

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

НИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

На правах рукописи

Софронова Алина Андреевна

**Взаимодействие белков с синтетическими и природными
полиэлектролитами и влияние на него посттрансляционных
модификаций**

03.01.08 – Биоинженерия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к. б. н., Семенюк Павел Игоревич

Москва, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1. Актуальность проблемы и степень разработанности темы	7
2. Цели и задачи.....	9
3. Объект и предмет исследования	10
4. Научная новизна.....	10
5. Теоретическая и практическая значимость	11
6. Методология исследования	11
7. Положения, выносимые на защиту.....	12
8. Степень достоверности данных	12
9. Публикации по теме диссертации.....	13
10. Апробация работы.....	14
11. Личный вклад автора	14
12. Объем и структура диссертации.....	15
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1. Взаимодействие белков с полиэлектролитами	17
1.1. Влияние различных характеристик полиэлектролита на подавление агрегации белков	19
1.2. Влияние среды на эффективность подавления агрегации полиэлектролитами	21
2. Неструктурированные белки	22
2.1. Особенности структуры внутренне неупорядоченных белков.....	22
2.2. Казеины как пример внутренне неупорядоченных белков	25
2.3. α -синуклеин	28
2.3.1. Функции α -синуклеина.....	29
2.3.2. Строение α -синуклеина	30
2.3.3. Агрегация α -синуклеина и нейродегенерация	33
2.3.4. Взаимодействие ГАФД с α -синуклеином	35
2.4. Гирудин как пример внутренне неупорядоченных белков.....	39

3. Посттрансляционные модификации, ассоциированные с изменением заряда.....	43
3.1. Гликирование	43
3.2. Фосфорилирование.....	46
3.3. Сульфатирование	47
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
1. Экспериментальная часть.....	49
1.1. Реактивы.....	49
1.2. Используемые белки.....	49
1.3. Используемые полиэлектролиты.....	50
1.4. Определение концентрации белков, РНК и полиэлектролитов	51
1.5. Измерение уровня агрегации белков	52
1.5.1. Измерение уровня агрегации ГАФД.....	52
1.5.2. Измерение уровня агрегации лизоцима и α -лактальбумина	53
1.6. Определение дзета-потенциала и размера частиц.....	53
1.7. Гликирование β -казеина.....	54
1.8. Изотермическая титрационная калориметрия	54
1.9. Флуоресцентная спектроскопия нативного и гликированного β -казеина.....	55
1.10. Аналитическое ультрацентрифугирование комплексов нативного и гликированного β -казеина с полимерами	56
1.11. Спектроскопия кругового дихроизма	57
1.12. Протеолиз β -казеина.....	57
1.13. ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле	58
1.14. Антитромботическая активность С-концевых (остатки 55-65) пептидов гирудина и его производных	59
2. Молекулярное моделирование взаимодействий	59
2.1. Симуляции молекулярной динамики лизоцима с полиэлектролитами и анализ траекторий.....	59
2.2. Симуляции молекулярной динамики ГАФД с α -синуклеином и РНК и анализ траекторий.....	62
2.3. Симуляции направленной молекулярной динамики комплекса гирудин-тромбин и расчет свободной энергии взаимодействия.....	65

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	70
1. Взаимодействие белков с полиэлектролитами	70
1.1. Влияние заряда белка на взаимодействие с полиэлектролитами и их шапероноподобную активность.....	70
1.2. Влияние степени полимеризации полиэлектролита на взаимодействие белок-полиэлектролит.....	81
2. Взаимодействие внутренне неупорядоченного белка β -казеина с полиэлектролитами и влияние гликирования	90
3. Взаимодействие ГАФД с РНК и α -синуклеином и влияние гликирования.....	106
3.1. Взаимодействие ГАФД с α -синуклеином	109
3.2. Взаимодействие ГАФД с РНК	119
3.3. Экспериментальная проверка связывания ГАФД с α -синуклеином и РНК.....	125
4. Влияние посттрансляционных модификаций на связывание гирудин-тромбин	126
4.1. Выбор силового поля для моделирования посттрансляционных модификаций..	128
4.2. Структурные особенности взаимодействия между тромбином и различными производными гирудина.....	129
4.3. Оценка свободной энергии связывания гирудин-тромбин	133
4.4. Антитромботическая активность производных гирудина <i>in vitro</i>	137
4.5. Выбор оптимального производного гирудина для крупномасштабного синтеза и использования в клинической практике	139
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	143
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	147
БЛАГОДАРНОСТИ	149
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	150

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БП – болезнь Паркинсона

ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

ДЛС – динамическое лазерное светорассеяние

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДС – декстрансульфат натрия

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ИТК – изотермическая титрационная калориметрия

КД – спектроскопия кругового дихроизма

ПДР – площадь поверхности, доступная растворителю

ПолиЦ – полицитидилат калия

ПСС – поли(стиролсульфонат) натрия

ПФ – полифосфат натрия

ПЭВП – бромид поли-N-этил-4-винилпиридиний

РНК – рибонуклеиновая кислота

УФ – ультрафиолет

AGE – конечные продукты гликирования

CML – карбоксиметиллизин

CMF – (карбоксиметил)фенилаланин

IDP – внутренне неупорядоченные белки

NAD⁺ – никотинамидадениндинуклеотид (окисленный)

NADH – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный)

PMF – потенциал средней силы

pTyr – фосфорилированный тирозин

sTyr – сульфатированный тирозин

SuccK – сукциниллизин

WHAM – метода анализа взвешенных гистограмм

ВВЕДЕНИЕ

1. Актуальность проблемы и степень разработанности темы

Электростатические взаимодействия играют важную роль во многих биологических процессах, поскольку они контролируют специфичность взаимодействия белков с другими заряженными полимерами. В частности, белки содержат заряженные аминокислоты, а именно остатки аспартата, глутамата, лизина, аргинина и гистидина. В результате поверхность белка имеет отрицательно и положительно заряженные участки, которые важны для взаимодействия белка с другими макромолекулами [1].

Частным случаев белков с высокой плотностью заряда являются внутренне неупорядоченные белки, повышенное содержание заряженных аминокислот в которых дестабилизирует структуру подобных молекул и приводит к отсутствию компактной глобулы. Электростатические взаимодействия особенно важны для этого класса белков [2].

К заряженным полимерам можно отнести нуклеиновые кислоты, обладающие высокой плотностью отрицательного заряда, который необходим для образования белок-ДНК и белок-РНК комплексов [3]. Кроме того, к природным полимерам можно отнести сульфатированные полисахариды, в частности природный антикоагулянт гепарин и полисахариды, образующую клеточную стенку водорослей. Биологические системы также содержат множество фосфат-содержащих полимеров, от молекул, таких как АТФ и инозитолтрифосфат, до различных линейных полифосфатов, которые синтезируются в прокариотах и эукариотах, участвуя в энергетическом обмене [4].

Природные и синтетические гомополимеры и простые сополимеры применяются в биоинженерии, биотехнологии и фармакологии для очистки белков,

иммобилизации ферментов и направленной доставки лекарственных препаратов [5,6]. Их использование также является перспективным подходом для подавления агрегации белков. Серии экспериментов показали влияние различных характеристик полиэлектролитов и белков, а также условий среды на образование комплексов белок-полиэлектролит [7–12].

Значительное изменение локального заряда на поверхности белка может приводить к изменению пространственной структуры и функции белка. С этой точки зрения, посттрансляционные модификации, такие как фосфорилирование [13], сульфатирование [14], гликирование [15] и прочие модификации представляют особый интерес для биоинженерии, поскольку они могут изменять белок-белковые взаимодействия. Кроме того, нарушения в регуляции посттрансляционных модификаций может стать причиной развития многих заболеваний, включая диабет, онкологические и нейродегенеративные заболевания.

Особое значение имеет гликирование ГАФД, наблюдаемое при высоком уровне глюкозы у пациентов с диабетом и участвующее в развитии диабетических осложнений [16]. Было показано, что гликирование может влиять на структуру ГАФД, что приводит к инактивации фермента [17], снижению стабильности белка и повышению его склонности к агрегации [18]. Кроме того, было обнаружено, что ГАФД колокализуется вместе с α -синуклеином в тельцах Леви у пациентов с болезнью Паркинсона. Это позволяет предположить, что гликирование этих двух белков может быть одним из факторов, вовлеченных в развитие синуклеинопатий, связанных с диабетом [19].

Сульфатирование факторов свертывания крови играет важную роль в специфичности и необратимости коагуляционного каскада [20]. Сульфатированный полипептид гепарин, содержащийся в слюнных железах медицинских пиявок, является одним из наиболее высокоспецифичных природных ингибиторов тромбина [21–23]. Ключевую роль во взаимодействии гирудин-тромбин играют ионные взаимодействия между сульфатированным остатком Tyr63

на С-конце гирудина с положительно заряженной бороздкой на поверхности тромбина. Использование природного сульфатированного гирудина для медицинских целей лимитировано сложностью его получения, поэтому в клинической практике используют рекомбинантный аналог гирудина без сульфатированного остатка тирозина, что приводит к 10-кратному снижению аффинности гирудина к тромбину. Использование мутантных вариантов гирудина может увеличить аффинность и улучшить фармакологические свойства гирудина.

2. Цели и задачи

Целью данной работы является исследование взаимодействия белков с заряженными полимерами (полиэлектролитами, РНК, внутренне неупорядоченными белками) и влияния белковых посттрансляционных модификаций, ассоциированных с изменением локального заряда на поверхности белка, на это взаимодействие.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследование влияния поликатионов и полианионов на агрегацию белков (лизоцим, ГАФД, α -лактальбумин) при рН ниже и выше изоэлектрической точки белка
2. Сравнение взаимодействия полиэлектролитов разной степени полимеризации с модельным белком лизоцимом методом симуляций молекулярной динамики
3. Сравнение связывания нативного и гликированного β -казеина с различными полиэлектролитами при температуре 10°C и 25°C
4. Изучение влияния разных вариантов гликирования ГАФД на ее взаимодействие с α -синуклеином и РНК методом симуляций молекулярной динамики

5. Сравнение связывания различных производных гирудина с тромбином методами молекулярного моделирования с последующей экспериментальной проверкой антитромботической активности модифицированных форм *in vitro*.

3. Объект и предмет исследования

Объектом исследования были белки, полиэлектролиты и их молекулярные модели: лизоцим, α -лактальбумин, ГАФД, β -казеин, гликированные формы ГАФД и β -казеина, α -синуклеин, производные гирудина, полиэлектролиты.

Предметом исследования было взаимодействие белков с различными полиэлектролитами; влияние заряда белка и свойств полиэлектролита (заряд, степень полимеризации и гидрофобность) на это взаимодействие; влияние гликирования на взаимодействие β -казеина с полиэлектролитами и ГАФД с РНК и α -синуклеином; аффинность к тромбину и степень ингибирования свертывания крови различных производных гирудина.

4. Научная новизна

Впервые была продемонстрирована универсальность подхода использования полиэлектролитов для подавления агрегации различных белков. В частности, было показано, что агрегация может быть подавлена одинаково заряженным полиэлектролитом. Взаимодействие белков с полиэлектролитами было впервые изучено при помощи полноатомного молекулярного моделирования, благодаря чему была предложена модель взаимодействия, объясняющая экспериментальные данные.

Впервые было изучено влияние гликирования на структуру β -казеина и его взаимодействие с природными и синтетическими полиэлектролитами. Показан различный характер влияния гликирования ГАФД на взаимодействие с полианионами РНК и α -синуклеином. Впервые было продемонстрировано, что фосфорилирование гирудина повышает его аффинность к тромбину и увеличивает антитромботическую активность.

5. Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты углубляют теоретические представления о взаимодействии белков с полиэлектролитами и могут быть использованы для выбора полиэлектролитов в качестве инструмента для подавления агрегации белков. Данные о гликировании β -казеина и его взаимодействия с полиэлектролитами полезны для химии молочных продуктов, в частности для использования полимеров при стабилизации белков молока и предотвращении их агрегации. Результаты влияния гликирования на взаимодействие ГАФД и α -синуклеина актуальны для выяснения молекулярного механизма взаимосвязи между развитием нейродегенеративных заболеваний и сахарного диабета. Данные об аффинности к тромбину и антитромботической активности производных гирудина могут быть использованы при разработке новых антикоагуляционных препаратов для снижения рисков побочных эффектов.

6. Методология исследования

В исследовании были использованы биохимические и физико-химические методы, а также методы вычислительной биологии и биоинформатики. Все использованные методики отвечают общепринятым мировым стандартам.

Результаты экспериментов воспроизводимы и были выполнены с надлежащими контролями.

7. Положения, выносимые на защиту

1. Использование полиэлектролитов является универсальным методом подавления агрегации белков, при этом шапероноподобная активность полиэлектролита возрастает с увеличением одноименного заряда на поверхности белка и длины цепи полиэлектролита.

2. Отрицательно заряженный β -казеин активно взаимодействует с поликатионом и относительно гидрофобным сульфатированным полианионом поли(стиролсульфонат), в то время как взаимодействие с более гидрофильными сульфатированными, полифосфатными и поликарбоксилатными полианионами гораздо менее выражено.

3. Гликирование ГАФД затрудняет ее взаимодействие с полианионами α -синуклеином и РНК, хотя механизм влияния гликирования на взаимодействие ГАФД с α -синуклеином и РНК был различным.

4. Фосфорилирование десульфо-гирудина улучшает его связывание с тромбином и антитромботическую активность по сравнению с природным сульфатированием.

8. Степень достоверности данных

Обзор литературы подготовлен с использованием актуальных публикаций и соответствует теме диссертации. Данные были получены с использованием современных методов биохимии и вычислительной биологии и биоинформатики. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного

обеспечения Origin8 и RStudio. Результаты исследования были представлены на российских и международных конференциях и опубликованы в международных рецензируемых научных журналах.

9. Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в международных рецензируемых научных журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science:

1. **Sofronova, A. A.**, Izumrudov, V. A., Muronetz, V. I. & Semenyuk, P. I. Similarly charged polyelectrolyte can be the most efficient suppressor of the protein aggregation. *Polymer* **108**, 281–287 (2017); IF: 3,771, (0,44/0,35)¹
2. **Sofronova, A. A.**, Evstafyeva, D. B., Izumrudov, V. A., Muronetz, V. I. & Semenyuk, P. I. Protein-polyelectrolyte complexes: Molecular dynamics simulations and experimental study. *Polymer* **113**, 39–45 (2017); IF: 3,771, (0,44/0,3)
3. **Sofronova, A. A.**, Semenyuk, P. I. & Muronetz, V. I. The influence of β -casein glycation on its interaction with natural and synthetic polyelectrolytes. *Food Hydrocoll.* **89**, 425–433 (2019); IF: 5,839, (0,56/0,45)
4. **Sofronova, A. A.**, Pozdyshev, D. V., Barinova, K. V., Muronetz, V. I. & Semenyuk, P. I. Glycation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits the binding with α -synuclein and RNA. *Arch. Biochem. Biophys.* **698**, 108744 (2021); IF: 3,017, (0,63/0,45)

¹ В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.

10. Апробация работы

Результаты работы были представлены на международных конференциях: XXXIV зимняя школа молодых ученых "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 2022, Москва, Россия; VII Молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия; VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум "Белки и пептиды", 2019, Дагомыс, Россия; The 2nd Russia-Japan Joint Forum for Education and Research, 2018, Москва, Россия; XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2017», Москва, Россия; International Conference "Biocatalysis-2017: Fundamentals and Applications", Московская обл., Истра, Россия; V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, 2016, Сочи, Россия; XXIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», Москва, Россия; XXVIII зимняя школа молодых ученых "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", 2016, Москва, Россия; XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2015», Москва, Россия.

11. Личный вклад автора

Основные результаты работы были получены самим соискателем. Личный вклад автора заключается в анализе данных литературы, планировании и проведении экспериментов, в обработке и анализе полученных данных, подготовке публикаций.

Эксперименты по спектроскопии кругового дихроизма β -казеина были проведены при участии А. М. Арутюняна; эксперименты по седиментационному анализу комплексов β -казеина с полиэлектролитами были проведены при участии

П. В. Калмыкова и Н. Н. Магретовой; эксперименты по изотермической титрационной калориметрии были выполнены при участии В. Н. Орлова и В. Н. Мичуриной, эксперименты по динамическому лазерному светорассеянию по измерению размера и дзета-потенциала комплексов лизоцима с полиэлектролитами были выполнены Д. Б. Евстафьевой; эксперименты по поверхностному плазмонному резонансу были выполнены Д. В. Поздышевым и К. В. Бариновой.

12. Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, полученных результатов и их обсуждения, заключения, основных результатов и выводов, благодарностей и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 187 страницах, иллюстрирована 46 рисунками и 6 таблицами. Список цитируемой литературы включает 271 источник.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Электростатические взаимодействия играют важную роль для биологических процессов, поскольку клетки содержат множество заряженных молекул (Рис. 1). Во-первых, буквально все белки содержат заряженные аминокислоты, а именно остатки аспартата, глутамата, лизина, аргинина и гистидина [1]. В зависимости от pH белки заряжены положительно или отрицательно, причем многие, такие как актин, тубулин, сывороточный альбумин, гистоны, лизоцим, цитохром С и т.д., сильно заряжены в физиологических условиях [24]. Даже если заряд белковой молекулы невелик, поверхность белка обычно имеет отрицательно и положительно заряженные участки, которые важны для взаимодействия белка с другими макромолекулами. Значительное изменение локального заряда может влиять на поведение белка. С этой точки зрения, посттрансляционные модификации, такие как фосфорилирование и полифосфорилирование [13], сульфатирование [14], гликирование [15], окисление [25] и прочие модификации представляют особый интерес, поскольку они могут сильно влиять на белковые взаимодействия.

Второй класс заряженных макромолекул составляют нуклеиновые кислоты. Электростатические взаимодействия важны для взаимодействия ДНК с гистонами и конденсации хроматина [26], взаимодействия рибосомальных белков с рибосомальной РНК [27], а также для образования других комплексов белок-ДНК и белок-РНК [3]. Кроме того, существует множество заряженных полисахаридов - сульфатированных или карбоксилированных гликозаминогликанов, таких как гепарин, гепарансульфат, гиалуроновая кислота и т.д., которые формируют внеклеточный матрикс, часто являясь компонентом протеогликанов [28]. Список аналогично заряженных полисахаридов из растений включает в себя сульфатированные полимеры, такие как каррагинан и фукоидан, карбоксилированные полимеры, такие как альгиновая кислота, пектин, и т.д. Некоторые из них широко используются в пищевой химии [29] или предлагаются для использования в медицине [30]. Наконец, необходимо упомянуть фосфат-

содержащие макромолекулы, которые широко присутствуют в живых клетках: от небольших молекул, таких как АТФ и инозитолтрифосфат, до различных линейных полифосфатов, которые синтезируются в прокариотах и эукариотах [4] и могут быть ковалентно присоединены к белкам [13].

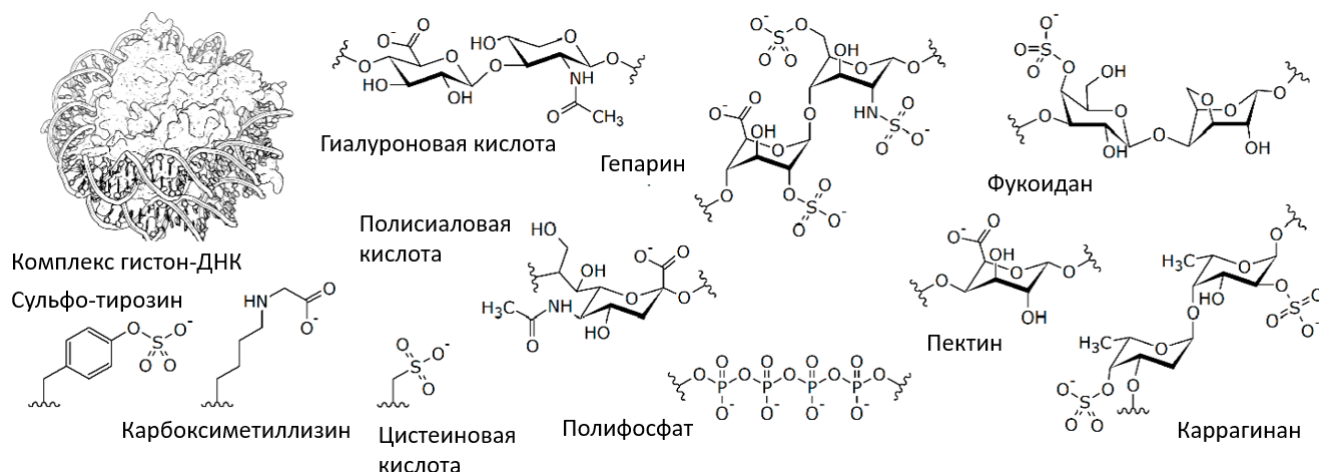


Рисунок 1. Примеры наиболее важных заряженных полимеров, встречающиеся в природе, и посттрансляционных модификаций, связанных с изменением локального заряда на поверхности белка. Адаптировано из [31].

1. Взаимодействие белков с полиэлектролитами

Гомополимеры и простые (с биологической точки зрения) сополимеры заряженных повторяющихся единиц-мономеров могут рассматриваться как упрощенная модель для изучения электростатических взаимодействий, так как такие взаимодействия, как правило, обусловлены зарядом [32]. В зависимости от того заряда, которые несут полиэлектролиты, они могут быть разделены на полианионы, поликатионы и полиамфолиты.

Белок-полиэлектролитные комплексы имеют большое значение для современной науки и промышленности в связи с их применением в биоинженерии, фармакологии и биотехнологии. Полиэлектролиты могут быть использованы для

разделения или очистки белков, направленной доставки лекарств, иммобилизации ферментов и т.д. [5,6]. Кроме того, использование полиэлектролитов является эффективным и перспективным методом подавления агрегации белков [7,33,34]. Было показано, что добавление избытка поликатиона или полианиона приводит к образованию водорастворимых белок-полиэлектролитных комплексов. Предполагается, что находящиеся на поверхности белка заряженные аминокислотные остатки взаимодействуют с противоположно заряженной цепью полиэлектролита. Электростатическое отталкивание белок-полиэлектролитных комплексов предотвращает самоагрегацию белков и обеспечивает растворимость (Рис. 2) [7]. Более того, полиэлектролиты способны растворять предварительно сформированные агрегаты [35].

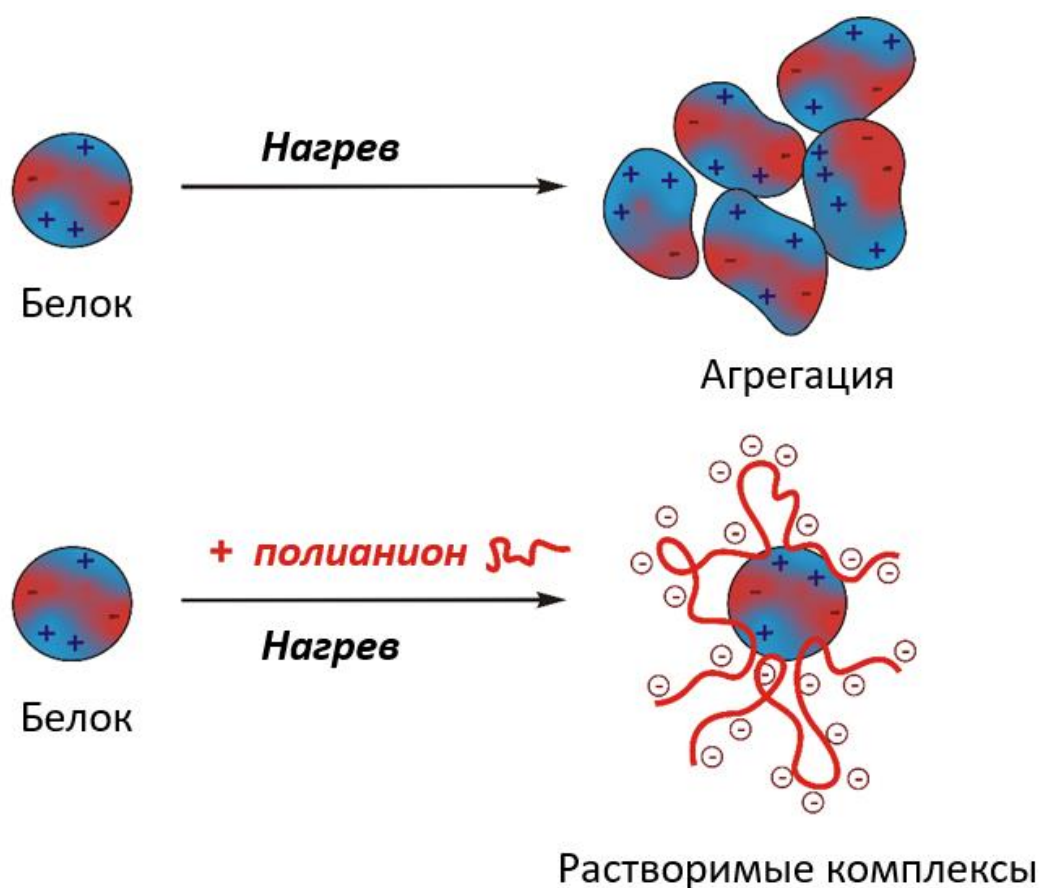


Рисунок 2. Предотвращение агрегации белков с использованием полиэлектролитов. Адаптировано из [7]

Еще одной причиной для изучения белок-полиэлектrolитных взаимодействий является их важность для живых организмов. Так, многие белки взаимодействуют с природными полифосфатами [36], включая ДНК и РНК [3], и сульфатированными полимерами [37].

1.1. Влияние различных характеристик полиэлектролита на подавление агрегации белков

Белки и полиэлектролиты взаимодействуют в основном посредством электростатических сил, образуя комплексы, которые могут иметь различную стехиометрию и архитектуру. На связывание белков с полиэлектролитами влияет множество факторов, которые, прежде всего, связаны со структурой белка (наличие гидрофобных и заряженных остатков на поверхности [8,9]) и полиэлектролита (степень полимеризации [7,9–12], гидрофобность [7,10–12], жесткость цепи [8] и др.), а также с концентрациями обоих компонентов [8].

Степень гидрофобности полиэлектролита оказывает существенное влияние на образование белок-полиэлектrolитных комплексов и, следовательно, подавление агрегации белков. Более гидрофильные полиэлектролиты взаимодействуют с белком за счет кулоновских взаимодействий [7]. Наличие у полиэлектролитов ароматических и незаряженных структур, делает возможным гидрофобные взаимодействия между белком и полиэлектролитом [7,10]. В ряде работ было выявлено, что более гидрофобные полиэлектролиты предотвращают агрегацию при меньших концентрациях, чем относительно гидрофильные [12]. Предположительно, данный эффект обуславливается заменой неблагоприятных межмолекулярных взаимодействия между гидрофобными участками белков на гидрофобные взаимодействия между белком и полиэлектролитом [11].

Так в нескольких работах показано, что гидрофобный поли(стиролсульфонат) (ПСС) ингибирует агрегацию эффективней, чем гидрофильный полифосфат (ПФ) или декстрансульфат (ДС) [7]. Заметим, что заряженные группы ПСС и ДС сходны, поэтому различие в силе взаимодействия определяется именно степенью гидрофобности полиэлектролита. Сходная закономерность была выявлена для поликатиона поли-N-этил-4-винилпиридиния (ПЭВП) [11]. При добавлении к поликатиону гидрофобных групп (например, алкилирование), ПЭВП подавляет агрегацию эффективнее.

Образование белок-полиэлектролитных комплексов оказывает негативное влияние на структуру белка и приводит к его денатурации [34,38]. Было показано, что гидрофобные полиэлектролиты нарушают белковую структуру сильнее, чем гидрофильные [10]. Вероятно, гидрофобные полиэлектролиты способны связываться с гидрофобным ядром, что приводит к дестабилизации белка. Так, использование гидрофильных полиаргинина, гепарина, ПФ не дестабилизирует нативную структуру белка, оказывая минимальный эффект на стабильность белка и улучшает их растворимость [7,9,38]. На данный момент существуют статьи, описывающие возможную шаперонную активность этих трех полиэлектролитов [11,38–40].

Важная характеристика полиэлектролита – длина цепи – непосредственно влияет на эффективность подавления агрегации [12]. Было установлено, что чем выше степень полимеризации полиэлектролита, тем лучше он предотвращает агрегацию. Существует несколько объяснений этого явления. Во-первых, более длинные цепи полиэлектролита образуют заряженные хвосты и петли вокруг молекулы белка, которые отталкиваются друг от друга, в отличие от коротких цепей, которые этих петель не имеют [8]. Во-вторых, это может объясняться тем, что одной из движущих сил образования комплекса является выигрыш в энтропии за счет высвобождения низкомолекулярных ионов, и короткие цепи в этом смысле менее выгодны, что делает комплексы менее устойчивыми [11].

Кроме того, взаимодействие белка и полиэлектролита зависит от жесткости цепи последнего. На данный момент предложена модель, учитывающая влияние жесткости полиэлектролитов на образование белок-полиэлектролитных комплексов [8]. Согласно этой модели, количество связывающихся с белком мономеров варьируется в зависимости от жесткости полиэлектролита. Более подвижные цепи образуют петли, чего не могут делать жесткие цепи - они плотно оплетают белок и не способны образовывать петель из-за слишком малого возможного угла между мономерами. Следуя этой модели, можно предположить, что эффективность подавления агрегации у подвижных цепей будет выше.

1.2. Влияние среды на эффективность подавления агрегации полиэлектролитами

В образовании комплексов полиэлектролитов с белком участвуют электростатические взаимодействия, поэтому образование таких комплексов зависит от ионной силы раствора [7,10]. Было установлено, что увеличение ионной силы раствора способно полностью подавлять образование комплексов [7]. Кроме того, ионная сила оказывает влияние на способность полиэлектролитов подавлять агрегацию белков. Растворимые комплексы остаются стабильными на начальный момент добавления соли, но с ростом концентрации соли в растворе уровень агрегации плавно увеличивается и в итоге становится равным уровню агрегации свободного белка [11].

Взаимодействие между полиэлектролитом может быть увеличено или уменьшено за счет изменения значения pH раствора. При значении pH меньшем, чем изоэлектрическая точка, белок заряжен положительно, поэтому он хорошо взаимодействует с полианионом. И, наоборот, при высоком значении pH, когда белок заряжен отрицательно, он взаимодействует с поликатионом. Кроме того, взаимодействие полиэлектролита с белком осуществляется ниже и выше pI белка, что объясняется анизотропией (неравномерностью) распределения заряда на белке,

то есть наличием на его поверхности положительно и отрицательно заряженных областей [9,41]. Таким образом, это способствует образованию ионных пар даже между полиэлектролитом и одноименно заряженной белковой глобулой.

2. Неструктурированные белки

2.1. Особенности структуры внутренне неупорядоченных белков

Внутренне неупорядоченные белки (или «intrinsically disordered proteins», IDP) — это белки, не образующие в водном растворе стабильную пространственную структуру, характерную для глобулярных белков, но при этом выполняющие определенные функции [42]. В процессе функционирования (например, при связывании с мишенью), для некоторых IDP наблюдается переход из неупорядоченного в упорядоченное состояние [43]. Структура некоторых белков полностью неупорядоченная, в то время как другие, к которым относится большинство белков в протеоме эукариот, содержат протяженные неупорядоченные участки, а также структурированные глобулярные домены [44]. Здесь, мы будем использовать термин IDP как общий для обозначения класса белков, содержащих протяженные неструктурированные участки, необходимые для функционирования.

Отсутствие жесткой упорядоченной структуры позволяет неструктурированным белкам играть важную роль во многих клеточных процессах, включая регуляцию транскрипции/трансляции, регуляцию клеточного цикла, процессинг мРНК, апоптоз и сборку крупных белковых комплексов или немембранных органелл, прежде всего за счет способности взаимодействовать с несколькими белками-партнерами, возможности обойти стерические ограничения при связывании и увеличения области контакта [43,45].

Аминокислотный состав IDP значительно отличается от аминокислотного состава глобулярных белков (Рис. 3А) [46]. Было показано, что IDP содержат

значительно большее количество остатков пролина, лизина и глутаминовой кислоты, чем структурированные белки. В то же время, содержание таких аминокислот, как триптофан, тирозин, фенилаланин, цистеин, изолейцин, лейцин сильно снижено в IDP по сравнению с глобулярными белками [47]. Такого рода дисбаланс в аминокислотном составе как раз и объясняет неструктурированную природу IDP. Анализ аминокислотного состава напрямую показывает, что IDP содержат меньшее количество гидрофобных аминокислот, следовательно, белковая глобула не может быть стабилизирована гидрофобными взаимодействиями, при этом избыточный заряд еще сильнее дестабилизирует структуру подобных молекул. Таким образом, важным признаком IDP являются высокая плотность заряда и относительно низкая гидрофобность (Рис. 3Б), что делает электростатические взаимодействия критически важными для данного класса белков [2].

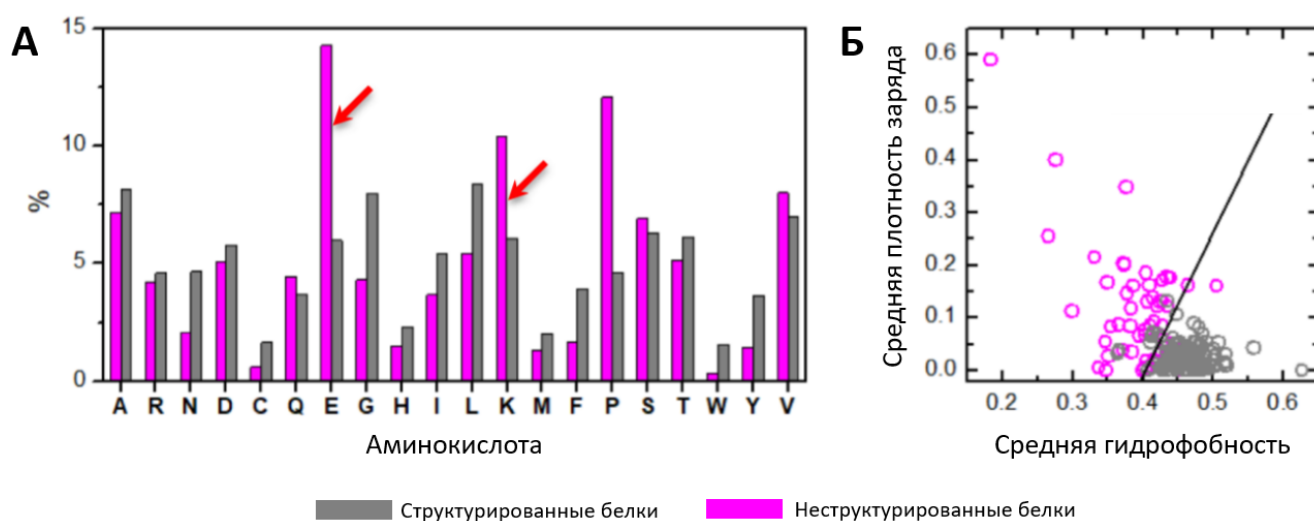


Рисунок 3. Особенности первичной аминокислотной последовательности IDP по сравнению с глобулярными белками. (А) Распределение частоты встречаемости аминокислот и (Б) соотношение средней плотности заряда и гидрофобности для структурированных и неструктурированных белков. Адаптировано из [2].

Неструктурированные белки изучаются в основном при помощи ЯМР-спектроскопии, а также малоуглового рассеяния рентгеновских лучей. Кроме того, неструктурированные белки возможно изучать следующими методами [48]:

- спектроскопия кругового дихроизма (КД) в ближнем и дальнем ультрафиолете;
- гидродинамические параметры, полученные с помощью геле-хроматографии, седиментационного анализа или динамического лазерного светорассеяния (ДЛС);
- флуоресцентные характеристики белка;
- повышенная доступность к протеолизу;
- иммунохимические методы (антитела на разные состояния белка);
- инфракрасная спектроскопия на основе преобразования Фурье;
- FRET одной молекулы (single-molecule fluorescence resonance energy transfer);
- рентгеноструктурный анализ (участки без четкой электронной плотности являются неструктурированными).

Одним из наиболее распространенных методов исследования IDP является спектроскопия КД. Неупорядоченная полипептидная цепь характеризуется довольно специфичной формой спектра КД в дальней ультрафиолетовой области. В области 200 нм (преимущественно неупорядоченные структуры и частично β -складки) наблюдается значительный отрицательный максимум молярной эллиптичности, а в области 222 нм (преимущественно α -спирали) молярная эллиптичность приближается к нулю [49].

2.2. Казеины как пример внутренне неупорядоченных белков

К внутренне неупорядоченным белкам относятся молочные белки казеины. Один литр коровьего молока содержит в среднем 30-35 г белка, которые могут быть разделены на две основные группы: казеины (24-28 г/литр) и растворимые сывороточные белки (5-7 г/литр), остающиеся в сыворотке после осаждения казеинов [50]. Фракция сывороточных белков включает в себя множество различных белков, основными из которых являются β -лактоглобулин (52 %), α -лактальбумин (23 %), иммуноглобулины (16 %) и альбумин сыворотки крови (8 %) [51]. Казеиновая фракция в основном присутствует в виде мицелл казеинов – сферических комплексов, содержащих казеин и фосфат кальция [50]. Мицеллы не имеют плотной структуры, а их диаметр варьируется от 50 до 300 нм (Рис. 4) [52]. Точная организация мицелл казеинов до сих пор не определена [53]. Образование мицелл преимущественно происходит за счет гидрофобных взаимодействий, ослабляющиеся при снижении температуры; электростатических взаимодействий, в основном между кальцием и отрицательно заряженными остатками казеинов и водородных связей.

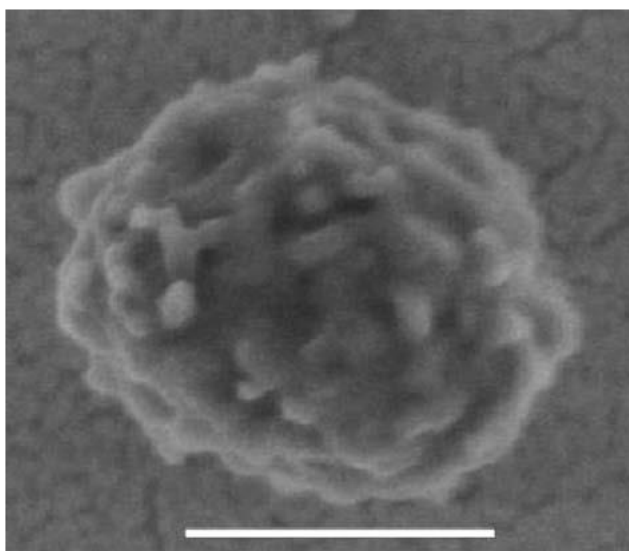


Рисунок 4. Электронная микрофотография мицелл казеина [53]

Коровье молоко содержит казеины 4 типов: α_{S1} -казеин, α_{S2} -казеин, β -казеин, κ -казеин, кодируемых каждый своим геном, которые отличаются по своей первичной структуре и подверженности посттрансляционным модификациям [54].

β -казеин составляет примерно 45% от общей фракции казеинов. Наиболее распространенный вариант A2 состоит из 209 аминокислот и имеет молекулярную массу порядка 24 кДа.

Аминокислотный состав казеинов отличается от типичных глобулярных белков. Так, казеины содержат большое количество гидрофобных остатков с неравномерным распределением гидрофильных и гидрофобных остатков [50]. β -казеин проявляет свойства поверхностно-активного вещества из-за наличия гидрофильной «головы» и гидрофобного хвоста, получающихся за счет распределения аминокислот (Рис. 5). N-концевой конец β -казеина (остатки 1-41) очень гидрофилен и отрицательно заряжен, т.к. содержит 5 фосфорилированных остатков серина. Участок 49-209, наоборот, очень гидрофобен и содержит большое количество нейтрально-заряженных аминокислот. β -казеин является самым гидрофобным среди всех казеинов [50].

С помощью различных методов структурного анализа показано, что β -казеин содержит небольшие участки, организованные в виде α -спиралей и β -слоев. Кроме того, β -казеин содержит относительно большое количество остатков пролина (35 из 209, т.е. 17%), которые образуют цепочки Pro-Pro или Pro-X-Pro, что приводит к многочисленным β -поворотам во вторичной структуре белка [55,56].

Благодаря своим амфифильным свойствам β -казеин обладает способностью к самоассоциации в форме мицелл. Такая ассоциация осуществляется за счет гидрофобных взаимодействий, с одной стороны, и электростатических связей, с другой. Мономерная фракция β -казеина наблюдается при температуре 0-4°C, когда гидрофобные взаимодействия ослаблены. Мицеллы β -казеина варьируются по количеству мономеров (15-60), гидродинамическому радиусу (7,3 – 13,5 нм) и

радиусу, наблюдаемому в электронный микроскоп (15 нм). При комнатной температуре мицелла β -казеина содержит приблизительно 40-50 мономеров [50].

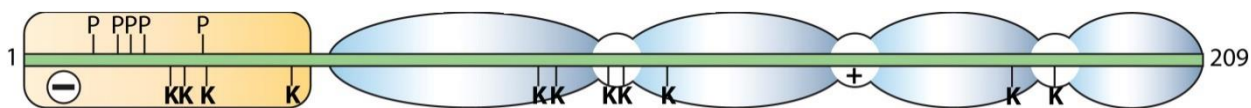


Рисунок 5. Структура β -казеина. Гидрофобные области показаны серыми овалами, полярные - прямоугольниками. Фосфорилированные остатки серина и остатки лизина в последовательности выделены отдельно.

Для казеинов характерны различные посттрансляционные модификации, самая распространённая среди которых фосфорилирование остатков серина, сгруппированные в фосфосериновые кластеры (последовательность Ser-Ser-Ser-Glu-Glu), кроме того, α_{S1} -казеин может быть фосфорилирован по остатку треонина. Различные генетические варианты казеинов фосфорилированы в разной степени и могут иметь от 1 до 13 фосфорилированных остатков [51]. Именно благодаря наличию кластера отрицательно заряженных фосфорилированных аминокислот казеины способны связывать ионы Ca^{2+} [57]. Кроме посттрансляционного фосфорилирования, встречается гликозилирование к-казеина по некоторым остаткам треонина [50].

В процессе хранения молочных продуктов [58], а также при тепловой переработке, такой как стерилизация и приготовление сухого молока при 180-200°C [59], молочные белки (в частности казеины) подвергаются неферментативному гликированию. Было показано, что гликирование молочных белков, включая β -казеин, значительно изменяет их структуру и свойства [60–62]. Согласно спектрам кругового дихроизма, гликированный β -казеин содержит больше β -поворотов и меньшее количество неструктурированных петель [63]. Было показано, что гликирование β -казеина увеличивает растворимость белка

[64,65]. С другой стороны, гликирование может быть подходом к снижению аллергенности молочных белков [62,66].

Взаимодействие гликированных молочных белков с полиэлектролитами представляет особый интерес из-за интенсивного использования полисахаридов (в том числе сульфатированных, таких как каррагинан) в пищевой химии [67,68]. В частности, известно, что β -казеин взаимодействует с сульфатированными полисахаридами [69]. Кроме того, полиэлектролиты способны защищать белок от агрегации и поэтому могут быть использованы для его стабилизации в молочных продуктах [70].

2.3. α -синуклеин

α -Синуклеин представляет из себя нейрональный белок, который преимущественно присутствует в пресинаптических нервных терминалях [71]. Впервые белок был обнаружен в электрическом органе скатов *Torpedo californica* с помощью антител к очищенным везикулам в холинергических синапсах [72]. Кроме того, α -синуклеин был обнаружен в ядерной оболочке клеток, отсюда и название белка синуклеин – от синаптических везикул («syn») и ядерной локализации («nuclein») [72]. α -Синуклеин стал объектом интенсивных исследований после открытия его центральной роли в различных нейродегенеративных заболеваниях [73], совместно называемых синуклеинопатиями. В частности известно, что α -синуклеин участвует в развитии болезни Паркинсона (БП) [73], нейродегенеративных заболеваний с образованием телец Леви (которые в качестве основного компонента содержат агрегаты α -синуклеина) [74], множественной системной атрофии [75] и нейродегенерации с накоплением железа [76].

2.3.1. Функции α -синуклеина

В литературе описано множество гипотетических функций α -синуклеина, однако точная физиологическая роль этого белка до сих пор остается неясной. Связывание α -синуклеина с фосфолипидами и сходство α -синуклеина с аполипопротеинами предполагает его роль в транспорте липидов [77]. Кроме того, было показано, что α -синуклеин является специфическим ингибитором фосфолипаз D1 и D2, что позволяет предположить, что α -синуклеин может участвовать в расщеплении мембранных липидов и биогенезе мембран [78,79]. Более того, предполагается, что α -синуклеин может быть способен активно ремоделировать мембраны [80].

