Успехи биологической химии, т. 53, 2013, с. 387-414

АНТИАГРЕГАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ШАПЕРОНОВ И ЕЁ КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА

©2013 г.

Б. И. КУРГАНОВ

Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва

I. Введение. II. Определение начальной скорости агрегации белков. III. Оценка антиагрегационной активности белковых шаперонов. IV. Оценка антиагрегационной активности химических шаперонов. V. Соотношение между начальной скоростью агрегации и длительностью лаг-периода. VI. Совместное действие шаперонов. VII. Заключение.

І. ВВЕДЕНИЕ

Пространственная структура белков является довольно лабильной и может зависеть от внешних условий. Стрессовые условия могут вызывать образование развернутых форм белков, проявляющих повышенную склонность к агрегации. В процессе биосинтеза белка в клетке сворачивание вновь синтезируемых полипептидных цепей может сопровождаться образованием ненативных форм белков, склонных к агрегации [1–5]. На клеточном уровне повреждения, связанные с агрегацией белков, носят ограниченный характер и репарируются системой контроля качества белков (protein quality control), включающей шапероны и протеазы [6]. Основная роль в сворачивании белков отводится белкам теплового шока, относящимся к семействам Hsp60 (GroEL у бактерий) и Hsp70 (DnaK у бактерий). Используя энергию гидролиза ATP, Hsp60 и Hsp70 обеспечивают правильное сворачивание вновь синтезируемых полипептидных цепей и корректировку структуры неправильно свернутых белков [6–8].

Принятые сокращения: ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, ОПЦД – 2-оксипропил-β-циклодекстрин, Phb – гликогенфосфорилаза b, sHsp – малый белок теплового шока.

Адрес для корреспонденции: kurganov@inbi.ras.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 11-04-00932-а и Программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

Б.И.Курганов	3
--------------	---

Среди белков теплового шока особое место занимает семейство малых белков теплового шока (sHsp), основной функцией которых является подавление агрегации ненативных форм белков. Представители этого семейства обнаружены практически у всех живых организмов. Характерными признаками данного семейства являются небольшая молекулярная масса мономеров (от 12 до 43 кДа) и склонность к образованию крупных олигомеров с молекулярной массой до 1000 кДа [9–22]. Отличительной чертой sHsp является наличие в их структуре консервативного α-кристаллинового домена. sHsp не способны обеспечить сворачивание полипептидной цепи, однако они образуют комплексы с ненативными формами белков и могут либо передавать последние на АТР-зависимые шапероны, либо переносить их в протеасомы, где происходит протеолитическая деградация развернутых белков [23-27]. Олигомеры sHsp представляют собой структуры, обладающие высокой подвижностью. Экспериментально продемонстрирована высокая скорость обмена субъединиц между олигомерами sHsp [28-34].

Комплексы sHsp с белковыми субстратами характеризуются высокой степенью полидисперсности [35, 36]. Это обстоятельство затрудняет исследование структуры комплексов. Возникающие трудности были преодолены благодаря использованию масс-спектрометрии высокого разрешения [37]. Например, исследуя взаимодействие Hsp18.1 с люциферазой, денатурированной при 42 °C, методом тандемной масс-спектрометрии, Бенеш с соавторами [38] обнаружили более 300 комплексов Hsp–белковый субстрат с различной стехиометрией. Подобные комплексы не являются статическими структурами и способны включать дополнительные количества белкового субстрата [35, 36, 38]. Более того, субъединицы Hsp сохраняют способность к обмену со свободными олигомерами Hsp и комплексами Hsp–белковый субстрат. Напротив, белковый субстрат, входящий в состав комплекса, по-видимому, не способен к переносу из одного комплекса в другой [36].

Антиагрегационной активностью обладают не только малые белки теплового шока, но и белки теплового шока, построенные из субъединиц более крупного размера. Например, в работах [39–46] была продемонстрирована антиагрегационная активность GroEL – представителя семейства белков теплового шока Hsp60. Молекула GroEL представляет собой полый цилиндр, состоящий из 14 идентичных субъединиц с молекулярной массой 57 кДа. Входящие в состав молекулы субъединицы образуют два семичленных кольца, расположенных вплотную к друг другу [47]. Согласно общепринятой точке

зрения фолдинг ненативных форм белка происходит в полости кольца молекулы GroEL с участием кошаперонина GroES, выполняющего роль «крышечки», и включает гидролиз АТР [48–50].

Альтернативный механизм шаперонной активности GroEL был предложен Марченковым и Семисотновым [51]. Предполагается, что сворачивание полипептидной цепи происходит в растворе, т.е. вне комплекса с шаперонином, а роль шаперонина состоит в том, чтобы, связывая ненативные формы белков, снизить вероятность агрегации последних.

Наличие антиагрегационной активности обнаружено также у Hsp90 – белка теплового шока, участвующего в сворачивании полипептидных цепей и в деградации белков; молекула Hsp90 представляет собой димер, состоящий из идентичных субъединиц с молекулярной массой 90 кДа [52–57].

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что осмолиты стабилизируют белковую структуру и снижают скорость разворачивания белка при денатурирующих воздействиях [58–64]. К осмолитам относятся соединения различной химической природы, такие как аминокислоты (пролин, аланин, глутаминовая кислота и др.), триметиламины (триметиламин-N-оксид, бетаин и др.) и углеводы (глицерин, трегалоза, сорбитол, маннитол и др.). В опытах по рефолдингу белков показано, что осмолиты повышают выход нативного белка, т.е. действуют как молекулярные шапероны. Это дало основание называть осмолиты «химическими шаперонами» [65-69]. Шаперонную функцию осмолитов объясняют их способностью подавлять агрегацию развернутых форм белков в результате взаимодействия с гидрофобными участками на поверхности белковых молекул. Антиагрегационная активность осмолитов достаточно хорошо изучена с использованием соответствующих тест-систем, основанных на агрегации белковых субстратов [70-76].

К природным агентам, проявляющим антиагрегационную активность, принадлежат также циклодекстрины – циклические олигомеры глюкозы [77–84]. В составе циклодекстринов остатки D-(+)-глюкопиранозы объединены в макроциклы α-D-1,4-гликозидными связями. Структура молекулы β-циклодекстрина, состоящей из семи глюкопиранозных звеньев, представлена на рис. 1А. β-Циклодекстрин обладает относительно низкой растворимостью в воде. Повышение растворимости β-циклодекстрина может быть достигнуть путем его химической модификации. Одним из производных β-циклодекстрина с повышенной растворимостью является 2-оксипропил-β-циклодекстрин, структура которого представлена на рис. 1Б. Все гидроксиль-





Рис. 1. Структуры β-циклодекстрина (A) и 2-оксипропил-β-циклодекстрина (Б). Полость молекулы циклодекстрина имеет диаметр ~0,7 нм и глубину ~0,8 нм.

ные группы в циклодекстринах находятся на внешней поверхности молекулы. Поэтому внутренняя полость циклодекстринов является гидрофобной и способна образовывать в водных растворах комплексы включения с другими молекулами органической и неорганической природы. Наличие антиагрегационных свойств у циклодекстринов объясняют их способностью образовывать комплексы включения с экспонированными ароматическими боковыми группами развернутых полипептидных цепей, в результате чего происходит блокирование агрегации последних.

Агенты, обладающие шапероноподобной (антиагрегационной) активностью, находят применение в биотехнологии и медицине. Для того чтобы проводить отбор соединений, проявляющих высокую эффективность как защитные агенты, исследователь должен иметь в распоряжении методы строгой количественной оценки антиагрегационной активности изучаемых соединений.

