

# ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ШАПЕРОНОВ В ТЕСТ-СИСТЕМАХ, ОСНОВАННЫХ НА ПОДАВЛЕНИИ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ

© 2002 г.

Б. И. КУРГАНОВ

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

I. Введение. II. Кинетика агрегации белков. III. Механизм агрегации белков. IV. Количественная оценка шаперонной активности. V. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Молекулярные шапероны участвуют в разнообразных внутриклеточных процессах, включая такие процессы, как котрансляционный фолдинг белков, сборка и распад надмолекулярных белковых структур и транспорт белков через мембраны [5, 11, 18, 28, 37, 45, 46, 52, 53, 58, 59, 65, 70, 72, 114, 119, 125, 129, 144, 145, 168]. Многие молекулярные шапероны известны как белки теплового шока (heat-shock proteins, Hsp), которые синтезируются в клетках всех организмов в ответ на повышенные температуры. Белки теплового шока необходимы для защиты клеток от теплового повреждения и нормализации функций клетки после прекращения теплового воздействия [19, 27, 50, 62, 94, 116, 147]. Молекулярные шапероны обладают общими свойствами, характеризующими способность этих белков оказывать влияние на конформацию белковых субстратов. Молекулярные шапероны избирательно взаимодействуют с определенными интермедиатами процесса фолдинга белков, оказывая таким образом влияние на выход белка в нативном состоянии. В то время как одни шапероны, такие как Hsp70 и Hsp60 (GroEL), благоприятствуют сворачиванию полипеп-

---

*Принятые сокращения:* БО ВТМ — белок оболочки вируса табачной мозаики; grp94-CT — С-концевой домен регулируемого глюкозой белка (glucose-regulated protein); GuHCl — гуанидингидрохлорид.

*Адрес для корреспонденции:* e-mail: kurganov@inbi.ras.ru

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты 02-04-48704, 02-04-49099, 02-04-39007 и 00-15-97787).

тидной цепи в нативную структуру, другие, такие как  $\alpha$ -кристаллины, маленькие белки теплового шока, иммунофилины, cdc37 и Hsp90, способны предотвращать агрегацию белковых субстратов, но не могут обеспечить полный переход белка в нативное состояние [27, 63, 64, 72, 82, 94, 98, 155, 184]. В работе [45] дано следующее определение шаперонов: *шаперонами* называют белки, которые, взаимодействуя со сворачивающимися полипептидными цепями или с собирающимися надмолекулярными структурами, обеспечивают переход спонтанно протекающего процесса в процесс, который регулируется клеточными факторами. Оценка шаперонной активности в тестах, основанных на подавлении агрегации белковых субстратов, требует понимания механизмов агрегации белков.

В настоящем обзоре излагаются новые представления о механизмах агрегации белков и обсуждаются методы, позволяющие количественно охарактеризовать способность шаперонов подавлять агрегацию белков.

## II. КИНЕТИКА АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ

### ПОРЯДОК РЕАКЦИИ АГРЕГАЦИИ ПО БЕЛКУ

Форма кинетической кривой может быть охарактеризована порядком реакции по веществу, изменение концентрации которого регистрируется во времени. Поскольку белковые агрегаты обладают повышенной способностью рассеивать падающий свет по сравнению с исходными белковыми молекулами, за кинетикой агрегации удобно следить по увеличению кажущегося поглощения  $A = \lg(I/I_0)$  или интенсивности светорассеяния раствора белка в видимой области спектра. Проведенный в настоящем обзоре анализ кинетики агрегации белков основан на предположении, что кажущееся поглощение (или интенсивность светорассеяния) пропорционально количеству белка в агрегированной форме. Можно ожидать, что строгая пропорциональность между величиной поглощения и количеством агрегированного белка существует во временной области, где протекает рост уже сформировавшихся агрегатов белка. Косвенным подтверждением такого предположения могут служить результаты проведенных нами исследований взаимодействия гликогенфосфоорилазы *b* из скелетных мышц кролика с гликогеном с использованием турбидиметрического метода [102]. В этих экспериментах использовали гликоген с молекулярной массой  $5,5 \cdot 10^6$  Да. Радиус гликогеновой частицы составляет 17 нм (в предположении сферической формы частицы). Гликогенфосфоорилаза *b* представляет собой димер, имеющий следующие

размеры:  $6,5 \times 6,5 \times 11$  нм [22]. В отличие от гликогенфосфорилазы растворы гликогена обладают заметной способностью рассеивать падающий свет в видимой области. На рис. 1, а показана зависимость интенсивности светорассеяния ( $I$ ) при 550 нм от концентрации гликогена  $[G]_0$  (прямая 1). Эта зависимость является линейной:  $I = \alpha[G]_0$  ( $\alpha$  – константа). В присутствии гликогенфосфорилазы  $b$  интенсивность светорассеяния растворов гликогена возрастает (кривая 2) вследствие адсорбции фермента на гликогеновых частицах. Для определения количества гликогенфосфорилазы  $b$ , адсорбированной гликогеном, был использован метод аналитического ультрацентрифугирования. Было установлено, что адсорбционная емкость гликогеновой частицы составляет 20 молекул фермента. Важный результат проведенных исследований состоит в том, что прирост интенсивности светорассеяния раствора гликогена линейно зависит от количества молекул фермента, адсорбированных на гликогеновой частице (рис. 1, б). Наличие пропорциональности между интенсивностью светорассеяния и количеством адсорбированной гликогенфосфорилазы  $b$  позволило провести изучение кинетики комплексообразования и доказать, что этот процесс протекает как обратимая бимолекулярная реакция. Были определены константы скорости прямой и обратной реакций.

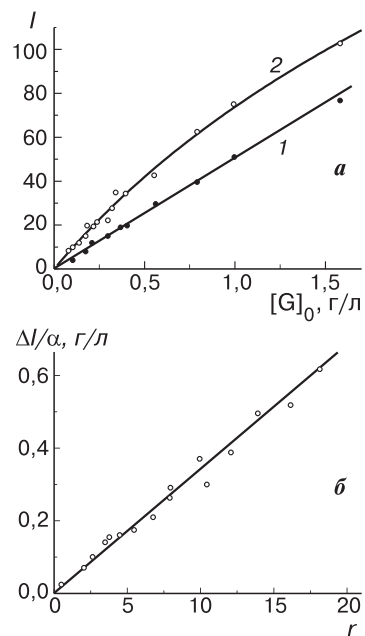


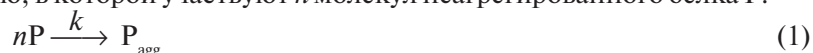
Рис. 1. Адсорбция гликогенфосфорилазы  $b$  на гликогеновых частицах [102] (0,05 М Na- $\beta$ -глицерофосфат, pH 6,8; 20 °С).

*а* — Зависимость интенсивности светорассеяния при 550 нм ( $I$  в произвольных единицах) от концентрации гликогена  $[G]_0$  в отсутствие (1) и в присутствии (2) гликогенфосфорилазы  $b$  (0,37 мг/мл).

*б* — Корреляция между приростом светорассеяния ( $\Delta I/\alpha$ ;  $\alpha$  — коэффициент пропорциональности между  $I$  и  $[G]_0$ ) и количеством молекул гликогенфосфорилазы  $b$ , адсорбированных на гликогеновой частице ( $r$ ). Величину  $r$  определяли методом аналитического ультрацентрифугирования.

Следует подчеркнуть, что в настоящем обзоре предположение о пропорциональности между величиной поглощения и количеством агрегированного белка использовано только для анализа *завершающей фазы* процесса агрегации (начальные участки кинетических кривых, обычно включающие лаг-период, нами не анализировались).

Процесс агрегации будем рассматривать как необратимую реакцию, в которой участвуют  $n$  молекул неагрегированного белка P:



( $\text{P}_{\text{agg}}$  – агрегированная форма белка,  $k$  – константа скорости реакции  $n$ -го порядка). Скорость агрегации ( $v_{\text{agg}}$ ) может быть записана как скорость убыли неагрегированного белка:

$$v_{\text{agg}} = -d[\text{P}]/dt = nk[\text{P}]^n, \quad (2)$$

где  $t$  – время и  $n$  – порядок агрегации по белку. Обозначим через  $A_{\text{lim}}$  предельное значение кажущегося поглощения ( $A$ ) при  $t \rightarrow \infty$ . Если величина  $A$  пропорциональна количеству агрегированного белка, то доля белка в агрегированной форме равна  $A/A_{\text{lim}}$ , а доля неагрегированного белка –  $(1 - A/A_{\text{lim}})$ .

При сделанных допущениях текущее значение молярной концентрации неагрегированного белка  $[\text{P}]$  равно  $(1 - A/A_{\text{lim}})[\text{P}]_0$  ( $[\text{P}]_0$  – величина  $[\text{P}]$  при  $t = 0$ ) и скорость изменения поглощения во времени имеет следующий вид:

$$\frac{dA}{dt} = \frac{nk[\text{P}]_0^{n-1}}{A_{\text{lim}}^{n-1}} (A_{\text{lim}} - A)^n \quad (3)$$

Как будет видно из дальнейшего обсуждения кинетики агрегации белков, особый интерес представляет случай, когда  $n = 1$  (первый порядок агрегации по белку). При  $n = 1$  уравнение (3) трансформируется в уравнение вида:

$$dA/dt = k_1(A_{\text{lim}} - A), \quad (4)$$

где  $k_1$  – константа скорости реакции первого порядка. Интегрирование уравнения (4) дает выражение, описывающее зависимость  $A$  от  $t$ :

$$A = A_{\text{lim}}\{1 - \exp[-k_1(t - t_0)]\} \quad (5)$$

( $t_0$  – значение  $t$ , при котором  $A = 0$ ) или

$$A = A_0 + (A_{\text{lim}} - A_0)[1 - \exp(-k_1 t)] \quad (6)$$

( $A_0$  – значение  $A$  при  $t = 0$ ). Первое упоминание о применимости уравнения (5) для описания кинетики агрегации белков содержится в работе Кнаппика и Плухтуна [103]. Однако эти авторы, к сожалению,

нию, не представили исходных кинетических кривых агрегации изучаемых белков (рекомбинантных антител).

Путем комбинирования уравнений (4) и (6) можно получить выражение для зависимости  $dA/dt$  от времени:

$$dA/dt = k_1(A_{\text{lim}} - A_0) \exp(-k_1 t) = (dA/dt)_0 \exp(-k_1 t), \quad (7)$$

где  $(dA/dt)_0$  – значение  $dA/dt$  при  $t = 0$ .

Таким образом, для доказательства выполнения первого порядка агрегации по белку могут быть использованы следующие уравнения: уравнение (3) для анализа зависимости  $A$  от  $t$  при помощи специальных программ, позволяющих проводить описание кинетических данных дифференциальными кинетическими уравнениями (для обсуждаемого случая величина  $n$  должна быть равной единице) и уравнение (5) (зависимость  $A$  от  $t$  должна быть экспоненциальной функцией с запаздыванием по времени;  $t_0 > 0$ ). Построение графиков в координатах  $\{dA/dt; A\}$  и  $\{dA/dt; t\}$  в соответствии с уравнениями (4) и (6) носит иллюстративный характер. Зависимость  $dA/dt$  от  $A$  является линейной анаморфозой кинетического уравнения первого порядка. Что касается зависимости  $dA/dt$  от  $t$ , то она также может быть представлена в виде линейной анаморфозы в координатах  $\{\ln(dA/dt); t\}$ .

## КИНЕТИКА ТЕПЛОВОЙ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ

Тепловая денатурация белков часто сопровождается агрегацией денатурированных молекул [3, 44], что осложняет изучение денатурации с использованием спектральных, гидродинамических и калориметрических методов. Разворачивание белковой молекулы приводит к экспонированию гидрофобных остатков и движущей силой агрегации являются гидрофобные взаимодействия между развернутыми белковыми молекулами [56, 84, 124]. Известно также, что скорость тепловой агрегации белков ( $v_{\text{agg}}$ ) сильно зависит от ионной силы раствора ( $\mu$ ), причем величина  $v_{\text{agg}}$  растет с увеличением  $\mu$  (см., например, [13, 110, 135, 150]). Эти данные указывают на важную роль электростатических взаимодействий в агрегации денатурированных белковых молекул.

Важно подчеркнуть различие между ассоциацией и агрегацией белковых молекул. Под *ассоциацией* (или самосборкой; self-assembly) понимают взаимодействие белковых молекул, которое приводит к образованию олигомерных структур, характеризующихся строгим стехиометрическим составом. В то же время *агрегацией* называют взаимодействие развернутых белковых молекул, которое приводит к образованию агломератов произвольной формы вследствие «ошибочных» межбелковых взаимодействий [87].

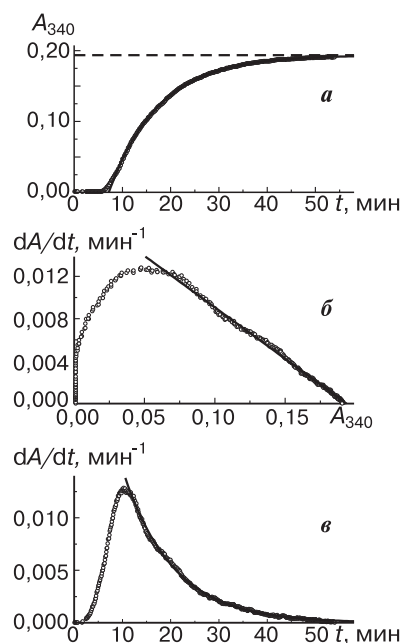


Рис. 2. Анализ кинетики тепловой агрегации цитратсинтазы из митохондрий сердца свиньи (45 °С; 50 мМ Нерес-буфер, рН 7,5). Экспериментальные данные [159] представлены точками.

*а* — Зависимость кажущегося поглощения при 340 нм ( $A_{340}$ ) от времени. Сплошная кривая рассчитана по уравнению (5). Горизонтальная штриховая линия соответствует значению  $A_{lim}$ .

*б* — Зависимость  $dA/dt$  от  $A$ . Завершающая фаза агрегации описана линейной функцией (4).

*в* — Зависимость  $dA/dt$  от  $t$ . Сплошная кривая рассчитана по уравнению (7).

Проведенный нами анализ кинетических кривых тепловой агрегации белков показал, что в большинстве случаев завершающая фаза агрегации (т.е. участок кинетической кривой после прохождения точки перегиба) следует кинетике первого порядка. Соответствующие примеры приведены в таблице. Таблица содержит список белковых субстратов, используемых в тест-системах, предназначенных для оценки способности шаперонов (и других агентов) подавлять агрегацию белков. В таблице указаны кинетические параметры ( $k_1$  и  $t_0$ ), рассчитанные из кинетических кривых агрегации по уравнению (5). В тех случаях, когда имеются соответствующие данные, указаны константы скорости тепловой инактивации ферментов в тех же условиях, при которых изучалась тепловая агрегация.

В качестве белковых субстратов при испытании способности шаперонов подавлять агрегацию белков особенно часто используются митохондриальная цитратсинтаза из сердца свиньи (димер с молекулярной массой 87 кДа) и  $\beta_L$ -кристаллин. На рис. 2 представлена кинетика тепловой агрегации цитратсинтазы, прослеженной по увеличению поглощения при 340 нм (данные, полученные Зарским с соавт. [159]). На-

ачальный участок кинетической кривой характеризуется наличием лаг-периода (рис. 2, *а*). Появление лаг-периода на кинетической кривой агрегации обусловлено следующими причинами. Во-первых, стадии агрегации предшествует стадия разворачивания белковой

Таблица  
**Белковые субстраты, используемые в тест-системах, предназначенных для оценки способности шаперонов и других агентов подавлять агрегацию белков**

№	Белковый субстрат	Источник	Концентрация белка	Условия тепловой агрегации	Кинетические параметры агрегации			$k_{наст}^*$ мин <sup>-1</sup>	Агент, подавляющий агрегацию белка	Ссылка
					$k_p$ , мин <sup>-1</sup>	$t_0$ , мин	7			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1.	Цитратсинтаза митохондриальная	Сердце свиньи	0,75 мкМ (налицмер)	43°; 40 мМ Непес-буфер, pH 7,5	0,313±0,006	2,55±0,04	0,58	Нсп90 дрожжей	95	
		То же	1 мкМ	39,5°; 50 мМ Непес-НСI-буфер, pH 7,0	0,093±0,001	3,63±0,02	-0,2 <sup>d</sup>	Нсп16.3 из <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	31	
		То же	0,15 мкМ	43°; 40 мМ Непес-буфер, pH 7,5	0,196±0,002	1,97±0,02		Иммунофилин FKBP532 и белок p23	25	
		То же	0,5 мкМ	45°; 40 мМ Непес, 20 мМ КОН, 2 мМ Na-ацетат, pH 7,8, 50 мМ KCl, 10 мМ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,038±0,001	10,7±0,3		αВ-Кристаллин	127	
		То же	0,5 мкМ	45°; тот же буфер	0,084±0,003	5,8±0,2		αВ-Кристаллин дикого типа и мутантные формы	128	
		То же	0,075 мкМ	43°; 40 мМ Непес-буфер, pH 7,5	0,205±0,006	3,58±0,07		Рекомбинантный Hsp25	51	
		То же	0,075 мкМ	43°; 40 мМ Непес-КОН буфер, pH 7,5	0,267±0,007	1,23±0,03	0,70	Нсп26 из <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73	
		То же	0,007 мг/мл	50°; 50 мМ Непес-КОН буфер, pH 7,5	0,48±0,01	1,77±0,04		Белок HspA из термофильной цианобактерии <i>Synechococcus yunnanensis</i>	143	

см. продолжение табл.

