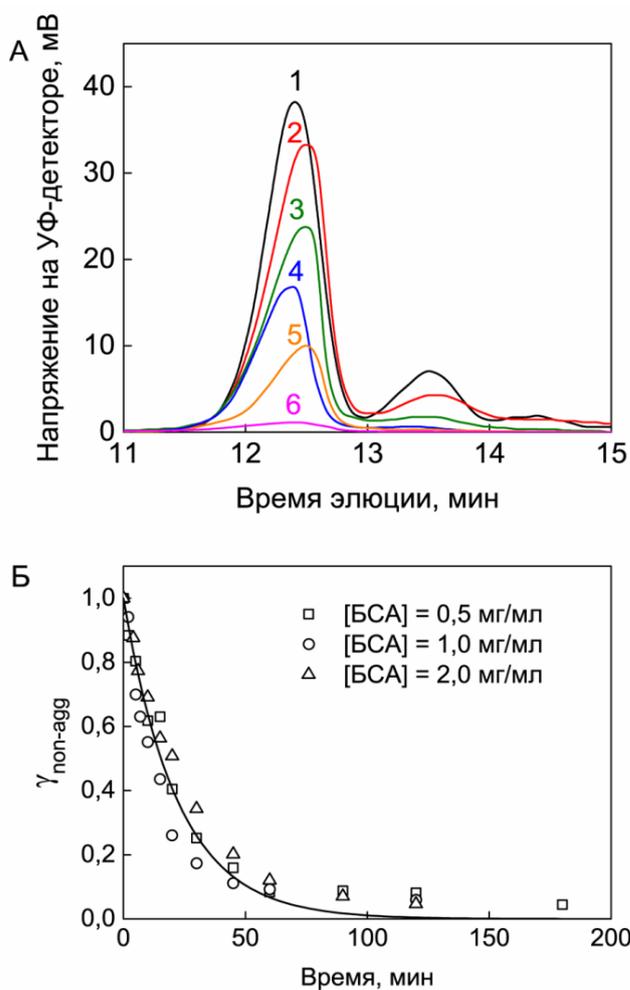


Рис. 3.32. Кинетика ДТТ-индуцированной агрегации БСА, полученная методом АФ₄. (А) Фрактограммы БСА (0,5 мг/мл), прогретого при 45 °С в присутствии 2 мМ ДТТ. Времена нагревания были следующими: 0 мин (1), 2 мин (2), 10 мин (3), 20 мин (4), 30 мин (5) и 180 мин (6). (Б) Снижение доли неагрегированного белка ($\gamma_{\text{non-agg}}$) в процессе ДТТ-индуцированной агрегации БСА. Точками обозначены экспериментальные данные, полученные при концентрациях 0,5, 1 и 2 мг/мл. Сплошная кривая была рассчитана по уравнению (3.22) при $k_1 = 0,045 \text{ мин}^{-1}$.

Зависимости доли неагрегированного БСА ($\gamma_{\text{non-agg}}$) от времени инкубации БСА при 45 °С в присутствии 2 мМ ДТТ представлены на рис. 3.23Б. 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:

$$\gamma_{\text{non-agg}} = \exp(-k_1 t), \quad (3.22)$$

где k_1 – константа скорости первого порядка. Значение k_1 было найдено равным $0,045 \pm 0,001 \text{ мин}^{-1}$. Тот факт, что снижение концентрации неагрегированного БСА подчиняется экспоненциальному закону, и константа скорости первого порядка не зависит от

концентрации белка позволяет сделать вывод о кинетическом режиме процесса агрегации. Можно заключить, что порядок агрегации по белку равен единице и скорость-лимитирующей стадией общего процесса агрегации является стадия разворачивания белковой молекулы. Другими словами, процесс агрегации включает в себя относительно медленные стадии восстановления S-S связей в молекуле белка и ее разворачивания и относительно быстрые стадии агрегации развернутого белка. Для такого режима агрегации начальная скорость агрегации (v_0) пропорциональна начальной концентрации БСА ($[БСА]_0$) в первой степени:

$$v_0 = \left(\frac{d[БСА]_{agg}}{dt} \right)_0 = k_1[БСА]_0. \quad (3.23)$$

В этом уравнении $[БСА]_{agg}$ – концентрация агрегированной формы БСА: $[БСА]_{agg} = (1 - \gamma_{non-agg})[БСА]_0$.

Динамическое светорассеяние позволяет измерять прирост интенсивности рассеянного света и увеличение размера белковых агрегатов в ходе ДТТ-индуцированной агрегации БСА при 45 °С. На рис. 3.33А показаны зависимости интенсивности светорассеяния от времени для ДТТ-индуцированной агрегации БСА, зарегистрированные при разных концентрациях белка. Начальные участки зависимостей интенсивности светорассеяния от времени, полученных при разных концентрациях БСА, анализировали с помощью уравнения (3.5). На рис. 3.33Б и В показаны зависимости интенсивности светорассеяния и гидродинамического радиуса белковых агрегатов от времени, полученные при концентрации БСА 1 мг/мл ($[ДТТ]= 2$ мМ). Зависимость I от времени представлена в координатах $\{(I - I_0)^{0,5}; t\}$. На основе этого графика были получены значения K_{LS} (параметр, характеризующий начальную скорость агрегации) и t_0 (длительность лаг-фазы): $K_{LS} = 10,41 \pm 0,07$ (фотоотсчет/с) $^{0,5} \cdot \text{мин}^{-1}$ и $t_0 = 9,3 \pm 0,1$ мин ($R^2 = 0,9973$).

При $t > t_0$ распределение частиц по размерам остается мономодальным и среднее значение R_h возрастает монотонно при возрастании времени инкубации (рис. 3.34). Это не позволяет предполагать формирование стартовых агрегатов. Зависимость R_h от времени может быть описана уравнением (2.7) (рис.3.33В). Были найдены следующие значения параметров t_{2R} и K : $t_{2R} = 10,3 \pm 0,2$ мин и $K = 3,4 \pm 0,3$ ($R^2 = 0,9860$). Отличие гидродинамического радиуса исходного БСА в момент времени $t = 0$ (рис. 3.34А) от значения $R_{h,initial}$ при $t = t_0$ может объясняться разворачиванием молекул белка и накоплением агрегатов небольшого размера, которые дают вклад в среднее значение гидродинамического радиуса, но не детектируются динамическим светорассеянием вследствие ограничения разрешающей способности метода.

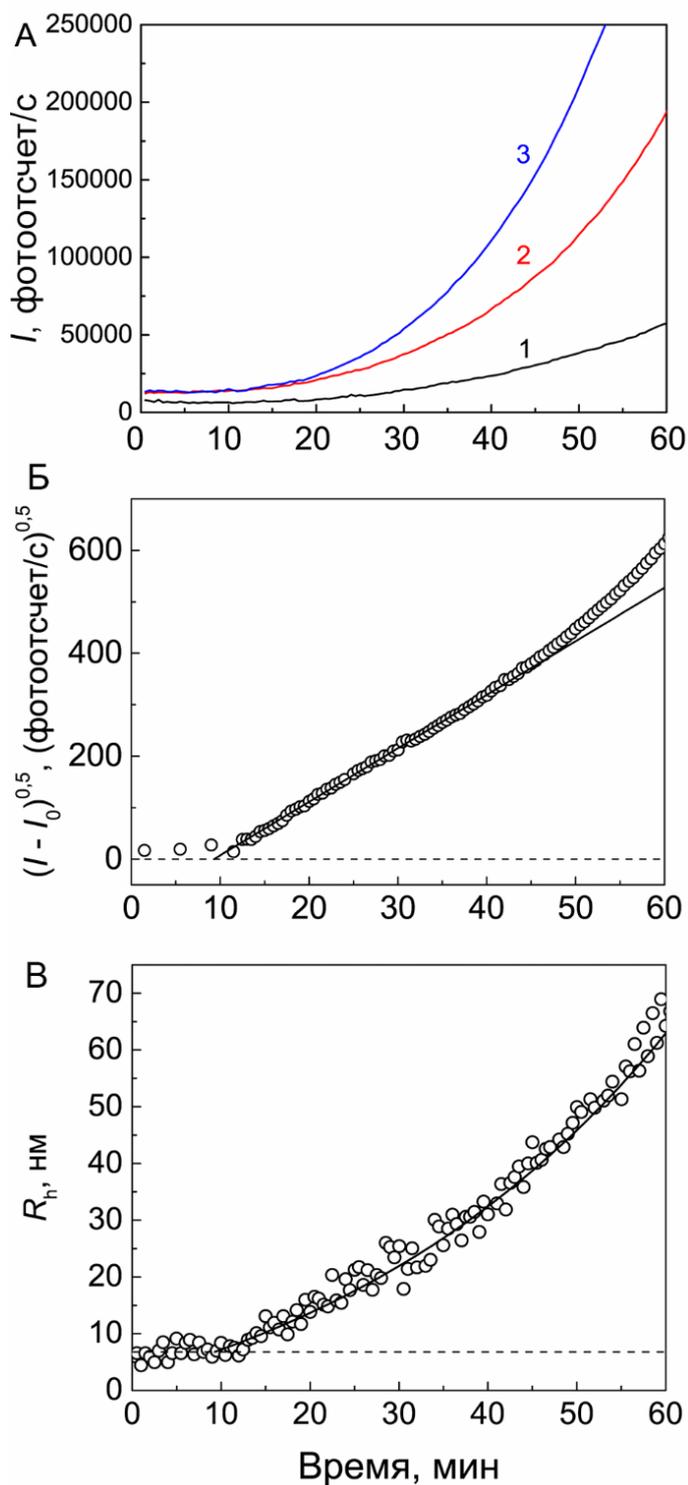


Рис. 3.33. Кинетика ДТТ-индуцированной агрегации БСА, полученная методом динамического светорассеяния. Концентрация ДТТ составляла 2 мМ. (А) Зависимость интенсивности светорассеяния (I) от времени в координатах $\{I; t\}$ при концентрациях БСА 0,5 мг/мл (1), 1,0 мг/мл (2) и 1,5 мг/мл (3). (Б) Зависимость интенсивности светорассеяния от времени в координатах $\{(I - I_0)^{0.5}; t\}$ при концентрации БСА 1 мг/мл. Точками обозначены экспериментальные данные. Сплошная кривая была рассчитана по уравнению (3.5) при $K_{LS} = 10,41$ (фотоотсчет/с)^{0.5}·мин⁻¹ и $t_0 = 9,3$ мин. (В) Зависимость гидродинамического радиуса (R_h) частиц от времени при концентрации БСА 1 мг/мл. Сплошная кривая была рассчитана по уравнению (2.7) при $R_{h,initial} = 6,8$ нм, $t_{2R} = 10,3$ мин и $K = 3,4$.

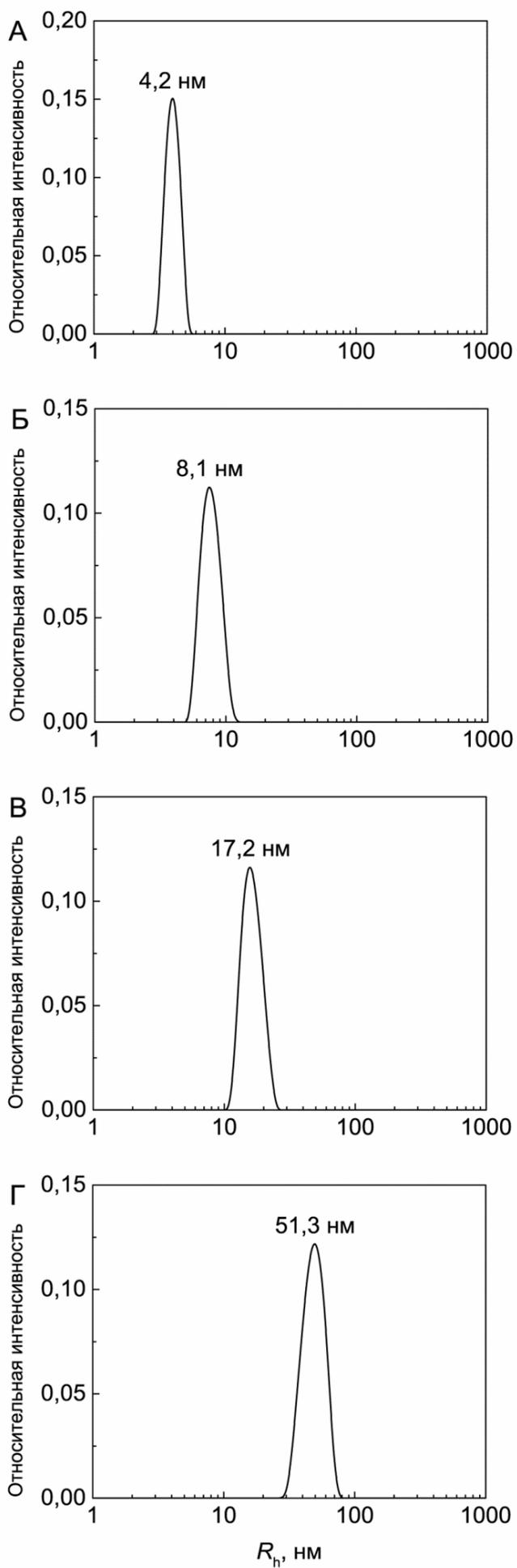


Рис. 3.34. Распределения гидродинамических радиусов частиц БСА (1 мг/мл) при инкубации в присутствии 2 мМ ДТГ при 45 °С в течение 0 мин (А), 20 мин (Б), 40 мин (В) и 60 мин (Г).

Результаты изучения кинетики ДТТ-индуцированной агрегации БСА при разных концентрациях белка представлены на рис. 3.35. Зависимость параметра K_{LS} от концентрации БСА линейна в интервале концентраций белка от 0 до 2 мг/мл (рис. 3.35А):

$$K_{LS} = \alpha[\text{БСА}]_0, \quad (3.24)$$

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:

$$v_0 = \frac{k_1}{\alpha} K_{LS} \quad (3.25)$$

($k_1/\alpha = 0,0056 \pm 0,0002$ (фотоотсчет/с) $^{0,5} \cdot \text{мл} \cdot \text{мг}^{-1}$). 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 $n = 1$.

Как видно из рис. 3.35Б, при варьировании концентрации БСА наблюдаются незначительные изменения t_0 . Среднее значение t_0 в интервале концентраций БСА от 0,5 до 2 мг/мл составляло $9,3 \pm 0,3$ мин.

Анализ зависимостей R_h от времени, полученных при разных концентрациях БСА, с помощью уравнения (2.7) позволяет построить график t_{2R} vs [БСА]. Как видно из рис. 3.35В, значение t_{2R} снижается при увеличении концентрации БСА. При высоких концентрациях БСА t_{2R} достигает предельной величины, которую можно оценить путем экстраполяции в координатах $\{t_{2R}; 1/[\text{БСА}]\}$: $t_{2R,\text{lim}} = 6,6 \pm 0,2$ мин. Что касается параметра K , то его значение постоянно и равно $3,1 \pm 0,3$.

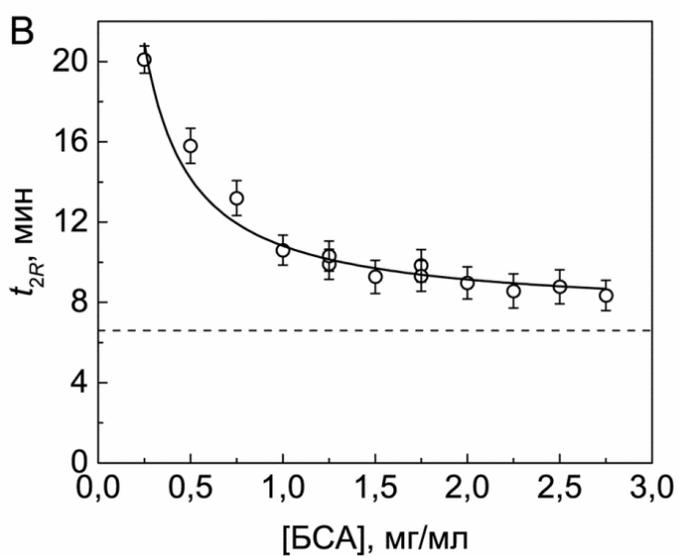
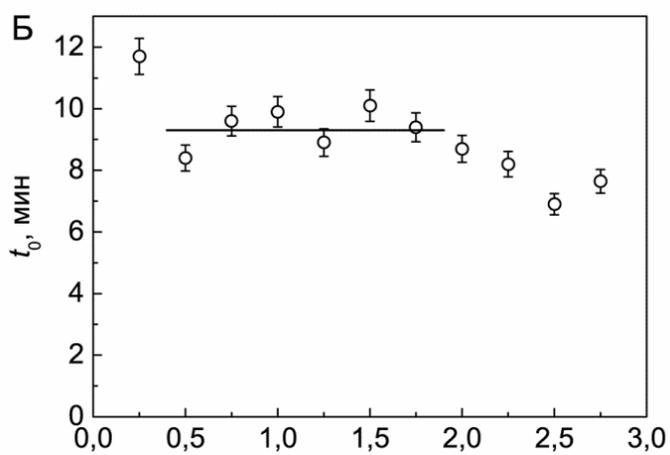
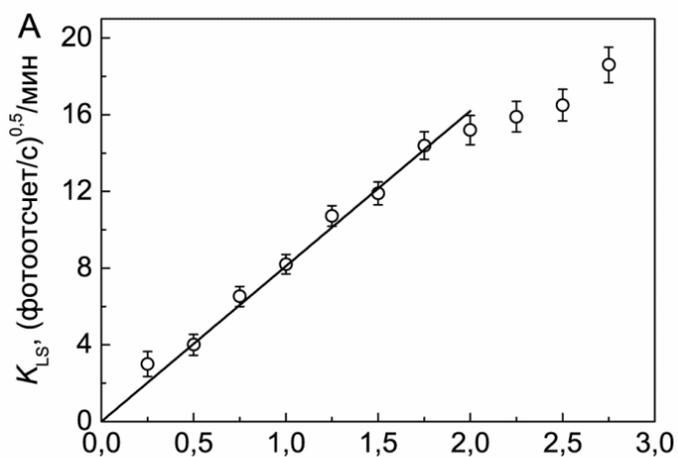


Рис. 3.35. Кинетика ДТТ-индуцированной агрегации БСА при разных концентрациях белка. Зависимости параметров K_{LS} (А), t_0 (Б) и t_{2R} (В) от концентрации БСА. Концентрация ДТТ составляла 2 мМ. Сплошная кривая на рисунке А была рассчитана по уравнению (3.24) при $\alpha = 8,1$ (фотоотсчет/с)^{0,5}·мин⁻¹·мл·мг⁻¹.

Кинетические данные, полученные в настоящей работе, позволяют обсудить механизм ДТТ-индуцированной агрегации БСА. Мы можем предложить следующую кинетическую схему процесса агрегации:

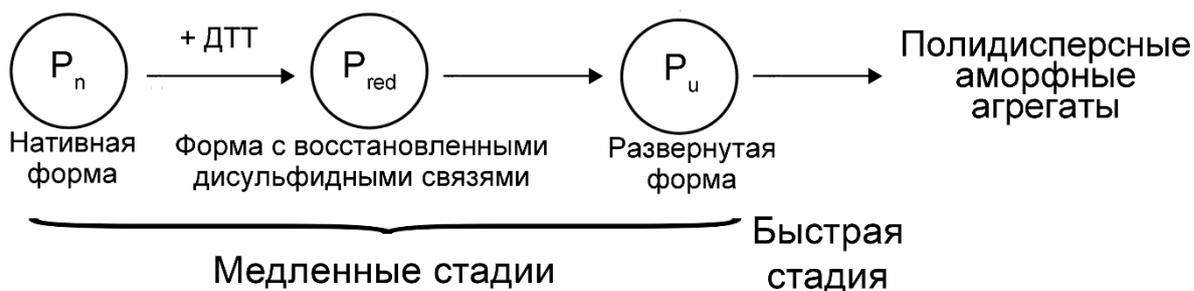


Рис 3.36. Механизм ДТТ-индуцированной агрегации БСА.

Первая стадия – восстановление дисульфидных связей исходной молекулы (P_n) до формы P_{red} (молекула БСА с восстановленными дисульфидными связями). Следующие стадии – разворачивание молекулы белка (P_u – развернутый белок) и агрегация развернутых молекул белка.

При агрегации БСА в присутствии ДТТ, в отличие от инсулина [Bumagina, et al., 2010a] и α -лактальбумина [Bumagina, et al., 2010b], не образуются стартовые агрегаты. Как видно из рис. 3.33В, средний радиус (R_h) белковых агрегатов в процессе агрегации возрастает монотонно, разделения на неагрегированную и агрегированную форму БСА не происходит.

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

Параметр K_{LS} , определяемый из кинетических данных, полученных методом динамического светорассеяния, может быть использован для количественной оценки антиагрегационной активности шаперонов белковой природы и низкомолекулярных химических шаперонов.

На рис. 3.37 продемонстрировано подавление ДТТ-индуцированной агрегации БСА в присутствии Arg. Зависимости I от времени (рис. 3.37А) представлены также в координатах $\{(I - I_0)^{0.5}; t\}$ (рис. 3.37Б) и проанализированы с применением уравнения (3.5). Зависимости гидродинамического радиуса частиц от времени (рис. 3.37В) были проанализированы с применением уравнения (2.7).

Аналогичным образом были получены и проанализированы зависимости интенсивности светорассеяния и гидродинамического радиуса от времени для ДТТ-индуцированной агрегации БСА в присутствии ArgAd в диапазоне концентраций от 0 до 150 мМ, ArgEE в диапазоне концентраций от 0 до 150 мМ и Pro в диапазоне концентраций от 0 до 1 М.

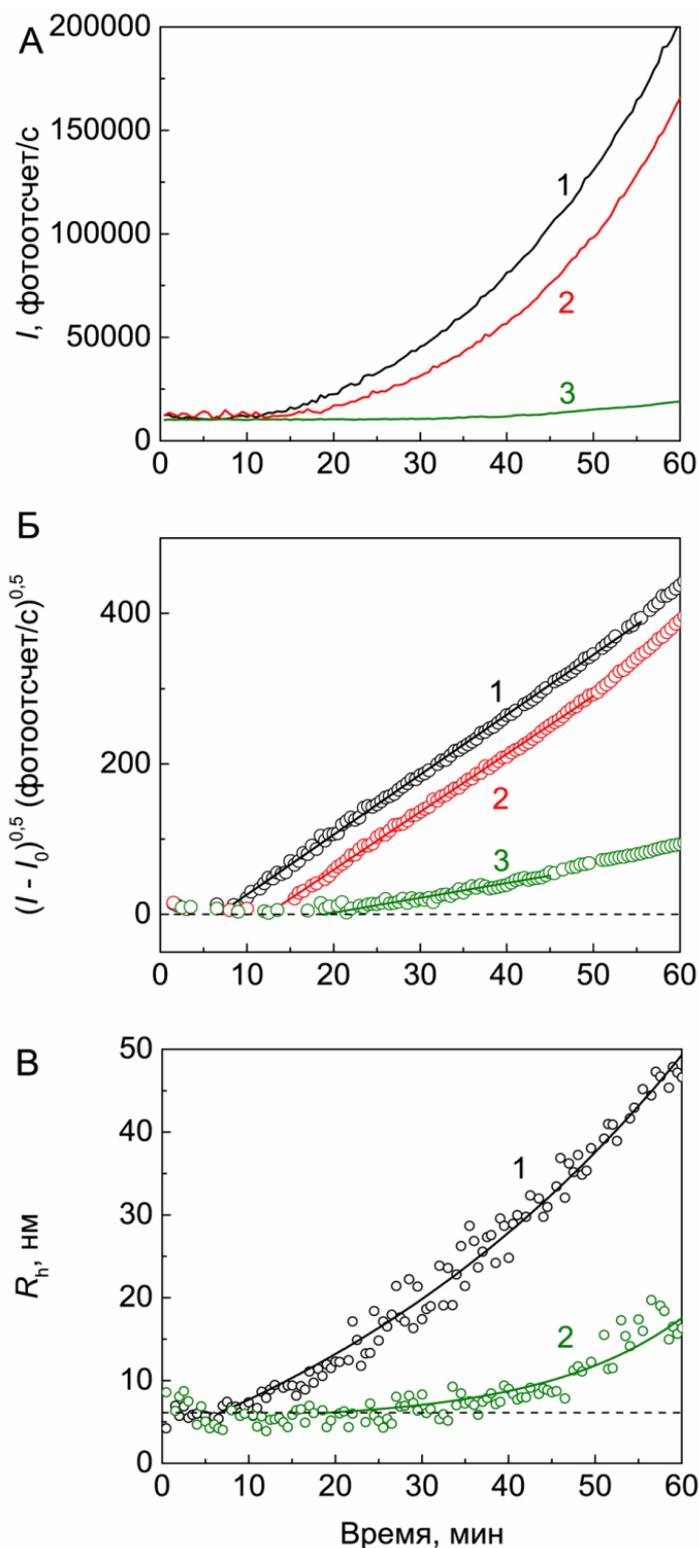


Рис. 3.37. Влияние Arg на ДТТ-индуцированную агрегацию БСА ($[BSA] = 1$ мг/мл, 2 мМ ДТТ). (А) Зависимости интенсивности светорассеяния (I) от времени. Концентрации Arg: 0 мМ (1), 50 мМ (2) и 400 мМ (3). (Б) Зависимость интенсивности светорассеяния от времени в координатах $\{(I - I_0)^{0.5}; t\}$. Точками обозначены экспериментальные данные. Сплошная кривая была рассчитана по уравнению (3.5). Концентрации Arg: 0 мМ (1), 50 мМ (2) и 400 мМ (3). (В) Зависимости гидродинамического радиуса (R_h) белковых агрегатов от времени. Точками обозначены экспериментальные данные. Сплошные кривые были рассчитаны по уравнению (2.7). Концентрации Arg: 0 мМ (1) и 400 мМ (2).

Анализ зависимостей интенсивности светорассеяния от времени позволил нам построить графики соотношения $K_{LS}/K_{LS,0}$ vs [химический шаперон] (рис. 3.38). Стоит напомнить, что порядок агрегации по белку для тест-системы на основе ДТТ-индуцированной агрегации БСА был найден равным 1, и K_{LS} линейно зависит от начальной концентрацией белка, следовательно, $a = 1$, и $(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/a} = K_{LS}/K_{LS,0}$.