II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЧАЛЬНОЙ СКОРОСТИ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ

Для того чтобы охарактеризовать антиагрегационную активность шаперона, мы должны измерить начальную скорость агрегации модельного белкового субстрата и сопоставить эту скорость с соответствующей величиной, измеренной в отсутствие шаперона. Белковые агрегаты обладают более высокой способностью рассеивать падающий свет по сравнению с неагрегированными белковыми молекулами. Поэтому простейший способ измерения начальной скорости агрегации состоит в регистрации прироста интенсивности светорассеяния (*I*) или кажущейся оптической плотности (*A*) в области длин волн, где отсутствует поглощение белка. На ранних стадиях наблюдается ускорение агрегации, которое, как полагают, обусловлено наличием стадии нуклеации. Для того чтобы охарактеризовать начальную скорость агрегации, мы предложили использовать квадратичную временную зависимость для описания начальных участков кинетических кривых агрегации [85]:

$$I = I_0 + K_{agg}(t - t_0)^2, \qquad (t > t_0)$$
(1)

или

$$A = A_0 + K_{aog}(t - t_0)^2, \qquad (t > t_0)$$
(2)

где I_0 и A_0 – начальные значения интенсивности светорассеяния и кажущегося поглощения соответственно, t – время и t_0 – длительность лаг-периода на кинетической кривой (момент времени, при котором наблюдается начальный прирост интенсивности светорассеяния или кажущегося поглощения). Константа K_{agg} может рассматриваться как мера начальной скорости агрегации. Теоретический анализ показывает, что квадратичный закон должен выполняться для агрегации, включающей стадию нуклеации [85, 86].

Применимость уравнения (1) для описания начальных участков кинетических кривых агрегации была продемонстрирована нами для тепловой агрегации гликогенфосфорилазы *b* (Ph*b*; КФ 2.4.1.1) [46, 85, 87, 88], глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД; КФ 1.2.1.12) [84, 89–90] и креатинкиназы (КФ 2.7.3.2) [83] из скелетных мышц кролика и индуцированной дитиотреитолом агрегации α-лактальбумина [91] и инсулина [92].

На рис. 2 показана применимость уравнения (2) для описания начального участка кинетической кривой агрегации на примере агрегации S1 головок миозина (0,5 мг/мл), изученной в работе [93].





Рис. 2. Использование параметра K_{agg} для характеристики начальной скорости агрегации.

График зависимости кажущегося оптического поглощения при 360 нм (A_{360}) от времени для агрегации S1 головок миозина (0,5 мг/мл) построен на основании данных, представленных в работе [93]. Условия: 43 °C, 30 мМ Нереs-буфер, рН 7,3, содержащий 1 мМ MgCl₂ и 100 мМ КСl. Точки – экспериментальные данные. Сплошная кривая проведена с помощью уравнения (2) при $K_{agg} = 5,41 \times 10^{-4}$ ед. оптической плотности×мин⁻² и $t_0 = 1,0$ мин.

Параметры уравнения (2) найдены равными: $K_{agg} = (5,41 \pm 0,04) \times 10^{-4}$ ед. оптической плотности × мин⁻² и $t_0 = 1,0 \pm 0,1$ мин (43 °C). Отметим, что одним из достоинств тест-системы, основанной на агрегации S1 головок миозина, является возможность изучения антиагрегационной активности шаперонов при температурах, близких к физиологическим.

Практическая ценность уравнений (1) и (2) состоит в следующем. Во-первых, добавление шаперона обычно приводит к увеличению длительности лаг-периода на кинетических кривых агрегации, и использование уравнений (1) и (2) позволяет надежно определить изменение длительности лаг-периода. Заметим, что визуальное определение длительности лаг-периода на кинетических кривых практически невозможно. Во-вторых, определение параметра K_{agg} дает возможность количественно охарактеризовать антиагрегационную активность шаперона.

Рассмотрим различные модификации уравнений (1) и (2). Во-первых, мы можем расширить временной интервал, используемый для

расчета параметров t_0 и K_{agg} , если проведем следующую модификацию этих уравнений:

$$I = I_0 + \frac{K_{agg} \left\{ \exp[K(t - t_0)^2] - 1 \right\}}{K}$$
(3)

или

$$A = A_0 + \frac{K_{\text{agg}} \left\{ \exp[K(t - t_0)^2] - 1 \right\}}{K}, \qquad (4)$$

где K – константа, которая учитывает отклонение от квадратичной зависимости. Важно подчеркнуть, что при $t \rightarrow t_0$ уравнения (3) и (4) трансформируются в уравнения (1) и (2) соответственно.

Во-вторых, необходимо иметь в виду, что в некоторых случаях на начальных участках кинетических кривых агрегации белкового субстрата, регистрируемых в присутствии шаперона, а именно α -кристаллина (представителя семейства sHsp), наблюдается снижение интенсивности светорассеяния (или кажущейся оптической плотности). Подобное кинетическое поведение продемонстрировано, например, при изучении влияния α -кристаллина на скорость тепловой агрегации цитратсинтазы (КФ 2.3.3.1) при 43 °C [94] и β-амилоидного пептида при 60 °C [95]. Существует простое объяснение необычного характера кинетических кривых агрегации. Повышенные температуры вызывают диссоциацию частиц α -кристаллина и снижение интенсивности светорассеяния. Это заключение подтверждается экспериментальными данными, полученными в наших работах [45, 96–98].

Если на начальном участке кинетических кривых агрегации наблюдается снижение интенсивности светорассеяния (или кажущейся оптической плотности), надежное определение начального значения интенсивности светорассеяния I_0 (или величины A_0) становится невозможным, и, таким образом, уравнения (1) и (2) не могут быть использованы для определения начальной скорости агрегации. В этом случае полезными оказываются дифференциальные формы уравнений (1) и (2):

$$dI/dt = 2K_{agg}(t - t_0), \qquad (t > t_0)$$
(5)

или

$$dA/dt = 2K_{agg}(t - t_0). \qquad (t > t_0)$$
(6)

Анализ зависимости начальной скорости агрегации от начальной концентрации белкового субстрата, [P], позволяет определить поря-

<i>D.</i> И. <i>Кургинов</i>

док агрегации по белку и сделать заключение о скорость-лимитирующей стадии процесса агрегации. Порядок агрегации по белку (*n*) рассчитывается в соответствии со следующим уравнением:

 $K_{\text{agg}} = \text{const} \times [P]_0^n. \tag{7}$

Как будет ясно из последующего изложения, знание величины *n* важно для количественной оценки антиагрегационной активности шаперонов белковой природы.

Для тепловой агрегации Phb (53 °C; pH 6.8) [85] и ГАФД (45 °C; pH 7.5) [84] зависимость параметра K_{agg} от начальной концентрации белка является линейной (n = 1). Кинетика тепловой агрегации глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2) из печени быка при различных концентрациях белка была изучена в работе [99] (50 °C; pH 8.0). Согласно нашим расчетам порядок агрегации по белку, рассчитанный на основании этих кинетических данных, близок к единице: $n = 0,86 \pm 0,1$. Ситуация, когда n = 1, означает, что разворачивание белковой молекулы протекает с существенно более низкой скоростью, чем последующие стадии агрегации развернутых белковых молекул.

В том случае, когда разворачивание белковой молекулы является относительно быстрым процессом, параметр *n* превышает единицу. Например, анализ кинетических данных по тепловой агрегации $\beta_{\rm L}$ -кристаллина из хрусталика глаз быка при 60 °C (pH 6.8) [100] и тепловой агрегации дрожжевой алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1) при 56 °C (pH 7.4) [101] показывает, что параметр *n* близок к 2. Аналогичная ситуация наблюдалась для агрегации УФ-облученной ГАФД (37 °C; pH 7,5; $n = 2, 1 \pm 0, 2$) [84]. При агрегации α -лактальбумина и инсулина, индуцированной дитиотреитолом, получены значения *n*, заметно превышающие 2. Для агрегации α -лактальбумина [91] величина составляла 5,9 ± 0,4 (при 37 °C), а для агрегации инсулина [92] $n = 8, 2 \pm 0, 5$ (при 25 °C). Отметим, что для расчета величины *n* мы использовали логарифмические координаты {log[P]₀; log(K_{agg} }. В качестве примера на рис. 3 представлен расчет величины *n* для α -лактальбумина.

Интересно отметить, что уравнение, эквивалентное уравнению (1), было использовано нами для описания начальных участков кинетических кривых агрегации в экспериментах, в которых температура повышалась с постоянной скоростью [102]:

$$I = I_0 + K_{agg} (T - T_0)^2 (T > T_0)$$
(8)

где T_0 – начальная температура агрегации, т.е. температура, при которой наблюдается начальный прирост интенсивности светорассеяния, и K_{agg} – параметр, который характеризует скорость агрегации.





395

Рис. 3. Расчет порядка по белку (n) для агрегации белкового субстрата.