продолжение табл.									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		То же	0,15 мкМ	43°; 40 мМ Нерес- КОН буфер, рН 7,5	0,216±0,001	3,5±0,1		DsbG (протеиндисульфид- изомераза) периплазмы <i>Escherichia coli</i>	151
		То же	0,15 мкМ	43°; тот же буфер	0,410±0,002	0,60±0,01		Активатор протеасомы (РА700)	164
		То же	0,3 мкМ	45°; 50 мМ Нерес буфер, рН 7,5	0,096±0,001	7,2±0,1		Hsp18 из пыльцевых зерен табака	159
		То же	0,115 мкМ	43°; 40 мМ Нерес буфер, рН 7,5	0,059±0,001	5,4±0,1		Фрагменты Hsp90	97
		То же	0,075 мкМ	43°; 40 мМ Нерес- КОН буфер, рН 7,5	0,074±0,001	0,23±0,01	0,51	Белок р26, треталоза	173
		То же	0,025 мг/мл	43°; тот же буфер	0,088±0,001	5,3±0,1	0,25	Рекомбинантные αА- и αВ- кристаллины	138
		То же	0,0375 мкМ	43°; 40 мМ Нерес буфер, рН 7,5	0,100±0,002	6,0±0,1		Рекомбинантный Hsp21	71
		То же	1,5 мкМ	40°; тот же буфер	0,063±0,001	6,4±0,1		Петтидил-пролил- <i>cis/trans</i> - изомеразы FKBP51, FKBP52 и Сур40	133
		То же	0,075 мкМ	43°; 40 мМ Нерес- КОН буфер, рН 7,5	0,17±0,01	2,2±0,1		Петтидил-пролил- <i>cis/trans</i> - изомераза SugA периплазмы <i>Escherichia coli</i>	23
		Дрожжи	0,075 мкМ	43°; 35 мМ Нерес буфер, рН 7,8	0,56±0,01	1,56±0,02	0,56	Петтидил-пролил- <i>cis/trans</i> - изомераза FкрА	139
2.	β <sub>1</sub> -Кристаллин	Хрусталик глаза быка	0,65 мг/мл	55°; 50 мМ Na-фос- фатный буфер, рН 7,5	0,056±0,001	9,1±0,1		α-Кристаллин из хрусталика глаза быка	80
		То же	0,325 мг/мл	58°; 50 мМ Na-фос- фатный буфер, рН 7,0	0,058±0,002	5,6±0,2		α-Кристаллин, Hsp25	121



продолжение табл.									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	То же	То же	0,2 мг/мл	62°; 60 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,0	0,111±0,002	3,12±0,05		α-Кристаллин, окисленный в системе аскорбат-FeCl <sub>3</sub> -EDTA-H <sub>2</sub> O	176
	То же	То же	0,2 мг/мл	72°; тот же буфер	0,25±0,01	2,9±0,1		То же	176
	То же	То же	0,195 мг/мл	56°; 50 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,0	0,071±0,008	17,0±0,7		α-Кристаллин	153
	То же	То же	0,0125 мг/мл	60°; 50 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,0, 0,1 М NaCl	0,121±0,003	4,11±0,05		α-Кристаллин из хрусталика глаза быка	35
	То же	То же	0,2 мг/мл	60°; 10 мМ фосфатный буфер, рН 7,0	0,069±0,001	1,17±0,04		α <sub>5</sub> -Казеин	24
	То же	То же	0,25 мг/мл	55°; 50 мМ фосфатный буфер, рН 7,4, 0,15 М NaCl	0,111±0,001	19,3±0,1		Рекомбинантный αА-кристаллин и его мутантные формы	146
	То же	То же	0,25 мг/мл	58°; 20 мМ Na-фосфатный буфер, рН 6,9, 0,1 М Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,124±0,001	4,08±0,01		Рекомбинантный αА-кристаллин и его мутантные формы	158
	Хрусталик глаза теленка		0,4 мг/мл	55°; тот же буфер	0,063±0,001	4,24±0,01		α-Кристаллин из здоровых крыс и крыс, страдающих диабетом	33
	То же		0,25 мг/мл	59,5°; 8 мМ КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> , 1,5 мМ Na <sub>2</sub> НРО <sub>4</sub> , 140 мМ NaCl, 3 мМ KCl, рН 7,4	0,133±0,001	4,36±0,01		Фосфорилированные, окисленные и химически модифицированные формы α-кристаллина	170
	То же		0,2 мг/мл	60°; 10 мМ фосфатный буфер, рН 7,4, 0,1 М NaCl	0,162±0,005	1,17±0,04		αА- и αВ-кристаллины	40
	Хрусталик глаза крысы		0,2 мг/мл	62°; тот же буфер	0,113±0,002	4,5±0,1		Фосфорилированные формы αА- и αВ-кристаллинов	175

продолжение табл.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Хрусталик глаза чело-века	0,25 мг/мл	55°; 50 мМ Na-фос-фатный буфер, рН 6,7	0,057±0,001	12,3±0,1		α-Кристаллин	47, 48
3.	Глицераль-дегид-3-фос-фатдегидро-геназа	Скелетные мышцы свиньи	75 нМ	45°; 50 мМ Na-фос-фатный буфер, рН 7,5	0,086±0,003	4,0±0,3		Hsp18 из <i>Pisum sativum</i>	108
4.	Малатдегид-рогеназа мито-хондриальная	Сердце свиньи	300 нМ	45°; тот же буфер	0,091±0,007	12,8±0,3		Hsp18 из гороха <i>Pisum sativum</i>	108
		То же	0,25 мг/мл	50°; тот же буфер	0,062±0,001	20,5±0,1		α-Кристаллин	47, 48
		То же	0,0123 мг/мл	45°; 50 мМ Нерес-КОН-буфер, рН 7,5	0,099±0,001	3,94±0,04	0,14 <sup>d</sup>	Белок HspA из термофильной цианобактерии <i>Synechococcus yunnanensis</i>	143
		То же	0,3 мкМ	47°	0,175±0,002	3,98±0,03		GtoEL и минишапероны, продуцированные из GtoEL	32
5.	Алкогольде-гидрогеназа	Печень лошади	1,25 мг/мл	37°; 50 мМ Na-фос-фатный буфер, рН 7,0; 0,1 М NaCl, 2 мМ EDTA	0,118±0,005	6,4±0,2		α-Кристаллин из хрусталика глаза быка	35
		То же	5 мкМ	То же	0,074±0,002	8,6±0,2		αВ-Кристаллин человека и фьюжен-белок, включающий αВ-кристаллин и белок, связывающий мальтозу	126
		То же	1,25 мг/мл	То же	0,112±0,003	6,7±0,1		αВ-Кристаллин человека и мутантные формы	128

продолжение табл.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		То же	0,05 мг/мл	37°; 20 mM Tris-HCl, pH 7,4	0,107±0,002	0,30±0,09		Нуклеолярный белок B23	166
		То же	6,2 мкМ	45°; 50 mM Na-фосфатный буфер, pH 7,0	0,032±0,001	29,9±0,1		Спнуклеин	160
		Дрожжи	150 мкМ	48°; тот же буфер	0,044±0,001	7,7±0,1		α-Кристаллин, химически сшитый диметил-3,3'-дитио-биспропионимидатом	153
	Модифицированный фермент <sup>6</sup> холоформа	То же	0,4 мг/мл	48°; 50 mM Na-фосфатный буфер, pH 7,0, 0,1 M NaCl	0,063±0,007	7±1		α-Кристаллин из хрусталика глаза быка	152
	То же	То же	0,025 мг/мл	50°; 50 mM K-фосфатный буфер, pH 7,8	0,25±0,01	2,24±0,5	0,228 (32%) <sup>6</sup>	Сахара (сахароза, трегалоза и др.)	123
6.	Карбоангидраза (форма В)	Эритроциты быка	0,06 мг/мл	63°	0,140±0,002	6,63±0,01		Наночастицы пулулана, модифицированного холестерином	18
		Эритроциты человека	0,1 мг/мл	60°; 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,1 M NaCl	0,329±0,001	1,90±0,01		α-Кристаллин	137
7.	Люцифераза	Светлячки	0,1 мкМ	43°; 40 mM HEPES-KOH буфер, pH 7,5	0,84±0,01	1,59±0,01		DsbG (протеиндисульфидизомераза) периплазмы <i>E. coli</i>	151
8.	Каталаза	Печень быка	0,249 мг/мл	55°; 50 mM Na-фосфатный буфер, pH 7,0	0,08±0,01	7,55±0,02	0,154 (54%) <sup>6</sup>	α-Кристаллин, Hsp25	78
9.	Каталитическая субъединица протеинкиназы СК2	Рекомбинантная		40°	0,100±0,005	4,0±0,4	(0,080±0,005) <sup>6</sup>	C-Концевой домен регулируемого глюкозой белка (grp94-CT)	142

		окончание табл.							
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10.	Сорбитолде- гидрогеназа	Хрусталик глаза быка	0,3 мг/мл	55°; 10 мМ Na-фос- фатный буфер, рН 7,0	0,033±0,005	16±1	0,203 (48%) <sup>б</sup>	α-Кристаллин	118
11.	γ-Кристаллин	Хрусталик глаза крысы	0,2 мг/мл	72°; тот же буфер	0,138±0,004	5,3±0,1		Фосфорилированные формы αА- и αВ-кристаллинов	175
		Хрусталик глаза быка	0,2 мг/мл	62°; 60 мМ Na-фос- фатный буфер, рН 7,0	0,086±0,013	12,1±0,4		α-Кристаллин, окисленный в системе аскорбат-FeCl <sub>3</sub> - EDTA-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	176
		То же	0,2 мг/мл	72°; тот же буфер	0,149±0,003	6,15±0,07		То же	176
		То же	0,625 мг/мл	66°; 50 мМ Na-фос- фатный буфер, рН 7,4	0,28±0,01	2,01±0,07		Рекомбинантный αВ-кристал- лин и его мутантные формы	134

\*  $k_{\text{инакт}}$  - константа скорости тепловой инактивации, мин<sup>-1</sup>.

Кинетические параметры агрегации  $k_1$  и  $t_0$  рассчитывали из кинетических кривых агрегации, прослеженной по увеличению мутности раствора белка, при помощи формулы (5).

<sup>а</sup> Оценка проведена на основании результатов, представленных в соответствующей цитированной работе, в предположении выполнимости экспоненциального закона для процесса тепловой инактивации.

<sup>б</sup> Оценка проведена на основании результатов, представленных в соответствующей цитированной работе, при описании процесса тепловой инактивации суммой двух экспонент. Указана константа скорости для более быстрой стадии. В скобках приведена амплитуда быстрой фазы (в %).

<sup>в</sup> фермент молифицирован сшивающим агентом — сульфосукцинимидил-2(7-азидо-4-метилкумарин-3-ацетамидо)-этил-1,3'-дитиопронионатом.

*Примечания:* в некоторых работах источник белка не указан; для каждого белкового субстрата ссылки даны в хронологическом порядке.

молекулы. Во-вторых, прежде чем появится возможность регистрации прироста поглощения, в системе должны появиться достаточно крупные агрегаты [43]. Регистрация прироста поглощения для основной части кинетической кривой связана, по-видимому, с укрупнением агрегатов, образовавшихся на начальной стадии агрегации.

В настоящем обзоре наше внимание сосредоточено, в основном, на анализе завершающей фазы процесса агрегации, а именно, участка кинетической кривой после прохождения точки перегиба. Для кинетической кривой, представленной на рис. 2, а, мы провели анализ области кривой при  $t > 17$  мин при помощи уравнения (3), используя программу Scientist («MicroMath», США), позволяющую проводить описание кинетической кривой в рамках кинетической схемы, описываемой дифференциальным уравнением (или системой дифференциальных уравнений). Значение  $n$ , полученное при помощи этой процедуры, составляет  $0,98 \pm 0,01$ . Следовательно, процесс агрегации в завершающей фазе следует кинетике реакции первого порядка.

Дополнительные подтверждения этого заключения были получены нами с использованием уравнений (4), (5) и (7). На рис. 2, а показано описание экспериментальной кривой интегральной формой уравнения, соответствующего кинетике реакции первого порядка, — уравнением (5). Получены следующие значения параметров:  $A_{\text{lim}} = 0,19 \pm 0,01$ ,  $k_1 = 0,096 \pm 0,001 \text{ мин}^{-1}$  и  $t_0 = 7,2 \pm 0,1 \text{ мин}$ . Как видно из данных, представленных на рис. 2, а, область выполнения первого порядка охватывает около 85% (от  $A/A_{\text{lim}} \approx 0,15$  и выше).

После дифференцирования зависимости  $A$  от  $t$ , проведенного нами при помощи программы Origin 5.0 («Microcal Software, Inc.», США), можно построить зависимости  $dA/dt$  от  $A$  или от  $t$ . Аппроксимация зависимости  $dA/dt$  от  $A$  в области значений  $A$  выше 0,075 прямой линией в соответствии с уравнением (4) дает следующие значения  $A_{\text{lim}}$  и  $k_1$ :  $A_{\text{lim}} = 0,19 \pm 0,01$  и  $k_1 = 0,097 \pm 0,001 \text{ мин}^{-1}$ . Аппроксимация зависимости  $dA/dt$  от  $t$  при  $t > 10$  мин экспоненциальной зависимостью типа (7) дает значение  $k_1$ , равное  $0,097 \pm 0,001 \text{ мин}^{-1}$ . Таким образом, аппроксимация экспериментальных данных уравнениями (4), (5) или (7) дает близкие значения константы скорости реакции первого порядка  $k_1$ .

Анализ литературных данных показывает, что во многих случаях при достаточно больших временах регистрации процесса агрегации цитратсинтазы рост поглощения прекращается и наблюдается снижение величины  $A$ . Это обусловлено, скорее всего, осаждением крупных агрегатов белка. Такая же картина обычно наблюдается и при тепловой агрегации  $\beta_L$ -кристаллина. В качестве примера на рис. 3 представлена кинетика агрегации  $\beta_L$ -кристаллина из хрусталика

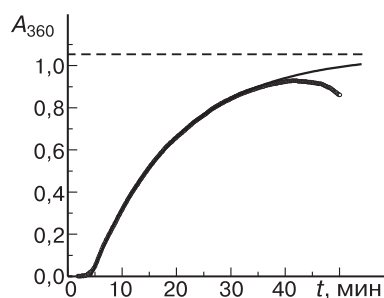


Рис. 3. Кинетика агрегации  $\beta_L$ -кристаллина из хрусталика глаза теленка (55 °С; 50 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,0). Точки – экспериментальные данные [33]. Сплошная кривая проведена по уравнению (5).

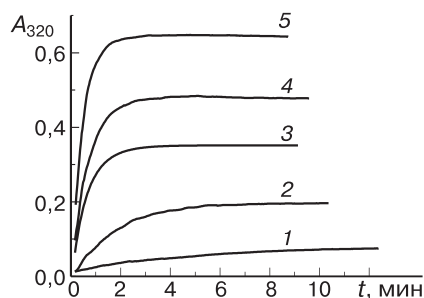


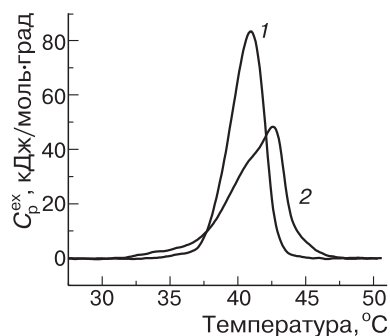
Рис. 4. Кинетика агрегации белка оболочки вируса табачной мозаики при 52 °С, зарегистрированной по увеличению поглощения при 320 нм,  $A_{320}$  (50 мМ фосфатный буфер, рН 8,0) [8]. Концентрация белка: 0,05 (1), 0,1 (2), 0,15 (3), 0,2 (4) и 0,3 мг/мл (5).

глаза теленка (55 °С; 50 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7,0). Значительная часть кинетической кривой (за исключением лаг-периода и области больших значений времени, а именно выше 35 мин) удовлетворительно описывается уравнением (5).

Поскольку агрегация белков включает бимолекулярные стадии (например, стадию роста агрегата, т.е. стадию присоединения белковых молекул к сформировавшимся агрегатам), ясно, что для установления механизма тепловой агрегации белков кинетические исследования должны проводиться в широком диапазоне концентраций белка. При этом важно при помощи независимых методов контролировать скорость денатурации изучаемого белка. Впервые систематические исследования кинетики тепловой агрегации в широком диапазоне концентраций белка с контролем скорости денатурации были проведены в работе [8] на примере агрегации белка оболочки вируса табачной мозаики (БО ВТМ). Агрегацию БО ВТМ при 52 °С изучали в интервале концентраций белка от 0,02 до 0,30 мг/мл (50 мМ фосфатный буфер, рН 8,0). Типичные кинетические кривые увеличения поглощения при 320 нм ( $A_{320}$ ), полученные при различных концентрациях белка, представлены на рис. 4.

Для оценки скорости денатурации БО ВТМ был использован метод дифференциальной сканирующей калориметрии. На рис. 5 помимо температурного профиля избыточной теплоемкости  $C_p^{ex}$  в 50 мМ фосфатном буфере (кривая 1) показан также соответствующий профиль для 100 мМ фосфатного буфера (кривая 2). Проведенный в работе [8] анализ зависимости  $C_p^{ex}$  от температуры для 50 мМ фосфатного буфера показал, что разворачивание белковой молекулы при

Рис. 5. Зависимости избыточной теплоемкости  $C_p^{ex}$  от температуры для белка оболочки вируса табачной мозаики (скорость сканирования температуры 1 град/мин; концентрация белка 1 мг/мл). Концентрация фосфатного буфера: 50 (1) и 100 мМ (2) [8].



52 °С происходит очень быстро: уже спустя 0,1 с степень денатурации составляет 0,999. Таким образом, при 52 °С (50 мМ фосфатный буфер, рН 8,0) весь белок к моменту начала регистрации агрегации оказывается в денатурированном состоянии.