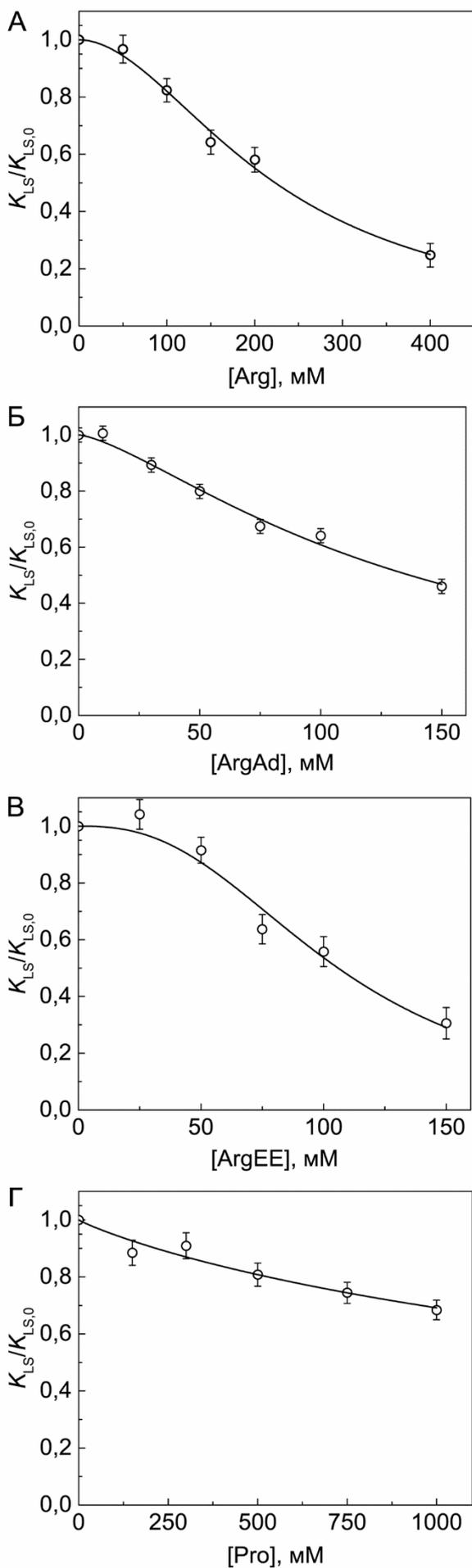


Рис. 3.38. Кинетика ДТТ-индуцированной агрегации БСА при различных концентрациях химических шаперонов ($[БСА] = 1$ мг/мл, 2 mM ДТТ). Зависимости соотношения $K_{LS}/K_{LS,0}$ в присутствии аргинина (А), аргининамида (Б), этилового эфира аргинина (В) и пролина (Г) от концентрации химического шаперона. Сплошные кривые были рассчитаны по уравнению (3.11) при соответствующих значениях $[L]_{0,5}$ и h , приведенных в табл. 3.3.

Зависимость соотношения $K_{LS}/K_{LS,0}$ от концентрации химического шаперона характеризует снижение начальной скорости агрегации в присутствии химического шаперона. Эта зависимость подчиняется уравнению Хилла (3.11). Соответствующие значения параметров $[L]_{0,5}$ и h для Arg, ArgAd, ArgEE и Pro даны в табл. 3.3.

Таблица 3.3. Значения параметров уравнения (3.11) для подавления ДТТ-индуцированной агрегации БСА (1 мг/мл) химическими 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	$0,9 \pm 0,1$

В случае Pro коэффициент Хилла был примерно равен единице. Для Arg, ArgAd и ArgEE коэффициент Хилла превышал единицу: $h = 1,9, 1,4$ и $2,6$, соответственно. Сигмоидный характер графиков $K_{LS}/K_{LS,0}$ vs $[Arg]$ (или $[ArgEE; ArgAd]$), то есть, случай, когда $h > 1$ может быть объяснен формированием кластеров молекул химических шаперонов в специфических участках поверхности белка [Shukla & Trout, 2010; Vagenende, et al., 2013].

На рис. 3.39 показаны зависимости соотношения $K_{LS}/K_{LS,0}$ от концентрации химического шаперона (в данном случае ArgAd), полученные при разных концентрациях белка-мишени.

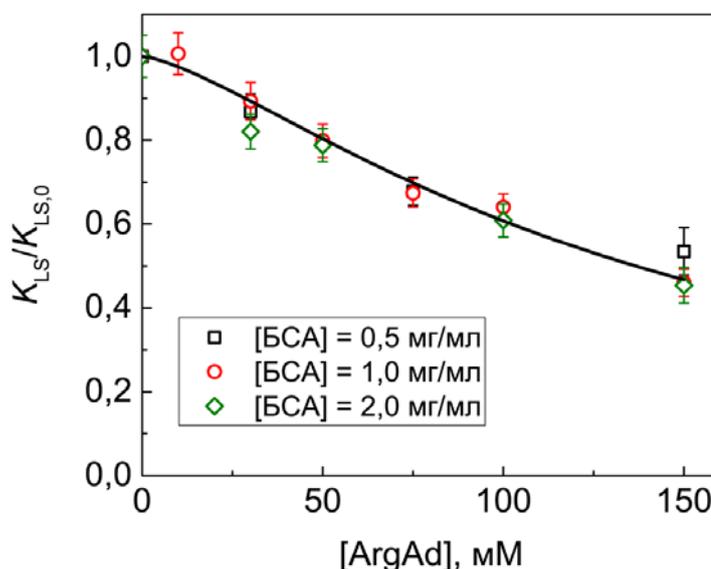


Рис. 3.39. Зависимости соотношения $K_{LS}/K_{LS,0}$ от концентрации ArgAd, полученные при концентрациях БСА 0,5, 1 и 2 мг/мл.

Значения $K_{LS}/K_{LS,0}$, соответствующие разным концентрациям БСА, попали на одну общую кривую. Этот результат совпал с теоретическими предположениями, изложенными в разделе 3.1.2.

Неизменность кинетического режима ДТТ-индуцированной агрегации БСА в присутствии аргинина была подтверждена методом фракционирования в поле асимметричного потока. Зависимости доли неагрегированного белка от времени представлены на рис. 3.40, все они подчиняются кинетике реакции первого порядка и не зависят от концентрации белка. Смены скорость-лимитирующей стадии не происходит, и параметр K_{LS} может быть использован как мера начальной скорости агрегации.

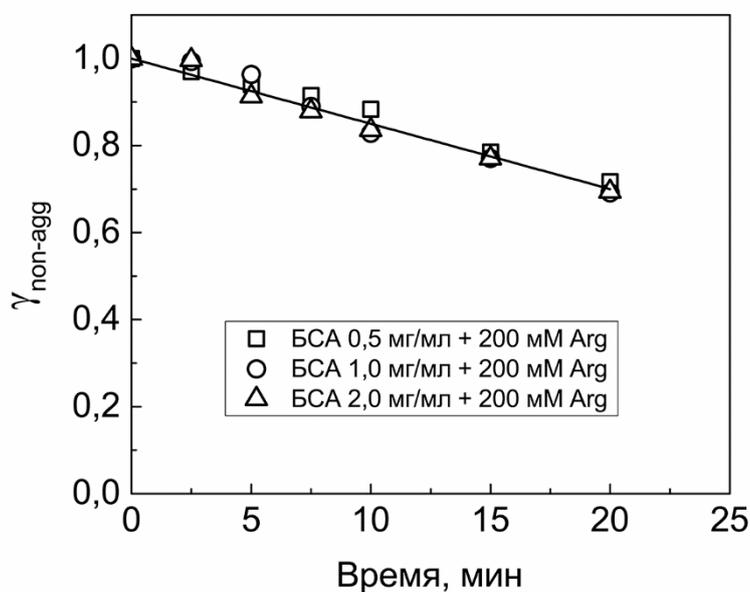


Рис. 3.40. Зависимость доли неагрегированного белка от времени для различных концентраций БСА в присутствии 200 мМ аргинина.

При интерпретации защитного влияния химических шаперонов необходимо принимать во внимание тип тест-системы, используемой для оценки антиагрегационной активности шаперонов. Тест-система на основе ДТТ-индуцированной агрегации БСА относится к тест-системам, в которых скорость-лимитирующей стадией процесса агрегации является стадия разворачивания молекулы белка. Снижение начальной скорости агрегации в присутствии химических шаперонов объясняется взаимодействием шаперона с нативной формой белка-мишени, что приводит к формированию комплекса, более устойчивого к разворачиванию. Данные ДСК, приведенные в разделе 3.2.2, показывают, что Arg и его производные (ArgEE и ArgAd) стабилизируют БСА. Таким образом, параметр $[L]_{0,5}$, вычисляемый на основе зависимости соотношения $K_{LS}/K_{LS,0}$ от концентрации шаперона характеризует сродство шаперона к нативной, неразвернутой

форме БСА. Среди изученных шаперонов ArgEE и ArgAd проявляли наибольшее сродство.

3.2.5. Сравнение шапероноподобной активности интактного и сшитого α -кристаллина с использованием тест-системы на основе ДТТ-индуцированной агрегации БСА

На рис. 3.41 показаны профили элюции для интактного и сшитого α -кристаллина, полученные методом гель-фильтрации. Интактный α -кристаллин элюировался через 127 мин. Сшитый белок состоял из двух фракций, элюирующихся при 107 и 128 мин. Пик при 107 мин – высокомолекулярный продукт межмолекулярного сшивания, тогда как пик при 128 мин – результат внутримолекулярного сшивания. Фракция сшитого белка, отмеченная на рис. 3.41 серым цветом, была собрана и изучена методом ДСН-электрофореза в 12,5% ПААГ.

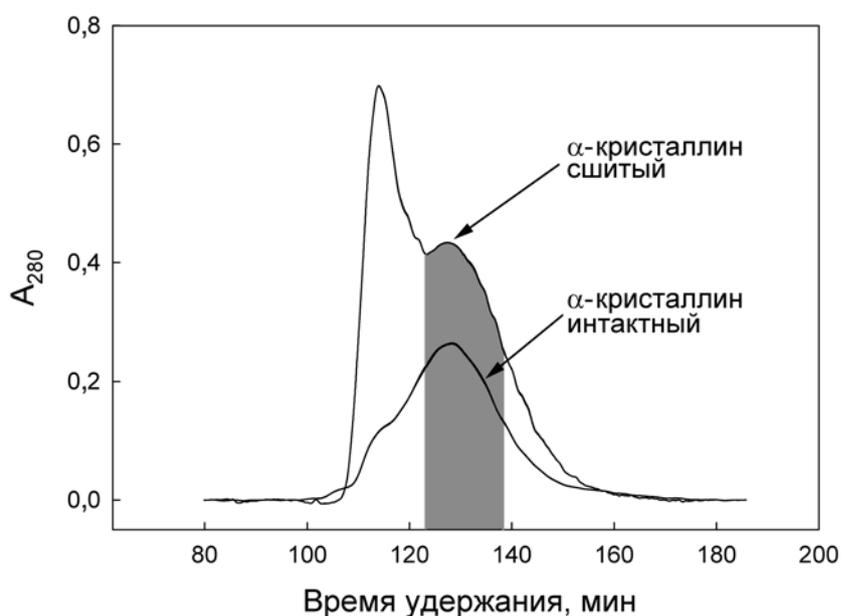


Рис. 3.41. Профили элюции сшитого и интактного α -кристаллина, полученные методом гель-проникающей хроматографии. Фракция сшитого белка, отмеченная серым цветом, была выделена для дальнейшего изучения шапероноподобной активности.

На рис. 3.42 показан результат электрофоретического разделения нативного и сшитого α -кристаллина. Даже при перегрузке геля (около 20 мкг белка) в препарате сшитого α -кристаллина наблюдались только следовые количества образца с низкой молекулярной массой. Большая часть белка (99%) присутствовала в высокомолекулярном виде и не вошла в 5% концентрирующий гель.

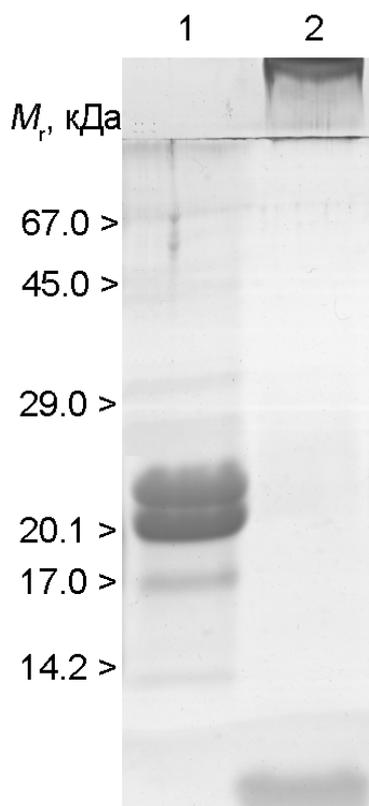


Рис. 3.42. Электрофореграмма интактного α -кристаллина (10 мкг, дорожка **1**) и сшитого α -кристаллина (20 мкг, дорожка **2**). Слева указаны относительные молекулярные массы белков-стандартов.

Препараты интактного и сшитого α -кристаллина были дополнительно охарактеризованы методом динамического светорассеяния. Средний гидродинамический радиус частиц интактного α -кристаллина составил 12,5 нм (рис. 3.43А). Главный пик распределения размеров частиц для сшитого α -кристаллина имел близкое значение $R_h = 16,7$ нм (рис. 3.43Б). Кроме этого пика наблюдались более крупные частицы с $R_h = 1430$ нм.

Образцы интактного и сшитого α -кристаллина были проанализированы методом ДСК для определения доли белка, остающегося в нативном состоянии после процедуры сшивания. На рис. 3.44 представлены профили изменения избыточной теплоемкости для интактного (кривая 1) и сшитого (кривая 2) α -кристаллина. В результате было установлено, что сшивание не влияет на термостабильность белка (T_{max} для α -кристаллина, не подвергнутого сшиванию, в этом эксперименте была найдена равной 62,9 °С, для сшитого α -кристаллина $T_{max} = 63,2$ °С), но доля нативного белка снижается при сшивании в 6,3 раза.

Как видно из рис. 3.45А, α -кристаллин подавляет ДТТ-индуцированную агрегацию БСА. На рисунке представлены зависимости интенсивности светорассеяния (I) от времени. Если реакционная смесь содержит α -кристаллин, наблюдается начальное снижение интенсивности светорассеяния на кинетической кривой агрегации. Например, на вставке на рис. 3.45А показан начальный участок кинетической кривой, полученной при концентрации α -кристаллина 0,5 мг/мл. Это обстоятельство затрудняет использование уравнения (3.5) для вычисления начальной скорости агрегации, так как определение величины I_0 становится невозможно. Поэтому для определения параметра K_{LS} , характеризующего начальную скорость агрегации, применили дифференциальную форму уравнения (3.5) – уравнение (3.6). Согласно уравнению (3.6), наклон прямой линии, проведенной через начальные положительные значения dI/dt , дает значение $2K_{LS}^2$ (рис. 3.45Б, $[\alpha\text{-кристаллин}] = 0,05$ мг/мл).

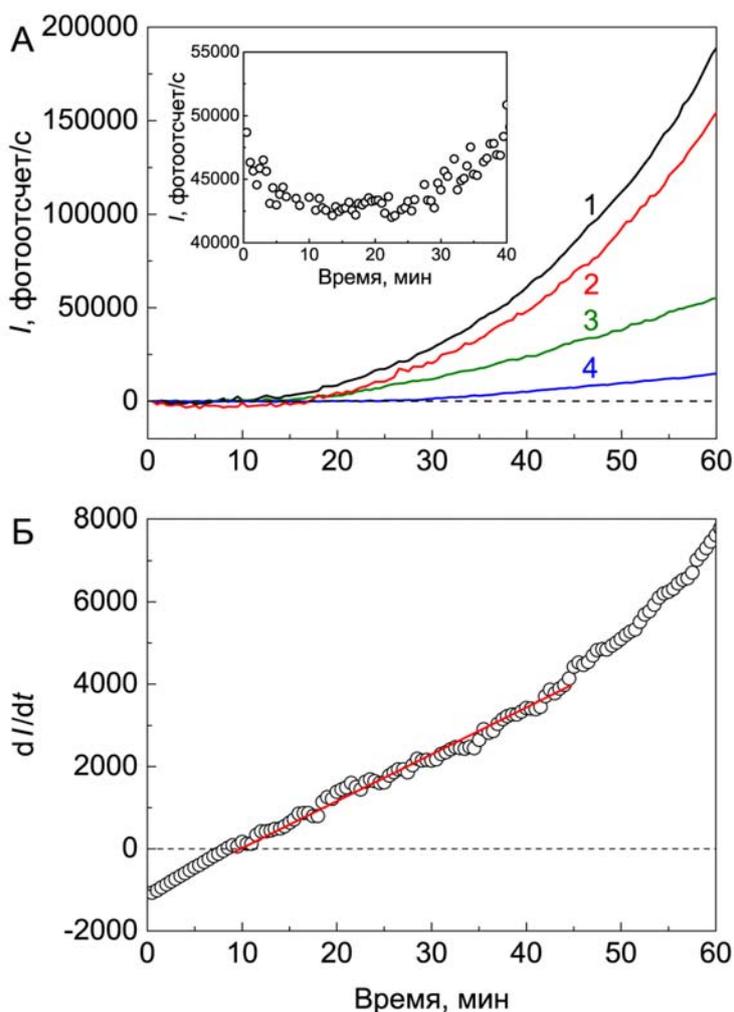


Рис. 3.45. Влияние α -кристаллина на ДТТ-индуцированную агрегацию БСА ($[БСА] = 1,0$ мг/мл; 2 мМ ДТТ). (А) Зависимости интенсивности светорассеяния (I) от времени, полученные при следующих концентрациях α -кристаллина: 0 мг/мл (1), 0,01 мг/мл (2), 0,1 мг/мл (3) и 1 мг/мл (4). На вставке показана зависимость I от времени при концентрации α -кристаллина 0,5 мг/мл. (Б) Зависимость dI/dt от времени при концентрации α -кристаллина 0,05 мг/мл. Точками показаны экспериментальные данные, сплошная кривая вычислена по уравнению (3.6).

Вычислены величины K_{LS} при разных концентрациях α -кристаллина и построен график зависимости $(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/n}$ от концентрации α -кристаллина (рис. 3.46). Целесообразно напомнить, что порядок ДТТ-индуцированной агрегации БСА по белку равен единице ($n = 1$). На рисунке дана дополнительная ось абсцисс $x = [\alpha$ -

кристаллин]/[БСА], где $[\alpha\text{-кристаллин}]$ – молярная концентрация α -кристаллина в расчете на одну субъединицу, [БСА] – молярная концентрация БСА. С использованием уравнения (3.12) было рассчитано значение начальной адсорбционной емкости α -кристаллина по отношению к белку-мишени: $AC_0 = 2,50 \pm 0,06$ молекул БСА на одну субъединицу α -кристаллина.

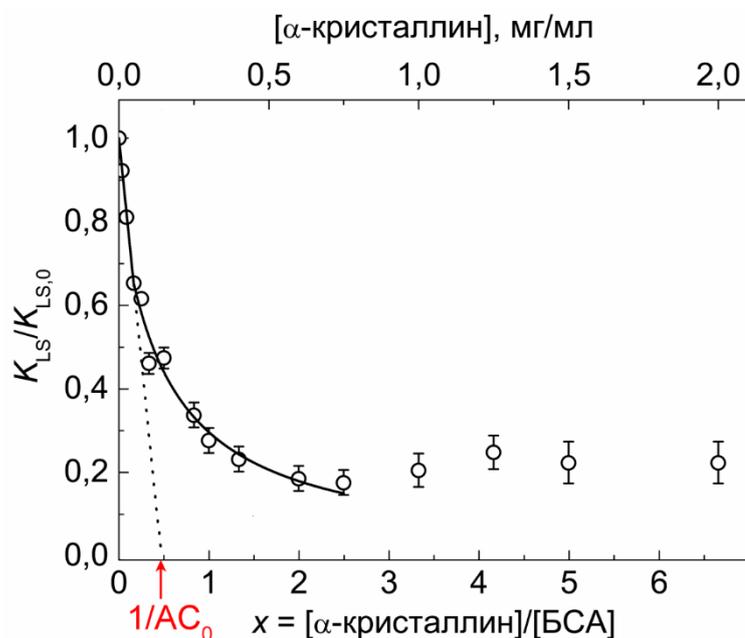


Рис. 3.46. Начальная скорость ДТТ-индуцированной агрегации БСА ([БСА] = 1,0 мг/мл; 2 мМ ДТТ) как функция соотношения молярных концентраций α -кристаллина и БСА (нижняя ось абсцисс) и концентрации α -кристаллина (верхняя ось абсцисс). Молярная концентрация α -кристаллина была рассчитана для субъединицы с массой 20 кДа. Точки соответствуют экспериментальным данным. Сплошная линия в интервале значений x от 0 до 0,17 была вычислена по уравнению (3.12).

При изучении влияния сшитого α -кристаллина на ДТТ-индуцированную агрегацию БСА (рис. 3.47А) также использовали уравнение (3.6) для расчета параметра K_{LS} (рис. 3.47Б).

На рис. 3.48 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 (3.12) позволяет определить адсорбционную емкость сшитого α -кристаллина: $AC_0 = 0,212 \pm 0,004$ мономеров БСА на одну субъединицу α -кристаллина.

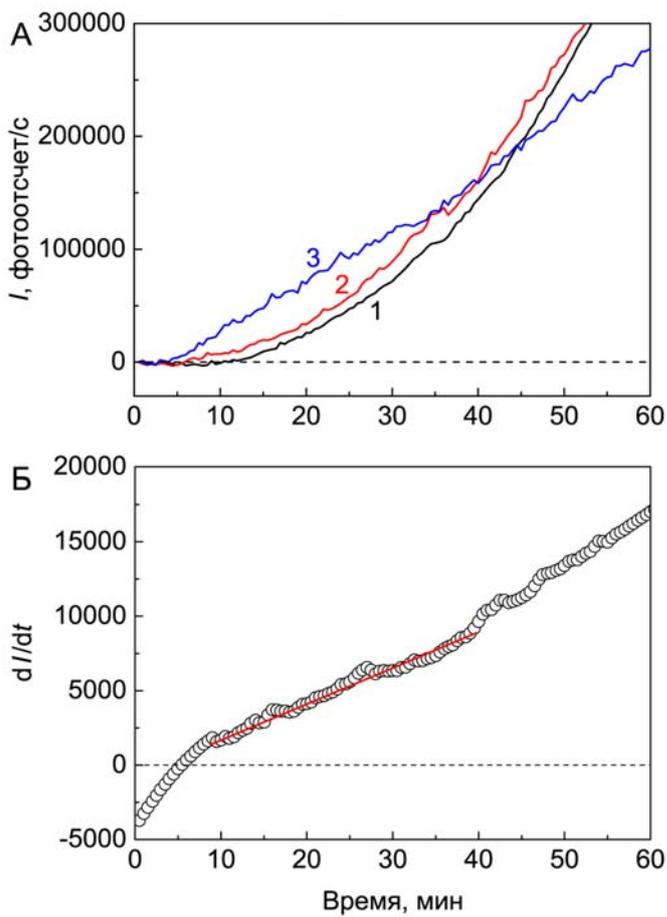


Рис. 3.47. Влияние сшитого α -кристаллина на ДТТ-индуцированную агрегацию БСА ($[БСА] = 1,0$ мг/мл; 2 мМ ДТТ). (А) Зависимости интенсивности светорассеяния (I) от времени, полученные при следующих концентрациях сшитого α -кристаллина: 0 мг/мл (1), 0,1 мг/мл (2), и 1 мг/мл (3). (Б) Зависимость dI/dt от времени при концентрации сшитого α -кристаллина 0,05 мг/мл. Точками показаны экспериментальные данные, сплошная кривая вычислена по уравнению (3.6).

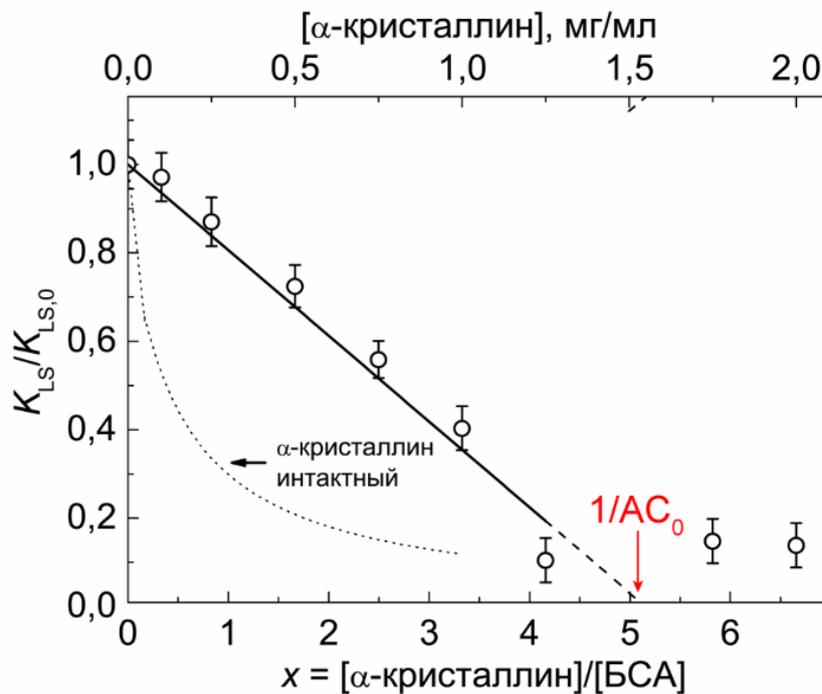


Рис. 3.48. Начальная скорость ДТТ-индуцированной агрегации БСА ($[БСА] = 1,0$ мг/мл; 2 мМ ДТТ) как функция соотношения молярных концентраций сшитого α -кристаллина и БСА (нижняя ось абсцисс) и концентрации сшитого α -кристаллина (верхняя ось абсцисс). Молярная концентрация α -кристаллина была рассчитана для субъединицы с массой 20 кДа. Точки соответствуют экспериментальным данным. Сплошная линия в интервале значений x от 0 до 4,2 была вычислена по уравнению (3.12). Пунктирная линия соответствует зависимости $(K_{LS}/K_{LS,0})$ от концентрации intactного α -кристаллина.

Дополнительная информация о взаимодействии БСА в присутствии ДТТ с α -кристаллином получена методом аналитического ультрацентрифугирования. Перед тем, как анализировать смеси БСА и α -кристаллина, мы изучили седиментационное поведение интактного и сшитого α -кристаллина, прогретого при 45 °С в течение 1 ч в присутствии 2 мМ ДТТ. Общее распределение $c(s,*)$ для прогретого α -кристаллина (рис. 3.49А), кроме основного пика с $s_{20,w} = 19,4$ S, выявило два минорных пика ($s_{20,w} = 15$ и 22,3 S). Как и в случае интактного α -кристаллина, сшитый α -кристаллин содержал набор олигомерных форм с наибольшей фракцией с $s_{20,w} = 22$ S (рис. 3.49Б). Следует отметить, что олигомеры с $s_{20,w} < 21$ S отсутствуют.