График зависимости начальной скорости агрегации α -лактальбумина от концентрации белка, построенный на основании данных, представленных в работе [91]. График представлен в логарифмических координатах. В качестве начальной скорости агрегации α -лактальбумина использована величина K_{agg} с размерностью (фотоотсчет/с)×мин⁻². Размерность концентрации α -лактальбумина – мг/мл. Условия: 37 °C, 20 мМ дитиотреитол, 50 мМ Na-фосфатный буфер, pH 6,8, содержащий 0,15 M NaCl и 1 мМ ЭГТА.

Параметры T_0 и K_{agg} могут быть использованы для количественной оценки способности различных агентов подавлять агрегацию белков. Применимость уравнения (8) была продемонстрирована для агрегации Phb, ГАФД, креатинкиназы и глутаматдегидрогеназы.

В соответствии с теоретическими представлениями о механизме агрегации белков, выдвинутыми Кургановым с соавторами [100, 102–104], момент времени $t = t_0$ (или температура $T = T_0$) соответствует появлению стартовых агрегатов. Стартовые агрегаты содержат сотни денатурированных молекул белка. Образование стартовых агрегатов протекает по принципу все-или-ничего. Не обнаружено образования интермедиатов, имеющих размеры, промежуточные между размерами неагрегированного белка и размерами стартовых агрегатов.

Для полноты картины обсудим дополнительные методы определения начальной скорости агрегации. При анализе кинетических кривых агрегации Phb, денатурированной УФ-излучением [105], мы показали, что уравнение (1) оказывается непригодным. Для харак-

Б.И.Курганов

теристики начальной скорости агрегации был использован интервал времени (t_{21}) , на протяжении которого интенсивность светорассеяния возрастает от начального значения I_0 до значения $2I_0$. Чтобы оценить значение t_{21} , для описания начальных участков кинетических кривых использовали растянутую экспоненту:

$$I = I_0 \exp\left\{ (\ln 2) \left(\frac{t}{t_{21}} \right)^m \right\},\tag{9}$$

где *т* – константа.

Проведенный нами анализ кинетики агрегации УФ-облученной Phb показывает, что для описания начальных участок кинетических кривых может быть использована простая экспонента:

$$I = I_0 \{ 1 + K[\exp(K_1 t) - 1] \},$$
(10)

где *K* и K_1 – константы. Это уравнение может быть трансформировано в уравнение, содержащее параметр t_{21} [106]:

$$I = I_0 \left\{ 1 + K \left[\exp\left(\frac{t}{t_{2I}} \ln\left\{\frac{(1+K)}{K}\right\}\right) - 1 \right] \right\}.$$
 (11)

Как видно из рис. 4, это уравнение удовлетворительно описывает начальный участок кинетической агрегации УФ-облученной Phb (0,15 мг/мл) при 37 С. Параметры уравнения (11) найдены равными: $t_{21} = 1,44 \pm 0,02$ мин и $K = 0,50 \pm 0,03$.

Следует отметить, что в тест-системе, основанной на агрегации УФ-облученной Phb, в отличие от тест-системы, основанной на тепловой агрегации белков, отсутствует стадия разворачивания белковой молекулы. Молекулы Phb, денатурированной УФ-излучением, образуют первичные агрегаты с гидродинамическим радиусом, равным 10,4 нм [107].

Существует еще один способ оценки начальной скорости агрегации. Проведенный нами анализ экспериментальных данных по кинетике агрегации белков показал, что при значениях времени, превышающих момент времени, соответствующий точке перегиба на кинетической кривой, зависимость *I* или *A* от времени подчиняется экспоненциальному закону [108–112]:

$$I = I_0 + (I_{\lim} - I_0) \{1 - \exp[-k_1(t - t^*)]\}$$
(12)

ИЛИ





Рис. 4. Использование обратного значения параметра *t*₂₁ для характеристики начальной скорости агрегации.

График зависимости интенсивности светорассеяния (*I*) от времени для агрегации УФ-облученной Phb (0,15 мг/мл) построен на основании данных, представленных в работе [105]. Условия: 37 °C, 80 мМ Нерез-буфер, pH 6,8, содержащий 100 мМ NaCl. Точки – экспериментальные данные. Сплошная кривая проведена с помощью уравнения (11) при $t_{21} = 1,44$ мин и K = 0,50.

$$A = A_0 + (A_{\lim} - A_0) \{1 - \exp[-k_1(t - t^*)]\},$$
(13)

где I_{lim} и A_{lim} – предельные значения I и A, соответственно, при $t \to \infty$, k_1 – константа скорости реакции первого порядка и t^* – длина отрезка, отсекаемого теоретической кривой, рассчитанной с помощью уравнения (12) или уравнения (13), на горизонтальной линии, соответствующей начальному значению I или A ($I = I_0$ или $A = A_0$). Наклон касательной к теоретической кривой, проходящей через точку с координатами { $t = t^*; I = I_0$ } или { $t = t^*; A = A_0$ } равен произведению $k_1(I_{\text{lim}} - I_0)$ или $k_1(A_{\text{lim}} - A_0)$. Этот наклон является мерой начальной скорости агрегации.

Следует отметить, что лаг-период на кинетических кривых агрегации может отсутствовать, что делает невозможным использование уравнений (1) и (2). В такой ситуации характеристика начальной скорости агрегации с помощью произведения $k_{\rm I}(I_{\rm lim} - I_0)$ или $k_{\rm I}(A_{\rm lim} - A_0)$ становится оправданной. В качестве примера можно указать на анализ кинетики агрегации белка оболочки вируса табачной мозаики, проведенный нами в работе (52 °C; pH 8.0) [113, 114].

Б.И.Курганов

Для определения порядка агрегации по белку может быть использовано уравнение, аналогичное уравнению (7):

$$k_{\mathrm{I}}(I_{\mathrm{lim}} - I_0) = \mathrm{const} \times [\mathrm{P}]_0^{\ n}. \tag{14}$$

или

$$k_{\rm I}(A_{\rm lim} - A_0) = {\rm const} \times [{\rm P}]_0^n.$$
(15)

Для тепловой агрегации люциферазы (КФ 1.13.12.7) светлячков [112] и белка оболочки вируса табачной мозаики [113, 114] значение параметра n найдено равным 2. Это означает, что скорость-лимитирующей стадией процесса агрегации является стадия агрегации. Отметим, что первый порядок по белку (n = 1) наблюдался для тепловой агрегации креатинкиназы из скелетных мышц кролика [115] и агрегации, сопровождающей ренатурацию предварительно денатурированной карбоангидразы (КФ 4.2.1.1) [116]. Таким образом, скорость-лимитирующей стадия (разворачивание белковой молекулы в случае креатинкиназы или начальная стадия сворачивания белка в случае карбоангидразы).

III. ОЦЕНКА АНТИАГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛКОВЫХ ШАПЕРОНОВ

При анализе зависимости начальной скорости агрегации (v) от концентрации шаперона белковой природы необходимо учитывать следующие два обстоятельства. Во-первых, связывание белкового субстрата с шапероном является достаточно прочным. Значения констант диссоциации для комплекса шаперон–белковый субстрат по порядку величины составляют несколько нмолей на л (см., например, [117]). Эксперименты по подавлению агрегации белкового субстрата проводятся обычно в условиях, когда начальные концентрации шаперона и белкового субстрата превышают существенно величину константы диссоциации для комплекса шаперон–белковый субстрат. Это означает, что зависимость начальной скорости агрегации от концентрации шаперона представляет собой кривую титрования, которая в определенных случаях дает информацию о стехиометрии комплекса шаперон–белковый субстрат.

Во-вторых, в соответствии с уравнением (7) концентрация белка $[P]_0$ пропорциональная $v^{1/n}$. Это означает, что снижение концентрации белкового субстрата (например, в результате комплексообразования с субстратом) должно приводить к пропорциональному снижению величины $v^{1/n}$. Таким образом, для анализа антиагрегационной активности шаперона следует использовать координаты { $v^{1/n}$; [шапе-

рон]}. Величина относительной начальной скорости агрегации v/v_0 определяется отношением концентраций шаперона и белкового субстрата. В идеальном случае зависимость $(v/v_0)^{1/n}$ от отношения [шаперон]/[белковый субстрат] представляет собой прямую линию (рис. 5А). Величина отрезка, отсекаемого прямой линии на оси абсцисс, (S_0) дает стехиометрию комплекса шаперон–белковый субстрат. Величина S_0 рассчитывается в соответствии со следующим уравнением:

$$\left(\frac{v}{v_0}\right)^{1/n} = 1 - \frac{x}{S_0},\tag{16}$$

где х представляет собой отношение [шаперон]/[белковый субстрат].