α -синуклеина способен связываться с другими внутриклеточными белками, проявляя шапероноподобную активность. α -синуклеин имеет структурную и функциональную гомологию с семейством молекулярных белков-шаперонов 14-3-3 [81] и белками малого теплового шока [82]. С-концевой домен α -синуклеина способен взаимодействовать с термоденатурированными белками и подавлять их агрегацию, а сверхэкспрессия α -синуклеина защищает дофаминергические нейроны от окислительного стресса и апоптоза [83]. Кроме того, сверхэкспрессия α -синуклеина спасает летальную нейродегенерацию, вызванную нокаутом кошаперонина CSP α у мышей, участвующего в экзоцитозе, путем сборки белковых комплексов SNARE [84].

α -Синуклеин ингибирует синтез дофамина путем подавления экспрессии и активности тирозингидроксилазы, участвующей в биосинтезе дофамина. Кроме того, α -синуклеин влияет на дофамин-транспортирующий везикулярный транспортер VMAT2 [85,86].

Пресинаптическая локализация α -синуклеина, его взаимодействие с синаптическими везикулами и синаптобревином-2, компонентом комплекса SNARE, свидетельствуют о том, что α -синуклеин играет роль в транспорте

синаптических везикул, их рециклинге и слиянии с мембраной при экзоцитозе и высвобождении нейротрансмиттеров в синаптическую щель [87].

2.3.2. Строение α -синуклеина

α -Синуклеин — это небольшой растворимый белок (140 аминокислот, молекулярная масса 14 кДа). В аминокислотной последовательности α -синуклена можно выделить три участка: N-концевой домен (остатки 1-60), гидрофобный центральный неамилоидный компонент (NAC-домен, non-amyloid component, остатки 61-95) и гидрофильный C-концевой домен (остатки 96-140) [71]. N-конец и NAC-домен содержат семь повторов последовательности из 11 остатков, включающей в себя консервативный мотив KTKEGV. N-концевая область α -синуклеина схоже по структуре с липид-связывающим доменом аполипопротеинов, благодаря чему может связываться с фосфолипидным слоем мембран [77]. NAC-домен α -синуклеина предположительно ответственен за фибриллизацию и агрегацию α -синуклеина [88].

C-концевая последовательность α -синуклеина не структурирована и богата отрицательно заряженными аминокислотами, в частности остатками глутамата [89]. Неструктурированная природа C-концевой области α -синуклеина позволяет белку взаимодействовать с различными молекулами - α -синуклеин участвует в связывании ионов, поликатионов и полиаминов и белков. Кроме того, C-домен участвует в модуляции связывания α -синуклеина с мембраной и в защите белка от агрегации [90]. Усеченные по C-концу варианты α -синуклеина оказываются более склонными к агрегации, чем полноразмерные варианты.

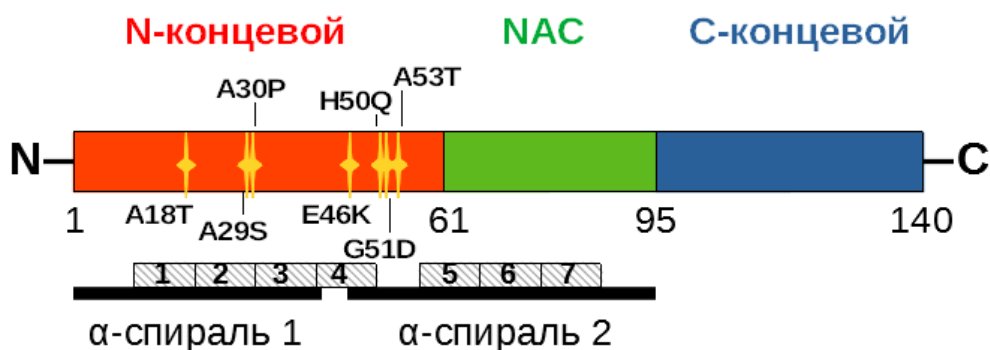


Рисунок 6. Структура белка α -синуклеин человека. α -синуклеин содержит три основных домена: N-концевой домен (остатки 1-60), NAC-домен (остатки 61-95) и отрицательно заряженного неструктурированный C-конец (остатки 96-140). Заштрихованные прямоугольники с номерами 1-7 – повторы длиной 11 аминокислот, содержащие консервативный мотив KTKEGV. Указаны участки последовательности, формирующие две α -спирали при взаимодействии с клеточной мембраной. Желтым цветом указаны точечные мутации, ассоциированные с повышенной вероятностью развития болезни Паркинсона.

α -Синуклеин подвергается многочисленным посттрансляционным модификациям, в основном в пределах неструктурированной C-концевой последовательности, включая фосфорилирование, окисление, ацетилирование, убиквитинирование, гликирование, гликозилирование, нитрозилирование, некоторые из которых, по-видимому, характерны исключительно для α -синуклеина, присутствующем в тельцах Леви [71]. Посттрансляционные модификации приводит к изменению заряда и структуры белка, а также к изменению аффинности связывания с другими белками и липидами и общей гидрофобности белка.

Фосфорилирование α -синуклеина может регулировать его структуру, связывание с мембраной, олигомеризацию, образование фибрилл и нейротоксичность [91]. C-конец α -синуклеина содержит несколько сайтов

фосфорилирования: остатки серина Ser87 и Ser129 и остатки тирозина Tyr125, Tyr133 и Tyr135. Было показано, что фосфорилирование остатка Ser129 стимулирует агрегацию α -синуклеина. Кроме того, большая часть α -синуклеина в составе телец Леви характеризуется наличием данной посттрансляционной модификации [92].

Нитрозилированные и окисленные формы α -синуклеина вовлечены в патогенез БП и болезни диффузных телец Леви [93]. Однако остается неясным, являются ли эти посттрансляционные модификации первичным событием, приводящим к агрегации α -синуклеина, или же они происходят при реакции реактивных форм азота с предварительно сформированными фибриллами. Основными мишенями для нитрозилирования являются остатки тирозина Tyr39 и Tyr125. Считается, что нитрозилирование α -синуклеина вызывает его олигомеризацию через образование межмолекулярных сшивок, возникающих за счет окисления тирозина до дитирозина, что может служить основой для образования более крупных агрегатов α -синуклеина.

Конечные продукты гликирования и α -синуклеин колокализуются в тельцах Леви в *substantia nigra*. Кроме того, гликированный α -синуклеин был выявлен в тканях мозга пациентов с БП. Было показано, что α -синуклеин может быть гликирован *in vitro* в N-концевой области под действием дикарбонильных соединений и рибозы, что индуцирует его агрегацию и цитотоксичность [94].

α -Синуклеин существует в равновесии между растворимым и мембранно-связанным состоянием, причем его вторичная структура зависит от его состояния [95,96]. Растворимый цитозольный α -синуклеин относится к внутренне неупорядоченным белкам с развернутой структурой на протяжении всей аминокислотной последовательности. При связывании с липидными мембранами семь 11-аминокислотных повторов в N-концевой области α -синуклеина образуют две амфифильные α -спирали. В связывании участвуют положительно заряженные остатки лизинов, расположенные на противоположных сторонах α -спирали α -синуклеина и отрицательно заряженные фосфо-группы фосфолипидов мембран.

В отличие от физиологических конформаций, в патологических условиях α -синуклеин принимает β -листовую амилоидную конформацию [97]. Эта β -листовая конформация связана с агрегацией α -синуклеина, формированием фибрилл и отложением белка в тельцах Леви.

2.3.3. Агрегация α -синуклеина и нейродегенерация

α -Синуклеин играет решающую роль в этиологии болезни Паркинсона (БП) и других синуклеинопатий [98]. Агрегированный α -синуклеин является основным компонентом телец Леви, образующихся внутри нейронов. Совокупность данных, полученных в ходе различных исследований *in vitro* и *in vivo*, свидетельствует о том, что неправильное сворачивание и агрегация α -синуклеина является ключевым событием в патогенезе БП [97]. Этот процесс включает образование нефибриллярных побочных продуктов агрегации α -синуклеина («off-pathway» олигомеры) и растворимых переходных промежуточных форм («on-pathway» олигомеры), которые в итоге превращаются в нерастворимые фибриллярные агрегаты с выраженной конформацией β -листа (Рис. 7). Сверхэкспрессия человеческого α -синуклеина в культивируемых нейронах и животных моделях БП также привела к цитотоксичности и возникновению симптомов БП [99]. Прямые доказательства участия α -синуклеина в патогенезе заболевания были получены в результате открытия нескольких аутосомно-доминантных мутаций в гене SNCA, кодирующего α -синуклеина [100]. Исследования *in vitro* показали, что мутации A53T, A53V, E46K и H50Q ускоряют фибриллизацию α -синуклеина [101], тогда как A30P, A53E и G51D замедляют скорость агрегации [102]. Несмотря на ряд исследований, основа различий в свойствах фибриллизации/олигомеризации α -синуклеина дикого типа и его мутантов остается неясной.

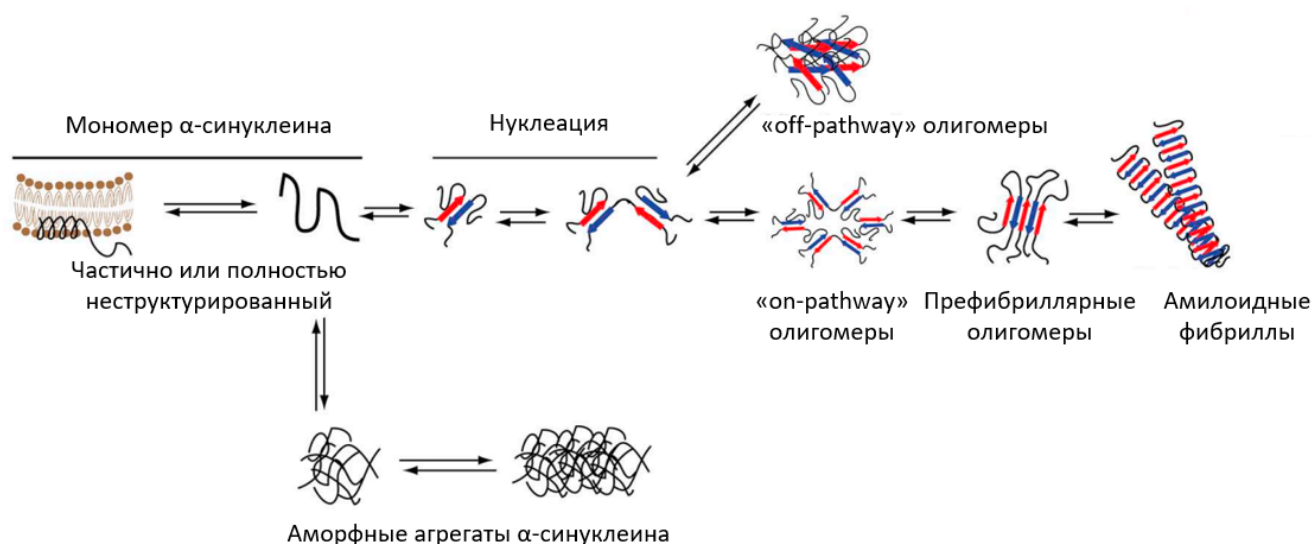


Рисунок 7. Конформационные состояния α -синуклеина. Мономер α -синуклеина существует в двух состояниях: в растворе (в полностью неструктурированной конформации) и в мембраносвязанном состоянии (частично спиральная конформация). При инкубации мономер превращается в олигомеры («on-pathway» или «off-pathway»). Олигомеры «on-pathway» превращаются в высокоупорядоченные амилоидные фибриллы с поперечными β -листами. α -Синуклеин может также образовывать аморфные агрегаты. Адаптировано из [97].

Нарушение регуляции клеточных процессов является одним из основных молекулярных механизмов нейротоксичности, связанной с агрегацией α -синуклеина. Ранее предполагалось, что амилоидные фибриллы α -синуклеина являются токсичными, однако последние исследования показали, что за патогенез БП ответственны олигомеры α -синуклеина [103]. Была выдвинута гипотеза, что увеличение проницаемости дофаминергических везикул олигомерами α -синуклеина и последующее образование реактивных форм кислорода в дофаминергических нейронах является причиной нейротоксичности и нейродегенерации при БП [104,105]. Изучение первичных событий агрегации α -синуклеина, которые включают процесс олигомеризации, очень важно для понимания этиологии БП, однако эти олигомерные формы очень нестабильны, что

делает характеристику олигомеров крайне сложной задачей. Хотя олигомеры α -синуклеина являются токсичными формами и способствуют патогенезу заболевания, фибриллы α -синуклеина играют решающую роль в распространении и прогрессировании заболевания [106,107]. Было показано, что фибриллы α -синуклеина обладают инфекционной активностью, подобно прионным белкам. Экзогенно добавленные фибриллы α -синуклеина приводят к образованию похожих на тельца Леви включения, которые затем распространяются в немодифицированные клетки, что приводит к распространению патологии БП. Было показано, что незначительные изменения условий инкубации в процессе агрегации приводят к образованию морфологически отличных амилоидных фибрилл, которые могут приводить к развитию различных патологий [108].

2.3.4. Взаимодействие ГАФД с α -синуклеином

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) – оксидоредуктаза, фермент катализирующий шестую реакцию гликолиза: превращение глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-бифосфоглицерат. Человеческий белок ГАФД представляет собой гомотетрамер с молекулярной массой 144 кДа, образованный четырьмя субъединицами О-Р (Рис. 8). Каждый мономер фермента содержит 335 аминокислот и состоит из двух доменов. N-концевой домен образует классическую укладку Россмана (β -листы с параллельной укладкой в центре, с фланкирующими его с двух сторон α -спиралями) и включает в себя NAD^+ -связывающий сайт (остатки 1-150). С-концевой каталитический домен содержит субстрат-связывающий сайт (остатки 151-335). Гомотетрамер можно описать, как димер димеров, так как фермент имеет три оси двухсторонней симметрии: ось Р разделяет поверхности фермента между субъединицами О и Р или Q и R; ось Q разделяет NAD^+ - и субстрат-связывающие бороздки между субъединицами О и Q или Р и R; ось R пересекает поверхность тетрамера между димерами О/Р и Q/R.

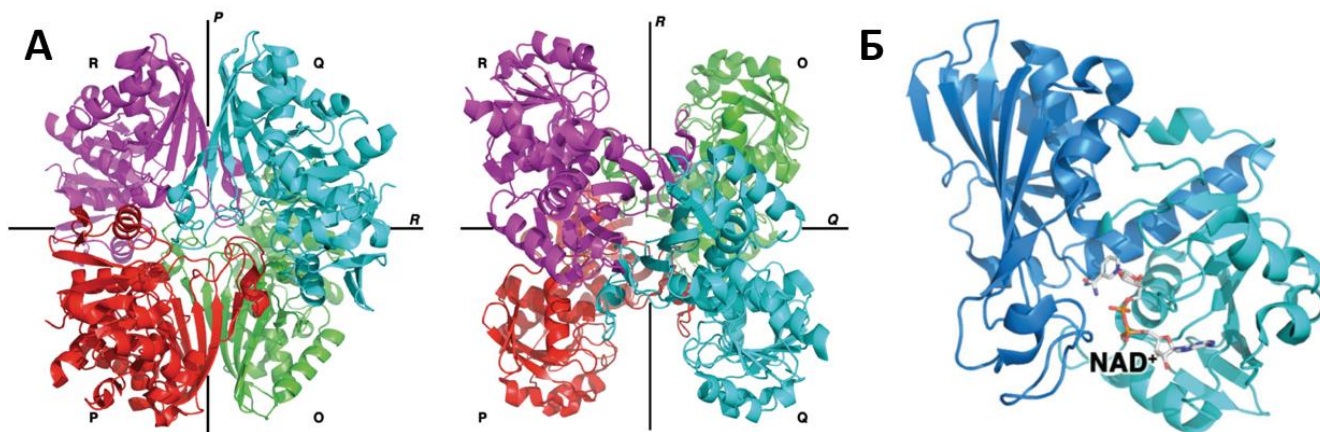


Рисунок 8. Строение фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД). (А) Нативная ГАФД состоит из четырех одинаковых субъединиц О, Р, Q и R (покрашены в зеленый, красный, сиреневый и голубой цвета соответственно) и имеет три оси двухсторонней симметрии (Р, Q, R). (Б) Каждая субъединица ГАФД состоит из двух доменов: NAD^+ -связывающий домен, состоящий из N-концевой домена и укладки Россмана (голубой цвет) и каталитический домен (синий цвет). Адаптировано из [109].

Фермент ГАФД наиболее известен своей ролью в гликолитическом метаболизме. Кроме того, ГАФД участвует во множестве других клеточных процессов, включая слияние мембран [110], апоптоз клеток [111], репликацию и репарацию ДНК [112,113], регуляцию экспрессии генов [114]. Кроме того, ГАФД может быть связан с клеточной дисфункцией при некоторых нейродегенеративных заболеваниях [115,116].

ГАФД взаимодействует с широким кругом белков-партнеров [117,118]. В частности, взаимодействие ГАФД с белком α -синуклеином приводит к ингибированию гликолиза и инициации апоптоза [119]. Кроме того, было показано, что ГАФД связана с амилоидными агрегатами α -синуклеина в тельцах Леви при болезни Паркинсона, что позволяет предположить участие ГАФД в развитии синуклеинопатий [120,121]. Дополнительно было показано, что ГАФД предотвращает амилоидогенную трансформацию α -синуклеина [122,123]. α -

Синуклеин связывается с частично окисленной формой ГАФД, что приводит к инактивации фермента [123]. С помощью молекулярного моделирования был предсказан сайт связывания α -синуклеина, который включает положительно заряженную бороздку ГАФД, образованную субстрат-связывающим и NAD^+ -связывающим сайтами (Рис. 9) [123,124].

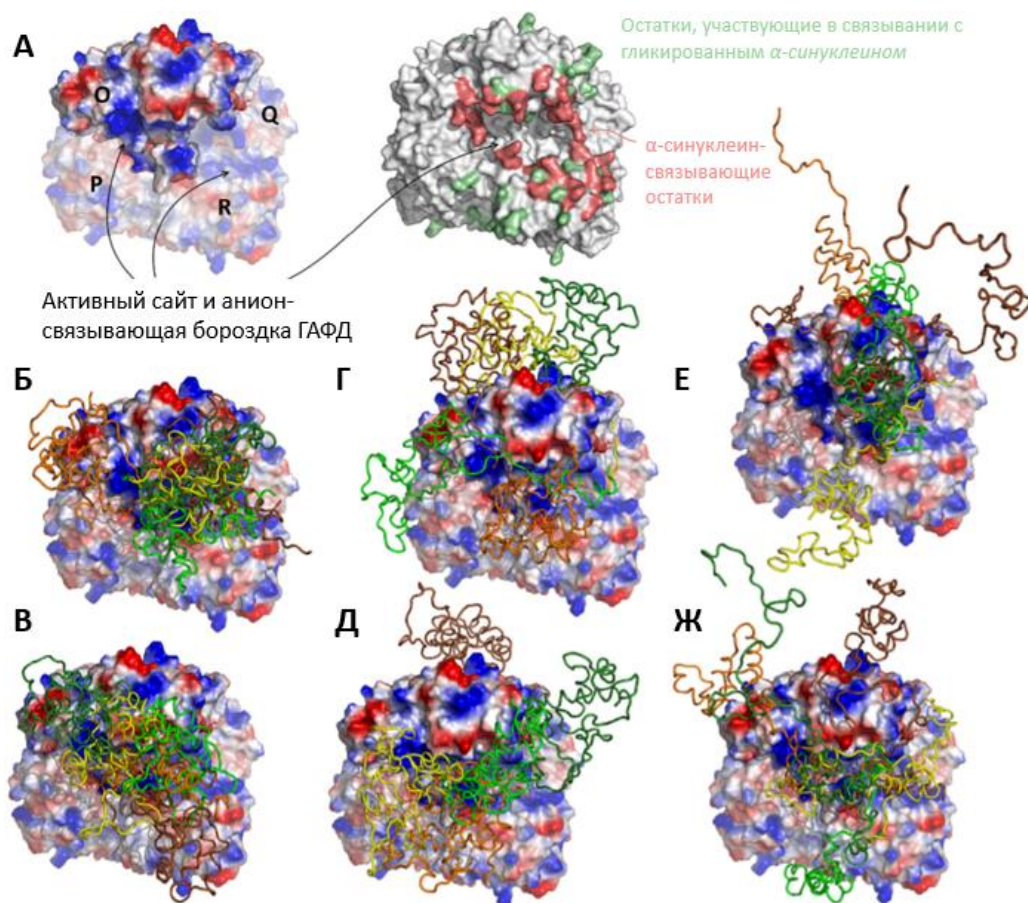


Рисунок 9. Взаимодействие α -синуклеина с ГАФД. (А) Остатки ГАФД, предположительно вовлеченные во взаимодействие с нативным (выделены розовым цветом) и гликированным (выделены зеленым цветом) α -синуклеином. (Б-Ж) Результаты молекулярного моделирования ГАФД с нативным α -синуклеином (Б-В) и двумя формами гликированного α -синуклеина (Г-Ж) для 10 симуляций с каждой формой (на каждой молекуле ГАФД показан результат 5 симуляций). Поверхность ГАФД окрашена в соответствии со значением электростатического потенциала (красный – отрицательно заряженный участок, синий – положительно заряженный), разные цвета α -синуклеина соответствуют разным симуляциям. Адаптировано из [124].

Нуклеиновые кислоты – еще один важный класс партнеров ГАФД. ГАФД связывается с широким спектром ДНК и РНК-мишеней, включая тРНК, клеточные мРНК, вирусные РНК [125,126] и полирибосомальные РНК [127]. ГАФД преимущественно взаимодействует с АУ-богатыми последовательностями РНК [128]. Биологическая роль многих взаимодействий ГАФД с РНК до сих пор неизвестны, однако было показано влияние ГАФД на стабильность мРНК [129], трансляцию РНК [130], а также участие в компартиментализации гликолитических ферментов на полирибосомах [127]. Местоположение сайта связывания РНК на поверхности ГАФД до сих пор неясно. Ряд экспериментальных данных свидетельствует о потенциальном участии положительно заряженной бороздки в связывании РНК [126,131,132]. Эта гипотеза косвенно подтверждается данными о том, что связывание ГАФД с мРНК чувствительно к окислению цистеина, расположенном в активного сайте фермента [125,128,133].

ГАФД является мишенью для нескольких посттрансляционных модификаций, таких как окисление, нитрозилирование, S-глутатионилирование, фосфорилирование, гликирование и гомоцистеинилирование аминокислотных остатков [18,116,134–136]. Особое значение имеет гликирование ГАФД, наблюдаемое при высоком уровне глюкозы у пациентов с диабетом и участвующее в развитии диабетических осложнений [16]. Гликирование может влиять на структуру ГАФД, что приводит к инактивации фермента [17], снижению стабильности белка и повышению его склонности к агрегации [18]. Кроме того, реакция гликирования приводит к модификации аминокислотных остатков аргинина и лизина ГАФД и, следовательно, изменяет локальный заряд поверхности белка. Это может повлиять на взаимодействие с заряженными партнерами ГАФД, такими как α -синуклеин и нуклеиновые кислоты, поскольку их предполагаемые сайты связывания включают в себя положительно заряженную бороздку. В частности, гликирование α -синуклеина повлияло на его связывание с ГАФД с последующим ухудшением ферментативной активности ГАФД (Рис. 9) [124]. Описанные факты

позволяют предположить, что гликирование этих двух белков может быть одним из факторов, вовлеченных в развитие синуклеинопатий, связанных с диабетом [19].

2.4. Гирудин как пример внутренне неупорядоченных белков

Еще один пример внутренне неупорядоченных белков – гирудин – небольшой полипептид, содержащийся в слюнных железах медицинских пиявок, который препятствует свертыванию крови за счет ингибирования фермента тромбина.

Нарушение в работе системы свертывания крови может привести к образованию тромбов, что может вызвать множественные опасные для жизни заболевания, такие как венозная тромбоэмболия, инфаркт миокарда и инсульт [137,138]. в процессе коагуляции участвует множество разнообразных факторов свертывания крови [139]. Среди них тромбин является ключевым ферментом в каскаде коагуляции, который отвечает за превращение растворимого фибриногена в нерастворимый фибрин для стабилизации агрегированных тромбоцитов и эритроцитов в процессе образования тромба [140]. Это делает тромбин основной мишенью для антикоагулянтных препаратов [141]. Гирудин является одним из наиболее сильных прямых ингибиторов тромбина природного происхождения и используется в качестве антикоагулянта в клинической практике для лечения острой ишемической болезни сердца, тромбоза глубоких вен и других тромботических заболеваний [21–23].

Гирудины — это секреторные полипептиды, вырабатываемые клетками слюнных желез медицинских пиявок рода *Hirudo* [142–144]. Гирудины были впервые описаны Джоном Хейкрафтом в 1884 году, и только 80 лет спустя гирудин (вариант 1) был успешно выделен и очищен из экстрактов пиявки *Hirudo medicinalis* [10]. Гирудин (вариант 1) представляет собой небольшой белок длиной 65 аминокислот с молекулярной массой около 7000 Да [145].

Гирудин взаимодействует с тромбином, образуя плотный комплекс с константой диссоциации в фемтомолярном диапазоне [146]. Гирудин относится к внутренне неупорядоченным белкам, имеющим компактный глобулярный N-концевой домен (остатки 1-53) и неупорядоченный C-концевой домен (остатки 54-65) богатый кислыми аминокислотами [147,148]. N-концевой домен содержит три консервативные внутримолекулярные дисульфидные связи и относительно гидрофобные аминокислоты, что приводит к образованию стабильного ядра молекулы. Он связывается в активном сайте тромбина, блокируя превращение фибриногена в фибрин (Рис. 10) [149]. В середине пептидной цепи находится аминокислотный триплет (Pro46-Lys47-Pro48), который обеспечивает правильное взаимодействие гирудина с тромбином [149]. C-концевая область гирудина богата кислыми аминокислотами и может связываться с фибриноген-распознающим сайтом тромбина, также известным как анион-связывающий экзосайт-I, преимущественно за счет электростатических взаимодействий (Рис. 10) [150,151]. Одной из ключевых структурных особенностей гирудина, важных для взаимодействия между C-концевым доменом и экзосайтом-I тромбина, является сульфатирование остатка Tyr63. Сульфатная группа опосредует несколько важных взаимодействий между тромбином и гирудином, что объясняет высокую аффинность и селективность природной формы гирудина (сульфо-гирудина) к тромбину [151,152].

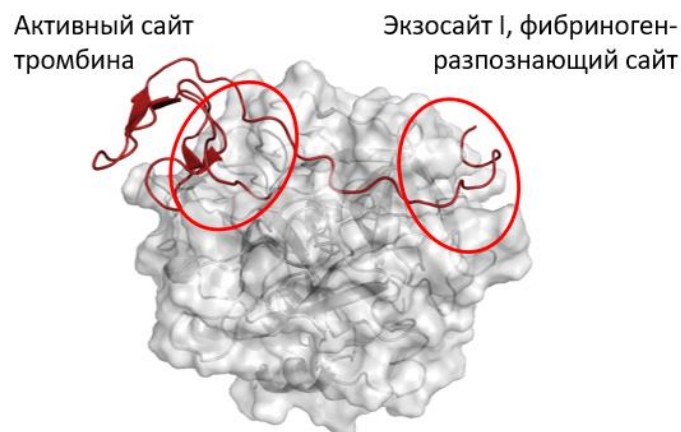


Рисунок 10. Структура и комплекса гирудин-тромбин. Гирудин представлен красным цветом, тромбин – серым. Глобулярный N-концевой домен гирудина связывается в активном сайте тромбина, неупорядоченный C-концевой домен с экзосайтом-I тромбина.

Выделение нативного гирудина из медицинских пиявок является дорогостоящим и неэффективным методом получения гирудина в промышленных масштабах. В литературе описано лишь несколько примеров успешного получения сульфогирудина. В частности, сульфогирудин был экспрессирован в клетках почек хомячка [153] и *Escherichia coli* [154] с использованием дополнительной ортогональной пары тРНК/аминоацил-тРНК-синтетаза для эффективного и избирательного включения сульфотирозина в гирудин. Кроме того, существуют примеры химического синтеза полноразмерного гирудина с помощью комбинации различных твердофазных методов [155] и сульфатирования рекомбинантного гирудина *in vitro* [156]. Тем не менее, эти подходы достаточно сложны и дают низкий выход гирудина, поэтому масштабируемость этих технологий для будущего применения в клинической практике сомнительна.

В качестве альтернативы рекомбинантный гирудин без сульфатирования тирозина может быть получен в больших количествах с использованием прокариотических [157,158] и эукариотических систем экспрессии [159–161], а

также путем бесклеточного синтеза белка [162]. Однако рекомбинантный десульфо-гирудин демонстрирует 10-кратное снижение тромбин-ингибирующей активности по сравнению с гирудином дикого типа [154,163], что делает сульфо-гирудин более выгодным для использования в клинике.

Тем не менее, несколько рекомбинантных производных десульфо-гирудина были одобрены для лечения тромботических заболеваний. Лепирудин (Рефлюдан) — это прямой ингибитор тромбина с заменой остатка лейцина на изолейцин в N-концевой области гирудина, который используется для предотвращения образования тромбов при тромбоцитопении, вызванной гепарином [164]. Дезирудин (Иприваск) — еще один ингибитор тромбина на основе рекомбинантного гирудина, который был одобрен для профилактики тромбоза глубоких вен [165]. Однако недостатки существующего гирудина, включая низкую антитромботическую эффективность (в основном из-за отсутствия сульфатирования Tug63), высокую стоимость, короткий (приблизительно 1-2 часа) время полувыведения и высокий риск кровотечения, ограничивают его клиническое применение [21]. Современные исследования сосредоточены на структурных модификациях гирудина для решения вышеупомянутых проблем [21]. Для снижения риска кровотечения и увеличения времени циркуляции в крови была разработана направленная доставка пролекарств к месту коагуляции [166]. Кроме того, были показаны улучшенные фармакологические свойства инкапсулированного в наногель гирудина, что способствует накоплению гирудина в тромбах, его саморегулируемому высвобождению во время патологического развития тромба и уменьшению побочных эффектов [167]. Время полувыведения гирудина может быть увеличено за счет различных структурных модификаций, например, включения D-аминокислот, неканонических аминокислот, конъюгации с жирными кислотами и других [168–171].

3. Посттрансляционные модификации, ассоциированные с изменением заряда

Многие болезни человека, в частности диабет, нейродегенеративные заболевания и онкология, связаны с изменением функционирования ферментов и белок-белковых взаимодействий в результате посттрансляционных модификаций белков. Некоторые из них ассоциированы с изменением локального заряда белка, например, гликирование, фосфорилирование, сульфатирование и другие.

3.1. Гликирование

Одним из видов посттрансляционных модификаций белков является гликозилирование – ферментативный процесс, в ходе которого происходит присоединение остатков сахаров к органическим молекулам. Гликозилирование протекает по ОН-группам остатков серина или треонина (О-гликозилирование) или функциональной группе бокового радикала аспарагина и лизина (N-гликозилирование) [172].

Помимо ферментативного гликозилирование в тканях организма происходит неферментативное гликирование белков [173]. Гликирование белков представляет собой сложную серию параллельных и последовательных реакций, в совокупности называемых реакцией Майара. Период полураспада этих продуктов более длительный, чем белков (от нескольких месяцев до нескольких лет), и скорость их образования зависит от уровня и длительности экспозиции с гликирующим агентом. Предполагается, что именно с их образованием связаны многие осложнения, возникающие при диабете (в частности ретинопатия, нейропатия и нефропатия) [174], при болезни Альцгеймера и при катаракте [175]. Кроме того, согласно одной из множества различных теорий, образование и накопление конечных продуктов гликирования (advanced glycation end products, AGE) является одной из причин старения [176].

Негативный эффект гликирования обусловлен как нарушением структуры и функций при присоединении глюкозы к долгоживущим белкам, так и происходящим вследствие этого окислительным повреждением белков, вызванным свободными радикалами, образующимися при окислении сахаров в присутствии ионов переходных металлов [177]. Нуклеотиды и ДНК также подвергаются гликированию, что приводит к мутациям из-за прямого повреждения ДНК и инактивации систем репарации [178].

Процесс гликирования можно разделить на две фазы: раннюю и позднюю. На первой стадии гликирования происходит нуклеофильная атака карбонильной группы глюкозы ϵ -аминогруппой остатка лизина или гуанидиновой группы остатка аргинина, в результате чего образуется нестабильное основание Шиффа – N-гликозиламин. Образование основания Шиффа – процесс относительно быстрый и обратимый. Далее происходит перегруппировка основания Шиффа с образованием соединения Амадори – 1-амино-1-дезоксиглюкозы. Скорость этого процесса ниже, чем скорость образования N-гликозиламина, но существенно выше, чем скорость гидролиза основания Шиффа, поэтому белки, содержащие остатки 1-амино-1-дезоксиглюкозы, накапливаются в крови (Рис. 11). Поздняя стадия гликирования, включающая длительный процесс дальнейшего превращения основания Шиффа и продуктов Амадори, приводит к образованию стабильных продуктов конечного гликирования (AGE) [175]. Непосредственное участие в формировании AGE принимают дикарбонильные сахара (α -оксальальдегиды), такие как глиоксаль, метилглиоксаль и 3-дезоксиглюкозон [176,179].

При гликировании глюкозой, в основном, модифицируются N-концевые аминокислотные остатки лизина. Напротив, дикарбоновые соединения (глиоксаль, метилглиоксаль, 3-дезоксиглюкозон) реагируют в основном с гуанидиновыми группами аргинина [180]. Кроме того, они имеют более высокую активность, чем глюкоза [181].

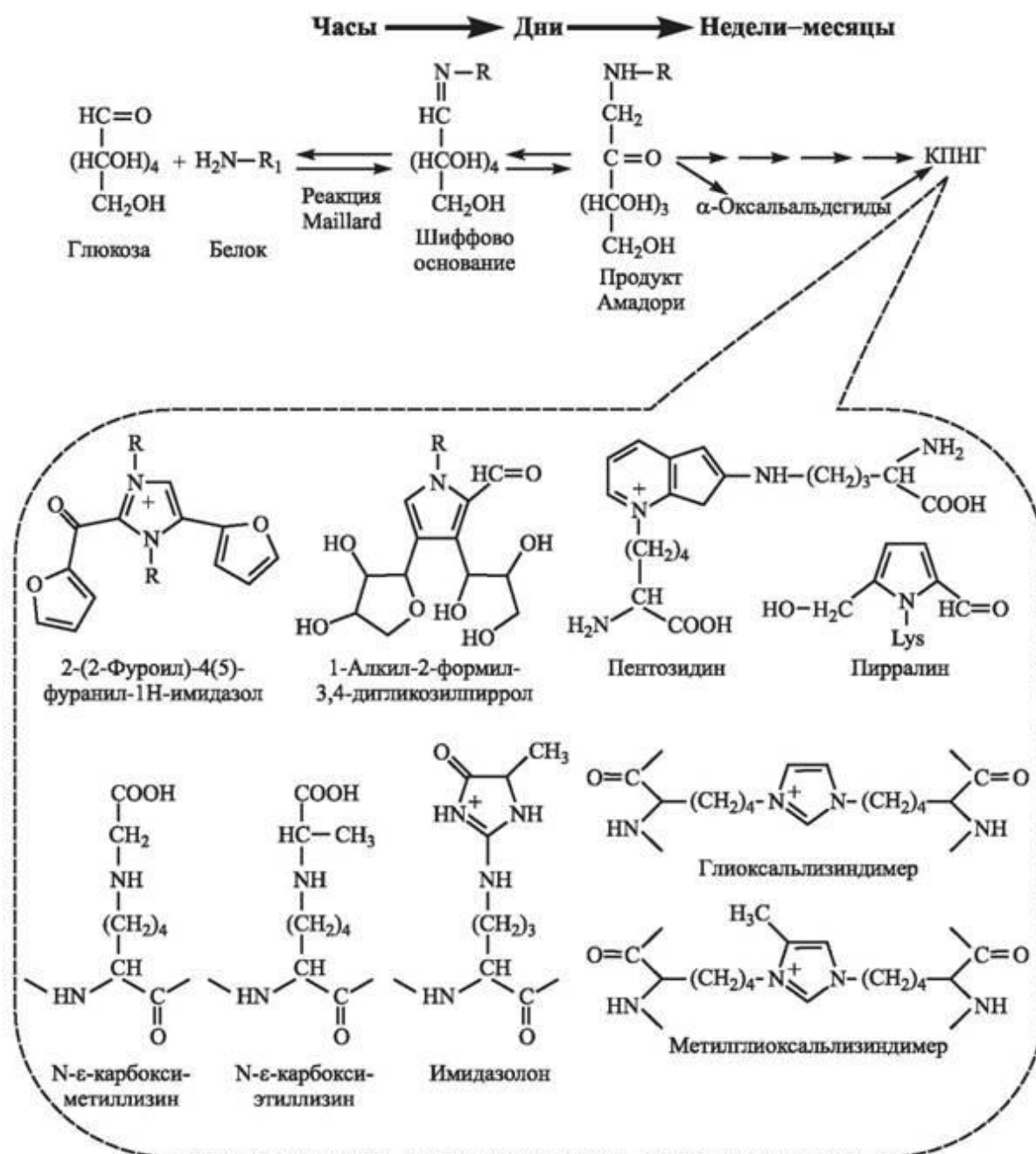


Рисунок 11. Механизм образования конечных продуктов гликирования.
Адаптировано из [176].

Среди AGE охарактеризованы N-ε-карбоксиметиллизин (CML) и N-ε-карбоксиэтиллизин, бис(лизил)имидазольные аддукты (GOLD глиоксальлизиндимер, MOLD метилглиоксальлизиндимер, DOLD дезоксиглюкозонлизиндимер), имидазолон, пирралин, пентозидин и другие

соединения (Рис. 11) [175]. В частности, продукты гликирования пентозидин и CML обнаружены в долгоживущих белках: коллагене кожи и кристаллине хрусталика. Замена положительно заряженного остатка лизина на отрицательно заряженный продукт CML приводит к сильному изменению локального заряда, что может повлиять на пространственную структуру белка [182]. Пентозидин, который представляет собой продукт поперечной сшивки соединения Амадори и остатка аргинина, был обнаружен в тканях мозга пациентов с болезнью Альцгеймера, а также в коже и плазме крови больных диабетом [183]. Образование конечных продуктов гликирования на белках базальной мембраны (коллаген IV типа, ламинин, гепарансульфат протеогликан) приводит к ее утолщению, сужению просвета сосудов и нарушению их функции, что способствуют ускоренному развитию атеросклеротического процесса [184].

3.2. Фосфорилирование

Фосфорилирование — одна из наиболее распространенных посттрансляционных модификаций, которая регулирует рост, дифференциацию и апоптоз клеток [185]. Динамичная регуляция достигается за счет обратимости и быстрой кинетики фосфорилирования, когда фосфатная группа может быть быстро присоединена и удалена киназами и фосфатазами, соответственно. Во время фосфорилирования белковые киназы переносят терминальную фосфатную группу АТФ на боковые цепи остатков серина, треонина и тирозина субстратных белков. И наоборот, белковые фосфатазы катализируют удаление фосфатной группы (дефосфорилирование), восстанавливая первоначальные свойства белка [186].

Фосфорилирование может сильно повлиять на структуру, активность, стабильность и локализацию белков в клетках, а также на их взаимодействие с другими белками [187,188]. Нарушение баланса фосфорилирования и дефосфорилирования может быть причиной многих заболеваний. Так,

неправильная регуляция работы киназ, участвующих в клеточном цикле (тирозинкиназы, MAP-киназы и т.д.), приводит к возникновению различных типов рака [189]. Тау-белок, в норме стабилизирующий микротрубочки нейронов, чрезмерно фосфорилируется при болезни Альцгеймера. Это изменяет растворимость белка, образуя токсичные нерастворимые агрегаты, которые приводят к гибели нейронов [190].

3.3. Сульфатирование

Сульфатирование – это посттрансляционная модификация, заключающаяся в ковалентном присоединении сульфата к остаткам тирозина, реже к остаткам треонина или серина [14,191]. Сульфатирование тирозина катализируется ферментом, тирозилпротеинсульфотрансферазой (TPST) в аппарате Гольджи, который осуществляет перенос сульфата от универсального донора сульфата 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата (PAPS) на гидроксильную группу боковой цепи остатка тирозина (Рис. 12) [192].

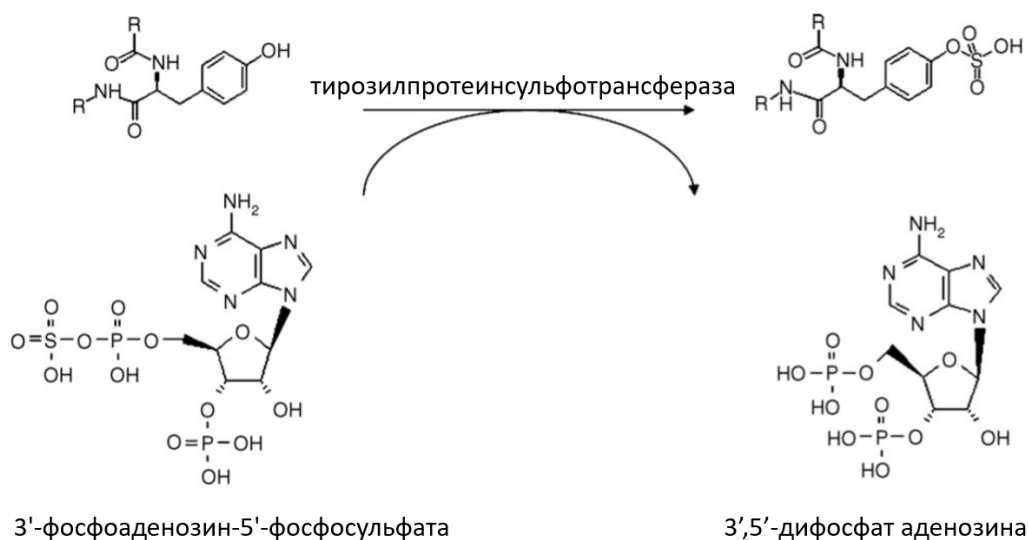


Рисунок 12. Схема образования сульфо-тирозина. Адаптировано из [193].

Сульфатирование – относительно редкая (по сравнению с фосфорилированием) посттрансляционная модификация. В частности, сульфатирование характерно для некоторых секреторных белков, белков плазматической мембраны, молекул адгезии, факторов свертывания крови [20,194–196] .

Как правило, сайт сульфатирования расположен в кислой области поверхности белка, где добавление сульфатной группы приводит к дополнительному увеличению отрицательного заряда. В результате сульфатирование изменяет белок-белковое взаимодействие [197]. Так, сульфатирование некоторых нейропептидов и токсинов активирует или ингибирует их активность [195]; сульфатирование белков, участвующих в системе свертывания крови, значительно увеличивает соответствующие константы связывания [20].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Экспериментальная часть

1.1. Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы: метилглиоксаль, глицин, пепсин, NaOH, Трис, HCl, глицерин, бромфеноловый синий, кумасси бриллиантовый синий, ДСН, KH_2PO_4 , акриламид, персульфат аммония, TEMED, изопропанол, этанол и уксусная кислота, NaCl. Все реактивы приобретены у компании Sigma-Aldrich, США.

Все буферные растворы были приготовлены с использованием дистиллированной воды, полученной с помощью системы Milli-Q (Millipore, США).

1.2. Используемые белки

В работе были использованы следующие белки: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), лизоцим, α -лактальбумин, β -казеин, α -синуклеин, С-концевой пептид гирудина и его производные.

Белок ГАФД ($pI = 8,9$) выделен из мышц кролика и очищен по стандартной технологии Скоупса [198]. Белок хранили в виде суспензии при температуре 4°C . Перед каждым экспериментом суспензию ГАФД диализировали против 1000-кратного объема 10мМ калий-фосфатного буфера с целью очищения от сульфата аммония. Диализ проводился при постоянном перемешивании в течение ночи при 4°C .

Лизоцим ($pI = 9,4$) из белка куриных яиц приобретен у корпорации Sigma-Aldrich, США.

α -лактальбумин (pI = 4,9) из коровьего молока был любезно предоставлен профессором Томасом Хартле из государственного института агрономических исследований города Нант.

β -казеин (pI = 5,1) из коровьего молока был предоставлен Юлией Стройловой из НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, Москва.

Рекомбинантный человеческий α -синуклеин, выделенный из штамма-продуцента *E. coli* по методологии, описанной ранее [199], был предоставлен Ксенией Бариновой из НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, Москва.