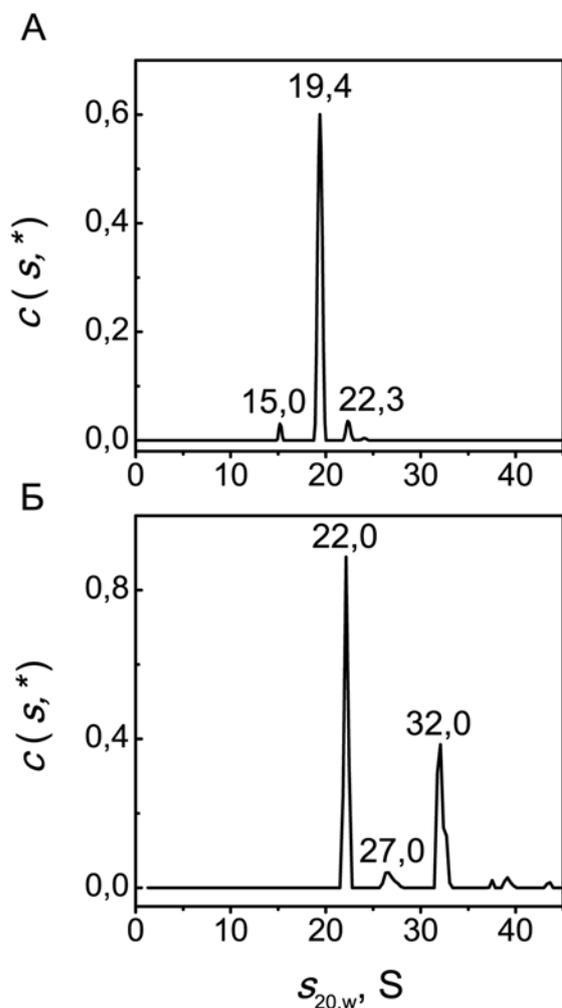


Рис. 3.49. Седиментационный анализ интактного α -кристаллина (А) и сшитого α -кристаллина (Б), прогретого при 45 °С в течение 1 часа. Концентрация белка составляла 0,5 мг/мл для обоих образцов. Общие распределения коэффициентов седиментации $c(s,*)$, полученные при 45 °С были преобразованы в стандартные распределения $s_{20,w}$. Скорость ротора была равна 34000 об/мин.

На рис. 3.50 показано распределение $c(s)$ для смесей БСА (1 мг/мл) с разными концентрациями α -кристаллина (0,05, 0,1 и 0,4 мг/мл). Смеси прогревали при 45 °С в течение 1 ч. Следует отметить, что в случае смеси БСА с α -кристаллином в концентрации 0,05 мг/мл (см. рис. 3.50, красная линия), на распределении $c(s)$ не обнаружено несвязанного α -кристаллина из-за его малой концентрации. 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. Подобное 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. Важно заметить, что комплексы с $s_{20,w}$ в интервале 6,8 – 14,5 S были сформированы диссоциированными формами α -кристаллина (для сравнения см. распределения $c(s)$ для α -кристаллина на рис. 3.49А, где формы с $s_{20,w}$ меньше 15 S отсутствуют).

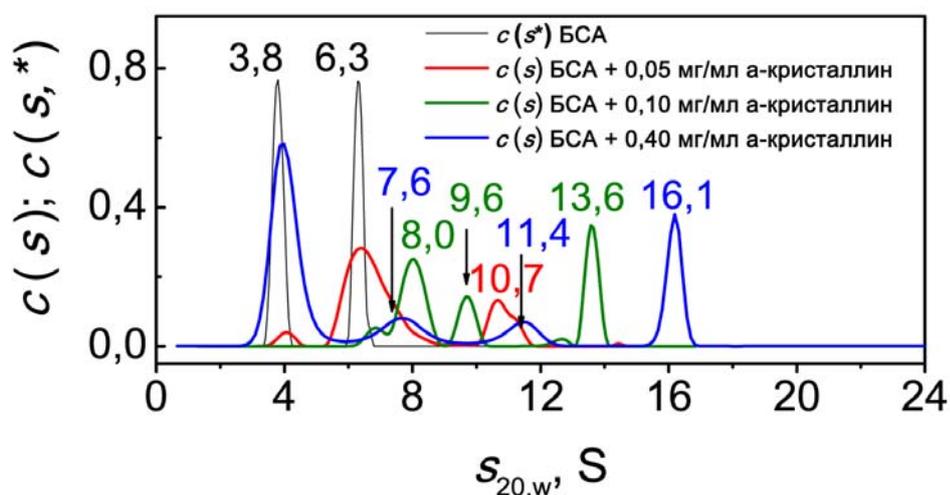


Рис. 3.50. Взаимодействие БСА с интактным α -кристаллином при нагревании при 45 °С. Все образцы БСА (1 мг/мл) и смесей БСА с α -кристаллином прогревали при 45 °С в течение 1 часа в присутствии 2 мМ ДТТ. Распределения $c(s)$ смесей БСА с α -кристаллином в различных концентрациях (0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,4 мг/мл) и $c(s,*)$ для БСА, полученные при 45 °С были преобразованы в стандартные распределения $s_{20,w}$. Скорость ротора была равна 34000 об/мин.

Было изучено 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 (рис. 3.51). Мы предположили, что главный пик с $s_{20,w} = 5,3$ S соответствует БСА. Отметим, что полученные данные не выявили пиков, соответствующих несвязанному сшитому α -кристаллину, вследствие его низкой концентрации (0,05 мг/мл). Анализ графиков $c(s,*)$ и $c(s)$ на рис. 3.49Б, 3.50 и 3.51 позволил сделать вывод, что пик с $s_{20,w} = 19,2$ S на рис. 3.51 соответствует комплексу БСА со сшитым α -кристаллином. Пики с $s_{20,w}$ в интервале 6,8 – 14 S отсутствовали (рис. 3.51).

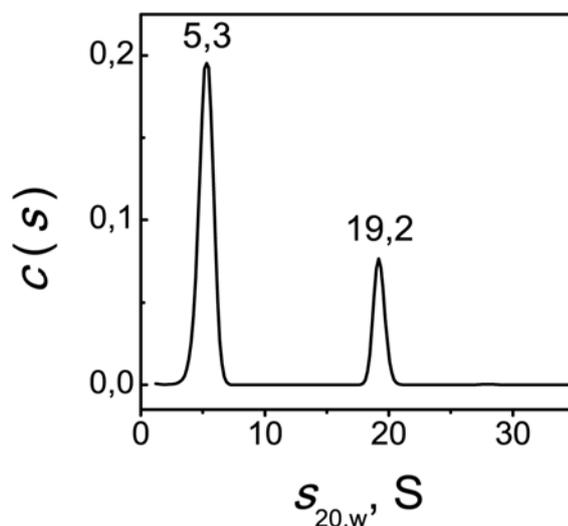


Рис. 3.51. Взаимодействие БСА со сшитым α -кристаллином при нагревании при 45 °С. Все образцы прогревали при 45 °С в течение 1 часа в присутствии 2 мМ ДТТ. Распределение $c(s)$ для смеси БСА (1 мг/мл) с α -кристаллином (0,05 мг/мл) были преобразованы в стандартные распределения $s_{20,w}$. Скорость ротора была равна 34000 об/мин.

Таким образом, в случае сшитого α -кристаллина комплексы с диссоциированными формами не образуются.

3.2.6. Кинетика ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина

Для установления взаимосвязи между начальной скоростью агрегации белка и длительностью лаг-периода в случае аморфной агрегации была изучена кинетика ДТТ-индуцированной агрегации холо- α -лактальбумина коровьего молока.

Существует корреляция между скоростью роста агрегатов (k_g) и лаг-периодом (t_{lag}): чем короче лаг-период, тем выше скорость роста, т. е., образцы, которые проходят нуклеацию быстро и обладают коротким лаг-периодом, демонстрируют быстрый рост агрегатов. Фендрих [Fändrich, 2007] предложил простое уравнение, связывающее значения k_g и t_{lag} :

$$k_g = \alpha / t_{lag}, \quad (3.26)$$

где α - постоянная величина. Применимость этого уравнения для амилоидной агрегации продемонстрирована Фендрихом [Fändrich, 2007] и другими авторами [Knowles, et al., 2009; Auer & Kashchiev, 2010].

Кинетику агрегации α -лактальбумина регистрировали с использованием динамического светорассеяния. На рис. 3.52А показаны кинетические кривые для ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина при 37 °С, зарегистрированные по

увеличению интенсивности светорассеяния (I). Концентрацию α -лактальбумина варьировали в интервале от 0,4 до 1,0 мг/мл. Начальные участки кинетических кривых проанализированы с использованием уравнения (3.4), что позволило определить начальную скорость агрегации (K_{LS}) и длительность лаг-периода (t_0). Применение уравнения (3.4) показано на вставке на рис. 3.52А (концентрация α -лактальбумина 0,4 мг/мл).

Измерение гидродинамического радиуса (R_h) белковых агрегатов методом динамического светорассеяния показало, что возрастание интенсивности светорассеяния происходит в результате увеличения размеров частиц (рис. 3.52Б). Начальные участки зависимостей R_h от времени позволяют вычислить параметры $R_{h,0}$ (гидродинамический радиус стартовых агрегатов) и t_{2R} с использованием уравнения (2.6) (см. вставку на рис. 3.52Б). Увеличение концентрации белка в интервале от 0,4 мг/мл до 1,0 мг/мл сопровождается уменьшением $R_{h,0}$ от 36 до 24 нм и увеличением величины $1/t_{2R}$, которая характеризует начальную скорость агрегации, в 6,2 раза.

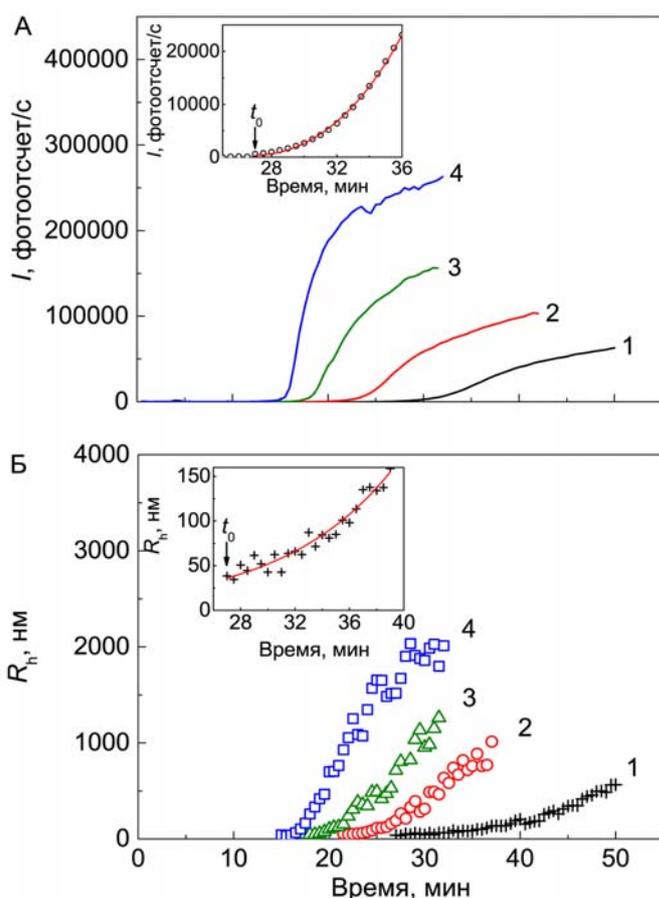


Рис. 3.52. Кинетика ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина ($[ДТТ] = 20$ мМ). (А) Зависимости интенсивности светорассеяния (I) от времени. Концентрации белка: 0,4 мг/мл (1), 0,5 мг/мл (2), 0,7 мг/мл (3) и 1,0 мг/мл (4). На вставке показан начальный участок кинетической кривой, $[LA] = 0,4$ мг/мл. Точками обозначены экспериментальные данные. Непрерывная кривая вычислена по уравнению (3.4): $K_{LS} = 4,9$ (фотоотсчет/с)·мин⁻¹, $t_0 = 27$ мин. (Б) Зависимости гидродинамического радиуса (R_h) белковых агрегатов от времени. Концентрации белка: 0,4 мг/мл (1), 0,65 мг/мл (2), 0,7 мг/мл (3) и 1,0 мг/мл (4). На вставке показан начальный участок зависимости R_h от времени, $[LA] = 0,4$ мг/мл. Точками обозначены экспериментальные данные. Непрерывная кривая вычислена по уравнению (2.6): $R_{h,0} = 36$ мин и $t_{2R} = 5,7$ мин.

Для определения параметра a в случае ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина построена зависимость начальной скорости агрегации (K_{LS}) от

концентрации α -лактальбумина в логарифмических координатах (рис. 3.53). Эта зависимость линейна. Получено следующее значение параметра: $a = 2,5 \pm 0,2$.

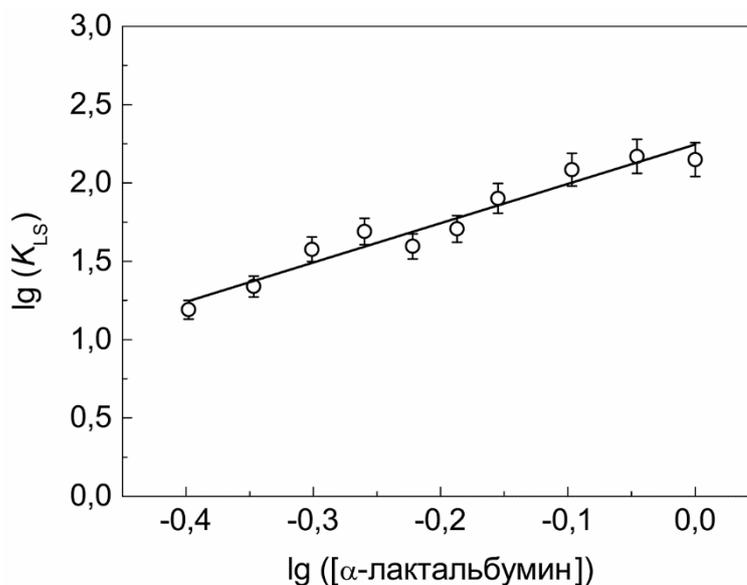


Рис. 3.53. Определение параметра a для ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина. Зависимость начальной скорости (K_{LS}) агрегации от концентрации белка в логарифмических координатах.

Прежде чем переходить к установлению взаимосвязи между начальной скоростью агрегации α -лактальбумина и длительностью лаг-периода, целесообразно обсудить зависимость t_0 от концентрации α -лактальбумина. Как видно из рис. 3.54, значение t_0 линейно зависит от обратной величины концентрации белка. Таким образом, для описания зависимости t_0 от концентрации α -лактальбумина, можно использовать следующее уравнение:

$$t_0 = t_{0,\text{lim}} + K/[P]_0, \quad (3.27)$$

где $t_{0,\text{lim}}$ – предельное значение t_0 при $[\alpha\text{-лактальбумин}] \rightarrow \infty$ и K постоянная величина. Для агрегации α -лактальбумина найдены следующие значения параметров: $t_{0,\text{lim}} = 6,0 \pm 0,5$ мин и $K = 8,0 \pm 0,7$ мин·мг/мл.

Принимая во внимание уравнения (3.8) и (3.27), мы можем получить следующее выражение, описывающее взаимосвязь между начальной скоростью агрегации и длительностью лаг-периода:

$$K_{LS}^{1/a} = \alpha/(t_0 - t_{0,\text{lim}}), \quad (3.28)$$

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

$$\frac{1}{K_{LS}^{1/a}} = -\frac{t_{0,\text{lim}}}{\alpha} + \frac{1}{\alpha} t_0. \quad (3.29)$$

Отрезок, отсекаемый на оси абсцисс линейной зависимостью $1/K_{LS}^{1/a}$ от t_0 , соответствует значению $t_{0,lim}$.

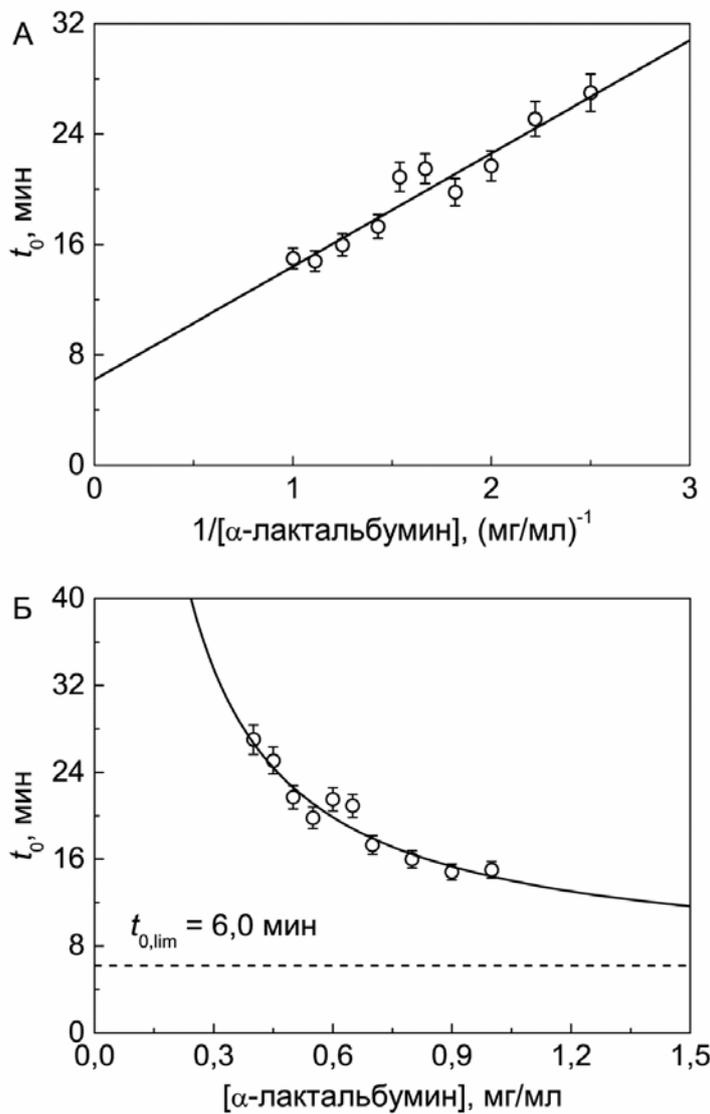


Рис. 3.54. Зависимость длительности лаг-периода (t_0) от обратной (А) и прямой (Б) величины концентрации α -лактальбумина. Сплошная линия на рисунке А рассчитана по уравнению 3.27 при $t_{0,lim} = 6,0$ мин и $K = 8,0$ мин·мг/мл.

На рис. 3.55А представлен график зависимости $K_{LS}^{1/a}$ от t_0 . Непрерывная кривая вычислена по уравнению (3.28) при $a = 2,5$, $t_{0,lim} = 6$ мин и $\alpha = 58 \text{ мин} \cdot [(\text{фотоотсчет/с}) \cdot \text{мин}^{-1}]^{1/a}$. Пунктирная вертикальная линия соответствует $t_0 = t_{0,lim}$. На рис. 3.55Б показана линейная анаморфоза, соответствующая уравнению (3.29). Таким образом, построение графика $\{1/K_{LS}^{1/a}; t_0\}$ позволяет проверить, равняется ли $t_{0,lim}$ нулю.

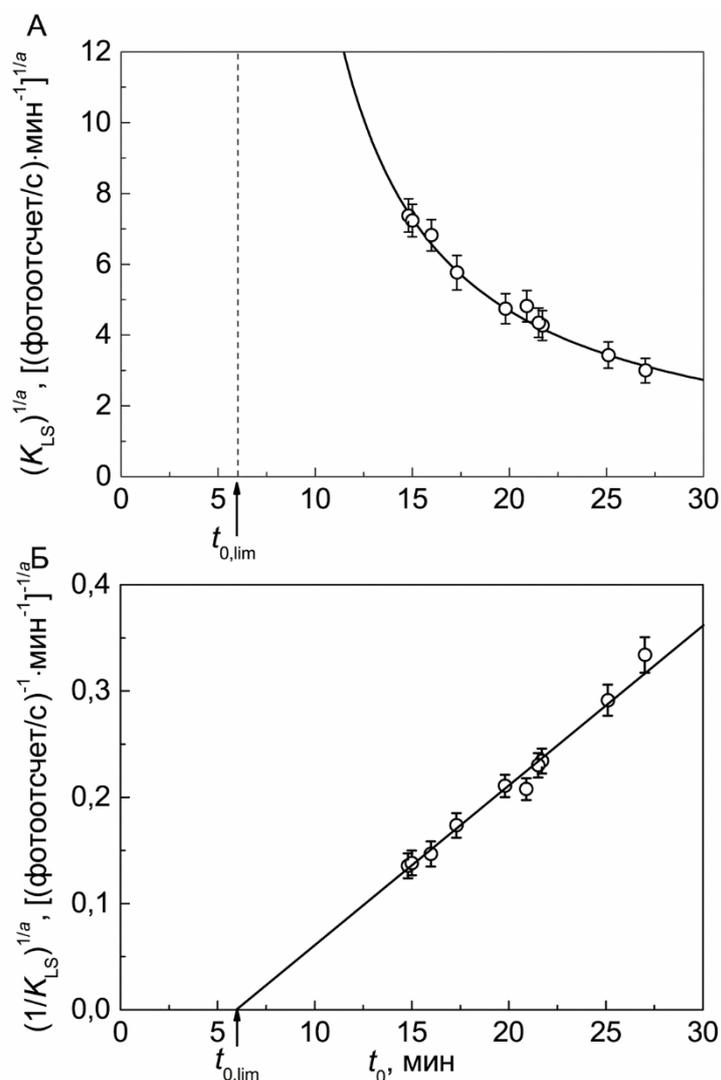


Рис. 3.55. Взаимосвязь между начальной скоростью (K_{LS}) ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина и длительностью лаг-периода (t_0). Экспериментальные данные представлены в координатах $\{K_{LS}^{1/a}; t_0\}$ (А) и координатах $\{1/K_{LS}^{1/a}; t_0\}$ (Б). Непрерывная кривая на рисунке А вычислена по уравнению (3.28) при $a = 2,5$, $t_{0,lim} = 6,0$ мин и $\alpha = 58$ мин·[(фотоотсчет/с)·мин⁻¹]^{1/a}.

На кинетику ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина влияет не только концентрация белка, но и концентрация восстанавливающего агента. Поэтому было интересно проверить применимость уравнения (3.28) в случае, когда изменение скорости агрегации вызвано изменением концентрации ДТТ. На рис. 3.56А показаны кинетические кривые агрегации, полученные при фиксированной концентрации α -лактальбумина (0,7 мг/мл) и разных концентрациях ДТТ. График зависимости начальной скорости агрегации (K_{LS}) от концентрации ДТТ, построенный в логарифмических координатах, позволяет определить порядок реакции (n) по дитиотреитолу (рис. 3.56Б). Значение n найдено равным $0,37 \pm 0,05$. Можно ожидать, что порядок агрегации по ДТТ будет варьировать от единицы при относительно низких концентрациях ДТТ до нуля при относительно высоких концентрациях ДТТ. Полученное значение $n = 0,37$ можно рассматривать как постоянную величину, пригодную для использования в данном рабочем диапазоне концентраций ДТТ.

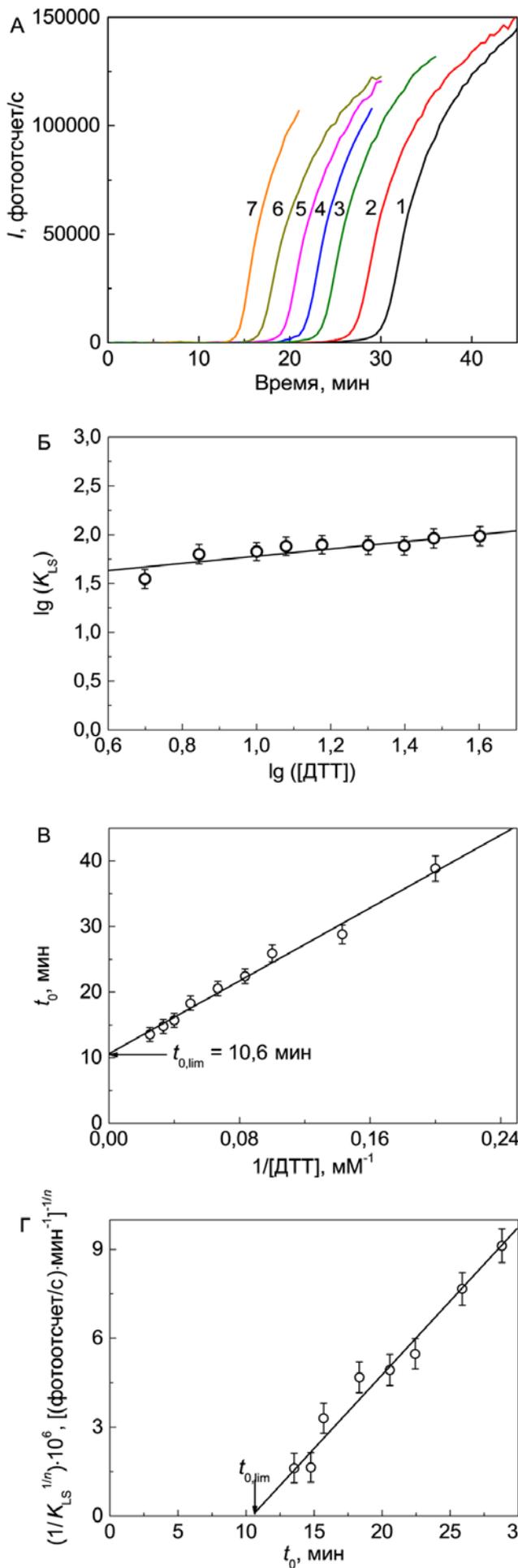


Рис. 3.56. Кинетика ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина (0,7 мг/мл), изученная при различных концентрациях ДТТ. **(А)** Зависимости интенсивности светорассеяния от времени, полученные при следующих концентрациях ДТТ: 7 мМ (1), 10 мМ (2), 12 мМ (3), 15 мМ (4), 20 мМ (5), 25 мМ (6) и 40 мМ (7). **(Б)** Зависимость начальной скорости (K_{LS}) ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина от концентрации ДТТ в логарифмических координатах. **(В)** Зависимость длительности лаг-периода (t_0) от обратной величины концентрации ДТТ. **(Г)** Взаимосвязь между начальной скоростью (K_{LS}) и длительностью лаг-периода (t_0) для ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина. Экспериментальные данные представлены в координатах $\{(1/K_{LS})^{1/n}; t_0\}$. Параметр n принят равным 0,37.

Зависимость лаг-периода от обратной концентрации ДТТ линейна (рис. 3.56В), как и в случае с варьированием концентрации α -лактальбумина, и отрезок, отсекаемый на оси ординат линейной зависимостью t_0 от $1/[\text{ДТТ}]$ соответствует предельному значению t_0 ($t_{0,\text{lim}} = 10,6 \pm 0,6$ мин), которое достигается при $[\text{ДТТ}] \rightarrow \infty$. Линейный характер зависимости $(1/K_{LS})^{1/n}$ от t_0 (рис. 3.56Г) подтверждает выполнимость линейной анаморфозы, представленной уравнением (3.29). Значение параметра α было найдено равным $2,3 \cdot 10^9$ мин \cdot [(фотоотсчет/с) \cdot мин $^{-1}$] $^{1/n}$. Таким образом, уравнение (3.28), описывающее взаимосвязь между начальной скоростью агрегации и длительностью лаг-периода, может быть использовано независимо от того, варьируется ли концентрация α -лактальбумина или дитиотреитола.