Анализ кинетических кривых агрегации БО ВТМ, полученных при 52 °С (50 мМ фосфатный буфер, рН 8,0), показал, что они следуют кинетике реакции первого порядка. В качестве примера на рис. 6 показана кинетическая кривая агрегации при концентрации белка, равной 0,02 мг/мл. Как видно из рис. 6, а, кинетическая кривая удовлетворительно описывается уравнением (5). Значения кинетических параметров найдены равными:  $A_{lim} = 0,042 \pm \pm 0,001$ ,  $k_1 = 0,21 \pm 0,01 \text{ мин}^{-1}$  и  $t_0 = -0,77 \pm 0,01 \text{ мин}$ . Выполнимость кинетики первого порядка подтверждается также представлением кинетических данных в координатах  $\{dA/dt, A\}$ . Зависимость  $dA/dt$  от  $A$  является линейной для завершающей фазы агрегации (рис. 6, б).

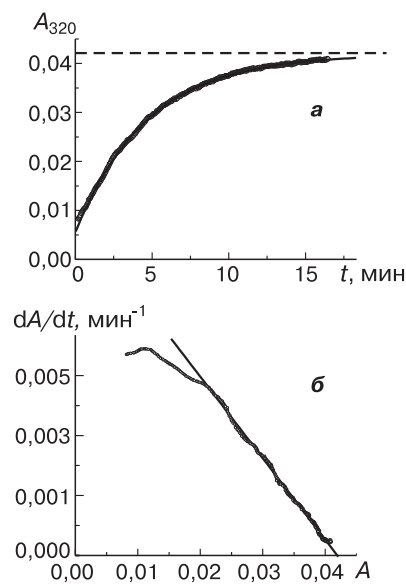


Рис. 6. Анализ кинетики агрегации белка оболочки вируса табачной мозаики при концентрации белка, равной 0,02 мг/мл (52 °С; 50 мМ фосфатный буфер, рН 8,0) [8].

а – Кинетическая кривая в координатах  $\{A_{320}; t\}$ . Точки – экспериментальные данные, сплошная кривая рассчитана по уравнению (5). Горизонтальная штриховая линия соответствует значению  $A_{lim}$ .

б – Представление кинетических данных в координатах  $\{dA/dt; A\}$ .

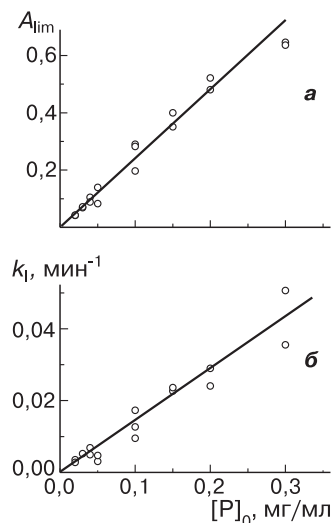


Рис. 7. Зависимости параметров  $A_{lim}$  (a) и  $k_1$  (б) от концентрации белка,  $[P]_0$ , для агрегации белка оболочки вируса табачной мозаики при 52 °С (50 мМ фосфатный буфер, рН 8,0) [8].

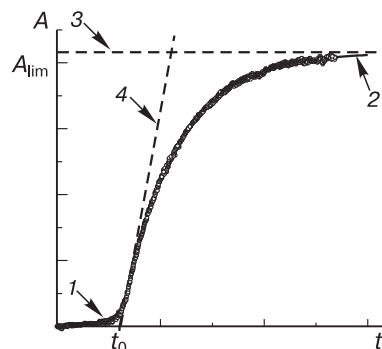


Рис. 8. Иллюстрация физического смысла величины  $k_1 \cdot A_{lim}$ .

1 — экспериментальная зависимость кажущегося поглощения ( $A$ ) от времени,

2 — теоретическая зависимость, соответствующая уравнению (5),

3 — предельное значение  $A$ , соответствующее  $A_{lim}$ ,

4 — касательная, проведенная к кривой 2 в точке с координатами  $t = t_0$  и  $A = 0$ .

Аналогичным образом были рассчитаны значения кинетических параметров и для других концентраций белка. Зависимости  $A_{lim}$  и  $k_1$  от концентрации белка представлены на рис. 7. Линейный характер зависимости параметра  $A_{lim}$  от концентрации белка (рис. 7, а) согласуется с предположением о существовании прямой пропорциональности между кажущимся поглощением и количеством агрегированного белка. Чрезвычайно интересным оказался тот факт, что константа скорости первого порядка  $k_1$  линейно зависит от концентрации белка. Это означает, что константу  $k_1$  следует рассматривать как константу скорости *псевдопервого порядка*.

В работе [7] было предложено использовать произведение  $k_1 \cdot A_{lim}$  в качестве меры начальной скорости агрегации при выполнении первого порядка. Для того чтобы пояснить физический смысл этой величины, воспользуемся рис. 8, на котором представлена схематично экспериментальная зависимость  $A$  от  $t$  и ее аппроксимация теоретическим уравнением (5). Теоретическая кривая пересекает ось времени при  $t = t_0$ . Проведем касательную к теоретической кривой в точке с координатами  $t = t_0$  и  $A = 0$ . Наклон этой касательной равен  $k_1 \cdot A_{lim}$ . Таким образом, произведение  $k_1 \cdot A_{lim}$  представляет собой начальную



скорость агрегации (выраженную в единицах оптической плотности в единицу времени) в предположении, что процесс агрегации следует кинетике реакции первого порядка.

Воспользуемся подобным подходом для того, чтобы охарактеризовать вид зависимости начальной скорости агрегации БО ВТМ от концентрации белка. На рис. 9 величина  $k_1 \cdot A_{\text{lim}}$  представлена как функция квадрата концентрации белка. Линейный характер этой зависимости означает, что начальная скорость агрегации БО ВТМ прямо пропорциональна квадрату концентрации белка. Иначе говоря, порядок агрегации по белку, рассчитываемый из зависимости начальной скорости агрегации от  $[P]_0$ , равен 2.

Для характеристики кинетики агрегации БО ВТМ в условиях, когда скорость агрегации может быть сравнима со скоростью денатурации, в работе [8] была повышена концентрация фосфатного буфера (до 100 мМ) и понижена температура опыта. При использовании 100 мМ фосфатного буфера температура, соответствующая максимальному значению  $C_p^{\text{ex}}$ , составляет 42,5 °С (рис. 5, кривая 2). Грубая оценка времени полупревращения для денатурации БО ВТМ при 42 °С, проведенная в работе [8] на основании калориметрических данных, дает величину 0,49 мин<sup>-1</sup>.

Агрегация БО ВТМ при 42 °С была изучена в интервале концентраций белка от 0,01 до 0,40 мг/мл (100 мМ фосфатный буфер, рН 8,0). Типичные кинетические кривые представлены на рис. 10, а в координатах  $\{A/A_{\text{lim}}; t\}$ . Проведенный в работе [8] анализ кинетических кривых показал, что в интервале концентраций БО ВТМ от 0,01 до 0,04 мг/мл кинетические кривые удовлетворительно описываются уравнением (5). При этом кинетические параметры  $A_{\text{lim}}$  и  $k_1$  линейно зависят от концентрации белка, а произведение  $k_1 \cdot A_{\text{lim}}$  параметров прямо пропорционально  $[P]_0^2$ . Если бы обнаруженные кинетические закономерности выполнялись во всем изученном интервале концентраций белка (0,01 до 0,40 мг/мл), то время полупревращения  $t_{1/2}$  должно было бы монотонно снижаться по мере увеличения концентрации белка до нулевого значения (по закону  $t_{1/2} \sim 1/[P]_0$ ). Однако, как видно из

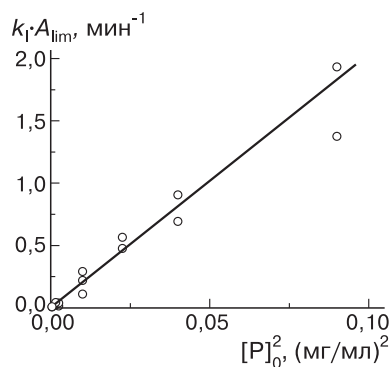


Рис. 9. Зависимость произведения  $k_1 \cdot A_{\text{lim}}$ , характеризующего начальную скорость агрегации, от квадрата концентрации белка оболочки вируса табачной мозаики при 52 °С (50 мМ фосфатный буфер, рН 8,0) [8].

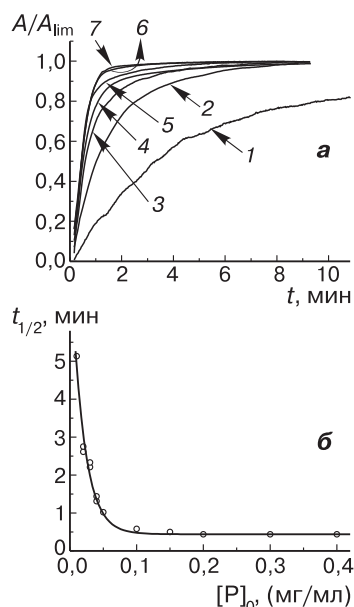


Рис. 10. Кинетика агрегации белка оболочки вируса табачной мозаики при 42 °С (100 мМ фосфатный буфер, рН 8,0).

*а* — Кинетические кривые в координатах  $\{A/A_{\text{lim}}; t\}$ . Концентрация белка: 0,02 (1), 0,05 (2), 0,10 (3), 0,15 (4), 0,20 (5), 0,30 (6) и 0,40 мг/мл (7).

*б* — Зависимость времени полупревращения  $t_{1/2}$  от концентрации белка [8].

кая кривая удовлетворительно описывается экспоненциальной функцией вида  $I = I_{\text{lim}}[1 - \exp(-k_1 t)]$ , где  $I_{\text{lim}}$  — предельное значение интенсивности светорассеяния при  $t \rightarrow \infty$ . Используя найденное значение  $I_{\text{lim}}$ , мы представили кинетическую кривую в координатах  $\{I/I_{\text{lim}}; t\}$  (рис. 11). Одновременно авторы изучили кинетику агрегации по убыли растворимой формы белка. Агрегированный белок отделяли центрифугированием при 20000 г. Были получены, в частности, кинетические кривые при концентрациях  $\beta$ -лактоглобулина, равных 4,8, 7,9 и 16,2 мг/мл. Проведенный нами анализ кинетических кривых убыли растворимого белка показал, что в изученном временном

рис. 10, *б*, с ростом концентрации БО ТМВ время полупревращения стремится к предельному значению ( $t_{1/2} = 0,44$  мин). При этом кинетические кривые в координатах  $\{A/A_{\text{lim}}; t\}$  сливаются в общую кривую при высоких значениях концентрации белка (рис. 10, *а*). На основании подобного характера зависимости времени полупревращения от концентрации белка в работе [8] было сделан вывод о том, что при относительно высоких концентрациях белка скоростью лимитирующей стадией агрегации БО ТМВ становится стадия разворачивания белковой молекулы.

Представляет интерес обсудить данные по кинетике агрегации  $\beta$ -лактоглобулина при 65 °С, представленные Роефсом и Де Круифом [141]. Авторами получены кинетические кривые прироста интенсивности светорассеяния при различных концентрациях белка. Начальная скорость увеличения интенсивности светорассеяния пропорциональна начальной концентрации белка в квадрате. Типичная кинетическая кривая агрегации, полученная при концентрации  $\beta$ -лактоглобулина, равной 13,9 мг/мл, представлена на рис. 11. Проведенный нами анализ показал, что кинетическая

интервале снижение доли растворимого белка ( $\gamma_{\text{sol}}$ ) во времени подчиняется следующему закону:

$$\gamma_{\text{sol}} = (\gamma_{\text{sol}})_{\text{lim}} + [1 - (\gamma_{\text{sol}})_{\text{lim}}] \exp(-k_1 t), \quad (8)$$

где  $(\gamma_{\text{sol}})_{\text{lim}}$  – предельное значение  $\gamma_{\text{sol}}$  при  $t \rightarrow \infty$ . Путем интерполяции нами была построена зависимость  $\gamma_{\text{sol}}$  от времени при концентрации  $\beta$ -лактоглобулина, равной 13,9 мг/мл:  $\gamma_{\text{sol}} = 0,11 + 0,89 \exp(-0,00105t)$  ( $t$  в мин). Долю агрегированного белка ( $\gamma_{\text{agg}}$ ) в изученном временном интервале рассчитывали как  $(1 - \gamma_{\text{sol}}) / [1 - (\gamma_{\text{sol}})_{\text{lim}}]$ . Как видно из рис. 11, существует удовлетворительная корреляция между приростом интенсивности светорассеяния в ходе агрегации и увеличением доли агрегированного белка. Эти данные могут рассматриваться как подтверждение предположения о существовании пропорциональности между мутностью раствора и количеством агрегированного белка.

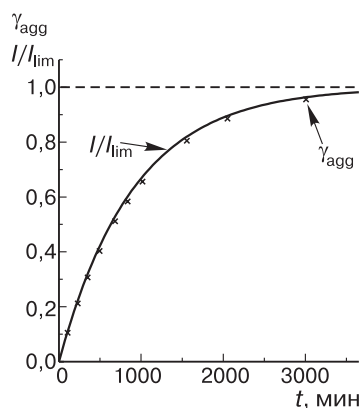


Рис. 11. Сопоставление прироста интенсивности светорассеяния ( $I/I_{\text{lim}}$ ; сплошная кривая) и увеличения доли агрегированного белка ( $\gamma_{\text{agg}}$ ; крестики) при тепловой агрегации  $\beta$ -лактоглобулина (13,9 мг/мл) при 65 °С.

Построено на основании данных, представленных в работе [141].

### КИНЕТИКА АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ В ПРИСУТСТВИИ GuHCl И МОЧЕВИНЫ

Изучение денатурации белков под действием GuHCl или мочевины показало, что в определенном интервале концентраций денатурирующего агента изучаемый белок проявляет повышенную склонность к агрегации. Подобное действие GuHCl или мочевины объясняется тем, что относительно низкие концентрации денатурирующего агента вызывают денатурацию белка и взаимодействие денатурированных молекул приводит к агрегации. В то же время высокие концентрации денатурирующего агента ослабляют белок-белковые взаимодействия, что приводит к повышению растворимости белка и распаду агрегатов [43, 44, 163]. Подобная картина наблюдалась, например, при действии GuHCl на роданезу из печени быка [79], бычий гормон роста [26], рекомбинантный интерферон  $\gamma$  свиньи [172], креатинкиназу из мышц цыпленка [177], G-актин [107], D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу из скелетных мышц кролика [109],

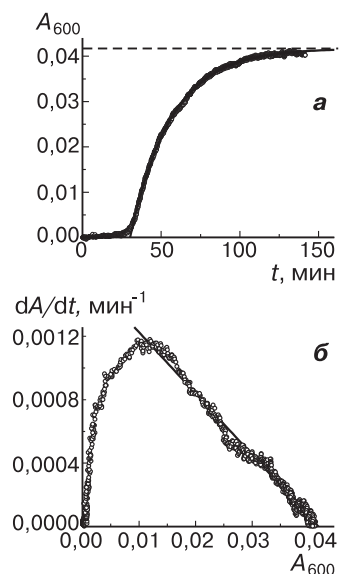


Рис. 12. Кинетика агрегации гликогенфосфорилазы *b* из скелетных мышц кролика в присутствии 1 М  $\text{GuHCl}$  (0,08 М  $\text{Hepes}$ -буфер, рН 6,8; 25 °С). Концентрация белка 0,1 мг/мл.

*a* — Кинетическая кривая в координатах  $\{A_{600}; t\}$  ( $A_{600}$  — поглощение при 600 нм). Точки — экспериментальные данные [2], сплошная кривая рассчитана по уравнению (5).

*б* — Представление кинетических данных в координатах  $\{dA/dt; A\}$ .

зана линеаризация заключительной фазы агрегации в координатах  $\{dA/dt; A\}$ .

Другим примером выполнения первого порядка при агрегации белков в присутствии денатурирующих агентов может служить агрегация синтазы жирных кислот цыпленка в присутствии 3 М мочевины (1 М  $\text{Na}$ -фосфатный буфер, рН 8,0; 37 °С) [14]. Анализ этих данных проведен нами в работе [7] ( $k_1 = 0,0217 \pm 0,0001 \text{ мин}^{-1}$ ).

Кендрик с соавт. [99] изучали кинетику агрегации рекомбинантного интерферона  $\gamma$  человека в присутствии 0,9 М  $\text{GuHCl}$  (25 °С). Количество агрегированного белка определяли путем отделения его в

фосфофруктокиназу-1 из *Saccharomyces cerevisiae* [21] и гликогенфосфорилазу *b* из скелетных мышц кролика [1, 2] и при действии мочевины на триптофаназу из *Escherichia coli* [113], мутантную форму фрагмента антитела к  $\beta$ -галактозидазе человека scFv13R4c [120] и синтазу жирных кислот из печени цыпленка [14, 181]. Тот факт, что степень агрегации белка при умеренных концентрациях денатурирующего агента уменьшается при понижении температуры, указывает на важную роль гидрофобных взаимодействий в «слипании» развернутых белковых молекул [26, 177].

Анализ кинетики агрегации гликогенфосфорилазы *b* в присутствии 1 М  $\text{GuHCl}$  (0,08 М  $\text{Hepes}$ -буфер, рН 6,8; 25 °С) показал, что при относительно низких концентрациях белка завершающая фаза агрегации, прослеженной по увеличению поглощения при 600 нм, следует кинетике реакции первого порядка. В качестве примера на рис. 12, *a* представлена кинетическая кривая агрегации при концентрации гликогенфосфорилазы *b*, равной 0,1 мг/мл [2]. Описание кинетической кривой с использованием уравнения (5) дает следующие значения параметров:  $A_{\text{lim}} = 0,042 \pm 0,001$ ,  $k_1 = 0,038 \pm 0,001 \text{ мин}^{-1}$  и  $t_0 = 30,2 \pm 0,1 \text{ мин}$ . На рис. 12, *б* показана

растворе 5 мМ сукцината натрия (рН 5,0; 5 °С). Было показано, что убыль концентрации нативного неагрегированного белка следует кинетике реакции первого порядка ( $k_1 = 0,033 \text{ мин}^{-1}$ ).