С-концевые (остатки 55-65) пептиды гирудина и его производные, а именно десульфо-гирудин (DFEEIPEE(Tyr63)LQ), сульфо-гирудин (DFEEIPEE(sTyr)LQ), фосфо-гирудин (DFEEIPEE(pTyr)LQ), гирудин с мутациями Tyr63CMF (DFEEIPEE(CMF)LQ) и Gln65Glu (DFEEIPEEYLE), с чистотой не менее 95%, были приобретены у компании Cloud-Clone Corp., США.

1.3. Используемые полиэлектролиты

В работе использовали полианионы гепарин натрия, полицитидилат калия (полиЦ), поли(стиролсульфонат) натрия (ПСС, $n=20, 77, 155$ и 1700), полиметакриловая (ПМАК, $n=230$) и полиакриловая (ПАК, $n=230$) кислоты, декстрансульфат натрия (ДС, $n=30$, заряд звена -2.3) и поликатион поли-N-этил-4-винилпиридиний бромид (ПЭВП, $n=340$ и 1600), где n – степень полимеризации (Рис. 13). Все полианионы и ПЭВП со степенью полимеризации 1600 были приобретены у Sigma-Aldrich, США. ПЭВП со степенью полимеризации 340 был любезно предоставлен профессором Владимиром Изумрудовым из МГУ им. М. В. Ломоносова [200].

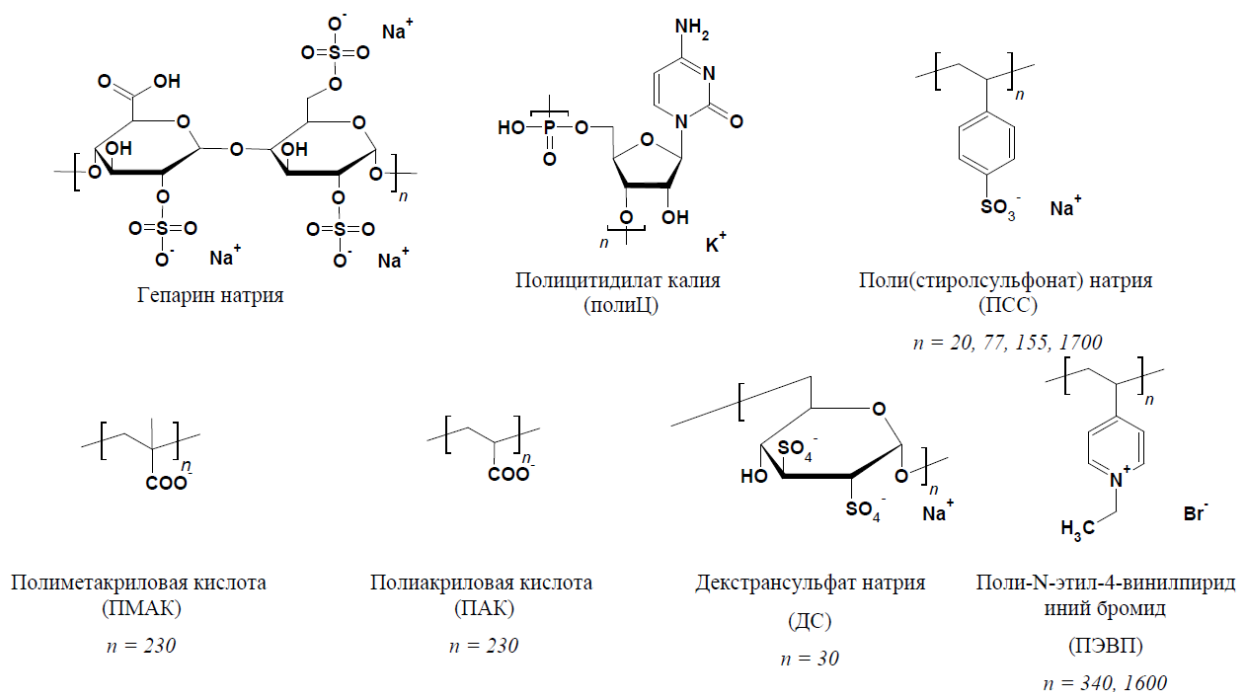


Рисунок 13. Химические формулы используемых полиэлектролитов: гепарин натрия, полицитидилат калия (полиЦ), поли(стиролсульфонат) натрия (ПСС, $n=20, 77, 155$ и 1700), полиметакриловая (ПМАК, $n=230$) и полиакриловая (ПАК, $n=230$) кислоты, декстрансульфат натрия (ДС, $n=30$) и поликатион поли-N-этил-4-винилпиридиний бромид (ПЭВП, $n=340$ и 1600), где n – степень полимеризации.

1.4. Определение концентрации белков, РНК и полиэлектролитов

Концентрацию белков (ГАФД, лизоцим, α -лактальбумин, β -казеин, α -синуклеин) измеряли спектрофотометрически при длине волны 280 нм. Были использованы следующие значения коэффициентов поглощения $A_{280}^{0,1\%}$: 1,0 для ГАФД; 2,3 для лизоцима; 1,8 для α -лактальбумина; 0,486 для β -казеина; 0,412 для α -синуклеина. Значения рассчитаны при помощи веб-сервиса ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Концентрацию С-концевых полипептидов гирудина и его производных измеряли по методу Лоури [201]. В качестве калибровочного раствора

использовали десульфо-гирудин, концентрация которого была измерена спектрофотометрическим методом с $A_{280}^{0,1\%} = 1,056$.

Концентрацию образцов РНК оценивали спектрофотометрически при длине волны 260 нм.

Концентрацию полиэлектролитов в растворе выражали как молярную концентрацию заряженных групп.

1.5. Измерение уровня агрегации белков

1.5.1. Измерение уровня агрегации ГАФД

Тепловая агрегация ГАФД была индуцирована нагреванием белка при температуре 60°C. Степень агрегации в присутствии или отсутствии полиэлектролитов оценивали путем измерения оптической плотности раствора. Измерения проводились на спектрофотометре Aminco DW2000 при длине волны 320 нм в течение 5 минут. Буферный раствор с полиэлектролитом предварительно инкубировали в течение 10 минут при температуре 60°C, затем быстро впрыскивался белок до конечной концентрации ГАФД 0,1 мг/мл. Был использован 10 мМ калий-фосфатный буфер при различных значениях pH: 6,5, 7,5 или 9,0. Относительный уровень агрегации ГАФД определяли, как отношение значений оптической плотности для каждой смеси ГАФД с полиэлектролитом к контрольному раствору ГАФД при тех же условиях. Таким образом, соотношение равное 0 соответствует полному подавлению тепловой агрегации ГАФД при добавлении полиэлектролитов, а равное 1 означает отсутствие какого-либо эффекта.

1.5.2. Измерение уровня агрегации лизоцима и α -лактальбумина

Уровень агрегации лизоцима и α -лактальбумина оценивали по размеру частиц в растворе методом динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) с использованием прибора ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания, He-Ne лазер 663 нм, 10 мВт, угол рассеяния 173°). Пробы с лизоцимом, а также со смесью лизоцима с полиэлектролитами инкубировали в течение 10 минут при температуре 75°C (в случае pH раствора 7,5 и 9) и 80°C (при pH раствора 11). Пробы с α -лактальбумином и со смесью белка и полиэлектролитов (pH раствора 6,5) инкубировали в течение 15 минут при температуре 85°C. Использовали 10 мМ калий-фосфатный буфер, концентрация лизоцима и α -лактальбумина во всех пробах была равна 1 мг/мл.

1.6. Определение дзета-потенциала и размера частиц

Дзета-потенциал и размер частиц в растворе определяли методом динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) с использованием прибора ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания, He-Ne лазер 663 нм, 10 мВт) с углом рассеяния 173°. Эксперименты с лизоцимом и ГАФД проводились при 25°C, предварительно инкубировав белки с полианионами в течение 5 минут в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH раствора 6,5. В экспериментах с лизоцимом концентрация белка была 1 мг/мл, концентрация полианионов 2 мМ. В экспериментах с ГАФД концентрация белка составляла 0,5 мг/мл, концентрация полианионов 0,35 мМ.

Гидродинамический диаметр нативного и гликированного β -казеина и комплексов β -казеина с полиэлектролитами был измерен в 20мМ калий-фосфатном буфере с pH 7,2 при температуре 10°C и 25°C. Концентрация белка 1 мг/мл, концентрация полиэлектролита в смеси 1 мМ. Измеренный диаметр

β -казеина является кажущимся диаметром частиц, поскольку трудно определить реальный гидродинамический диаметр для гибких несферических частиц, в частности для природно-развернутых белков, к которым относится β -казеин.

1.7. Гликирование β -казеина

Гликирование β -казеина (1 мг/мл или 40,8 мкМ) проводили в 20 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,2, с добавлением 2 мМ раствора метилглиоксала. Гликирование проводили в течение 1 часа при температуре 37°C при постоянном перемешивании. После гликирования метилглиоксаль удаляли с помощью центробежного концентратора. Конечные продукты гликирования детектировали методом флуоресцентной спектроскопии при длине волны возбуждения 335 нм (спектрофлуориметр (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, Франция), спектры снимали в пределах длин волн 350-600 нм. В заданных условиях собственная флуоресценция нативного белка незначительна, при этом флуоресцирующие конечные продукты гликирования детектируются по появлению пика в области 410 нм [202].

1.8. Изотермическая титрационная калориметрия

Раствор нативного или гликированного β -казеина (0,25 мг/мл или 0,5 мг/мл, что соответствует 10,2 мкМ или 20,4 мкМ) в 20 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,2, титровали путем последовательных 15 инъекций по 20 мкл 10мМ раствора полиэлектролита в том же буфере при температуре 10°C и 25°C. Дополнительные титрования с растворами полианиона меньшей молярности (1 мМ и 5 мМ) были выполнены для уменьшения молярного соотношения полианион/ β -казеин, что позволило наблюдать за первой

стадией связывания белка с полиэлектролитом. Значения энтальпий разбавления полиэлектrolита определяли титрованием буфера раствором полиэлектrolита, а затем вычитанием из значений энтальпий связывания β -казеина. Кроме того, было проведено титрование раствора β -казеина буфером для проверки возможной диссоциации мицелл при 25°C, однако теплового эффекта не наблюдалось. Все образцы были дегазированы перед экспериментом. Титрование проводили с использованием калориметра VP-ITC (Microcal, США). Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения MicroCal Origin 7.0.

Для анализа связывания β -казеина с гепарином и ПАК использовали модель одного сайта связывания («one set of sites»), соответствующую набору идентичных сайтов связывания, расположенных на поверхности одной молекулы белка. Для анализа связывания β -казеина с ПСС и полиЦ использовали модель двух сайтов связывания («two sets of sites»), которая соответствует двум различным сайтам связывания, отличающихся по значениям стехиометрии, константы ассоциации и энтальпии. В случае ПСС термодинамические параметры первой стадии определяли по изотермам связывания, соответствующим титрованию 1 мМ и 5 мМ раствора полианиона, а параметры второй стадии определяли по данным для 5 мМ и 10 мМ раствора полианиона.

1.9. Флуоресцентная спектроскопия нативного и гликированного β -казеина

Была измерена собственная флуоресценция β -казеина, соответствующая флуоресценции триптофана в 157 положении. Спектры флуоресценции снимали в системе состоящей из гликированного или нативного β -казеина, концентрацией 0,4 мг/мл в отсутствии или присутствии 0,4 мМ раствора полиэлектrolита в 20 мМ калий-фосфатном буфере pH 7,2 при температуре

10°C и 25°C. Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, Франция) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см. Ширина щели возбуждающего света и флуоресцентной щели составляла 3 нм, длина волны возбуждающего света при изучении флуоресценции составляла 295 нм, спектры флуоресцентного свечения триптофана были записаны в диапазоне длин волн 300-400 нм, каждый 1 нм. Длина волны максимума интенсивности флуоресценции триптофана меняется в зависимости от молекулярного окружения, в котором находится триптофан и варьируется от 300 до 350 нм [203]. Так, смещение спектра флуоресценции в коротковолновую сторону наблюдается при гидрофобном окружении триптофана, а в сторону длинных волн при гидрофильном окружении.

1.10. Аналитическое ультрацентрифугирование комплексов нативного и гликированного β -казеина с полимерами

Эксперименты по скорости седиментации комплексов нативного и гликированного β -казеина с полиэлектролитами проводились при температуре 10°C и 25°C, используя центрифугу модели Beckman E, оснащенную фотоэлектрической сканирующей оптической системой поглощения, при скорости 60000 об/мин (240000 g) и сканировании при 280 нм. Концентрация белка составляла 1 мг/мл, концентрация полиэлектролитов 1 мМ. Значение фрикционного отношения (f/f_0) - показателя отклонения формы молекулы от сферической (f – коэффициент трения молекулы, f_0 - коэффициент трения аналогичной сферической частицы) взяли равным 2,2, что соответствует природным неструктурированным белкам [49]. Полученные данные анализировали при помощи программы SEDFIT [204]. Плотность белка оценивали по уравнению Сведберга с использованием коэффициента

седиментации и радиуса частицы, определяемого методом динамического лазерного светорассеяния.

1.11. Спектроскопия кругового дихроизма

Исследование вторичной структуры нативного и гликированного β -казеина (0,4 мг/мл) в присутствии или отсутствии 0,4 мМ ПСС в 20 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7.2, проводили методом спектроскопии кругового дихроизма (КД). Спектры кругового дихроизма записывали при длине волны от 195 до 260 нм в области дальнего ультрафиолета на приборе Jobin Yvon CD Mark 6 в кювете с длиной оптического пути 0,1 мм при температуре 10°C и 25°C. КД спектр буфера был принят в качестве базовой линии. Каждый спектр был получен усреднением трех измерений. Расчет количества элементов вторичной структуры (α -спирали, β -листы, неструктурированные участки) проводили с помощью программы DichroWeb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>).

1.12. Протеолиз β -казеина

Частичный протеолиз нативного и гликированного β -казеина (концентрацией 1 мг/мл или 40,8 мкМ), а также β -казеина с добавлением 2 мМ ПСС проводили в присутствии 0,04 мкМ фермента пепсина в 50 мМ глициновом буфере, рН 2,5, при температуре 37°C, предварительно инкубировав пробы в течение 10 минут. Отношение фермента к субстрату 0,1%. Аликвоты по 5 мг белка отбирали через 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 и 60 минут от начала протеолиза. Протеолитическую реакцию останавливали добавлением NaOH и мгновенным кипячением пробы в течение 5 минут.

Полученные гидролизаты анализировали с помощью ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле.

1.13. ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез в денатурирующих условиях проводили по методу Лэммли [205] с использованием 16% разделяющего и 4% концентрирующего полиакриламидного геля в невозстанавливающих условиях (без β -меркаптоэтанола). К образцам белка добавляли соответствующий объем четырехкратного буфера для образцов (0,25 М Трис-НСl, pH 6,8, 8% ДСН, 40% глицерин, 0,04% бромфеноловый синий), затем пробы инкубировали в течение 5 минут на кипящей водяной бане. Разделяющий гель имел следующий состав: 2,7 мл 30% раствора акриламида; 1,25 мл 2 М Трис, pH 8,8; 1,05 мл воды; 50 мкл ДСН 10%; 20 мкл 10% раствора персульфата аммония и 10 мкл раствора TEMED. Состав концентрирующего геля: 0,45 мл 30% раствора акриламида; 0,6 мл 0,5 М Трис, pH 6,8; 1,45 мл H₂O; 20 мкл ДСН 10%; 10 мкл 10% раствора персульфата аммония и 5 мкл TEMED. В лунку геля наносили по 5 мкг каждого белка. В качестве маркеров молекулярных весов использовали наборы белков 14,4-116 кДа (Biorad, США).

Разделение проводили с помощью аппарата для электрофореза (Biorad, Hercules, CA) в трис-глициновом буфере (25 mM Трис, 0,192 М глицин, ДСН 0,1%) при силе тока 15 мА на один гель для концентрирующего геля и 20 мА на один гель для основного геля. Гели окрашивали в течение 10 минут в горячем растворе красителя (0,04% Кумасси R-250, 20% изопропанол, 10% этанол и 10%-уксусная кислота) и затем отмывали в 10% уксусной кислоте.

1.14. Антитромботическая активность С-концевых (остатки 55-65) пептидов гирудина и его производных

Антитромботическую активность С-концевых аналогов гирудина (остатки 55-65) в плазме крови человека оценивали по стандартному коагуляционному тесту, определяя тромбиновое время – время превращения растворимого фибриногена в нерастворимый фибрин при добавлении тромбина к плазме. Эксперименты проводились с использованием набора TECHNOCLOT® DTI (Technoclone GmbH, Австрия). К лиофилизированным реагентам плазмы человека и тромбина добавляли 2 мл воды и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Аналоги гирудина растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия (изотоничен плазме крови). 0,1 мл плазмы смешивали с 0,05 мл разбавленных производных гирудина или 0,9% хлорида натрия, в качестве контроля. Образцы инкубировали в течение 5 минут при температуре 37°C. Затем свертывание плазмы инициировали добавлением 0,1 мл реагента тромбина и контролировали спектрофотометрически при длине волны 671 нм [206]. Тромбиновое время определяли как максимум второй производной функции светопоглощения образца по времени. Все тесты проводились в трехкратной повторности.

2. Молекулярное моделирование взаимодействий

2.1. Симуляции молекулярной динамики лизоцима с полиэлектролитами и анализ траекторий

PDB структуры лизоцима (идентификатор 4NHI) была взята с сайта RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). Протонирование структуры лизоцима при различных значениях pH осуществлялось с помощью веб-сервера PDB2PQR (http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_1.9.0). Для визуализации электростатического потенциала была использована программа APBS [207]. В

результате, положительно и отрицательно заряженные участки поверхности белка окрашены в синий и красный цвет соответственно.

В работе использовали полианионы полифосфат натрия (ПФ) и поли(стиролсульфонат) натрия (ПСС) с различной степень полимеризации: 5, 18 и 45, а также поликатион поли-N-этил-4-винилпиридиний бромид (ПЭВП) со степенью полимеризации 18 (Рис. 13). Молекулы полиэлектролитов были параметризованы с помощью инструментов RED III [208]. Оптимизацию геометрии мономера проводили в пакете Firefly QC [209], который частично основан на исходном коде GAMESS [210].

Симуляции молекулярной динамики взаимодействия лизоцима с полиэлектролитами были сделаны с использованием пакета программ молекулярной динамики GROMACS 5.0 [211]. Было использовано силовое поле GROMOS 54a7 [212].

Каждая система моделирования состояла из одной молекулы лизоцима и нескольких молекул поли-N-этил-4-винилпиридиний (ПЭВП), неорганичеполифосфата (ПФ) или поли(стиролсульфоната) (ПСС). В зависимости от длины полиэлектролита было добавлено разное количество молекул так, чтобы общее количество мономеров в симуляционной ячейке было равно 90. Таким образом, было добавлено 2, 5 или 18 цепей, имеющие длину 45, 18 и 5 соответственно. Для каждой длины цепи полиэлектролита система моделировалась трижды с разными случайными начальными положениями цепей в ячейке. Оптимизация и релаксация структуры белка и полиэлектролитов были выполнены с использованием симуляций молекулярной динамики в ячейке с одной молекулой в течение 10 нс. Далее эти оптимизированные структуры лизоцима и полиэлектролитов использовались как стартовые структуры для основной молекулярной динамики.

Полиэлектролиты в произвольной ориентации помещали в ячейку-параллелепипед с лизоцимом с минимальным расстоянием до края ячейки 2,5, 2 или 1,5 нм в зависимости от длины добавляемых полиэлектролитов (степень полимеризации 45, 18 и 5 соответственно). Длина добавленных полиэлектролитов не превышала соответствующий размер ячейки. Ко всем системам были добавлены молекулы воды модели TIP3P [213] с добавлением необходимого количества ионов Na^+ или Cl^- для нейтрализации заряда в системе. Молекулярная динамика проводилась при постоянной температуре 300 К с использованием термостата «Velocity rescale» [214] и при постоянном давлении 1 бар с использованием баростата Берендсена [215]. Перед моделированием минимизация энергии системы выполнялась с использованием алгоритма наискорейшего спуска. Все расчеты проводились в течение 50 нс с временным шагом 2 фс. Выбор длительности моделирования основывался на времени, когда количество связей между белком и полиэлектролитами достигло плато.

Анализ полученных траекторий молекулярной динамики проводили с помощью пакета программ молекулярной динамики GROMACS 5.0. Были рассчитаны усредненные для каждого типа полиэлектролита временные зависимости количества водородных связей и ионных пар (с дистанцией между заряженными атомами менее 0,35 нм) между белком и цепями полиэлектролита. Было проанализировано изменение гидрофильной и гидрофобной доступной для растворителя площади поверхности комплекса лизоцим-полиэлектролит. Все мономеры полиэлектролитных цепей, которые связались и образовали стабильный комплекс с лизоцимом, были разделены на две группы: мономеры связанные и несвязанные с белком. Количество связанных и несвязанных мономеров рассчитывали и усредняли за последние 5 нс динамики. Заряд белок-полиэлектролитного комплекса (несвязанные цепи исключали из анализа) рассчитывали, как усредненный суммарный заряд белка и связанных цепей за последние 5 нс траекторий.

2.2. Симуляции молекулярной динамики ГАФД с α -синуклеином и РНК и анализ траекторий

Структуры ГАФД, α -синуклеина и РНК были взяты из базы данных RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) с идентификаторами PDB ID 1U8F, 1XQ8 и 1AQO соответственно. Была использована апоформа ГАФД из-за конкуренции в связывании α -синуклеина с коферментом никотинамид аденин динуклеотид (NAD^+) [216]. Гликированные структуры белка ГАФД были получены путем замены остатков лизина остатками N- ϵ -карбоксиметиллизина (CML, Рис. 14), который является одним из наиболее распространенных конечных продуктов гликирования [217–219]. Молекула CML была параметризована с помощью инструментов RED III [208], оптимизацию геометрии проводили в пакете Firefly QC [209], который частично основан на исходном коде GAMESS [210].

Были использованы две формы гликированной молекулы ГАФД. В первом случае все остатки лизинов в каждой из двух анион-связывающих бороздок ГАФД, где содержатся NAD^+ - и субстрат-связывающие карманы [216], были заменены на отрицательно-заряженные CML (всего 24 остатка, по 12 остатков в каждой бороздке) – гликированная по бороздке форма ГАФД. Другая гликированная форма – равномерно гликированная форма ГАФД – была получена модификацией 40 остатков лизинов, равномерно распределенных по поверхности белка. Для получения и визуализации электростатического потенциала на поверхности белка использовали веб-сервер PDB2PQR (http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_1.9.0) и инструменты APBS [207].

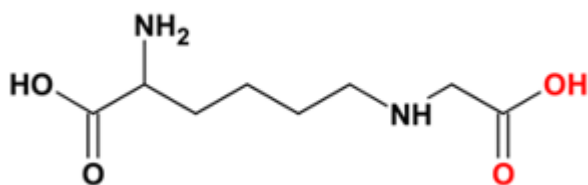


Рисунок 14. Структура N-ε-карбоксиметиллизина (CML)

Симуляции молекулярной динамики взаимодействия между ГАФД и α -синуклеина или РНК проводили с помощью пакета программ GROMACS 5.1 [211]. Было использовано силовое поле AMBER99-parmbsc0 [220] с улучшенными параметрами для моновалентных ионов [221].

Симуляционная ячейка включала в себя одну молекулу ГАФД и одну молекулу α -синуклеина или РНК. Было выполнено три набора симуляций как для α -синуклеина, так и для РНК: с нативной ГАФД и двумя формами гликированной ГАФД: гликированная по бороздке ГАФД и равномерно гликированная ГАФД. В каждом случае провели по 10 независимых симуляций по 200 нс с разными случайно-выбранными исходными позициями α -синуклеина или РНК (одинаковыми для всех форм ГАФД), так чтобы покрыть четверть сферы вокруг одной субъединицы молекулы ГАФД. Так как ГАФД – тетрамерный белок с эквивалентными субъединицами и бороздками, покрытие одной субъединицы достаточно для получения оптимальной выборки стартовых позиций. Минимальное начальное расстояние между ГАФД и α -синуклеином и между ГАФД и РНК варьировались от 1,1 до 5,2 нм и от 1,1 до 4,5 нм соответственно.

Релаксацию белковых структур проводили с помощью симуляций молекулярной динамики в течение 200 нс, Постоянная температура 300 К системы поддерживалась за счет термостата Берендсена. Остальные настройки были аналогичны, описанным ранее в пункте 2.1.

Анализ полученных траекторий проводили с помощью пакета программ молекулярной динамики GROMACS 5.1. Для дальнейшего визуального анализа все финальные структуры были выравнены по структуре ГАФД, чтобы поместить все связанные молекулы α -синуклеина/РНК в одну и ту же анион-связывающую бороздку фермента. Были рассчитаны временные зависимости количества всех потенциально взаимодействующих атомов ГАФД и α -синуклеина/РНК, т. е. атомов, расстояние между которыми не превышает 0,35 нм, а также количество водородных связей, ионных пар и гидрофобных взаимодействий между ГАФД и α -синуклеином/РНК. Ионные пары между ГАФД и α -синуклеином/РНК были определены, как противоположно заряженные атомы с порогом расстояния 0,35 нм между ними: атомы аминокислот, несущие положительный заряд (NZ в остатке Lys, NE, NH1 и NH2 в остатке Arg, ND1 или NE2 в заряженном остатке His), отрицательный заряд (атомы кислорода в карбоксильных группах остатков Asp, Glu и CML) и заряженные атомы РНК (атомы кислорода фосфатных групп и атомы N1, N3, N7 аденина; атомы N3, N7, O6 гуанина; атомы N3, O2 цитозина и атомы O2, O4 урацила). Вклад гидрофобных взаимодействий оценивали по количеству неполярных пар атомов на расстоянии менее 0,45 нм друг от друга. В качестве неполярных атомов ГАФД и α -синуклеина рассматривали тяжелые атомы боковой цепи неполярных остатков (Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Pro, Cys и Met) и атомы с зарядом менее 0,2 для молекулы РНК (атомы C5', C2' каждого нуклеотида, атом C5 аденина; атомы C4, C5 гуанина; атом C6 цитозина и атомы C5, C6 урацила).

Чтобы определить, какие остатки молекулы α -синуклеина взаимодействует с ГАФД, были получены временные зависимости расстояния между каждым остатком α -синуклеина и ГАФД за последние 50 нс моделирования и был рассчитан процент временных точек, где расстояние между тяжелыми атомами белков было менее 0,35 нм. Значения были усреднены по всем 10 независимым симуляциям для каждой формы ГАФД и

представлены в виде процентного соотношения связывания каждого аминокислотного остатка α -синуклеина с различными структурами ГАФД; значение 100 означает, что остаток α -синуклеина постоянно связан с ГАФД в течение последних 50 нс во всех 10 симуляциях. Та же самая процедура была выполнена для обнаружения остатков ГАФД, важных для связывания. Значения суммировались по четырем субъединицам и усреднялись по 10 симуляциям для каждой формы ГАФД, таким образом, значение 100 означает, что остаток одной из субъединиц постоянно связан с α -синуклеином в течение последних 50 нс во всех 10 симуляциях.

2.3. Симуляции направленной молекулярной динамики комплекса гирудин-тромбин и расчет свободной энергии взаимодействия

Исходная структура комплекса тромбина с нативным гирудином (вариант I, UniProt ID P01050) взята из базы данных RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) с идентификаторами PDB ID 2PW8. Недостающие аминокислоты обеих белковых молекул добавляли вручную на основе комплекса тромбина с рекомбинантной формой гирудина (PDB ID 4HTC) с последующей минимизацией энергии комплекса. Моделирование проводилось со следующими производными гирудина с модификацией по остатку 63: гирудин с Tyr63 без сульфатирования (десульфо-гирудин), с сульфатированием Tyr63 (сульфо-гирудин), с фосфорилированием Tyr63 (фосфо-гирудин с зарядом -1 и -2), гирудин с заменой Tyr63 на (карбоксиметил)фенилаланин (Tyr63CMF гирудин) и на остаток Glu (Tyr63Glu гирудин). Также были использованы производные десульфо-гирудина с мутацией Gln65Glu (Gln65Glu гирудин) и с заменой всех остатков Lys (Lys27, Lys36, Lys47) на остатки сукциниллизина (SuccK) (K₃27,36,47SuccK₃ гирудин). Химические структуры использованных модификаций

представлены на Рис. 15, список производных гирудина и их структурные особенности представлены в Таблице 1.

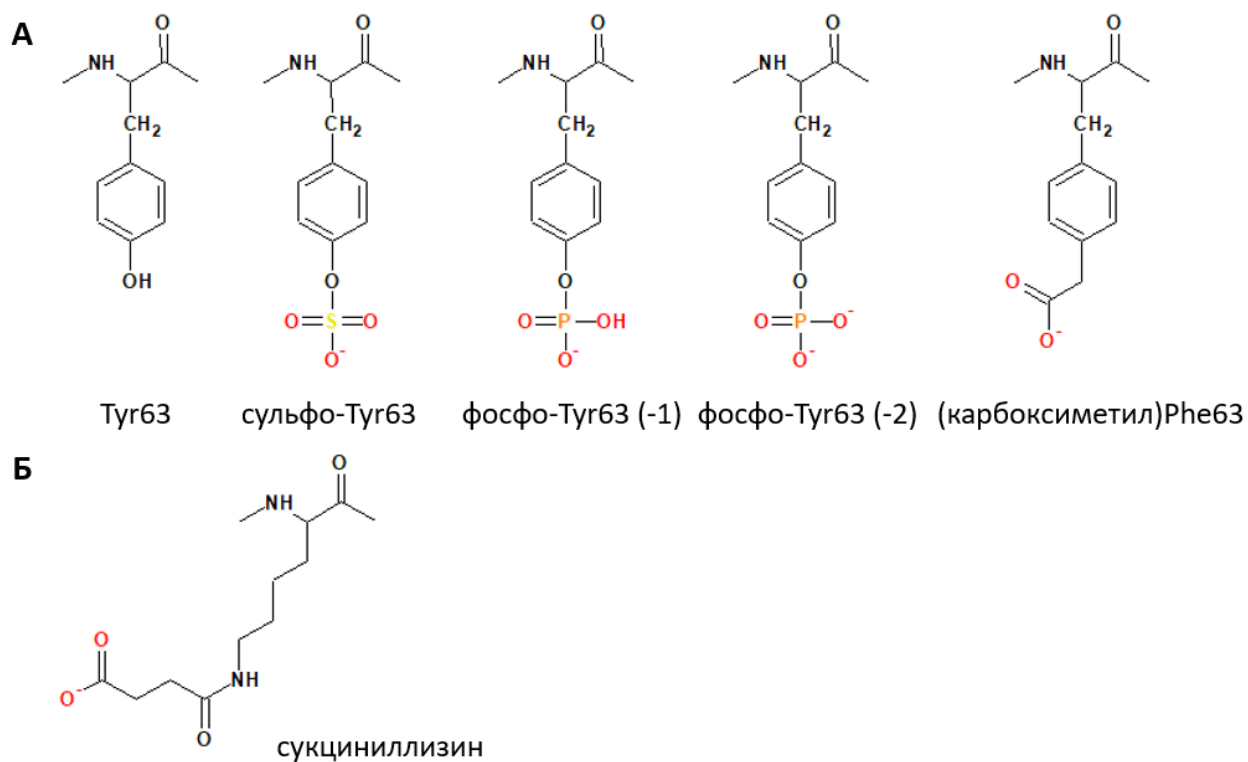


Рисунок 15. Химические структуры модификаций гирудина в положении 63 (А) и сукциниллизина (Б) в качестве замены остатков лизина.

Таблица 1. Сводная информация о последовательностях производных гирудина, используемых в работе. Полную последовательность гирудина (десульфо-гирудина) можно найти в базе данных UniProt (ID P01050).

Производные гирудина	Аминокислота на позиции 63	Модификации на других позициях
Десульфо-гирудин	Tyr	-
Сульфо-гирудин	sTyr	-
Фосфо-гирудин (-1)	pTyr (-1)	-
Фосфо-гирудин (-2)	pTyr (-2)	-
Tyr63CMF гирудин	CMF	-
Tyr63Glu гирудин	Glu	-
Gln65Glu гирудин	Tyr	Gln65Glu
K _{327,36,47} SuccK ₃ гирудин	Tyr	K27SuccK K36SuccK K47SuccK

Из-за использования множества нестандартных аминокислот было протестировано два силовых поля GROMOS-54A8 и Charmm 36M, чтобы выбрать оптимальное для моделирования производных гирудина. Выбор силового поля был мотивирован сравнением предсказанной *in silico* свободной энергии связывания (ΔG) с экспериментальными значениями ΔG связывания тромбина с десульфо- и сульфо- формой гирудина [150,151]. Силовое поле GROMOS-54A8 [222] с надстройкой Vienna-PTM (<http://vienna-ptm.univie.ac.at>) [223] содержит готовые параметры для остатка сульфотиروزина (sTyr). Для силового поля Charmm 36M были проведены дополнительные квантово-химические расчеты неприродных аминокислот

(sTyr, фосфо-тирозина в двух протонированных формах pTyr (-1), pTyr (-2), SuccK и CMF), выполненные с использованием онлайн-сервиса CGenFF (<https://cgenff.umaryland.edu/>).

Симуляции направленной молекулярной динамики комплекса тромбина с различными производными гирудина проводились с использованием программного обеспечения для молекулярной динамики GROMACS 2018.

Структура комплекса тромбин-гирудин была помещена в параллелепипедную ячейку с размерами 9,4 нм x 10 нм x 25 нм по оси x, y и z, соответственно, так что ось, проходящая через центры масс молекул гирудина и тромбина, соответствовала оси z. Соответствующий размер ячейки по оси z был выбран для обеспечения пространства для растягивания комплекса вдоль оси z до полной диссоциации гирудина от тромбина. Релаксированные структуры комплексов были получены в результате 10 нс симуляций молекулярной динамики с настройками, описанными ранее в пункте 2.1. Как и прежде, в качестве растворителя была использована модель воды TIP3P. Для нейтрализации заряда системы были добавлены ионы Na⁺ или Cl⁻. Уравновешивание системы проводилось в течение 100 пс алгоритма наискорейшего спуска. Далее на тромбин были наложены позиционные ограничения. К центру масс гирудина была приложена дополнительная сила вдоль оси z с постоянной константой скорости растяжения пружины 0.01 нм/с и ее жесткости 500 кДж/моль*нм² в течение 1 нс. Применение более медленных скоростей вытягивания (0,005 и 0,001 нм/с) приводило к получению идентичных траекторий и кривых зависимости силы от времени, и, таким образом, для ускорения расчётов ко всем системам применялась более высокая скорость вытягивания 0.01 нм/с. Константа жесткости пружины выше 500 кДж/моль*нм² приводила к заметным колебаниям кривой зависимости силы от времени.

Расчет свободной энергии Гиббса (ΔG) взаимодействия тромбина с производными гирудина проводился методом зонтичной выборки (umbrella

sampling). Стартовые конфигурации выборки были получены из траекторий симуляций направленной молекулярной динамики. Было использовано асимметричное распределение окон выборки вдоль координаты реакции для увеличения детализации на близком расстоянии между молекулами, так что расстояние между соседними окнами составляло примерно 0,05 нм для расстояния между центрами масс тромбина и гирудина менее 2,5 нм; 0,2 нм для расстояния от 2,5 нм до 8 нм и 0,5 нм для расстояния между центрами масс более 8 нм. В итоге выборка для каждого производного гирудина состояла из 85–95 окон. Для каждой конфигурации была выполнена симуляция молекулярной динамики в течение 10 нс. Серии зонтичной выборки были проанализированы с помощью метода анализа взвешенных гистограмм (WHAM) [224], в результате чего были вычислены кривые потенциала средней силы (PMF) от координаты реакции для каждого производного гирудина. На основе PMF профилей была рассчитана свободная энергия связывания. Стандартная ошибка была оценена с использованием метода бутстрепа [225].

Все вычисления проводились с использованием ресурсов Суперкомпьютерного центра МГУ им. М.В. Ломоносова [226] и Межведомственного суперкомпьютерного центра Российской академии наук.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Взаимодействие белков с полиэлектролитами

1.1. Влияние заряда белка на взаимодействие с полиэлектролитами и их шапероноподобную активность

Некоторые полиэлектролиты, взаимодействуя с белками, проявляют шапероноподобную активность и могут быть использованы для подавления агрегации белков [7]. Чтобы проверить влияние рН среды и заряда белка на шапероноподобную активность таких полиэлектролитов, были использованы три модельных белка с различной изоэлектрической точкой (рI): глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД, рI 8,5), лизоцим (рI 9,3) и α -лактальбумин (рI 4,9). Эксперименты проводили при различных значениях рН, как выше, так и ниже изоэлектрической точки белков. Таким образом, поверхностный заряд белков варьировался, и, следовательно, изменялось и взаимодействие белков с полиэлектролитами. В качестве полиэлектролитов мы использовали полианион декстрансульфат (ДС), а также поликатион поли(N-этил-4-винилпиридиний) бромид (ПЭВП).

Серия экспериментов с лизоцимом и ПЭВП была проведена при рН 7,5, 9,0 и 11,0. Добавление ПЭВП к лизоциму позволило подавить тепловую агрегацию белка при всех выбранных значениях рН. Гидродинамический диаметр нативных частиц лизоцима составлял 4–7 нм в зависимости от значения рН и увеличивался до 500–1000 нм после инкубации при 75–80°C в течение 10 мин (Рис. 16, черные кривые). Добавление малых концентраций ПЭВП не влияло на размер агрегированных частиц. Увеличение концентраций ПЭВП привело к уменьшению диаметра комплексов, что свидетельствует о подавлении поликатионом агрегации лизоцима. Так, в присутствии всего 12,5 мкМ ПЭВП при рН 7,5 в системе полностью отсутствовали крупные частицы, таким образом, агрегацию удалось полностью подавить в заданных условиях (Рис. 16А).

Концентрация ПЭВП, необходимая для полного подавления агрегации лизоцима, зависела от величины pH. Так, при pH 7,5 для полного подавления агрегации было достаточно добавления микромолярных концентраций ПЭВП (Рис. 16А), в то время как при pH 9,0 требовались миллимолярные (4 мМ) концентрации ПЭВП (Рис. 16Б). При pH 11,0 агрегацию не удалось подавить полностью даже при добавлении высоких (8 мМ) концентраций ПЭВП, при этом образовывались относительно крупные комплексы размером 250 нм. Тем не менее, они были меньше, чем агрегаты нативного белка в тех же условиях (1700 нм), что отражает значительное снижение уровня агрегации лизоцима (Рис. 16В). Примечательно, что подавление агрегации поликатионом было наиболее эффективным при pH 7,5, когда и лизоцим ($pI = 9,3$), и поликатион заряжены положительно и, следовательно, электростатическое связывание белок-поликатион наименее эффективно. Напротив, добавление полианиона ДС к лизоциму при всех исследованных значениях pH приводило к образованию крупных комплексов даже при комнатной температуре, сравнимых по размеру с агрегатами белка после инкубации, что сделало невозможным исследование подавление агрегации лизоцима предложенным способом.

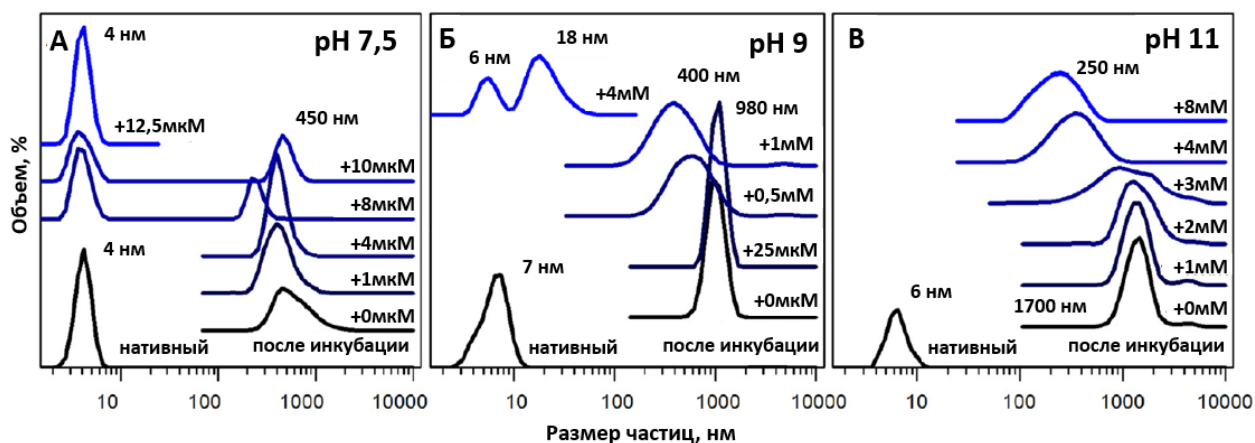


Рисунок 16. Гидродинамический диаметр частиц лизоцима с ПЭВП. Размер частиц лизоцима измеряли до (нижняя кривая) и после (остальные кривые) тепловой агрегации в отсутствие (черные кривые) и в присутствии (цветные кривые) ПЭВП различной концентрации при pH 7,5 (А), pH 9,0 (Б) и pH 11,0 (В).

Далее мы исследовали тепловую агрегацию другого белка ГАФД (pI = 8,5) в присутствии полиэлектролитов, измеряя увеличение оптической плотности раствора в процессе агрегации. При всех трех выбранных значениях pH, а именно 6,5, 7,5 и 9,0, агрегация ГАФД была полностью подавлена при добавлении полианиона ДС, а также частично подавлена при добавлении поликатиона ПЭВП.

На Рисунке 17 представлены зависимости относительного уровня агрегации ГАФД при 60°C от концентрации полиэлектролитов. Оптическая плотность пробы белка после инкубации при 60°C снижается при увеличении концентрации полиэлектролитов, что отражает снижение уровня агрегации ГАФД в результате добавления полиэлектролитов. Как и в случае с лизоцимом, поликатион ПЭВП показал наибольшую эффективность при pH 6,5 (Рис. 17А), когда и белок, и поликатион заряжены положительно. Аналогичным образом, полианион ДС оказался наименее эффективным при pH 6,5 (Рис. 17Б), при этом необходимая для подавления агрегации

концентрация полианиона ДС была на порядок ниже по сравнению с поликатионом ПЭВП.

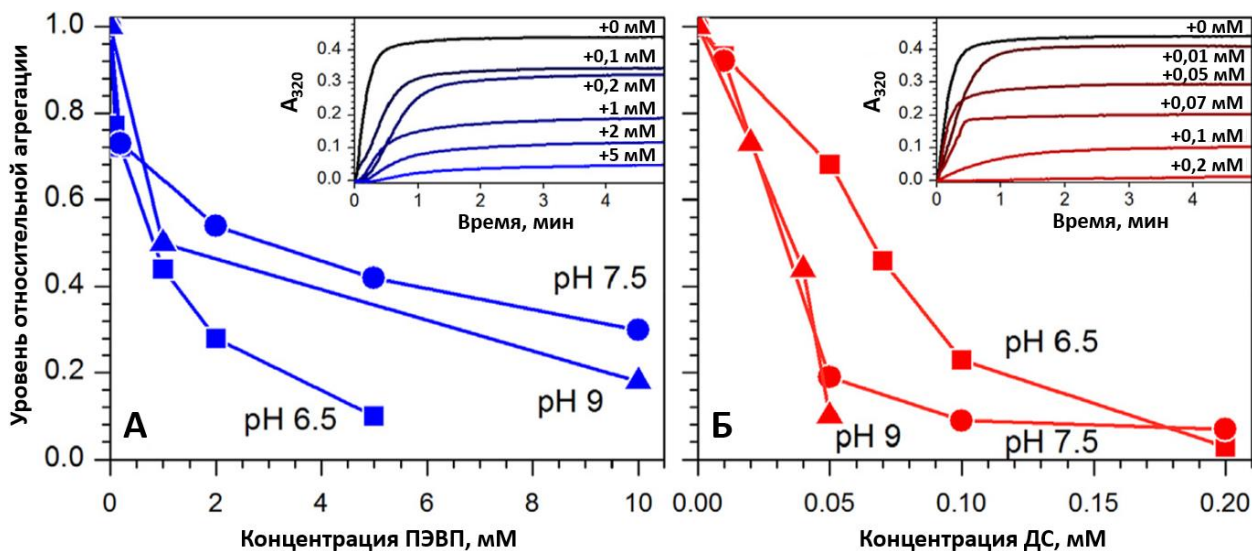


Рисунок 17. Зависимость уровня относительной тепловой агрегации ГАФД от концентрации добавленных полиэлектролитов ПЭВП (А) и ДС (Б) при различных значениях рН. Вставки представляют собой пример кинетических кривых термоагрегации ГАФД с добавлением различных концентраций ПЭВП или ДС (0 мМ означает отсутствие полиэлектролитов в пробе).