При расчете стехиометрии комплекса подобным способом мы допускаем, что весь белковый субстрат находится в форме, способной связываться с шапероном. Однако, если используется тест-система, основанная на тепловой агрегации белка, исходная (нативная) форма субстрата не связывается с шапероном, а накопление развернутой формы белка, взаимодействующей с шапероном, происходит во времени. Таким образом, имеется неопределенность в определении концентрации белкового субстрата. В подобной ситуации мы предлагаем называть стехиометрию комплекса, определяемую из отрезка, отсекаемого на оси абсцисс, кажущейся стехиометрией (S_{0.app}). Важно, что величина S_{0,арр} может быть использована для количественной оценки антиагрегационной активности шаперона. При работе с одной и той же тест-системой мы можем использовать параметр S_{0 app} для сравнительного анализа антиагрегационной активности различных шаперонов (например, для анализа защитного действия малых белков теплового шока дикого типа и их мутантных форм, защитного действия интактного шаперона и его химически модифицированных форм).

Рассмотрим зависимость начальной скорости агрегации УФ-облученной Phb от концентрации α -кристаллина, полученную в работе Роман и др. [105] (37 °C; pH 6.8). Для расчета начальной скорости агрегации v было использовано уравнение (9). Важно отметить, что в качестве белкового субстрата использовалась Phb, полностью денатурированная УФ-облучением. Из начального участка зависимости v от концентрации α -кристаллина определена величина S_0 : $S_0 = 1.53 \pm 0.15$ молей субъединиц α -кристаллина на 1 субъединицу Phb. Интересно отметить, что при достаточно высоких концентрациях α -кристаллина наблюдаются отклонения от линейности. Можно полагать, что сложный характер зависимости начальной скорости агрегации от





Рис. 5. Подавление агрегации белкового субстрата шапероном белковой природы.

Зависимости относительной начальной скорости агрегации $(v/v_0)^{1/n}$ от отношения концентраций шаперона и белкового субстрата. Обозначения: v_0 и v – начальная скорость агрегации в отсутствие и в присутствии шаперона соответственно; n – показатель степени при концентрации белка в уравнении (7); x = [шаперон]/[белковый субстрат]; S – стехиометрия комплекса шаперон–белковый субстрат.

А — образование комплекса шаперон
—белковый субстрат с постоянной стехиометрие
й $S_{\scriptscriptstyle 0}$

Б – случай, когда стехиометрия комплекса шаперон–белковый субстрат изменяется при варьировании отношения [шаперон]/[белковый субстрат] в интервале значений x от x_1 до x_2 .

концентрации α-кристаллина обусловлен динамической структурой α-кристаллина, и начальный участок этой зависимости соответствует образованию комплексов белкового субстрата с диссоциированными формами α-кристаллина. Для второго, более пологого участка зависимости v от концентрации α-кристаллина характерно образование комплексов α-кристаллин–белковый субстрат со сниженной адсорбционной емкостью α-кристаллина по отношению к белковому субстрату. Заметим, что адсорбционная емкость рассчитывается как обратное значение величины S.

В том случае, когда зависимость начальной скорости агрегации от отношения [шаперон]/[белковый субстрат] обнаруживает отклонения от линейности, для оценки стехиометрии комплекса шаперон–белковый субстрат может быть использован следующий подход. Рассмотрим, например, случай, когда начальный линейный участок зависимости начальной скорости агрегации от величины x = [шаперон]/[белковый субстрат] сменяется более пологим участком при $x > x_1$, и этот пологий участок описывается гиперболической зависимостью в интервале значений x от x_1 до x_2 (см. рис. 5Б):

$$Y = \frac{Y_0}{1 + x / x_{0.5}}, \qquad (x_1 < x < x_2) \tag{17}$$

где через *Y* обозначена величина $(v/v_0)^{1/n}$, Y_0 – значение *Y* при x = 0 и $x_{0.5}$ – значение *x*, при котором $Y = Y_0/2$. Выберем некоторую точку в интервале между x_1 и x_2 . Из рис. 5Б видно, что наклон к теоретической кривой в точке с координатами {*x*; *Y*} связан со стехиометрией комплекса шаперон–белковый субстрат следующим соотношением:

наклон =
$$\frac{\mathrm{d}Y}{\mathrm{d}x} = \frac{Y}{(x-S)}$$
 (18)

Отсюда следует, что

$$S = x - \frac{Y}{\mathrm{d}Y/\mathrm{d}x} \,. \tag{19}$$

Производная d*Y*/dx рассчитывается из уравнения (17):

$$\frac{\mathrm{d}Y}{\mathrm{d}x} = -\frac{Y_0}{\left(1 + x/x_{0.5}\right)^2 x_{0.5}} \,. \tag{20}$$

Б.И.Курганов

Подстановка dY/dx в уравнение (19) дает выражение для расчета стехиометрии комплекса шаперон–белковый субстрат при определенном значении *x* в интервале $x_1 < x < x_2$:

$$S = (x_{0.5} + 2x). \qquad (x_1 < x < x_2) \tag{21}$$

Таким образом, в интервале значений *x* от x_1 до x_2 величина *S* растет от $(x_{0.5} + 2x_1)$ до $(x_{0.5} + 2x_2)$. Что касается начального участка зависимости $(v/v_0)^{1/n}$ от отношения [шаперон]/[белковый субстрат] (область значений *x* при $x < x_1$), стехиометрия комплекса постоянна и равна S_0 .

В работах [118–120] для количественной оценки шапероноподобной активности цельного казеина и β -казеина использовали произведение $k_r A_{lim}$. Интересно отметить, что график зависимости величины $k_r A_{lim}$ от концентрации цельного казеина для подавления агрегации, сопровождающей ренатурацию предварительно денатурированной карбоангидразы, цельным казеином, состоит из двух линейных участков [118].

Экспериментальные данные по подавлению тепловой агрегации каталитической субъединицы протеинкиназы СК2 (СК2 α) при 40 °C С-концевым доменом регулируемого глюкозой белка (glucose-regulated protein; grp94-CT), полученные Итарте с соавторами [121], были проанализированы Кургановым в работе [109]. Для расчета начальной скорости агрегации было использовано произведение $k_1 I_{lim}$. При этом был обнаружен линейный характер зависимости $k_1 A_{lim}$ от молярного отношения [grp94-CT]/[СК2 α]. Из отрезка, отсекаемого прямой линией на оси абсцисс, рассчитана стехиометрия комплекса grp94-CT–СК2 α : 4 молекулы grp94-CT на 1 молекулу СК2 α .

Отметим, что некоторые исследователи для характеристики антиагрегационной активности белковых шаперонов (α -кристаллина и др.) используют графики зависимости {степень защитного действия; концентрация шаперона}. Степень защитного действия (P) рассчитывается из кинетической кривой агрегации:

$$P = (A_0 - A)/A_0, (22)$$

где A_0 и A – значения кажущейся оптической плотности в отсутствие и в присутствии шаперона, соответственно, при t = 1 ч. Вместо значений кажущейся оптической плотности могут, очевидно, использоваться значения интенсивности светорассеяния. Описанный прием использовался, например, в работах [122–125]. К подобным оценкам антиагрегационной активности белковых шаперонов следует относиться с известной осторожностью, поскольку значения A_0 и A относятся, как правило, к различным участкам кинетических кривых агрегации. Величина A_0 может соответствовать области предельных

значений кажущейся оптической плотности, а величина *А* – начальному участку кинетической кривой.

IV. ОЦЕНКА АНТИАГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ ШАПЕРОНОВ

Защитное действие химических шаперонов выражается в снижении начальной скорости агрегации белкового субстрата (v) в присутствии химического шаперона. В простейшем случае зависимость v от концентрации шаперона (L) является гиперболической:

$$v = \frac{v_0}{1 + [L]/K_d},$$
(23)

где v_0 – начальная скорость агрегации в отсутствие шаперона и K_d – константа диссоциации. Это уравнение было использовано, например, Вилкеном и др. [126] при анализе подавления лекарственными агентами агрегации мутанта белка p53 (37 °C; pH 7.2). Начальную скорость агрегации рассчитывали с помощью уравнения (1). Аналогичная гиперболическая зависимость начальной скорости агрегации белкового субстрата от концентрации химического шаперона наблюдается при подавлении тепловой агрегации Phb пролином при 48 °C [87] (см. рис. 6). Константа K_d рассчитана равной 0,13 ± 0,01 М.