#### АГРЕГАЦИЯ БЕЛКОВ ПРИ КИСЛЫХ ЗНАЧЕНИЯХ РН

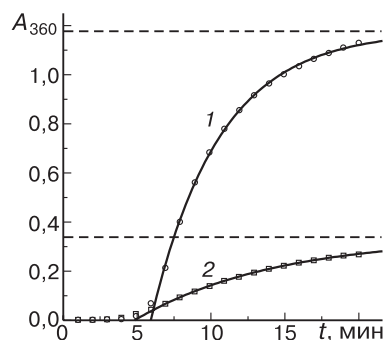
Денатурация белков в кислой области рН может сопровождаться агрегацией денатурированных молекул. Обсудим в качестве примера агрегацию люциферазы светлячка при подкислении раствора фермента до рН 5,5 [174]. Кинетическая кривая агрегации фермента, прослеженной по увеличению поглощения при 360 нм, представлена на рис. 13 (кривая 1). Участок кинетической кривой после прохождения лаг-периода удовлетворительно описывается интегральной формой кинетического уравнения, соответствующего кинетике реакции первого порядка ( $A_{\text{lim}} = 1,18 \pm 0,01$ ,  $k_1 = 0,22 \pm 0,01 \text{ мин}^{-1}$  и  $t_0 = 5,9 \pm 0,1 \text{ мин}$ ). На основании данных по инактивации люциферазы при рН 5,5, представленных автором обсуждаемой работы, нами была рассчитана константа скорости инактивации, которая оказалась равной  $0,20 \pm 0,01 \text{ мин}^{-1}$ . Полученное значение константы скорости первого порядка близко к соответствующему значению, рассчитанному из кинетической кривой агрегации. Полученный результат указывает на то, что скоростью лимитирующей стадией агрегации в изучаемых условиях является денатурация белковой молекулы.

На рис. 13 показано также защитное действие  $\alpha$ -кристаллина при агрегации люциферазы (кривая 2). Кинетическая кривая агрегации в присутствии  $\alpha$ -кристаллина следует экспоненциальному закону ( $A_{\text{lim}} = 0,34 \pm 0,01$ ,  $k_1 = 0,11 \pm 0,01 \text{ мин}^{-1}$  и  $t_0 = 4,8 \pm 0,1 \text{ мин}$ ). Поскольку автором цитированной работы [174] показано, что  $\alpha$ -кристаллин не влияет на скорость инактивации люциферазы, можно сделать заключение, что защитный эффект  $\alpha$ -кристаллина целиком обусловлен его способностью связывать денатурированный белок и удерживать его в форме, не проявляющей склонности к агрегации. Уменьшение

Рис. 13. Кинетика агрегации люциферазы светлячка, индуцируемой подкислением раствора фермента. К исходному раствору фермента в 25 мМ Tricine, рН 7,5, добавлен 0,5 М раствор  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (рН 4,2) до установления рН, равного 5,5 (30 °С).

1 — Контроль (1 мкМ люцифераза),

2 — агрегация фермента в присутствии 0,1 мкМ  $\alpha$ -кристаллина. Точки — экспериментальные данные [174], сплошные кривые рассчитаны по уравнению (5).



величины  $A_{\text{lim}}$  в 3,48 раза в присутствии 0,1 мкМ  $\alpha$ -кристаллина означает, что при этой концентрации шаперона связывается 71% денатурированного белка.

#### АГРЕГАЦИЯ БЕЛКОВ В ПРИСУТСТВИИ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Денатурация белков в органических растворителях приводит к агрегации белков. В качестве примера на рис. 14 показана кинетика агрегации креатинкиназы из скелетных мышц кролика в присутствии 20%-ного 2,2,2-трифторэтанола (экспериментальные данные, полученные Жоу и соавт. [81]). После прохождения лаг-периода кинетические кривые следуют экспоненциальному закону (рис. 14, *a*). Для кинетической кривой агрегации получены следующие значения параметров:  $A_{\text{lim}} = 1,57 \pm 0,01$ ,  $k_1 = 0,24 \pm 0,01 \text{ мин}^{-1}$  и  $t_0 = 1,3 \pm 0,1$  мин. Линеаризация кинетических данных в координатах  $\{dA/dt, A\}$  демонстрируется на рис. 14, *б*.

#### АГРЕГАЦИЯ ИНСУЛИНА В ПРИСУТСТВИИ ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ АГЕНТОВ

Восстановление дисульфидных связей в инсулине дитиотреитолом приводит к высвобождению В цепей, проявляющих склонность к агрегации [77]. Агрегация инсулина в присутствии восстановительных агентов широко используется для оценки способности шаперонов подавлять агрегацию белков. Проведенный нами анализ кинетических кривых прироста мутности при агрегации В цепей инсулина показал, что в определенных случаях заключительная фаза агрегации удовлетворительно описывается уравнением, соответствующим кинетике реакции первого порядка. В качестве примера приведем данные из недавно опубликованной работы Чанга с соотр. [12]. Описание заключительной фазы агрегации уравнением (5) и линеаризация в координатах  $\{dA/dt, A\}$  (рис. 15) подтверждает первый порядок агрегации по белку. Проведенный нами анализ кинетических кривых агрегации инсулина в присутствии дитиотреитола, представленных в работах [49, 68, 106, 148, 160, 162, 165], также указывает на выполнимость кинетики реакции первого порядка. В тех случаях, когда  $n = 1$ , кинетика агрегации В цепей инсулина может быть охарактеризована тремя параметрами ( $A_{\text{lim}}$ ,  $k_1$  и  $t_0$ ).

Однако более полный анализ представленных в литературе кинетических кривых агрегации В цепей инсулина показывает, наиболее типичными являются кинетические кривые, для которых при достаточно больших временах поглощение растет пропорционально величине  $t$ . Обсудим в качестве примера кинетическую кривую агрегации В цепей инсулина, представленную в работе [140] (рис. 16, *a*).

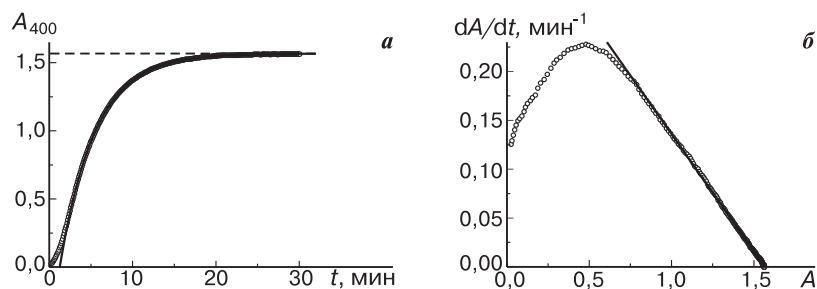


Рис. 14. Агрегация белков в присутствии органических растворителей. Агрегация креатинкиназы из скелетных мышц кролика (2,78 мкМ) в 50 мМ Tris-HCl-буфере, рН 8,0, содержащем 20% 2,2,2-трифторэтанола.

*a* — Кинетика агрегации, прослеженная по увеличению поглощения при 400 нм. Точки — экспериментальные данные [81], сплошная кривая рассчитана по уравнению (5).

*б* — Кинетическая кривая в координатах  $\{dA/dt; A\}$ .

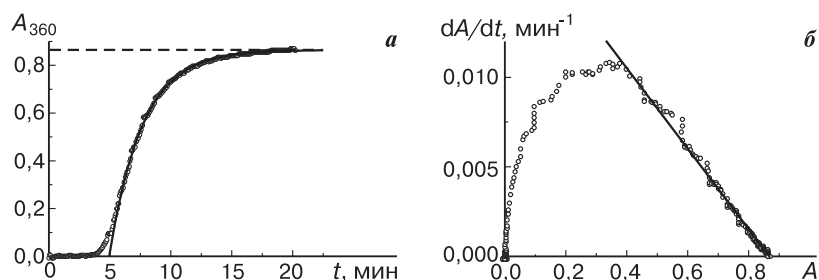


Рис. 15. Агрегация В цепей бычьего инсулина (60 мкМ), инициированная добавлением 20 мМ дитиотреитола (37 °С).

*a* — Зависимость поглощения при 360 нм от времени. Точки — экспериментальные данные [12], сплошная кривая рассчитана по уравнению (5).

*б* — Представление кинетических данных в координатах  $\{dA/dt; A\}$ .

На рис. 16, *б* показана зависимость производной  $dA/dt$  от времени. Как указывалось выше, в случае выполнения первого порядка зависимость  $dA/dt$  от времени является экспоненциальной. Однако для обсуждаемой кинетической кривой величина  $dA/dt$  стремится при  $t \rightarrow \infty$  не к нулю, а к конечной величине. Зависимость  $dA/dt$  от времени описывается следующим уравнением:

$$dA/dt = (dA/dt)_{\lim} + [(dA/dt)_0 - (dA/dt)_{\lim}] \exp(-k_1 t), \quad (9)$$

где  $(dA/dt)_0$  и  $(dA/dt)_{\lim}$  — значения  $dA/dt$  при  $t = 0$  и  $t \rightarrow \infty$  соответственно.

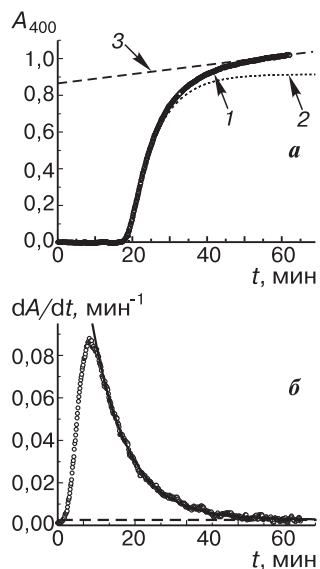


Рис. 16. Отклонения от кинетики первого порядка при агрегации инсулина в присутствии восстановительных агентов.

*a* — Кинетика агрегации инсулина из поджелудочной железы быка в присутствии 20 мМ дитиотреитола, прослеженная по увеличению поглощения при 400 нм (25 °С). Точки — экспериментальные данные [140]. Сплошная кривая 1 рассчитана по уравнению (10). Штриховая кривая 2 — экспоненциальный член, определяемый уравнением (5), и штриховая кривая 3 — асимптота при  $t \rightarrow \infty$ .

*б* — Представление кинетических данных в координатах  $\{dA/dt; t\}$ . Точки — экспериментальные данные. Сплошная кривая рассчитана по уравнению (9). Горизонтальная штриховая линия — предельное значение  $dA/dt$  при  $t \rightarrow \infty$ .

Постоянство величины  $dA/dt$  при достаточно больших значениях времени означает, что зависимость  $A$  от  $t$  с ростом времени выходит на участок, имеющий постоянный наклон. Для описания кинетической кривой агрегации, включающей экспоненциальный член и линейный член при больших временах, уравнение (5) может преобразовано следующим образом:

$$A = A_{\text{lim}} \{1 - \exp[-k_1(t - t_0)]\} + \beta(t - t_0) \quad (10)$$

( $\beta$  — константа). На рис. 16, *a* сплошная кривая 1 показывает аппроксимацию заключительной фазы агрегации В цепей инсулина уравнением (10). Пунктирная линия 2 соответствует экспоненциальному члену кривой ( $A_{\text{lim}} = 0,92 \pm 0,01$ ,  $k_1 = 0,138 \pm 0,001 \text{ мин}^{-1}$  и  $t_0 = 19,0 \pm 0,5 \text{ мин}$ ). Пунктирная линия 3 соответствует асимптоте при  $t \rightarrow \infty$  ( $\beta = 0,0025 \pm 0,0001 \text{ мин}^{-1}$ ). Анализ агрегации инсулина в присутствии дитиотреитола показывает, что уравнение (10) удовлетворительно выполняется для кинетических кривых, представленных в работах [29, 39, 55, 71, 104, 138, 156, 157, 169, 182]. Одно из объяснений отклонений агрегации В цепей инсулина от кинетики первого порядка может состоять в следующем. Мы полагаем, что увеличение мутности раствора связано прежде всего с ростом уже сформировавшихся ядер агрегатов путем присоединения к ним развернутых В цепей. Помимо этого основного процесса может протекать более медленная ассоциация ядер агрегатов. Выход кинетической кривой на линейную асимптоту при больших значениях времени означает, что побочный



процесс слипания ядер агрегатов в изученном масштабе времени грубо описывается линейной зависимостью  $A$  от  $t$ . Очевидно, что для более глубокого понимания механизма агрегации инсулина в присутствии восстановительных агентов необходимы исследования кинетики агрегации в широком интервале концентраций белка.

#### АГРЕГАЦИЯ, СОПРОВОЖДАЮЩАЯ РЕФОЛДИНГ БЕЛКОВ

В определенных случаях белки, денатурированные действием  $\text{GuHCl}$  или мочевины при высоких концентрациях денатурирующих агентов, проявляют способность к восстановлению нативной структуры после снижения концентрации денатурирующего агента. Рефолдинг сопровождается агрегацией белка, и выход нативного белка уменьшается по мере увеличения концентрации белка [42, 66, 75, 88–90, 93, 113, 115, 167, 172, 183]. Структура агрегатов, образующихся, например, при рефолдинге лактатдегидрогеназы из скелетных мышц свиньи после обработки фермента 6 М  $\text{GuHCl}$ , была изучена с использованием методов электронной микроскопии и кругового дихроизма [183]. Агрегаты представляют собой неупорядоченную сетку из нитей, структурные элементы которых по размеру в 10–15 раз превышают нативный тетрамер (молекулярная масса тетрамера –  $1,4 \cdot 10^5$  Да). Молекулярная масса агрегатов составляет несколько миллионов дальтон. Агрегаты формируются из индивидуальных мономерных цепей, обладающих частично восстановленной вторичной структурой.

Прежде всего интересно обсудить вопрос о пропорциональности между приростом мутности раствора и количеством агрегированного белка. В работе Дженнингс с сотр. [61] изучалась агрегация, сопровождающая рефолдинг мутантной формы интерлейкина  $1\beta$  K971, в которой лизин 97 заменен на изолейцин, после денатурирующего воздействия 2,2 М  $\text{GuHCl}$ . Для определения количества белка, остающегося в растворимой форме, раствор белка подвергали центрифугированию при 7000 g и проводили измерение оптической плотности при 280 нм. Подобные измерения позволяют оценить количество агрегированного белка. На рис. 17 представлены полученные авторами цитированной работы зависимости доли агрегированного белка и поглощения при 500 нм от общей концентрации мутантной формы интерлейкина  $1\beta$  K971. Как видно, существует удовлетворительная корреляция между приростом мутности и количеством агрегированного белка.

В ряде работ скорость агрегации белка в условиях рефолдинга изучалась при различных концентрациях белка. Интересно, что порядок агрегации по белку ( $n_c$ ), рассчитываемый из зависимости начальной скорости агрегации от начальной концентрации белка, оказался близким к 2. Это было показано, например, для агрегации лактатде-

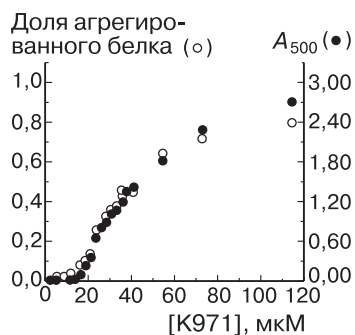


Рис. 17. Зависимости доли агрегированного белка и поглощения при 500 нм от общей концентрации мутантной формы интерлейкина 1 $\beta$  K971 при рефолдинге белка, предварительно денатурированного 2,2 М GuHCl [61].

гидрогеназы из скелетных мышц свиньи при рефолдинге фермента, предварительно денатурированного GuHCl ([183];  $n_c = 2,5 \pm 0,1$ ), и для агрегации мутантной формы фрагмента антитела к  $\beta$ -галактозидазе scFv13R4c при рефолдинге белка, предварительно денатурированного 7,5 М мочевиной ([120];  $n_c = 2,0 \pm 0,1$ ). Данные подобного рода указывают на то, что агрегация белка в изучаемых условиях является бимолекулярной реакцией.

В то же время проведенный нами анализ индивидуальных кинетических кривых агрегации белков при проведении рефолдинга показывает, что во многих случаях протекающая

во времени агрегация следует кинетике реакции первого порядка. Это обнаруживается для кинетических кривых агрегации при рефолдинге лактатдегидрогеназы (при достаточно малых концентрациях фермента) и рефолдинге мутантной формы фрагмента антитела к  $\beta$ -галактозидазе scFv13R4c (анализ подобных кривых был проведен в работе [7]).

Обсудим в качестве примера агрегацию белка  $\Delta$ F-NBD1, предварительно денатурированного 6 М GuHCl (сокращение  $\Delta$ F-NBD1 соответствует  $\Delta$ F508 мутантной формы нуклеотид-связывающего домена 1 регулятора трансмембранной проводимости кистозного фиброза). На рис. 18, а показана кинетическая кривая агрегации  $\Delta$ F-NBD1 после 240-кратного разбавления раствора белка, содержащего 6 М GuHCl [164]. Анализ завершающей фазы агрегации с использованием уравнения (5) и представление кинетических данных в координатах  $\{dA/dt; A\}$  (рис. 18, б) указывает на подчинение агрегации кинетике реакции первого порядка ( $A_{\text{lim}} = 0,21 \pm 0,01$ ,  $k_1 = 0,034 \pm 0,001$  мин<sup>-1</sup> и  $t_0 = 8,2 \pm 0,1$  мин).