Затем эксперименты по подавлению агрегации были проведены с кислым белком α -лактальбумин ($pI = 4,9$) при рН 6,5, когда белок был заряжен отрицательно. Добавление одноименно заряженного полианиона ДС привело к снижению уровня агрегации α -лактальбумина. Так, гидродинамический диаметр частиц нативного белка до и после инкубации при температуре 85°C составил 4 нм и 550 нм соответственно (Рис. 18). Добавление 0,1 мМ ДС до нагревания привело к уменьшению размера агрегатов до 70 нм. ДС в концентрации 10 мМ полностью подавил агрегацию α -лактальбумина: размер комплексов был практически равен размеру нативного белка при комнатной

температуре. Добавление противоположно заряженного поликатиона ПЭВП, напротив, привело к образованию крупных комплексов даже при комнатной температуре (данные не показаны).

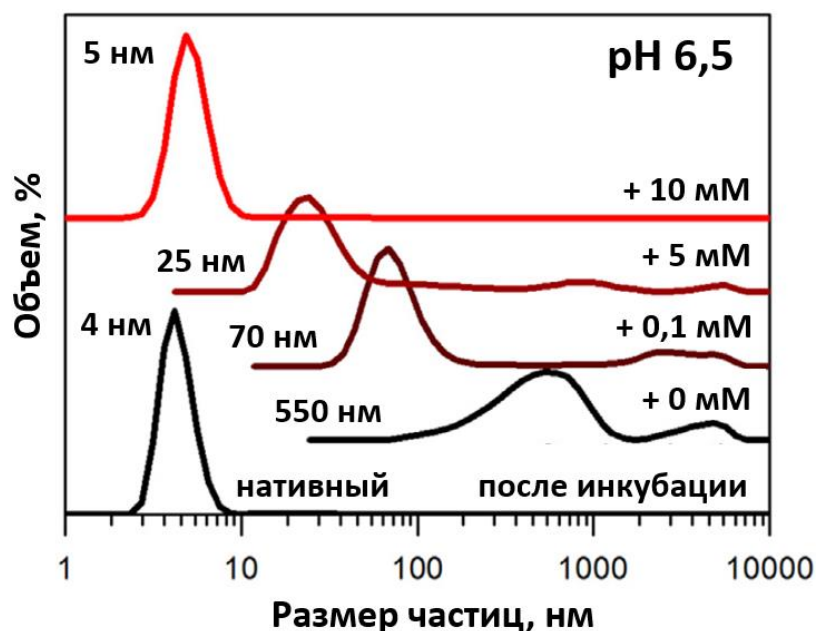


Рисунок 18. Размер частиц α-лактальбумина до (нижняя кривая) и после (остальные кривые) тепловой агрегации в отсутствие (чёрная кривая) и в присутствии (цветные кривые) ДС различной концентрации при pH 6,5.

Для объяснения экспериментальных результатов по подавлению агрегации белков с разными значениями изоэлектрическими точками, мы провели симуляции молекулярной динамики с модельным белком при различных значениях pH. Мы выбрали лизоцим и относительно короткий поликатион ПЭВП, состоящий из 18 повторяющихся звеньев (вместо 1600 единиц, используемых в экспериментах) для минимизации размера ячейки моделирования. Моделирование системы, содержащей одну молекулу белка и 5 молекул поликатиона, проводили при pH 7,5 и 11,0, ниже и выше изоэлектрической точки лизоцима ($pI = 9,3$). Согласно предсказанию PDB2PQR, молекула лизоцима имеет 18 положительных и 10 отрицательных

зарядов при рН 7,5 и 12 положительных и 12 отрицательных зарядов при рН 11.

Визуальный анализ полученных траекторий показал, что взаимодействие поликатиона с белком происходит при обоих значениях рН. Положительно заряженные группы полиэлектролита связываются с кислыми аминокислотами на поверхности белка, при этом часть мономеров цепей поликатиона, по-видимому, отталкивается от положительно заряженных участков поверхности белка. Такое частичное связывание и отталкивание звеньев полиэлектролита приводило к образованию петель и хвостов заряженных цепей вокруг поверхности белка (Рис. 19А).

Взаимодействие белка с поликатионом в основном определялось образованием ионных пар между отрицательно заряженными аминокислотами лизоцима и связанными мономерами поликатиона (Рис. 19Б). Для количественной оценки образования петель и хвостов поликатиона мы посчитали долю свободных звеньев среди связанных цепей (цепи поликатиона, не контактировавшие с белком, при анализе не учитывались) использовали. Количество свободных мономеров оказалось несколько выше при рН 7,5, когда белок заряжен положительно (80% и 75% при рН 7,5 и 11,0 соответственно, Рис. 19Г). Иными словами, чем больше количество отрицательно заряженных остатков, расположенных на поверхности белка, тем больше мономеров поликатиона связано с белком, а значит, тем меньше количество некомпенсированных поликатионных зарядов, образующих заряженные петли и хвосты. Хотя разница в проценте свободных мономеров между разными протонированными формами лизоцима была небольшой (всего 5%), можно предположить, что она должна быть более выраженной для высокополимеризованных цепей полиэлектролита. Так, в исследуемом случае с относительно короткой длиной цепи полиэлектролита (степень полимеризации 18), количество молекул полиэлектролита, связанных с белком, отличалось между разными значениями рН: только одна цепь при рН

7,5 вместо 3-4 заряженных цепей при рН 11. Если степень полимеризации поликатиона выше (сотни или тысячи повторяющихся звеньев), то эти 3-4 связанные короткие цепи, скорее всего, станут 3-4 фрагментами одной длинной цепи полиэлектролита при рН 11. При рН 7,5, напротив, белок не способен связывать дополнительные заряженные группы, так как все отрицательно заряженные участки белка уже участвуют в образовании ионных пар. Следовательно, при обоих значениях рН белок должен быть связан с одной молекулой поликатиона, но число контактов белка со связанной цепью полиэлектролита будет больше при рН 11. В результате процент свободных мономеров должен различаться более значительно в случае длинных цепей полиэлектролита. К сожалению, проверить это предположение путем молекулярно-динамического моделирования взаимодействия белка с ПЭВП со степенью полимеризации 1600 невозможно из-за ограничения вычислительных возможностей.

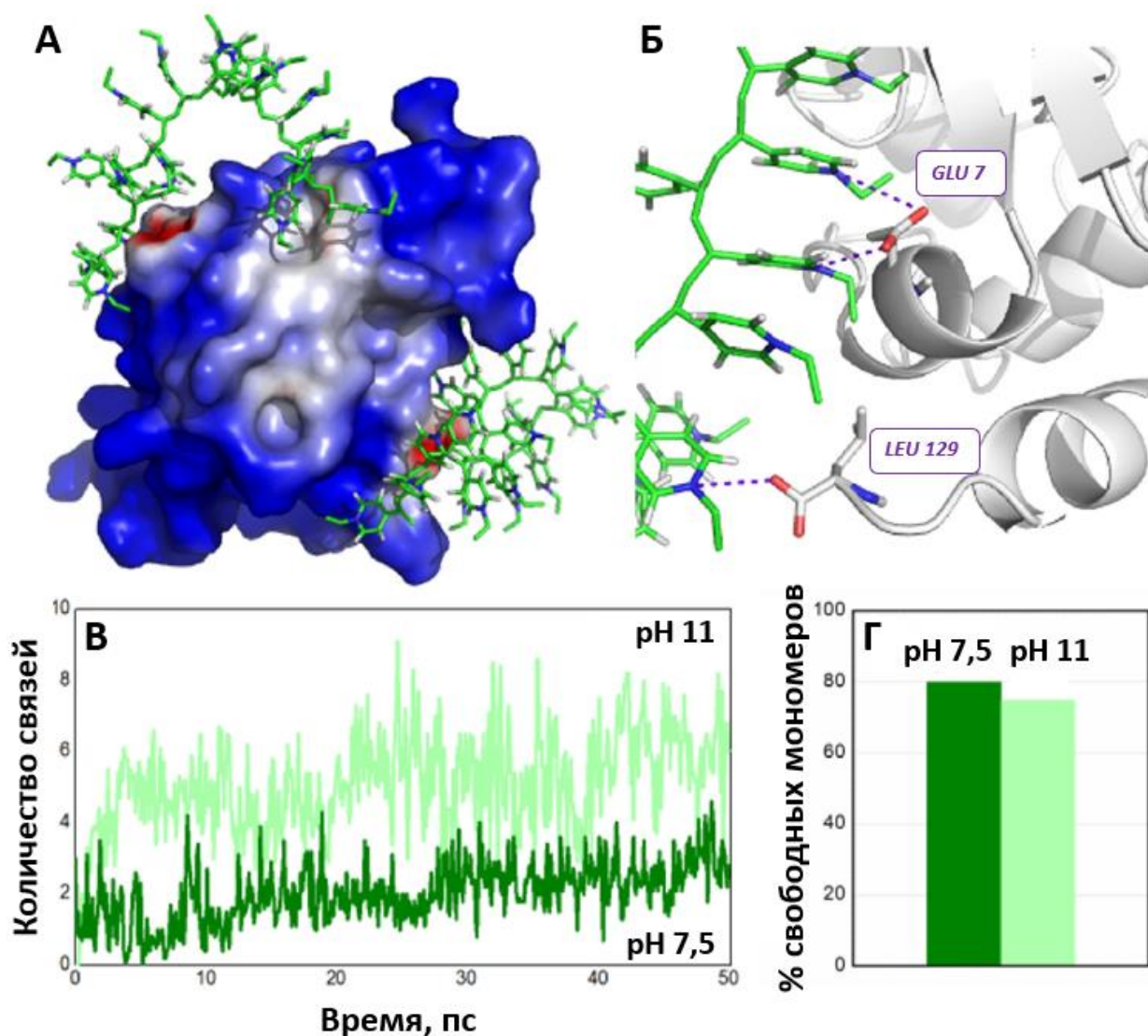


Рисунок 19. Результаты моделирования взаимодействия лизоцима с поликатионом ПЭВП. (А) Общий вид комплекса лизоцим-полиэлектrolит; (Б) Пример ионных связей, образовавшихся между лизоцимом и ПЭВП; (В) Временной профиль количества связей между белком и поликатионом при различных значениях pH; (Г) Процентное содержание свободных (несвязанных) мономеров в связанных с лизоцимом цепях ПЭВП, усредненное за последние 5 нс моделирования.

Таким образом, для исследования влияния заряда белка на взаимодействие с полиэлектролитами были выбраны три модельных белка, различающихся по величине изоэлектрической точки и молекулярной массы.

Примечательно, что лизоцим и α -лактальбумин являются гомологами, но существенно различаются по величине изоэлектрической точки, тогда как ГАФД полностью отличается от двух других белков по структуре, размеру и молекулярной массе. Тепловую агрегацию модельных белков изучали при различных значениях pH, как выше, так и ниже изоэлектрической точки. В результате агрегация подавлялась при использовании поликатиона или полианиона во всех случаях независимо от знака заряда белка в конкретных условиях. Таким образом, использование полиэлектролитов является универсальным подходом для подавления агрегации белков. Можно провести аналогию с шаперонами с широким спектром субстратов, которые неспецифично связывают белки-субстраты и защищают их от агрегации.

Ранее ГАФД использовали для детального изучения подавления агрегации белков противоположно заряженным полиэлектролитом. Так, добавление полианиона к положительно заряженной ГАФД при pH 7,5 [227], а также добавление поликатиона к отрицательно заряженной ГАФД при pH 9,0 [11] приводило к подавлению агрегации. С другой стороны, известно, что полиэлектролиты взаимодействуют и с одноименно заряженными белками, по всей вероятности, за счет локальных противоположно заряженных участков поверхности белка [6,41,228]. Результаты настоящей работы впервые показали, что возможно также предотвращение агрегации белков с помощью одноименно заряженного полиэлектролита. В частности, нам удалось подавить агрегацию лизоцима ($pI = 9,3$) при pH 7,5 и 9,0 с помощью поликатиона (Рис. 16), агрегацию α -лактальбумина ($pI = 4,9$) при pH 6,5 с помощью полианиона (Рис. 18) и агрегацию ГАФД ($pI = 8,5$) при pH 6,5 с использованием поликатиона, а также при pH 9,0 с использованием полианиона (Рис. 17). Важно отметить, что агрегацию ГАФД удалось подавить при всех выбранных значениях pH как поликатионом, так и полианионом, что дает возможность выбора между положительным и отрицательным зарядом полиэлектролита. Данная возможность позволяет подавлять агрегацию не

только в модельных системах с одним белком, но и в сложных системах из нескольких белков с различными значениями изоэлектрической точки. К примеру, если использование поликатиона ограничено в связи с активным взаимодействием с другими компонентами системы, то агрегацию можно подавить добавлением полианиона, и наоборот.

На основе полученных результатов была предложена модель взаимодействия полиэлектролитов с белками в зависимости от значения рН (Рис. 20). Поскольку на поверхности белка одновременно расположены как положительно, так и отрицательно заряженные аминокислоты, полиэлектролит связывает белок только частью своей цепи. Остальные мономеры полиэлектролита отталкиваются от одноименно заряженных остатков белка, образуя петли и хвосты с нескомпенсированным зарядом. Последние образуют заряженную оболочку вокруг белка, что, по-видимому, и определяет склонность комплекса к агрегации, т. е. более высокий защитный эффект полиэлектролита достигается за счет увеличения размеров и числа петель. В свою очередь размер и количество петель увеличиваются с уменьшением количества потенциальных сайтов связывания, т. е. противоположно заряженных участков на поверхности белка. Таким образом, увеличение эффективности подавления агрегации полиэлектролитом увеличивается с ростом одноименного заряда на белке. Это предположение подтверждается экспериментальными данными, полученными в настоящей работе для ГАФД и лизоцима. Возможность образования этих петель и хвостов также была показана с помощью моделирования молекулярной динамики (Рис. 19).

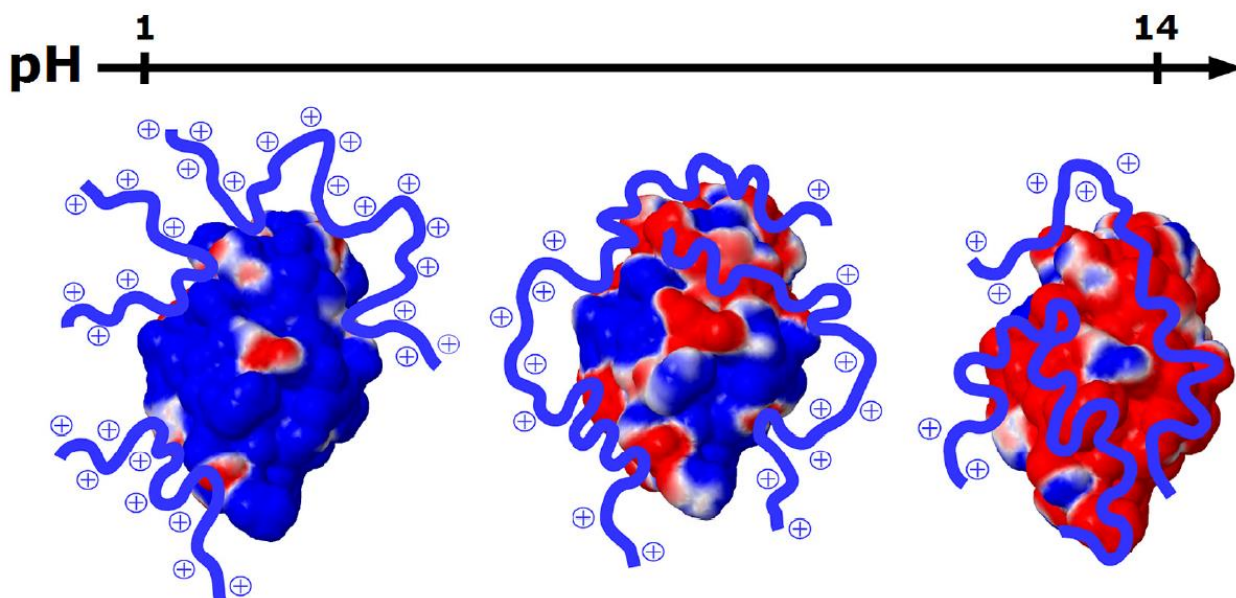


Рисунок 20. Модель взаимодействия белок-полиэлектrolит при различных значениях pH. Синие линии обозначают поликатион. Поверхность электростатического потенциала модельного белка лизоцима отображает положительно (синие) и отрицательно (красные) заряженные участки поверхности белка.

Примечательно, что в ряде случаев добавление к белку противоположно заряженного полиэлектролита не приводило к предотвращению агрегации. Напротив, большие комплексы образовывались даже при комнатной температуре, когда белок еще не был развернут в результате нагрева. Такой сценарий наблюдался при добавлении поликатиона к отрицательно заряженному α -лактальбумину, а также при добавлении полианиона к положительно заряженному лизоциму. Данный результат хорошо согласуется с предложенной моделью, так как в этих случаях на поверхности белка нет одноименно заряженных участков, частично отталкивающих цепь полиэлектролита, и, следовательно, заряженные петли и хвосты не образуются. Очевидно, что противоположно заряженные полимеры должны эффективно взаимодействовать друг с другом, однако, наиболее эффективно связанный полимер может обладать наихудшей способностью подавлять

агрегацию. В сущности, полиэлектролит должен не только эффективно связывать белок, но и удерживать его в растворимом (неагрегированном) состоянии. С одной стороны, должен образовываться стабильный комплекс белок-полиэлектролит, а с другой стороны, значительная часть цепи полиэлектролита должна быть несвязанной, чтобы образовывались петли и хвосты, обеспечивающие растворимость комплекса. Следовательно, полиэлектролиты, слишком эффективно взаимодействующие с белком, как в случае сильно противоположно заряженных белков и полиэлектролитов, не являются лучшим выбором для подавления агрегации, поскольку сами могут индуцировать агрегацию. Защита от агрегации оказалась наиболее эффективной, когда взаимодействие полиэлектролита с белком ограничено наличием противоположно заряженных групп на поверхности белка.

1.2. Влияние степени полимеризации полиэлектролита на взаимодействие белок-полиэлектролит

Исследование взаимодействия полианионов разной степени полимеризации с белком проводили методом симуляций молекулярной динамики. Для этого в качестве модельного белка был выбран лизоцим, имеющий заряд +8 при pH 7,5. Моделирование проводилось с двумя разными полианионами: поли(стиролсульфонат) натрия (ПСС) и полифосфат натрия (ПФ). Использовались разные степени полимеризации полианионов: 5, 18 и 45.

Оба полианиона со всеми выбранными степенями полимеризации связывались с лизоцимом, образуя комплекс белок-полиэлектролит. Как показано на Рисунке 21, связи, образующиеся между белком и полианионом, и их количество выходит на плато в течение 20–30 нс. Взаимодействие обоих полианионов с лизоцимом осуществлялось за счет образования ионных пар и водородных связей (Рис. 21). Полианионы в основном связывались с

положительно заряженными аминокислотами на поверхности белка, и никакой другой специфичности не наблюдалось. Во всех системах количество водородных связей, образующихся между полианионами и белком, превышало количество ионных пар (приблизительно 20 водородных связей и 10 ионных пар для ПФ и 18 и 9 для ПСС).

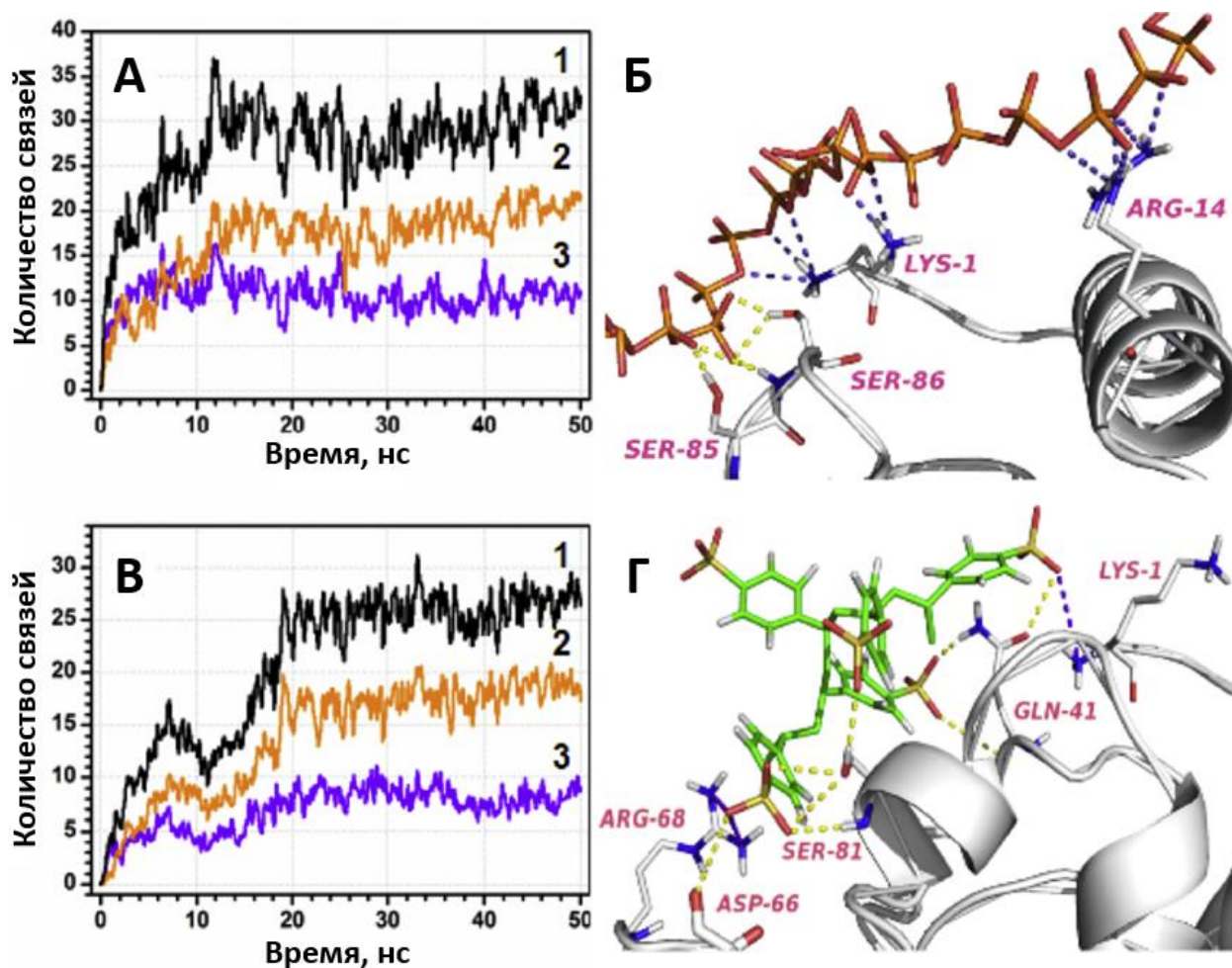


Рисунок 21. Временные профили количества связей между белком и ПФ₄₅ (А) или ПСС₄₅ (В): 1 - общее количество связей, 2 - количество водородных связей, 3 - количество ионных пар. Пример связи между белком и ПФ₁₈ (Б) или ПСС₅ (Г). Полиэлектролиты показаны в модели «sticks»; желтые и фиолетовые пунктирные линии обозначают водородные связи и ионные пары соответственно.

Помимо водородных связей и ионных пар, мы также оценили вклад гидрофобных взаимодействий в связывание полианионов с лизоцимом. С этой целью мы исследовали общую, гидрофильную и гидрофобную доступную для растворителя площадь поверхности (ПДР) белка и полианионов. Среди исследуемых полианионов только ПСС способен к гидрофобным взаимодействиям. В случае ПФ площадь гидрофобной и гидрофильной поверхности практически не менялась в течение всего времени моделирования. В случае ПСС, наоборот, произошло резкое снижение общей ПДР. На Рисунке 22 мы видим два резких изменения ПДР в моменты времени 2 нс и 16 нс, которые соответствуют связыванию двух цепей ПСС₄₅, причем уменьшение гидрофильной поверхности более значительно. То есть даже в случае более гидрофобных полианионов связывание происходит в основном с гидрофильной частью поверхности белка. С другой стороны, известно, что гидрофобные взаимодействия играют важную роль в связывании полианионов с белками и в подавлении агрегации белков [7,12,229]. Например, относительно гидрофобный полианион ПСС вызывает денатурацию связанного фермента ГАФД и частичную потерю его активности [7]. По всей видимости, 50 нс моделирования недостаточно для выявления вклада гидрофобных взаимодействий, что, по-видимому, связано с конформационными перестройками структуры белка, изучение которых требует гораздо более длительного времени моделирования. То же самое относится и к исследованию влияния коротких полимерных цепей на структуру белка, которые склонны вызывать его частичную денатурацию [229].

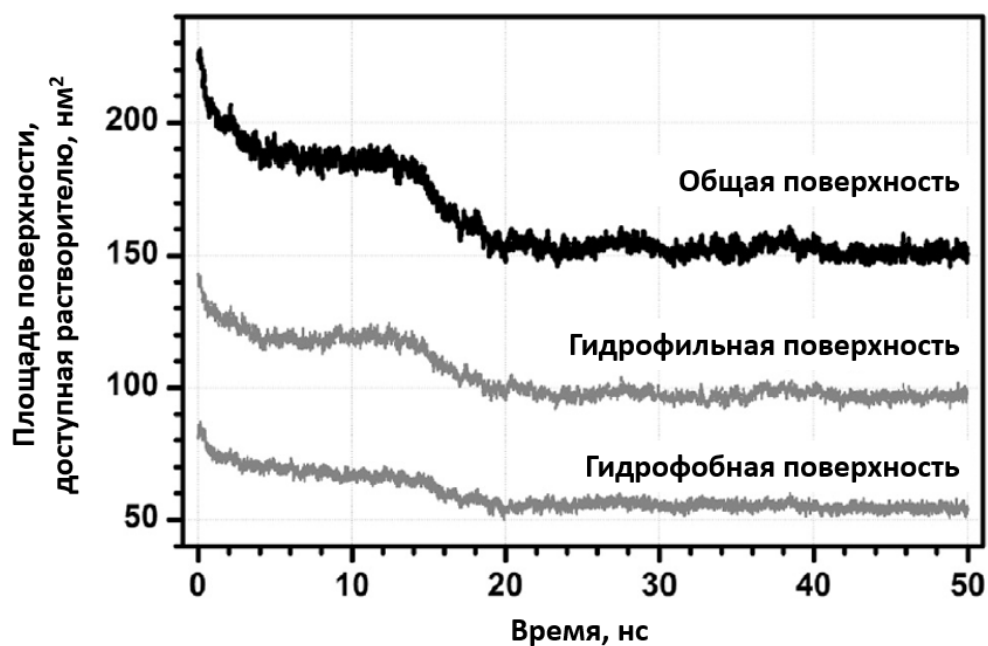


Рисунок 22. Временная зависимость площади общей, гидрофильной и гидрофобной поверхности, доступной для растворителя для лизоцима и всех молекул ПСС₄₅.

Комплексы, образованные полианионами разной степени полимеризации, отличались друг от друга. В частности, короткие цепи полианионов связывались с белком практически по всей длине молекулы, тогда как более длинные полианионы могли связываться только через небольшие фрагменты цепи (Рис. 23А и 23Б). Несвязанный остаток цепи полиэлектролита отталкивался от одноименно заряженной поверхности белка, образуя заряженные хвосты и петли.

Для количественной оценки различия между длинными и короткими полиэлектролитами мы проанализировали количество связанных и свободных звеньев полианионов в образующемся комплексе, усредненное за последние 5 нс динамики. Мономер считался связанным, если он образовывал хотя бы одну связь с белком. При этом цепи полианиона, не взаимодействующие с белком, в расчете не участвовали.

Оказалось, что в случае обоих полианионов количество связанных мономеров полиэлектролита практически не зависит от степени его полимеризации (Рис. 23В, левые панели). Причем это число одинаково для обоих полианионов и составляет около 20 (из 90 мономеров в сумме). Кроме того, сайты связывания ПП и ПСС совпали между собой. Количество свободных мономеров, наоборот, увеличивалось вместе со степенью полимеризации (Рис. 23В, правые панели). Так, комплекс белок-ПФ₅ имел в среднем 13 свободных мономеров, тогда как комплекс белок-ПФ₄₅ имел уже в среднем 69 свободных мономеров. В случае ПСС наблюдалась аналогичная зависимость: комплекс лизоцима с ПСС₅ и ПСС₄₅ имел 30 и 68 несвязанных мономеров соответственно. Разница в количестве свободных мономеров между ПСС₅ и ПФ₅ была обусловлена разным количеством связанных цепей (вероятно, из-за большего размера мономера ПСС по сравнению с ПФ).

Таким образом, оба полианиона, вероятно, занимали все возможные сайты связывания из-за избытка полианионов в модельной ячейке. Короткие заряженные цепи связывались с белком по всей длине молекулы, поэтому в случае коротких полиэлектролитов количество свободных мономеров невелико. Длинные цепи связывались с белком схожим числом мономеров, но вследствие их большей длины большее количество мономеров остается в свободной форме. Увеличение количества несвязанных мономеров полианиона с увеличением степени полимеризации подтвердило наши визуальные наблюдения: с увеличением длины цепи большее количество мономеров образует петли и хвосты, отталкивающиеся от поверхности белка.

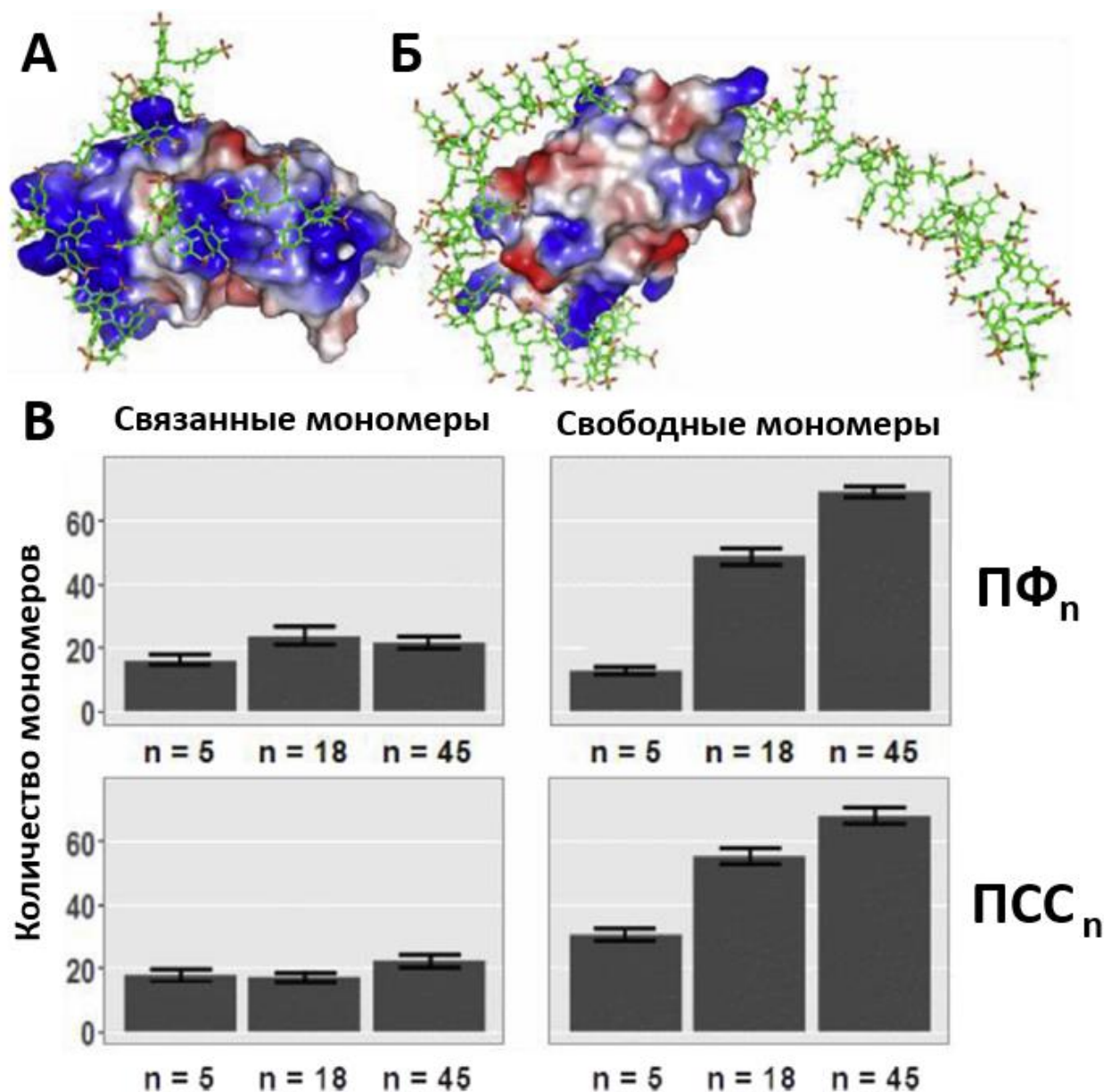


Рисунок 23. Общий вид комплекса белок-ПСС₅ (А) и белок-ПСС₄₅ (Б). Полианион показан в модели «sticks», поверхность белка окрашена в соответствии с электростатическим потенциалом: положительные области обозначены синим цветом, а отрицательные — красным. (В) Количество связанных и свободных мономеров связанных цепей ПФ (В, верхняя панель) или ПСС (В, нижняя панель), усредненное за последние 5 нс, где n - степень полимеризации.

Кроме того, мы рассчитали заряд комплекса белок-полиэлектrolит. Заряд комплекса был определен как суммарный заряд белка и связанных с ним молекул полианиона, усредненный за последние 5 нс. Лизоцим в свободной форме заряжен положительно и имеет заряд +8. Заряд комплекса оказался отрицательным и увеличивался по мере увеличения длины цепи полианиона (Рис. 24). В частности, заряд комплекса белок-ПФ₅ составил -32 (5-6 связанных молекул ПФ), заряд комплекса белок-ПФ₄₅ составлял уже -86 (две связанные молекулы). Аналогично увеличивался заряд комплекса белок-ПСС с увеличением длины цепи полиэлектролита: заряд -40 и -82 для ПСС со степенью полимеризации 5 (8-10 связанных молекул ПСС) и 45 (две связанные молекулы ПСС) соответственно.

Таким образом, увеличение заряда комплекса с увеличением длины цепи связано с увеличением общего числа мономеров полиэлектролита в образующемся комплексе. Как показано выше, количество связанных мономеров полианиона не зависело от степени его полимеризации, тогда как количество свободных мономеров увеличивалось с увеличением длины полианиона. Следовательно, общее число мономеров полианиона в комплексе было выше в случае более длинных цепей, а значит и больше отрицательный заряд комплекса.

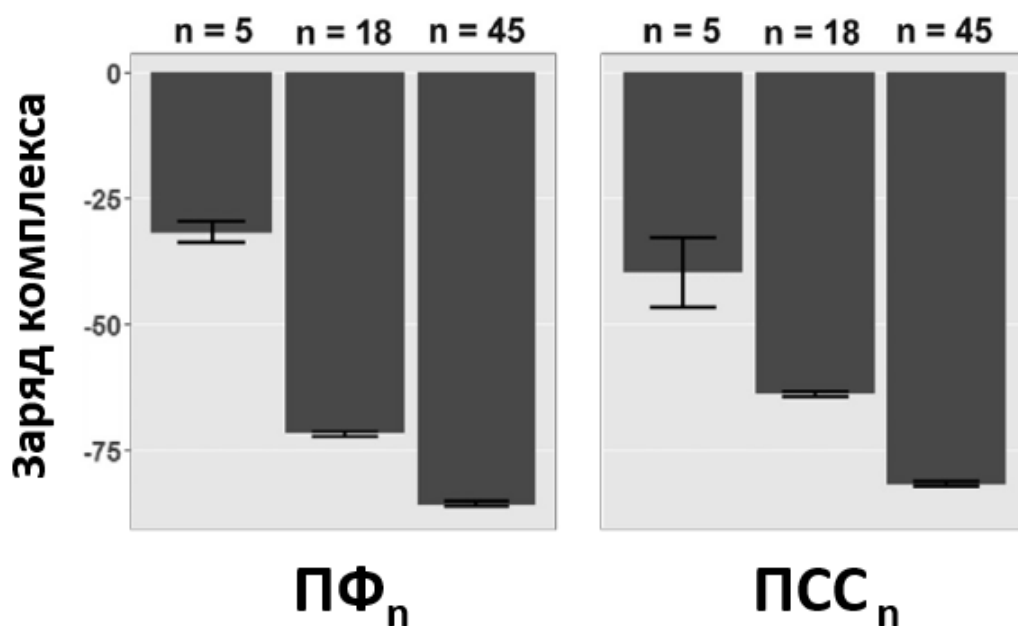


Рисунок 24. Рассчитанный заряд комплексов, образованных лизоцимом и связанными с ним молекулами ПФ (слева) или PSS (справа), усредненный за последние 5 нс динамики, где n - степень полимеризации.

Для проверки полученных результатов был определен размер и дзета-потенциал (ζ -потенциал) комплексов лизоцима и более крупного олигомерного белка ГАФД с полианионами методом динамического лазерного светорассеяния. Эксперименты проводились с использованием избыточных концентраций PSS различной степени полимеризации.

Изучение гидродинамического диаметра и дзета-потенциала лизоцима и его комплексов с PSS проводили при pH 7,5, как и в случае молекулярного моделирования (данные получены Д.Б. Евстафьевой). В этих условиях дзета-потенциал лизоцима составил +4 мВ. Добавление PSS инициировало образование отрицательно заряженных комплексов, причем дзета-потенциал комплексов увеличивался с увеличением степени полимеризации, что согласуется с ранее полученными результатами моделирования (Рис. 25А). Кроме того, увеличение степени полимеризации PSS приводило к увеличению гидродинамического диаметра комплексов.

Аналогичные результаты наблюдались в случае более крупного тетрамерного белка ГАФД. Измерения дзета-потенциала и размера комплексов ГАФД с ПСС проводили при рН 6,5, когда ГАФД имеет суммарный положительный заряд и эффективно взаимодействует с полианионами [7]. Как и в случае с лизоцимом, ГАФД при взаимодействии с ПСС образует отрицательно заряженные комплексы, дзета-потенциал и гидродинамический диаметр которых увеличиваются с увеличением длины полианионов (Рис. 25Б).

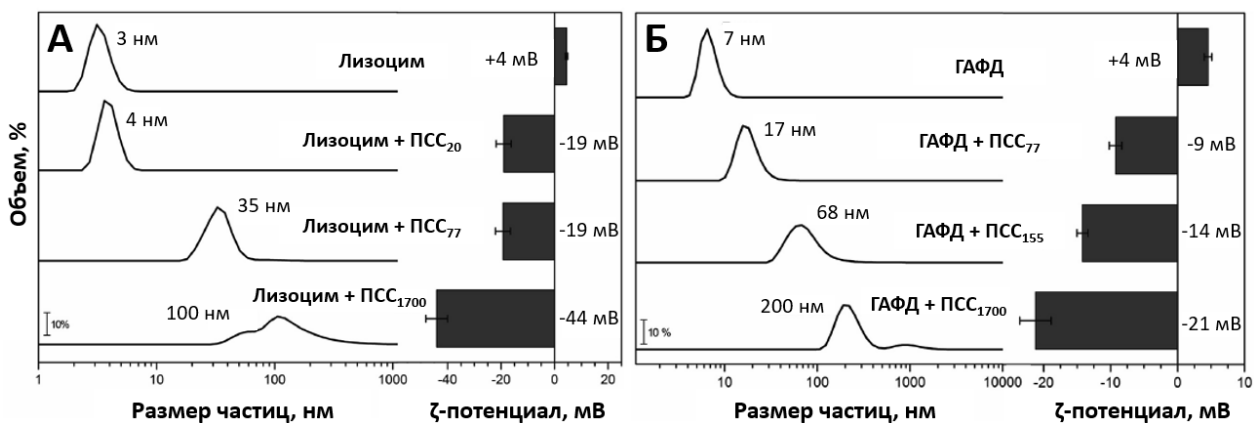


Рисунок 25. Гидродинамический диаметр (слева) и ζ -потенциал (справа) комплексов лизоцима (А) и ГАФД (Б) с ПСС разной степени полимеризации. Данные получены Д.Б. Евстафьевой.

Поскольку использование полиэлектролитов является эффективным методом предотвращения агрегации белков, нас интересовало исследование взаимодействия белок-полиэлектролит с точки зрения растворимости таких комплексов. Согласно опубликованным экспериментальным данным, более длинные заряженные цепи более эффективно подавляют агрегацию белков [11,227,230]. В соответствии с результатами молекулярного моделирования образования комплексов белка с полианионами различной степени полимеризации, количество свободных мономеров полиэлектролита

увеличивалось с увеличением степени полимеризации. Такая зависимость наблюдалась для обоих полианионов (Рис. 23В). Таким образом, чем выше степень полимеризации полианиона, тем эффективнее полианион должен подавлять агрегацию белка, что согласуется с экспериментальными данными.

На основании полученных результатов полученную ранее модель взаимодействия белка с полиэлектролитами можно уточнить, добавив влияние степени полимеризации полиэлектролита на его способность образовывать хвосты и петли. Таким образом, уменьшение количества центров связывания, а также увеличение степени полимеризации полиэлектролита приводит к усилению образования петель и хвостов.

Важным фактором, влияющим на стабильность частиц в растворе, является их заряд. Согласно полученным результатам, заряд комплексов белок-полиэлектролит увеличивался по мере увеличения степени полимеризации полианиона. В частности, лизоцим, положительно заряженный при рН 7,5, связывался с полианионами и образовывал отрицательно заряженный комплекс, отрицательный заряд которого возрастал с увеличением длины цепи. Результаты, полученные с помощью моделирования, подтверждаются измерением дзета-потенциала комплексов ПСС с двумя разными белками, лизоцимом (Рис. 25А) и ГАФД (Рис. 25Б). Таким образом, чем выше степень полимеризации полиэлектролита, тем больше заряд комплекса и тем ниже его склонность к агрегации, что хорошо согласуется с экспериментальными данными.

2. Взаимодействие внутренне неупорядоченного белка β -казеина с полиэлектролитами и влияние гликирования

В качестве модельного белка был взят внутренне неупорядоченный молочный белок β -казеин. Из-за своей амфифильной структуры β -казеин

самостоятельно собирается в мицеллы при нейтральном значении pH за счет гидрофобных взаимодействий [50]. Все эксперименты проводили при 10°C и 25°C, когда β -казеин находится преимущественно в мономерной и мицеллярной форме соответственно [231]. Эксперименты проводили при pH 7,2, когда β -казеин заряжен отрицательно ($pI = 5,1$). Гидрофильная часть (остатки 1–40) β -казеина имеет 7 положительно и 24 отрицательно заряженных групп, в том числе 5 остатков фосфосерина [50]. Гидрофобная часть (остатки 41–209) включает 9 положительно и 10 отрицательно заряженных остатков.

В процессе хранения и переработки молочных продуктов казеины подвергаются неферментативному гликированию [58]. В результате гликирования модифицируются аминокислотные группы боковых цепей аргинина и лизина, N-концевая аминокислотная группа белка, а также тиоловые группы цистеина. Поскольку эти остатки играют ключевую роль в электростатическом взаимодействии с заряженными макромолекулами, мы исследовали влияние гликирования на взаимодействие β -казеина с полиэлектролитами разных типов.

Было изучено взаимодействие нативного и гликированного β -казеина с различными синтетическими и природными полиэлектролитами, различающихся заряженной группой, структурой и гидрофобностью: два сульфатированных полимера, гидрофильный гепарин натрия и относительно гидрофобный поли(стиролсульфонат) натрия (ПСС), полиакриловая кислота (ПАК) и полицитидилат калия (полиЦ), а также поликатион, поли-N-этил-4-винилпиридиний бромид (ПЭВП).

Во-первых, мы измерили размер комплексов нативного и гликированного β -казеина с полиэлектролитами с помощью динамического лазерного светорассеяния и седиментационного анализа (Рис. 26). Кажущийся гидродинамический диаметр мономерной и мицеллярной формы β -казеина составил 8 нм и 20 нм соответственно (Рис. 26А). Добавление поликатиона

ПЭВП привело к образованию крупных комплексов, которые быстро выпадали в осадок. При температуре 10°C, когда β -казеин преимущественно находится в мономерной форме, добавление ПСС приводило к образованию растворимых комплексов с кажущимся диаметром 13 нм. В присутствии других полианионов диаметр частиц в пробе совпадал с диаметром свободного β -казеина (8 нм), что свидетельствует об отсутствии взаимодействия между мономером β -казеина и полианионами (Рис. 26А, синие линии). При температуре 25°C изменение размера частиц наблюдалось только в случае добавления гепарина, но не других полианионов (Рис. 26А, красные линии), причем размер образующихся комплексов был сравним с размером мономерной формы β -казеина.