Как и в случае апо- α -лактальбумина [Bumagina, et al., 2010b], изучение ДТТ-индуцированной агрегации холо- α -лактальбумина показывает, что агрегация проходит стадию формирования стартовых агрегатов. Момент времени $t = t_0$ (t_0 – лаг-период) соответствует появлению стартовых агрегатов. При изучении ДТТ-индуцированной агрегации апо- α -лактальбумина среднее значение гидродинамического радиуса стартовых агрегатов найдено равным 93 нм [Bumagina, et al., 2010b]. При агрегации более стабильной формы α -лактальбумина, холо- α -лактальбумина, получены меньшие значения $R_{h,0}$ ($R_{h,0} = 22\text{-}36$ нм).

Значение $a > 1$ указывает на то, что в процесс нуклеации вовлечены несколько развернутых молекул белка. Можно предположить, что скорость-лимитирующая стадия процесса агрегации – стадия агрегации денатурированных форм белка.

Как видно из уравнения (3.28), определение порядка агрегации по белку необходимо для установления взаимосвязи между величинами K_{LS} и t_0 . Другая отличительная черта уравнения (3.28) по сравнению с уравнением (3.26) – появление параметра $t_{0,\text{lim}}$ в знаменателе. Появление параметра $t_{0,\text{lim}}$ связано либо со стадиями структурной реорганизации ядер и кластеров ядер, предшествующими стадии образования стартовых агрегатов, либо со стадиями восстановления дисульфидных связей в молекуле α -лактальбумина и разворачивания белка, которые предшествуют стадиям нуклеации и агрегации.

Установление количественных взаимосвязей между начальной скоростью агрегации и длительностью лаг-периода расширяет методологию количественной оценки антиагрегационной активности химических и белковых шаперонов.

3.2.7. Оценка шапероноподобной активности УФ-облученного α -кристаллина с использованием тест-системы на основе ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина

Структурные модификации α -кристаллина, связанные со старением хрусталика, снижают его эффективность как молекулярного шаперона [Ellozy, et al., 1996]. Некоторые посттрансляционные модификации связаны с облучением ультрафиолетом. Эффекты ультрафиолетового излучения начинаются с поглощения света ароматическими остатками аминокислот. Фотоионизация остатков тирозина и триптофана ведет к формированию ароматических свободных радикалов [Grossweiner, 1984]. Испускаемые электроны стабилизируются в водной среде в гидратированном состоянии и могут быть временно пойманы цистильными группами. N-формилкинуруенин – важное фотопроизводное триптофана, которое действует как эндогенный фотосенсибилизатор для УФ-излучения, генерируя синглетный кислород и супероксид-радикал. Фотоокисление остатков триптофана в α -кристаллине может быть одним из событий, которые влияют на трехмерную структуру и шаперонную активность α -кристаллина [Fujii, et al., 2004]. Такие модификации остатков триптофана в полипептидной цепи α A и α B-кристаллина были получены в результате окисления α -кристаллина OH^- -радикалами, возникающими при облучении растворов белков гамма-лучами в присутствии N_2O [Finley, et al., 1998a; Finley, et al., 1998b]. Показано, что озон окисляет боковые цепи остатков триптофана до N'-формилкинуруенина или кинуруенина, и небольшая модификация одного остатка триптофана продуцирует сильное снижение стабильности белка [Okajima, et al., 1990].

Основными эффектами УФ-облучения на α -кристаллин являются внутривитрическое сшивание между α A и α B субъединицами, и потеря сайтов связывания белков-мишеней [Borkman & McLaughlin, 1995]. Чериан-Шоу с соавторами [Cherian-Shaw, et al., 1999] сообщают о роли дисульфидных связей в связанной со старением потере шаперонной активности α -кристаллина. В процессе старения формируются в основном дисульфидные связи, что способствует потере шаперонной активности α -кристаллина в хрусталике глаза человека. Окисление остатков гистидина также может вызывать сшивание путем формирования ковалентных связей [Verweij, et al., 1981].

Показано, что облучение очищенного α -кристаллина UVB-светом при разных длинах волн от 280 до 308 нм связано с постепенной потерей его шаперонной активности [Borkman & McLaughlin, 1995; Weinreb, et al., 2000]. В то же время результаты, полученные Кривандиным с соавторами [Krivandin, et al., 2009], показывают, что повреждение большого количества субъединиц в олигомере α -кристаллина в результате

УФ-облучения ($\lambda > 260 \text{ nm}$) не вызывает значительных перестроек его четвертичной структуры, агрегации олигомеров или потери их растворимости.

Чтобы охарактеризовать шапероноподобную активность α -кристаллина, поврежденного УФ-излучением, использовали тест-систему, основанную на ДТТ-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).

Для характеристики доли α -кристаллина, подвергшегося сшиванию в процессе облучения ультрафиолетом, использовали ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле. На рис. 3.57А показаны результаты электрофоретического анализа α -кристаллина, облученного разными дозами ультрафиолетового света. Для интактных А- и В-субъединиц α -кристаллина наблюдались две полосы, соответствующие молекулярным массам $22,4 \pm 0,1$ и $24,5 \pm 0,1$ кДа. Данные ДСН-электрофореза показали, что УФ-облучение приводит к сшиванию между субъединицами α -кристаллина с формированием димеров и высокомолекулярных продуктов с молекулярной массой свыше 200 кДа. Результаты согласуются с литературными данными [Li, et al., 1990; Borkman & McLaughlin, 1995].

Для А-субъединицы α -кристаллина была рассчитана доля несшитого α -кристаллина ($\gamma_{\text{non-cross}}$) как функция дозы облучения (D) (рис. 3.57Б). Эти данные анализировали с использованием экспоненциальной функции:

$$\gamma_{\text{non-cross}} = \exp\left\{-\frac{\ln(2)}{D_{0,5}} D\right\}, \quad (3.30)$$

где $D_{0,5}$ – значение D , при котором $\gamma_{\text{non-cross}} = 0,5$. Величина $D_{0,5}^{\text{den}}$ была найдена равной $5,1 \pm 0,8 \text{ Дж/см}^2$.

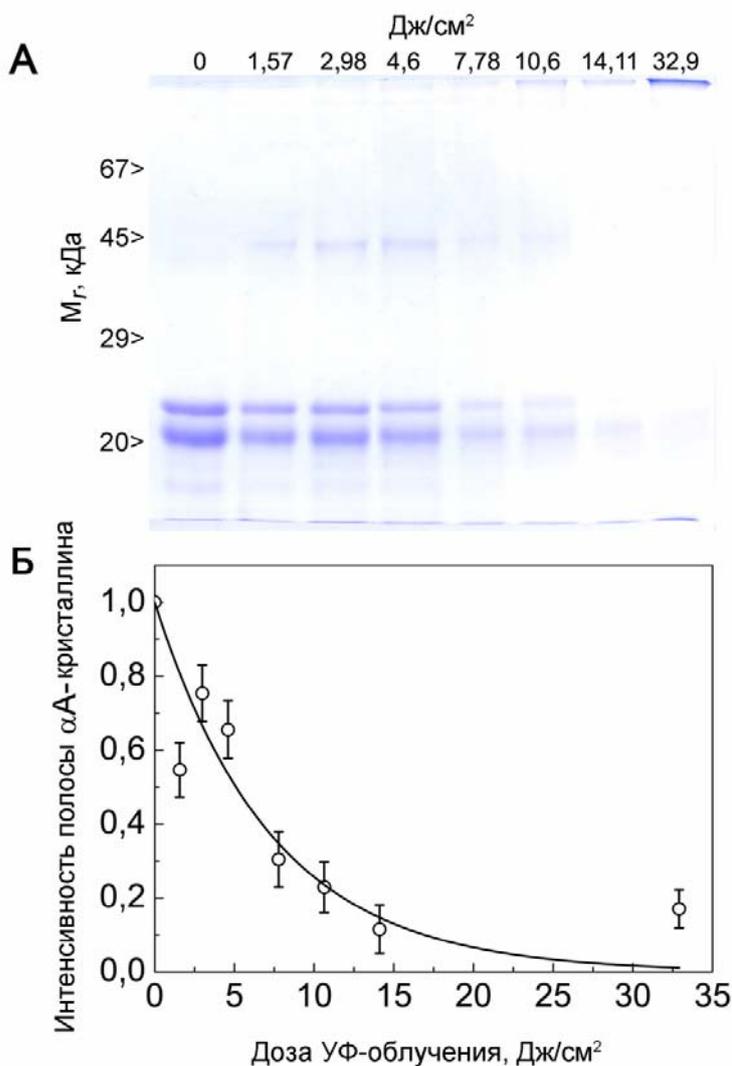


Рис. 3.57. ДСН-электрофорез УФ-облученного α-кристаллина. (А) Электрофореграмма УФ-облученного α-кристаллина. Цифры над дорожками соответствуют дозам облучения в Дж/см². Слева указаны относительные молекулярные массы белковых стандартов. (Б) Зависимость интенсивности полосы, соответствующей αА-кристаллину (полоса с М_r 22,4 кДа) от дозы УФ-облучения. Сплошная линия была вычислена по уравнению (3.30) при D_{0,5} = 5,1 Дж/см².

На рис. 3.58 показаны профили гель-проникающей хроматографии для интактного и УФ-облученного α-кристаллина (доза ультрафиолетового излучения 32,9 Дж/см²). Времена удержания для интактного и УФ-облученного α-кристаллина составили 136,4 и 136,8 мин, полуширина пиков была равна 16,4 и 18,4 мин. Таким образом, ультрафиолетовое облучение не влияло на средний молекулярный вес образцов и увеличивало полидисперсность УФ-облученного α-кристаллина. Полученные результаты показали, что сшивание происходит между субъединицами в олигомере α-кристаллина, а не между олигомерными частицами.

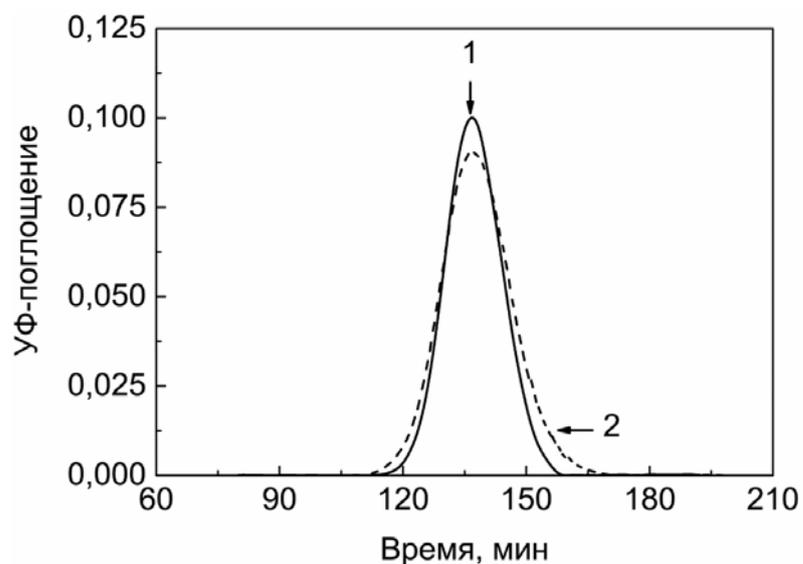


Рис. 3.58. Профили элюции нативного (1) и УФ-облученного (2) α -кристаллина, полученные методом гель-проникающей хроматографии.

УФ-облучение α -кристаллина приводит к снижению флуоресценции белка из-за разрушения триптофана (рис. 3.59А). Положение максимума триптофановой флуоресценции оставалось неизменным при увеличении дозы облучения ($\lambda_{\text{max}} = 335$ нм). Это означает, что главный механизм снижения триптофановой флуоресценции – фотохимическое разрушение, а не тушение флуоресценции, которое обычно сопровождает денатурацию белков. Такую же ситуацию наблюдали ранее при облучении β_L -кристаллина [Murarov, et al., 2011] и ГАФД [Maloletkina, et al., 2012].

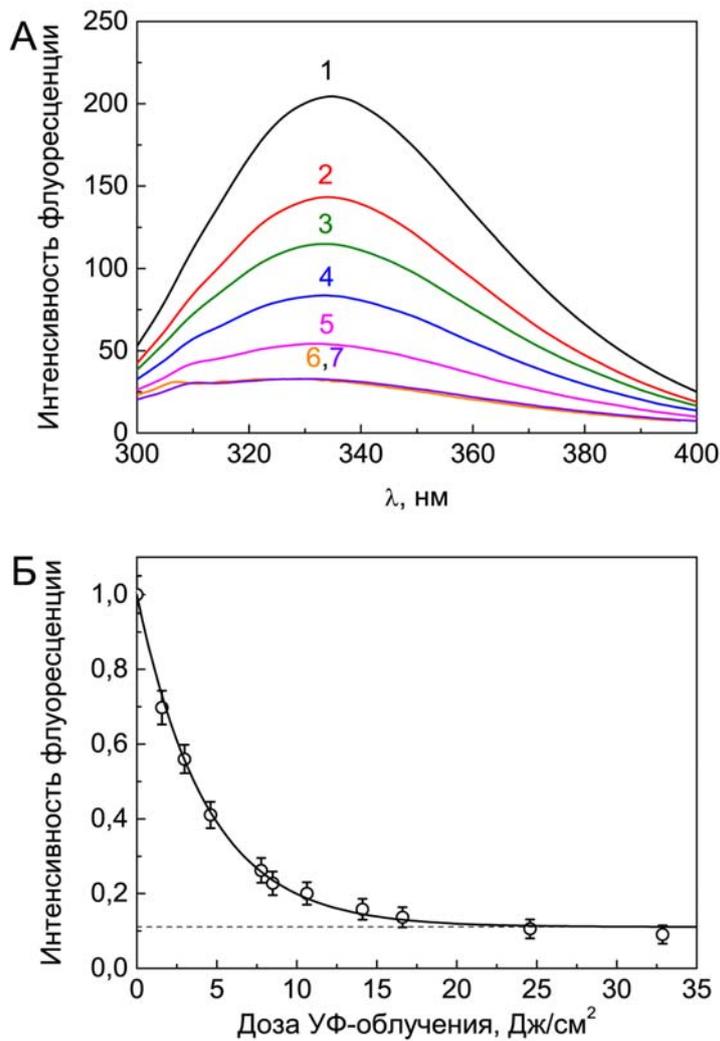


Рис. 3.59. Фотоиндуцированное снижение триптофановой флуоресценции α -кристаллина при УФ-облучении. (А) Спектры триптофановой флуоресценции УФ-облученного α -кристаллина. Дозы облучения были следующими: 0 Дж/см² (1), 1,6 Дж/см² (2), 2,4 Дж/см² (3), 7,8 Дж/см² (4), 10,6 Дж/см² (5) и 14,1 Дж/см² (6). (Б) Зависимость интенсивности флуоресценции при 335 нм от дозы облучения. Точки соответствуют экспериментальным данным. Сплошная линия рассчитана по уравнению (3.31) при $D_{0,5} = 3,0$ Дж/см² и $(I/I_0)_{lim} = 0,110$.

По литературным данным [Schauerte & Gafni, 1995] вызванное облучением снижение интенсивности триптофановой эмиссии не моноэкспоненциально, и зависимость интенсивности флуоресценции от дозы облучения описывается суммой двух экспонент. Каждая из этих экспонент может быть охарактеризована величиной $D_{0,5}$ (доза облучения, при которой наблюдается 50%-ное снижение амплитуды экспоненциального затухания). Как можно видеть из рис. 3.59Б, величина $D_{0,5}$ для второй экспоненты значительно превышает соответствующую величину для первой экспоненты. Таким образом, надежное определение величины $D_{0,5}$ возможно только для первой экспоненты:

$$\left(\frac{I}{I_0}\right) = \left(\frac{I}{I_0}\right)_{lim} + \left[1 - \left(\frac{I}{I_0}\right)_{lim}\right] \exp\left\{-\frac{\ln(2)}{D_{0,5}} D\right\}, \quad (3.31)$$

где D – доза облучения, I/I_0 – относительная интенсивность флуоресценции и $[1 - (I/I_0)_{lim}]$ – амплитуда первого экспоненциального снижения. Значения параметров $D_{0,5}$ и $(I/I_0)_{lim}$ были следующими: $D_{0,5} = 3,0 \pm 0,1$ Дж/см² и $(I/I_0)_{lim} = 0,110 \pm 0,008$.

Долю α -кристаллина, оставшегося в нативном состоянии после облучения ультрафиолетом, оценивали методом дифференциальной сканирующей калориметрии. На рис. 3.60А показаны профили ДСК для интактного и УФ-облученного α -кристаллина. Площадь под кривой дает полную теплоту денатурации белка (Q_0) и пропорциональна количеству нативного белка. Как видно из рис. 3.60А, УФ-облучение приводит к уменьшению площади под кривой. Это позволило предположить, что УФ-облучение вызывает снижение доли нативного белка. Долю нативного белка (γ_{nat}) можно вычислить как соотношение Q_D/Q_0 , где Q_0 – полная теплота денатурации для интактного α -кристаллина и Q_D – соответствующая величина для УФ-облученного α -кристаллина. Снижение величины γ_{nat} как функция дозы облучения (D) представлено на рис. 3.60Б. Зависимость γ_{nat} от D подчиняется экспоненциальному закону:

$$\gamma_{\text{nat}} = \exp\left\{-\frac{\ln(2)}{D_{0,5}^{\text{den}}} D\right\}, \quad (3.32)$$

где $D_{0,5}^{\text{den}}$ – величина D , при которой $\gamma_{\text{nat}} = 0,5$ (доля денатурированного белка равна 0,5).

Величина $D_{0,5}^{\text{den}}$ была найдена равной $6,3 \pm 0,4$ Дж/см².

Особый интерес представляет тот факт, что форма профилей ДСК остается неизменной при УФ-облучении. Положение максимума (T_{max}) на профилях ДСК для интактного и УФ-облученного α -кристаллина практически одинаково ($T_{\text{max}} = 62,9 \pm 0,2$ °С, см. вставку на рис. 3.60А). Таким образом, площадь пика может быть использована для оценки доли белка, остающегося в нативном состоянии после облучения.

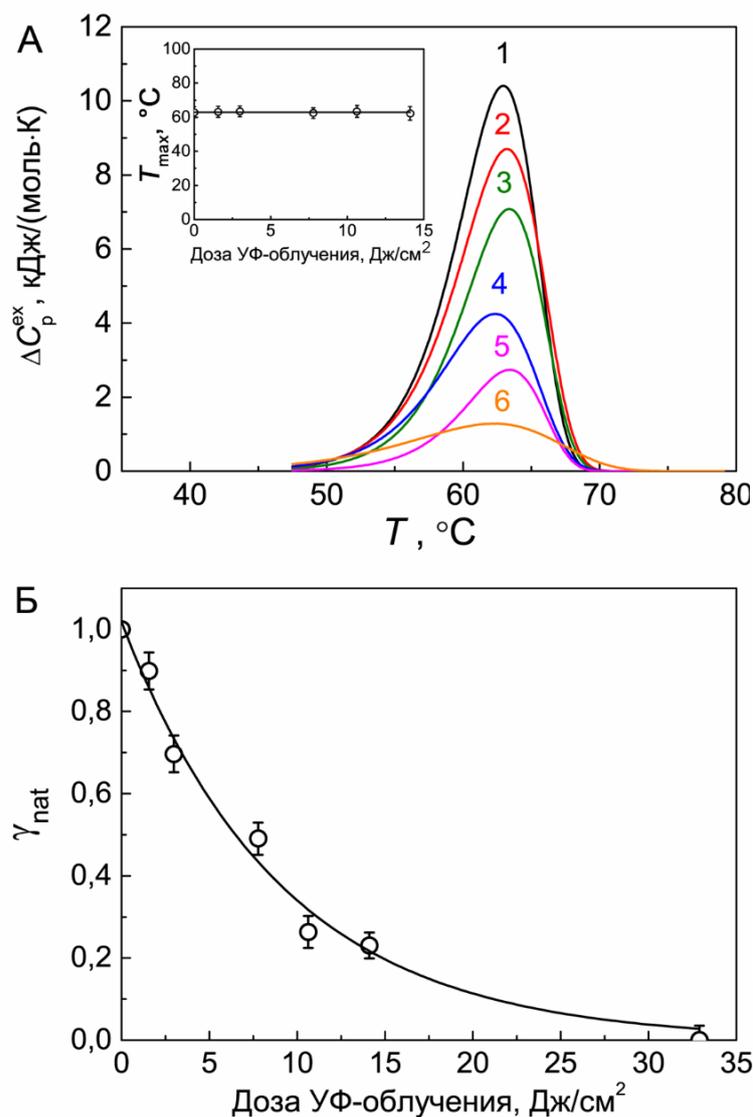


Рис. 3.60. Влияние УФ-облучения на термостабильность α -кристаллина. (А) Зависимость избыточной теплоемкости от температуры для УФ-облученного α -кристаллина (1 мг/мл). Дозы облучения были следующими: 0 Дж/см² (1), 1,6 Дж/см² (2), 2,4 Дж/см² (3), 7,8 Дж/см² (4), 10,6 Дж/см² (5) и 14,1 Дж/см² (6). На вставке показано положение T_{max} как функция дозы облучения. (Б) Зависимость доли нативного белка $\gamma_{\text{nat}} = Q_D/Q_0$ от дозы облучения (Q_0 и Q_D – теплоты денатурации для интактного и УФ-облученного белка, соответственно). Точки соответствуют экспериментальным данным. Сплошная линия вычислена по уравнению (3.32) при $D_{0,5}^{\text{den}} = 6,3$ Дж/см².

Рис. 3.61А демонстрирует подавление ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина интактным α -кристаллином. Представлены зависимости интенсивности светорассеяния от времени, полученные в присутствии α -кристаллина. Анализ этих зависимостей с помощью уравнения (3.4) позволил оценить начальную скорость агрегации (K_{LS}) и длительность лаг-периода (t_0) при разных концентрациях α -кристаллина. Величина t_0 возрастает при увеличении концентрации α -кристаллина (см. рис. 3.61Б). Для оценки антиагрегационной активности α -кристаллина построили график $(K_{\text{LS}}/K_{\text{LS},0})^{1/a}$ vs $x = [\alpha\text{-кристаллин}]/[\alpha\text{-лактальбумин}]$ (рис. 3.61В, $K_{\text{LS},0}$ – величина K_{LS} , измеренная в отсутствие α -кристаллина). Параметр a был найден равным 2,5 (см. раздел 3.2.6.). Из начального участка зависимости $(K_{\text{LS}}/K_{\text{LS},0})^{1/a}$ от x вычислили начальную адсорбционную емкость α -кристаллина (AC_0) по отношению к α -лактальбумину: $AC_0 = 1,18 \pm 0,07$ молекул α -лактальбумина на одну субъединицу α -кристаллина.

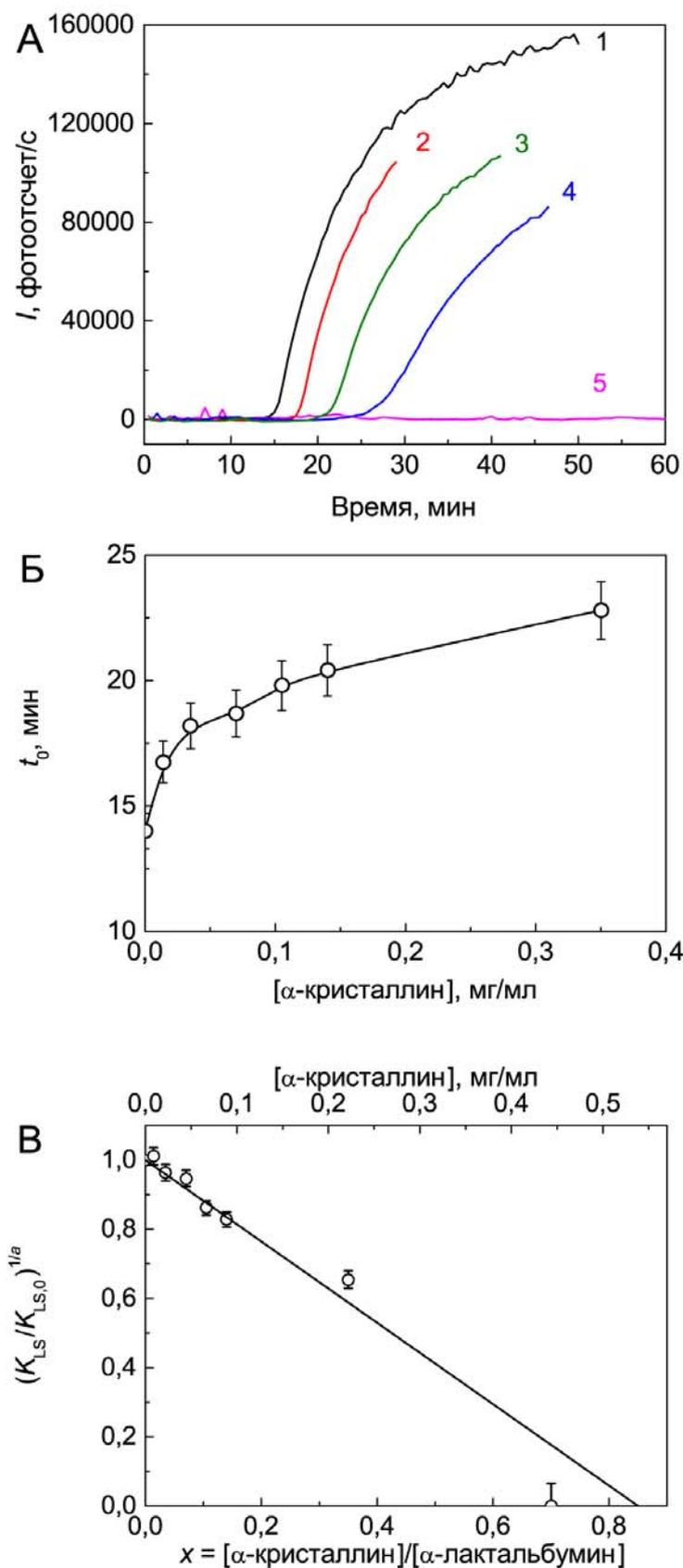


Рис. 3.61. Подавление ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина (0,5 мг/мл) α -кристаллином. Концентрация ДТТ составляла 20 мМ. **(А)** Зависимости интенсивности светорассеяния от времени, полученные при следующих концентрациях α -кристаллина: 0 мг/мл (1), 0,01 мг/мл (2), 0,075 мг/мл (3), 0,25 мг/мл (4) и 0,5 мг/мл (5). **(Б)** Зависимость длительности лаг-периода (t_0) от концентрации α -кристаллина. **(В)** Зависимость относительной начальной скорости агрегации α -лактальбумина $(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/a}$ от соотношения молярных концентраций α -кристаллина и α -лактальбумина ($x = [\alpha\text{-кристаллин}]/[\alpha\text{-лактальбумин}]$). Параметр a принят равным 2,5. Молярная концентрация α -кристаллина была рассчитана для субъединицы с массой 20 кДа. Дополнительная ось абсцисс соответствует концентрации α -кристаллина. Сплошная линия была рассчитана по уравнению (3.12) при $AC_0 = 1,18$ 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. 3.62А показаны графики $(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/a}$ vs x для α -кристаллина, облученного следующими дозами: 0, 7,8 и 10,6 Дж/см². Антиагрегационная

активность α -кристаллина уменьшается с увеличением дозы облучения (рис. 3.62Б), и зависимость AC_0 от D подчиняется экспоненциальному закону:

$$AC_0 = AC_{0, \text{intact}} \exp\left\{-\frac{\ln(2)}{D_{0,5}^{\text{inact}}} D\right\}, \quad (3.33)$$

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.