При изучении подавления агрегации УФ-облученной ГАФД химическим шапероном 2-оксипропил-β-циклодекстрином (ОПЦД) [84] мы показали, что зависимость начальной скорости агрегации (*v*), выраженной параметром *K*_{agg}, от концентрации химического шаперона описывается уравнением Хилла, широко используемым в энзимологии (см. [127]):

$$v = \frac{v_0}{1 + ([L]/[L]_{0.5})^h},$$
(24)

где $[L]_{0.5}$ – концентрация полунасыщения, т.е. концентрация шаперона, при которой $v/v_0 = 0.5$, и h – коэффициент Хилла. Для подавления агрегации УФ-облученной ГАФД 2-оксипропил- β -циклодекстрином были получены следующие значения параметров: $[L]_{0.5} = 11 \pm 1$ мМ и $h = 1.8 \pm 0.2$ (37 °C). Значения коэффициента Хилла, превышающие единицу, указывают на существование положительных кооперативных взаимодействий между шаперон-связывающими центрами в молекуле белкового субстрата [127]. Параметр $[L]_{0.5}$ может рассмат-





Рис. 6. Подавление агрегации белкового субстрата химическим шапероном.

Зависимость относительной начальной скорости агрегации ($K_{agg}/K_{agg,0}$) Phb (0,3 мг/мл) от концентрации пролина (48 °C; 0,08 М Нерез-буфер, PH 6,8, содержащий 0,1 М NaCl). График зависимости $K_{agg}/K_{agg,0}$ от концентрации пролина построен на основании данных, представленных в работе [87]. Точки – экспериментальные данные. Сплошная кривая проведена с помощью уравнения (23) при $K_d = 0,13 \pm 0,1$ М.

риваться как характеристика сродства шаперона к белковому субстрату. Чем ниже величина [L]_{0,5}, тем выше сродство шаперона к белковому субстрату. Важно подчеркнуть, что форма зависимости начальной скорости от концентрации химического шаперона должна оставаться неизменной при варьировании концентрации белкового субстрата. Подобная картина наблюдалась, например, для кривых зависимости начальной скорости агрегации УФ-облученной Phb от концентрации пролина [105]. Для подавления агрегации УФ-облученной Phb пролином были получены следующие значения параметров уравнения (24): $[L]_{0.5} = 0.19 \pm 0.01$ М и $h = 1.6 \pm 0.1$ (37 °С). Отметим, что в обоих случаях в качестве белкового субстрата использовался УФ-облученный белок – ГАФД [84] или Phb [105]). Тест-системы подобного типа позволяют регистрировать эффект химического шаперона непосредственно на стадии агрегации белкового субстрата. В обычно используемых тест-системах, например, в тест-системах, основанных на тепловой агрегации белков, общий эффект химического шаперона включает воздействие шаперона на стадию агрегации и воздействие шаперона на стадии, предшествующие стадии агрегации (см., например, [87-90]).

V. СООТНОШЕНИЕ МЕЖДУ НАЧАЛЬНОЙ СКОРОСТЬЮ АГРЕГАЦИИ И ДЛИТЕЛЬНОСТЬЮ ЛАГ-ПЕРИОДА

Анализируя соотношение между длительностью лаг-периода (t_0) и скоростью роста амилоидоподобных структур (k_g) , Фендрих [128] пришел к заключению, что величина k_g пропорциональна обратному значению t_0 :

 $k_{\rm g} = \alpha/t_0, \tag{25}$

где α – константа. По мнению Фендриха, наблюдаемый закон означает, что существует кинетическая корреляция между эффективностью образования ядра (зародыша) и скоростью роста агрегата. Представляло интерес выяснить, насколько универсальным является уравнение (25) и выполняется ли оно в случае агрегации, приводящей к образованию аморфных агрегатов.

Отметим прежде всего, что наличие количественных методов, позволяющих надежно определять на кинетических кривых агрегации такие характеристики, как лаг-период и начальная скорость агрегации, позволяет более строго подойти к проблеме существования определенного соотношения между длительностью лаг-периода и начальной скоростью агрегации. Анализ литературных данных по кинетике тепловой и дитиотреитол-индуцируемой агрегации белков показывает, что, как правило, существует нижний предел для значений t_0 . Обсудим, например, кинетику агрегации дитиотреитол-индуцируемой агрегации α-лактальбумина. С увеличением концентрации α-лактальбумина длительность лаг-периода уменьшается и при достаточно высоких концентрациях белка достигает предельного значения, равного 11,6 мин (рис. 7). Соотношение между начальной скоростью агрегации, определяемой величиной параметра K_{agg} , и длительностью лаг-периода (величиной параметра t_0) показано на вставке на рис. 7. Величина K_{agg} растет с увеличением концентрации белка по закону, определяе мому уравнением (7) с n = 5,9. Как видно из рисунка на вставке, предлагаемая Фендрихом обратная пропорциональность скорости агрегации и длительности лаг-периода не выполняется, и все значения K_{agg} располагаются при $t_0 > 11,6$ мин. Существование нижнего предела для длительности лагпериода обусловлено, по-видимому, кинетическими особенностями стадии нуклеации.

Нижний предел для значений *t*₀ может проявиться и изучении влияния химических шаперонов на скорость агрегации белковых субстратов. В работе [90] мы наблюдали ускорение агрегации ГФАД





Рис. 7. Анализ соотношения между начальной скоростью агрегации и длительностью лаг-периода.

Кинетические характеристики агрегации α -лактальбумина, индуцируемой дитиотреитолом (37 °C, 20 мМ дитиотреитол, 50 мМ Na-фосфатный буфер, pH 6,8, содержащий 0,15 М NaCl и 1 мМ ЭГТА). График зависимости длительности лаг-периода t_0 от концентрации α -лактальбумина, построенный на основании данных, представленных в работе [91]. На вставке показано соотношение между параметрами $K_{\text{авд}}$ и t_0 .

при 45 °C (10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,5, содержащий 0,1 M NaCl) в присутствии ОПЦД, что позволяет говорить об «антишаперонной активности» ОПЦД. Причиной повышения скорости агрегации ГФАД является дестабилизирующее действие этого агента, что подтверждается данными дифференциальной сканирующей калориметрии. Обнаружено, что длительность лаг-периода с ростом концентрации ОПЦД снижается от $t_0 = 3,0$ мин (величина, измеренная в отсутствие ОПЦД) до $t_0 = 1,6$ мин при достаточно высоких концентрациях ОПЦД.

VI. СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ШАПЕРОНОВ

Защитное действие шаперонов белковой природы может модулироваться в присутствии низкомолекулярных химических шаперонов. Например, в работах [129–131] было показано, шапероноподобная активность α-кристаллина увеличивается в присутствии аргинина. Предполагается, что подобное действие аргинина связано с увеличением подвижности четвертичной структуры частиц α-кристаллина [130].

Поскольку в общем случае каждый из шаперонов (белковый шаперон или химический шаперон) оказывает влияние на скорость агрегации белкового субстрата, для характеристики совместного действия шаперонов должны использоваться строгие количественные методы. Для этих целей может быть использован параметр *j*, предложенный нами для анализа совместного действия ингибиторов [132]:

$$j = \frac{i_{1,2}}{1 - (1 - i_1)(1 - i_2)}.$$
(26)

В этом уравнении *i* – степень ингибирования: $i_1 = 1 - v_1/v_0$ для ингибитора 1, $i_2 = 1 - v_2/v_0$ для ингибитора 2 и $i_{1,2} = 1 - v_{1,2}/v_0$ для смеси ингибитор 1 + ингибитор 2 (v_0 – начальная скорость агрегации в отсутствие ингибиторов, v_1 , v_2 и $v_{1,2}$ – значения начальной скорости агрегации в присутствии ингибитора 1, ингибитора 2 и смеси ингибитор 1 + ингибитор 2 соответственно). В том случае, когда действие одного ингибитора не зависит от присутствия другого, параметр *j* равен единице. Случай *j* > 1 соответствует синергизму, а случай *j* < 1 – антагонизму в совместном действии двух ингибиторов.