Для испытания способности шаперонов подавлять агрегацию белков широко применяются тест-системы, в которых изучается агрегация роданезы из печени быка и люциферазы светлячка в условиях проведения рефолдинга. На рис. 19, а показана кинетика агрегации роданезы после разбавления раствора фермента, денатурированного 6 М GuHCl [122]. Кинетическая кривая удовлетворительно описывается уравнением, соответствующим кинетике реакции первого порядка ( $A_{\text{lim}} = 107 \pm 1$ ,  $k_1 = 0,26 \pm 0,01$  мин<sup>-1</sup> и  $t_0 = 0$ ). Как показал проведенный нами анализ, аналогичная картина наблюдается для

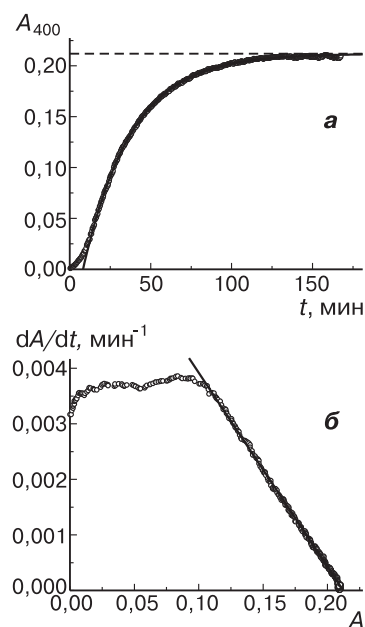


Рис. 18. Анализ кинетики агрегации  $\Delta F$ -NBD1 ( $\Delta F508$  мутантной формы нуклеотид-связывающего домена 1 регулятора трансмембранной проводимости кистозного фиброза). Раствор белка  $\Delta F$ -NBD1, предварительно денатурированного 6 М GuHCl, был разбавлен в 240 раз. Конечная концентрация белка составляла 2 мкМ (100 мМ Tris-HCl-буфер, pH 7,4; 37 °C).

*a* — Зависимость поглощения при 400 нм от времени. Точки — экспериментальные данные [164], сплошная кривая рассчитана по уравнению (5).

*б* — Представление кинетических данных в координатах  $\{dA/dt; A\}$ .

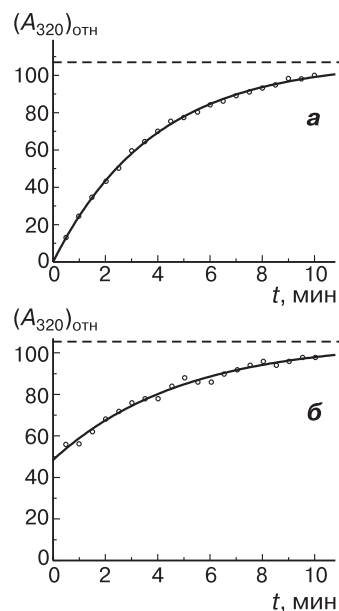


Рис. 19. Агрегация, сопровождающая рефолдинг белков.

*a* — Кинетика агрегации роданезы из печени быка после 100-кратного разбавления раствора фермента, денатурированного 6 М GuHCl. Точки — экспериментальные данные [122], сплошная кривая рассчитана по уравнению (5). Конечная концентрация белка 0,46 мкМ.

*б* — Кинетика агрегации люциферазы светлячка после 126-кратного разбавления раствора фермента, денатурированного 6 М GuHCl. Точки — экспериментальные данные [74], сплошная кривая рассчитана по уравнению (6).  $(A_{320})_{отн}$  — оптическая плотность при 320 нм, отнесенная к значению  $A_{320}$  при  $t = 10$  мин.

кинетических кривых агрегации роданезы, полученных в работах [20, 38, 178] при изучении рефолдинга фермента.

Агрегация люциферазы после разбавления раствора фермента, денатурированного 6 М GuHCl (данные работы [74]; рис. 19, б), является примером кривой, включающей быстрый прирост мутности и относительно медленный участок, подчиняющийся кинетике первого порядка. Для описания медленного участка нами использовано уравнение (6). При этом были получены следующие значения параметров:  $A_0 = 48 \pm 2$ ,  $A_{\text{lim}} = 105 \pm 3$  и  $k_i = 0,20 \pm 0,02 \text{ мин}^{-1}$ . Как показал проведенный нами анализ, первый порядок агрегации люциферазы после разбавления фермента, денатурированного GuHCl, наблюдается также для кинетических кривых, полученных в работах [149, 154].

Тот факт, что агрегация, сопровождающая рефолдинг белков, в определенных случаях следует кинетике реакции первого порядка, является неожиданным. Действительно, обычно допускается, что рефолдинг протекает с образованием интермедиатов ( $I_i$ ), дальнейшее превращение которых может осуществляться по двум путям, один из которых ведет к нативному состоянию (N), а другой – к белковым агрегатам [10, 36, 44, 57, 60, 61, 66, 85, 87, 88–90, 91–93, 101, 113, 124, 161, 179, 180, 183]:

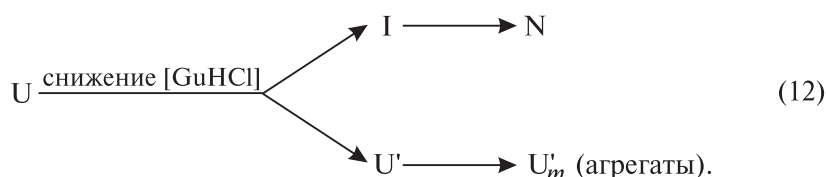


U – развернутое состояние белка в растворе денатурирующего агента. Некоторые авторы допускают агрегацию U, что учтено в приведенной схеме.

Представляется маловероятным, что в условиях конкуренции двух процессов (превращение интермедиата в нативную форму и агрегация интермедиата) процесс агрегации будет следовать кинетике реакции первого порядка. На наш взгляд, достаточно обоснованные кинетические модели рефолдинга белков, сопровождающегося агрегацией, могут быть предложены только после того, как будут сформулированы кинетические механизмы агрегации на основании кинетических исследований агрегации в широком интервале концентраций белка.

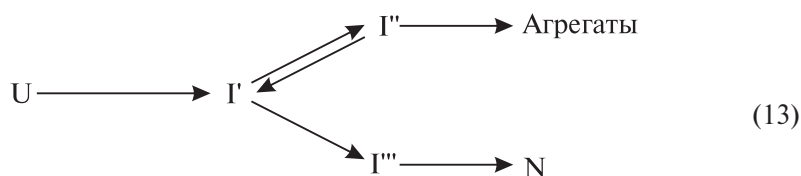
Для объяснения первого порядка по белку для протекающей во времени агрегации в условиях проведения рефолдинга белка в работе [7] был предложен следующий механизм. Допустим, что исходным состоянием белка в растворе GuHCl достаточно высокой концентрации является полностью развернутое состояние U. Предположим, что

при разбавлении часть  $U$  относительно быстро превращается в интермедиат  $I$ , далее трансформирующийся в нативную форму  $N$ , а оставшаяся часть  $U$  остается в развернутой форме, не способной к ренатурации (обозначим эту форму через  $U'$ ). Наблюдаемая во времени агрегация обусловлена «слипанием» состояний  $U'$ . Общая схема рефолдинга имеет следующий вид [7]:



В этой схеме стадия трансформации интермедиата  $I$  в нативное состояние и стадия агрегации  $mU' \rightarrow U'_m$  протекают независимо друг от друга. В рамках обсуждаемой схемы агрегация сходна с тепловой агрегацией белка в условиях, когда за относительно короткий промежуток времени весь белок оказывается в развернутой форме (например, при высоких температурах) и регистрируемая во времени агрегация целиком связана с взаимодействием развернутых форм. Учитывая это обстоятельство, можно ожидать, что в рамках обсуждаемой схемы агрегация в завершающей фазе процесса будет следовать кинетике реакции первого порядка, как это обычно имеет место при тепловой агрегации.

Обсуждаемая схема рефолдинга белка, сопровождаемая агрегацией, близка к схеме, предложенной Горовитцем с сотр. для рефолдинга роданезы [67]. Авторы этой работы допускают, что при снижении концентрации денатурирующего агента происходит переход денатурированного состояния  $U$  в компактное состояние  $I'$ . Из этого промежуточного состояния относительно быстро образуются два состояния, одно из которых ( $I'''$ ) далее превращается в нативное состояние ( $N$ ), а другое ( $I''$ ) дает агрегаты:



В том случае, когда обратный переход  $I''$  в  $I'$  является очень медленным, схема Горовитца с соавт. становится практически эквивалентной схеме (12), предложенной в работе [7].

### ОБРАЗОВАНИЕ ТЕЛ ВКЛЮЧЕНИЯ

Рекомбинантные белки, продуцируемые в *Esherichia coli*, часто агрегируют и образуют тела включения (inclusion bodies) [30, 34, 41, 69, 105]. Сверхэкспрессия приводит к высоким локальным концентрациям интермедиатов фолдинга, значительная часть которых из-за конкуренции между реакциями фолдинга и реакциями агрегации оказывается включенной в нерастворимый осадок. Агрегация создает серьезные проблемы в биотехнологических производствах, поскольку она осложняет выделение и очистку рекомбинантных белков. Анализ кинетики образования тел включения, проведенный в работе [76], показал, что включение мономеров в осадок следует кинетике реакции первого порядка (при допущении снижения скорости продуцирования начального продукта трансляции во времени по экспоненциальному закону). Авторы цитированной работы проводят аналогию между кинетикой образования тел включения и кинетикой включения амилоид- $\beta$ -белка в фибриллярные амилоидные бляшки, образующиеся при болезни Альцгеймера [54] (см. также [83, 96, 111, 112, 130, 131]).

### III. МЕХАНИЗМ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ

Процесс агрегации включает взаимодействие двух (или нескольких) молекул белка, находящихся в развернутом состоянии. Поэтому многие исследователи полагают, что протекающая во времени агрегация следует кинетике реакции второго (или более высокого) порядка [66, 85, 86, 88–90, 92, 93, 100, 183]. Например, в часто цитируемой теоретической работе Киефхабера с соавт. [100] предполагается, что скорость агрегации контролируется начальной стадией димеризации, за которой следуют более быстрые стадии агрегации, приводящие к образованию агрегата с числом агрегации  $N$ . При сделанных допущениях скорость протекающей во времени агрегации пропорциональна квадрату текущей концентрации денатурированных молекул  $D$ :

$$(d[D]/dt)_{\text{agg}} = Nk_{II}[D]^2, \quad (14)$$

( $k_{II}$  – константа скорости реакции второго порядка).

Однако, как показал проведенный нами анализ, протекающая во времени необратимая агрегация белков, вызываемая действием тепла или денатурирующих агентов (а также агрегация, сопровождающая рефолдинг), в завершающей фазе процесса следует во многих случаях кинетике реакции первого порядка.

Исследования тепловой агрегации БО ТМВ [8] свидетельствуют о том, что в области относительно низких концентраций белка

завершающая фаза процесса агрегации следует кинетике первого порядка, причем константа скорости реакции первого порядка является функцией концентрации белка и линейно растет с ростом  $[P]_0$ . Произведение параметров  $k_1 \cdot A_{lim}$ , характеризующее начальную скорость агрегации, пропорционально квадрату концентрации белка. Таким образом, порядок агрегации по белку ( $n_c$ ), рассчитываемый из значений текущей скорости (т.е. из кинетической кривой), равен единице, в то время как величина  $n_c$ , рассчитываемая из зависимости начальной скорости агрегации от начальной концентрации белка, равна 2.

В работе [8] была предложена кинетическая модель, которая позволяет объяснить подобную кинетическую закономерность процесса тепловой денатурации. Ясно, что модель, в которой скорость лимитирующей стадией процесса агрегации является бимолекулярная реакция взаимодействия развернутых состояний белковой молекулы (как это предполагалось, например, в теоретической работе [100]), является непригодной. Единственной моделью, способной объяснить различие в величинах порядка реакции агрегации по белку, рассчитываемых из кинетической кривой и из зависимости начальной скорости агрегации от начальной концентрации белка, является модель ассоциации белков, которая включает стадию образования ядра ассоциата — стадию нуклеации (model of nucleation-dependent polymerization). Эта модель была предложена Оосава и Касаи [132] и включает следующие обратимые стадии: стадию нуклеации



(M — мономер и  $M_n$  — ядро) и стадию роста ассоциата



Если говорить о применимости подобной модели к тепловой агрегации белка, то прежде всего следует обратить внимание на то обстоятельство, что при использовании достаточно малых концентраций белка весь белок на начальных стадиях регистрации агрегации оказывается в денатурированном состоянии. Иначе говоря, стадию  $N \rightarrow D$  можно считать полностью завершенной. Таким образом, мономеру M в реакциях (15) и (16) соответствует денатурированная форма D.

Далее, если признать стадию нуклеации обратимой, то комбинация обратимой стадии нуклеации и необратимой стадии роста агрегата не может обеспечить первый порядок агрегации по мономеру D. К этому заключению можно придти на основе анализа приведенной в

работе [83] кинетической схемы, включающей обратимые стадии нуклеации и роста ассоциата (при проведении подобного анализа константу скорости распада ассоциата  $M_{j+1}$  в соответствующих выражениях следует приравнять к нулю).

Для того чтобы объяснить выполнение первого порядка по белку для протекающего во времени процесса агрегации, следует предположить, что, во-первых, стадия зародышеобразования (нуклеации) является необратимой и протекает очень быстро по сравнению со скоростью стадии роста агрегата, и, во-вторых, концентрация зародышей (ядер) остается неизменной в ходе агрегации.

Предложенная в работе [8] схема агрегации денатурированных (D) молекул включает стадию зародышеобразования



(D – мономер, R – ядро, зародыш агрегата) и стадию роста агрегата



(R' – ядро, содержащее дополнительную молекулу D).  $k_{II}^{\text{macro}}$  представляет собой макроскопическую константу скорости реакции второго порядка.

В общем случае ядро R содержит несколько точек роста (т.е. центров, по которым происходит присоединение мономеров D). Обозначим через  $\Omega$  точку роста агрегата, а через  $j$  – число точек роста в ядре R. Если  $[R]$  – молярная концентрация ядер, то молярная концентрация точек роста равна  $j[R]$ . Условие постоянства концентрации ядер эквивалентно условию неуничтожимости точек роста и их постоянства в ходе агрегации:



где  $k_{II}^{\text{micro}}$  – микроскопическая константа скорости реакции второго порядка. Справедливо следующее соотношение между микроскопической и макроскопической константами скорости реакции второго порядка:  $k_{II}^{\text{macro}} = j k_{II}^{\text{micro}}$ .

Скорость агрегации, выраженная как убыль концентрации мономеров D, имеет следующий вид:

$$v_{\text{agg}} = -d[D]/dt = k_{II}^{\text{macro}} [R][D] = k_{II}^{\text{micro}} [\Omega][D] = k_1 [D]. \quad (20)$$

В этом выражении  $k_1$  – константа скорости реакции псевдопервого порядка:  $k_1 = k_{II}^{\text{macro}} [R] = k_{II}^{\text{micro}} [\Omega]$ .



Если экспериментально определяемая константа скорости реакции первого порядка  $k_1$  линейно растет при увеличении начальной концентрации белка, это означает, что концентрация ядер  $[R]$  (или концентрация точек роста  $[\Omega]$ ) прямо пропорциональна  $[P]_0$ .

Неуничтожимость точек роста ядер агрегатов означает, что процесс агрегации белков сходен с химическими *цепными реакциями*, в основе которых лежит принцип неуничтожимости свободной валентности. Цепные реакции были открыты Н.Н.Семеновым [15, 16]. За это открытие ему была присуждена Нобелевская премия. По цепному механизму протекает ряд важных классов химических реакций, таких как окисление молекулярным кислородом, хлорирование и бромирование многих соединений, ряд реакций термического распада и многие реакции цепной полимеризации. Свободные радикалы, участвующие в цепной реакции, называют *активными центрами* цепной реакции. В нашей терминологии активные центры цепной реакции агрегации белка — это точки роста агрегата. Основными стадиями химической цепной реакции являются стадия зарождения цепей, стадия продолжения цепей и стадия обрыва цепей. Зарождением цепей называется стадия цепной реакции, приводящая к образованию свободных радикалов из валентно-насыщенных молекул. Если говорить об агрегации белков, то этой стадии соответствуют стадия разворачивания белковой молекулы и стадия нуклеации. Реакциями продолжения цепи называют элементарные стадии цепной реакции, идущие с сохранением свободной валентности и приводящие к расходованию исходных веществ и образованию продуктов реакции. При рассмотрении агрегации белков этой стадии соответствует стадия роста агрегата, протекающая с сохранением точки роста агрегата. Обрывом цепей называют стадии цепного процесса, приводящие к исчезновению свободной валентности. Обрыв цепей может происходить в результате захвата свободного радикала стенкой реакционного сосуда или в результате взаимного насыщения свободных валентностей при взаимодействии двух свободных радикалов. Если говорить об агрегации белков, то прежде всего следует отметить, что при использовании относительно низких концентраций белков следует учитывать возможное участие поверхности реакционного сосуда в процессе денатурации белка. Известно, что в этом случае константа скорости денатурации растет по мере снижения концентрации белка и пропорциональна отношению поверхности сосуда к объему раствора [4, 9]. Вопрос об участии белка, денатурированного на поверхности сосуда, в процессах агрегации остается пока неизученным. Если говорить о взаимодействии ядер агрегатов, несущих точки роста, то подобное взаимодействие ведет не только к исчезновению определенного числа

точек роста, но и, что важно с точки зрения анализа кинетики агрегации, к нарушению предположения о пропорциональности между мутностью раствора и количеством агрегированного белка. Взаимодействия подобного рода, ведущие в конечном счете к преципитации агрегированного белка, становятся существенными по мере увеличения начальной концентрации белка.