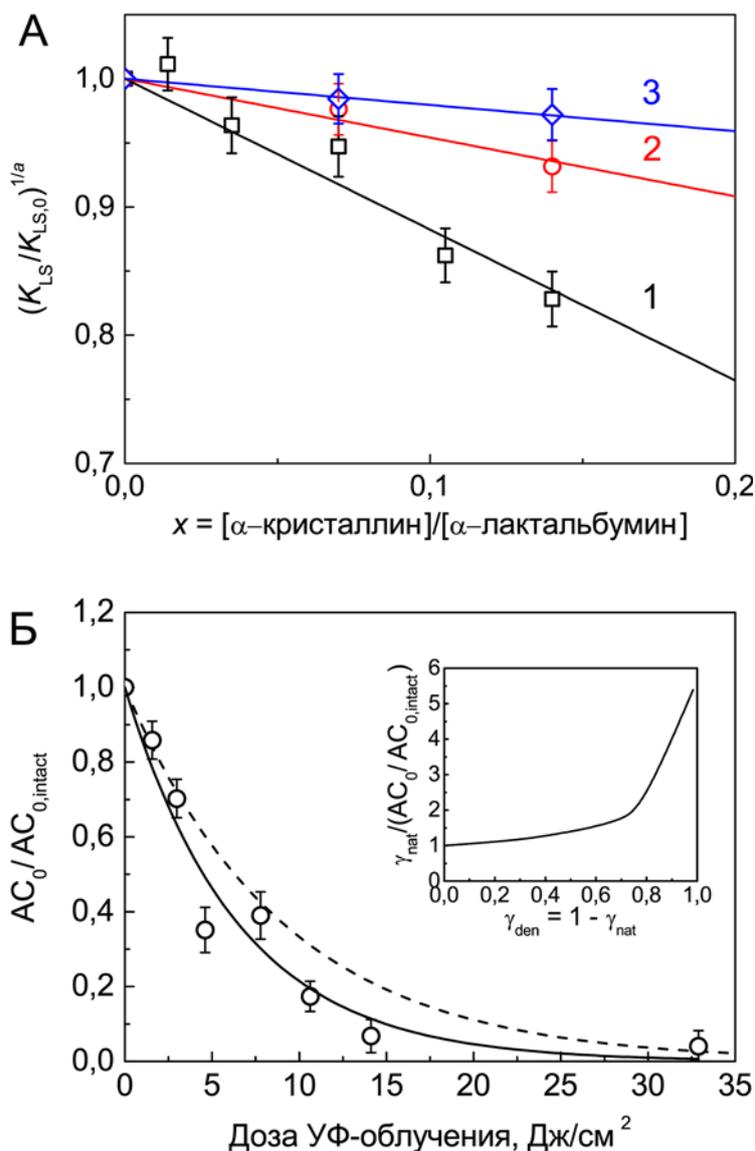


Рис. 3.62. Влияние УФ-облучения на антиагрегационную активность α -кристаллина. (А) Зависимости относительной начальной скорости агрегации $(K_{LS}/K_{LS,0})^{1/a}$ от соотношения молярных концентраций α -кристаллина и α -лактальбумина для УФ-облученного α -кристаллина. Параметр a принят равным 2,5. Дозы облучения были следующими: 0 Дж/см² (1), 7,8 Дж/см² (2) и 10,6 Дж/см² (3). Сплошные линии вычислены с помощью уравнения (3.12). (Б) Зависимость относительной адсорбционной емкости α -кристаллина по отношению к α -лактальбумина ($AC_0/AC_{0, \text{intact}}$) от дозы облучения. Сплошная линия была вычислена по уравнению (3.33) 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). На вставке показана зависимость соотношения $\gamma_{\text{nat}}/(AC_0/AC_{0, \text{intact}})$ от доли денатурированного α -кристаллина (γ_{den}).

Зависимость AC_0 от дозы облучения (рис. 3.62Б) характеризует снижение антиагрегационной активности α -кристаллина в результате повреждения ультрафиолетом.

Рассмотрим зависимость доли нативного α -кристаллина (γ_{nat}) и начальной адсорбционной емкости (AC_0) α -кристаллина от дозы облучения. Пунктирная кривая на

рис. 3.62Б соответствует исчезновению нативного мономера в олигомере α -кристаллина по данным ДСК. Величина $D_{0,5}^{\text{den}}$ была найдена равной $6,3 \pm 0,4$ Дж/см². Если предположить, что УФ-индуцированная денатурация мономера α -кристаллина строго коррелирует со снижением шаперонной функции, то $D_{0,5}$ для зависимости AC_0 от дозы УФ-облучения должна быть равна $6,3$ Дж/см². Непрерывная кривая на рис. 3.62Б показывает экспериментально наблюдаемое снижение антиагрегационной активности α -кристаллина с $D_{0,5}^{\text{inact}} = 4,3 \pm 0,6$ Дж/см². Следовательно, потеря антиагрегационной активности α -кристаллина (AC_0) с увеличением времени УФ-облучения протекает быстрее, чем снижение доли нативного α -кристаллина (γ_{nat}). Вставка на рис. 3.62Б показывает соотношение γ_{nat}/AC_0 как функцию доли денатурированного α -кристаллина ($\gamma_{\text{den}} = 1 - \gamma_{\text{nat}}$). При $\gamma_{\text{den}} = 0,5$ величина γ_{nat}/AC_0 равна $1,4$ и дополнительное снижение антиагрегационной активности α -кристаллина составляет 40%.

Расхождение между зависимостями γ_{nat} и AC_0 от дозы облучения можно объяснить следующим образом. Если олигомер обладает локальной n -мерной субструктурой, и n -мер является шаперонной единицей, разрушение одной субъединицы в n -мере должно приводить к потере активности всего n -мера. В этом случае значение $D_{0,5}$ для зависимости AC_0 от дозы облучения должно быть равно $D_{0,5}^{\text{den}}/n$. При $n = 2$ (олигомер α -кристаллина обладает димерной локальной субструктурой) $D_{0,5} = D_{0,5}^{\text{den}}/2 = 3,15 \pm 0,2$ Дж/см². Тот факт, что величина $D_{0,5}^{\text{inact}}$ для зависимости AC_0 от дозы облучения ($D_{0,5}^{\text{inact}} = 4,3$ Дж/см²) выше $3,15$ Дж/см² может быть показателем промежуточного соотношения между мономерной и димерной субструктурами в олигомерах α -кристаллина, которое способствует оптимальной шапероноподобной активности [Benesch, et al., 2008].

Существует еще один фактор, который нужно принимать во внимание при обсуждении влияния УФ-облучения на шапероноподобную активность α -кристаллина. Снижение антиагрегационной активности α -кристаллина при облучении ультрафиолетом сопровождается уменьшением доли несшитого α -кристаллина ($D_{0,5} = 5,1$ Дж/см²). Влияние сшивания на антиагрегационную активность α -кристаллина было описано в разделе 3.2.5. Таким образом, имеет смысл предположить, что сшивание субъединиц, оставшихся в нативном состоянии после УФ-облучения, вызывает дополнительное снижение антиагрегационной активности α -кристаллина.

3.2.8. Скрининг агентов, оказывающих влияние на стабильность белков с использованием тест-систем, основанных на агрегации белков в режиме нагревания с постоянной скоростью. Влияние лигандов на тепловую агрегацию глутаматдегидрогеназы

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]. Очевидно, что подобный скрининг должен выполняться в тест-системах, где скорость-лимитирующей стадией общего процесса агрегации является стадия разворачивания белка. Для анализа кинетических кривых в литературе использовали подход с анализом полных кривых, включая высокие температуры. При высоких температурах происходит преципитация агрегатов, что делает такой подход недостаточно обоснованным. Поэтому в настоящей работе внимание было обращено на начальные участки кинетических кривых.

Для поиска веществ, влияющих на термостабильность белков, использовали тест на основе регистрации агрегации белка в режиме нагревания с постоянной скоростью.

Для описания начальных участков кинетических кривых агрегации при изучении агрегации белка в условиях нагревания с постоянной скоростью может быть использовано уравнение, эквивалентное уравнению (3.4) [Eronina, et al., 2011]:

$$I = I_0 + K_{\text{agg}}(T - T_0)^2, \quad (T > T_0) \quad (3.34)$$

где T_0 – начальная температура агрегации, при которой начинает возрастать интенсивность светорассеяния, и K_{agg} – параметр, характеризующий скорость агрегации.

Константа K_{agg} связана с константой K_{LS} следующим соотношением:

$$K_{\text{agg}} = K_{\text{LS}}^2 \quad (3.35)$$

и также может быть использована в качестве меры начальной скорости агрегации белка.

Если экспериментально изучена зависимость K_{agg} от начальной концентрации белка-мишени и эта зависимость описывается степенной функцией

$$K_{\text{agg}} = \text{const}[P]_0^b, \quad (3.36)$$

то параметр $(K_{\text{LS}})^{1/a}$, используемый для количественной оценки антиагрегационной активности химических и белковых шаперонов, может быть заменен на параметр $(K_{\text{agg}})^{1/b}$:

$$(K_{\text{LS}})^{1/a} = (K_{\text{agg}})^{1/b}. \quad (3.37)$$

Отметим, что $(K_{\text{agg}})^{1/b}$ тоже является линейной функцией начальной концентрации белка:

$$(K_{agg})^{1/b} = \text{const}[P]_0. \quad (3.38)$$

Параметры T_0 и K_{agg} могут быть использованы для количественной оценки подавления агрегации белков различными агентами. Применимость уравнения (3.34) показана для тепловой агрегации ряда белков [Eronina, et al., 2011].

Начальные участки зависимости интенсивности светорассеяния от температуры (рис. 3.63), полученные при разных концентрациях ГД, проанализировали с помощью уравнения (3.34) и получили соответствующие значения T_0 и K_{agg} .

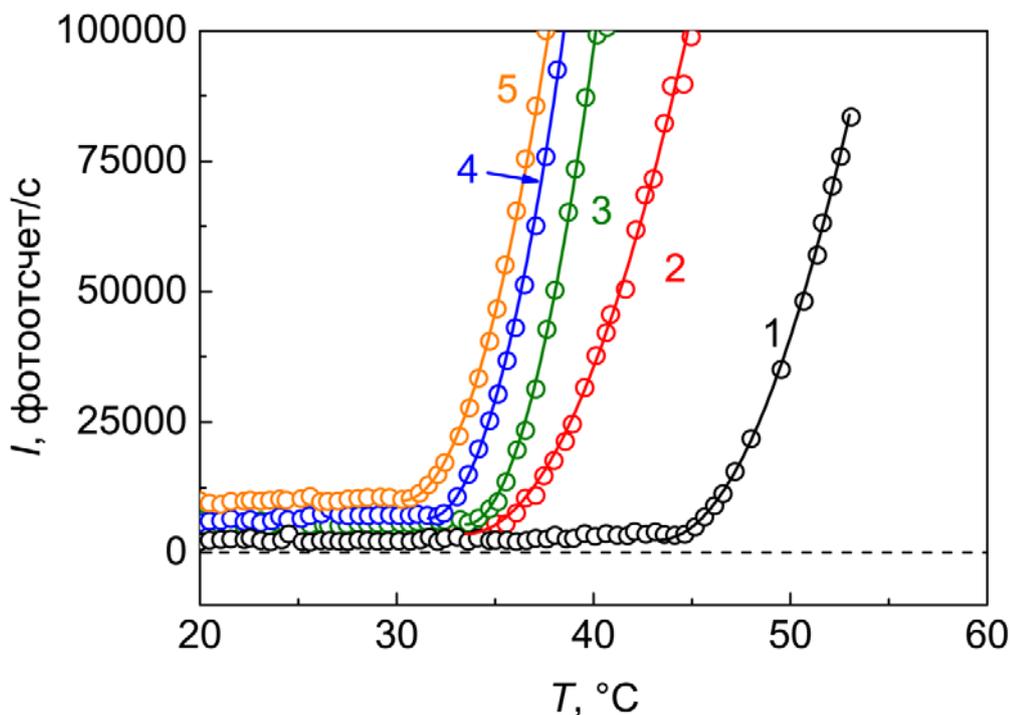


Рис. 3.63. Зависимости интенсивности светорассеяния (I) от температуры для различных концентраций глутаматдегидрогеназы: 0,05 мг/мл (1), 0,1 мг/мл (2), 0,2 мг/мл (3), 0,3 мг/мл (4) и 0,4 мг/мл (5) при нагревании с постоянной скоростью. Точки соответствуют экспериментальным данным, сплошные кривые вычислены по уравнению (3.34).

Количественный анализ начальных участков зависимостей интенсивности светорассеяния от температуры с использованием уравнения (3.34) позволил оценить пороговую температуру T_0 и параметр K_{agg} , который можно рассматривать как меру скорости агрегации. Параметр T_0 имеет четкий физический смысл, это температура при которой регистрируется начало прироста интенсивности светорассеяния, то есть образование в тест-системе агрегатов. Значения параметра T_0 оставались практически постоянными при изменении концентрации ГД (рис. 3.64Б). Среднее значение $T_0 = 34,8 \pm 0,2$ °С. Как видно из рис. 3.64А, параметр K_{agg} возрастал монотонно при возрастании концентрации белка. Зависимость K_{agg} от концентрации ГД была описана уравнением (3.36), значение параметра b было найдено равным $0,66 \pm 0,01$.

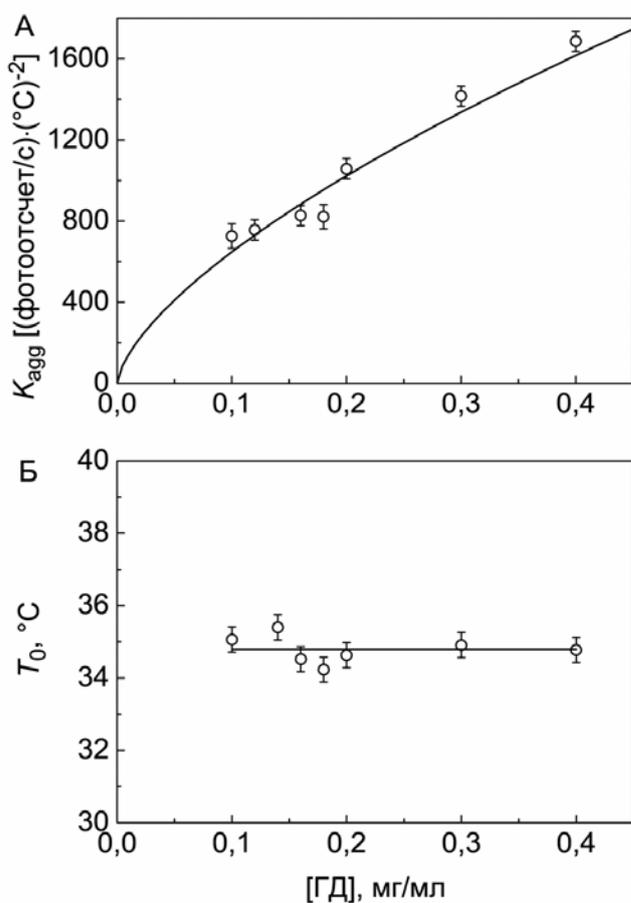


Рис. 3.64. Зависимости параметров тепловой агрегации ГД от концентрации белка. **(А)** Зависимость начальной скорости агрегации (K_{agg}) от концентрации ГД. Сплошная кривая рассчитана по уравнению (3.36) при $b = 0,66$. **(Б)** Зависимость длительности лаг-периода (T_0) от концентрации глутамат-дегидрогеназы. Сплошная линия соответствует $T_0 = 34,8$ °C.

Дополнительную информацию об агрегации в режиме нагревания с постоянной скоростью можно получить при измерении размеров белковых агрегатов. На рис. 3.65А показаны начальные участки зависимостей гидродинамического радиуса белковых агрегатов от температуры для агрегации ГД при различных концентрациях белка. Эти зависимости экспоненциальны. Для их анализа применяли уравнение (2.7).

Значения параметров $R_{h,initial}$ и T_{2R} как функции концентрации белка представлены на рис. 3.65Б и В. Увеличение концентрации ГД приводит к уменьшению T_{2R} .

Экспоненциальный характер зависимости гидродинамического радиуса белковых агрегатов от температуры, наблюдаемый для ГД, можно интерпретировать как показатель выполнения режима реакционно-лимитируемой кластер-кластерной агрегации, при котором вероятность слипания сталкивающихся частиц меньше единицы.

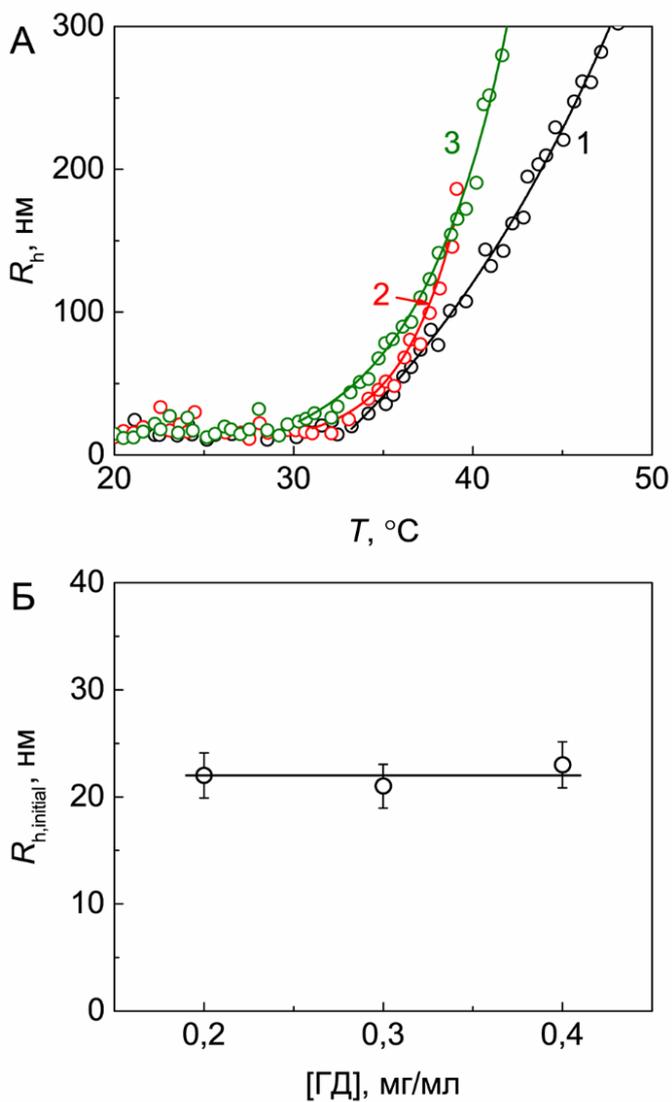


Рис. 3.65. Тепловая агрегация глутаматдегидрогеназы из печени быка при нагревании с постоянной скоростью. (А) Зависимость гидродинамического радиуса (R_h) от температуры для различных концентраций ГД: 0,2 мг/мл (1), 0,3 мг/мл (2), 0,4 мг/мл (3). Сплошные линии вычислены по уравнению (2.7). (Б) Зависимость начального радиуса агрегатов $R_{h,initial}$ от концентрации ГД. Сплошная линия соответствует значению $R_{h,initial} = 22$ нм.

При анализе распределения частиц по размерам при различной температуре (рис. 3.66) было показано, что при тепловой агрегации ГД не наблюдается образования крупных стартовых агрегатов, содержащих десятки денатурированных молекул. Рост агрегатов происходит монотонно. Значение гидродинамического радиуса в момент начала прироста интенсивности светорассеяния было обозначено нами как $R_{h,initial}$, среднее значение этого параметра равно 22 нм (рис. 3.65Б). По-видимому, столь высокое значение $R_{h,initial}$ обусловлено высокой способностью ГД к самоассоциации.

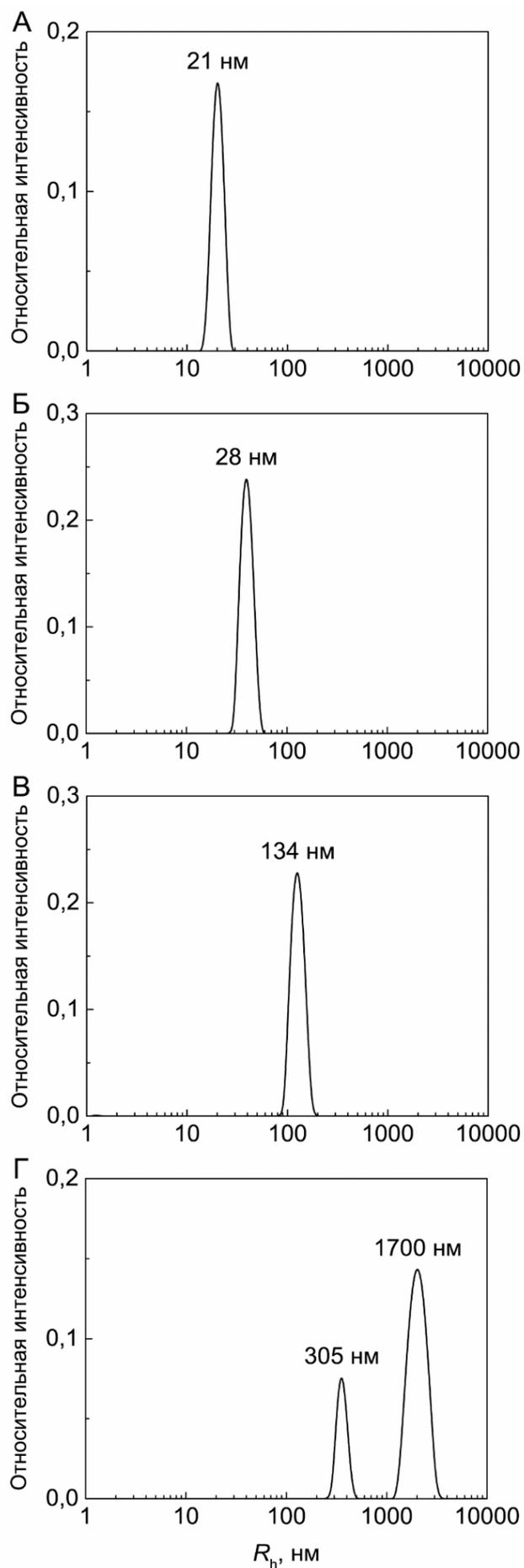


Рис. 3.66. Распределение гидродинамических радиусов частиц при тепловой агрегации ГД в режиме нагрева с постоянной скоростью при температуре 25 °С (А), 32 °С (Б), 41 °С (В) и 60 °С (Г). Концентрация ГД составляла 0,2 мг/мл.

Рассмотрим использование нового подхода к характеристике скорости агрегации для количественной оценки способности разных агентов подавлять агрегацию белка. На рис. 3.67 показано влияние специфических лигандов NADH, NAD, ADP, L-глутамата (Glu) и L-лейцина (Leu) на агрегацию ГД в режиме нагрева с постоянной скоростью.

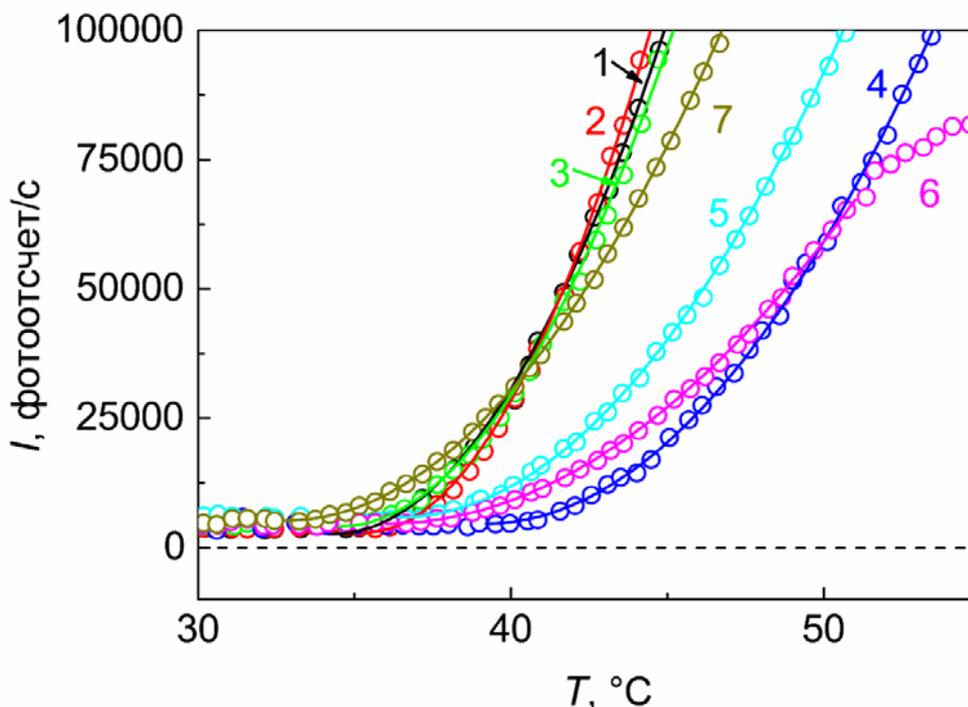


Рис. 3.67. Влияние специфических лигандов на тепловую агрегацию глутаматдегидрогеназы ($[ГД] = 0,12$ мг/мл) при нагревании с постоянной скоростью. Зависимости интенсивности светорассеяния от температуры в отсутствие лигандов (**1**) и в присутствии 0,2 мМ NADH (**2**), 0,2 мМ NAD (**3**), 0,5 мМ ADP (**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 (3.34).

Значения параметров T_0 и K_{agg} даны в табл. 3.4.

Таблица 3.4. Значения параметров тепловой агрегации ГД в режиме нагрева с постоянной скоростью (1 °С/мин) в присутствии специфических лигандов.

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

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.