В работе [105] параметр *j* был использован нами для анализа совместного действия α -кристаллина и пролина на скорость агрегации УФ-облученной Phb. Для характеристики начальной скорости агрегации был использован параметр $1/t_{1/2}$. В том случае, когда концентрация пролина составляла 0.15 М, наблюдался небольшой по величине антагонизм в совместном действии α -кристаллина и пролина (рассчитанные значения параметра *j* находились в интервале 0,81–0,91). Однако при более высокой концентрации пролина (0,5 М) каждый ингибитор (α -кристаллин или пролин) действовал независимо друг от друга.

Параметр *ј* может быть использован также для анализа совместного действия белковых шаперонов. Например, в работе [133] было изучено совместное действие α-кристаллина и β-казеина на индуцированную дитиотреитолом агрегацию инсулина из поджелудочной железы быка.

Б.И.Курганов

Для характеристики начальной скорости агрегации был использован параметр $k_I A_{lim}$. Проведенный нами анализ данных, представленных в этой работе, показывает, что *j* близок к единице. Таким образом, два шаперона действуют независимо друг от друга.

Отметим, что в работах [129,131] для характеристики антиагрегационной активности α -кристаллина в присутствии аргинина использовалась степень защитного действия P, определяемая уравнением (22). Очевидно, что величина P эквивалентна степени ингибирования i в уравнении (26). Таким образом, для расчета параметра j, характеризующего совместное защитное действие шаперона белковой природы и химического шаперона может быть использовано уравнение, идентичное уравнению (26):

$$j = \frac{P_{1,2}}{1 - (1 - P_1)(1 - P_2)}.$$
(27)

В этом уравнении P – степень защитного действия: P_1 – для шаперона 1, P_2 – для шаперона 2 и $P_{1,2}$ – для смеси шаперон 1 + шаперон 2.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных по действию шаперонов белковой природы и химических шаперонов, опубликованных на протяжении двух последних десятилетий, показывает, что из-за отсутствия должной обработки кинетических данных теряется существенная информация, которая могла быть полезной для понимания механизма защитного действия шаперонов. Очевидно, что в случае шаперонов белковой природы зависимости начальной скорости агрегации белкового субстрата от концентрации шаперона содержат информацию о стехиометрии комплекса шаперон-белковый субстрат. Однако для каждой использованной тест-системы должны быть проведены специальные исследования по оценке реальной концентрации белкового субстрата. Например, для агрегационных тест-систем, в которых стадии агрегации предшествует стадия разворачивания белковой молекулы (тест-системы, основанные на тепловой агрегации белков, или тестсистемы, основанные на дититреитол-индуцированной агрегации белков), нужна детальная информация о скорости денатурации белка. Следует подчеркнуть, что оценка стехиометрии комплекса шаперонбелковый субстрат, проводимая кинетическим методом, т.е. на основе анализа зависимостей начальной скорости агрегации от концентрации шаперона, должна быть подтверждена прямыми экспериментами по

определению стехиометрии, например, экспериментами с разделением компонентов системы с использованием гель-проникающей хроматографии и последующим количественным электрофорезом компонентов в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

В настоящее время для оценки антиагрегационной активности шаперонов используется большое число тест-систем различного типа. Актуальными становятся исследования по сопоставлению тест-систем и отбору систем, позволяющих более надежно рассчитать антиагрегационную активность и дать оценку стехиометрии комплекса шаперон–белковый субстрат.

Использование описанных в настоящем обзоре уравнений для расчета начальной скорости агрегации белков и уравнений для описания зависимости начальной скорости агрегации белкового субстрата от концентрации химического шаперона позволяет дать строгую количественную оценку антиагрегационной активности химических шаперонов и обеспечивает возможность отбора агентов, эффективно подавляющих агрегацию белков и представляющих интерес для решения биотехнологических задач.

Для оценки совместного действия шаперонов, в частности шаперонов белковой природы и химических шаперонов, оказались полезными уравнения, предложенные для совместного действия ингибиторов ферментативных реакций. Таким образом, эффекты синергизма или антагонизма в совместном действии шаперонов могут быть охарактеризованы строго количественно.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002) Science, **295**, 1852–1858.
- 2. *Маркосян К.А., Курганов Б.И.* (2004) Биохимия, **69**, 1196–1212.
- Ellis, R.J. (2011) In: Folding for the Synapse / Wyttenbach, A., and O'Connor, V. (eds.), Springer, New York, pp. 9–34.
- 4. Invernizzi, G., Papaleo, E., Sabate, R., and Ventura, S. (2012) Int. J. Biochem. Cell Biol., 44, 1541–1554.
- 5. *Kurganov, B.I.* (2012) Biochem. Anal. Biochem., **1**: e107.
- Tyedmers, J., Mogk, A., and Bukau, B. (2010) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 11, 777–788.

- 7. Richter, K., Haslbeck, M., and Buchner, J. (2010) Mol. Cell, 40, 253–266.
- 8. Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2010) Nature, 475, 324–332.
- 9. van Montfort, R., Slingsby, C., and Vierling, E. (2002) Adv. Protein Chem., **59**, 105–156.
- 10. Narberhaus, F. (2002) Microbiol. Mol. Biol. Rev., **66**, 64–93;
- Haslbeck, M., and Buchner, J. (2002) Prog. Mol. Subcell. Biol., 28, 37–59.
- Панасенко О.О., Ким М.В., Гусев Н.Б. (2003) Успехи биол. химии, 43, 59–98.

- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurtner, D., and Buchner, J. (2005) Nat. Struct. Mol. Biol., 12, 842–846.
- 14. Sun, Y., and MacRae, T.H. (2005) Cell. Mol. Life Sci., **62**, 2460–2476.
- Nakamoto, H., and Vígh, L. (2007) Cell. Mol. Life Sci., 64, 294–306.
- Vos, M.J., Hageman, J., Carra, S., and Kampinga, H.H. (2008) Biochemistry, 47, 7001–7011.
- 17. *Kappé, G., Boelens, W.C., and de Jong, W.W.* (2010) Cell Stress Chaperones, **15**, 457–461.
- Baldwin, A.J., Lioe, H., Hilton, G.R., Baker, L.A., Rubinstein, J.L., Kay, L.E., and Benesch, J.L.P. (2011) Structure, 19, 1855–1863.
- Baldwin, A.J., Lioe, H., Robinson, C.V., Kay, L.E., and Benesch, J.L.P. (2011) J. Mol. Biol., 413, 297–309.
- Jehle, S., Vollmar, B.S., Bardiaux, B., Dove, K.K., Rajagopal, P., Gonen, T., Oschkinat, H., and Klevit, R.E. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108, 6409–6414.
- 21. Mymrikov, E.V., Seit-Nebi, A.S., and Gusev, N.B. (2011) Physiol. Rev., **91**, 1123–1159.
- Hilton, G.R., Lioe, H., Stengel, F., Baldwin, A.J., and Benesch, J.L.P. (2013) Top. Curr. Chem., 2013, 328, 69–98.
- Lee, G.J., Roseman, A.M., Saibil, H.R., and Vierling, E. (1997) EMBO J., 16, 659–671.
- 25. Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J., and Goloubinoff, P. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 11032–11037.
- 26. *Lee, G.J., and Vierling, E.* (2000) Plant Physiol., **122**, 189–198.
- 27. *Wang, K., and Spector, A.* (2000) Eur. J. Biochem., **267**, 4705–4712.
- Bova, M.P., Ding, L.L., Horwitz, J., and Fung, B.K. (1997) J. Biol. Chem., 272, 29511–29517.