Аналогичные измерения были проведены для гликированного β -казеина (Рис. 26Б). Кажущийся гидродинамический диаметр гликированного β -казеина превышал диаметр нативного белка и составлял 26 нм при температуре 10°C, что свидетельствует об образовании мицелл или олигомеров даже при низкой температуре. При температуре 25°C гликированный β -казеин преимущественно склонен к образованию комплексов вдвое большего размера (45 нм), но, кроме них, раствор содержал некоторое количество относительно крупных частиц с кажущимся гидродинамическим диаметром до 400 нм. Как и в случае с немодифицированным β -казеином, взаимодействие с поликатионом приводило к образованию крупных агрегатов и выпадению осадка. Добавление каждого из полианионов влияло на диаметр частиц в растворе. Добавление ПСС приводило к образованию комплексов, близких по размеру к мономеру нативного β -казеина. Скорее всего, ПСС взаимодействует с β -казеином, подавляя белок-белковое взаимодействие и замедляя образование мицелл. Кажущийся гидродинамический диаметр частиц в растворе с полиЦ был весьма мал и сравним с размером самого полиэлектролита.

Взаимодействие гликированного белка с гепарином, наоборот, приводило к увеличению размеров комплексов.

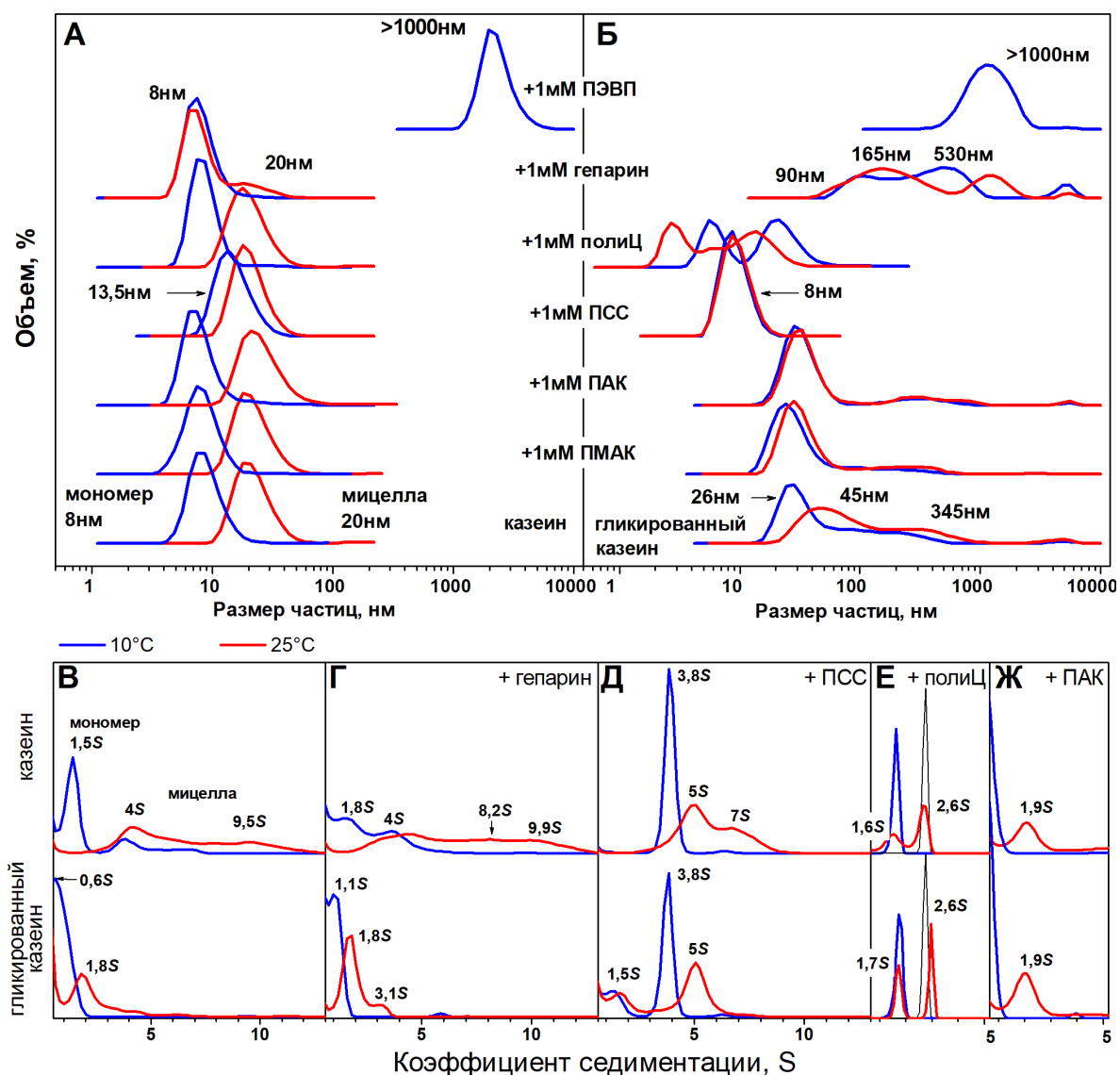


Рисунок 26. Размер комплексов β -казеина с различными полиэлектролитами. (А, Б) Кажущийся гидродинамический диаметр частиц β -казеина (А) и гликированного β -казеина (Б) при температуре 10°C (синие кривые) и 25°C (красные кривые) в присутствии различных полиэлектролитов. Добавленные полиэлектролиты указаны в центре. (В-Ж) Седиментограммы растворов β -казеина и гликированного β -казеина (В) и их растворов с 1 мМ гепарина (Г), PSS (Д), полиД (Е), ПАК (Ж) при температуре 10°C (синие кривые) и 25°C (красные кривые). Черная кривая на графике Е обозначает свободный полиД.

Для более детального анализа размеров комплексов был проведен седиментационный анализ нативного и гликированного β -казеина (Рис. 26В). Коэффициент седиментации мономера нативного β -казеина составил 1,5 S, что согласуется с литературными данными [232]. Мономеры с коэффициентом седиментации 1,5 S соответствует молекулярной массе белка 24 кДа, в предположении, что значение отношения f/f_0 соответствует типичному для природно-развернутых белков значению 2,2 [49]. При температуре 10°C раствор белка преимущественно содержал мономеры β -казеина и небольшое количество мицелл. При температуре 25°C наблюдался размытый пик с коэффициентами седиментации от 4 S до 9,5 S, что может свидетельствовать о присутствии в растворе агрегатов. Пики гликированного β -казеина были смещены влево относительно таковых для нативного β -казеина. Таким образом, гликирование привело к уменьшению коэффициента седиментации β -казеина, в отличие от увеличения гидродинамического диаметра по данным ДЛС (Рис. 26А и 26Б). Это противоречие указывает на то, что частицы гликированного β -казеина (которые, по-видимому, являются мицеллами или олигомерами, как мы упоминали выше) менее плотные, чем нативный β -казеин. Так, оцененные значения плотности для нативного и гликированного β -казеина составили 1,084 и 1,004 г/мл соответственно, что значительно меньше типичного значения плотности глобулярных белков, причем значение плотности гликированного β -казеина лишь незначительно превышает значение для раствора буфера. Стоит отметить, что образование «обычных» мицелл нативного β -казеина сопровождалось увеличением коэффициента седиментации (Рис. 26В), однако, в случае гликированного β -казеина образования крупных агрегатов не наблюдалось. Другими словами, гликированный β -казеин образует своего рода олигомеры, более рыхлые, чем нативный β -казеин. Хотя трудно судить о структуре гликированного β -казеина, можно заключить, что гликирование индуцировало дальнейшее разворачивание β -казеина.

Комплексы нативного и гликированного β -казеина с полианионами (ПСС, гепарином, полиЦ и ПАК) также исследовали с помощью седиментационного анализа (Рис. 26Г–Ж). Добавление гепарина не оказало существенного влияния на значения коэффициентов седиментации, хотя процентное содержание мономерной формы нативного β -казеина снизилось при температуре 10°C (Рис. 26Г). Что касается гликированного β -казеина, то после добавления гепарина наблюдался небольшой сдвиг коэффициентов седиментации. Действительно, β -казеин представляет собой природно-развернутый белок, находящийся в динамическом равновесии между мономерной и мицеллярной формами. С другой стороны, данные ДЛС однозначно указывают на то, что гепарин взаимодействует как с нативным, так и с гликированным β -казеином. В частности, размер комплексов гепарина с гликированным β -казеином больше, чем размер свободного гликированного белка. По данным ДЛС трудно сделать вывод о взаимодействии гепарина с нативным белком при температуре 10°C, однако, при температуре 25°C размер комплексов меньше, чем размер мицелл свободного нативного β -казеина. Суммируя данные ДЛС и седиментационного анализа (большой кажущийся диаметр и малый коэффициент седиментации), можно предположить, что комплексы гепарина с гликированным β -казеином крайне рыхлые и неупорядоченные, но дальше строить предположения о структуре этих комплексов сложно.

Интерпретация данных седиментации полиЦ (Рис. 26Е) весьма затруднительна, т. к. в отличие от других протестированных полианионов, полиЦ поглощает при 280 нм. Следовательно, наличие двух пиков при температуре 25°C, скорее всего, отражает слабое взаимодействие или отсутствие взаимодействия совсем: каждый пик соответствует отдельному компоненту в системе. Однако при температуре 10°C наблюдался только один пик, и, что более важно, в смеси нативного β -казеина и полиЦ при 25°C не наблюдалось частиц с большим (от 4 S и выше) коэффициентом седиментации.

Аналогичная картина была показана для полианиона ПАК (Рис. 26Ж): крупных частиц, подобных мицеллам нативного β -казеина при температуре 25°C, не наблюдалось в присутствии ПАК, что свидетельствует о связывании полианиона с белком. Частицы, образующиеся при добавлении полиЦ или ПАК к гликированному β -казеину, также имеют небольшие размеры и не отличаются от свободного белка. Поскольку данные ДЛС указывают на взаимодействие гликированного β -казеина с ПАК при температуре 25°C, образующиеся комплексы отличаются по структуре и размеру от частиц свободного гликированного β -казеина.

Совершенно иная картина, а именно выраженное изменение коэффициентов седиментации, наблюдалась при добавлении полианиона ПСС (Рис. 26Д). Во всех четырех случаях коэффициент седиментации комплексов был больше, чем у свободного белка. Результаты седиментационного анализа и ДЛС свидетельствуют об образовании относительно компактных комплексов в присутствии ПСС, причем особенно выражено это уплотнение для гликированного β -казеина. Для изучения вероятного упорядочивания структуры β -казеина, вызванного взаимодействием с полианионами, были измерены спектры кругового дихроизма (КД) в дальнем УФ (Рис. 27). Полученные спектры β -казеина с отрицательным пиком при длине волны 200 нм типичны для неупорядоченных белков. Существенной разницы между спектрами гликированного и нативного β -казеина не наблюдалось. Взаимодействие с ПСС также не вызвало изменений в структуре белка. Другими словами, вторичная структура β -казеина не изменилась: гликирование вызывало дальнейшее разрыхление белка, а взаимодействие с полимерами не вызывало образования спиралей или β -слоев.

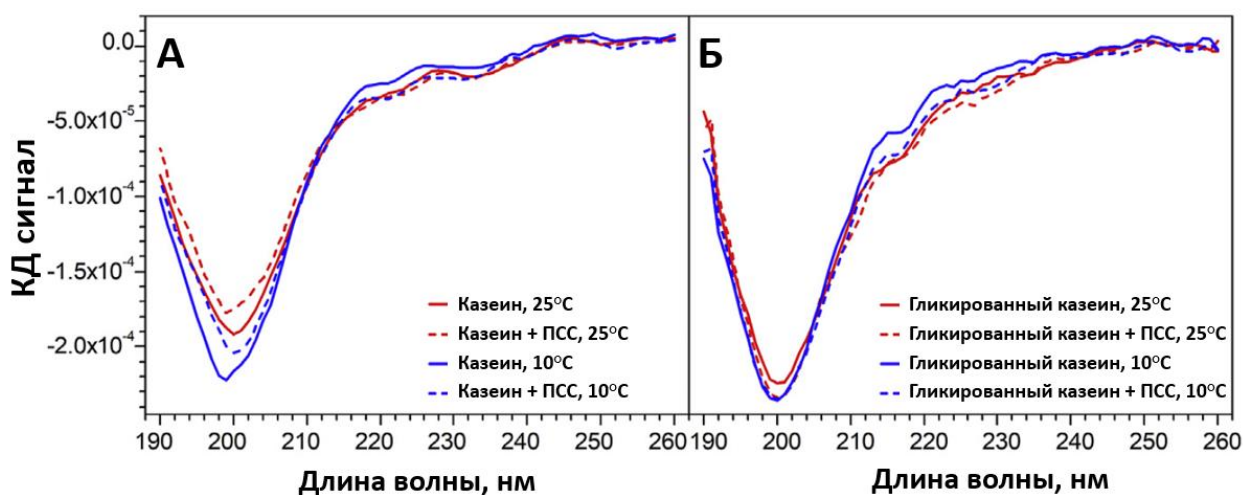


Рисунок 27. Спектры кругового дихроизма нативного (А) и гликированного (Б) β -казеина в свободной форме (сплошные линии) и в присутствии ПСС (штриховые линии) при разных температурах.

Прямое исследование взаимодействия β -казеина с полианионами (ПСС, гепарином, полиЦ и ПАК) проводили методом изотермической титрационной калориметрии (ИТК). Взаимодействие нативного β -казеина с ПСС сопровождалось выраженным выделением тепла (Рис. 28А, закрашенные квадраты). Связывание происходило в две стадии, первая из которых была эндотермической с приблизительной константой ассоциации $23,2 \pm 5,5 \text{ mM}^{-1}$, а вторая – экзотермической с константой ассоциации $19,3 \pm 1,6 \text{ mM}^{-1}$ и стехиометрией 24 заряженные группы ПСС на одну молекулу β -казеина при температуре 10°C . Термодинамические параметры связывания представлены в Таблице 2. При температуре 25°C , когда β -казеин образует мицеллы, взаимодействие было еще более выраженным. При этих условиях константа ассоциации и энтальпия были аналогичными, но стехиометрия, т.е. количество заряженных групп ПСС, связанных с одной молекулой β -казеина, увеличилась до 35. Гликирование β -казеина вызывало лишь небольшие изменения во взаимодействии, которое, по-видимому, немного более эффективно по сравнению с нативным белком (Рис. 28А, пустые квадраты). Другими словами, ПСС взаимодействует как с нативным, так и с гликированным β -казеином, что

подтверждается данными ДЛС. Взаимодействие осуществляется за счет гидрофобных взаимодействий, а также за счет электростатических взаимодействий: первая (эндотермическая) стадия сопровождается значительным положительным изменением энтропии, тогда как вторая стадия является экзотермической.

Взаимодействие нативного β -казеина с полиЦ также было двухстадийным (Рис. 28Б). Примечательно, что гликирование привело к практически полному подавлению взаимодействия с полиЦ. Взятые вместе с данными ДЛС и седиментационного анализа, эти результаты предполагают, что взаимодействие происходит в обоих случаях, но трудно строить предположения о его природе и поведении комплекса. Аналогичная картина наблюдалась для карбонового полимера ПАК (Рис. 28В). Нативный β -казеин взаимодействовал с ПАК в одну эндотермическую стадию с константой ассоциации $20,8 \text{ mM}^{-1}$ и $18,4 \text{ mM}^{-1}$ при температуре 10°C и 25°C соответственно, что свидетельствует о важной роли гидрофобных взаимодействий. Гликирование β -казеина приводило к уменьшению энтальпии взаимодействия, хотя константа ассоциации не менялась (Таблица 2). По данным ИТК взаимодействие ПАК с гликированным β -казеином при температуре 25°C было более выраженным, чем при температуре 10°C . Что касается гепарина, то взаимодействие было одностадийным и экзотермическим, хотя тепловыделение было очень небольшим (Рис. 28Г). Поскольку гепарин очень гидрофилен, маловероятно, что гидрофобные взаимодействия играют значительную роль в связывании, и поэтому мы можем предположить, что совокупные данные ИТК и описанных ранее экспериментов отражают слабое связывание гепарина с β -казеином. Различий между нативным и гликированным β -казеином не наблюдалось.

Суммируя приведенные выше результаты экспериментов по титрованию, можно заключить, что наиболее эффективным было связывание β -казеина с ПСС. Действительно, тепловой эффект взаимодействия в случае ПСС был

значительно выше по сравнению с другими полианионами; стехиометрия связывания (т.е. количество заряженных групп полимера, связанных с молекулой β -казеина) была выше по сравнению с другими полианионами, за исключением полиЦ; константа ассоциации также была относительно высокой. Высокие значения стехиометрии также наблюдались для взаимодействия полиЦ с нативным β -казеином, что свидетельствует об эффективном взаимодействии, хотя тепловой эффект был намного ниже, чем в случае ПСС. Примечательно, что связывание β -казеина с ПСС обеспечивается гидрофобными взаимодействиями, которые, по-видимому, отражают первую (эндотермическую) стадию связывания, в отличие от связывания с полиЦ.

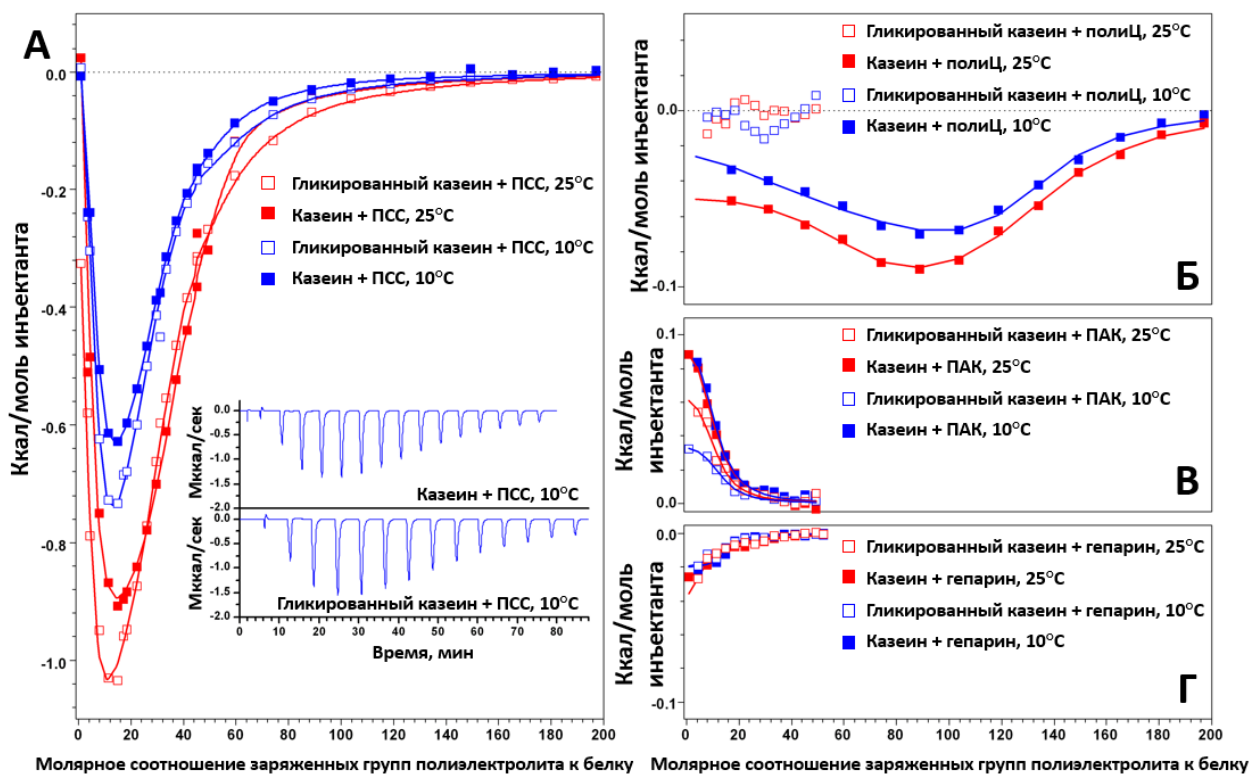


Рисунок 28. Данные ИТК для титрования нативного (закрашенные квадраты) и гликированного (пустые квадраты) β -казеина растворами полианионов при температуре 10°C и 25°C (синие и красные кривые, соответственно): (А) ПСС. На вставке представлены типичные примеры необработанных данных для титрования с молярным избытком ПСС. (Б-Г) – полиЦ, ПАК и гепарин, соответственно.

Таблица 2. Термодинамические параметры связывания β -казеина с полианионами.

Система	Модель	Стехиометрия	Константа ассоциации, мМ^{-1}	Энтальпия, Дж/моль	Энтропия, Дж/(моль*К)
β -казеин + ПСС, 10°C	Два сайта связывания	$3,0 \pm 0,4$ $23,8 \pm 0,6$	$23,2 \pm 5,5$ $19,3 \pm 1,6$	$705,0 \pm 125,0$ $-235,5 \pm 8,0$	7,3 3,8
β -казеин + ПСС, 25°C	Два сайта связывания	$1,9 \pm 1,0$ $35,4 \pm 0,6$	$17,6 \pm 6,0$ $14,0 \pm 2,2$	$656,3 \pm 401,3$ $-255,6 \pm 10,6$	6,8 3,7
Гликированный β -казеин + ПСС, 10°C	Два сайта связывания	$3,0 \pm 0,3$ $27,8 \pm 0,6$	$56,5 \pm 13,7$ $16,3 \pm 1,1$	$428,0 \pm 135,7$ $-236,2 \pm 6,4$	6,7 3,8
Гликированный β -казеин + ПСС, 25°C	Два сайта связывания	$0,7 \pm 2,7$ $32,1 \pm 1,3$	$125,0 \pm 176,0$ $10,7 \pm 2,1$	1168 ± 6759 $-339,2 \pm 46,1$	9,5 3,3
β -казеин + полиЦ, 10°C	Два сайта связывания	$54,0 \pm 4,6$ $77,0 \pm 7,3$	501 ± 417 $28,9 \pm 8,6$	$-6,8 \pm 1,3$ $-21,1 \pm 2,4$	6,2 4,8
β -казеин + полиЦ, 25°C	Два сайта связывания	$56,4 \pm 5,0$ $72,7 \pm 8,7$	281 ± 213 $16,2 \pm 4,2$	$-10,7 \pm 1,3$ $-29,4 \pm 3,9$	5,9 4,5
Гликированный β -казеин + полиЦ, 10°C	—	—	—	—	—
Гликированный β -казеин + полиЦ, 25°C	—	—	—	—	—
β -казеин + ПАК, 10°C	Один сайт связывания	$9,8 \pm 0,5$	$20,8 \pm 3,7$	$27,9 \pm 1,9$	4,8
β -казеин + ПАК, 25°C	Один сайт связывания	$9,4 \pm 0,5$	$18,4 \pm 3,4$	$27,6 \pm 1,7$	4,8
Гликированный β -казеин + ПАК, 10°C	Один сайт связывания	$12,2 \pm 0,7$	$23,9 \pm 6,6$	$9,2 \pm 0,7$	4,8
Гликированный β -казеин + ПАК, 25°C	Один сайт связывания	$9,9 \pm 1,1$	$22,2 \pm 8,5$	$18,1 \pm 2,6$	4,8
β -казеин + гепарин, 10°C	Один сайт связывания	$14,5 \pm 1,1$	$69,7 \pm 46,3$	$-0,005 \pm 0,0005$	5,3
β -казеин + гепарин, 25°C	Один сайт связывания	$12,4 \pm 1,1$	$9,8 \pm 2,5$	$-8,7 \pm 1,0$	4,3
Гликированный β -казеин + гепарин, 10°C	Один сайт связывания	$12,8 \pm 1,7$	$17,3 \pm 8,8$	$-5,7 \pm 1,0$	4,6
Гликированный β -казеин + гепарин, 25°C	Один сайт связывания	$15,6 \pm 3,1$	$11,7 \pm 6,2$	$-5,4 \pm 1,5$	4,4

Изменения в структуре белка исследовали путем измерения собственной флуоресценции β -казеина. β -казеин содержит один остаток триптофана, Trp157, расположенный в гидрофобной части белка. Согласно Рисунку 29А, максимум флуоресценции нативного β -казеина не зависел от температуры. В обоих случаях, то есть для мономерного β -казеина и мицелл β -казеина, длина волны, соответствующая максимуму флуоресценции, составляла 345 нм (Рис.

29А). Это значение не характерно для свернутых глобулярных белков, т. е. 330-340 нм [203,233], что является еще одним свидетельством неструктурированной природы β -казеина. Интересно, что длина волны максимума флуоресценции гликированного β -казеина (355 нм) была даже выше, чем у нативного β -казеина. Это наблюдение подтверждает увеличение гидрофильности окружения Trp157 и наше предположение о том, что гликирование приводит к дальнейшему разворачиванию β -казеина.

Максимум флуоресценции нативного β -казеина и гликированного β -казеина существенно не изменился в присутствии полианионов (Рис. 29Б-Д). Добавление гепарина к нативному и гликированному β -казеину, однако, приводило к выраженному увеличению интенсивности флуоресценции, что свидетельствует об изменении окружения Trp157 за счет связывания с гепарином. Добавление ПСС к нативному β -казеину, напротив, приводило к снижению интенсивности флуоресценции (Рис. 29Б). Вероятно, снижение интенсивности флуоресценции в присутствии ПСС связано с тушением флуоресценции ароматическими группами полимера [233]. Поскольку Trp157 расположен в гидрофобной части белка, можно предположить, что связывание ПСС с этим участком β -казеина происходит за счет гидрофобных взаимодействий, что приводит к изменению окружения Trp157. Кроме того, данные ДЛС и седиментационного анализа свидетельствовали об образовании компактных и плотных комплексов в присутствии ПСС, изменение окружения Trp157 в которых может быть значительным. Аналогичное снижение интенсивности флуоресценции наблюдалось как для нативного, так и для гликированного β -казеина в присутствии полиЦ (Рис. 29В, Д).

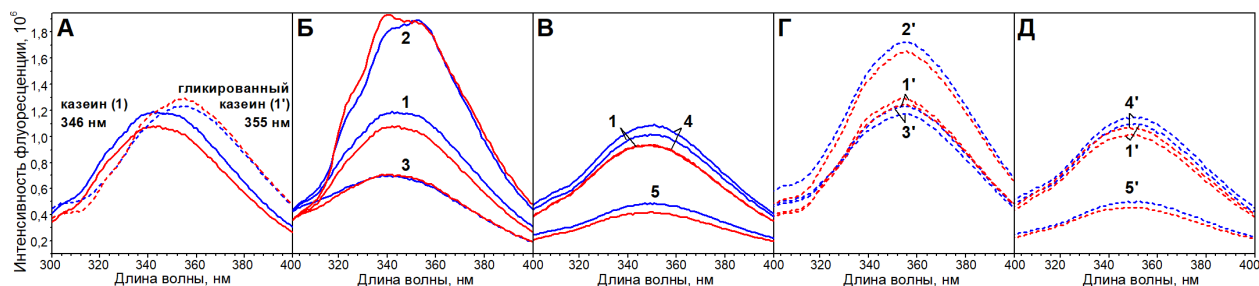


Рисунок 29. (А) Спектры собственной флуоресценции раствора β -казеина (1, сплошные кривые) и гликированного β -казеина (1', пунктирные кривые) при температуре 10°C и 25°C (синие и красные линии соответственно). На рисунке указаны длины волн максимумов флуоресценции. (Б-Д) Спектры собственной флуоресценции раствора β -казеина (1, сплошные кривые) и гликированного β -казеина (1', пунктирные кривые) с 1 мМ гепарином (2 и 2' соответственно), с 1 мМ ПСС (3 и 3' соответственно), с 1 мМ ПАК (4 и 4' соответственно), с 1 мМ полиЦ (5 и 5' соответственно) при температуре 10°C и 25°C (синие и красные линии соответственно).

Так как мы показали, что ПСС наиболее эффективно взаимодействует с β -казеином, и известно, что он может сильно влиять на структуру глобулярных белков [7,10,12], мы также проанализировали его влияние на протеолиз нативного и гликированного β -казеина. Данный метод позволяет судить о доступности различных участков полипептидной цепи к действию протеаз. Протеолиз осуществляли пепсином в соотношении фермент/субстрат 1:1000. Предсказанные сайты разрезания пепсином нативного β -казеина изображены на Рисунке 30.

RELEELNVPG EIVESLSSSE ESITRINKKI EKFAQSEEQQQ TEDELQDKIH PFAQTQSLVY PFPGPINSL
 PQNIPLTQT PVVPPFLQP EVMGVSKVKE AMAPKHKEMP FPKYPVEPFT ESQSLTLTDV ENLHPLPLL
 QSWMHQPHQP LPPTVMFPQ SVLSLSQSKV LPVPQKAVPY PQRDMPIQAF LLYQEPVLGP VRGPFPIIV

Рисунок 30. Предсказанные сервисом Peptide Cutter [234] сайты разрезания нативного β -казеина пепсином. Сайты подсвечены голубым цветом.

Электрофореграммы протеолиза нативного и гликированного белка не отличаются друг от друга (Рис. 31, верхняя панель). Предсказанные сайты разрезания (Рис. 30) практически (за исключением лизина в 32 положении) не содержат аргининов (R) и лизинов (K). Возможно, в связи с этим гликирование никак не повлияло на протеолиз. Однако комплексообразование с ПСС замедляло протеолиз как в случае нативного, так и гликированного β -казеина (Рис. 31, нижняя панель). Действительно, даже после часовой инкубации (дорожка 7) полоса, соответствующая мономеру β -казеина, четко выражена в присутствии ПСС, в отличие от случая со свободным β -казеином, где эта полоса исчезла через 5-10 мин. Это факт однозначно указывает на ингибирование протеолиза. Промежуточных продуктов протеолиза не наблюдалось. Интересно, что добавление ПСС также индуцировало образование димеров β -казеина, вероятно, за счет образования дисульфидной связи [231]. Небольшое количество димеров обнаружено в растворе свободного нативного и особенно гликированного β -казеина, но процент димерной формы значительно выше в присутствии ПСС. Димерная, как и мономерная форма, была защищена от протеолиза в присутствии ПСС: обе формы все еще обнаруживались после 60-минутной инкубации с пепсином. Недавно было показано, что ПСС усиливает протеолиз глобулярного белка ГАФД и амилоидных фибрилл прионного белка [235]. Скорее всего, противоположное действие ПСС на β -казеин является следствием его неупорядоченной структуры. Согласно нашим результатам, ПСС образует

стабильные и компактные комплексы с β -казеином, защищая его от протеаз: эти относительно плотные комплексы должны быть более устойчивыми к протеазам, в то время как глобулярные белки, обработанные ПСС, частично дестабилизируются и подвергаются протеолизу.

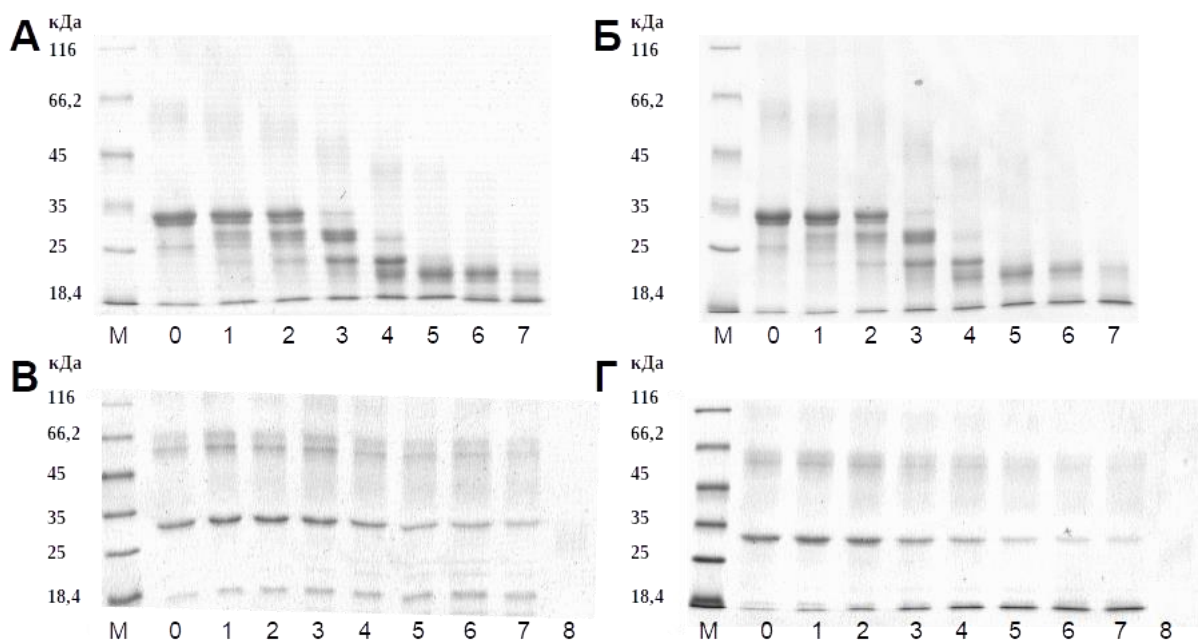


Рисунок 31. Частичный протеолиз нативного (А, В) и гликированного (Б, Г) β -казеина (верхняя панель) и их комплексов с 2 мМ ПСС (нижняя панель) пепсином в течение 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 и 60 минут с отношением фермент/субстрат 0,1%. Дорожки 0–7 соответствуют 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 и 60 минутам, дорожка 8 представляет собой свободный 2 мМ ПСС. Молекулярные массы маркеров (дорожка М) показана слева.

Суммируя описанные выше результаты, можно сделать вывод, что β -казеин эффективно взаимодействует с различными полиэлектролитами. Схема взаимодействия представлена на Рисунке 32. Отрицательно заряженный β -казеин при pH 7,2 эффективно связывает поликатион, образуя крупные комплексы, выпадающие в осадок. Взаимодействие β -казеина с полианионами

более сложное и зависит от гидрофобности полиэлектролита. Взаимодействие с относительно гидрофобным сульфатированным полимером ПСС было значительно более эффективным, чем взаимодействие с другими полимерами. Поскольку связывание другого сульфатированного, но более гидрофильного полимера гепарина было наименее выраженным среди всех протестированных полианионов, ключевую роль в связывании ПСС играют именно гидрофобные взаимодействия. Анионы полифосфатов, такие как полиЦ, и анионы поликарбоксилатов, такие как ПАК, также менее эффективно взаимодействовали с β -казеином, чем ПСС. Известно, что связывание фосфатных и карбоксилатных заряженных групп с белком менее прочное по сравнению с сульфо/сульфонатными группами [7]. По всей видимости, взаимодействия заряженных групп ПАК и гепарина с положительно заряженными аминокислотами β -казеина недостаточно для прочного взаимодействия, что подтверждается и наличием гидрофобных взаимодействий с ПСС. Кроме того, гликирование вызывало уменьшение количества положительно заряженных групп, что ослабило связывание как фосфатных, так и карбоксилатных полианионов (Рис. 28Б, В). Однако даже после гликирования β -казеина, по-видимому, происходит связывание со всеми протестированными полианионами. Гликирование приводило к образованию относительно крупных комплексов в растворе свободного β -казеина, склонных к дальнейшему агрегированию при нагревании до температуры 25°C и последующему мицеллообразованию (Рис. 26). Все протестированные полианионы подавляли указанную агрегацию гликированного β -казеина, за исключением гепарина, который, наоборот, вызывал образование еще более крупных комплексов.

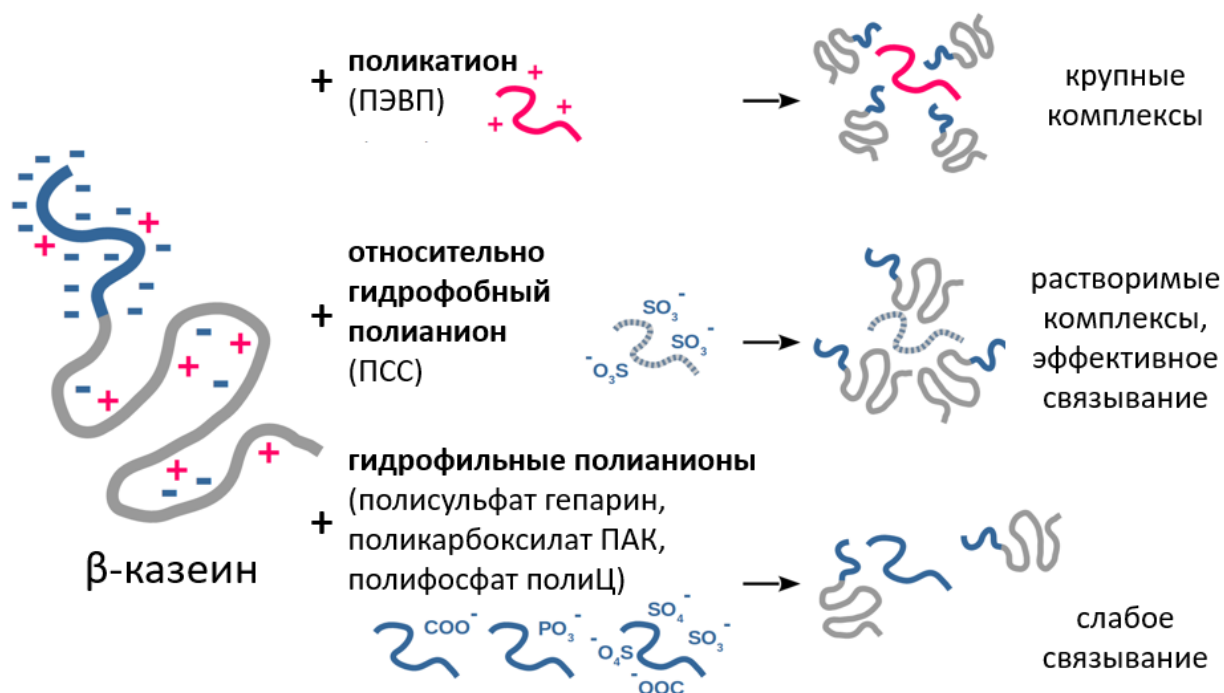


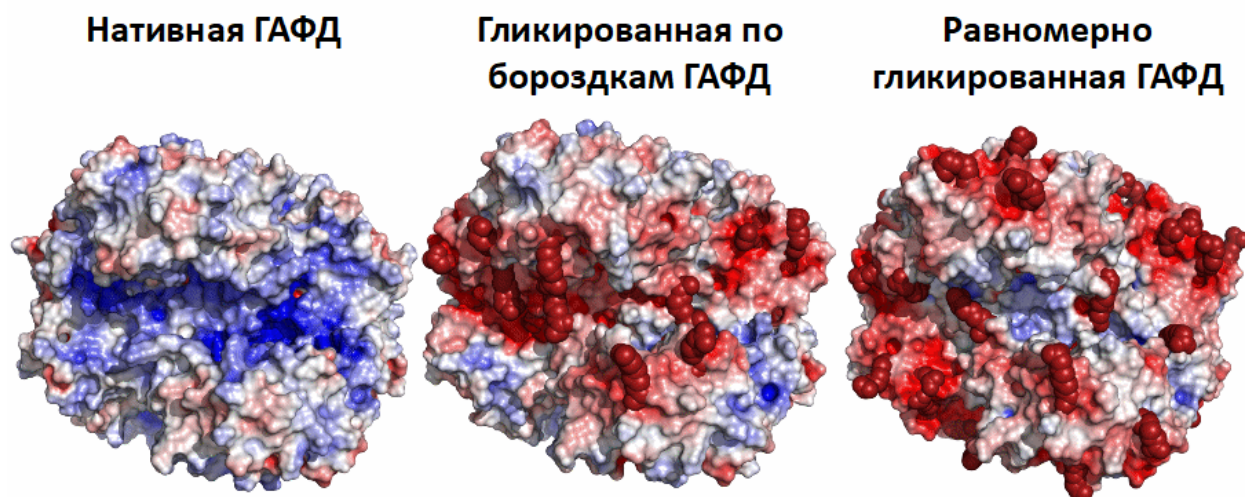
Рисунок 32. Модель взаимодействия β-казеина с полиэлектролитами. Розовый цвет обозначает положительно заряженную часть, синий цвет – отрицательно заряженную часть, серый цвет – гидрофобную часть.

3. Взаимодействие ГАФД с РНК и α-синуклеином и влияние гликирования

Методом симуляций молекулярной динамики было изучено влияние гликирования на взаимодействие ГАФД с двумя анионными биомакромолекулами, α-синуклеином и РНК. Гликированная структура апоформы ГАФД была получена путем замены лизинов на отрицательно заряженные N-ε-карбоксиметиллизины (CML) – самый распространенный поздний продукт гликирования. Ранее было показано, что α-синуклеин взаимодействует с положительно заряженной бороздкой нативной формы ГАФД [216], содержащей активный сайт и сайт связывания кофактора НАД⁺. Поэтому были проведены симуляции с двумя разными формами гликированной ГАФД. В первом случае модифицировались все остатки

лизина в обеих бороздках (всего 24 остатка, по 12 в каждой бороздке). Во втором случае модификации были равномерно распределены по поверхности ГАФД, всего было гликировано 40 остатков лизина. В обоих случаях (обозначенных как гликированная по бороздкам и равномерно гликированная ГАФД) гликирование изменило распределение поверхностного заряда белка ГАФД. Нативная ГАФД имела как положительно, так и отрицательно заряженные участки на всей поверхности белка, тогда как анион-связывающая бороздка в основном заряжена положительно (Рис. 33, слева). В результате замены положительно заряженных остатков лизина на отрицательно заряженные СМЛ общий заряд ГАФД становится более отрицательным, что приводит к появлению новых отрицательно заряженных участков. Гликированная по бороздкам форма ГАФД имела преимущественно отрицательно заряженные бороздки (Рис. 33, в центре). Что касается равномерного гликирования, поверхность ГАФД преимущественно несет отрицательный заряд с небольшой положительно заряженной областью в бороздке (Рис. 33, справа).

Симуляционная ячейка включала в себя одну молекулу нативной, гликированной по бороздкам или равномерно гликированной формы ГАФД и молекулу α -синуклеина или РНК. Для каждой формы ГАФД провели по 10 независимых симуляций по 200 нс с разными исходными позициями α -синуклеина или РНК (одинаковыми для всех форм ГАФД). Поскольку ГАФД является тетрамерным белком с эквивалентными субъединицами и бороздками, начальные положения α -синуклеина или РНК были выбраны так, чтобы покрыть четверть сферы вокруг одной субъединицы.



***Рисунок 33.** Поверхность электростатического потенциала ГАФД для каждой формы (нативной, гликированной по бороздкам и равномерно гликированной) ГАФД. Электростатический потенциал между -5 кТл/э и 5 кТл/э показан градиентом цвета от красного (отрицательный заряд) до синего (положительный заряд). Остатки CML представлены в виде сфер.*

Чтобы исследовать, насколько активно молекулы α -синуклеина или РНК могут исследовать поверхность ГАФД, на Рисунке 34 показано положение центра масс (желтые сферы) α -синуклеина или РНК по отношению к ГАФД каждую нс моделирования. Центр масс перемещался вокруг поверхности ГАФД, когда α -синуклеин или РНК находились в свободном состоянии, и становился почти неподвижным в результате связывания (высокая концентрация желтых точек вблизи поверхности ГАФД). Это говорит о том, что выбранные начальные положения молекул α -синуклеина или РНК и продолжительность моделирования достаточны для тщательного поиска сайта связывания.