Было также изучено влияние этих лигандов на термостабильность глутаматдегидрогеназы методом ДСК. Профили ДСК для ГД в присутствии лигандов и значения T_{max} даны на рис. 3.68. Результаты изучения влияния лигандов на термостабильность согласуются с таковыми для влияния на агрегацию ГД. На основании этого можно предположить, что в данной тест-системе скорость-лимитирующей стадией является стадия денатурации белка-мишени и эффекты лигандов связаны с их влиянием в первую очередь на тепловое разворачивание фермента.

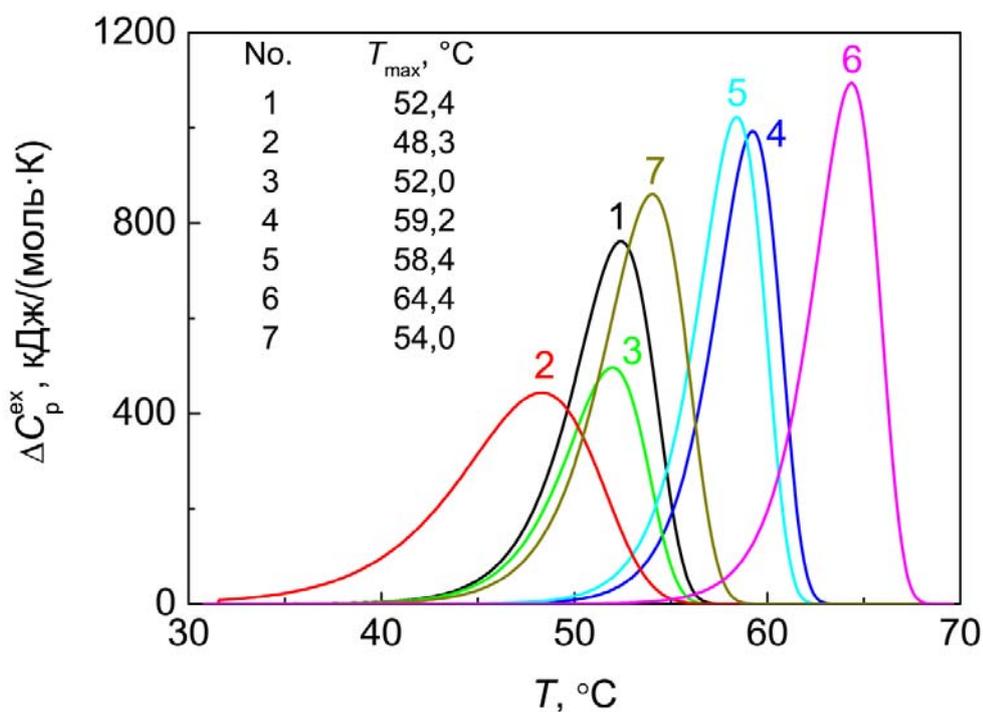


Рис. 3.68. Влияние специфических лигандов на термостабильность глутаматдегидрогеназы ($[ГД] = 0,4$ мг/мл). Зависимости избыточной теплоемкости от температуры в отсутствие лигандов (1) и в присутствии 0,2 мМ NADH (2), 0,2 мМ NAD (3), 0,5 мМ ADP (4) 0,2 мМ NADH + 0,5 мМ ADP (5), 50 мМ Leu (6) и 50 мМ Glu (7). На вставке даны положения T_{max} для соответствующих профилей ДСК.

При обсуждении практической важности использования метода изучения лиганд-белковых взаимодействий, предложенного в этой работе, стоит отметить в первую очередь, что этот метод может быть использован для характеристики самих белков. Результаты изучения стабильности белков в буферных растворах разного состава полезны при выборе оптимального буфера для очистки и хранения изучаемых белков. Мутантные

формы белков, полученные методами генной инженерии, также могут быть охарактеризованы описанным методом. Кроме того, скрининг кофакторов, аналогов субстратов, эффекторов и металлов можно использовать для установления условий, способствующих стабилизации белков. Стабилизирующие агенты могут быть применены для улучшения кристаллизации белков. Наконец, важным направлением применения процедуры скрининга на основе светорассеяния, сопровождающего агрегацию белков, является поиск соединений, представляющих интерес для медицинской химии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в настоящей работе, показывают важность понимания механизмов агрегации белковых субстратов и установления кинетического режима агрегации для интерпретации данных о защитном действии шапероноподобных агентов. Подчеркивается необходимость определения скорость-лимитирующей стадии процесса агрегации белка-мишени при изучении действия шапероноподобных агентов в модельных тест-системах. Предложена классификация используемых тест-систем в зависимости от скорость-лимитирующей стадии агрегации.

В диссертационной работе предложен механизм тепловой агрегации бычьего сывороточного альбумина, включающий в себя образование форм денатурированного белка, различающихся по способности к агрегации. Установлен кинетический режим тепловой и ДТТ-индуцированной агрегации БСА: в случае тепловой агрегации (при 70 °С) скорость-лимитирующей стадией является стадия слипания развернутых молекул белка, а в случае ДТТ-индуцированной агрегации (при 45 °С) – разворачивание белковой молекулы. Показана возможность смены скорость-лимитирующей стадии агрегации под действием химических шаперонов. Подробно изучена кинетика ДТТ-индуцированной агрегации α -лактальбумина коровьего молока и глутаматдегидрогеназы из печени быка, также использовавшихся в качестве тест-систем для изучения антиагрегационной активности.

Разработана и апробирована в различных тест-системах методология строгой количественной оценки шапероноподобной активности белковых шаперонов на примере α -кристаллина хрусталика глаза быка и химических шаперонов – пролина, аргинина и его производных (аргининамида и этилового эфира аргинина). Предложены параметры, характеризующие антиагрегационную активность, для шаперонов белковой природы это адсорбционная емкость шаперона по отношению к белку-мишени (AC_0), а для химических шаперонов – концентрация полунасыщения $[L]_{0,5}$.

При изучении влияния сшивания глутаровым альдегидом и облучения ультрафиолетовым светом на антиагрегационную активность α -кристаллина показана важность динамичности четвертичной структуры этого белка для осуществления его функций. Существующие данные по влиянию сшивания на шапероноподобную активность α -кристаллина противоречивы и количественное определение вкладов внутриолигомерного сшивания и денатурации белка при сшивании или при облучении в падение антиагрегационной активности представляет особый интерес.

При изучении влияния химических шаперонов – пролина, аргинина и его производных – на агрегацию БСА в тест-системах различных типов (тепловая и ДТТ-индуцированная агрегация) показано, что при ДТТ-индуцированной агрегации наибольшим сродством к белку-мишени и наибольшей антиагрегационной активностью обладают аргининамид и этиловый эфир аргинина. В случае тепловой агрегации БСА химические шапероны вызывают смену скорость-лимитирующей стадии, и применение предлагаемых параметров количественной оценки антиагрегационной активности химических шаперонов становится невозможным. Таким образом, установлено важное ограничение предлагаемой методологии и экспериментально продемонстрирована необходимость определения кинетического режима агрегации при интерпретации защитных эффектов шапероноподобных соединений.

В заключительной части работы описано использование тест-системы, основанной на тепловой агрегации глутаматдегидрогеназы из печени быка при нагревании белка с постоянной скоростью. Предложен и апробирован способ количественной оценки влияния специфических лигандов фермента на тепловую агрегацию глутаматдегидрогеназы, основанный на описании начальных участков кинетических кривых агрегации.

Полученные в данной диссертационной работе результаты представляют интерес как с точки зрения понимания фундаментальных механизмов агрегации белков, так и для дальнейшего практического применения при поиске новых антиагрегационных агентов для биотехнологии и медицины.

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., Poliansky 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., Макеева 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 α -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 α -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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Acharya K.R., Stuart D.I., Walker M.P., Lewis M., Phillips D.C. Refined structure of baboon alpha-lactalbumin at 1.7 Å resolution. Comparison with C-type lysozyme // *J Mol Biol.* 1989. – V. 208. – P. 99-127.
2. Acharya K.R., Ren J.S., Stuart D.I., Phillips D.C., Fenna R.E. Crystal structure of human alpha-lactalbumin at 1.7 Å resolution // *J Mol Biol.* 1991. – V. 221. – P. 571-581.
3. Allen A., Kwagh J., Fang J., Stanley C.A., Smith T.J. Evolution of glutamate dehydrogenase regulation of insulin homeostasis is an example of molecular exaptation // *Biochemistry.* 2004. – V. 43. – P. 14431-14443.
4. Andrews J.M., Roberts C.J. A Lumry-Eyring nucleated polymerization model of protein aggregation kinetics: 1. Aggregation with pre-equilibrated unfolding // *J Phys Chem B.* 2007. – V. 111. – P. 7897-7913.
5. Andya J.D., Hsu C.C., Shire S.J. Mechanisms of aggregate formation and carbohydrate excipient stabilization of lyophilized humanized monoclonal antibody formulations // *AAPS PharmSci.* 2003. – V. 5. – E: 10.
6. Antonov Y.A., Wolf B.A. Calorimetric and structural investigation of the interaction between bovine serum albumin and high molecular weight dextran in water // *Biomacromolecules.* 2005. – V. 6. – P. 2980-2989.
7. Aoki K., Foster J.F. Electrophoretic demonstration of the isomerization of bovine plasma albumin at low pH // *J Am Chem Soc.* 1956. – V. 78. – P. 3538-3539.
8. Aquilina J.A., Benesch J.L., Bateman O.A., Slingsby C., Robinson, C.V. Polydispersity of a mammalian chaperone: mass spectrometry reveals the population of oligomers in alphaB-crystallin // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003. – V. 100. – P. 10611-10616.
9. Aquilina J.A., Benesch J.L., Ding L.L., Yaron O., Horwitz J., Robinson C.V. Subunit exchange of polydisperse proteins: mass spectrometry reveals consequences of alphaA-crystallin truncation // *J Biol Chem.* 2005. – V. 280. – P. 14485-14491.
10. 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. – P. 148-152.
11. Arakawa T., Ejima D., Tsumoto K., Obeyama N., Tanaka Y., Kita Y., Timasheff S. Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects // *Biophys Chem.* 2007. – V. 127. – P. 1-8.

12. 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.
13. Atmeh R.F., Arafa I.M., Al-Khateeb M. Albumin aggregates: hydrodynamic shape and physico-chemical properties // *JJC.* 2007. – V. 2. – P. 169-182.
14. Auer S., Kashchiev D. Insight into the correlation between lag time and aggregation rate in the kinetics of protein aggregation // *Proteins.* 2010. – V. 78. – P. 2412-2416.
15. Augustein R.C., Stevens A. Macromolecular structure of the eye lens // *Prog Polym Sci.* 1998. – V. 23. – P. 375-413.
16. Augusteyn R.C. Alpha-crystallin: a review of its structure and function // *Clin Exp Optom.* 2004. – V. 87. – P. 356-366.
17. Augusteyn R.C. Dissociation is not required for alpha-crystallin's chaperone function // *Exp Eye Res.* 2004. – V. 79. – P. 781-784.
18. Bagneris C., Bateman O.A., Naylor C.E., Cronin N., Boelens W.C., Keep N.H., Slingsby C. Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20 // *J Mol Biol.* 2009. – V. 392. – P. 1242-1252.
19. Bailey J.S., Bell E.T., Bell J.E. Regulation of bovine glutamate dehydrogenase. The effects of pH and ADP // *J Biol Chem.* 1982. – V. 257. – P. 5579-5583.
20. Bajorunaite E., Sereikaite J., Bumelis V.-A. L-arginine suppresses aggregation of recombinant growth hormones in refolding process from *E. coli* inclusion bodies // *Prot J.* 2007. – V. 26. – P. 547-555.
21. Bal W., Christodoulou J., Sadler P.J., Tucker A. Multi-metal binding site of serum albumin // *J Inorg Biochem.* 1998. – V. 70. – P. 33-39.
22. Baldwin A.J., Lioe H., Robinson C.V., Kay L.E., Benesch J.L. α B-crystallin polydispersity is a consequence of unbiased quaternary dynamics // *J Mol Biol.* 2011. – V. 413. – P. 297-309.
23. Banerjee S., Schmidt T., Fang J., Stanley C.A., Smith T.J. Structural studies on ADP activation of mammalian glutamate dehydrogenase and the evolution of regulation // *Biochemistry.* 2003. – V. 42. – P. 3446-3456.
24. Barone G., Capasso S., Del Vecchio P., De Sena C., Fessas D., Giancola C., Graciano J., Tramonti P. Thermal denaturation of bovine serum albumin and its oligomers and derivatives. pH dependence // *J Thermal Anal.* 1995. – V. 45. – P. 1255-1264.
25. Basha E., Friedrich K.L., Vierling E. The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity // *J Biol Chem.* 2006. – V. 281. – P. 39943-39952.

26. Bayley P.M., O'Neil T.J. The binding of oxidised coenzyme to bovine-liver glutamate dehydrogenase studied by circular-difference spectroscopy // *Eur J Biochem.* 1980. – V. 112. – P. 521-531.
27. Baynes B.M., Trout B.L. Rational design of solution additives for the prevention of protein aggregation // *Biophys J.* 2004. – V. 87. – P. 1631-1639.
28. Baynes B.M., Wang D.I., Trout B.L. Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation // *Biochemistry.* 2005. – V. 44. – P. 4919-4925.
29. Benesch J.L., Ayoub M., Robinson C.V., Aquilina J.A. Small heat shock protein activity is regulated by variable oligomeric substructure // *J Biol Chem.* 2008. – V. 283. – P. 28513-28517.
30. Bettelheim F.A., Ansari R., Cheng Q.F., Zigler J.S.Jr. The mode of chaperoning of dithiothreitol-denatured alpha-lactalbumin by alpha-crystallin // *Biochem Biophys Res Commun.* 1999. – V. 261. – P. 292-297.
31. Bettelheim F.A. Kinetics of chaperoning of dithiothreitol-denatured alpha-lactalbumin by alpha-crystallin // *Int J Biol Macromol.* 2002. – V. 30. – P. 161-169.
32. Bhat S.P., Nagineni C.N. Alpha B subunit of lens-specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues // *Biochem Biophys Res Commun.* 1989. – V. 158. – P. 319-325.
33. Bhattacharya M., Jain N., Mukhopadhyay S. Insights into the mechanism of aggregation and fibril formation from bovine serum albumin // *J Phys Chem B.* 2011. – V. 115. – P. 4195-4205.
34. Bhattacharyya J., Shipova E.V., Santoshkumar P., Sharma K.K., Ortwerth B.J. Effect of a single AGE modification on the structure and chaperone activity of human alphaB-crystallin // *Biochemistry.* 2007. – V. 46. – P. 14682-14692.
35. Bishop M.F., Ferrone F.A. Kinetics of nucleation-controlled polymerization. A perturbation treatment for use with a secondary pathway // *Biophys J.* 1984. – V. 46. – P. 631-644.
36. Bloemendal H., De Jong W., Jaenicke R., Lubsen N.H., Slingsby C. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins // *Prog Biophys Mol Biol.* 2004. – V. 86. – P. 407-485.
37. Borkman R.F., McLaughlin J. The molecular chaperone function of alpha-crystallin is impaired by UV photolysis // *Photochem Photobiol.* 1995. – V. 62. – P. 1046-1051.
38. Bova M.P., Ding L.L., Horwitz J., Fung B.K. Subunit exchange of alphaA-crystallin // *J Biol Chem.* 1997. – V. 272. – P. 29511-29517.

39. Bova M.P., McHaourab H.S., Han Y., Fung B.K. Subunit exchange of small heat shock proteins. Analysis of oligomer formation of alphaA-crystallin and Hsp27 by fluorescence resonance energy transfer and site-directed truncations // *J Biol Chem.* 2000. – V. 275. – P. 1035-1042.
40. Brahma A., Mandal C., Bhattacharyya D. Characterization of a dimeric unfolding intermediate of bovine serum albumin under mildly acidic condition // *BBA.* 2005. – V. 1751. – P. 159-169.
41. Brodersen R. Bilirubin. Solubility and interaction with albumin and phospholipid // *J Biol Chem.* 1979. – V. 254. – P. 2364-2369.
42. Brown P.H., Schuck P. Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation // *Biophys J.* 2006. – V. 90. – P. 4651-4661.
43. Bryant D.T., Andrews P. High-affinity binding of Ca²⁺ to bovine alpha-lactalbumin in the absence and presence of EGTA // *Biochem J.* 1984. – V. 220. – P. 617-620.
44. Bujacz A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin // *Acta Crystallogr D.* 2012. – V. 68. – P. 1278-1289.
45. Bulone D., Martorana V., San Biagio P.L. Effects of intermediates on aggregation of native bovine serum albumin // *Biophys Chem.* 2001. – V. 91. – P. 61-69.
46. 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.* 2010a. – V. 11. – P. 4556-4579.
47. Bumagina Z.M., Gurvits B.Y., Artemova N.V., Muranov K.O., Yudin I.K., Kurganov B.I. Mechanism of suppression of dithiothreitol-induced aggregation of bovine α -lactalbumin by α -crystallin // *Biophys Chem.* 2010b. – V. 146. – P. 108-117.
48. Burgio M.R., Kim C.J., Dow C.C., Koretz J.F. Correlation between the chaperone-like activity and aggregate size of alpha-crystallin with increasing temperature // *Biochem Biophys Res Commun.* 2000. – V. 268. – P. 426-432.
49. Carrell R.W., Lomas D.A. Conformational disease // *Lancet.* 1997. – V. 350. – P. 134-138.
50. Carter D.C., Ho J.X. Structure of serum albumin // *Adv Protein Chem.* 1994. – V. 45. – P. 153-203.
51. Carver J.A., Aquilina J.A., Truscott R.J., Ralston G.B. Identification by ¹H NMR spectroscopy of flexible C-terminal extensions in bovine lens alpha-crystallin // *FEBS Lett.* 1992. – V. 311. – P. 143-149.
52. Carver J.A., Aquilina J.A., Truscott R.J.W. A possible chaperone-like quaternary structure for a-crystallin // *Exp Eye Res.* 1994. – V. 59. – P. 231-234.

53. Carver J.A., Lindner R.A. NMR spectroscopy of alpha-crystallin. Insights into the structure, interactions and chaperone action of small heat-shock proteins // *Int J Biol Macromol.* 1998. – V. 22. – P. 197-209.
54. Carver J.A., Lindner R.A., Lyon C., Canet D., Hernandez H., Dobson C.M., Redfield C. The interaction of the molecular chaperone alpha-crystallin with unfolding alpha-lactalbumin: a structural and kinetic spectroscopic study // *J Mol Biol.* 2002. – V. 318. – P. 815-827.
55. Chandra N., Brew K., Acharya K.R. Structural evidence for the presence of a secondary calcium binding site in human alpha-lactalbumin // *Biochemistry.* 1998. – V. 37. – P. 4767-4772.
56. Chaudhuri R., Cheng Y., Middaugh C.R., Volkin D.B. High-throughput biophysical analysis of protein therapeutics to examine interrelationships between aggregate formation and conformational stability // *AAPS J.* 2014. – V. 16. – P. 48-64.
57. Chebotareva N.A., Kurganov B.I., Muranov K.O., Asryants R.A., Ostrovsky M.A. Role of thermoinduced dissociation in interaction between alpha-crystallin as an oligomeric chaperone and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an oligomeric protein substrate // *Dokl Biochem Biophys.* 2009. – V. 428. – P. 245-248.
58. Chebotareva N.A., Eronina T.B., Roman S.G., Poliansky N.B., Muranov K.O., Kurganov B. I. Effect of crowding and chaperones on self-association, aggregation and reconstitution of apophosphorylase b // *Int J Biol Macromol.* 2013. – V. 60 – P. 69-76.
59. Cherian-Shaw M., Smith J.B., Jiang X.Y., Abraham E.C. Intrapolypeptide disulfides in human alphaA-crystallin and their effect on chaperone-like function // *Mol Cell Biochem.* 1999. – V. 199. – P. 163-167.
60. Chilson O.P., Chilson A.E. Perturbation of folding and reassociation of lactate dehydrogenase by proline and trimethylamine oxide // *Eur J Biochem.* 2003. – V. 270. – P. 4823-4834.
61. Chiti F., Stefani M., Taddei N., Ramponi G., Dobson C.M. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates // *Nature.* 2003. – V. 424. – P. 805-808.
62. Chrysina E.D., Brew K., Acharya K.R. Crystal structures of apo- and holo-bovine a-lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions // *J Biol Chem.* 2000. – V. 275. – P. 37021-37029.
63. 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.

64. Civera M., Sironi M., Fornili S.L. Unusual properties of aqueous solutions of l-proline: A molecular dynamics study // *Chem Phys Lett*. 2005. – V. 415. – P. 274-278.
65. Clarke M.J., Artero J.B., Moulin M., Callow P., Carver J.A., Griffiths P.C., Haertlein M., Harding J.J., Meek K.M., Timmins P., Regini J.W. Investigation of gammaE-crystallin target protein binding to bovine lens alpha-crystallin by small-angle neutron scattering // *Biochim Biophys Acta*. 2010. – V. 1800. – P. 392-397.
66. Cohen S.I.A., Vendruscolo M., Dobson C.M., Knowles T.P.J. From macroscopic measurements to microscopic mechanisms of protein aggregation // *J Mol Biol*. 2012. – V. 421. – P. 160-171.
67. Colman R.F., Frieden C. Cooperative interaction between the GTP binding sites of glutamate dehydrogenase // *Biochem Biophys Res Commun*. 1966. – V. 22. – P. 100-105.
68. 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. – E: 1176.
69. Davidson B.E., Hird F.J. The reactivity of the disulphide bonds of purified proteins in relationship to primary structure // *Biochem J*. 1967. – V. 104. – P. 473-479.
70. De Jong W.W., Leunissen J.A., Voorter C.E. Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family // *Mol Biol Evol*. 1993. – V. 10. – P. 103-126.
71. De Young L.R., Fink A.F., Dill K.A. Aggregation of globular proteins // *Acc Chem Res*. 1993. – V. 26. – P. 614-620.
72. Delbecq S.P., Klevit R.E. One size does not fit all: The oligomeric states of aB crystallin // *FEBS Lett*. 2013. – V. 587. – P. 1073-1080.
73. Desmet J., Hanssens I., Van Cauwelaert F. Comparison of the binding of Na⁺ and Ca²⁺ to bovine alpha-lactalbumin // *Biochim Biophys Acta*. 1987. – V. 912. – P. 211-219.
74. Dieter H., Koberstein R., Sund H. Studies of glutamate dehydrogenase. The interaction of ADP, GTP, and NADPH in complexes with glutamate dehydrogenase // *Eur J Biochem*. 1981. – V. 115. – P. 217-226.
75. Dobson C.M. Protein misfolding, evolution and disease // *Trends Biochem Sci*. 1999. – V. 24. – P. 329-332.
76. Duy C., Fitter J. How aggregation and conformational scrambling of unfolded states govern fluorescence emission spectra // *Biophys J*. 2006. – V. 96. – P. 3704-3711.
77. Ellozy A.R., Ceger P., Wang R.H., Dillon J. Effect of the UV modification of alpha-crystallin on its ability to suppress nonspecific aggregation // *Photochem Photobiol*. 1996. – V. 64. – P. 344-348.

78. Eronina T.B., Chebotareva N.A., Bazhina S.G., Makeeva V.F., Kleymenov S.Yu., Kurganov B.I. Effect of proline on thermal inactivation, denaturation and aggregation of glycogen phosphorylase b from rabbit skeletal muscle // *Biophys Chem.* 2009. – V. 141. – P. 66-74.
79. Eronina T.B., Chebotareva N.A., Bazhina S.G., Kleymenov S.Y., Naletova I.N., Muronetz V.I., Kurganov B.I. Effect of GroEL on thermal aggregation of glycogen phosphorylase b from rabbit skeletal muscle // *Macromol Biosci.* 2010a. – V. 10. – P. 768-774.
80. Eronina T.B., Chebotareva N.A., Kleymenov S.Y., Roman S.G., Makeeva V.F., Kurganov B.I. Effect of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on thermal stability and aggregation of glycogen phosphorylase b from rabbit skeletal muscle // *Biopolymers.* 2010b. – V. 93. – P. 986-993.
81. 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.
82. Eronina T.B., Chebotareva N.A., Roman S.G., Kleymenov S.Y., Makeeva V.F., Poliansky N.B., Muranov K.O., Kurganov B.I. Thermal denaturation and aggregation of apoform of glycogen phosphorylase b. Effect of crowding agents and chaperones // *Biopolymers.* 2014. – V. 101. – P. 504-516.
83. Fändrich M. Absolute correlation between lag time and growth rate in the spontaneous formation of several amyloid-like aggregates and fibrils // *J Mol Biol.* 2007. – V. 365. – P. 1266-1270.
84. Fazeli A., Haji-Abdolvahab M., Shojaosadati S.A., Schellekens H., Khalifeh K., Moosavi-Movahedi A.A., Fazeli M.R. Effect of arginine on pre-nucleus stage of interferon beta-1b aggregation // *AAPS Pharm Sci Tech.* 2014. – V. 15. – P. 1619-1629.
85. Fedurkina N.V., Belousova L.V., Mitskevich L.G., Zhou H.M., Chang Z., Kurganov B.I. Change in kinetic regime of protein aggregation with temperature increase. Thermal aggregation of rabbit muscle creatine kinase // *Biochemistry (Mosc).* 2006. – V. 71. – P. 325-331.
86. Fei L., Perrett S. Effect of nanoparticles on protein folding and fibrillogenesis // *Int J Mol Sci.* 2009. – V. 10. – P. 646-655.
87. 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.
88. Fink A.L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid // *Fold Des.* 1998. – V. 3. – P. R9-R23.