- 29. Sun, T.X., Akhtar, N.J., and Liang, J.J. (1998) FEBS Lett., **430**, 401–404.
- Bova, M.P., McHaourab, H.S., Han, Y., and Fung B.K. (2000) J. Biol. Chem., 275, 1035–1042.
- Bova, M.P., Huang, Q., Ding, L., and Horwitz, J. (2002) J. Biol. Chem., 277, 38468–38475.
- 32. Baldwin, A.J., Hilton, G.R., Lioe, H., Bagnéris, C., Benesch, J.L., and Kay, L.E. (2011) J. Mol. Biol., 413, 310–320.
- 33. Baldwin, A.J., Walsh, P., Hansen, D.F., Hilton, G.R., Benesch, J.L.P., Sharpe, S., and Kay, L.E. (2012) J. Am. Chem. Soc., 134, 15343–15350.
- Basha, E., O'Neill, H., and Vierling, E. (2012) Trends Biochem. Sci., 37, 106–117.
- 35. Stromer, T., Ehrnsperger, M., Gaestel, M., and Buchner, J. (2003) J. Biol. Chem., 278, 18015–18021.
- Friedrich, K.L., Giese, K.C., Buan, N.R., and Vierling, E. (2004) J. Biol. Chem., 279, 1080–1089.
- 37. Benesch, J.L., and Ruotolo, B.T. (2011) Curr. Opin. Struct. Biol., **21**, 641–649.
- 38. Stengel, F., Baldwin, A.J., Painter, A.J., Jaya, N., Basha, E., Kay, L.E., Vierling, E., Robinson, C.V., and Benesch, J.L.P. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **107**, 2007–2012.
- Buchner, J., Schmidt, M., Fuchs, M., Jaenicke, R., Rudolph, R., Schmid, F.X., and Kiefhaber, T. (1991) Biochemistry, 30, 1586–1591.
- 40. Hartman, D.J., Surin, B.P., Dixon, N.E., Hoogenraad, N.J., and Hoj, P.B. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 2276–2280.
- Weber, F., Keppel, F., Georgopoulos, C., Hayer-Hartl, M.K., and Hartl, F.U. (1998) Nat. Struct. Biol., 5, 977–985.
- 42. Naletova, I.N., Muronetz, V.I., and Schmalhausen, E.V. (2006) Biochim. Biophys. Acta, **1764**, 831–838.

- 43. Huq, S., Sueoka, K., Narumi, S., Arisaka, F., and Nakamoto, H. (2010) Biosci. Biotechnol. Biochem., 74, 2273–2280.
- 44. Li, Y., Zheng, Z., Ramsey, A., and Chen, L. (2010) J. Pept. Sci., 16, 693–700.
- 45. Markossian, K.A., Golub, N.V., Chebotareva, N.A., Asryants, R.A., Naletova, I.N., Muronez, V.I., Muranov, K.O., and Kurganov, B.I. (2010) Protein J., 29, 11–25.
- Eronina, T.B., Chebotareva, N.A., Bazhina, S.G., Kleymenov, S.Y., Naletova, I.N., Muronetz, V.I., and Kurganov, B.I. (2010) Macromol. Biosci., 10, 768–774.
- 47. Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., and Sigler, P.B. (1994) Nature, **371**, 578–586.
- 48. Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2009) Nat. Struct. Mol. Biol., 16, 574–581.
- 49. Clare, D.K., Bakkes, P.J., van Heerikhuizen, V., van der Vies, S.M., and Saibil, H.R. (2009) Nature, **457**, 107–110.
- 50. Jewett, A.I., and Shea, J.-E. (2010) Cell. Mol. Life Sci., **67**, 255–276.
- Marchenkov, V.V., and Semisotnov, G.V. (2009) Int. J. Mol. Sci., 10, 2066–2083.
- 52. Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R., and Jakob, U. (1992) Nature, **358**, 169–170.
- Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I., and Buchner, J. (1995) J. Biol. Chem., 270, 7288–7294.
- 54. Youker, R.T., Walsh, P., Beilharz, T., Lithgow, T., and Brodsky, J.L. (2004) Mol. Biol. Cell, 15, 4787–4797.
- Müller, L., Schaupp, A., Walerych, D., Wegele, H., and Buchner, J. (2004) J. Biol. Chem., 279, 48846–48854.
- Evans, C.G., Wisén, S., and Gestwicki, J.E. (2006) J. Biol. Chem., 281, 33182–33191.

- 57. *Wayne, N., and Bolon, D.N.* (2010) J. Mol. Biol., **401**, 931–939.
- 58. *Taneja*, *S.*, *and Ahmad*, *F*. (1994) Biochem. J., **303**, 147–153.
- 59. *Xie, G., and Timasheff, S.N.* (1997) Biophys. Chem., **64**, 25–43.
- Anjum, F., Rishi, V., and Ahmad, F. (2000) Biochim. Biophys. Acta, 1476, 75–84.
- 61. *Bolen, D.W.* (2001) Methods Mol. Biol., **168**, 17–36.
- Rösgen, J., Pettitt, B.M., and Bolen, D.W. (2005) Biophys. J., 89, 2988–2997.
- 63. *Kumar, R.* (2009) Arch. Biochem. Biophys., **491**, 1–6.
- 64. *Politi, R., and Harries, D.* (2010) Chem. Commun., **46**, 6449–6451.
- 65. Welch, W.J., and Brown, C.R. (1996) Cell Stress Chaperones, 1, 109–115.
- 66. *Papp, E., and Csermely, P.* (2006) Handb. Exp. Pharmacol., **172**, 417–436.
- 67. Paul, S., Punam, S., and Chaudhuri, T.K. (2007) FEBS J., **274**, 6000–6010.
- 68. Leandro, P., and Gomes, C.M. (2008) Mini Rev. Med. Chem., **8**, 901–911.
- Rajan, R.S., Tsumoto, K., Tokunaga, M., Tokunaga, H., Kita, Y., and Arakawa, T. (2011) Curr. Med. Chem., 18, 1–15.
- 70. *Singer, M.A., and Lindquist, S.* (1998) Molecular Cell, **1**, 639–648.
- 71. Arora, A., Ha, C., and Park, C.B. (2004) FEBS Lett., **564**, 121–125.
- 72. Ignatova, Z., and Gierasch, L.M. (2007) Methods Enzymol., **428**, 355–372.
- 73. Xia, Y., Park, Y.D., Mu, H., Zhou, H.M., Wang, X.Y., and Meng, F.G. (2007) Int. J. Biol. Macromol., 40, 437–443.
- 74. Hamada, H., Arakawa, T., and Shiraki, K. (2009) Curr. Pharm. Biotechnol., 10, 400–407.
- Nayak, A., Lee, C.C., McRae, G.J., and Belfort, G. (2009) Biotechnol. Prog., 25, 1508–1514.

- 76. Macchi, F., Eisenkolb, M., Kiefer, H., and Otzen, D.E. (2012) Int. J. Mol. Sci., 13, 3801–3819.
- 77. Charman, S.A., Mason, K.L., and Charman, W.N. (1993) Pharm. Res., 10, 954–962.
- Yu, J., Bakhos, L., Chang, L., Holterman, M.J., Klein, W.L., and Venton, D.L. (2002) J. Mol. Neurosci., 19, 51–55.
- Tavornvipas, S., Tajiri, S., Hirayama, F., Arima, H., and Uekama, K. (2004) Pharm. Res., 21, 2369–2376.
- Tavornvipas, S., Hirayama, F., Takeda, S., Arima, H., and Uekama, K. (2006) J. Pharm. Sci., 95, 2722–2729.
- Bajorunaite, E., Cirkovas, A., Radzevicius, K., Larsen, K.L., Sereikaite, J., Bumelis, V.A. (2009) Int. J. Biol. Macromol., 44, 428–434.
- 82. Samra, H.S., He, F., Bhambhani, A., Pipkin, J.D., Zimmerer, R., Joshi, S.B., and Middaugh, C.R. (2010) J. Pharm. Sci., 99, 2800–2818.
- Maloletkina, O.I., Markossian, K.A., Belousova, L.V., Kleimenov, S.Y., Orlov, V.N., Makeeva, V.F., and Kurganov, B.I. (2010) Biophys. Chem., 148, 121–130.
- 84. Maloletkina, O.I., Markossian, K.A., Chebotareva, N.A., Asryants, R.A., Kleymenov, S.Y., Poliansky, N.B., Muranov, K.O., Makeeva, V.F., and Kurganov, B.I. (2012) Biophys. Chem., 163–164, 11–20.
- 85. *Курганов Б.И*. (1998) Биохимия, **63**, 430–432.
- 86. Ferrone, F. (1999) Methods Enzymol., **309**, 256–274.
- Eronina, T.B., Chebotareva, N.A., Bazhina, S.G., Makeeva, V.F., Kleymenov, S.Y., and Kurganov, B.I. (2009) Biophys. Chem., 141, 66–74.
- Eronina, T.B., Chebotareva, N.A., Kleymenov, S.Y., Roman, S.G., Makeeva, V.F., and Kurganov, B.I. (2010) Biopolymers, 93, 986–993.