Цепные реакции, идущие без разветвления цепей, называют неразветвленными цепными реакциями. В этом случае на стадии продолжения цепи из активного центра образуется один новый активный центр. Проводя аналогию между агрегацией белка и химическими цепными реакциями, мы можем сказать, что *агрегация белка является неразветвленной цепной реакцией*. Строго говоря, это утверждение справедливо только в приложении к стадии роста агрегата. Если же говорить о стадии нуклеации, что она является, очевидно, разветвленной цепной реакцией, поскольку суть этой стадии состоит в формировании ядра, имеющего несколько точек роста (несколько активных центров). Более того, именно такой подход к стадии нуклеации позволяет дать строгое определение длительности этой стадии. Рост исходного ядрышка сопровождается увеличением числа точек роста, содержащихся в ядрышке. Начиная с определенного размера ядрышка, число точек роста достигает предельного значения и это означает, что процесс нуклеации для этого ядрышка закончен. Далее, образовавшееся ядро растет путем присоединения «мономеров» (денатурированных молекул белка) без изменения числа точек роста в этом ядре.

Вещества, добавление которых в идущую цепную реакцию приводит к замене активных свободных радикалов, ведущих цепь, на малоактивные, не способные к продолжению цепей, называют ингибиторами цепных реакций. Таким образом, шапероны, блокирующие агрегацию белкового субстрата, могут быть названы ингибиторами цепной реакции агрегации белка. Функция шаперона состоит в том, что полностью заблокировать точки роста белкового агрегата (т.е. активные центры цепной реакции).

В области относительно низких концентраций белка скорость-лимитирующей стадией процесса агрегации является стадия роста агрегата. Поскольку начальная скорость разворачивания белковой молекулы пропорциональна концентрации белка в первой степени, а начальная скорость агрегации пропорциональна  $[P]_0^2$ , можно ожидать, что при достаточно высоких концентрациях белка скорость-лимитирующей стадией будет стадия денатурации белка. Такая ситуация действительно реализуется при относительно высоких концентрациях БО ТМВ (при 42 °С) [8].

Таким образом, кинетический механизм агрегации меняется при варьировании концентрации белка. Условно можно выделить три области концентраций белка.

*Область относительно низких концентраций белка.* При достаточно низких значениях  $[P]_0$  скоростью лимитирующей стадией процесса агрегации является стадия роста агрегата на зародышах, концентрация которых остается постоянной в ходе агрегации. Агрегация (в завершающей фазе) следует кинетике реакции первого порядка, причем величина  $k_1$  является линейной функцией концентрации белка. Начальная скорость агрегации, выраженная как произведение  $k_1 \cdot A_{\text{lim}}$ , пропорциональна  $[P]_0^2$ . Кинетическая схема агрегации имеет следующий вид:



Для механизма агрегации, который реализуется в области малых концентраций белка, можно предсказать, что размер конечных агрегатов не должен зависеть от начальной концентрации белка. Это происходит потому, что концентрация зародышей, на которых идет рост агрегатов, растет в той же мере, в какой повышается начальная концентрация белка, и конечная степень агрегации остается неизменной. Экспериментальным подтверждением этого предсказания могут служить, по-видимому, данные работы [150], в которой было показано, что размер конечных агрегатов  $\beta$ -лактоглобулина, образующихся при тепловой агрегации белка ( $80^\circ\text{C}$ ), остается практически неизменным при варьировании начальной концентрации белка. При выбранном авторами значении рН (2,5) в образовании агрегатов участвуют только нековалентные взаимодействия. Важно подчеркнуть, что судя по характеру зависимости начальной скорости снижения доли растворимого белка от начальной концентрации белка, авторы проводили эксперименты в области, где порядок агрегации по белку равен 2.

*Область относительно высоких концентраций белка.* При достаточно высоких значениях  $[P]_0$  скоростью лимитирующей стадией процесса агрегации является стадия разворачивания белковой молекулы. Если разворачивание протекает как необратимая мономолекулярная реакция, агрегация (в завершающей фазе) следует кинетике реакции первого порядка, причем величина  $k_1$  остается постоянной при варьировании концентрации белка и совпадает с соответствующим значением для процесса разворачивания белковой молекулы. Начальная скорость агрегации, выраженная как произведение  $k_1 \cdot A_{\text{lim}}$ , пропорциональна  $[P]_0$ . Кинетическая схема агрегации имеет следующий вид:



То обстоятельство, что тепловая агрегация (в завершающей фазе) следует кинетике реакции первого порядка при достаточно малых и достаточно больших концентрациях белка (в последнем случае при условии одностадийности процесса тепловой денатурации), объясняет тот факт, почему во многих случаях кинетика тепловой агрегации описывается экспоненциальным законом.

Как следует из изложенного в настоящем разделе механизма тепловой агрегации белков, величина константы скорости разворачивания белковой молекулы представляет собой верхний предел для константы скорости первого порядка  $k_1$ , рассчитываемой из кинетической кривой агрегации. Анализ данных, представленных в таблице, показывает, что действительно между величиной  $k_1$ , рассчитанной из кинетических кривых тепловой агрегации ( $k_1^{\text{agg}}$ ), и величиной  $k_1$ , оцененной из кинетических кривых тепловой инактивации ( $k_1^{\text{inact}}$ ), выполняется подобное соотношение:  $k_1^{\text{agg}} \leq k_1^{\text{inact}}$ .

*Область промежуточных концентраций белка.* Эта область значений  $[P]_0$  соответствует ситуации, когда скорость разворачивания белковой молекулы сравнима со скоростью агрегации денатурированных молекул. В этом случае нет оснований ожидать, что агрегация будет следовать кинетике реакции первого порядка. Отметим, что механизм агрегации белков, включающий стадию необратимой денатурации, стадию нуклеации и стадию роста агрегатов, при допущении сравнимых скоростей стадии разворачивания белковой молекулы и стадии роста агрегата был использован в работе [6] для анализа *начальных* участков кинетических кривых тепловой агрегации белков. Было показано, что после завершения стадии нуклеации кинетика агрегации следует закону:  $A \sim t^2$  (или  $dA/dt \sim t$ ).

Кинетический режим агрегации зависит не только от начальной концентрации белка, но и от условий проведения эксперимента (температура, ионная сила, рН, вязкость среды). Изменение условий может привести к смене кинетического режима агрегации. Один из примеров изменения кинетического режима агрегации при изменении условий среды содержится в работе [8]. Агрегация БО ВТМ при концентрации белка, равной 0,3 мг/мл, в условиях, когда температура равна 42 °С, а концентрация буфера составляет 100 мМ (рН 8,0), протекает в режиме, когда скоростьюлимитирующей стадией процесса агрегации является стадия разворачивания белковой молекулы. Повышение температуры до при 52 °С с одновременным снижением концентрации буфера до 50 мМ приводит к установлению кинетического режима, при котором скоростьюлимитирующей стадией процесса агрегации является стадия роста агрегата.

#### IV. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ШАПЕРОННОЙ АКТИВНОСТИ

В тех случаях, когда агрегация белкового субстрата следует кинетике реакции первого порядка, параметры  $A_{\text{lim}}$  (или  $I_{\text{lim}}$ ),  $k_1$  и  $t_0$  могут быть использованы для количественной оценки эффективности действия шаперона в тест-системах, основанных на подавлении агрегации белка. Рассмотрим в качестве примера результаты изучения шаперонной активности С-концевого домена (остатки 518–803) регулируемого глюкозой белка (glucose-regulated protein; grp94) – гликопротеина с молекулярной массой 94 кДа, обладающего множественными центрами связывания  $\text{Ca}^{2+}$ . Молекулярная масса С-концевого домена grp94 (grp94-СТ), измеренная в присутствии 1 мМ дитиотрептола, составляет 36 кДа. В отсутствие восстановительных агентов grp94-СТ существует как димер (обнаруживаются олигомерные формы и более высокого порядка). Шаперонная активность grp94-СТ была изучена Итарте с соавт. [142] в тест-системе, основанной на подавлении агрегации каталитической субъединицы протеинкиназы СК2 (СК2 $\alpha$ ) при 40 °С. Кинетические кривые агрегации, зарегистрированные по увеличению интенсивности светорассеяния при 360 нм, представлены на рис. 20, а. Для всех кинетических кривых, полученных в отсутствие или в присутствии grp94-СТ, завершающая фаза процесса следует кинетике реакции первого порядка. Экспериментальная кривая, полученная в отсутствие grp94-СТ, описана уравнением, эквивалентным уравнению (5)

$$I = I_{\text{lim}} \{1 - \exp[-k_1(t - t_0)]\} \quad (23)$$

( $I_{\text{lim}}$  – значение  $I$  при  $t \rightarrow \infty$ ) при следующих значениях параметров:  $I_{\text{lim}} = 8,3 \pm 0,1$ ,  $k_1 = 0,100 \pm 0,005 \text{ мин}^{-1}$  и  $t_0 = 4,0 \pm 0,4 \text{ мин}$  (кривая  $I$  на рис. 20, а). Значения  $I_{\text{lim}}$  и  $k_1$  для кинетических кривых агрегации, полученных в присутствии grp94-СТ, представлены на рис. 20, б и в как функция молярного отношения [grp94-СТ]/[СК2 $\alpha$ ].

Итарте с соавт. [142] изучили кинетику инактивации каталитической субъединицы протеинкиназы СК2 при 40 °С и влияние grp94-СТ на процесс инактивации (рис. 21). Как видно из рисунка, шаперон не влияет на скорость инактивации СК2 $\alpha$ . Проведенный нами анализ кривой инактивации показал, что экспериментальные данные удовлетворительно описываются экспоненциальным уравнением вида:

$$v/v_0 = (v/v_0)_{\text{lim}} + [1 - (v/v_0)_{\text{lim}}] \exp(-k_1 t), \quad (24)$$

где  $v$  – скорость ферментативной реакции,  $v_0$  – значение  $v$  при  $t = 0$  и  $(v/v_0)_{\text{lim}}$  – предельное значение  $v/v_0$  при  $t \rightarrow \infty$ . Значения параметров найдены равными:  $(v/v_0)_{\text{lim}} = 0,144 \pm 0,014$  и  $k_1 = 0,080 \pm 0,005 \text{ мин}^{-1}$  (при расчетах использовали все точки, представленные на рис. 21).

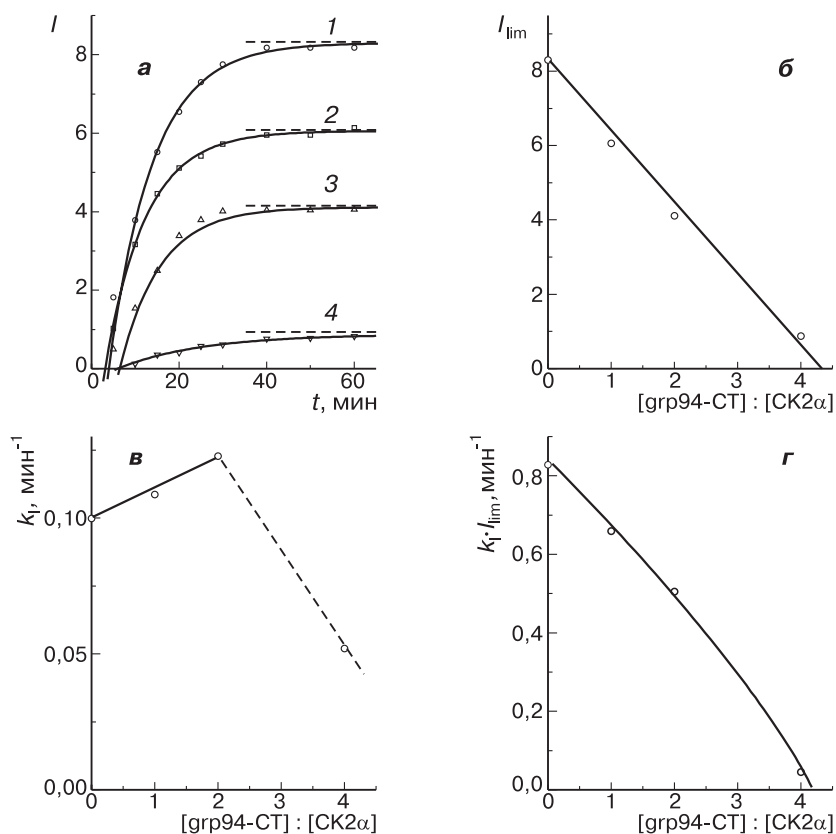


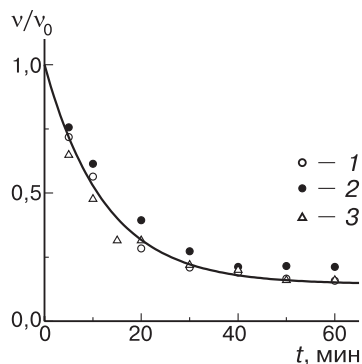
Рис. 20. Анализ шаперонной активности с использованием тест-системы, основанной на подавлении агрегации белкового субстрата.

*а* — Кинетика тепловой агрегации каталитической субъединицы протеинкиназы SK2 (СК2 $\alpha$ ), прослеженная по увеличению интенсивности светорассеяния при 360 нм ( $I$ , произвольные единицы) при 40 °С. Кривая 1 — контроль (в отсутствие grp94-СТ). Кривые 2–4 получены при молярном отношении  $[grp94-CT]/[SK2\alpha]$ , равном 1 : 1, 2 : 1 и 4 : 1 соответственно. Точки — экспериментальные данные [142]. Сплошные кривые рассчитаны по уравнению (5).

*б*, *в* и *г* — Зависимости  $I_{lim}$ ,  $k_1$  и  $k_1 \cdot I_{lim}$  от отношения  $[grp94-CT]/[SK2\alpha]$  соответственно.

Тот факт, что величина  $(v/v_0)_{lim}$  отличается от нуля, может означать наличие в препарате фермента фракции, обладающей относительно высокой термостабильностью. Полученное значение константы скорости инактивации близко к значению константы скорости реакции первого порядка, рассчитанной нами для завершающей фазы

Рис. 21. Кинетика тепловой инактивации каталитической субъединицы протеинкиназы СК2 (СК2 $\alpha$ ) при 40 °С. Зависимость относительной ферментативной активности СК2 $\alpha$ ,  $v/v_0$  ( $v$  – скорость ферментативной реакции и  $v_0$  – значение  $v$  при  $t = 0$ ), от времени. Точки – экспериментальные данные [142]: 1 – инактивация в отсутствие грp94-СТ, 2 и 3 – инактивация при отношении [грp94-СТ]/[СК2 $\alpha$ ], равном 2 : 1 и 4 : 1 соответственно. Сплошная кривая рассчитана по уравнению (24).



агрегации СК2 $\alpha$  ( $k_1 = 0,100 \text{ мин}^{-1}$ ). Ситуация, когда денатурация белка, прослеженная по потере ферментативной активности, и агрегация белка в завершающей фазе следуют кинетике реакции первого порядка и соответствующие константы скорости реакции первого порядка совпадают, означает, что стадией, лимитирующей скорость агрегации, является стадия разворачивания белковой молекулы. Иначе говоря, в этих условиях скорость стадии агрегации намного превышает скорость стадии денатурации белковой молекулы.

Обсудим характер зависимости величины  $I_{\text{lim}}$  от концентрации шаперона. Снижение величины  $I_{\text{lim}}$  в присутствии шаперона обусловлено связыванием денатурированного белка шапероном. Денатурированный белок в связанном состоянии исключается из процессов агрегации. Таким образом, величина  $I_{\text{lim}}$  пропорциональна количеству белка, участвующего в агрегации. Важно подчеркнуть, что характер кинетической кривой агрегации белкового субстрата сохраняется в присутствии шаперона. Это означает, что в системе имеется свободный денатурированный белок и комплекс денатурированного белка с шапероном и в тех временных интервалах, в которых проводится регистрация агрегации, не происходит диссоциации комплекса на исходные компоненты. В противном случае не наблюдалось бы выхода кинетических кривых на предельное значение при больших значениях времени.

Если принять, что связывание денатурированного белка шапероном является достаточно прочным, то из зависимости  $I_{\text{lim}}$  от концентрации шаперона оценить стехиометрию комплексообразования шаперона с денатурированным белком. Для этой цели используется величина отрезка, отсекаемого на оси абсцисс прямой линией. Например, для данных, представленных на рис. 20, *a*, полное подавление агрегации наблюдается при отношении [грp94-СТ]/[СК2 $\alpha$ ], равном  $4,3 \pm 0,2$ . Это означает, что комплекс шаперона с денатурированной каталити-

ческой субъединицей протеинкиназы содержит одну молекулу денатурированного белка и 4 молекулы grp94-СТ.

Следует отметить, что определение стехиометрии комплекса шаперона с денатурированным белком указанным способом можно считать надежным, если зависимости  $I_{\text{lim}}$  от концентрации шаперона, построенные для различных фиксированных концентраций белкового субстрата, дают одну и ту же величину для стехиометрии комплекса.