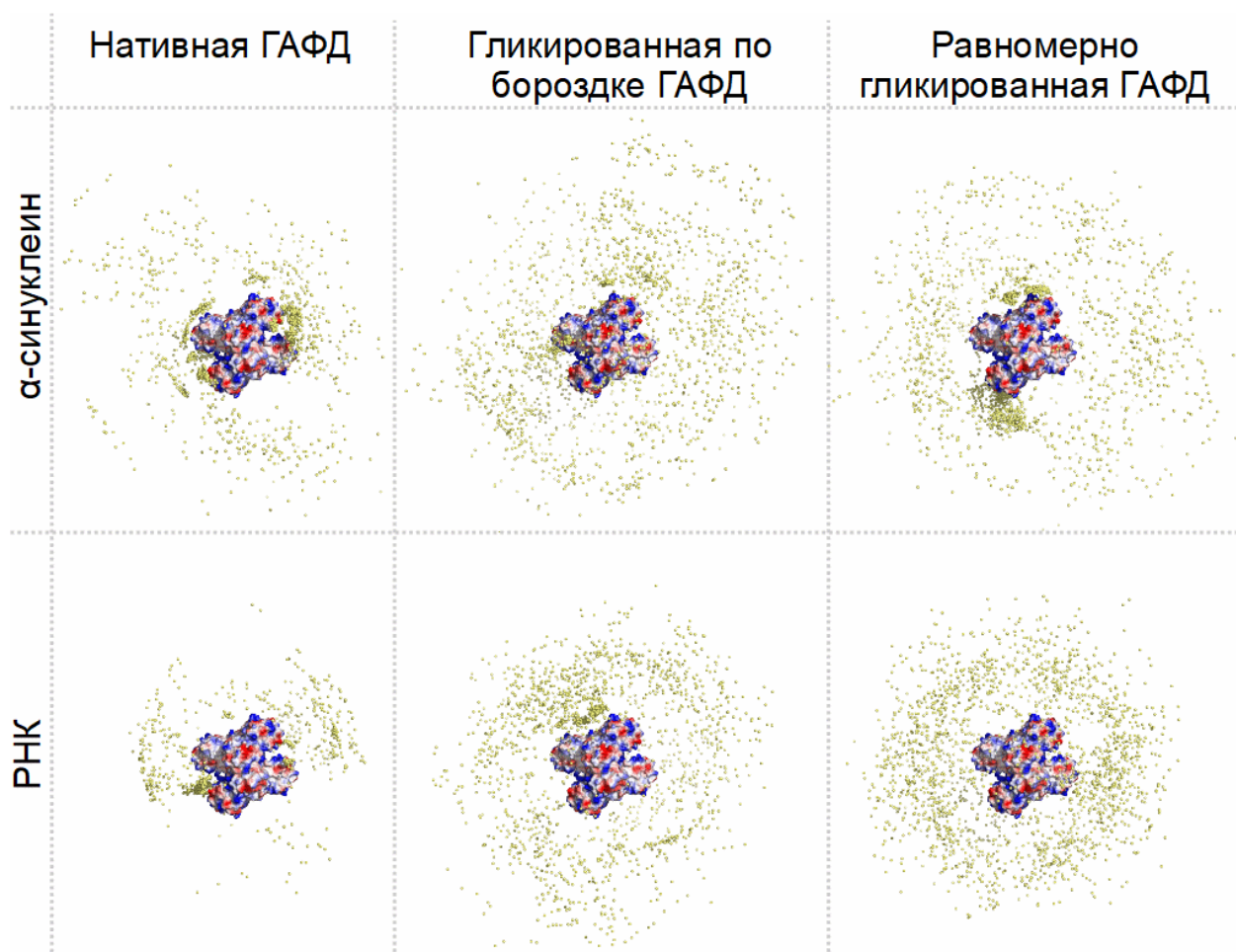


Рисунок 34. Положение центра масс (представлены желтыми сферами) α -синуклеина (верхняя панель) и РНК (нижняя панель) по отношению к ГАФД (нативной, гликированной по бороздкам и равномерно гликированной форме) каждую нс моделирования. Поверхность ГАФД окрашена в соответствии с электростатическим потенциалом (красный для отрицательно и синий для положительно заряженных областей).

3.1. Взаимодействие ГАФД с α -синуклеином

Согласно результатам молекулярного моделирования, гликирование подавляет связывание α -синуклеина с ГАФД. Стабильное взаимодействие между ГАФД и α -синуклеином наблюдалось во всех 10 симуляциях с нативной формой ГАФД, при этом α -синуклеин взаимодействует с анион-

связывающей бороздкой между О- и R-субъединицами ГАФД, которая включает субстрат- и НАД⁺-связывающий сайт (Рис. 35, слева). В результате гликирования, α -синуклеин связывался с ГАФД лишь в 3 и 5 из 10 симуляций в случае гликированной по бороздкам и равномерно гликированной формы ГАФД соответственно (Рис. 35, в центре и справа).

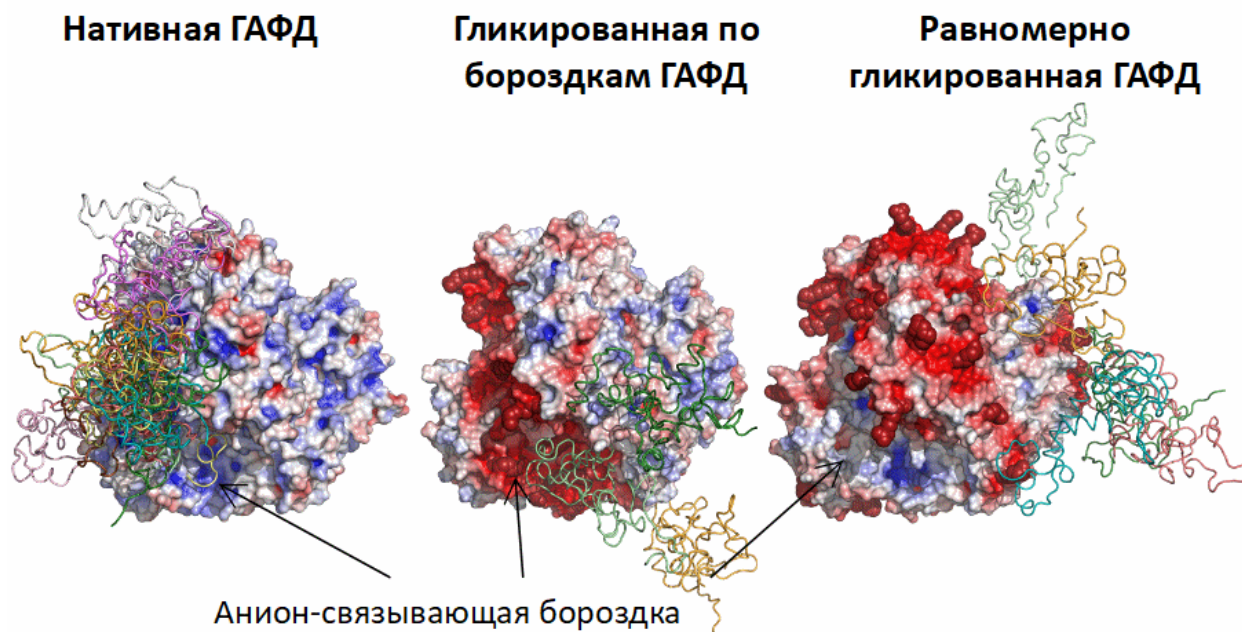


Рисунок 35. Результаты молекулярного моделирования связывания α -синуклеина с каждой из форм ГАФД: нативной, гликированной по бороздкам и равномерно гликированной. Финальные комплексы, полученные в 10 симуляциях для каждой формы ГАФД были выровнены по молекуле ГАФД и наложены друг на друга. Поверхность ГАФД окрашена в соответствии с электростатическим потенциалом (красный для отрицательно и синий для положительно заряженных областей); молекулы α -синуклеина из разных симуляций показаны в виде cartoon и окрашены в разные цвета.

Вывод о том, что гликирование ослабляет взаимодействие, подтверждается расчетом количества связей между различными формами

ГАФД и α -синуклеином. Значения были усреднены по симуляциям, где взаимодействие между белками имело место, т.е. по 10, 3 и 5 симуляциям для нативной, гликированной по бороздке и равномерно гликированной форме ГАФД соответственно, поскольку усреднение по всем симуляциям может скрыть хороший (т.е. с высокой аффинностью и большим количеством образовавшихся контактов), но небольшой (т.е. трудно достичь за 200 нс из некоторых начальных положений) сайт связывания. Количество водородных связей, ионных пар, гидрофобных взаимодействий и общее число контактов было заметно выше в случае нативной ГАФД по сравнению с обеими гликированными формами ГАФД (Рис. 36А). Этот эффект особенно значителен для гидрофобных взаимодействий. Взаимодействие α -синуклеина с равномерно гликированной ГАФД было несколько более эффективным, чем с ГАФД, гликированной по бороздкам: стабильное взаимодействие наблюдалось в пяти и трех случаях соответственно; число солевых мостиков было немного больше в случае равномерно гликированной формы ГАФД. Можно заключить, что гликирование ГАФД значительно ингибирует ее взаимодействие с α -синуклеином.

Что касается солевых мостиков, то гликирование изменило знак заряда остатков ГАФД и α -синуклеина, принимающих участие во взаимодействии (Рис. 36Б). Связывание α -синуклеина с нативной ГАФД происходило в основном за счет положительно заряженных остатков ГАФД и отрицательно заряженных аминокислот α -синуклеина (синие кривые). Гликирование уменьшило количество ионных пар данного типа. Действительно, гликирование по бороздкам привело к более чем трехкратному уменьшению данных ионных пар, тогда как более интенсивное равномерное гликирование привело к образованию примерно одной связи такого типа. В то же время гликирование способствовало образованию солевых мостиков между отрицательно заряженными остатками ГАФД и положительно заряженными аминокислотами α -синуклеина (красные кривые). В частности, при

гликировании по бородкам образовывалось равное количество ионных пар обоих типов, а равномерное гликирование приводило к преобладанию количества солевых мостиков второго типа, что свидетельствует о том, что α -синуклеин взаимодействует с отрицательно заряженными остатками СМЛ, а не с положительно заряженными остатками лизина в бороздках равномерно гликированной ГАФД.

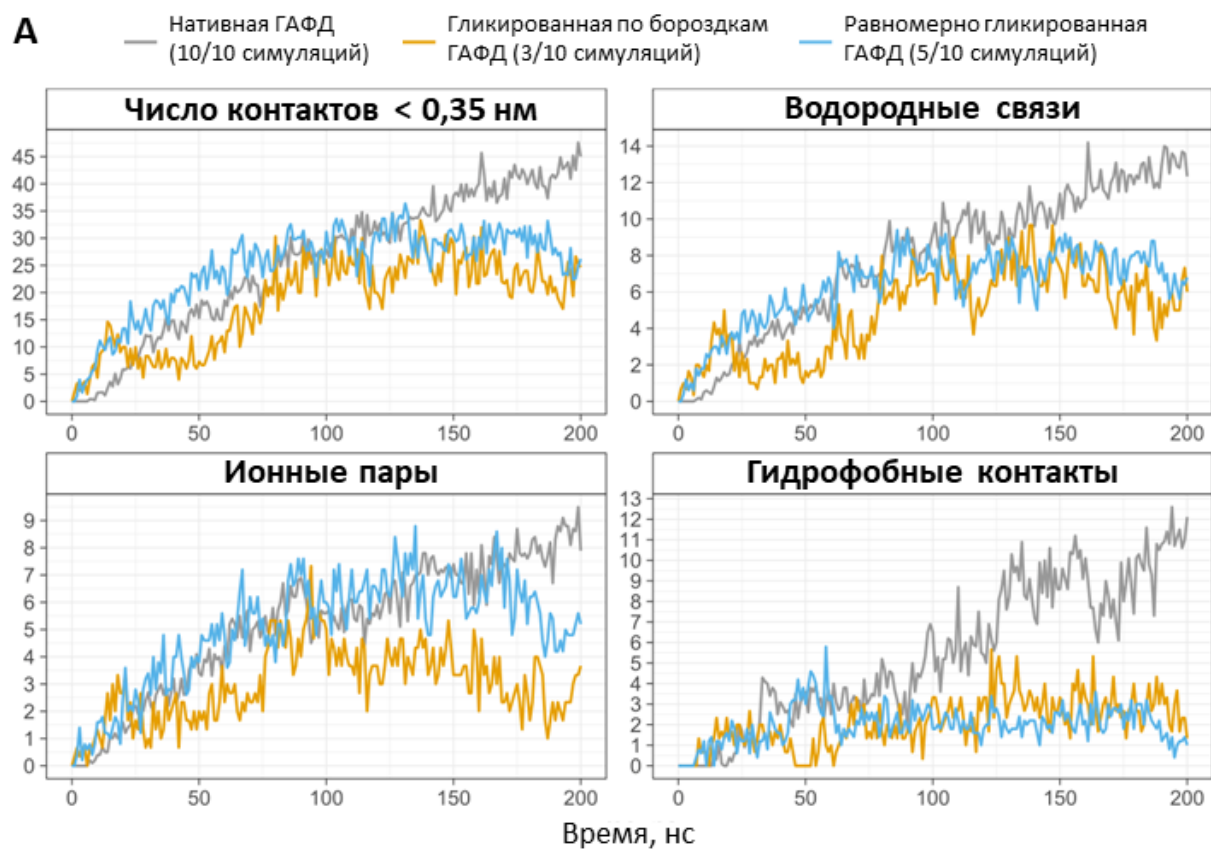


Рисунок 36. Временные профили количества связей различных типов, образующихся между ГАФД и α -синуклеином. (А) Временные профили количества всех потенциальных контактов с порогом расстояния 0,35 нм между атомами, водородных связей, ионных пар и гидрофобных связей между α -синуклеином и каждой формой ГАФД. Количество связей усредняли по соответствующему количеству симуляций со связыванием ГАФД- α -синуклеина – 10, 3 и 5 для нативной, гликированной по бороздке и равномерно гликированной формы ГАФД соответственно. (Б) Временные профили количества ионных пар между α -синуклеином и различными формами ГАФД. Ионные пары делятся на две категории в зависимости от знака заряда остатков, образующих ионные связи: ионные пары между положительно заряженными остатками α -синуклеина и отрицательно заряженными остатками ГАФД окрашены в красный цвет, в противоположном случае — в синий. Количество связей усредняли по соответствующему количеству симуляций со связыванием ГАФД- α -синуклеина – 10, 3 и 5 для нативной, гликированной по бороздке и равномерно гликированной формы ГАФД соответственно.

Гликирование изменило потенциальный сайт связывания α -синуклеина на поверхности белка ГАФД. Предсказанный сайт связывания нативной формы ГАФД обогащен положительно заряженными остатками в бороздке (Рис. 35, Рис. 37А) и включает следующие ключевые остатки: Arg80, Lys84, Glu106, Lys107, Gln113, Lys194, Gly212, Lys215, Lys219, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными остатками α -синуклеина. Гликирование бороздок осложнило ранее сильное взаимодействие между положительно заряженной бороздкой нативной формы ГАФД и отрицательно заряженным С-концом молекулы α -синуклеина. Взаимодействие наблюдалось только в 3 из 10 симуляций и при этом в каждом случае было сформировано разными остатками (Рис. 35, Рис. 37Б), поэтому сложно говорить о стабильном

сайте связывания. Хотя связывание между α -синуклеином и равномерно гликированной формой ГАФД было немного сильнее, остатки, участвующие во взаимодействии, также различались между симуляциями (Рис. 35, Рис. 37В), т. е. и в этом случае отсутствует конкретный сайт связывания. Несмотря на наличие в бороздках положительно заряженных остатков лизина, α -синуклеин взаимодействовал с большим количеством преимущественно отрицательно заряженных аминокислот, включая остатки CML: Lys3, Lys5, Asn64, CML117, CML259, CML260, CML263, Glu267 и Glu335.

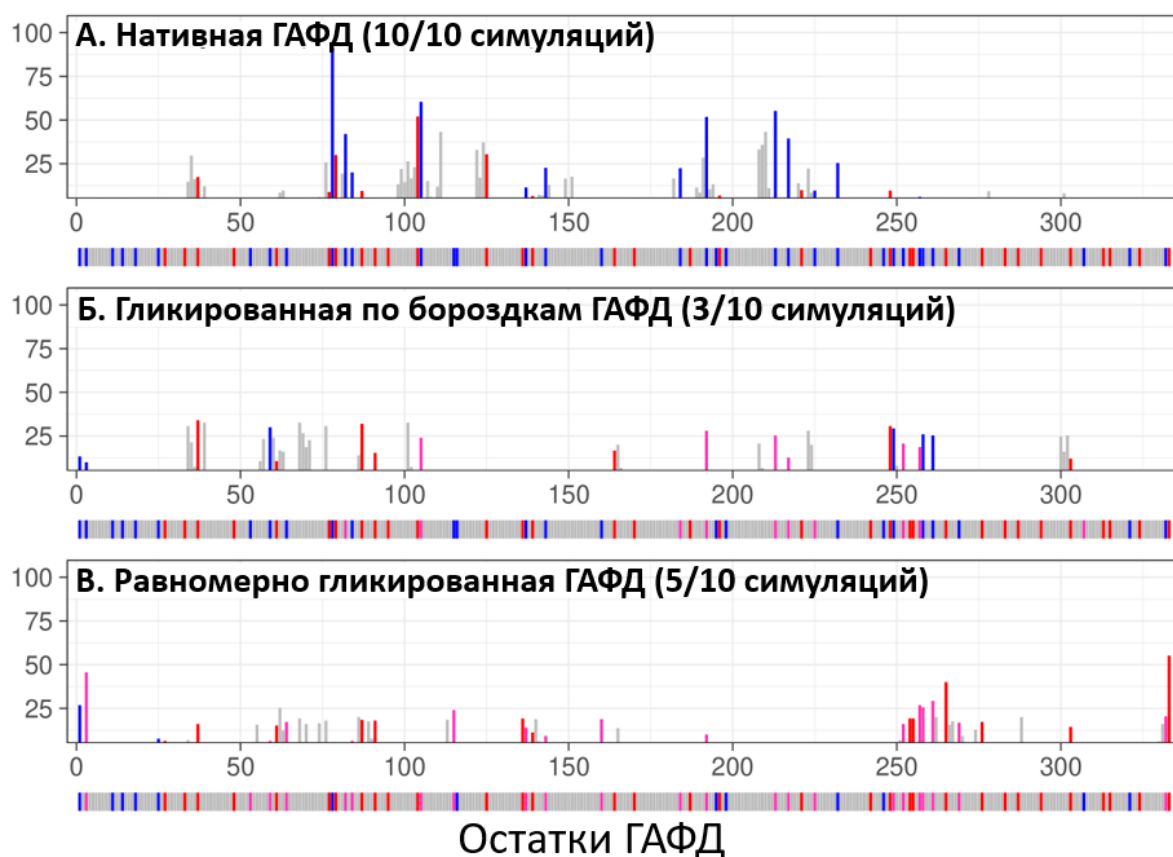


Рисунок 37. Анализ остатков ГАФД, участвующих во взаимодействии с α -синуклеином. Процентное соотношение связывания каждого аминокислотного остатка различных структур ГАФД с α -синуклеином в течение последних 50 нм моделирования (усреднены по четырем субъединицам): нативная (А), гликированная по бороздкам (Б) и равномерно гликированная (В) форма ГАФД. Графики усредняли по соответствующему количеству симуляций, где присутствовало образование комплекса ГАФД- α -синуклеин (10, 3 и 5 симуляций соответственно). Учитывали только остатки ГАФД, которые были связаны более 10% времени, остальные считали случайными. Полоса под каждым графиком представляет распределение заряженных остатков в последовательности ГАФД: серым цветом показаны незаряженные аминокислоты, отрицательные и положительные остатки выделены красным и синим цветом соответственно. Остатки лизина, замененные на CML, показаны малиновым цветом (если замена была произведена не во всех субъединицах и во взаимодействии принимает участие не модифицированный остаток лизина, такой остаток выделен синим).

Кроме того, гликирование приводило к значительному изменению участка α -синуклеина, участвующего в связывании. Действительно, α -синуклеин взаимодействует с нативной формой ГАФД в основном через отрицательно заряженный С-концевой участок (остатки 104-140) (Рис. 38А). Взаимодействие α -синуклеина с гликированными формами ГАФД (в тех немногих симуляциях, где оно наблюдалось) в основном осуществлялось за счет положительно заряженных аминокислот на N-конце (Рис. 38Б, В). В случае гликирования ГАФД по бороздкам, наблюдается высокая лабильность остатков α -синуклеина, взаимодействующих с ГАФД (Рис. 38Б). В случае равномерного гликирования ГАФД сайт связывания включал остатки 1-13 и 22-46 молекулы α -синуклеина (Рис. 38В). В обоих случаях гликирования участие С-концевой области α -синуклеина в связывании с ГАФД было незначительным.

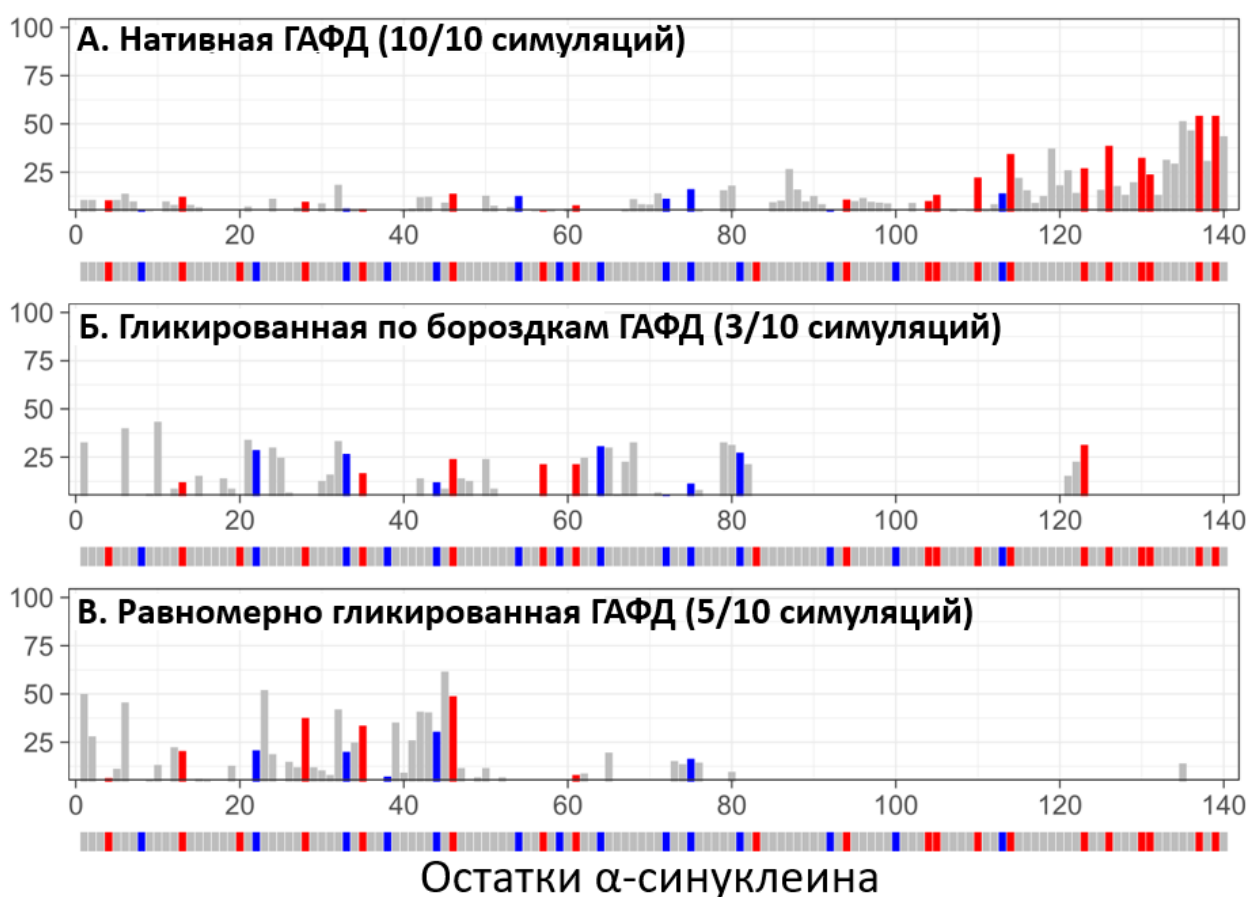


Рисунок 38. Анализ остатков α -синуклеина, участвующих во взаимодействии с ГАФД. Процентное соотношение связывания каждого аминокислотного остатка α -синуклеина с различными формами ГАФД в течение последних 50 нс моделирования: нативная (А), гликированная по бороздкам (Б) и равномерно гликированная (В) форма ГАФД. Графики усредняли по соответствующему количеству симуляций, где присутствовало образование комплекса ГАФД- α -синуклеин (10, 3 и 5 симуляций соответственно). Учитывали только остатки α -синуклеина, которые были связаны более 10% времени, остальные считали незначительными (случайными). Полоса под каждым графиком представляет распределение заряженных остатков в последовательности α -синуклеина: серым цветом показаны незаряженные аминокислоты, отрицательные и положительные остатки выделены красным и синим цветом соответственно.

Таким образом, моделирование молекулярной динамики показало, что гликирование ГАФД препятствует ее взаимодействию с α -синуклеином через основной сайт связывания – положительно заряженную бороздку, образованную сайтами связывания субстрата и НАД⁺. Возможно, α -синуклеин может связываться с гликированными формами ГАФД через другие участки, образованные в основном отрицательно заряженными остатками ГАФД, в том числе остатками CML, и положительно заряженными аминокислотами α -синуклеина на N-конце. Однако это взаимодействие значительно менее стабильно по сравнению с нативной формой ГАФД. Гликирование остатков, расположенных в положительно заряженной бороздке, было более критичным для связывания, в то время как более интенсивное равномерное гликирование оказывало несколько меньшее влияние на взаимодействие.

3.2. Взаимодействие ГАФД с РНК

Известно, что ГАФД является РНК-связывающим белком и, вероятно, участвует в регуляции экспрессии генов. Однако как именно ГАФД связывается со своими РНК-партнерами, до сих пор неизвестно, хотя предполагается, что положительно заряженная бороздка может являться потенциальным сайтом связывания нуклеиновой кислоты [236]. Наши результаты моделирования молекулярной динамики подтверждают это предположение, т. е. ГАФД связывает РНК в аналогичном сайте связывания, что и α -синуклеин. Стабильное взаимодействие между нативной формой ГАФД и РНК наблюдалось во всех 10 независимых симуляциях. Почти во всех симуляциях с нативной формой ГАФД РНК связывалась с положительно заряженной бороздкой ГАФД и только в одном случае РНК связывалась с другим положительно заряженным участком на поверхности субъединицы (Рис. 39, слева). Ключевыми остатками, вовлеченными во взаимодействие, были Phe37, Arg80, Lys84, Val101, Trp103, Lys107, Gly193, Lys194, Leu195 и

Lys215 (Рис. 40А). Эти остатки частично (почти все положительно заряженные) совпадали с остатками, участвующими во взаимодействии α -синуклеина с нативной формой ГАФД (Таблица 3).

***Таблица 3.** Ключевые остатки ГАФД, участвующие во взаимодействии каждой формы ГАФД с α -синуклеином или молекулой РНК. Остатки, участвующие в связывании и α -синуклеина и РНК, выделены жирным шрифтом.*

	Нативная ГАФД	Гликированная по бороздкам ГАФД	Равномерно гликированная ГАФД
α -синуклеин-ГАФД	Arg80, Lys84 , Glu106, Lys107 , Gln113, Lys194 , Gly212, Lys215 , Lys219	Asp39, Asn41, Asn70 , Thr103	Lys3, CML5, Asn64, CML117, CML259, CML260, CML263, Glu267, Glu335
РНК-ГАФД	Phe37, Arg80 , Lys84 , Val101, Thr103, Lys107 , Gly193, Lys194 , Leu195, Lys215	Lys3, Lys5, Phe23, Asn24, Gly26, Asp29, His57, Asn70 , Asn72	-

Как и в случае взаимодействия ГАФД с α -синуклеином, гликирование подавляет взаимодействие ГАФД с молекулой РНК. Действительно, взаимодействие наблюдалось лишь в 5 из 10 симуляций для гликированной по бороздкам формы ГАФД, причем молекулы РНК связывались в том же месте на поверхности субъединицы, что и в одной из симуляций с нативной формой ГАФД (Рис. 39). Этот сайт можно рассматривать в качестве альтернативного сайта связывания нуклеиновых кислот (Рис. 39, в центре), который стал первичным в случае гликирования бороздок. Обнаруженный сайт связывания был сходным для всех симуляций и включал в себя следующие остатки Lys3,

Lys5, Phe23, Asn24, Gly26, Asp29, His57, Asn70, Asn72 (Таблица 3). Ни в одной из симуляций для равномерно гликированной формы ГАФД не наблюдалось стабильное взаимодействие ГАФД-РНК (только в одной симуляции молекула РНК взаимодействовала с ГАФД в течение 0,8 нс, а затем диссоциировала от белка), хотя и не все остатки лизина в бороздках были заменены на СМЛ, что свидетельствует о полном ингибировании связывания при гликировании по всей поверхности ГАФД.

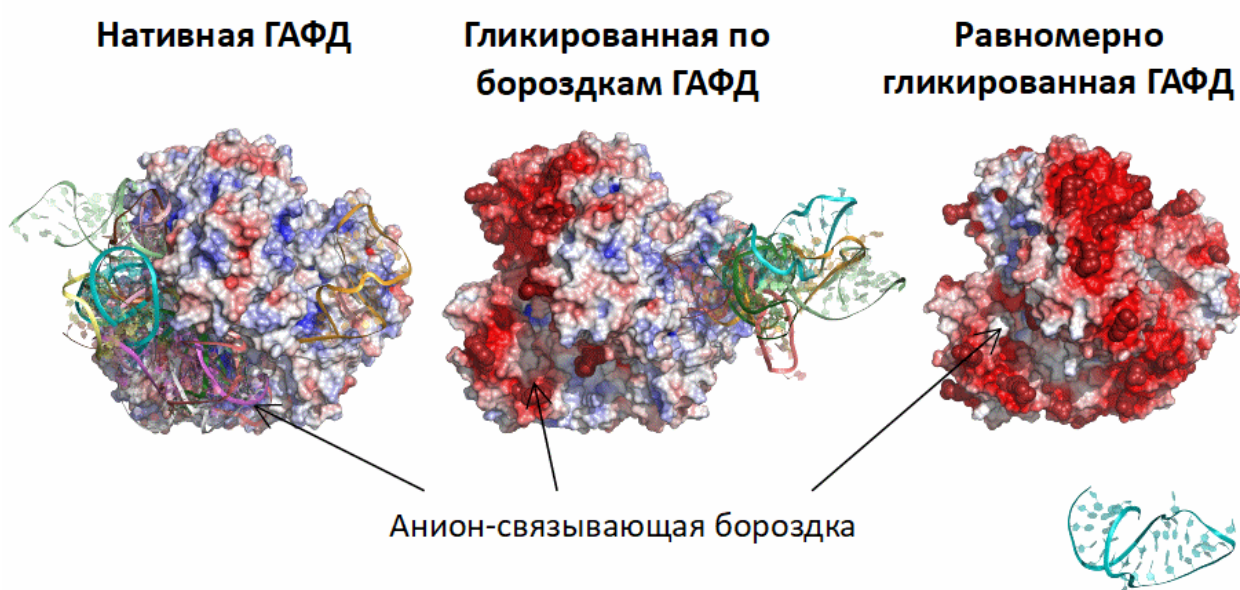


Рисунок 39. Результаты молекулярного моделирования связывания РНК с каждой из форм ГАФД: нативной, гликированной по бороздкам и равномерно гликированной. Финальные комплексы полученные в 10 симуляциях для каждой формы ГАФД были выровнены по молекуле ГАФД и наложены друг на друга. Поверхность ГАФД окрашена в соответствии с электростатическим потенциалом (красный для отрицательно и синий для положительно заряженных областей); молекулы РНК из разных симуляций показаны в виде cartoon и окрашены в разные цвета.

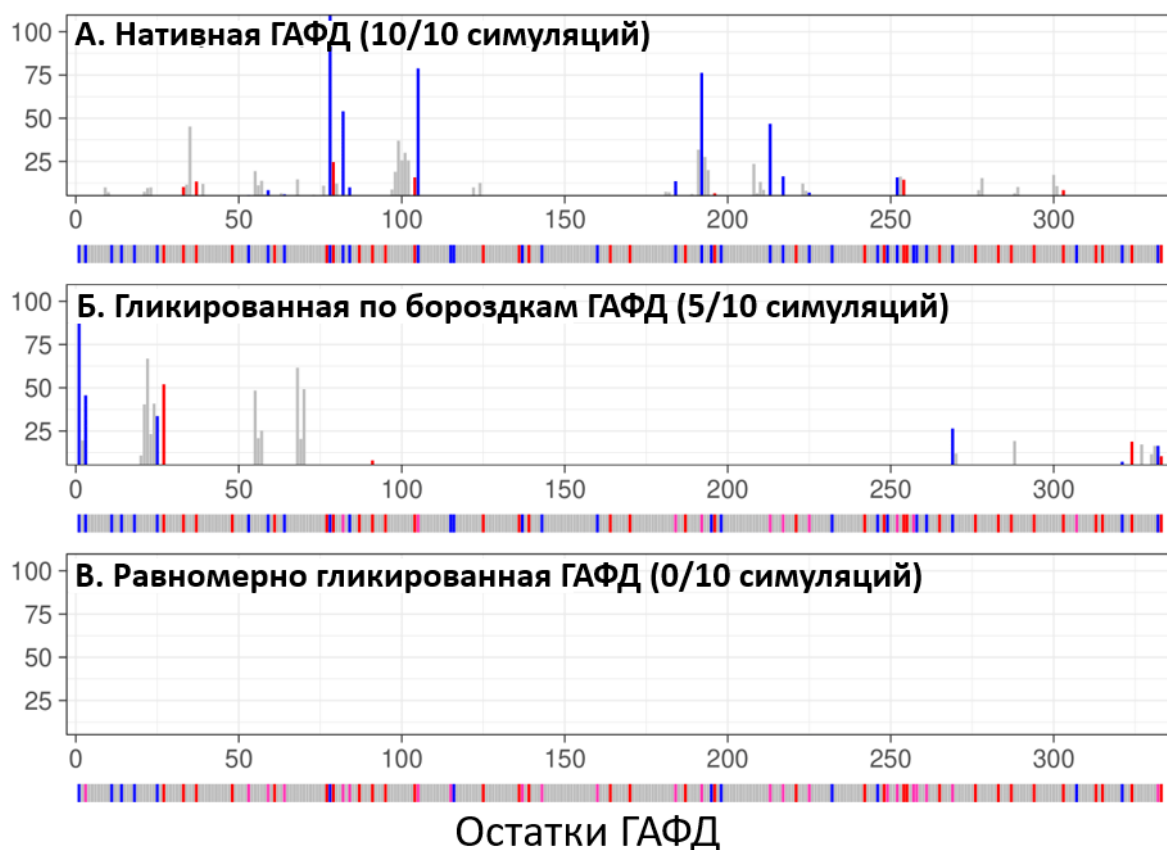


Рисунок 40. Анализ остатков ГАФД, участвующих во взаимодействии с РНК. Процентное соотношение связывания каждого аминокислотного остатка различных структур ГАФД с РНК в течение последних 50 нм моделирования (усреднены по четырем субъединицам): нативная (А), гликированная по бороздкам (Б) и равномерно гликированная (В) форма ГАФД. Графики усредняли по соответствующему количеству симуляций, где присутствовало образование комплекса ГАФД-РНК (10, 5 и 0 симуляций соответственно). Учитывали только остатки ГАФД, которые были связаны более 10% времени, остальные считали случайными. Полоса под каждым графиком представляет распределение заряженных остатков в последовательности ГАФД: серым цветом показаны незаряженные аминокислоты, отрицательные и положительные остатки выделены красным и синим цветом соответственно. Остатки лизина, замененные на СМЛ, показаны малиновым цветом (если замена была произведена не во всех субъединицах и во взаимодействии принимает участие не модифицированный остаток лизина, такой остаток выделен синим).

Значительное подавление взаимодействия между ГАФД и РНК после гликирования ГАФД подтверждается подсчетом количества различных типов контактов между молекулами (Рис. 41). Взаимодействие нативной ГАФД с РНК обусловлено в основном водородными и ионными связями. В результате гликирования бороздок их количество значительно уменьшилось. На Рисунке 41 показано количество связей, усредненное по количеству симуляций, где наблюдалось связывание ГАФД-РНК, т. е. в 5 из 10 случаев для гликированной по бороздкам ГАФД и во всех 10 случаях для нативной ГАФД. Наиболее существенное различие наблюдалось для солевых мостиков, где разница между нативной и гликированной формами ГАФД была почти трехкратной. Существенное уменьшение ионных пар, по-видимому, связано с уменьшением количества доступных для взаимодействия положительно заряженных остатков ГАФД.

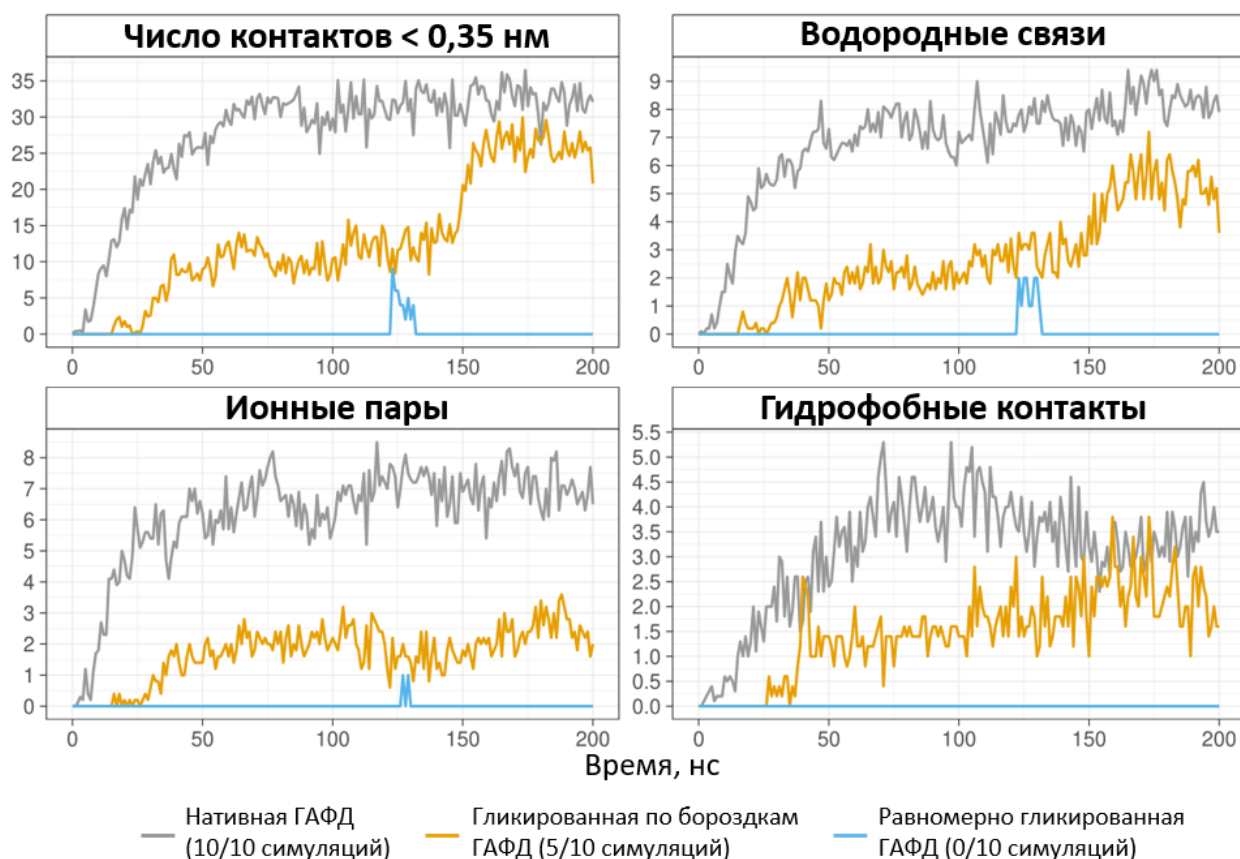


Рисунок 41. Временные профили количества всех потенциальных контактов с порогом расстояния 0,35 нм между атомами, водородных связей, ионных пар и гидрофобных связей между РНК и каждой формой ГАФД. Количество связей усредняли по соответствующему количеству симуляций со связыванием ГАФД-РНК – 10, 5 и 0 для нативной, гликированной по бороздке и равномерно гликированной формы ГАФД соответственно.

Таким образом, результаты молекулярного моделирования показали, что гликирование ГАФД препятствует ее взаимодействию как с РНК, так и с α -синуклеином. Положительно заряженная бороздка, вероятно, является основным местом связывания молекулы РНК, однако на поверхности субъединицы существует положительно заряженная область, которая может служить альтернативным сайтом связывания в случае гликирования бороздок ГАФД. Тем не менее интенсивное равномерное гликирование всей

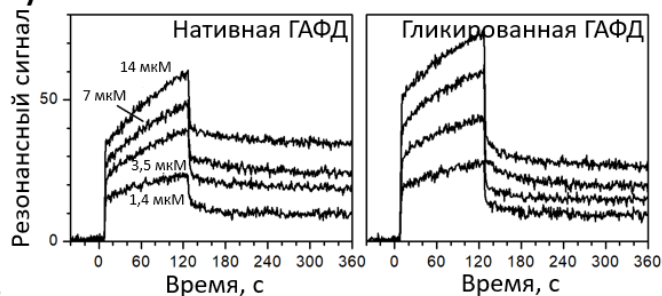
поверхности белка приводило к уменьшению всех положительно заряженных участков и полному ингибированию связывания.

3.3. Экспериментальная проверка связывания ГАФД с α -синуклеином и РНК

Результаты моделирования молекулярной динамики были исследованы с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса (данные получены при участии научного сотрудника отдела биохимии животной клетки НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова, к.б.н. Д.В. Поздышева). Нативная форма ГАФД содержит 29 аминокислот; в результате гликирования 6-7 из них были гликированы ($78 \pm 2\%$ аминокислот остались немодифицированными). В результате гликирования ферментативная активность ГАФД снизилась до $44 \pm 2\%$. Поскольку мы стремились изучить поведение гликированного, но активного фермента, мы выбрали эту форму гликирования вместо форм, полученных при более длительном инкубировании или более высокой концентрации гликирующего агента, что привело бы к более высокой инактивации ГАФД.

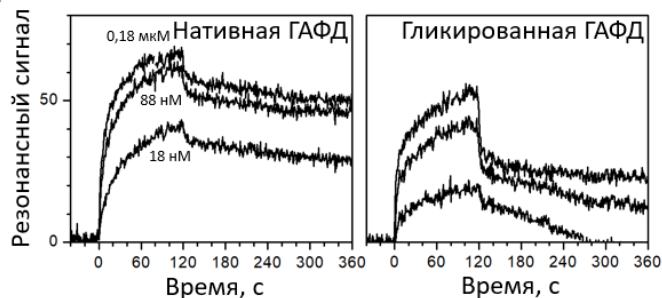
Было показано, что α -синуклеин взаимодействует с нативной формой ГАФД с константой диссоциации $2,7 \pm 0,4$ мкМ (Рис. 42, верхняя панель). Для гликированной ГАФД наблюдалось лишь небольшое снижение аффинности связывания. Более выраженная разница наблюдалась при связывании РНК с ГАФД, где константа диссоциации для гликированной ГАФД уменьшилась вдвое (Рис. 42, нижняя панель). К сожалению, гликированная форма ГАФД лишь отчасти похожа моделируемую, однако даже относительно низкий уровень гликирования ГАФД приводит к снижению эффективности связывания с α -синуклеином и РНК.

α-синуклеин



	Кд, мкМ
Нативная ГАФД	$2,7 \pm 0,4$
Гликированная ГАФД	$3,6 \pm 0,5$

РНК



	Кд, нМ
Нативная ГАФД	26 ± 4
Гликированная ГАФД	58 ± 12

Рисунок 42. Данные поверхностного плазмонного резонанса взаимодействия нативной ГАФД (слева) и гликированной ГАФД (в центре) с α-синуклеином (верхняя панель) и РНК (нижняя панель). ГАФД была иммобилизована на чипе; концентрации α-синуклеин и РНК указаны на левой панели. Значения констант диссоциации указаны справа. Данные получены при участии научного сотрудника отдела биохимии животной клетки НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова, к.б.н. Д.В. Поздышева.

4. Влияние посттрансляционных модификаций на связывание гирудин-тромбин

Электростатические взаимодействия между анион-связывающим экзосайтом-I тромбина, или сайт распознавания фибриногена, и отрицательно заряженным С-концом гирудина играют важную роль в образовании комплекса тромбин-гирудин [150,237]. Нативный гирудин сульфатирован по остатку Tyr63 (sTyr), что увеличивает отрицательный заряд пептида, обеспечивает высокую специфичность к тромбину и вносит решающий вклад

в общую энергию связывания [151,152]. Учитывая, что сульфатированные пептиды экспрессируются с относительно низким выходом и подвергаются многоступенчатой очистке [154,238], в клинической практике используется десульфатированный рекомбинантный аналог гирудина с более низкой эффективностью ингибирования [21]. Мы предложили несколько модификаций молекулы гирудина, которые имитируют сульфатирование остатка Tyr63 и могут быть потенциально синтезированы в больших количествах [239], такие как фосфотирозин (pTyr), (карбоксиметил)фенилаланин (CMF) и глутамат. Остаток pTyr был протестирован в двух разных протонированных формах с зарядом -1 и -2 (pTyr (-1) и pTyr (-2) соответственно). Обе протонированные формы, вероятно, имеют биологическую значимость, так как значение pK_{a2} для второй стадии диссоциации фосфатной группы pTyr (5,8-6,1 [240,241]) недалеко от физиологического диапазона pH (нормальный pH крови составляет 7,35-7,45 [242]). Кроме того, мы протестировали модификации других остатков (отличных от Tyr63) для неспецифического увеличения отрицательного заряда гирудина, включая замену остатка Gln65 на отрицательно заряженный остаток Glu или всех остатков лизина (Lys27, Lys36, Lys47) на остатки сукциниллизина (SuccK). Сукцинирование лизина – это посттрансляционная модификация, которая изменяет заряд остатка с +1 на -1 [243]. Сукцинирование лизина может быть легко проведено *in vitro* в достаточно мягких условиях с использованием сукцинил-КоА [244]. Все аналоги гирудина сравнивали с встречающимся в природе сульфо-гирудином и его десульфатированной формой.