89. Finley E.L., Dillon J., Crouch R.K., Schey K.L. Identification of tryptophan oxidation products in bovine alpha-crystallin // *Protein Sci.* 1998a. – V. 7. – P. 2391-2397.
90. Finley E.L., Dillon J., Crouch R.K., Schey K.L. Radiolysis-induced oxidation of bovine alpha-crystallin // *Photochem Photobiol.* 1998b. – V. 68. – P. 9-15.
91. Fisher H.F., Cross D.G., McGregor L.L. The independence of the substrate specificity of glutamate dehydrogenase on its state of aggregation // *Biochim Biophys Acta.* 1965. – V. 99. – P. 165-167.
92. Frieden C. The dissociation of glutamic dehydrogenase by reduced diphosphopyridine nucleotide (DPNH) // *Biochim Biophys Acta.* 1958. – V. 27. – P. 431-432.
93. Frieden C. Glutamic dehydrogenase. I. The effect of coenzyme on the sedimentation velocity and kinetic behavior // *J Biol Chem.* 1959a. – V. 234. – P. 809-814.
94. Frieden C. Glutamic dehydrogenase. II. The effect of various nucleotides on the association-dissociation and kinetic properties // *J Biol Chem.* 1959b. – V. 234. – P. 815-819.
95. Frieden C. Glutamate dehydrogenase. VI. Survey of purine nucleotide and other effects on the enzyme from various sources // *J Biol Chem.* 1965. – V. 240. – P. 2028-2035.
96. Friedrich K.L., Giese K.C., Buan N.R., Vierling E. Interactions between small heat shock protein subunits and substrate in small heat shock protein-substrate complexes // *J Biol Chem.* 2004. – V. 279. – P. 1080-1089.
97. Fu L., Villette S., Petoud S., Fernandez-Alonso F., Saboungi M.L. H/D isotope effects in protein thermal denaturation: the case of bovine serum albumin // *J Phys Chem B.* 2011. – V. 115. – P. 1881-1888.
98. Fujii N., Uchida H., Saito T. The damaging effect of UV-C irradiation on lens alpha-crystallin // *Mol Vis.* 2004. – V. 10. – P. 814-820.
99. Fujimoto A., Hirano A., Shiraki, K. Ternary system of solution additives with arginine and salt for refolding of beta-galactosidase // *Protein J.* 2010. – V. 29. – P. 161-166.
100. Fukuda M., Kameoka D., Torizawa T., Saitoh S., Yasutake M., Imaeda Y., Koga A., Mizutani A. Thermodynamic and fluorescence analyses to determine mechanisms of IgG1 stabilization and destabilization by arginine // *Pharm Res.* 2014. – V. 31. – P. 992-1001.
101. Gao M.-T., Dong X.-Y., Sun Y. Interactions between L-arginine/L-arginine derivatives and lysozyme and implications to their inhibition effects on protein aggregation // *Biotechnol Prog.* 2013. – V. 29. – P. 1316-1324.
102. Gayen A., Chatterjee C., Mukhopadhyay C. GM1-induced structural changes of bovine serum albumin after chemical and thermal disruption of the secondary structure: a spectroscopic comparison // *Biomacromolecules.* 2008. – V. 9. – P. 974-983.

103. Gelamo E.L., Silva C.H., Imasato H., Tabak M. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling // *Biochim Biophys Acta*. 2002. – V. 1594. – P. 84-99.
104. George A., Bell J.E. Effects of adenosine 5'-diphosphate on bovine glutamate dehydrogenase: diethyl pyrocarbonate modification // *Biochemistry*. 1980. – V. 19. – P. 6057-6061.
105. 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.
106. Giancola C., De Sena C., Fessas D., Graziano G., Barone G. DSC studies on bovine serum albumin denaturation. Effects of ionic strength and SDS concentration // *Int J Biol Macromol*. 1997. – V. 20. – P. 193-204.
107. Gill S.C., von Hippel P.H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data // *Anal Biochem*. 1989. – V. 182. – P. 319-326.
108. Goedert M., Spillantini M.G., Davies S.W. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases // *Curr Opin Neurobiol*. 1998. – V. 8. – P. 619-632.
109. Gohda S., Shimizu A., Ikeguchi M., Sugai S. The superreactive disulfide bonds in alpha-lactalbumin and lysozyme // *J Protein Chem*. 1995. – V. 14. – P. 731-737.
110. Golub N., Meremyanin A., Markossian K., Eronina T., Chebotareva N., Asryants R., Muronets V., Kurganov B. Evidence for the formation of start aggregates as an initial stage of protein aggregation // *FEBS Lett*. 2007. – V. 581. – P. 4223-4227.
111. Golub N.V., Markossian K.A., Kasilovich N.V., Sholukh M.V., Orlov V.N., Kurganov B.I. Thermal inactivation, denaturation and aggregation of mitochondrial aspartate aminotransferase // *Biophys Chem*. 2008. – V. 135. – P. 125-131.
112. Golub N.V., Markossian K.A., Sholukh M.V., Muranov K.O., Kurganov B.I. Study of kinetics of thermal aggregation of mitochondrial aspartate aminotransferase by dynamic light scattering: protective effect of alpha-crystallin // *Eur Biophys J*. 2009. – V. 38. – P. 547-556.
113. Griko 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.
114. Groenen P.J., Merck K.B., De Jong W.W., Bloemendal H. Structure and modifications of the junior chaperone alpha-crystallin. From lens transparency to molecular pathology // *Eur J Biochem*. 1994. – V. 225. – P. 1-19.
115. Grossweiner L.I. Photochemistry of proteins: a review // *Curr Eye Res*. 1984. – V. 3. – P. 137-144.

116. Gupta R., Srivastava O.P. Deamidation affects structural and functional properties of human alphaA-crystallin and its oligomerization with alphaB-crystallin // *J Biol Chem.* 2004. – V. 279. – P. 44258-44569.
117. Hamada H., Shiraki K. L-Argininamide improves the refolding more effectively than L-arginine // *J Biotechnol.* 2007. – V. 130. – P. 153-160.
118. Hamada H., Arakawa T., Shiraki K. Effect of additives on protein aggregation // *Curr Pharm Biotechnol.* 2009. – V. 10. – P. 400-407.
119. Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurter 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.
120. Hellebust J.A. Osmoregulation // *Ann Rev Plant Physiol.* 1976. – V. 27. – P. 485-505.
121. Hendrix T.M., Griko Y., Privalov P.L. Energetics of structural domains in alpha-lactalbumin // *Protein Sci.* 1996. – V. 5. – P. 923-931.
122. Hershko A., Kindler S.H. Mode of interaction of purine nucleotides and amino acids with glutamate dehydrogenase // *Biochem J.* – V. 101. – P. 661-664.
123. Hess J.F., Fitzgerald P.G. Protection of a restriction enzyme from heat inactivation by [alpha]-crystallin // *Mol Vis.* 1998. – V. 4. – P. 29.
124. Hill R.L., Brew K. Lactose synthetase // *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1975. – V. 43. – P. 411-490.
125. Hirayama K., Akashi S., Furuya M., Fukuhara K. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS // *Biochem Biophys Res Commun.* 1990. – V. 173. – P. 639-646.
126. Ho J.X., Holowachuk E.W., Norton E.J., Twigg P.D., Carter D.C. X-ray and primary structure of horse serum albumin (*Equus caballus*) at 0.27-nm resolution // *Eur J Biochem.* 1993. – V. 215. – P. 205-212.
127. Holm N.K., Jespersen S.K., Thomassen L.V., Wolff T.Y., Seghal P., Thomsen L.A., Christiansen G., Andersen C.B., Knudsen A.D., Otzen D.E. Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin // *Biochim Biophys Acta.* 2007. – V. 1774. – P. 1128-1138.
128. Hook D.W., Harding J.J. Molecular chaperones protect catalase against thermal stress // *Eur J Biochem.* 1997. – V. 247. – P. 380-385.
129. Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992. – V. 89. – P. 10449-10453.
130. Horwitz J., Bova M.P., Ding L.L., Haley D.A., Stewart P.L. Lens alpha-crystallin: function and structure // *Eye (Lond).* 1999. – V. 13. – P. 403-408.

131. Horwitz J. The function of alpha-crystallin in vision // *Semin Cell Dev Biol.* 2000. – V. 11. – P. 53-60.
132. Horwitz J. Alpha-crystallin // *Exp Eye Res.* 2003. – V. 76. – P. 145-153.
133. Horwitz J., Huang Q., Ding, L. The native oligomeric organization of alpha-crystallin, is it necessary for its chaperone function? // *Exp Eye Res.* 2004. – V. 79. – P. 817-521.
134. Ignatova Z., Gierasch L.M. Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006. – V. 103. – P. 13357-13361.
135. Inaguma Y., Hasegawa K., Goto S., Ito H., Kato K. Induction of the synthesis of hsp27 and alpha B crystallin in tissues of heat-stressed rats and its suppression by ethanol or an alpha 1-adrenergic antagonist // *J Biochem.* 1995. – V. 117. – P. 1238-1243.
136. Inoue T., Fukushima K., Tastumoto T., Shimozawa R. Light-scattering study on subunit association-dissociation equilibria of bovine liver glutamate dehydrogenase // *Biochim Biophys Acta.* 1984. – V. 786. – P. 144-150.
137. Ito L., Shiraki K., Matsuura T., Okimura 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.
138. Itzhaki R.F., Gill D.M. A micro-biuret method for estimating proteins // *Anal Biochem.* 1964. – V. 9. – P. 401-410.
139. Iwaki T., Kume-Iwaki A., Liem R.K., Goldman J.E. Alpha B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain // *Cell.* 1989. – V. 57. – P. 71-78.
140. Iwaki T., Kume-Iwaki A., Goldman J.E. Cellular distribution of alpha B-crystallin in non-lenticular tissues // *J Histochem Cytochem.* 1990. – V. 38. – P. 31-39.
141. Iwatsubo M., Pantaloni D. Regulation of the activity of glutamate dehydrogenase by effectors GTP and ADP: study by means of "stopped flow" // *Bull Soc Chem Biol (Paris).* 1967. – V. 49. – P. 1563-1572.
142. Jachimska B., Wasilewska M., Adamczyk Z. Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements // *Langmuir.* 2008. – V. 24. – P. 6866-6872.
143. Jaenicke R. Folding and association versus misfolding and aggregation of proteins // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1995. – V. 348. – P. 97-105.
144. Jakob U., Gaestel M., Engel K., Buchner J. Small heat shock proteins are molecular chaperones // *J Biol Chem.* 1993. – V. 268. – P. 1517-1520.

145. Jaya N., Garcia V., Vierling E. Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009. – V. 106. – P. 15604-15609.
146. Julian R.R., Hodyss R., Beauchamp J.L. Salt bridge stabilization of charged zwitterionic arginine aggregates in the gas phase // *J Am Chem Soc*. 2001. – V. 123. – P. 3577-3583.
147. Kappe G., Boelens W.C., De Jong W.W. Why proteins without an alpha-crystallin domain should not be included in the human small heat shock protein family HSPB // *Cell Stress Chaperones*. 2010. – V. 15. – P. 457-461.
148. Katchalski E., Benjamin G.S., Gross V. The availability of the disulfide bonds of human and bovine serum albumin and of bovine gamma-globulin to reduction by thioglycolic acid // *J Am Chem Soc*. 1957. – V. 79. – P. 4096-4099.
149. Kayushina R.L., Vainshtein B.K. Structure determination of L-proline by X-ray diffraction // *Kristallographia*. 1983. – V. 10. – P. 834-844.
150. Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C. How to study proteins by circular dichroism // *Biochim Biophys Acta*. 2005. – V. 1751. – P. 119-139.
151. Khanova H.A., Markossian K.A., Kurganov B.I., Samoilov A.M., Kleimenov S.Y., Levitsky D.I., Yudin I.K., Timofeeva A.C., Muranov K.O., Ostrovsky M.A. Mechanism of chaperone-like activity. Suppression of thermal aggregation of betaL-crystallin by alpha-crystallin // *Biochemistry*. 2005. – V. 44. – P. 15480-15487.
152. Khanova H.A., Markossian K.A., Kleimenov S.Y., Levitsky D.I., Chebotareva N.A., Golub N.V., Asryants R.A., Muronetz V.I., Saso L., Yudin I.K., Muranov K.O., Ostrovsky M.A., Kurganov B.I. Effect of alpha-crystallin on thermal denaturation and aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Biophys Chem*. 2007. – V. 125. – P. 521-531.
153. Kiese S., Pappenberger A., Friess W., Mahler H.C. Shaken, not stirred: mechanical stress testing of an IgG1 antibody // *J Pharm Sci*. 2008. – V. 97. – P. 4347-4366.
154. Kim K.K., Kim R., Kim S.H. Crystal structure of a small heat-shock protein // *Nature*. 1998. – V. 394. – P. 595-599.
155. Kim R., Lai L., Lee H.H., Cheong G.W., Kim K.K., Wu Z., Yokota H., Margusee S., Kim S.H. On the mechanism of chaperone activity of the small heat-shock protein of *Methanococcus jannaschii* // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003. – V. 100. – P. 8151-8155.
156. 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.

157. Knowles T.P., Waudby C.A., Devlin G.L., Cohen S.I., Aguzzi A., Vendruscolo M., Terentjev E.M., Welland M.E., Dobson C.M. An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly // *Science*. 2009. – V. 326. – P. 1533-1537.
158. Koberstein R., Sund H. Studies of glutamate dehydrogenase. The influence of ADP, GTP, and L-glutamate on the binding of the reduced coenzyme to beef-liver glutamate dehydrogenase // *Eur J Biochem*. 1973. – V. 36. – P. 545-552.
159. Kodaka M. Interpretation of concentration-dependence in aggregation kinetics // *Biophys Chem*. 2004a. – V. 109. – P. 325-332.
160. Kodaka M. Requirements for generating sigmoidal time-course aggregation in nucleation-dependent polymerization model // *Biophys Chem*. 2004b. – V. 107. – P. 243-253.
161. Kosa T., Maruyama T., Otagiri M. Species differences of serum albumins: II. Chemical and thermal stability // *Pharm Res*. 1998. – V. 15. – P. 449-454.
162. Krivandin A.V., Muranov K.O., Yakovlev F.Y., Poliansky N.B., Wasserman L.A., Ostrovsky M.A. Resistance of alpha-crystallin quaternary structure to UV irradiation // *Biochemistry (Mosc)*. 2009. – V. 74. – P. 633-342.
163. Kronman M.J., Andreotti R., Vitols R. Inter- and intramolecular interactions of alpha-lactalbumin. II. Aggregation reactions at acid pH // *Biochemistry*. 1964. – V. 3. – P. 1152-1160.
164. Kurganov B.I. Allosteric enzymes: kinetic behavior. – Chichester: Wiley, 1982. – P. 1-344.
165. Kurganov B.I. Thermal denaturation and aggregation assays in analytical biochemistry // *Biochem Anal Biochem*. 2013. – V. 2. – e: 143.
166. Kuwajima K., Harushima Y., Sugai S. Influence of Ca²⁺ binding on the structure and stability of bovine alpha-lactalbumin studied by circular dichroism and nuclear magnetic resonance spectra // *Int J Pept Protein Res*. 1986. – V. 27. – P. 18-27.
167. Kuwajima K., Mitani M., Sugai S. Characterization of the critical state in protein folding. Effects of guanidine hydrochloride and specific Ca²⁺ binding on the folding kinetics of alpha-lactalbumin // *J Mol Biol*. 1989. – V. 206. – P. 547-561.
168. Kuwajima K., Ikeguchi M., Sugawara T., Hiraoka Y., Sugai S. Kinetics of disulfide bond reduction in alpha-lactalbumin by dithiothreitol and molecular basis of superreactivity of the Cys6-Cys120 disulfide bond // *Biochemistry*. 1990. – V. 29. – P. 8240-8249.
169. Kuwajima K. The molten globule state of alpha-lactalbumin // *FASEB J*. 1996. – V. 10. – P. 102-109.

170. Kuznetsov A.N., Ebert B., Lassmann G., Shapiro A.B. Adsorption of small molecules to bovine serum albumin studied by the spin-probe method // *Biochim Biophys Acta*. 1975. – V. 379. – P. 139-146.
171. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. – V. 227. – P. 680-685.
172. Laganowsky A., Benesch J.L., Landau M., Ding L., Sawaya M.R., Cascio D., Huang Q., Robinson C.V., Horwitz J., Eisenberg D. Crystal structures of truncated alphaA and alphaB crystallins reveal structural mechanisms of polydispersity important for eye lens function // *Protein Sci*. 2010. – V. 19. – P. 1031-1043.
173. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. – New York: Springer, 2006. – P. 1-954.
174. Lange C., Rudolph, R. Suppression of protein aggregation by L-arginine // *Curr Pharm Biotechnol*. 2009. – V. 10. – P. 408-414.
175. Laue T.M., Shah B.D., Ridgeway T.M., Pelletier S.L. Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins // *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science*. – Roy Soc Chem. 1992. – P. 90-125.
176. Li D.Y., Borkman R.F., Wang R.H., Dillon J. Mechanisms of photochemically produced turbidity in lens protein solutions // *Exp Eye Res*. 1990. – V. 51. – P. 663-669.
177. Li J., Garg M., Shah D., Rajagopalan R. Solubilization of aromatic and hydrophobic moieties by arginine in aqueous solutions // *J Chem Phys*. 2010. – V. 133. – P. 054902.
178. Li M., Allen A., Smith T.J. High throughput screening reveals several new classes of glutamate dehydrogenase inhibitors // *Biochemistry*. 2007. – V. 46. – P. 15089-15102.
179. Li S., Schöneich C., Borchardt R.T. Chemical instability of protein pharmaceuticals: Mechanisms of oxidation and strategies for stabilization // *Biotechnol Bioeng*. 1995. – V. 48. – P. 490-500.
180. Li Y., Roberts C.J. Lumry-Eyring nucleated-polymerization model of protein aggregation kinetics. 2. Competing growth via condensation and chain polymerization // *J Phys Chem B*. 2009. – V. 113. – P. 7020-7032.
181. Lin M.Y., Lindsay H.M., Weitz D.A., Ball R.C., Klein R., Meakin P. Universality of fractal aggregates as probed by light scattering // *Proc R Soc Lond A*. 1989. – V. 423. – P. 71-87.
182. Lin V.J.C., Koenig J.L. Raman studies of bovine serum albumin // *Biopolymers*. 1976. – V. 15. – P. 203-218.

183. 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.
184. Lindner R.A., Treweek T.M., Carver J.A. The molecular chaperone alpha-crystallin is in kinetic competition with aggregation to stabilize a monomeric molten-globule form of alpha-lactalbumin // *Biochem J.* 2001. – V. 354. – P. 79-87.
185. Lowe J., McDermott H., Pike I., Spendlove I., Landon M., Mayer R.J. Alpha B crystallin expression in non-lenticular tissues and selective presence in ubiquitinated inclusion bodies in human disease // *J Pathol.* 1992. – V. 166. – P. 61-68.
186. Lumry R., Eyring H. Conformation change of protein // *J Phys Chem.* 1954. – V. 58. – P. 110-120.
187. Lyubarev A.E., Kurganov B.I., Orlov V., Zhou H. Two-state irreversible thermal denaturation of muscle creatine kinase // *Biophys Chem.* 1999. – V. 79. – P. 199-204.
188. Lyutova E.M., Kasakov A.S., Gutvits B.Ya. Effects of arginine on kinetics of protein aggregation studied by dynamic laser light scattering and turbidimetry techniques // *Biotechnol Prog.* 2007. – V. 23. – P. 1411-1416.
189. Mahler H.-C., Friess W., Grauschopf U., Kiese S. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis // *J Pharm Sci.* 2009. – V. 98. – P. 2909-2934.
190. Malcolm A.D. Coenzyme binding to glutamate dehydrogenase. A study by relaxation kinetics // *Eur J Biochem.* 1972. – V. 27. – P. 453-461.
191. Malencik D.A., Anderson S.R. Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe // *Amino Acids.* 2003. – V. 25. – P. 233-247.
192. Maloletkina O.I., Markosyan K.A., Asriyants R.A., Orlov V.N., Kurganov B.I. Antichaperone activity of cyclodextrin derivatives // *Dokl Biochem Biophys.* 2009. – V. 427. – P. 199-201.
193. Maloletkina O.I., Markossian K.A., Asryants R.A., Semenyuk P.I., Makeeva V.F., Kurganov B.I. Effect of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on thermal inactivation, denaturation and aggregation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit skeletal muscle // *Int J Biol Macromol.* 2010a. – V. 46. – P. 487-492.
194. Maloletkina O.I., Markossian K.A., Belousova L.V., Kleimenov S.Y., Orlov V.N., Makeeva V.F., Kurganov B.I. Thermal stability and aggregation of creatine kinase from rabbit skeletal muscle. Effect of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin // *Biophys Chem.* 2010b. – V. 148. – P. 121-130.
195. Maloletkina O.I., Markossian K.A., Chebotareva N.A., Asriyants R.A., Kleymenov S.Y., Poliansky N.B., Muranov K.O., Makeeva V.F., Kurganov B. Kinetics of

aggregation of UV-irradiated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit skeletal muscle. Effect of agents possessing chaperone-like activity // *Biophys Chem.* 2012. – V. 163-164. – P. 11-20.

196. Marini I., Moschini R., Del Corso A., Mura U. Complete protection by alpha-crystallin of lens sorbitol dehydrogenase undergoing thermal stress // *J Biol Chem.* 2000. – V. 275. – P. 32559-32565.

197. Markau K., Steinhubel I. Kinetic measurements with monocarboxylic acids as substrates and effectors of glutamate dehydrogenase // *FEBS Lett.* 1972. – V. 28. – P. 115-120.

198. Markossian K.A., Khanova H.A., Kleimenov S.Y., Levitsky D.I., Chebotareva N.A., Asryants R.A., Muronetz V.I., Saso L., Yudin I.K., Kurganov B.I. Mechanism of thermal aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Biochemistry.* 2006. – V. 45. – P. 13375-13384.

199. Markossian K.A., Golub N.V., Kleymenov S.Y., Muranov K.O., Sholukh M.V., Kurganov B.I. Effect of alpha-crystallin on thermostability of mitochondrial aspartate aminotransferase // *Int J Biol Macromol.* 2009a. – V. 44. – P. 441-446.

200. Markossian K.A., Yudin I.K., Kurganov B.I. Mechanism of suppression of protein aggregation by a-crystallin // *Int J Mol Sci.* 2009b. – V. 10. – P. 1314-1345.

201. Markossian K.A., Golub N.V., Chebotareva N.A., Asryants R.A., Naletova I.N., Muronetz V.I., Muranov K.O., Kurganov B. Comparative analysis of the effects of a-crystallin and GroEL on the kinetics of thermal aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase // *Protein J.* 2010. – V. 29. – P. 11-25.

202. Markov D.I., Zubov E.O., Nikolaeva O.P., Kurganov B.I., Levitsky D.I. Thermal denaturation and aggregation of myosin subfragment 1 isoforms with different essential light chains // *Int J Mol Sci.* 2010. – V. 11. – P. 4194-4226.

203. Mason P.E., Neilson G.W., Dempsey C.E., Barnes A.C., Cruickshank J.M. The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: implications for protein stability in aqueous solution // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003. – V. 100. – P. 4557-4561.

204. Mason P.E., Brady J.W., Neilson G.W., Dempsey C.E. The interaction of guanidinium ions with a model peptide // *Biophys J.* 2007. – V. 93. – P. L04-L06.

205. Matsuoka T., Tomita S., Hamada H., Shiraki K. Amidated amino acids are prominent additives for preventing heat-induced aggregation of lysozyme // *J Biosci Bioeng.* 2007. – V. 103. – P. 440-443.

206. Mayr C., Richter K., Lilie H., Buchner J. Cpr6 and Cpr7, two closely related Hsp90-associated immunophilins from *Saccharomyces cerevisiae*, differ in their functional properties // *J Biol Chem.* 2000. – V. 275. – P. 34140-34146.

207. McLain S.E., Soper A.K., Terry A.E., Watts A. Structure and hydration of L-proline in aqueous solutions // *J Phys Chem B*. 2007. – V. 111. – P. 4568-4580.
208. Melo A., Ramos M.J., Floriano W.B., Gomes J.A.N.F., Leão J.F.R., Magalhães A.L., Maigret B., Nascimento M.C., Reuter N. Theoretical study of arginine – carboxylate interactions // *J Mol Struct (Theochem)*. 1999. – V. 463. – P. 81-90.
209. Meng C.K., Fenn J.B. Formation of charged clusters during electrospray ionization of organic solute species // *Org Mass Spectrom*. 1991. – V. 26. – P. 542-549.
210. Merck K.B., Groenen P.J., Voorter C.E., de Haard-Hoekman W.A., Horwitz J., Bloemendal H., De Jong W.W. Structural and functional similarities of bovine alpha-crystallin and mouse small heat-shock protein. A family of chaperones // *J Biol Chem*. 1993. – V. 268. – P. 1046-1052.
211. Meremyanin A.K., 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.
212. Michnik A. Thermal stability of bovine serum albumin. DSC study // *J Therm Anal Cal*. 2003. – V. 71. – P. 509-519.
213. Michnik A., Michalik K., Drzazga S. Stability of bovine serum albumin at different pH // *J Therm Anal Cal*. 2005. – V. 80. – P. 399-406.
214. Militello V., Vetri V., Leone M. Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin // *Biophys Chem*. 2003. – V. 105. – P. 133-141.
215. Militello V., Casarino C., Emanuele A., Giostra A., Pullara F., Leone M. Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering // *Biophys Chem*. 2004. – V. 107. – P. 175-187.
216. Minton A.P. Influence of macromolecular crowding upon the stability and state of association of proteins: predictions and observations // *J Pharm Sci*. 2005. – V. 94. – P. 1668-1675.
217. Moriyama Y., Watanabe E., Kobayashi K., Harano H., Inui E., Takeda K. Secondary structural change of bovine serum albumin in thermal denaturation up to 130 degrees C and protective effect of sodium dodecyl sulfate on the change // *J Phys Chem B*. 2008. – V. 112. – P. 16585-19589.
218. Morris A.M., Aquilina J.A. Evidence for specific subunit distribution and interactions in the quaternary structure of alpha-crystallin // *Proteins*. 2010. – V. 78. – P. 2546-2553.

219. Muranov K.O., Maloletkina O.I., Poliansky N.B., Markossian K.A., Kleymenov S.Y., Rozhkov S.P., Goryunov A.S., Ostrovsky M.A., Kurganov B.I. Mechanism of aggregation of UV-irradiated beta(L)-crystallin // *Exp Eye Res.* 2011. – V. 92. – P. 76-86.
220. Murphy R.M., Roberts C.J. Protein misfolding and aggregation research: some thoughts on improving quality and utility // *Biotechnol Prog.* 2013. – V. 29. – P. 1109-1115.
221. Neal R., Zigler J.S.Jr., Bettelheim F.A. On the equilibrium between monomeric alpha-lactalbumin and the chaperoning complex of alpha-crystallin // *Biochem Biophys Res Commun.* 2001. – V. 280. – P. 14-18.
222. Nilsson M.R. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro // *Methods.* 2004. – V. 34. – P. 151-160.
223. Nitta K., Sugai S. The evolution of lysozyme and alpha-lactalbumin // *Eur J Biochem.* 1989. – V. 182. – P. 111-118.
224. Okajima T., Kawata Y., Hamaguchi K. Chemical modification of tryptophan residues and stability changes in proteins // *Biochemistry.* 1990. – V. 29. – P. 9168-9175.
225. Olsen S.N., Andersen K.B., Randolph T.W., Carpenter J.F., Westh P. Role of electrostatic repulsion on colloidal stability of *Bacillus halmapalus* alpha-amylase // *Biochim Biophys Acta.* 2009. – V. 1794. – P. 1058-1065.
226. Olson J.A., Anfinsen C.B. The crystallization and characterization of l-glutamic acid dehydrogenase // *J Biol Chem.* 1952. – V. 197. – P. 67-79.
227. Oosawa F., Kasai M. A theory of linear and helical aggregations of macromolecules // *J Mol Biol.* 1962. – V. 4. – P. 10-21.
228. Painter A.J., Jaya N., Basha E., Vierling E., Robinson C.V., Benesch J.L. Real-time monitoring of protein complexes reveals their quaternary organization and dynamics // *Chem Biol.* 2008. – V. 15. – P. 246-253.
229. Palmieri V., Maulucci G., Maiorana A., Papi M., De Spirito M. α -crystallin modulates its chaperone activity by varying the exposed surface // *Chembiochem.* 2013. – V. 14. – P. 2362-2370.
230. Papp E., Csermely P. Chemical chaperones: mechanisms of action and potential use // *Molecular Chaperones in Health and Disease.* – Springer Berlin Heidelberg, 2006. – C. 405-416.
231. Paris G., Kraszewski S., Ramseyer C., Enescu M. About the structural role of disulfide bridges in serum albumins: evidence from protein simulated unfolding // *Biopolymers.* 2012. – V. 97. – P. 889-898.