- 89. Малолеткина О.И., Маркосян К.А., Асриянц Р.А., Орлов В.Н., Курганов Б.И. (2009) Доклады АН, 427, 549–552.
- Maloletkina, O.I., Markossian, K.A., Asryants, R.A., Semenyuk, P.I., Makeeva, V.F., and Kurganov, B.I. (2010) Int. J. Biol. Macromol., 46, 487–492.
- Bumagina, Z.M., Gurvits, B.Y., Artemova, N.V., Muranov, K.O., and Kurganov, B.I. (2010) Biophys. Chem., 146, 108–117.
- Bumagina, Z., Gurvits, B., Artemova, N., Muranov, K., and Kurganov, B. (2010). Int. J. Mol. Sci., 11, 4556–4579.
- 93. Markov, D.I., Pivovarova, A.V., Chernik, I.S., Gusev, N.B., and Levitsky, D.I. (2008) FEBS Lett. 582, 1407–1412.
- Bhattacharyya, J., Shipova, E.V., Santhoshkumar, P., Sharma, K.K., and Ortwerth, B.J. (2007) Biochemistry, 46, 14682–14692.
- 95. Sgarbossa, A., Buselli, D., and Lenci, F. (2008) FEBS Lett., 582, 3288–3292.
- 96. 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., and Kurganov, B.I. (2007) Biophys. Chem., **125**, 521–531.
- Meremyanin, A.V., Eronina, T.B., Chebotareva, N.A., and Kurganov, B.I. (2008) Biopolymers, 89, 124–134.
- Чеботарева Н.А., Курганов Б.И., Асриянц Р.А., Муранов К.О., Островский М.А. (2009) Доклады АН, 428, 245–248.
- Sabbaghian, M., Ebrahim-Habibi, A., and Nemat-Gorgani, M. (2009) Int. J. Biol. Macromol., 44, 156–162.

- 100. 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., and Ostrovsky, M.A. (2005) Biochemistry, 44, 15480–15487.
- 101. Markossian, K.A., Golub, N.V., Khanova, H.A., Levitsky, D.I., Poliansky, N.B., and Kurganov, B.I. (2008) Biochim. Biophys. Acta, 1784, 1286–1293.
- 102. Eronina, T., Borzova, V., Maloletkina, O., Kleymenov, S., Asryants, R.A., Markossian, K.A., and Kurganov, B. (2011) PLoS One, 6: e22154.
- 103. Golub, N., Meremyanin, A., Markossian, K., Eronina, T., Chebotareva, N.A., Asryants, R., Muronets, V., and Kurganov, B. (2007) FEBS Lett., 581, 4223–4227.
- 104. Markossian, K.A., Kurganov, B.I., Levitsky, D.I., Khanova, H.A., Chebotareva, N.A, Samoilov, A.M., Eronina, T.B., Fedurkina, N.V., Mitskevich, L.G., Meremyanin, A.V., Kleymenov, S.Yu., Makeeva, V.F. Muronets, V.I., Naletova, I.N., Shalova, I.N., Asryants, R.A, Schmalhausen, E.V., Saso, L., Panyukov, Yu.V., Dobrov, E.N., Yudin, I.K., Timofeeva A.C., Muranov, K.O., and Ostrovsky, M.A. (2006) In: Protein Folding: New Research / Obalinsky, T.R. (ed.), Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 89–171.
- 105. Roman, S.G., Chebotareva, N.A., and Kurganov, B.I. (2012) Intern. J. Biol. Macromol., 50, 1341–1345.
- 106. *Kurganov, B.I.* (2013) Biochem. Anal. Biochem., **2**: e107.
- 107. Roman, S.G., Chebotareva, N.A., Eronina, T.B., Kleymenov, S.Yu., Makeeva, V.F., Muranov, K.O., Poliansky, N.B., and Kurganov, B.I. (2011) Biochemistry, 50, 10607–10623.

- 108. *Курганов Б.И.* (2002) Успехи биол. химии, **42**, 89–138.
- 109. *Курганов Б.И.* (2002) Биохимия, **67**, 492–507.
- 110. *Kurganov, B.I.* (2002) Tsinghua Science and Technology, 7, 331–339.
- 111. Kurganov, B.I. (2005) In: Chemical and Biological Kinetics. New Horizons. Volume 2: Biological Kinetics / Burlakova, E.B., and Varfolomeev, S.D. (eds.), Koninklijke Brill NV, Leiden, The Netherlands, pp. 251–279.
- 112. Wang, K., and Kurganov, B.I. (2003) Biophys. Chem., **106**, 97–109.
- 113. Курганов Б.И., Рафикова, Э.Р., Добров, Е.Н. (2002) Биохимия, 67, 525–533.
- 114. Kurganov, B.I., Dobrov, E.N., and Rafikova, E.R. (2002) in Proceedings of the II International Symposium «Problems of Biochemistry, Radiation and Astrobiology», May 29 – June 1 2001, Dubna, the United Nuclear Research Institute Publishers, pp. 100–104.
- Федуркина Н.В., Белоусова Л.В., Мицкевич Л.Г., Жоу Х.-М., Чанг З., Курганов Б.И. (2006) Биохимия, 71, 408–416.
- 116. *Khodarahmi, R., Beyrami, M., and Soori, H.* (2008) Arch. Biochem. Biophys., **477**, 67–76.
- 117. Mayr, C., Richter, K., Lilie, H., and Buchner, J. (2000) J. Biol. Chem., 275, 34140–34146.
- 118. *Khodarahmi, R., Beyrami, M., and Soori, H.* (2008) Arch. Biochem. Biophys., **477**, 67–76.
- Yousefi, R., Shchutskaya, Y.Y., Zimny, J., Gaudin, J.C., Moosavi-Movahedi, A.A., Vladimir I. Muronetz, V.I., Zuev, Yu. F., Chobert, J.-M., and Haertlé, T. (2009) Biopolymers, 91, 623–632.
- 120. Захарченко Н.Л., Коннова Т.А., Гоголева Н.Е., Файзуллин Д.А., Т.

Эртле Т., Зуев Ю.Ф. (2012) Биоорг. химия, **38**, 223–228.

- 121. Roher, N., Miró, F., Boldyreff, B., Llorens, F., Plana, M., Issinger, O.G., and Itarte, E. (2001) Eur. J. Biochem., **268**, 429–436.
- 122. Raman, B., Ramakrishna, T., and Rao, C.M. (1995) FEBS Lett., **365**, 133–136.
- 123. Srinivas, V., Datta, S.A., Ramakrishna, T., and Rao, Ch.M. (2001) Mol. Vision, **7**, 114–119.
- 124. Ganadu, M.L., Aru, M., Mura, G.M., Coi, A., Mlynarz, P., and Kozlowski, H. (2004) J. Inorg. Biochem., 98, 1103–1109.
- 125. Spinozzi, F., Mariani, P., Rustichelli, F., Amenitsch, H., Bennardini, F., Mura, G.M., Coi, A., and Ganadu, M.L. (2006) Biochim. Biophys. Acta, **1764**, 677–687.
- 126. Wilcken, R., Wang, G., Boeckler, F.M., and Fersht, A.R. (2012)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109, 13584–13589.

- 127. *Kurganov, B.I.* (1982) Allosteric Enzymes. Kinetic Behaviour. John Wiley & Sons, Chichester, p. 56–60.
- 128. Fändrich, M. (2007) J. Mol. Biol., **365**, 1266–1270.
- 129 Srinivas, V., Raman, B., Rao, K.S., Ramakrishna, T., and Rao, Ch.M. (2003) Protein Sci., 12, 1262–1270.
- 130. Srinivas, V., Raman, B., Rao, K.S., Ramakrishna, T., and Rao, Ch.M. (2005) Mol. Vis., **11**, 249–255.
- 131. *Ecroyd, H., and Carver, J.A.* (2008) FEBS J., **275**, 935–947.
- Силонова Г.В., Ливанова Н.Б., Курганов Б.И. (1969) Мол. биология, 3, 768–778.
- 133. Yousefi, R., and Jalili, S. (2011) Colloids Surf. B Biointerfaces, 88, 497–504.