4.1. Выбор силового поля для моделирования посттрансляционных модификаций

Влияние мутаций на связывание гирудина с тромбином было охарактеризовано с помощью симуляций направленной молекулярной динамики. Учитывая введение посттрансляционных модификаций и неканонических аминокислот, правильный выбор силового поля для их описания имеет важное значение. Если параметризация рTyr может быть найдена в литературе [245], то для описания других остатков есть только несколько примеров, которые не всегда подтверждены экспериментом [223,246]. Для этого были протестированы два силовых поля: GROMOS-54A8 в сочетании с параметрами Vienna-PTM для исследуемых модификаций [223] и Charmm 36M с дополнительной параметризацией. Выбор поля был основан на сравнении *in silico* предсказанной свободной энергии связывания (ΔG) с экспериментальными значениями, опубликованными в литературе [150,151], для взаимодействия тромбина с десульфо- и сульфо-гирудином. Для расчета свободной энергии связывания гирудина с тромбином были проведены симуляции направленной молекулярной динамики, при котором гирудин искусственно тянули за центр масс от тромбина с постоянной скоростью. Далее к полученным траекториям был применен метод зонтичной выборки (с английского, umbrella sampling), в результате которого был рассчитан потенциал средней силы, как функция от расстояния между центрами масс молекул и свободная энергия связывания. Сравнение рассчитанной свободной энергии связывания и экспериментальных значений представлено в Таблице 4. Согласно расчетам в обоих силовых полях, сульфо-гирудин имеет более высокое сродство к молекуле тромбина по сравнению с десульфатированным аналогом. Однако значение энергии ΔG , оцененное в силовом поле GROMOS-54A8 с параметрами Vienna-PTM для sTyr, сильно превышает экспериментальные значения энергии взаимодействия для сульфо-гирудина и десульфо-гирудина. Рассчитанные значения ΔG в силовом поле Charmm 36M

с нашей дополнительной параметризацией sTyr оказались сопоставимы с литературными данными. В частности, полученные значения свободной энергии связывания составили $-85,5 \pm 2,9$ кДж/моль и $-107,5 \pm 3,4$ кДж/моль для десульфо-гирудина и сульфо-гирудина соответственно, что соответствует экспериментальным значениям $-74,8$ кДж/моль [150] и $-87,2$ кДж/моль [151] для десульфо-гирудина и $-92,9$ [151] для сульфо-гирудина. В результате для дальнейших расчетов с другими модификациями было выбрано силовое поле Charmm 36M.

Таблица 4. Сравнение предсказанной и экспериментально полученной свободной энергии (ΔG , кДж/моль) взаимодействия десульфо-гирудина и сульфо-гирудина с тромбином

ΔG , кДж/моль	Экспериментальные значения	Силовое поле GROMOS-54A8 + Vienna-PTM	Силовое поле Charmm 36M + дополнительная параметризация
Десульфо-гирудин	$-74,8$ [150]; $-87,2$ [151]	$-113,5 \pm 4,1$	$-85,5 \pm 2,9$
Сульфо-гирудин	$-92,9$ [151]	$-218,5 \pm 5,2$	$-107,5 \pm 3,4$

4.2. Структурные особенности взаимодействия между тромбином и различными производными гирудина

Мутации в молекуле гирудина привели к заметным изменениям во взаимодействии с тромбином. На Рисунке 43 показаны оптимизированные структуры комплексов; ключевые контакты, участвующие во взаимодействии перечислены в Таблице 5. Сульфатная группа сульфо-тирозина в нативной форме гирудина действительно опосредует несколько важных взаимодействий между тромбином и гирудином, которые отсутствуют в

случае десульфо-гирудина (Рис. 43А, Б). Сульфатная группа непосредственно образует водородные связи с гидроксильной группой остатка Tyr76 тромбина и с основной цепью остатка тромбина Ile82. Между тем, атомы кислорода сульфатной группы также взаимодействуют с молекулами воды, образуя сеть водородных связей и опосредуя взаимодействие с положительно заряженной ε-аминогруппой остатка тромбина Lys81, гуанидиновой группой остатка тромбина Arg77 и с основной цепью остатков тромбина Asn78 и Glu80. Согласно кристаллической структуре комплекса, остаток тромбина Lys81 непосредственно взаимодействует с сульфатом sTyr63 на расстоянии 3,1 Å, образуя солевой мостик между молекулами [152]. Однако, вместо описанного солевого мостика, sTyr63 в оптимизированном комплексе образует два новых водяных мостика с боковыми цепями остатков тромбина Lys81 и Arg77, сохраняя остальные контакты, как в кристаллической структуре. Сульфо-гирудин, как и десульфо-гирудин, образует гидрофобные взаимодействия между ароматическим кольцом остатка гирудина в положении 63 и остатком тромбина Ile82.

Конформации основных цепей трех миметиков сульфо-тирозина, а именно фосфо-гирудина (pTyr (-1) и pTyr (-2)) и Tyr63CMF гирудина, практически совпадают с конформациями основных цепей сульфо- и десульфо-гирудина, что позволяет предположить, что фосфорилирование и карбоксилирование тирозина не вызывает значительных конформационных изменений полипептидной цепи. Модифицированные остатки этих трех производных гирудина образуют водородные связи с остатками тромбина Tyr76 и Ile82 и гидрофобные взаимодействия с остатком тромбина Ile82, аналогично сульфо-гирудину. Однако фосфо-гирудин (-1) образует значительно меньше контактов по сравнению с сульфо-гирудином и не взаимодействует с остатками Arg77, Asn78, Lys81 тромбина (Рис. 43В). С другой стороны, остатки pTyr63 (-2) и CMF63 для фосфо-гирудина (-2) и Tyr63CMF гирудина соответственно ориентированы в сторону остатка

тромбина Lys110, образуя дополнительные контакты, которые отсутствуют в случае взаимодействия тромбина с сульфо-гирудином (Рис. 43Г, Д). Более того, фосфо-гирудин (-2) является единственным производным гирудина, образующим прямой солевой мостик между остатком 63 и положительно заряженным остатком тромбина (Lys110), поэтому можно предположить, что взаимодействие тромбина с фосфо-гирудином (-2) сильнее, чем с нативным сульфо-гирудином.

Замена Tyr63 на остаток глутамата, который имеет более короткую и менее гидрофобную боковую цепь, приводит к изменению конформации С-конца гирудина и образованию только водородных связей, опосредованных молекулами воды (Рис. 43Е). Более того, остаток Glu63 не образует гидрофобных взаимодействий с остатком тромбина Ile82. Исходя из этого, можно предположить, что Tyr63Glu гирудин будет иметь более низкое сродство к тромбину, чем сульфо-гирудин.

В случае Gln65Glu гирудина боковая цепь остатка Glu65 ориентирована в растворитель и не образует связей с молекулой тромбина (Рис. 43Ж), поэтому Gln65Glu гирудин, вероятно, будет иметь такое же сродство к тромбину, как и десульфо-гирудин. Что касается производного гирудина K_{327,36,47}SuccK₃, то все остатки сукциниллизина находятся в глобулярной N-концевой части гирудина, при этом только остаток SuccK36 образует водяные мостики с гуанидиновой группой остатка Arg173 тромбина, в то время как остальные остатки SuccK ориентированы в растворитель. Кроме того, остаток SuccK36 образует внутримолекулярные связи с гирудином, которые ограничивают гибкость молекулы (Рис. 43З). В частности, карбоксильная группа остатка SuccK36 образует солевой мостик с атомом азота внутри остатка SuccK36 и водяной мостик с основной цепью остатка Gly18.

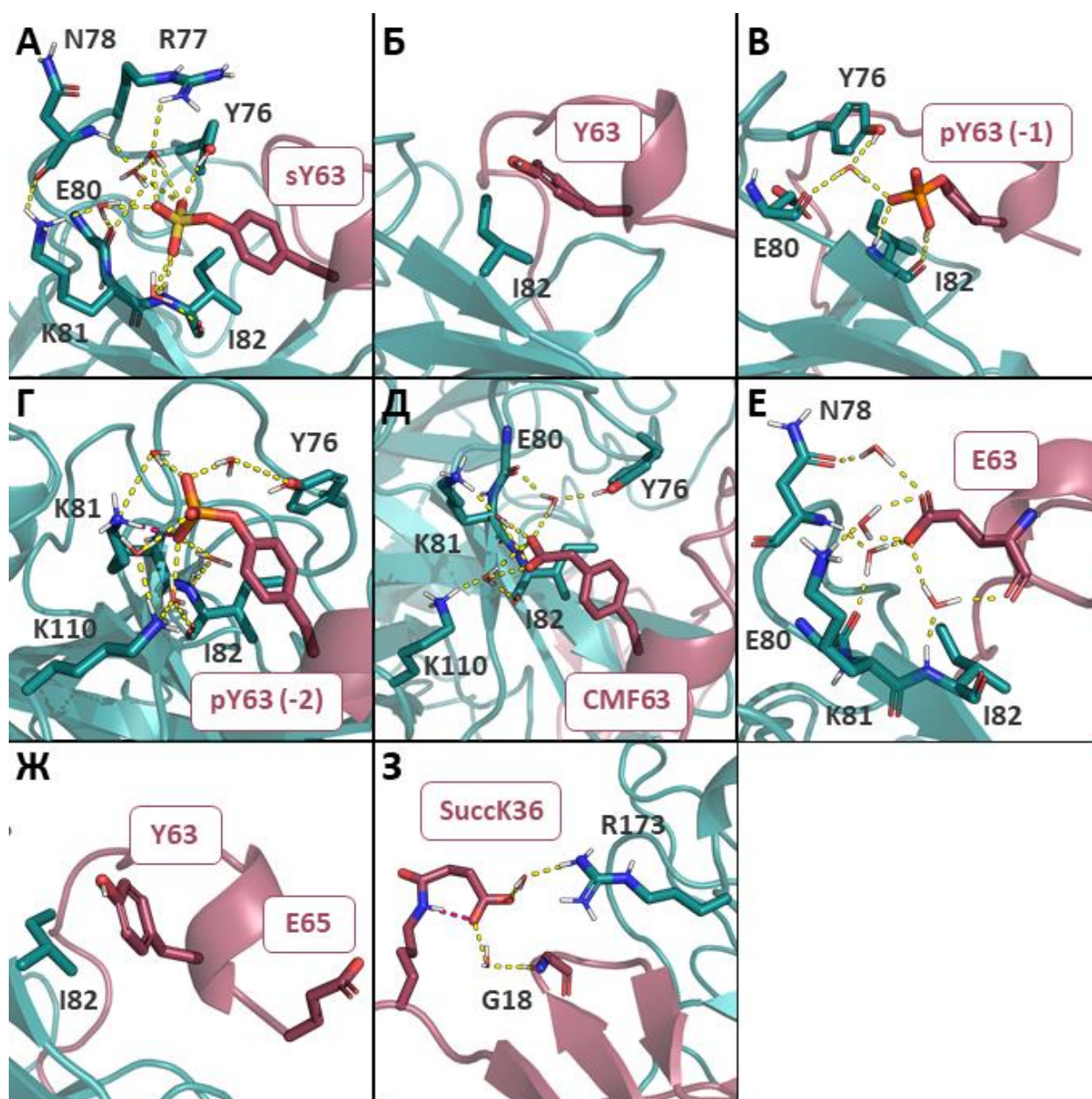


Рисунок 43. Взаимодействие модифицированных остатков гирудина с остатками тромбина в исходных структурах для молекулярного моделирования. (А) Сульфo-тирозин63 (sY63); (Б) Десульфo-тирозин63 (Y63); (В) Фосфо-тирозин63 (-1) (pY63 -1); (Г) Фосфо-тирозин63 (-2) (pY63 -2); (Д) (Карбоксиметил)фенилаланин63 (CMF63); (Е) Глутамат63; (Ж) Глутамат65; (3) Сукциниллизин36 (SuccK36). Молекулы тромбина и гирудина покрашены в аквамариновый и малиновый цвет соответственно. Остатки тромбина, участвующие во взаимодействии подписаны и представлены в модели «sticks». Желтый и пурпурный цвета обозначают водородную связь и солевой мостик соответственно.

Таблица 5. *Остатки тромбина, участвующие во взаимодействии с модифицированными остатками каждой молекулы гирудина. Взаимодействие между белками расклассифицировали на 4 категории: водородная связь, солевой и водной мостик, гидрофобные взаимодействия.*

Производные гирудина	Модифицированные остатки	Остатки тромбина, участвующие во взаимодействии			
		Водородная связь	Солевой мостик	Водной мостик	Гидрофобные взаимодействия
Сульфо-гирудин	sY63	Y76, I82		R77, N78, E80, K81, I82	I82
Десульфо-гирудин	Y63				I82
Фосфо-гирудин (-1)	pY63 (-1)	I82		Y76, E80	I82
Фосфо-гирудин (-2)	pY63 (-2)		K81	Y76, K81, I82, K110	I82
Tyr63CMF гирудин	CMF63	I82		Y76, E80, K81, I82, K110	I82
Tyr63Glu гирудин	E63			N78, E80, K81, I82	
Gln65Glu гирудин	Y63, E65				I82
K _{327,36,47} SuccK ₃ гирудин	Y63, SuccK36			R173	I82

4.3. Оценка свободной энергии связывания гирудин-тромбин

Для оценки аффинности различных производных гирудина к тромбину были проведены симуляции направленной молекулярной динамики с диссоциацией молекулы гирудина от тромбина путем введения внешней силы к центру масс гирудина. Приложенная к гирудину внешняя сила возрастала до достижения такой конфигурации комплекса, при которой разрываются критически важные для взаимодействия контакты, позволяя молекуле гирудина диссоциировать от молекулы тромбина (Рис. 44). Основные этапы процесса диссоциации гирудина показаны на Рис. А, которые были схожи для всех производных гирудина. Сначала диссоциирует N-концевая глобулярная часть гирудина. Точка максимума силы соответствует моменту

непосредственно перед разрывом водородных связей между остатками тромбина Glu217, Arg221A, Lys224 и остатками гирудина Tyr3, Asp5, Ser19, Val21 (Рис. 45А, вторая структура комплекса), что означает важную роль этих остатков во взаимодействии тромбина-гирудин. Вскоре после диссоциирует остаток гирудина Leu1, и вся N-концевая глобулярная часть отрывается от молекулы тромбина. Последующие этапы диссоциации показаны на Рисунке 45А, (третья и четвертая структура комплекса), пока гирудин полностью не отделяется от тромбина (последняя структура на Рис. 45А). Для всех производных гирудина, кроме фосфо-гирудина (-2), последние контакты между гирудином и тромбином осуществлялись за счет С-концевой карбоксильной группы остатка Gln65/Glu65 гирудина. В случае фосфо-гирудина (-2), последним взаимодействующим остатком гирудина был pTyr63 (-2). Диссоциация pTyr63 (-2) от тромбина соответствует второму меньшему пику на кривой профиля силы от времени, который отсутствует для других производных гирудина (Рис. 44), таким образом, можно предположить, что остаток pTyr63 (-2) вносит значительный вклад в энергию связывания гирудина с тромбином.

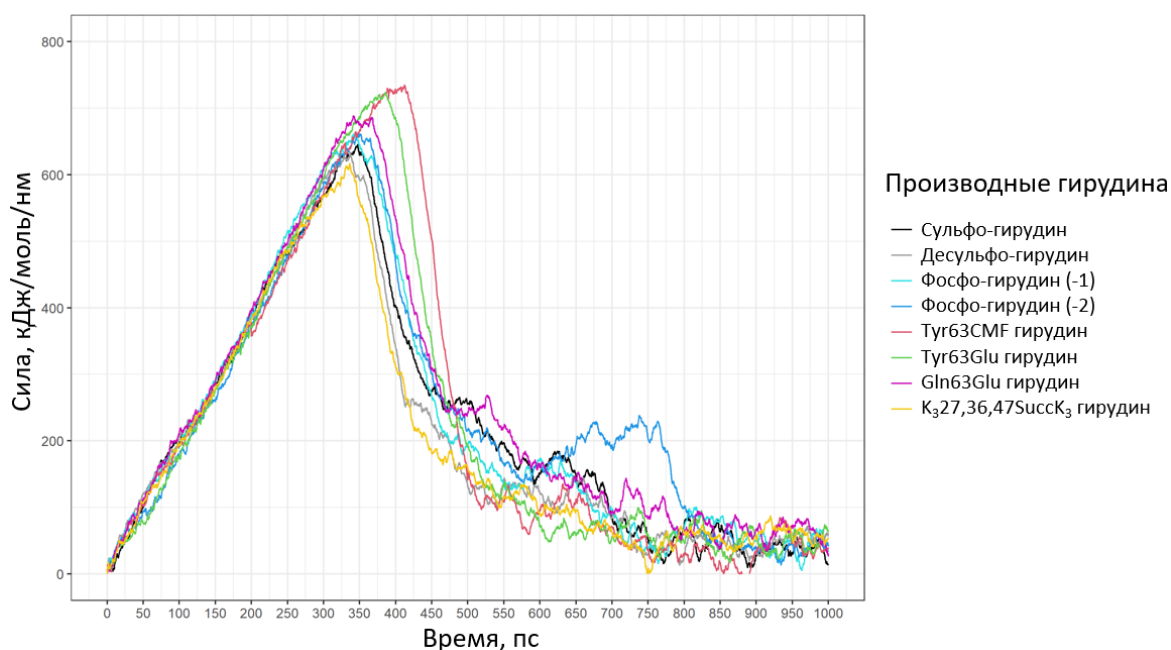


Рисунок 44. Профиль силы от времени при диссоциации различных производных гирудина от тромбина.

Для определения свободной энергии связывания (ΔG) тромбина с гирудином использовали метод зонтичной выборки. Кривые потенциала средней силы (PMF) были получены для каждого производного гирудина (Рис. 45Б) как функция от расстояния между центрами масс белков, а затем использованы для расчета ΔG связывания (Таблица 6). Для всех аналогов гирудина минимум энергии возникал при расстоянии между центрами масс в диапазоне 1,59 - 1,74 нм, причем самое близкое расстояние между центрами масс (1,59 нм) наблюдалось для фосфо-гирудина (-2). Свободные энергии связывания для десульфо-гирудина и сульфо-гирудина составляют $-85,5 \pm 2,9$ кДж/моль и $-107,5 \pm 3,4$ кДж/моль, соответственно, что соответствует значениям, опубликованным в литературе [150,151]. Таким образом, сродство нативного сульфо-гирудина к тромбину значительно выше, чем у десульфо-гирудина с предсказанным $\Delta\Delta G$ -22 кДж/моль.

Учитывая величину стандартной ошибки, можно сделать вывод, что мутация Tyr63Glu не оказывает заметного влияния на свободную энергию связывания гирудина. Этот факт подтверждается измеренным *in vitro* ΔG для Tyr63Glu гирудина [247], где энергия $\Delta\Delta G$ составляет +1,9 кДж/моль против +1,7 кДж/моль, предсказанной в данной работе. Мутация Tyr63CMF дестабилизирует взаимодействие с тромбином по сравнению с десульфо-гирудином с положительной $\Delta\Delta G$ +8,2 кДж/моль.

Согласно полученным результатам, другие производные гирудина могут иметь более высокое сродство к молекуле тромбина по сравнению с десульфо-гирудином. Три производных гирудина, а именно фосфо-гирудин (-1), Gln65Glu гирудин и K_{327,36,47}SuccK₃ гирудин, показывают одинаковую свободную энергию связывания с преимуществом в энергии $\Delta\Delta G$ от -9,6 до -10,6 кДж/моль. Однако самое сильное взаимодействие с тромбином наблюдалось для производного фосфо-гирудина (-2) с предсказанной разницей в энергии $\Delta\Delta G$ -51,7 кДж/моль. Согласно оценке ΔG , сульфо-гирудин, фосфо-гирудин, Gln65Glu и K_{327,36,47}SuccK₃ гирудин могут быть

потенциально более эффективными ингибиторами тромбина, чем используемый в клинической практике десульфо-гирудин, причем самым эффективным среди них является фосфо-гирудин (-2).

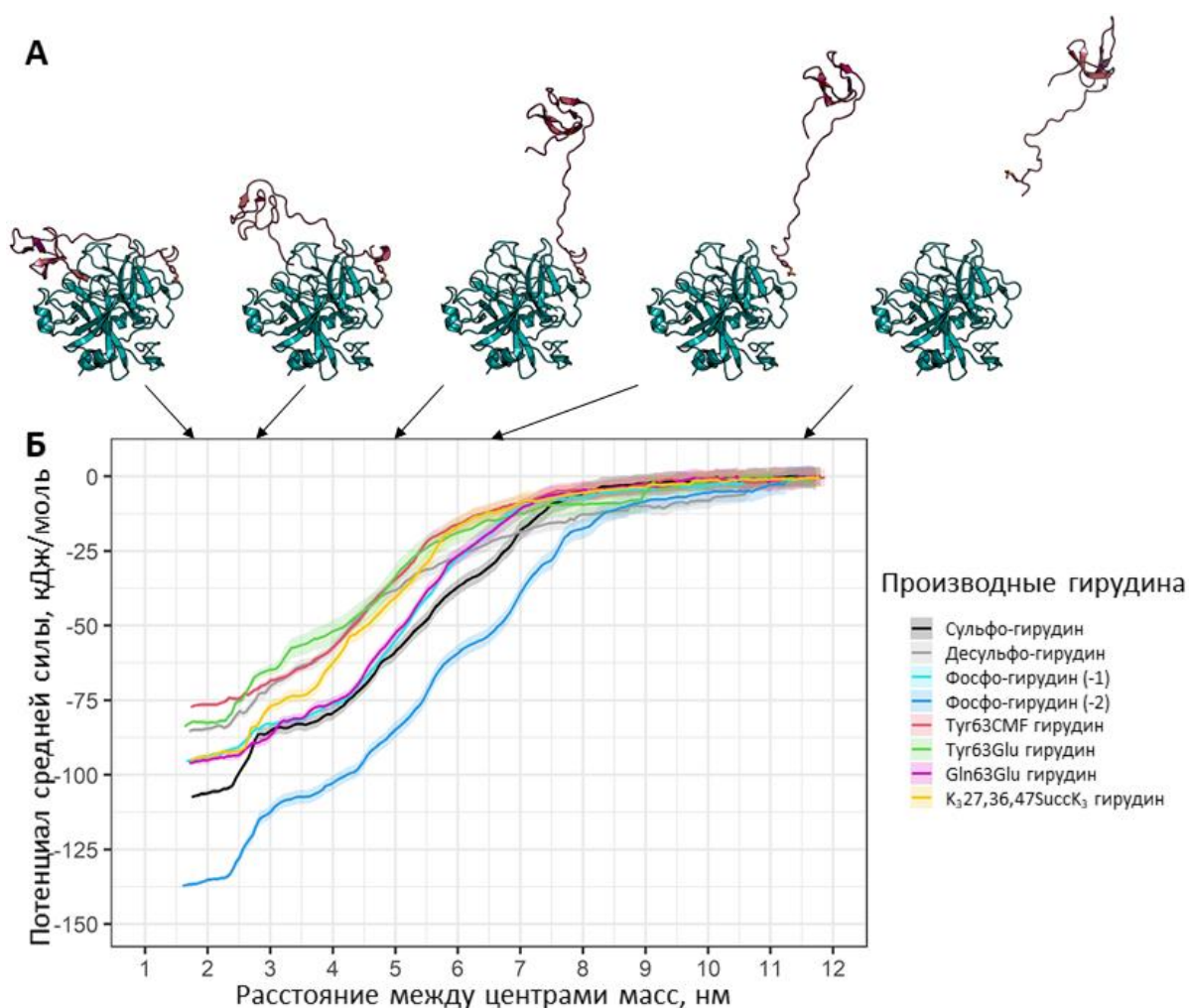


Рисунок 45. Результаты симуляций направленной молекулярной динамики с последующим применением метода зонтичной выборки для расчета свободной энергии связывания тромбина с производными гирудина. (А) Визуализация последовательной диссоциации сульфгидрида от молекулы тромбина в результате симуляций направленной молекулярной динамики и (Б) потенциал средней силы (PMF) с полосой, соответствующей стандартной ошибке, для каждого из исследуемых производных гирудина. Молекулы тромбина и гирудина покрашены в аквамариновый и малиновый цвет и изображены в виде cartoon, соответственно. sTyr63 изображен в модели «sticks».

Таблица 6. Предсказанная свободная энергия связывания (ΔG , кДж/моль) со стандартной ошибкой для каждого из исследованных производных гирудина. $\Delta\Delta G$ отражает насколько энергия связывания производного гирудина отличается от энергии связывания десульфо-гирудина и рассчитывается как $\Delta\Delta G_{\text{производное гирудина}} = \Delta G_{\text{производное гирудина}} - \Delta G_{\text{десульфо-гирудин}}$

Производное гирудина	ΔG , кДж/моль	$\Delta\Delta G$, кДж/моль
Десульфо-гирудин	$-85,5 \pm 2,9$	
Сульфо-гирудин	$-107,5 \pm 3,4$	-22
Фосфо-гирудин (-1)	$-95,4 \pm 2,1$	-9,9
Фосфо-гирудин (-2)	$-137,2 \pm 3,9$	-51,7
Tyr63CMF гирудин	$-77,3 \pm 2,9$	+8,2
Tyr63Glu гирудин	$-83,8 \pm 4,1$	+1,7
Gln65Glu гирудин	$-96,1 \pm 3,7$	-10,6
K327,36,47SuccK3 гирудин	$-95,1 \pm 3,4$	-9,6

4.4. Антитромботическая активность производных гирудина *in vitro*

Производные гирудина, для которых была предсказана энергия связывания тромбина, были исследованы на способность ингибировать активность тромбина *in vitro*. Введение исследуемых модификаций в полноразмерный полипептид гирудина – крайне трудоемкий процесс, однако было показано, что для связывания и ингибирования тромбин-опосредованного свертывания плазмы крови достаточен С-концевой фрагмент из 10-11 аминокислотных остатков гирудина [248], поэтому при

экспериментальной проверке были использованы аналоги С-концевого фрагмента (остатки 55-65) молекулы гирудина, полученные методом твердофазного синтеза. Аналоги гирудина были оценены на способность ингибировать тромбин-опосредованный гидролиз фибриногена *in vitro* (тромбиновое время). Лизин-сукцинилизированный аналог гирудина 55-65 не анализировали, так как модифицированные остатки лизина находятся вне С-концевого пептида. Кроме того, мы исключили из анализа аналог гирудина Tyr63Glu, так как эта модификация не показала увеличения энергии связывания по сравнению с десульфо-гирудином согласно молекулярному моделированию, а также в эксперименте, проведенном другой группой [247]. Эксперименты проводились при двух различных значениях pH, 7,5 и 6, для изучения различных состояний протонирования pTyr (значение pK_{a2} для второго этапа диссоциации фосфатной группы pTyr составляет 5,8-6,1 [240,241]). Результаты измерения тромбинового времени представлены на Рисунке 46.

Референсное значение тромбинового времени (полученное в присутствии буфера) составило 19,3 секунды при физиологических условиях, pH 7,5 [242]. В присутствии всех протестированных аналогов гирудина 55-65 тромбиновое время удлинялось, за исключением аналога гирудина Tyr63CMF 55-65, который не проявлял антитромбиновой активности даже при самой высокой исследуемой концентрации 15 мг/мл. Аналоги сульфо-гирудина 55-65 и фосфо-гирудина 55-65 (преимущественно с pTyr (-2)) проявили более высокую активность по сравнению с десульфо-гирудином 55-65, что согласуется с предсказанными свободными энергиями связывания (Таблица 6). Аналог гирудина Gln65Glu 55-65, показавший улучшение сродства к тромбину *in silico*, продемонстрировал меньшую способность ингибировать тромбин, чем десульфо-гирудин 55-65. При pH 6, где примерно половина фосфатных групп фосфо-тирозина протонирована, фосфо-гирудин 55-65 показал наиболее высокую способность ингибировать активность тромбина среди всех других

аналогов гирудина, что позволяет предположить, что производное фосфо-гирудина (-1) также проявляет значительную ингибирующую активность. Таким образом, фосфо-гирудин, по всей видимости, является наиболее эффективным ингибитором тромбина среди всех протестированных аналогов гирудина.

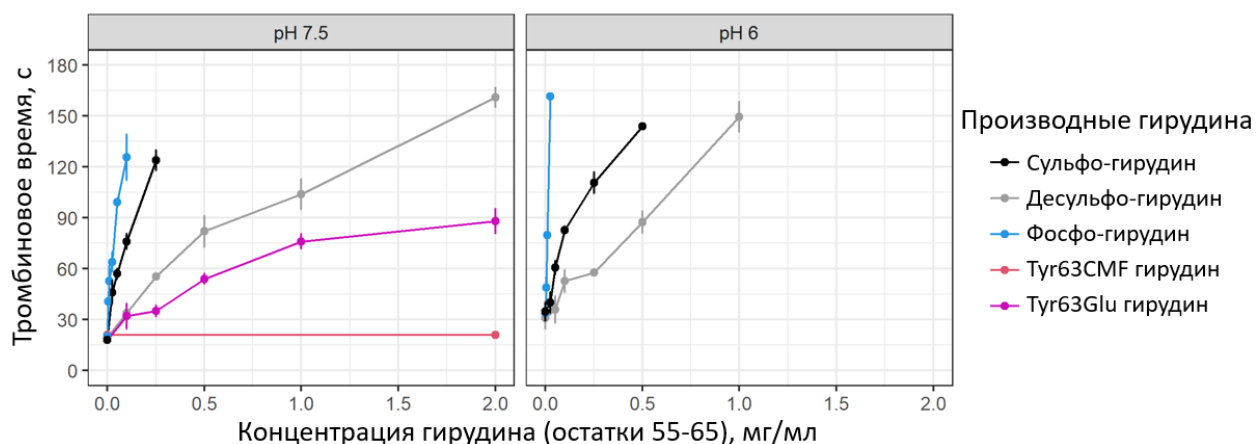


Рисунок 46. Тромбиновое время в зависимости от концентрации С-концевых производных гирудина (остатки от 55 до 65) при рН 6 и 7,5. Данные представлены как среднее значение со стандартным отклонением.

4.5. Выбор оптимального производного гирудина для крупномасштабного синтеза и использования в клинической практике

Мы изучили влияние различных модификаций гирудина, включая замену на стандартные (Tyr63Glu, Gln65Glu) и неканонические (карбоксиметилфенилаланин, CMF) аминокислоты или посттрансляционные модификации (sTyr, pTyr с разной степенью протонирования, сукциниллизин) на сродство к тромбину с помощью методов молекулярного моделирования. Производное гирудина с фосфорилированием остатка Tyr63 является наиболее перспективным кандидатом для ингибирования тромбина среди всех

протестированных производных гирудина. Согласно расчету свободной энергии связывания производных гирудина с тромбином, фосфо-гирудин обладал большим сродством к молекуле тромбина по сравнению с десульфо-гирудином ($\Delta\Delta G = -51,7$ кДж/моль) и нативным сульфо-гирудином ($\Delta\Delta G = -29,7$ кДж/моль). Кроме того, высокая антитромботическая активность фосфо-гирудина была подтверждена стандартным для клинической практики измерением тромбинового времени. Таким образом, фосфо-гирудин является наиболее перспективным производным гирудина в качестве ингибитора тромбина для медицинского применения, который даже более эффективен, чем нативный сульфо-гирудин.

Для синтеза пептидов и белков, содержащих фосфорилированные остатки тирозина, применяется множество стратегий [239]. Первая из них - химический твердофазный синтез пептидов, где коммерчески доступны многие строительные блоки фосфо-тирозина [239,249,250]. Несмотря на гибкость и эффективность современного химического пептидного синтеза, по-прежнему сложно синтезировать пептиды длиной более ~50-70 аминокислот. Решением этой проблемы может стать полусинтетический подход, при котором белок собирается из синтетических и рекомбинантных фрагментов [251–254]. Наконец, хотя полноценный синтез фосфо-гирудина в живых клетках является сложной задачей, остатки фосфо-тирозина могут быть введены в полипептид путем расширения генетического кода или перепрограммирования существующих кодонов [255–257]. Расширение генетического кода направлено на стоп- или квадруплетные кодоны, в то время как перепрограммирование предполагает переназначение смысловых кодонов [258,259]. Еще одним возможным подходом является использование бесклеточной платформы синтеза белка, использующей лизис клеток *Escherichia coli* и компоненты ортогональной системы трансляции для встраивания фосфо-тирозина [260,261].

В качестве альтернативы фосфо-протеины могут быть получены с помощью ферментативного фосфорилирования, когда рекомбинантный белок фосфорилируется киназами *in vitro* [262–265]. Выбор подходящей киназы строго определяется наличием консенсусных последовательностей в полипептидных цепях, подлежащих фосфорилированию [266]. Мы протестировали последовательность полипептида гирудина на наличие потенциальных сайтов фосфорилирования киназами с использованием программы Scansite 4.0 [267] (<http://scansite.mit.edu>). Tyr63 гирудина может быть фосфорилирован киназой рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), которая принадлежит к семейству ErbB рецепторных тирозинкиназ [268,269]. Последовательности узнавания данной киназы включают в себя множество кислых остатков, которыми богат С-концевой фрагмент гирудина.

Помимо фосфорилирования Tyr63, мы протестировали несколько других модификаций. Замена Tyr63 на остаток Glu в гирудине не увеличила сродство к тромбину, вероятно, из-за низкой аффинности связывания, которая была почти такой же, как у десульфо-гирудина. В качестве альтернативы можно ввести несколько неприродных аминокислот, чтобы имитировать отрицательный заряд и ароматическую структуру фосфо-тирозина. (Карбоксиметил)фенилаланин является наиболее популярным выбором среди миметиков фосфо-тирозина из-за относительно низкой стоимости его синтеза и эффективной техники его введения [270,271]. Мы протестировали производное гирудина с (карбоксиметил)фенилаланином вместо Tyr63, однако оно показало крайне низкую антитромботическую активность по сравнению с другими производными гирудина. Мутация Gln65Glu привела к более высокой предсказанной свободной энергии связывания, однако это привело к уменьшению антитромботической активности. Замена всех трех остатков лизина на сукциниллизин, по-видимому, является очень перспективной модификацией, обеспечивая высокую аффинность гирудина, но для проверки этого производного гирудина на антитромботическую

активность необходимы дальнейшие исследования. Кроме того, эта модификация выглядит перспективной с точки зрения доступности ее введения в рекомбинантный десульфо-гирудин *in vitro* [244].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Электростатические взаимодействия являются критически важными для правильного функционирования белков, поскольку они контролируют взаимодействие с другими заряженными полимерами. Посттрансляционные модификации, связанные с изменением локального заряда на поверхности белка, способны приводить к изменению пространственной структуры и функции белка, в частности, за счет нарушения белок-белковых взаимодействий. Это может стать причиной для развития многих заболеваний, например, онкологических заболеваний, диабета и нейродегенеративных заболеваний.

Целью нашей работы было изучить взаимодействие белков с заряженными синтетическими и природными полиэлектролитами, а также охарактеризовать влияние посттрансляционных модификаций, приводящих к изменению поверхностного заряда, на это взаимодействие.

Гомополимеры, состоящие из одинаковых повторяющихся заряженных единиц-мономеров, могут рассматриваться как упрощенная модель для изучения электростатических взаимодействий. Использование полиэлектролитов было показано как перспективный метод для предотвращения агрегации различных белков. Эффективность подавления агрегации была проверена для нескольких модельных белков при различных значениях pH, которые были выше и ниже изоэлектрических точек белков. Согласно предложенной модели, защитный эффект определяется размером и количеством заряженных полиэлектролитных петель и хвостов полиэлектролита вокруг поверхности белка. Наиболее эффективная защита может быть достигнута, когда взаимодействие белка с полиэлектролитом ограничено небольшим количеством противоположно заряженных групп на поверхности белка, и только часть цепи полиэлектролита взаимодействует с белком. В противоположность этому, слишком активное связывание между

полиэлектролитом и противоположно заряженным белком может привести к образованию больших комплексов и агрегации.

Молекулярное моделирование взаимодействия модельного белка с полиэлектролитами позволило уточнить модель и объяснить экспериментальные данные. Было показано, что связывание осуществляется путем образования ионных пар и водородных связей. Кроме того, увеличение степени полимеризации полиэлектролита приводит к увеличению количества несвязанных с белком мономеров полимера, образующих заряженную оболочку вокруг поверхности белка. При этом увеличивался и общий заряд комплекса, что было отдельно подтверждено экспериментальным измерением дзета-потенциала комплексов.

Мы исследовали влияние гликирования β -казеина на взаимодействие с природными и синтетическими полиэлектролитами. Было показано, что независимо от гликирования β -казеин эффективно взаимодействует с поликатионом, поли(N-этил-4-винилпиридиний) бромидом, образуя крупные осаждающиеся агрегаты. Эффективное взаимодействие наблюдалось также для одного из относительно гидрофобных полианионов, поли(стиролсульфоната), хотя связывание несколько снижалось при более высокой ионной силе. Взаимодействие с другими полианионами, включая гидрофильный сульфатированный полимер, гепарин, а также полифосфатные и поликарбоксилатные анионы было гораздо менее выраженным. Согласно данным динамического рассеяния света, седиментационного анализа, изотермической титрационной калориметрии и флуоресцентной спектроскопии, связывание β -казеина с полианионами определяется балансом гидрофобных и электростатических взаимодействий полианиона и положительно заряженных аминокислот, расположенных в гидрофобной области β -казеина.

Гликирование привело к дополнительному разрыхлению β -казеина. Связывание с поли(стиролсульфонатом) приводило к образованию более

компактных, но растворимых комплексов. Гликирование вызывало снижение эффективности взаимодействия β -казеина с другими полианионами, особенно с модельной нуклеиновой кислотой. Эти результаты полезны для химии молочных продуктов, в частности для использования анионных полимеров (синтетических или природных) в качестве добавок в молочные продукты с целью стабилизации белков молока в растворимом или мицеллярном состоянии и предотвращении их агрегации.

Важным классом природных заряженных полимеров являются нуклеиновые кислоты и внутренне неупорядоченные белки, которые характеризуются повышенным количеством заряженных аминокислот. Последние играют важную роль во многих физиологических процессах, в частности α -синуклеин при развитии нейродегенеративных заболеваний и гирудин в коагуляционном каскаде.

Нативная форма ГАФД взаимодействует с С-концевой областью α -синуклеина, обогащенной кислотными остатками, и отрицательно заряженной молекулой РНК через анион-связывающую канавку. Гликирование ГАФД приводит к подавлению связывания обоих полианионов, хотя влияние гликирования на взаимодействие ГАФД с α -синуклеином и РНК было различным. В случае молекулы РНК, обладающей высокой плотностью отрицательного заряда, наблюдался альтернативный сайт связывания, состоящий из небольшой положительно заряженной области на поверхности субъединицы. Равномерно распределенное гликирование приводило к полному ингибированию взаимодействия ГАФД-РНК. Более сложная картина наблюдалась для α -синуклеина. Взаимодействие между α -синуклеином и равномерно гликированной формой ГАФД было более выраженным, чем при менее интенсивном гликировании только анион-связывающей бороздки ГАФД. Замена остатков лизина на отрицательно заряженный СМЛ может стимулировать образование новых связей между положительно заряженными остатками α -синуклеина и СМЛ. Поскольку ГАФД и α -синуклеин, по-

видимому, вовлечены в развитие и прогрессирование нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, результаты о влиянии гликирования на взаимодействие этих белков актуальны для выяснения механизма прогрессирования нейродегенеративных заболеваний при диабете, особенно в свете данных о том, что сахарный диабет 2 типа может быть связан с болезнью Паркинсона.

Полипептид гирудин является природным антикоагулянтом, на основе которого было одобрено несколько лекарственных препаратов для лечения тромботических заболеваний. Дополнительные посттрансляционные модификации гирудина могут улучшить его связывание с тромбином и антитромботическую активность. Среди всех протестированных производных гирудина фосфорилированный гирудин обладает наибольшей аффинностью к тромбину и показал наилучшую способность ингибировать тромбин *in vitro*. Нацеленное на медицинское применение в качестве антикоагуляционного агента, это производное может снизить дозу по сравнению с рекомбинантным гирудином и даже нативным сульфогирудином, и, следовательно, уменьшить риск побочных эффектов.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Снижение уровня агрегации лизоцима и α -лактальбумина наблюдалось при добавлении одноименно заряженного полиэлектролита, тогда как агрегацию ГАФД удалось подавить как поликатионом, так и полианионом.

2. Согласно предложенной модели, эффективность полиэлектролита подавлять агрегацию возрастает с увеличением одноименного заряда на поверхности белка и длины цепи полиэлектролита, за счет образования длинных хвостов и петель с нескомпенсированным зарядом и увеличения заряда комплексов.

3. Взаимодействие белков с полиэлектролитами зависит от заряда и гидрофобности последнего. Отрицательно заряженный β -казеин эффективно взаимодействует с поликатионом, образуя агрегированные комплексы, и относительно гидрофобным сульфатированным полианионом поли(стиролсульфонат). Взаимодействие с более гидрофильными полианионами, в том числе с гидрофильным сульфатированным гепарином, а также полифосфатными и поликарбоксилатными полианионами, было гораздо менее выражено.

4. Гликирование снижает эффективность взаимодействия β -казеина с другими полианионами, особенно с модельной нуклеиновой кислотой полицитидилатом калия.

5. Гликирование ГАФД затрудняет ее взаимодействие с α -синуклеином, при этом ключевую роль играет гликирование остатков, расположенных в положительно заряженной бороздке ГАФД, тогда как эффект более интенсивного равномерного гликирования менее выражен.

6. Гликирование ГАФД по положительно заряженной бороздке частично подавляет ее взаимодействие с РНК, тогда как при интенсивном равномерном гликировании РНК не взаимодействует с ГАФД совсем.

7. Фосфорилирование десульфо-гирудина улучшает его связывание с тромбином и антитромботическую активность по сравнению с природным сульфатированием.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю, ведущему научному сотруднику отдела биохимии животной клетки, Семенюку Павлу Игоревичу за руководство, поддержку и вдохновение в процессе выполнения работы.

Автор также выражает благодарность всему коллективу отдела биохимии животной клетки, в особенности руководителю отдела В.И. Муронцу, Д.В. Поздышеву, К.В. Бариновой, Ю.Ю. Стройловой за помощь в выполнении диссертационной работы и ценные советы.

Автор выражает благодарность А.М. Арутюняну, П.В. Калмыкову, Н.Н. Магретовой, В.Н. Мичуриной и Д.Б. Евстафьевой за помощь в методических аспектах работы и консультации по обработке полученных данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] A.L. Lehninger, D.L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, W.H. Freeman, New York, 2005.
- [2] J. Yang, Y. Zeng, Y. Liu, M. Gao, S. Liu, Z. Su, Y. Huang, Electrostatic interactions in molecular recognition of intrinsically disordered proteins, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **38** (2020) 4883–4894. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1692073>.
- [3] Y. Peng, E. Alexov, Computational investigation of proton transfer, pKa shifts and pH-optimum of protein-DNA and protein-RNA complexes, *Proteins*. **85** (2017) 282–295. <https://doi.org/10.1002/prot.25221>.
- [4] J. Jiménez, S. Bru, M.P.C. Ribeiro, J. Clotet, Polyphosphate: popping up from oblivion, *Curr. Genet.* **63** (2017) 15–18. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0611-5>.
- [5] K. Achazi, R. Haag, M. Ballauff, J. Darnedde, J.N. Kizhakkedathu, D. Maysinger, G. Multhaupt, Understanding the Interaction of Polyelectrolyte Architectures with Proteins and Biosystems, *Angew. Chem. Int. Ed.* **60** (2021) 3882–3904. <https://doi.org/10.1002/anie.202006457>.
- [6] Y. Xu, M. Mazzawi, K. Chen, L. Sun, P.L. Dubin, Protein Purification by Polyelectrolyte Coacervation: Influence of Protein Charge Anisotropy on Selectivity, *Biomacromolecules*. **12** (2011) 1512–1522. <https://doi.org/10.1021/bm101465y>.
- [7] P.I. Semenyuk, V.I. Muronetz, T. Haertlé, V.A. Izumrudov, Effect of poly(phosphate) anions on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase structure and thermal aggregation: comparison with influence of poly(sulfoanions), *Biochim. Biophys. Acta*. **1830** (2013) 4800–4805. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.024>.