232. Pearce F.G., Mackintosh S.H., Gerrard J.A. Formation of amyloid-like fibrils by ovalbumin and related proteins under conditions relevant to food processing // *J Agric Food Chem.* 2007. – V. 55. – P. 318-322.
233. Pekar A., Sukumar M. Quantitation of aggregates in therapeutic proteins using sedimentation velocity analytical ultracentrifugation: Practical considerations that affect precision and accuracy // *Anal Biochem.* 2007. – V. 367. – P. 225-237.
234. 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.
235. Permyakov E.A., Shnyrov V.V., Kalinichenko L.P., Kuchar A., Reyzer I.L., Berliner L.J. Binding of Zn(II) ions to alpha-lactalbumin // *J Protein Chem.* 1991. – V. 10. – P. 577-584.
236. Permyakov E.A., Berliner L.J. A-lactalbumin: structure and function // *FEBS Lett.* 2000. – V. 473. – P. 269-274.
237. Peters T.Jr. Serum albumin // *Adv Protein Chem.* 1985. – V. 37. - P. 161-245.
238. Peters T.Jr. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. – San Diego, CA: Academic Press, 1996. – P. 1-432.
239. Pikal-Cleland K.A., Cleland J.L., Anchordoquy T.J., Carpenter J.F. Effect of glycine on pH changes and protein stability during freeze-thawing in phosphate buffer systems // *J Pharm Sci.* 2002. – V. 91. – P. 1969-1979.
240. Pike A.C.W., Brew K., Acharya K.R. Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine alpha-lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase // *Structure.* 1996. – V. 4. – P. 691-703.
241. Podzimek S. Light scattering, size exclusion chromatography and asymmetric flow field flow fractionation. – Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2011. – P. 259-305.
242. Poole S., West S.I., Fry J.C. Effect of basic proteins on the denaturation and heat-gelation of acidic proteins // *Food Hydrocolloids.* 1987. – V. 1. – P. 301-316.
243. Provencer S.W., Glockner J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism // *Biochemistry.* 1981. – V. 20. – P. 33-37.
244. Putilina T., Skouri-Panet F., Prat K., Lubsen N.H., Tardieu A. Subunit exchange demonstrates a differential chaperone activity of calf alpha-crystallin toward beta LOW- and individual gamma-crystallins // *J Biol Chem.* 2003. – V. 278. – P. 13747-13756.

245. Rachinsky M.R., Foster J.F. The salting-out behavior of bovine plasma albumin; further evidence for configurational isomerization // *Arch Biochem Biophys*. 1957. – V. 70. – P. 283-285.
246. Rajaraman K., Raman B., Rao C.M. Molten-globule state of carbonic anhydrase binds to the chaperone-like alpha-crystallin // *J Biol Chem*. 1996. – V. 271. – P. 27595-27600.
247. Rajaraman K., Raman B., Ramakrishna T., Rao C.M. Interaction of human recombinant alphaA- and alphaB-crystallins with early and late unfolding intermediates of citrate synthase on its thermal denaturation // *FEBS Lett*. 2001. – V. 497. – P. 118-123.
248. Raman B., Rao C.M. Chaperone-like activity and quaternary structure of alpha-crystallin // *J Biol Chem*. 1994. – V. 269. – P. 27264-27268.
249. Raman B., Rao C.M. Chaperone-like activity and temperature-induced structural changes of alpha-crystallin // *J Biol Chem*. 1997. – V. 272. – P. 23559-23564.
250. Raman B., Ban T., Sakai M., Pasta S.Y., Ramakrishna T., Naiki H., Goto Y., Rao Ch.M. α B-crystallin, a small heat-shock protein, prevents the amyloid fibril growth of an amyloid β -peptide and β 2-microglobulin // *Biochem J*. 2005. – V. 392. – P. 573-581.
251. Rao C.M., Raman B., Ramakrishna T., Rajaraman K., Ghosh D., Datta S., Trivedi V.D., Sukhaswami M.B. Structural perturbation of alpha-crystallin and its chaperone-like activity // *Int J Biol Macromol*. 1998. – V. 22. – P. 271-281.
252. Rao N.A., Saraswathy S., Wu G.S., Katselis G.S., Wawrousek E.F., Bhat S. Elevated retina-specific expression of the small heat shock protein, alphaA-crystallin, is associated with photoreceptor protection in experimental uveitis // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008. – V. 49. – P. 1161-1171.
253. 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.
254. Regini J.W., Grossmann J.G., Timmins P., Harding J.J., Quantock A.J., Hodson S.A., Elliott G.F. X-ray- and neutron-scattering studies of α -crystallin and evidence that the target protein sits in the fenestrations of the α -crystallin shell // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007. – V. 48. – P. 2695-2700.
255. Regini J.W., Ecroyd H., Meehan S., Bremmel K., Clarke M.J., Lammie D., Wess T., Carver J.A. The interaction of unfolding α -lactalbumin and malate dehydrogenase with the molecular chaperone α B-crystallin: a light and X-ray scattering investigation // *Mol Vis*. 2010. – V. 16. – P. 2446-2456.
256. Roberts C.J., Das T.K., Sahin E. Predicting solution aggregation rates for therapeutic proteins: approaches and challenges // *Int J Pharm*. 2011. – V. 418. – P. 318-333.

257. Roman S.G., Chebotareva N.A., Eronina T.B., Kleymentov S.Y., Makeeva V.F., Poliansky N.B., Muranov K.O., Kurganov B.I. Does the crowded cell-like environment reduce the chaperone-like activity of alpha-crystallin? // *Biochemistry*. 2011. – V. 50. – P. 10607-10623.
258. Roman S.G., Chebotareva N.A., Kurganov B.I. Concentration dependence of chaperone-like activities of alpha-crystallin, alphaB-crystallin and proline // *Int J Biol Macromol*. 2012. – V. 50. – P. 1341-1345.
259. 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.
260. Rudolph A.S., Crowe J.H. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline // *Cryobiology*. 1985. – V. 22. – P. 367-377.
261. Rudolph A.S., Crowe J.H. A calorimetric and infrared spectroscopic study of the stabilizing solute proline // *Biophys J*. 1986. – V. 50. – P. 423-430.
262. Ruegg M., Moor U., Blanc B.J. A calorimetric study of the thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate // *J Dairy Res*. 1977. – V. 44. – P. 509-520.
263. Sabbaghian M., Ebrahim-Habibi A., Nemat-Gorgani M. Thermal aggregation of a model allosteric protein in different conformational states // *Int J Biol Macromol*. 2009. – V. 44. – P. 156-162.
264. Sahin, Z., Demir Y.K., Kayser V. Global kinetic analysis of seeded BSA aggregation // *Eur J Pharm Sci*. 2016. – doi: 10.1016/j.ejps.2016.03.007.
265. Saifer A., Goldman L. The free fatty acids bound to human serum albumin // *J Lipid Res*. 1961. – V.2. – P. 268-270.
266. Samuel D., Kumar T.K., Ganesh G., Jayaraman G., Yang P.-W., Chang M.-M., Trivedi V.D., Wang S.L., Hwang K.C., Chang D.K., Yu C. Proline inhibits aggregation during protein refolding // *Protein Sci*. 2000. – V. 9. – P. 344-352.
267. Saradambal K.V., Bednar A.R., Colman R.F. Lysine and tyrosine in the NADH inhibitory site of bovine liver glutamate dehydrogenase // *J Biol Chem*. 1981. – V. 256. – P. 11866-11872.
268. Schauerte J.A., Gafni A. Photodegradation of tryptophan residues and attenuation of molecular chaperone activity in alpha-crystallin are correlated // *Biochem Biophys Res Commun*. 1995. – V. 212. – P. 900-905.
269. Schmidt J.A., Colman R.F. Identification of the lysine and tyrosine peptides labeled by 5'-p-fluorosulfonylbenzoyladenine in the NADH inhibitory site of glutamate dehydrogenase // *J Biol Chem*. 1984. – V. 259. – P. 14515-14519.

270. Schneider C.P., Trout B.L. Investigation of cosolute-protein preferential interaction coefficients: new insight into the mechanism by which arginine inhibits aggregation // *J Phys Chem B*. 2009. – V. 113. – P. 2050-2058.
271. Schobert B. The anomalous colligative properties of proline // *Naturwissenschaften*. 1977. – V. 64. – P. 386.
272. Schobert B., Tschesche H. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins // *Biochim Biophys Acta*. 1978. – V. 541. – P. 270-277.
273. Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling // *Biophys J*. 2000. – V. 78. – P. 1606-1019.
274. 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.
275. 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.
276. Sgarbossa A., Buselli D., Lenci F. In vitro perturbation of aggregation processes in beta-amyloid peptides: a spectroscopic study // *FEBS Lett*. 2008. – V. 582. – P. 3288-3292.
277. Shafer J.A., Chiancone E., Vittorelli L.M., Spagnuolo C., Machler B., Antonini E. Binding of reduced cofactor to glutamate dehydrogenase // *Eur J Biochem*. 1972. – V. 31. – P. 166-171.
278. 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.
279. 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 // *Biotechnol Prog*. 2012. – V. 28. – P. 223-231.
280. Shammass S.L., Waudby C.A., Wang S., Buell A.K., Knowles T.P., Ecroyd H., Welland M.E., Carver J.A., Dobson C.M., Meehan S. Binding of the molecular chaperone α B-crystallin to Ab amyloid fibrils inhibits fibril elongation // *Biophys J*. 2011. – V. 101. – P. 1681-1689.
281. Shanmugam G., Polavarapu P.L. Vibrational circular dichroism spectra of protein films: thermal denaturation of bovine serum albumin // *Biophys Chem*. 2004. – V. 111. – P. 73-77.
282. Sharma K., Ortwerth B.J. Effect of cross-linking on the chaperone-like function of alpha crystallin // *Exp Eye Res*. 1995. – V. 61. – P. 413-421.

283. Sharma S., Sarkar S., Paul S.S., Roy S., Chattopadhyay K. A small molecule chemical chaperone optimizes its unfolded state contraction and denaturant like properties // *Sci Rep*. 2013. – V. 3. – P. 3525.
284. 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.
285. Shire S.J., Shahrokh Z., Liu J. Challenges in the development of high protein concentration formulations // *J Pharm Sci*. 2004. – V. 93. – P. 1390-1402.
286. 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.
287. Shukla D., Trout B.L. Preferential interaction coefficients of proteins in aqueous arginine solutions and their molecular origins // *J Phys Chem B*. 2011. – V. 115. – P. 1243-1253.
288. Siezen R.J., Hoenders H.J. The quaternary structure of bovine alpha-crystallin. Surface probing by limited proteolysis in vitro // *Eur J Biochem*. 1979. – V. 96. – P. 431-440.
289. Singh N., Liu Z., Fisher H.F. The existence of a hexameric intermediate with molten-globule-like properties in the thermal denaturation of bovine-liver glutamate dehydrogenase // *Biophys Chem*. 1996. – V. 63. – P. 27-36.
290. Smirnova E., Chebotareva N., Gurvits B. Transient transformation of oligomeric structure of alpha-crystallin during its chaperone action // *Int J Biol Macromol*. 2013a. – V. 55. – P. 62-68.
291. 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.
292. Smith T.J., Peterson P.E., Schmidt T., Fang J., Stanley C.A. Structures of bovine glutamate dehydrogenase complexes elucidate the mechanism of purine regulation // *J Mol Biol*. 2001. – V. 307. – P. 707-720.
293. Smith T.J., Schmidt T., Fang J., Wu J., Siuzdak G., Stanley C.A. The structure of apo human glutamate dehydrogenase details subunit communication and allostery // *J Mol Biol*. 2002. – V. 318. – P. 765-777.
294. Smith T.J., Stanley C.A. Untangling the glutamate dehydrogenase allosteric nightmare // *Trends Biochem Sci*. 2008. – V. 33. – P. 557-564.
295. Smulders R.H., Van Boekel M.A., De Jong W.W. Mutations and modifications support a 'pitted-flexiball' model for alpha-crystallin // *Int J Biol Macromol*. 1998. – V. 22. – P. 187-196.

296. Sogami M., Foster J.F. Resolution of oligomeric and isomeric forms of plasma albumin by zone electrophoresis on polyacrylamide gel // *J Biol Chem.* 1962. – V. 237. – P. 2514-2521.
297. Spector A., Stauffer J., Roy D., Li L.K., Adams D. Human alpha-crystallin. I. The isolation and characterization of newly synthesized alpha-crystallin // *Invest Ophthalmol.* 1976. – V. 15. – P. 288-296.
298. Speed M.A., King J., Wang D.I.C. Polymerization mechanism of polypeptide chain aggregation // *Biotechnol Bioeng.* 1997. – V. 54. – P. 333-343.
299. Sreerama N., Woody R.W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism // *Anal Biochem.* 1993. – V. 209. – P. 32-44.
300. Strambini G.B., Conelli M. Protein stability in ice // *Biophys J.* 2007. – V. 92. – P. 2131-2138.
301. Struck J., Sizer I.W. The substrate specificity of glutamic acid dehydrogenase // *Arch Biochem Biophys.* 1960. – V. 82 – P. 260-266.
302. Stuart D.I., Acharya K.R., Walker M.P., Smith S.G., Lewis M., Phillips D.C. Alpha-lactalbumin possesses a novel calcium binding loop // *Nature.* 1986. – V. 324. – P. 84-87.
303. Su R., Qi W., He Z., Zhang Y., Jin F. Multilevel structural nature and interactions of bovine serum albumin during heat-induced aggregation process // *Food Hydrocolloids.* 2008. – V. 22. – P. 995-1005.
304. Sulkowska A., Maciazek M., Rownicka J., Bojko B., Pentak D., Sulkowski W.W. Effect of temperature on the methotrexate – BSA interaction: Spectroscopic study // *J Mol Struct.* 2007. – V. 834-836. – P. 162-169.
305. Surewicz W.K., Olesen P.R. On the thermal stability of alpha-crystallin: a new insight from infrared spectroscopy // *Biochemistry.* 1995. – V. 34. – P. 9655-9660.
306. Swamy M.S., Abraham E.C. Reverse-phase HPLC analysis of human alpha crystallin // *Curr Eye Res.* 1991. – V. 10. – P. 213-220.
307. Syed S.E., Engel P.C. Ox liver glutamate dehydrogenase. The use of chemical modification to study the relationship between catalytic sites for different amino acid substrates and the question of kinetic non-equivalence of the subunits // *Biochem J.* 1984. – V. 222. – P. 621-626.
308. Takai E., Yoshizawa S., Ejima D., Arakawa T., Shiraki K. Synergistic solubilization of porcine myosin in physiological salt solution by arginine // *Int J Biol Macromol.* 2013. – V. 62. – P. 647-651.
309. Tanford C., Buzzell J.G. The viscosity of aqueous solutions of bovine serum albumin between pH 4.3 and 10.5 // *J Phys Chem.* 1956. – V. 60. – P. 225-231.

310. Tardieu A., Laporte D., Licinio P., Krop B., Delaye M. Calf lens alpha-crystallin quaternary structure. A three-layer tetrahedral model // *J Mol Biol.* 1986. – V. 192. – P. 711-724.
311. Taylor R.P., Benjamin I.J. Small heat shock proteins: a new classification scheme in mammals // *J Mol Cell Cardiol.* 2005. – V. 38. – P. 433-444.
312. Thampi P., Hassan A., Smith J.B., Abraham E.C. Enhanced C-terminal truncation of alphaA- and alphaB-crystallins in diabetic lenses // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002. – V. 43. – P. 3265-3272.
313. Tomkins G.M., Yielding K.L., Curran J.F. Steroid hormone activation of L-alanine oxidation catalyzed by a subunit of crystalline glutamic dehydrogenase // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1961. – V. 47. – P. 270-278.
314. Treuheit M.J., Kosky A.A., Brems D.N. Inverse relationship of protein concentration and aggregation // *Pharm Res.* 2002. – V. 19. – P. 511-516.
315. Treweek T.M., Rekas A., Walker M.J., Carver J.A. A quantitative NMR spectroscopic examination of the flexibility of the C-terminal extensions of the molecular chaperones, α A- and α B-crystallin // *Exp Eye Res.* 2010. – V. 91. – P. 691-699.
316. Troitzsch R.Z., Martyna G.J., McLain S.E., Soper A.K., Crain J. Structure of aqueous proline via parallel tempering molecular dynamics and neutron diffraction // *J Phys Chem B.* 2007. – V. 111. – P. 8210-8222.
317. Troitzsch R.Z., Tulip P.R., Crain J., Martyna G.J. A simplified model of local structure in aqueous proline amino acid revealed by first-principles molecular dynamics simulations // *Biophys J.* 2008a. – V. 95. – P. 5014-5020.
318. Troitzsch R.Z., Vass H., Hossak W.J., Martyna G.J., Crain J. Molecular mechanisms of cryoprotection in aqueous proline: light scattering and molecular dynamics simulations // *J Phys Chem B.* 2008b. – V. 112. – P. 4290-4297.
319. 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.* 2003. – V. 312. – P. 1383-1386.
320. Tsumoto K., Umetsu M., Kumagai I., Ejima D., Philo J., Arakawa T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification // *Biotechnol Prog.* 2004. – V. 20. – P. 1301-1308.
321. Tsumoto K., Ejima D., Kita Y., Arakawa T. Review: why is arginine effective in suppressing aggregation? // *Protein Pept Lett.* 2005. – V. 12. – P. 613-619.
322. Ueki T., Hiragi Y., Kataoka M., Inoko Y., Amemiya Y., Izumi Y., Tagawa H., Muroga Y. Aggregation of bovine serum albumin upon cleavage of its disulfide bonds, studied

by the time-resolved small-angle X-ray scattering technique with synchrotron radiation // *Biophys Chem.* 1985. – V. 23. – P. 115-124.

323. 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.

324. Vaiana S.M., Emanuele A., Palma-Vittorelli M.B., Palma M.U. Irreversible formation of intermediate BSA oligomers requires and induces conformational changes // *Proteins: Struct Funct Bioinf.* 2004. – V. 55. – P. 1053-1062.

325. Van der Ouderaa F.J., De Jong W.W., Hilderink A., Bloemendal H. The amino-acids sequence of the alphaB2 chain of bovine alpha-crystallin // *Eur J Biochem.* 1974. – V. 49. – P. 157-168.

326. Van Montfort R.L., Basha E., Friedrich K.L., Slingsby C., Vierling E. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein // *Nat Struct Biol.* 2001a. – V. 8. – P. 1025-1030.

327. Van Montfort R., Slingsby C., Vierling E. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones // *Adv Protein Chem.* 2001b. – V. 59. – P. 105-156.

328. Vanderheeren G., Hanssens I., Meijberg W., Van Aerschot A. Thermodynamic characterization of the partially unfolded state of Ca(2+)-loaded bovine alpha-lactalbumin: evidence that partial unfolding can precede Ca²⁺ release // *Biochemistry.* 1996. – V. 35. – P. 16753-16759.

329. Vanhooren A., Vanhee K., Noyelle K., Majer Z., Joniau M., Hanssens I. Structural basis for difference in heat capacity increments for Ca(2+) binding to two alpha-lactalbumins // *Biophys J.* 2002. – V. 82. – P. 407-417.

330. Vanhoudt J., Aertis S., Abgar T., Clauwaert J. Native quaternary structure of bovine alpha-crystallin // *Biochemistry.* 2000. – V. 39. – P. 4483-4492.

331. Verweij H., Dubbelman T.M., Van Steveninck J. Photodynamic protein cross-linking. *Biochim Biophys Acta.* 1981. – V. 647. – P. 87-94.

332. Vetri V., Librizzi F., Leone M., Militello V. Thermal aggregation of bovine serum albumin at different pH: comparison with human serum albumin // *Eur Biophys J.* 2007. – V. 36. – P. 717-725.

333. Vetri V., D'Amico M., Fodera V., Leone M., Ponzoni A., Sberveglieri G., Militello V. Bovine Serum Albumin protofibril-like aggregates formation: Solo but not simple mechanism // *Arch Biochem Biophys.* 2011. – V. 508. – P. 13-24.

334. Vondrášek J., Mason P.E., Heyda J., Collins K.D., Jungwirth P. The molecular origin of like-charge arginine-arginine pairing in water // *J Phys Chem B*. 2009. – V. 113. – P. 9041-9045.
335. Walsh M.T., Sen A.C., Chakrabarti B. Micellar subunit assembly in a three-layer model of oligomeric alpha-crystallin // *J Biol Chem*. 1991. – V. 266. – P. 20079-20084.
336. Wang C. H., Chen W. Raman characterizing disulfide bonds and secondary structure of bovine serum albumin // *XXII INTERNATIONAL CONFERENCE ON RAMAN SPECTROSCOPY*. – AIP Publishing, 2010. – V. 1267. – P. 346-347.
337. Wang K., Spector A. The chaperone activity of bovine alpha crystallin. Interaction with other lens crystallins in native and denatured states // *J Biol Chem*. 1994. – V. 269. – P. 13601-13608.
338. Wang W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals // *Int J Pharm*. 1999. – V. 185. – P. 129-188.
339. Wang W., Roberts C.J. Non-Arrhenius protein aggregation // *AAPS J*. 2013. – V. 15. – P. 840-851.
340. Webb J.L. Enzyme and metabolic inhibitors. – New York: Academic Press, 1963 – V. 1. – P. 1-951.
341. Weinreb O., Van Boekel M.A., Dovrat A., Bloemendal H. Effect of UV-A light on the chaperone-like properties of young and old lens alpha-crystallin // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000. – V. 41. – P. 191-198.
342. Weitz D.A., Huang J.S., Lin M.Y., Sung J. Limits of the fractal dimension for irreversible kinetic aggregation of gold colloids // *Phys Rev Lett*. 1985. – V. 54. – P. 1416-1419.
343. Wen L., Chen Y., Liao J., Zheng X., Yin Z. Preferential interactions between protein and arginine: effects of arginine on tertiary conformational and colloidal stability of protein solution // *Int J Pharm*. 2015. – V. 478. – P. 753-761.
344. Wetzel R., Becker M., Behlke J., Billwitz H., Bohm S., Ebert B., Hamann H., Krumbiegel J., Lassmann G. Temperature behaviour of human serum albumin // *Eur J Biochem*. 1980. – V. 104. – P. 469-478.
345. Wu L.C., Shulman B.A., Peng Z.Y., Kim P.S. Disulfide determinants of calcium-induced packing in alpha-lactalbumin // *Biochemistry*. 1996. – V. 35. – P. 859-863.
346. Xi J., Farjo R., Yoshida S., Kern T.S., Swaroop A., Andley U.P. A comprehensive analysis of the expression of crystallins in mouse retina // *Mol Vis*. 2003. – V. 9. – P. 410-419.
347. Yamasaki M., Yano H., Aoki K. Differential scanning calorimetric studies on bovine serum albumin: I. Effects of pH and ionic strength // *Int J Biol Macromol*. 1990. – V. 12. – P. 263-268.

348. Yaung J., Kannan R., Wawrousek E.F., Spee C., Sreekumar P.G., Hinton D.R. Exacerbation of retinal degeneration in the absence of alpha crystallins in an in vivo model of chemically induced hypoxia // *Exp Eye Res.* 2008. – V. 86. – P. 355-365.
349. Yohannes G., Wiedmer S.K., Elomaa M., Jussila M., Aseyev V., Riekkola M.-L. Thermal aggregation of bovine serum albumin studied by asymmetrical flow field-flow fractionation // *Anal Chim Acta.* 2010. – V. 675. – P. 191-198.
350. Zhang H.M., Lou K., Cao J., Wang Y.Q. Interaction of a hydrophobic-functionalized PAMAM dendrimer with bovine serum albumin: thermodynamic and structural changes // *Langmuir.* 2014. – V. 30. – P. 5536-5544.
351. Zhang Y., Liu X., Liu J. Recombinant human alphaA-crystallin can protect the enzymatic activity of CpUDG against thermal inactivation // *FEBS Lett.* 2005. – V. 579. – P. 2897-2900.
352. Zhao D., Liu Y., Zhang G., Zhang C., Li X., Wang Q., Shi H., Su Z. Interaction of arginine with protein during refolding process probed by amide H/D exchange mass spectrometry and isothermal titration calorimetry // *Biochim Biophys Acta.* 2015. – V. 1854. – P. 39-45.
353. Курганов Б.И. Кинетика тепловой агрегации белков // *Биохимия.* 1998. – Т. 63. – С. 430-432.
354. Любарев А.Е., Курганов Б.И. Изучение необратимой тепловой денатурации белков методом дифференциальной сканирующей калориметрии // *Усп биол хим.* 2000. – Т. 40. – С. 43-84.
355. Маркосян К.А., Курганов Б.И. Фолдинг, неправильный фолдинг и агрегация белков. Образование телец включения и агрегатов // *Биохимия.* 2004. – Т. 69, № 9. – С. 1196-1212.
356. Сердюк И., Заккаи Н., Заккаи Дж. Методы в молекулярной биофизике: структура, функция, динамика. – Москва: КДУ, 2010. – Т.1. – С. 1-542.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность моим научным руководителям д.б.н. Кире Андреевне Маркосян и д.х.н., проф. Борису Ивановичу Курганову за поддержку и неоценимую помощь в работе на всех её этапах, от планирования эксперимента до интерпретации полученных результатов.

Особую благодарность выражаю заведующему лабораторией структурной биохимии белка, д.б.н., проф. Дмитрию Ивановичу Левицкому за помощь при обсуждении результатов и подготовке работы. Выражаю признательность д.б.н. К.О. Муранову за предоставление препаратов интактного, сшитого глутаровым альдегидом и УФ-облученного α -кристаллина и помощь в проведении экспериментов по гель-проникающей хроматографии, к.б.н. С.Ю. Клейменову за помощь в проведении экспериментов по дифференциальной сканирующей калориметрии, обработке и интерпретации данных, д.б.н. Н.А. Чеботаревой за помощь в проведении экспериментов по аналитическому ультрацентрифугированию, обработке и интерпретации данных, к.б.н. В.Ф. Макеевой за помощь в измерении показателя преломления, вязкости и плотности растворов, к.б.н. В.А. Штейн-Марголиной за помощь в проведении электронной микроскопии и обработке электронных микрофотографий, к.б.н. В.В. Шубину за помощь в проведении спектроскопии кругового дихроизма, обработке и интерпретации полученных результатов.

Выражаю благодарность сотрудникам лаборатории структурной биохимии белка за дружественное отношение и полученные знания и опыт практической работы.