Если говорить о зависимости константы скорости  $k_1$  от концентрации шаперона, то, как видно из рис. 20, в, при увеличении отношения  $[\text{grp94-СТ}]/[\text{СК2}\alpha]$  до 2 : 1 величина  $k_1$  изменяется незначительно. Дальнейшее увеличение отношения  $[\text{grp94-СТ}]/[\text{СК2}\alpha]$  приводит к снижению константы скорости  $k_1$ . Подобный характер зависимости  $k_1$  от концентрации шаперона может быть интерпретирован следующим образом. Как отмечалось выше, начальная концентрация белкового субстрата в обсуждаемом случае соответствует кинетическому режиму, при котором скоростьлимитирующей стадией агрегации является стадия разворачивания белковой молекулы. Поскольку в этом кинетическом режиме варьирование концентрации белка (в определенном интервале) не сопровождается изменением константы скорости первого порядка, рассчитываемой из кинетической кривой агрегации, снижение концентрации белка, участвующего в агрегации, в результате связывания денатурированного белка шапероном не должно приводить к изменению величины  $k_1$ . Подобная картина действительно наблюдается при действии шаперона grp94-СТ на агрегацию каталитической субъединицы протеинкиназы СК2 при малых отношениях  $[\text{grp94-СТ}]/[\text{СК2}\alpha]$  (рис. 20, в). Снижение величины  $k_1$ , обнаруживаемое при  $[\text{grp94-СТ}]/[\text{СК2}\alpha] = 4$ , связано, скорее всего с убылью концентрации белка, участвующего в процессе агрегации. В соответствии с механизмом агрегации, обсужденным в предыдущем разделе, понижение концентрации белка приводит к переходу процесса агрегации в кинетический режим, при котором константа  $k_1$  линейно снижается по мере снижения  $[\text{P}]_0$ . Из-за ограниченности экспериментальных данных невозможно более детально обсудить поведение параметра  $k_1$  при  $I_{\text{lim}} \rightarrow 0$ .

Если говорить об изменении параметра  $t_0$  при варьировании концентрации grp94-СТ, то при отношениях  $[\text{grp94-СТ}]/[\text{СК2}\alpha]$ , равных 1 : 1, 2 : 1 и 4 : 1, величина  $t_0$  составляет 3,1, 6,4 и 6,0 мин. Таким образом, наблюдается рост величины  $t_0$  по мере повышения концентрации шаперона.

Как видно из представленных данных, влияние шаперона на агрегацию белкового субстрата выражается в изменении параметров  $A_{\text{lim}}$  (или  $I_{\text{lim}}$ ) и  $k_1$ , каждый из которых не является, очевидно, прямой



характеристикой скорости агрегации. Для того чтобы описать влияние шаперона на *скорость* агрегации, мы можем воспользоваться построением графика в координатах  $\{k_1 \cdot A_{\text{lim}}; [\text{шаперон}]\}$  или соответственно  $\{k_1 \cdot I_{\text{lim}}; [\text{шаперон}]\}$ , поскольку, как отмечалось выше, именно произведение параметров  $k_1 \cdot A_{\text{lim}}$  (или  $k_1 \cdot I_{\text{lim}}$ ) пригодно для характеристики скорости агрегации. На рис. 20, *з* показана зависимость  $k_1 \cdot I_{\text{lim}}$  от отношения  $[\text{grp94-CT}]/[\text{СК2}\alpha]$  для рассмотренного случая подавления агрегации СК2 $\alpha$  в присутствии grp94-CT.

Представляло интерес найти в литературе экспериментальные данные по действию шаперонов на агрегацию белков такого рода, когда уже малые добавки шаперона вызывают снижение константы скорости первого порядка  $k_1$ . Анализ результатов работы Виерлинг с соавт. [108], в которой изучалось действие белка теплового шока Hsp18.1 из гороха *Pisum sativum* на тепловую агрегацию малатдегидрогеназы из митохондрий сердца свиньи, свидетельствует о том, в данном случае реализуется именно такая ситуация. На рис. 22, *а* представлены кинетические кривые агрегации малатдегидрогеназы, полученные при различных концентрациях Hsp18.1. Все кинетические кривые (в завершающей фазе процесса) следуют кинетике первого порядка. Для контрольной кривой, полученной в отсутствие Hsp18.1, получены следующие значения кинетических параметров:  $\Delta A_{\text{lim}} = 0,53 \pm 0,01$ ,  $k_1 = 0,091 \pm 0,007 \text{ мин}^{-1}$  и  $t_0 = 12,8 \pm 0,3 \text{ мин}$ . Независимыми опытами с использованием метода гель-проникающей хроматографии авторы цитированной работы показали, что додекамер Hsp18.1 связывает 12 мономеров денатурированной малатдегидрогеназы. В экспериментах по агрегации авторы использовали малатдегидрогеназу в концентрации 600 нМ в расчете на мономер. Исходя из приведенной стехиометрии комплекса, можно рассчитать концентрацию Hsp18.1, при которой происходит полное связывание денатурированной малатдегидрогеназы. Эта концентрация составляет 50 нМ. Учитывая это обстоятельство, мы не проводили обработку кинетической кривой агрегации, полученной при концентрации Hsp18.1, равной 100 нМ. На рис. 22, *б* показана зависимость параметра  $\Delta A_{\text{lim}}$  от концентрации Hsp18.1. Прямая линия проведена в предположении, что при полном насыщении шаперона денатурированным белком образуется комплекс, содержащий 12 мономеров денатурированной малатдегидрогеназы на додекамер Hsp18.1. Как видно из рисунка, экспериментальные значения  $\Delta A_{\text{lim}}$  удовлетворительно укладываются на теоретическую линию. Что касается константы скорости  $k_1$ , то этот параметр снижается с ростом концентрации Hsp18.1 (рис. 22, *в*). Особый интерес представляет корреляционный график, на котором на одной из осей нанесен величина параметра  $\Delta A_{\text{lim}}$ , а на другой — величина параметра

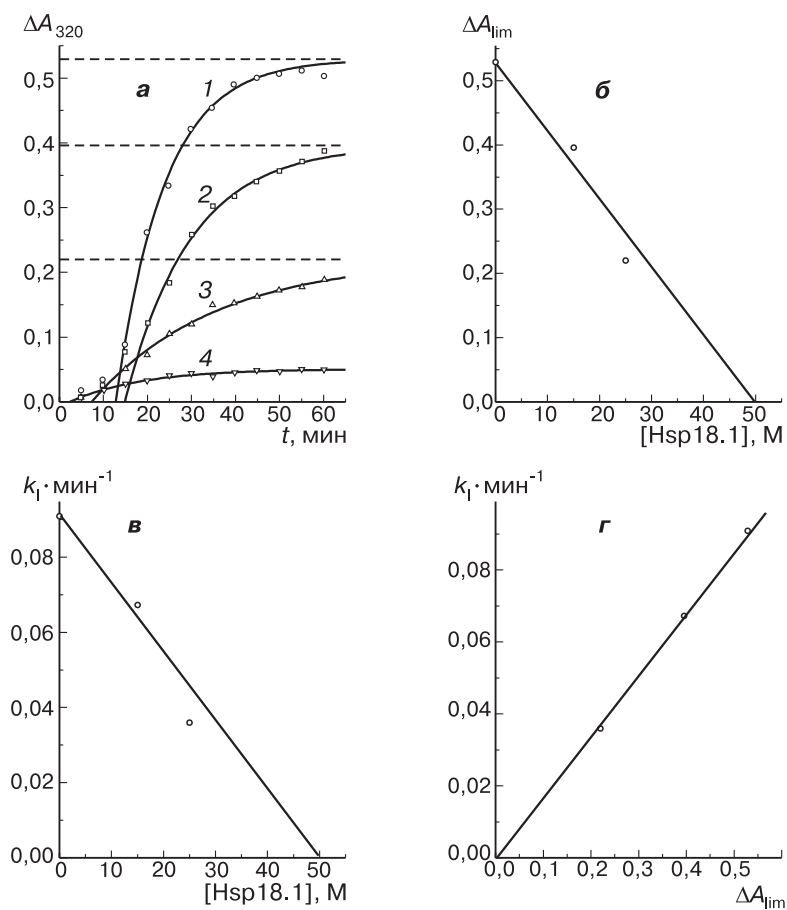


Рис. 22. Кинетика тепловой агрегации малатдегидрогеназы из митохондрий сердца свиньи (45 °С; Na-фосфатный буфер, pH 7,5) в присутствии Hsp18.1 из гороха *Pisum sativum*.

*а* — Кинетические кривые агрегации, прослеженной по увеличению поглощения при 320 нм ( $\Delta A_{320}$ ). Концентрация фермента 300 нМ (в расчете на димер). Кривая 1 — контроль (в отсутствие Hsp18.1). Кривые 2–4 получены в присутствии Hsp18.1 при концентрации последнего, равной 15, 25 и 100 нМ соответственно (в расчете на додекамер Hsp18.1). Точки — экспериментальные данные [108]. Сплошные кривые рассчитаны по уравнению (5).

*б* и *в* — Зависимости параметров  $\Delta A_{lim}$  и  $k_1$  от концентрации Hsp18.1.

*г* — Корреляция между величинами  $\Delta A_{lim}$  и  $k_1$ .

$k_1$  (рис. 22, з). Поскольку параметр  $\Delta A_{\text{lim}}$  характеризует концентрацию белка, участвующего в процессе агрегации, линейное снижение константы  $k_1$  по мере уменьшения параметра  $\Delta A_{\text{lim}}$  может означать, что для данного белкового субстрата в изученных условиях реализуется кинетический режим агрегации, при котором скоростью лимитирующей стадией является стадия роста агрегата. Для полноты картины отметим, как меняется параметр  $t_0$  при увеличении концентрации Hsp18.1. Величина  $t_0$  составляет 14,8, и 7,3 мин при концентрациях Hsp18.1, равных 15 и 25 нМ соответственно.

Другим примером тест-системы, в которой добавление шаперона уже в малых количествах приводит к снижению параметра  $k_1$ , является цитратсинтаза из митохондрий сердца свиньи. Согласно нашим расчетам, такая картина наблюдается при испытании шаперонной активности Hsp16.3 из *Mycobacterium tuberculosis* [30], иммунофилина FKBP532 [25] и Hsp26 из *Saccharomyces cerevisiae* [73]. Подобный характер зависимости параметра  $k_1$  от концентрации шаперона в области малых концентраций последнего не удивителен, если учесть, что для цитратсинтазы в подавляющем числе случаев выполняется соотношение:  $k_1^{\text{agg}} < k_1^{\text{inact}}$  (см. таблицу). Как отмечалось выше, только в том случае, когда  $k_1^{\text{agg}} = k_1^{\text{inact}}$ , можно ожидать, что параметр  $k_1$  будет оставаться неизменным при добавлении малых количеств шаперона.

В заключение отметим, что при анализе литературных данных по влиянию шаперонов на кинетику агрегации белков всегда выясняется, что авторами не проводился предварительный анализ кинетики агрегации белкового субстрата при разных концентрациях белка. Это означает, что авторы никогда не знают точно, в каком кинетическом режиме протекает агрегация белкового субстрата при выбранной концентрации. Это обстоятельство существенно осложняет анализ полученных данных. Таким образом, требуется проведение специальных экспериментов по выяснению особенностей испытания шаперонной активности для разных кинетических режимов агрегации белкового субстрата.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре показано, что во многих случаях необратимая агрегация белков, вызываемая действием тепла, денатурирующих агентов (GuHCl, мочевины, органических растворителей), подкислением раствора или сопровождающая рефолдинг белка, предварительно денатурированного GuHCl или мочевиной, следует на завершающем этапе кинетике реакции первого порядка. Исследования кинетики тепловой агрегации белков в широком интервале концент-

раций белка с одновременным контролем скорости денатурации белковой молекулы позволили сформулировать механизм агрегации белков, основными стадиями которого наряду со стадией разворачивания белковой молекулы являются стадия нуклеации и стадия роста агрегата. Сопоставление процесса агрегации белков с химическими цепными реакциями показало, что агрегация (на стадии роста агрегата) может рассматриваться как неразветвленная цепная реакция, а шапероны, блокирующие агрегацию белкового субстрата, — как ингибиторы цепной реакции агрегации белка.

Для каждой кинетической кривой агрегации (на завершающем этапе процесса) могут быть рассчитаны предельное значение кажущегося поглощения  $A_{\text{lim}}$  (или интенсивности светорассеяния  $I_{\text{lim}}$ ) и константа скорости реакции первого порядка  $k_1$ . При оценке шаперонной активности в тест-системах, основанных на подавлении агрегации белковых субстратов, эти параметры могут быть использованы для количественной оценки эффективности действия шаперонов. Изменение величины  $k_1 \cdot A_{\text{lim}}$  (или  $k_1 \cdot I_{\text{lim}}$ ) отражает изменение скорости агрегации в присутствии шаперона. Подобным же образом может быть количественно охарактеризовано влияние соединений небелковой природы (например, осмолитов, производных циклодекстринов) на агрегацию белков, а также изменение скорости агрегации при изменении условий проведения эксперимента (температуры, ионной силы, рН).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Еронина Т.Б., Чеботарева Н.А., Ливанова Н.Б., Курганов Б.И. // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 555–562.
2. Еронина Т.Б., Чеботарева Н.А., Ливанова Н.Б., Курганов Б.И. // II Международный симпозиум «Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии» (29 мая — 1 июня 2001 г., Дубна). Сборник трудов. Дубна, Объединенный институт ядерных исследований, 2002.
3. Жоли М. // Физическая химия денатурации. М.: Мир, 1968. С. 153–170.
4. Корнилаев Б.А., Курганов Б.И., Еронина Т.Б., Ливанова Н.Б. // Биохимия. 1996. Т. 61. С. 871–879.
5. Котова Н.В., Семисотнов Г.В. // Успехи биол. химии. 1998. Т. 38. С. 199–223.
6. Курганов Б.И. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 430–432.
7. Курганов Б.И. // Биохимия. 2002. Т. 67, С. 409–422.
8. Курганов Б.И., Рафикова Э.Р., Добров Е.Н. // Биохимия. 2002. Т. 67, С. 525–533.
9. Курганов Б.И., Сугрובה Н.П. // Биофизика. 1967. Т. 12. С. 193–199.
10. Курганов Б.И., Топчиева И.Н. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 491–499.
11. Курочкина Л.П., Месянжинов В.В. // Успехи биол. химии. 1996. Т. 36. С. 49–86.

12. Мао К., Ке Д., Чанг З. // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 1111–1116.
13. Орлов В.Н., Арутюнян А.М., Куст С.В., Литманович Е.А., Драчев В.А., Добров Е.Н. // Биохимия. 2001. Т. 66. С. 195–204.
14. Парк И.-Д., Ву Б.-Н., Тиан В.-К., Жоу Х.-М. // Биохимия. 2002. Т. 67, вып. 8.
15. Семенов Н.Н. // Цепные реакции. Л.: ОНТИ. 1934.
16. Семенов Н.Н. // О некоторых проблемах химической кинетики и реакционной способности. М.: Изд-во АН СССР. 1958.
17. Agashe V.R., Hartl F.U. // *Semin Cell Dev. Biol.* 2000. Vol. 11. P. 15–25.
18. Akiyoshi K., Sasaki Y., Sunamoto J. // *Bioconjugate Chem.* 1999. Vol. 10. P. 321–324.
19. Arsene F., Tomoyasu T., Bukau B. // *Int. J. Food Microbiol.* 2000. Vol. 55. P. 3–9.
20. Ballinger C.A., Connell P., Wu Y., Hu Z., Thompson L.J., Yin L.-Y., Patterson C. // *Mol. Cell. Biol.* 1999. Vol. P. 4535–4545.
21. Bär J., Golbik R., Hübner G., Kopperschlüger G. // *Biochemistry.* 2000. Vol. 39. P. 6960–6968.
22. Barford D., Johnson L.N. // *Nature.* 1989. Vol. 340. P. 609–616.
23. Behrens S., Maier R., de Cock H., Schmid F.X., Gross C.A. // *EMBO J.* 2001. Vol. 20. P. 285–294.
24. Bhattacharyya J., Das K.P. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 15505–15509.
25. Bose S., Weikl T., Bggl H., Buchner J. // *Science.* 1996. Vol. 274. P. 1715–1717.
26. Brems D.N. // *Biochemistry.* 1968. Vol. 27. P. 4541–4546.
27. Buchner J. // *FASEB J.* 1996. Vol. 10. P. 10–19.
28. Bukau B., Deuerling E., Pfund C., Craig E.A. // *Cell.* 2000. Vol. 101. P. 119–22.
29. Burgio M.R., Bennett P.M., Koretz J.F. // *Mol. Vision.* 2001. Vol. 7. P. 228–233.
30. Chan W., Helms L.R., Brooks I., Lee G., Ngola S., McNulty D., Maleef B., Hensley P., Wetzel R. // *Folding Des.* 1996. Vol. 1. P. 77–89.
31. Chang Z., Primm T.P., Jakana J., Lee I.H., Serysheva I., Chiu W., Gilbert H.F., Guiocho F.A. // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 7218–7223.
32. Chatellier J., Hill F., Fersht A.R. // *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 304. P. 883–896.
33. Cherian M., Abraham E.C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. Vol. 212. P. 184–189.
34. Chrnyk B.A., Evans J., Lillquist J., Young P., Wetzel D. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 18053–18061.
35. Clark J.I., Huang Q.-I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93. P. 15185–15189.
36. Cleland J.L. // Protein Folding in vivo in vitro. ACS Symposium Series 526 / Ed. J.L. Cleland. Washington: American Chemical Society. 1993. P. 1–21.
37. Csermely P. // *News Physiol. Sci.* 2001. Vol. 16. P. 123–126.
38. Cyr D.M. // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 359. P. 129–132.
39. Das B.K., Liang J.J.-N., Chakrabarti B. // *Curr. Eye Res.* 1997. Vol. 16. P. 303–309.
40. Datta S.A., Rao Ch.M. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 34773–34778.
41. De Bernardes Clark E., Georgiou G. // Protein Refolding / Eds. G. Georgiou, E. De Bernardes-Clark. Washington: American Chemical Society. 1991. P. 1–20.
42. De Bernardes Clark E., Hevehan D., Szela S., Maachupalli-Reddy J. // *Biotechnol. Prog.* 1998. Vol. 14. P. 47–54.

43. *De Young L.R., Dill K.A., Fink A.L.* // Biochemistry. 1993. Vol. 32. P. 3877–3886.
44. *De Young L.R., Fink A.L., Dill K.A.* // Accounts Chem. Res. 1993. Vol. 26. P. 614–620.
45. *Demchenko A.P.* // Comments Mol. Cel. Biophys. 1999. Vol. 9. P. 219–260.
46. *Demchenko A.P.* // J. Mol. Recognition. 2001. Vol. 14. P. 42–61.
47. *Derham B.K., Harding J.J.* // Biochim. Biophys. Acta. 1997. Vol. 1336. P. 187–194.
48. *Derham B.K., Harding J.J.* // Biochem J. 1997. Vol. 328. P. 763–768.
49. *Dhir P., Akhtar N.J., Sun T.-X., Liang J.J.-N.* // Photochem. Photobiol. 1999. Vol. 69. P. 329–335.
50. *Ehrnsperger M., Buchner J., Gaestel M.* // Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins / Eds. A.L.Fink, Y.Goto. New York: Marcel Dekker, Inc. 1998. P. 533–575.
51. *Ehrnsperger M., Lilie H., Gaestel M., Buchner J.* // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 14867–14874.
52. *Ellis R.J.* // Folding Des. 1996. Vol. 1. P. R9–R15.
53. *Ellis R.J., Hartl F.U.* // FASEB J. 1996. Vol. 10. P. 20–26.
54. *Esler W.P., Stimson E.R., Ghilardi J.R., Vinters H.V., Lee J.P., Mantyh P.W., Maggio J.E.* // Biochemistry. 1996. Vol. 35. P. 749–757.
55. *Farahbakhsh Z.T., Huang Q.-L., Ding L.-L., Altenbach C., Steinhoff H.-J., Horwitz J., Hubbell W.L.* // Biochemistry. 1995. Vol. 34. 509–516.
56. *Fields G.B., Alonso D.O.V., Stigter D., Dill K.A.* // J. Phys. Chem. 1992. Vol. 96. P. 3974–3981.
57. *Fink A.L.* // Folding Des. 1998. Vol. 3. P. R9–R23.
58. *Fink A.L.* // Physiol. Reviews. 1999. Vol. 79, 425–449.
59. *Fink A.L., Goto Y.*, eds // Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins. New York: Marcel Dekker, Inc. 1998.
60. *Finke J.M., Gross L.A., Ho H.M., Sept D., Zimm B.H., Jennings P.A.* // Biochemistry. 2000. Vol. 39. P. 15633–15642.
61. *Finke J.M., Roy M., Zimm B.H., Jennings P.* // Biochemistry. 2000. Vol. 39. P. 575–583.
62. *Forreiter C., Nover L.* // J. Biosci. 1998. Vol. 23. P. 287–320.
63. *Freeman B.C., Morimoto R.I.* // EMBO J. 1996. Vol. 15. P. 2969–2979.
64. *Freeman B.C., Toft D.O., Morimoto R.I.* // Science. 1996. Vol. 274. P. 1718–1720.
65. *Frydman J.* // Annu. Rev. Biochem. 2001. Vol. 70. P. 603–647.
66. *Goldberg M.E., Rudolph R., Jaenicke R.* // Biochemistry. 1991. Vol. 30. P. 2790–2897.
67. *Gorovits B.M., McGee W.A., Horowitz P.M.* // Biochim. Biophys. Acta. 1998. Vol. 1382. P. 120–128.
68. *Guha S., Manna T.K., Das K.P., Bhattacharyya B.* // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 30077–30080.
69. *Haase-Pettingell C.A., King J.* // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263, 4977–4983.
70. *Hardesty B., Kramer G.* // Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 2001. Vol. 66. P. 41–66.
71. *Hörndahl U., Kokke B.P.A., Gustavsson N., Linse S., Berggren K., Tjerneld F., Boelens W.C., Sundby C.* // Biochim. Biophys. Acta. 2001. Vol. 1545. P. 227–237.
72. *Hartl F.U.* // Nature. 1996. Vol. 381. P. 571–579.
73. *Haslbeck M., Walke S., Stromer T., Ehrnsperger M., White H.E., Chen S., Saibil H.R., Buchner J.* // EMBO J. 1999. Vol. P. 6744–6751.
74. *Hermawan A., Chirico W.J.* // Arch. Biochem. Biophys. 1999. Vol. 369. P. 157–162.

75. *Hevehan D.L., De Bernardez Clark E.* // *Biotechnol. Bioeng.* 1997. Vol. 54. P. 221–230.
76. *Hoffmann F., Posten C., Rinas U.* // *Biotechnol. Bioeng.* 2001. Vol. 72. P. 315–322.
77. *Holmgren A.* // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254. P. 9627–9632.
78. *Hook D.W.A., Harding J.J.* // *Eur. J. Biochem.* 1997. Vol. 247. P. 380–385.
79. *Horowitz P., Criscimagna N.L.* // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261. P. 15652–15658.
80. *Horwitz J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. Vol. 89. P. 10449–10453.
81. *Huang K., Park Y.-D., Cao Z.-F., Zhou H.M.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. Vol. 1545. P. 305–313.
82. *Hwang D.S., Crooke E., Kornberg A.* // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 19244–19248.
83. *Inouye H., Kirschner D.A.* // *J. Struct. Biol.* 2000. Vol. 130. P. 123–129.
84. *Jaenicke R.* // *J. Polym. Sci.* 1967. Vol. 16. P. 2143–2160.
85. *Jaenicke R.* // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30. P. 3147–3161.
86. *Jaenicke R.* // *Chemtracts: Biochem. Mol. Biol.* 1993. Vol. 4, 1–30.
87. *Jaenicke R.* // *Phil. Trans. R. Soc. (London) B.* 1995. Vol. 348. P. 97–105.
88. *Jaenicke R.* // *Current Topics in Cellular Regulation*, vol. 34 / Eds. E.R. Stadtman, P.B. Chock. New York: Academic Press. 1997. P. 209–314.
89. *Jaenicke R.* // *Stability Stabilization of Biocatalysts* / Eds. A. Ballesteros, F.J. Plou, J.L. Iborra, P.J. Halling. Amsterdam: Elsevier. 1998. P. 165–182.
90. *Jaenicke R.* // *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins* / Eds. A.L. Fink, Y. Goto. New York: Marcel Dekker, Inc. 1998. P. 35–70.
91. *Jaenicke R.* // *Biol. Chem.* 1998. Vol. 379. P. 237–243.
92. *Jaenicke R.* // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1999. Vol. 71. P. 155–241.
93. *Jaenicke R., Seckler R.* // *Adv. Protein Chem.* 1997. Vol. 50. P. 1–59.
94. *Jakob U., Buchner J.* // *Trends Biochem. Sci.* 1994. Vol. 19. P. 205–211.
95. *Jakob U., Lilie H., Meyer I., Buchner J.* // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 7288–7294.
96. *Jarrett J.T., Lansbury P.T.* // *Cell.* 1993. Vol. 73. P. 1055–1058.
97. *Johnson B.D., Chadli A., Felts S.J., Bouhouche I., Catelli M.G., Toft D.O.* // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 32499–32507.
98. *Johnson J.L., Craig E.A.* // *Cell.* 1997. Vol. 90. P. 201–204.
99. *Kendrick B.S., Carpenter J.F., Cleland J.L., Randolph T.W.* // 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 14142–14146.
100. *Kiefhaber T., Rudolph R., Kohler H.-H., Buchner J.* // *Bio/Technology.* 1991. Vol. 9. P. 825–829.
101. *King J., Haase-Pettingell C., Robinson A.S., Speed M., Mitraki A.* // *FASEB J.* 1996. Vol. 10. P. 57–66.
102. *Klinov S.V., Chebotareva N.A., Lisovskaya N.P., Davidov D.R., Kurganov B.I.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1982. Vol. 709. P. 91–98.
103. *Knappik A., Plückthun A.* // *Protein Eng.* 1995. Vol. 8. P. 81–89.
104. *Kokke B.P.A., Leroux M.R., Candido E.P.M., Boelens W.C., de Jong W.W.* // *FEBS Lett.* 1998. Vol. 433. P. 228–232.
105. *Kopito R.R.* // *Trends Cell Biol.* 2000. Vol. 10. P. 524–530.
106. *Kumar L.V.S., Ramakrishna T., Rao Ch.M.* // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 24137–24141.
107. *Kuznetsova I.M., Biktashev A.G., Khaitlina S.Y., Vassilenko K.S., Turoverov K.K., Uversky V.N.* // *Biophys. J.* 1999. Vol. 77. P. 2788–2800.

108. Lee G.J., Roseman A.M., Saibil H.R., Vierling E. // *EMBO J.* 1997. Vol. 16. P. 659–671.
109. Lin Z., Wang C.-C., Tsou C.-L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. Vol. 1481. P. 283–288.
110. Lindner R.A., Treweek T.M., Carver J.A. // *Biochem. J.* 2001. Vol. 354. P. 79–87.
111. Lomakin A., Chung D.S., Benedek G.B., Kirschner D.A., Teplow D.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93. P. 1125–1129.
112. Lomakin A., Teplow D.B., Kirschner D.A., Benedek G.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 94. P. 7942–7947.
113. London J., Skrzynia C., Goldberg M.E. // *Eur. J. Biochem.* 1974. Vol. 47. P. 409–415.
114. Lund P.A. // *Adv. Microb. Physiol.* 2001. Vol. 44. P. 93–140.
115. Maachupalli-Reddy J., Kelley B.D., De Bernardez Clark E. // *Biotechnol. Prog.* 1997. Vol. 13. P. 144–150.
116. Macario A.J., Conway de Macario E. // *Front. Biosci.* 2001. Vol. 6. P. D262–D283.
117. MacRae T.H. // *Cell Mol. Life Sci.* 2000. Vol. 57. P. 899–913.
118. Marini I., Moschini R., Del Corso A., Mura U. // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 32559–32565.
119. Martin J., Hartl F.U. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1997. Vol. 7. P. 41–52.
120. Martineau P., Betton J.-M. // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 292. P. 921–929.
121. Merck K.B., Groenen P.J.T.A., Voorter C.E.M., de Haard-Hoekman W.A., Horwitz J., de Jong W.W. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, P. 1046–1052.
122. Minami Y., Höhfeld J., Ohtsuka K., Hartl F.-U. // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 19617–19624.
123. Miroliaei M., Nemat-Gorgani M. // *Enzyme Microb. Technol.* 2001. Vol. 29. P. 554–559.
124. Mitraki, A., King, J. // *Bio/Technology.* 1989. Vol. 7. P. 690–697.
125. Morimoto R.I., Tissieres A., Georgopoulos C., eds // *Progress Perspectives on the Biology of Heat Shock Proteins Molecular Chaperones.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. 1994.
126. Muchowski P.J., Bassuk J.A., Lubsen N.H., Clark J.I. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 2578–2582.
127. Muchowski P.J., Clark J.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 1004–1009.
128. Muchowski P.J., Wu G.J.S., Liang J.J.N., Adman E.T., Clark J.I. // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 289. P. 397–411.
129. Muller M., Koch H.G., Beck K., Schafer U. // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2001. Vol. 66. P. 107–157.
130. Naiki H., Gejyo F. // *Methods Enzymol.* 1999. Vol. 309. P. 305–319.
131. Naiki H., Hasegawa K., Yamaguchi I., Nakamura H., Gejyo F., Nakakuki K. // *Biochemistry.* 1998. Vol. 37. P. 17882–17889.
132. Oosawa F., Kasai M. // *J. Mol. Biol.* 1962. Vol. 4. P. 10–21.
133. Pirkel F., Buchner J. // *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 308. P. 795–806.
134. Plater M.L., Goode D., Crabbe M.J.C. // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 28558–28566.
135. Pots A.M., ten Grotenhuis E., Gruppen H., Voragen A.G.J., de Kruijff K.G. // *J. Agric. Chem.* 1999. Vol. 47. P. 4600–4605.
136. Rajaraman K., Raman B., Ramakrishna T., Rao Ch.M. // *FEBS Lett.* 2001. Vol. 497. P. 118–123.
137. Rajaraman K., Raman B., Rao Ch.M. // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 27595–27600.
138. Raman B., Ramakrishna T., Rao Ch.M. // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 365. P. 133–136.
139. Ramm K., Plückthun A. // *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 310. P. 485–498.



140. Reddy G.B., Reddy P.Y., Suryanarayana P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. Vol. 282. P. 712–716.
141. Roefs S.P.F.M., de Kruif K.G. // Eur. J. Biochem. 1994. Vol. 226. P. 883–889.
142. Roher N., Miré F., Boldyreff B., Llorens F., Plana M., Issinger O.-G., Itarte E. // Eur. J. Biochem. 2001. Vol. 268. P. 429–436.
143. Roy S.K., Hiyama T., Nakamoto H. // Eur. J. Biochem. 1999. Vol. 262. P. 406–416.
144. Ruddon R.W., Bedows E. // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 3125–3128.
145. Saibil H. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2000. Vol. 10. P. 251–258.
146. Santhoshkumar P., Sharma K.K. // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 47094–47099.
147. Sax C.M., Piatigorsky J. // Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol. 1994. Vol. 69. P. 155–201.
148. Scheibel T., Siegmund H.I., Jaenicke R., Ganz P., Lilie H., Buchner J. // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 1297–1302.
149. Schneider C., Hartl F.U., Young J.C. // FEBS Lett. 1997. Vol. 418. P. 139–143.
150. Schokker E.P., Singh H., Pinder D.N., Creamer L.K. // Intern. Dairy J. 2000. Vol. 10. P. 233–240.
151. Shao F., Bader M.W., Jakob U., Bardwell J.C.A. // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 13349–13352.
152. Sharma K.K., Kaur H., Kester K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. Vol. 239. P. 217–222.
153. Sharma K.K., Ortwerth B.J. // Exp. Eye Res. 1995. Vol. 61. P. 413–421.
154. Singer M.A., Lindquist S. // Mol. Cell. 1998. Vol. 1. P. 639–648.
155. Skowyra D., Georgopoulos C., Zylicz M. // Cell. 1990. Vol. 62. P. 939–944.
156. Smulders H.P.H., Carver J.A., Lindner R.A., van Boekel M.A.A., Bloemendal H., de Jong W.W. // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. P. 29060–29066.
157. Smulders H.P.H., de Jong W.W. // FEBS Lett. 1997. Vol. 409. P. 101–104.
158. Smulders H.P.H., Merck K.B., Aendekerk J., Horwitz J., Takemoto L., Slingsby C., Bloemendal H., de Jong W.W. // Eur. J. Biochem. 1995. Vol. 232. P. 834–838.
159. Smэкal P., Машаn J., Hрдэ I., Коноб-сек I., Ърскэ V. // Plant J. 2000. Vol. 23. P. 703–713.
160. Souza J.M., Giasson B.I., Lee V.M.-Y., Ischiropoulos H. // FEBS Lett. 2000. Vol. 474. P. 116–119.
161. Speed M.A., Wang D.I., King J. // Prot. Sci. 1995. Vol. 4. P. 900–908.
162. Srinivas V., Datta S.A., Ramakrishna, Rao Ch.M. // Mol. Vision. 2001. Vol. 7. P. 114–119.
163. Stigter D., Dill K.A. // Fluid Phase Equilibria. 1993. Vol. 82. P. 237–249.
164. Strickland E., Hakala K., Thomas P.J., DeMartino G.N. // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 5565–5572.
165. Sun T.-X., Das B.K., Liang J.J.-N. // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 6220–6225.
166. Szebeni A., Olson M.O.J. // Protein Sci. 1999. Vol. 8. P. 905–912.
167. Tarn-Moseman A., Schauer N., De Bernardez Clark E. // Protein Expression Purification. 1999. Vol. 16. P. 181–189.
168. Thirumalai D., Lorimer G.H. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2001. Vol. 30. P. 245–269.
169. van Boekel M.A.M., de Lange F., de Grip W.J., de Jong W.W. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1434. P. 114–123.
170. van Boekel M.A.M., Hoogakker S.E.A., Harding J.J., de Jong W.W. // Ophthalmic Res. 1996. Vol. 28. P. 32–38.

171. *van de Klundert F.A.J.M., Smulders R.H.P.H., Gijzen M.L.J., Lindner R.A., Jaenicke R., Carver J.A., de Jong W.W.* // Eur. J. Biochem. 1998. Vol. 258. P. 1014–1021.
172. *Vandenbroeck K., Martens E., D'Andrea S., Billiau A.* // Eur. J. Biochem. 1993. Vol. 215. P. 481–486.
173. *Viner R.I., Clegg J.S.* // Cell Stress Chaperones. 2001. Vol. 6. P. 126–135.
174. *Wang K.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. Vol. 287. P. 642–647.
175. *Wang K., Ma W., Spector A.* // Exp. Eye Res. 1995. Vol. 61. P. 115–124.
176. *Wang K., Spector A.* // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1995. Vol. 36. P. 311–321.
177. *Webb T., Jackson P.J., Morris G.E.* // Biochem. J. 1997. Vol. 321, 83–88.
178. *Weber F., Keppel F., Georgopoulos C., Hayer-Hartl M.K., Hartl F.U.* // Nature Struct. Biol. 1998. Vol. 5. P. 977–985.
179. *Wetzel R.* // Trends Biotechnol. 1994. Vol. 12. P. 193–198.
180. *Wetzel R.* // Cell. 1996. Vol. 86. P. 699–702.
181. *Wu B.-N., Park Y.-D., Tian W.-X., Zhou H.-M.* // Biochim. Biophys. Acta. 2001. Vol. 1549. P. 112–121.
182. *Yang, H., Huang S., Dai H., Gong Y., Zheng C., Chang Z.* // Protein Sci. 1999. Vol. 8. P. 174–179.
183. *Zettlmeissl G., Rudolph R., Jaenicke R.* // Biochemistry. 1979. Vol. 18. P. 5567–5571.
184. *Ziemiencowicz A., Skowrya D., Zeilstra-Ryalls J., Fayet O., Georgopoulos C., Zylicz M.* // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. P. 25425–25431.