- [8] C.L. Cooper, A. Goulding, A.B. Kayitmazer, S. Ulrich, S. Stoll, S. Turksen, S. Yusa, A. Kumar, P.L. Dubin, Effects of polyelectrolyte chain stiffness, charge mobility, and charge sequences on binding to proteins and micelles, *Biomacromolecules*. 7 (2006) 1025–1035. <https://doi.org/10.1021/bm050592j>.
- [9] Y. Xu, D. Seeman, Y. Yan, L. Sun, J. Post, P.L. Dubin, Effect of heparin on protein aggregation: inhibition versus promotion, *Biomacromolecules*. 13 (2012) 1642–1651. <https://doi.org/10.1021/bm3003539>.
- [10] E. Sedlák, D. Fedunová, V. Veselá, D. Sedláková, M. Antalík, Polyanion hydrophobicity and protein basicity affect protein stability in protein-polyanion complexes, *Biomacromolecules*. 10 (2009) 2533–2538. <https://doi.org/10.1021/bm900480t>.
- [11] I.N. Shalova, I.N. Naletova, L. Saso, V.I. Muronetz, V.A. Izumrudov, Interaction of polyelectrolytes with proteins, 3. Influence of complexing polycations on the thermoaggregation of oligomeric enzymes, *Macromol. Biosci*. 7 (2007) 929–939. <https://doi.org/10.1002/mabi.200700052>.
- [12] S.V. Stogov, V.A. Izumrudov, V.I. Muronetz, Structural changes of a protein bound to a polyelectrolyte depend on the hydrophobicity and polymerization degree of the polyelectrolyte, *Biochem. Mosc*. 75 (2010) 437–442.
- [13] C. Azevedo, T. Livermore, A. Saiardi, Protein polyphosphorylation of lysine residues by inorganic polyphosphate, *Mol. Cell*. 58 (2015) 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.010>.
- [14] K.L. Moore, The Biology and Enzymology of Protein Tyrosine O-Sulfation, *J. Biol. Chem*. 278 (2003) 24243–24246. <https://doi.org/10.1074/jbc.R300008200>.
- [15] I. Sadowska-Bartos, G. Bartosz, Effect of glycation inhibitors on aging and age-related diseases, *Mech. Ageing Dev*. 160 (2016) 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.09.006>.

- [16] P.J. Beisswenger, S.K. Howell, K. Smith, B.S. Szwegold, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity as an independent modifier of methylglyoxal levels in diabetes, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1637 (2003) 98–106. [https://doi.org/10.1016/S09254439\(02\)00219-3](https://doi.org/10.1016/S09254439(02)00219-3).
- [17] H.J. Lee, S.K. Howell, R.J. Sanford, P.J. Beisswenger, Methylglyoxal Can Modify GAPDH Activity and Structure, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043 (2005) 135–145. <https://doi.org/10.1196/annals.1333.017>.
- [18] V. Muronetz, K. Barinova, E. Schmalhausen, Glycation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the presence of glucose and glyceraldehyde-3-phosphate, *J. Int. Soc. Antioxid.* 3 (2016) 1–4.
- [19] V.I. Muronetz, A.K. Melnikova, Z.N. Seferbekova, K.V. Barinova, E.V. Schmalhausen, Glycation, Glycolysis, and Neurodegenerative Diseases: Is There Any Connection?, *Biochem. Biokhimiia.* 82 (2017) 874–886. <https://doi.org/10.1134/S0006297917080028>.
- [20] G.L. Hortin, Sulfation of tyrosine residues in coagulation factor V, *Blood.* 76 (1990) 946–952.
- [21] C. Junren, X. Xiaofang, Z. Huiqiong, L. Gangmin, Y. Yanpeng, C. Xiaoyu, G. Yuqing, L. Yanan, Z. Yue, P. Fu, P. Cheng, Pharmacological Activities and Mechanisms of Hirudin and Its Derivatives - A Review, *Front. Pharmacol.* 12 (2021) 660757. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.660757>.
- [22] K.-M. B, Hirudin for prophylaxis and treatment of deep vein thrombosis, *Semin. Thromb. Hemost.* 28 (2002). <https://doi.org/10.1055/s-2002-35286>.
- [23] N. Lubenow, A. Greinacher, Hirudin in heparin-induced thrombocytopenia, *Semin. Thromb. Hemost.* 28 (2002). <https://doi.org/10.1055/s-2002-35283>.

- [24] L.P. Kozlowski, Proteome-pI: proteome isoelectric point database, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) D1112–D1116. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw978>.
- [25] V.I. Muronetz, A.K. Melnikova, L. Saso, E.V. Schmalhausen, Influence of Oxidative Stress on Catalytic and Non-glycolytic Functions of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Curr. Med. Chem.* 25 (2018). <https://doi.org/10.2174/0929867325666180530101057>.
- [26] N. Korolev, O.V. Vorontsova, L. Nordenskiöld, Physicochemical analysis of electrostatic foundation for DNA-protein interactions in chromatin transformations, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 95 (2007) 23–49. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.11.003>.
- [27] D. Guhathakurta, D.E. Draper, Contributions of basic residues to ribosomal protein L11 recognition of RNA, *J. Mol. Biol.* 295 (2000) 569–580. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3372>.
- [28] E. Seyrek, P. Dubin, Glycosaminoglycans as polyelectrolytes, *Adv. Colloid Interface Sci.* 158 (2010) 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.03.001>.
- [29] L. Van Haver, S. Nayar, Polyelectrolyte flocculants in harvesting microalgal biomass for food and feed applications, *Algal Res.* 24 (2017) 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.022>.
- [30] L.-A. Tziveleka, N. Pippa, P. Georgantea, E. Ioannou, C. Demetzos, V. Roussis, Marine sulfated polysaccharides as versatile polyelectrolytes for the development of drug delivery nanoplatfroms: Complexation of ulvan with lysozyme, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.050>.
- [31] P. Semenyuk, V. Muronetz, Protein Interaction with Charged Macromolecules: From Model Polymers to Unfolded Proteins and Post-

Translational Modifications, Int. J. Mol. Sci. 20 (2019) 1252.
<https://doi.org/10.3390/ijms20051252>.

[32] A.L. Becker, K. Henzler, N. Welsch, M. Ballauff, O. Borisov, Proteins and polyelectrolytes: A charged relationship, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 17 (2012) 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.10.001>.

[33] M.B. Dainiak, V.A. Izumrudov, V.I. Muronetz, I.Yu. Galaev, B. Mattiasson, Reactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase using conjugates of monoclonal antibodies with polyelectrolyte complexes. An attempt to make an artificial chaperone, J. Mol. Recognit. 11 (1998) 25–27. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1352\(199812\)11:1/6<25::AID-JMR384>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(199812)11:1/6<25::AID-JMR384>3.0.CO;2-T).

[34] M. Kudou, K. Shiraki, S. Fujiwara, T. Imanaka, M. Takagi, Prevention of thermal inactivation and aggregation of lysozyme by polyamines, Eur. J. Biochem. 270 (2003) 4547–4554.

[35] P.I. Semenyuk, E.V. Moiseeva, Y.Yu. Stroylova, M. Lotti, V.A. Izumrudov, V.I. Muronetz, Sulfated and sulfonated polymers are able to solubilize efficiently the protein aggregates of different nature, Arch. Biochem. Biophys. 567 (2015) 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.021>.

[36] L.P. Lichko, T.V. Kulakovskaya, I.S. Kulaev, Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in different cell compartments of *Saccharomyces cerevisiae*, Biochem. Biokhimiia. 71 (2006) 1171–1175. <https://doi.org/10.1134/s0006297906110010>.

[37] A.M. Nesterenko, E.E. Orlov, G.V. Ermakova, I.A. Ivanov, P.I. Semenyuk, V.N. Orlov, N.Y. Martynova, A.G. Zarausky, Affinity of the heparin binding motif of Noggin1 to heparan sulfate and its visualization in the embryonic tissues, Biochem. Biophys. Res. Commun. 468 (2015) 331–336. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.100>.

[38] K. Chung, J. Kim, B.-K. Cho, B.-J. Ko, B.-Y. Hwang, B.-G. Kim, How does dextran sulfate prevent heat induced aggregation of protein? The mechanism and its limitation as aggregation inhibitor, *Biochim. Biophys. Acta.* 1774 (2007) 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.11.015>.

[39] M.J. Gray, W.-Y. Wholey, N.O. Wagner, C.M. Cremers, A. Mueller-Schickert, N.T. Hock, A.G. Krieger, E.M. Smith, R.A. Bender, J.C.A. Bardwell, U. Jakob, Polyphosphate is a primordial chaperone, *Mol. Cell.* 53 (2014) 689–699. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.012>.

[40] K.A. Markossian, H.A. Khanova, S.Y. Kleimenov, D.I. Levitsky, N.A. Chebotareva, R.A. Asryants, V.I. Muronetz, L. Saso, I.K. Yudin, B.I. Kurganov, Mechanism of thermal aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Biochemistry.* 45 (2006) 13375–13384. <https://doi.org/10.1021/bi0610707>.

[41] C. Yigit, J. Heyda, M. Ballauff, J. Dzubiella, Like-charged protein-polyelectrolyte complexation driven by charge patches, *J. Chem. Phys.* 143 (2015) 064905. <https://doi.org/10.1063/1.4928078>.

[42] P.E. Wright, H.J. Dyson, Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16 (2015) 18–29. <https://doi.org/10.1038/nrm3920>.

[43] A.K. Dunker, J.D. Lawson, C.J. Brown, R.M. Williams, P. Romero, J.S. Oh, C.J. Oldfield, A.M. Campen, C.M. Ratliff, K.W. Hipps, J. Ausio, M.S. Nissen, R. Reeves, C. Kang, C.R. Kissinger, R.W. Bailey, M.D. Griswold, W. Chiu, E.C. Garner, Z. Obradovic, Intrinsically disordered protein, *J. Mol. Graph. Model.* 19 (2001) 26–59.

[44] A.K. Dunker, E. Garner, S. Guilliot, P. Romero, K. Albrecht, J. Hart, Z. Obradovic, C. Kissinger, J.E. Villafranca, Protein disorder and the evolution of

molecular recognition: theory, predictions and observations, *Pac. Symp. Biocomput.* Pac. Symp. Biocomput. (1998) 473–484.

[45] P.E. Wright, H.J. Dyson, Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm, *J. Mol. Biol.* 293 (1999) 321–331. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3110>.

[46] V.N. Uversky, Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics, *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 11 (2002) 739–756. <https://doi.org/10.1110/ps.4210102>.

[47] P. Tompa, Intrinsically unstructured proteins, *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 527–533.

[48] V.N. Uversky, Biophysical Methods to Investigate Intrinsically Disordered Proteins: Avoiding an “Elephant and Blind Men” Situation, in: I.C. Felli, R. Pierattelli (Eds.), *Intrinsically Disord. Proteins Stud. NMR Spectrosc.*, Springer International Publishing, Cham, 2015: pp. 215–260. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20164-1_7.

[49] V.N. Uversky, A.K. Dunker, *Intrinsically Disordered Protein Analysis*, Springer New York, New York, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3704-8>.

[50] Swaisgood, H.E., Chemistry of the caseins, in: *Adv. Dairy Chem.*, 3rd ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, United States, 2003: pp. 139–231.

[51] H.M. Farrell, R. Jimenez-Flores, G.T. Bleck, E.M. Brown, J.E. Butler, L.K. Creamer, C.L. Hicks, C.M. Hollar, K.F. Ng-Kwai-Hang, H.E. Swaisgood, Nomenclature of the proteins of cows’ milk—sixth revision, *J. Dairy Sci.* 87 (2004) 1641–1674.

[52] C. Holt, The size distribution of bovine casein micelles: A review, *Food Struct.* 4 (1985) 2.

- [53] D.G. Dalgleish, On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements, *Soft Matter*. 7 (2011) 2265–2272. <https://doi.org/10.1039/C0SM00806K>.
- [54] M. Rijnkels, P.M. Kooiman, H.A. De Boer, F.R. Pieper, Organization of the bovine casein gene locus, *Mamm. Genome*. 8 (1997) 148–152.
- [55] H.M. Farrell, E.D. Wickham, J.J. Unruh, P.X. Qi, P.D. Hoagland, Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of β -casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization, *Food Hydrocoll*. 15 (2001) 341–354.
- [56] A. Ptiček Siročić, Characterization of Casein Fractions – Comparison of Commercial Casein and Casein Extracted from Cow's Milk, *Chem. Biochem. Eng. Q. J.* 30 (2017) 501–509. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2015.2311>.
- [57] H.M. Farrell Jr, T.F. Kumosinski, E.L. Malin, E.M. Brown, The caseins of milk as calcium-binding proteins, *Biochemistry*. 23 (1988) 5912–5923.
- [58] B. Meyer, D. Al-Diab, G. Vollmer, M. Pischetsrieder, Mapping the glycoxidation product N ϵ -carboxymethyllysine in the milk proteome, *Proteomics*. 11 (2011) 420–428. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000233>.
- [59] C.D. Calvano, A. Monopoli, P. Loizzo, M. Faccia, C. Zambonin, Proteomic approach based on MALDI-TOF MS to detect powdered milk in fresh cow's milk, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 1609–1617. <https://doi.org/10.1021/jf302999s>.
- [60] M. Darewicz, J. Dziuba, H. Mioduszevska, Some physico-chemical properties and structural changes of bovine beta-casein upon glycation, *Nahr*. 42 (1998) 213–214.

- [61] S. Jindal, A. Naeem, Consequential secondary structure alterations and aggregation during prolonged casein glycation, *J. Fluoresc.* 23 (2013) 367–374. <https://doi.org/10.1007/s10895-013-1162-5>.
- [62] R. Yousefi, L. Ferdowsi, Z. Tavaf, T. Sadeghian, A.M. Tamaddon, M. Moghtaderi, Z. Pourpak, Evaluation of Structure, Chaperone-Like Activity and Allergenicity of Reduced Glycated Adduct of Bovine β -casein, *Protein Pept. Lett.* 24 (2017) 46–55. <https://doi.org/10.2174/0929866524666161121144025>.
- [63] M. Darewicz, J. Dziuba, The effect of glycosylation on emulsifying and structural properties of bovine b-casein, *Nahrung/Food.* (2001).
- [64] J.L. Courthaudon, B. Colas, D. Lorient, Covalent binding of glycosyl residues to bovine casein: effects on solubility and viscosity, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 32–36.
- [65] M. Darewicz, J. Dziuba and, H. Mioduszevska, Some physico-chemical properties and structural changes of bovine b-casein upon glycation, *Nahrung.* (1998).
- [66] G. Bu, Y. Luo, F. Chen, K. Liu, T. Zhu, Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review, *Dairy Sci. Technol.* 93 (2013) 211–223. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0113-x>.
- [67] C.G. de Kruif, R. Tuinier, Polysaccharide protein interactions, *Food Hydrocoll.* 15 (2001) 555–563. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00076-5).
- [68] L. Van Haver, S. Nayar, Polyelectrolyte flocculants in harvesting microalgal biomass for food and feed applications, *Algal Res.* 24 (2017) 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.022>.
- [69] T.V. Burova, N.V. Grinberg, V.Ya. Grinberg, A.I. Usov, V.B. Tolstoguzov, C.G. de Kruif, Conformational Changes in ι - and κ -Carrageenans

Induced by Complex Formation with Bovine β -Casein, *Biomacromolecules*. 8 (2007) 368–375. <https://doi.org/10.1021/bm060761f>.

[70] P.I. Semenyuk, L.P. Kurochkina, N.B. Gusev, V.A. Izumrudov, V.I. Muronetz, Chaperone-like activity of synthetic polyanions can be higher than the activity of natural chaperones at elevated temperature, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 489 (2017) 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.128>.

[71] J. Burré, M. Sharma, T.C. Südhof, *Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein*, Cold Spring Harb. Perspect. Med. 8 (2018) a024091. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024091>.

[72] L. Maroteaux, J.T. Campanelli, R.H. Scheller, Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 8 (1988) 2804–2815.

[73] M.X. Henderson, J.Q. Trojanowski, V.M.-Y. Lee, α -Synuclein Pathology in Parkinson's Disease and Related α -Synucleinopathies, *Neurosci. Lett.* 709 (2019) 134316. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134316>.

[74] M.G. Spillantini, M.L. Schmidt, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, R. Jakes, M. Goedert, α -Synuclein in Lewy bodies, *Nature*. 388 (1997) 839–840. <https://doi.org/10.1038/42166>.

[75] A.L. Woerman, J.C. Watts, A. Aoyagi, K. Giles, L.T. Middleton, S.B. Prusiner, α -Synuclein: Multiple System Atrophy Prions, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8 (2018) a024588. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024588>.

[76] S. Arawaka, Y. Saito, S. Murayama, H. Mori, Lewy body in neurodegeneration with brain iron accumulation type 1 is immunoreactive for α -synuclein, *Neurology*. 51 (1998) 887–889. <https://doi.org/10.1212/wnl.51.3.887>.

[77] J.M. George, H. Jin, W.S. Woods, D.F. Clayton, Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch, *Neuron*. 15 (1995) 361–372. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90040-3).

[78] B.-H. Ahn, H. Rhim, S.Y. Kim, Y.-M. Sung, M.-Y. Lee, J.-Y. Choi, B. Wolozin, J.-S. Chang, Y.H. Lee, T.K. Kwon, K.C. Chung, S.-H. Yoon, S.J. Hahn, M.-S. Kim, Y.-H. Jo, D.S. Min, α -Synuclein interacts with phospholipase D isozymes and inhibits pervanadate-induced phospholipase D activation in human embryonic kidney-293 cells., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 12334–42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110414200>.

[79] O.S. Gorbatyuk, S. Li, F.N. Nguyen, F.P. Manfredsson, G. Kondrikova, L.F. Sullivan, C. Meyers, W. Chen, R.J. Mandel, N. Muzyczka, α -Synuclein Expression in Rat Substantia Nigra Suppresses Phospholipase D2 Toxicity and Nigral Neurodegeneration, *Mol. Ther.* 18 (2010) 1758–1768. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.137>.

[80] M.M. Ouberaï, J. Wang, M.J. Swann, C. Galvagnion, T. Guillems, C.M. Dobson, M.E. Welland, α -Synuclein Senses Lipid Packing Defects and Induces Lateral Expansion of Lipids Leading to Membrane Remodeling, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 20883–20895. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.478297>.

[81] N. Ostrerova, L. Petrucelli, M. Farrer, N. Mehta, P. Choi, J. Hardy, B. Wolozin, α -Synuclein Shares Physical and Functional Homology with 14-3-3 Proteins, *J. Neurosci.* 19 (1999) 5782–5791. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-14-05782.1999>.

[82] T.D. Kim, E. Choi, H. Rhim, S.R. Paik, C.-H. Yang, Alpha-synuclein has structural and functional similarities to small heat shock proteins., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324 (2004) 1352–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.208>.

- [83] A. Rekas, C.G. Adda, J. Andrew Aquilina, K.J. Barnham, M. Sunde, D. Galatis, N.A. Williamson, C.L. Masters, R.F. Anders, C. V Robinson, R. Cappai, J.A. Carver, Interaction of the molecular chaperone α B-crystallin with α -synuclein: effects on amyloid fibril formation and chaperone activity., *J. Mol. Biol.* 340 (2004) 1167–83. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.054>.
- [84] S. Chandra, G. Gallardo, R. Fernández-Chacón, O.M. Schlüter, T.C. Südhof, α -Synuclein cooperates with CSP α in preventing neurodegeneration., *Cell.* 123 (2005) 383–96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.028>.
- [85] R.G. Perez, J.C. Waymire, E. Lin, J.J. Liu, F. Guo, M.J. Zigmond, A Role for α -Synuclein in the Regulation of Dopamine Biosynthesis, *J. Neurosci.* 22 (2002) 3090–3099. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-08-03090.2002>.
- [86] S. Yu, X. Zuo, Y. Li, C. Zhang, M. Zhou, Y.A. Zhang, K. Ueda, P. Chan, Inhibition of tyrosine hydroxylase expression in α -synuclein-transfected dopaminergic neuronal cells., *Neurosci. Lett.* 367 (2004) 34–9. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.05.118>.
- [87] G. Yoo, S. Yeou, J.B. Son, Y.-K. Shin, N.K. Lee, Cooperative inhibition of SNARE-mediated vesicle fusion by α -synuclein monomers and oligomers, *Sci. Rep.* 11 (2021) 10955. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90503-0>.
- [88] K. Ueda, H. Fukushima, E. Masliah, Y.U. Xia, A. Iwai, M. Yoshimoto, D.A.C. Otero, J. Kondo, Y. Ihara, T. Saitoh, Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease (neurodegeneration/chaperone/amyloid P/A4 protein/neuritic plaque), *Proc Natl Acad Sci USA.* 90 (1993) 11282–11286.
- [89] K.-P. Wu, S. Kim, D.A. Fela, J. Baum, Characterization of conformational and dynamic properties of natively unfolded human and mouse α -

synuclein ensembles by NMR: implication for aggregation, *J. Mol. Biol.* 378 (2008) 1104–1115. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.03.017>.

[90] A. Farzadfard, J.N. Pedersen, G. Meisl, A.K. Somavarapu, P. Alam, L. Goksøyr, M.A. Nielsen, A.F. Sander, T.P.J. Knowles, J.S. Pedersen, D.E. Otzen, The C-terminal tail of α -synuclein protects against aggregate replication but is critical for oligomerization, *Commun. Biol.* 5 (2022) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03059-8>.

[91] H. Fujiwara, M. Hasegawa, N. Dohmae, A. Kawashima, E. Masliah, M.S. Goldberg, J. Shen, K. Takio, T. Iwatsubo, α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 160–164. <https://doi.org/10.1038/ncb748>.

[92] A. Oueslati, Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade?, *J. Park. Dis.* 6 (2016) 39–51. <https://doi.org/10.3233/JPD-160779>.

[93] C. Chavarría, J.M. Souza, Oxidation and nitration of α -synuclein and their implications in neurodegenerative diseases, *Arch. Biochem. Biophys.* 533 (2013) 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.02.009>.

[94] E. Guerrero, P. Vasudevaraju, M.L. Hegde, G.B. Britton, K.S. Rao, Recent advances in α -synuclein functions, advanced glycation, and toxicity: implications for Parkinson's disease, *Mol. Neurobiol.* 47 (2013) 525–536. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8328-z>.

[95] J. Kim, Evidence that the precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid (NACP) has an extended structure primarily composed of random-coil., *Mol. Cells.* 7 (1997) 78–83.

[96] B. Fauvet, M.K. Mbefo, M.-B. Fares, C. Desobry, S. Michael, M.T. Ardah, E. Tsika, P. Coune, M. Prudent, N. Lion, D. Eliezer, D.J. Moore, B. Schneider, P. Aebischer, O.M. El-Agnaf, E. Masliah, H.A. Lashuel, α -Synuclein in

central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer., *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 15345–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318949>.

[97] S. Mehra, S. Sahay, S.K. Maji, α -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics.* 1867 (2019) 890–908. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.03.001>.

[98] D. Sulzer, R.H. Edwards, The physiological role of α -synuclein and its relationship to Parkinson's Disease, *J. Neurochem.* 150 (2019) 475–486. <https://doi.org/10.1111/jnc.14810>.

[99] W. Zhou, M.S. Hurlbert, J. Schaack, K.N. Prasad, C.R. Freed, Overexpression of human α -synuclein causes dopamine neuron death in rat primary culture and immortalized mesencephalon-derived cells, *Brain Res.* 866 (2000) 33–43. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02215-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02215-0).

[100] M.H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, R.L. Nussbaum, Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science.* 276 (1997) 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>.

[101] K.A. Conway, J.D. Harper, P.T. Lansbury, Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease, *Nat. Med.* 4 (1998) 1318–1320. <https://doi.org/10.1038/3311>.

[102] J. Li, V.N. Uversky, A.L. Fink, Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein, *Biochemistry.* 40 (2001) 11604–11613. <https://doi.org/10.1021/bi010616g>.

[103] H.L. Roberts, D.R. Brown, Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric α -synuclein, *Biomolecules*. 5 (2015) 282–305. <https://doi.org/10.3390/biom5020282>.

[104] N. Lorenzen, S.B. Nielsen, A.K. Buell, J.D. Kaspersen, P. Arosio, B.S. Vad, W. Paslawski, G. Christiansen, Z. Valnickova-Hansen, M. Andreassen, J.J. Enghild, J.S. Pedersen, C.M. Dobson, T.P.J. Knowles, D.E. Otzen, The Role of Stable α -Synuclein Oligomers in the Molecular Events Underlying Amyloid Formation, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 3859–3868. <https://doi.org/10.1021/ja411577t>.

[105] S.W. Chen, S. Drakulic, E. Deas, M. Oubrai, F.A. Aprile, R. Arranz, S. Ness, C. Roodveldt, T. Guilliams, E.J. De-Genst, D. Klenerman, N.W. Wood, T.P.J. Knowles, C. Alfonso, G. Rivas, A.Y. Abramov, J.M. Valpuesta, C.M. Dobson, N. Cremades, Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during α -synuclein fibril formation., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) E1994-2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421204112>.

[106] P. Desplats, H.-J. Lee, E.-J. Bae, C. Patrick, E. Rockenstein, L. Crews, B. Spencer, E. Masliah, S.-J. Lee, Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α -synuclein, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 13010–13015. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903691106>.

[107] C. Hansen, E. Angot, A.-L. Bergström, J.A. Steiner, L. Pieri, G. Paul, T.F. Outeiro, R. Melki, P. Kallunki, K. Fog, J.-Y. Li, P. Brundin, α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 715–725. <https://doi.org/10.1172/JCI43366>.

[108] G. Suzuki, S. Imura, M. Hosokawa, R. Katsumata, T. Nonaka, S.-I. Hisanaga, Y. Saeki, M. Hasegawa, α -synuclein strains that cause distinct pathologies differentially inhibit proteasome, *ELife*. 9 (2020) e56825. <https://doi.org/10.7554/eLife.56825>.

[109] M.R. White, E.D. Garcin, The sweet side of RNA regulation: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a noncanonical RNA-binding protein, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 7 (2016) 53–70. <https://doi.org/10.1002/wrna.1315>.

[110] P.E. Glaser, R.W. Gross, Rapid plasmenylethanolamine-selective fusion of membrane bilayers catalyzed by an isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: discrimination between glycolytic and fusogenic roles of individual isoforms, *Biochemistry*. 34 (1995) 12193–12203. <https://doi.org/10.1021/bi00038a013>.

[111] M.R. Hara, S.H. Snyder, Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade, *Cell. Mol. Neurobiol.* 26 (2006) 527–538. <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9011-6>.

[112] A.A. Kosova, S.N. Khodyreva, O.I. Lavrik, Role of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) in DNA Repair, *Biochem. Biokhimiia*. 82 (2017) 643–654. <https://doi.org/10.1134/S0006297917060013>.

[113] L. Zheng, R.G. Roeder, Y. Luo, S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component, *Cell*. 114 (2003) 255–266. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00552-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00552-x).

[114] M.A. Sirover, Chapter 2 - Moonlighting GAPDH and the Transcriptional Regulation of Gene Expression: Multiprotein Complex Formation and Mechanisms of Nuclear Translocation, in: M.A. Sirover (Ed.), *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase GAPDH*, Academic Press, 2017: pp. 21–33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809852-3.00002-9>.

[115] D.A. Butterfield, S.S. Hardas, M.L.B. Lange, Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease:

many pathways to neurodegeneration, *J. Alzheimers Dis. JAD.* 20 (2010) 369–393. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1375>.

[116] V.I. Muronetz, K.V. Barinova, Y.Y. Stroylova, P.I. Semenyuk, E.V. Schmalhausen, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Aggregation mechanisms and impact on amyloid neurodegenerative diseases, *Int. J. Biol. Macromol.* 100 (2017) 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.066>.

[117] N.W. Seidler, *GAPDH: Biological Properties and Diversity*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4716-6>.

[118] K.S.F. e Silva, R.M. Lima, L.C. Baeza, P. de S. Lima, T. de M. Cordeiro, S. Charneau, R.A. da Silva, C.M. de A. Soares, M. Pereira, Interactome of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Points to the Existence of Metabolons in *Paracoccidioides lutzii*, *Front. Microbiol.* 10 (2019). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01537>.

[119] E. Kragten, I. Lalande, K. Zimmermann, S. Roggo, P. Schindler, D. Müller, J. Van Oostrum, P. Waldmeier, P. Fürst, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, the putative target of the antiapoptotic compounds CGP 3466 and R-(-)-deprenyl, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5821–5828. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5821>.

[120] N.A. Tatton, Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease, *Exp. Neurol.* 166 (2000) 29–43. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7489>.

[121] K. Tsuchiya, H. Tajima, T. Kuwae, T. Takeshima, T. Nakano, M. Tanaka, K. Sunaga, Y. Fukuhara, K. Nakashima, E. Ohama, H. Mochizuki, Y. Mizuno, N. Katsube, R. Ishitani, Pro-apoptotic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes the formation of Lewy body-like inclusions, *Eur. J. Neurosci.* 21 (2005) 317–326. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03870.x>.

[122] C.L. Ávila, C.M. Torres-Bugeau, L.R.S. Barbosa, E.M. Sales, M.O. Ouidja, S.B. Socías, M.S. Celej, R. Raisman-Vozari, D. Papy-Garcia, R. Itri, R.N. Chehín, Structural Characterization of Heparin-induced Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Protofibrils Preventing α -Synuclein Oligomeric Species Toxicity, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 13838–13850. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.544288>.

[123] K. Barinova, E. Khomyakova, P. Semenyuk, E. Schmalhausen, V. Muronetz, Binding of alpha-synuclein to partially oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induces subsequent inactivation of the enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.* 642 (2018) 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.02.002>.

[124] P. Semenyuk, K. Barinova, V. Muronetz, Glycation of α -synuclein amplifies the binding with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Int. J. Biol. Macromol.* 127 (2019) 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.064>.

[125] E.I. Arutyunova, P.V. Danshina, L.V. Domnina, A.P. Pleten, V.I. Muronetz, Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances its binding to nucleic acids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307 (2003) 547–552. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01222-1](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01222-1).

[126] C. Nicholls, A.R. Pinto, H. Li, L. Li, L. Wang, R. Simpson, J.-P. Liu, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) induces cancer cell senescence by interacting with telomerase RNA component, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 13308–13313. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206672109>.

[127] A.G. Ryazanov, L.I. Ashmarina, V.I. Muronetz, Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with mono- and polyribosomes of rabbit reticulocytes, *Eur. J. Biochem. FEBS.* 171 (1988) 301–305.

[128] E. Nagy, W.F. Rigby, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase selectively binds AU-rich RNA in the NAD(+)-binding region (Rossmann fold), *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 2755–2763. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.6.2755>.

[129] Y. Ikeda, R. Yamaji, K. Irie, N. Kioka, A. Murakami, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates cyclooxygenase-2 expression by targeting mRNA stability, *Arch. Biochem. Biophys.* 528 (2012) 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.09.004>.

[130] Y. Zhou, X. Yi, J.B. Stoffer, N. Bonafe, M. Gilmore-Hebert, J. McAlpine, S.K. Chambers, The Multifunctional Protein Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is Both Regulated and Controls Colony-Stimulating Factor-1 Messenger RNA Stability in Ovarian Cancer, *Mol. Cancer Res.* 6 (2008) 1375–1384. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2170>.

[131] P. Carmona, A. Rodríguez-Casado, M. Molina, Conformational structure and binding mode of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to tRNA studied by Raman and CD spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta.* 1432 (1999) 222–233. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(99\)00113-2](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(99)00113-2).

[132] K. Kramer, T. Sachsenberg, B.M. Beckmann, S. Qamar, K.-L. Boon, M.W. Hentze, O. Kohlbacher, H. Urlaub, Photo-cross-linking and high-resolution mass spectrometry for assignment of RNA-binding sites in RNA-binding proteins, *Nat. Methods.* 11 (2014) 1064–1070. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3092>.

[133] F. Rodríguez-Pascual, M. Redondo-Horcajo, N. Magán-Marchal, D. Lagares, A. Martínez-Ruiz, H. Kleinert, S. Lamas, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Regulates Endothelin-1 Expression by a Novel, Redox-Sensitive Mechanism Involving mRNA Stability, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 7139–7155. <https://doi.org/10.1128/MCB.01145-08>.

[134] R.A.V. Bell, K.B. Storey, 150 Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from a hibernating mammal: Insight into cold-adaptation and structural diversity of a housekeeping enzyme, *Cryobiology.* 67 (2013) 440–441. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.09.156>.

[135] S.T. Bond, K.F. Howlett, G.M. Kowalski, S. Mason, T. Connor, A. Cooper, V. Streltsov, C.R. Bruce, K.R. Walder, S.L. McGee, Lysine post-translational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates hepatic and systemic metabolism, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 31 (2017) 2592–2602. <https://doi.org/10.1096/fj.201601215R>.

[136] S. Mohr, J.S. Stamler, B. Brüne, Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 4209–4214. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.8.4209>.

[137] N. Mackman, Triggers, targets and treatments for thrombosis, *Nature*. 451 (2008) 914–918. <https://doi.org/10.1038/nature06797>.

[138] A.M. Wendelboe, G.E. Raskob, Global Burden of Thrombosis: Epidemiologic Aspects, *Circ. Res.* 118 (2016) 1340–1347. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306841>.

[139] H. Ten Cate, T.M. Hackeng, P. García de Frutos, Coagulation factor and protease pathways in thrombosis and cardiovascular disease, *Thromb. Haemost.* 117 (2017) 1265–1271. <https://doi.org/10.1160/TH17-02-0079>.

[140] E.W. Davie, J.D. Kulman, An overview of the structure and function of thrombin, *Semin. Thromb. Hemost.* 32 Suppl 1 (2006) 3–15. <https://doi.org/10.1055/s-2006-939550>.

[141] Z.-G. Sun, Yang-Liu, J.-M. Zhang, S.-C. Cui, Z.-G. Zhang, H.-L. Zhu, The Research Progress of Direct Thrombin Inhibitors, *Mini-Rev. Med. Chem.* 20 (2020) 1574–1585. <https://doi.org/10.2174/1389557519666191015201125>.

[142] G. Nowak, K. Schrör, Hirudin – the long and stony way from an anticoagulant peptide in the saliva of medicinal leech to a recombinant drug and beyond: A historical piece, *Thromb. Haemost.* 98 (2007) 116–119. <https://doi.org/10.1160/TH07-05-0364>.

[143] F. Markwardt, Hirudin As Alternative Anticoagulant- A Historical Review, *Semin. Thromb. Hemost.* 28 (2002) 405–414. <https://doi.org/10.1055/s-2002-35292>.

[144] I.S. Whitaker, J. Rao, D. Izadi, P.E. Butler, Historical Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history, *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 42 (2004) 133–137. [https://doi.org/10.1016/S0266-4356\(03\)00242-0](https://doi.org/10.1016/S0266-4356(03)00242-0).

[145] A. Electricwala, R. Hartwell, M.D. Scawen, T. Atkinson, The complete amino acid sequence of a hirudin variant from the leech *Hirudinaria manillensis*, *J. Protein Chem.* 12 (1993) 365–370. <https://doi.org/10.1007/BF01028198>.

[146] P.J. Braun, S. Dennis, J. Hofsteenge, S.R. Stone, Use of site-directed mutagenesis to investigate the basis for the specificity of hirudin, *Biochemistry.* 27 (1988) 6517–6522. <https://doi.org/10.1021/bi00417a048>.

[147] G.M. Clore, D.K. Sukumaran, M. Nilges, J. Zarbock, A.M. Gronenborn, The conformations of hirudin in solution: a study using nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics, *EMBO J.* 6 (1987) 529–537.

[148] T. Szyperski, P. Güntert, S.R. Stone, K. Wüthrich, Nuclear magnetic resonance solution structure of hirudin(1–51) and comparison with corresponding three-dimensional structures determined using the complete 65-residue hirudin polypeptide chain, *J. Mol. Biol.* 228 (1992) 1193–1205. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90325-E](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90325-E).

[149] A. Betz, J. Hofsteenge, S.R. Stone, Interaction of the N-terminal region of hirudin with the active-site cleft of thrombin, *Biochemistry.* 31 (1992) 4557–4562. <https://doi.org/10.1021/bi00134a004>.

[150] T. Myles, B.F. Le Bonniec, A. Betz, S.R. Stone, Electrostatic Steering and Ionic Tethering in the Formation of Thrombin–Hirudin Complexes: The Role

of the Thrombin Anion-Binding Exosite-I, *Biochemistry*. 40 (2001) 4972–4979. <https://doi.org/10.1021/bi0023549>.

[151] S.R. Stone, S. Dennis, J. Hofsteenge, Quantitative evaluation of the contribution of ionic interactions to the formation of the thrombin-hirudin complex, *Biochemistry*. 28 (1989) 6857–6863. <https://doi.org/10.1021/bi00443a012>.

[152] C.C. Liu, E. Brustad, W. Liu, P.G. Schultz, Crystal Structure of a Biosynthetic Sulfo-hirudin Complexed to Thrombin, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 10648–10649. <https://doi.org/10.1021/ja0735002>.

[153] T. Skern, R. Bischoff, S. Jallat, K. Dott, D. Ali-Hadji, D. Clesse, M.P. Kieny, M. Courtney, Sulphation of hirudin in BHK cells, *FEBS Lett.* 275 (1990) 36–38. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81433-O](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81433-O).

[154] C.C. Liu, P.G. Schultz, Recombinant expression of selectively sulfated proteins in *Escherichia coli*, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 1436–1440. <https://doi.org/10.1038/nbt1254>.

[155] Y.S.Y. Hsieh, L.C. Wijeyewickrema, B.L. Wilkinson, R.N. Pike, R.J. Payne, Total Synthesis of Homogeneous Variants of Hirudin P6: A Post-Translationally Modified Anti-Thrombotic Leech-Derived Protein, *Angew. Chem.* 126 (2014) 4028–4032. <https://doi.org/10.1002/ange.201310777>.

[156] C. Niehrs, W.B. Huttner, D. Carvallo, E. Degryse, Conversion of recombinant hirudin to the natural form by in vitro tyrosine sulfation. Differential substrate specificities of leech and bovine tyrosylprotein sulfotransferases, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 9314–9318.

[157] Q. Bi, J. Zhang, Y. Huang, H. Su, X. Zhou, S. Zhu, Construction, expression, and characterization of recombinant hirudin in *Escherichia coli*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 95 (2001) 23–30. <https://doi.org/10.1385/abab:95:1:23>.

[158] H.Y. Chen, X.H. Qi, X. Geng, Q.G. Xu, J. Wang, Z.R. Wu, Expression, Purification and Characterization of the Recombinant Hirudin Variant iii in the *Bacillus Subtilis*, *Adv. Mater. Res.* 343–344 (2012) 753–763. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.343-344.753>.

[159] B. Gasser, R. Prielhofer, H. Marx, M. Maurer, J. Nocon, M. Steiger, V. Puxbaum, M. Sauer, D. Mattanovich, *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research, *Future Microbiol.* 8 (2013) 191–208. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.133>.

[160] E.S. Choi, J.H. Sohn, S.K. Rhee, Optimization of the expression system using galactose-inducible promoter for the production of anticoagulant hirudin in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42 (1994) 587–594. <https://doi.org/10.1007/BF00173925>.

[161] L. Benatti, E. Scacheri, D.H. Bishop, P. Sarmientos, Secretion of biologically active leech hirudin from baculovirus-infected insect cells, *Gene*. 101 (1991) 255–260. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90420-g](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90420-g).

[162] D.A. Wüstenhagen, P. Lukas, C. Müller, S.A. Aubele, J.-P. Hildebrandt, S. Kubick, Cell-free synthesis of the hirudin variant 1 of the blood-sucking leech *Hirudo medicinalis*, *Sci. Rep.* 10 (2020) 19818. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76715-w>.

[163] S.R. Stone, J. Hofsteenge, Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin, *Biochemistry*. 25 (1986) 4622–4628. <https://doi.org/10.1021/bi00364a025>.

[164] J.C. Adkins, M.I. Wilde, Lepirudin: a review of its potential place in the management of thrombotic disorders, *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* 10 (1998) 227–255. <https://doi.org/10.2165/00063030-199810030-00006>.

[165] T.J. Graetz, B.R. Teller, J.R. Smith, M.S. Avidan, Desirudin: a review of the pharmacology and clinical application for the prevention of deep vein

thrombosis, *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 9 (2011) 1101–1109.
<https://doi.org/10.1586/erc.11.131>.

[166] H.-H. Han, H.-T. Zhang, R. Wang, Y. Yan, X. Liu, Y. Wang, Y. Zhu, J.-C. Wang, Improving long circulation and procoagulant platelet targeting by engineering of hirudin prodrug, *Int. J. Pharm.* 589 (2020) 119869.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119869>.

[167] X. Xu, X. Huang, Y. Zhang, S. Shen, Z. Feng, H. Dong, C. Zhang, R. Mo, Self-regulated hirudin delivery for anticoagulant therapy, *Sci. Adv.* 6 (2020) eabc0382. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc0382>.

[168] S.-C. Wang, X.-D. Wang, X.-N. Teng, Z.-L. Xiu, Chemical modification of recombinant hirudin with palmitic acid in mixed aqueous-organic solutions, *Process Biochem.* 77 (2019) 85–92.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.11.022>.

[169] Y. Li, Y. Huang, B. Zhao, M. Wu, T. Li, Y. Zhang, D. Chen, M. Yu, W. Mo, RGD-hirudin-based low molecular weight peptide prevents blood coagulation via subcutaneous injection, *Acta Pharmacol. Sin.* 41 (2020) 753–762.
<https://doi.org/10.1038/s41401-019-0347-0>.

[170] V. De Filippis, G. Colombo, I. Russo, B. Spadari, A. Fontana, Probing the Hirudin–Thrombin Interaction by Incorporation of Noncoded Amino Acids and Molecular Dynamics Simulation, *Biochemistry.* 41 (2002) 13556–13569.
<https://doi.org/10.1021/bi0203482>.

[171] C. Thurieau, J.-L. Faucheret, New N"-Guanidinobenzoyl Derivatives of Hirudin-54-65 Containing Stabilized Carboxyl or Phosphoryl Groups on the Side Chain of Phenylalanine-63, (n.d.) 5.

[172] J. Eichler, Protein glycosylation, *Curr. Biol. CB.* 29 (2019) R229–R231. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.01.003>.

- [173] A. Simm, Protein glycation during aging and in cardiovascular disease, *J. Proteomics*. 92 (2013) 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.012>.
- [174] J.-L. Wautier, Protein Glycation: A Firm Link to Endothelial Cell Dysfunction, *Circ. Res.* 95 (2004) 233–238. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000137876.28454.64>.
- [175] R. Singh, A. Barden, T. Mori, L. Beilin, Advanced glycation end-products: a review, *Diabetologia*. 44 (2001) 129–146.
- [176] P.J. Thornalley, A. Langborg, H.S. Minhas, Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose, *Biochem. J.* 344 (1999) 109–116.
- [177] E. Maciel, R. Faria, D. Santinha, M.R.M. Domingues, P. Domingues, Evaluation of oxidation and glyco-oxidation of 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-phosphatidylserine by LC-MS/MS, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 929 (2013) 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.04.009>.
- [178] V. Breyer, M. Frischmann, C. Bidmon, A. Schemm, K. Schiebel, M. Pischetsrieder, Analysis and biological relevance of advanced glycation end-products of DNA in eukaryotic cells, *FEBS J.* 275 (2008) 914–925. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06255.x>.
- [179] N. Rabbani, P.J. Thornalley, Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome, *Amino Acids*. 42 (2012) 1133–1142. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0783-0>.
- [180] M. Lima, C. Moloney, J.M. Ames, Ultra performance liquid chromatography-mass spectrometric determination of the site specificity of modification of β -casein by glucose and methylglyoxal, *Amino Acids*. 36 (2009) 475–481. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0105-y>.

- [181] P.J. Thornalley, Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043 (2005) 111–117. <https://doi.org/10.1196/annals.1333.014>.
- [182] S. Hu, W. He, Z. Liu, H. Xu, G. Ma, The accumulation of the glycoxidation product N(ε)-carboxymethyllysine in cardiac tissues with age, diabetes mellitus and coronary heart disease, *Tohoku J. Exp. Med.* 230 (2013) 25–32. <https://doi.org/10.1620/tjem.230.25>.
- [183] S.S. Sivan, E. Tsitron, E. Wachtel, P. Roughley, N. Sakkee, F. van der Ham, J. Degroot, A. Maroudas, Age-related accumulation of pentosidine in aggrecan and collagen from normal and degenerate human intervertebral discs, *Biochem. J.* 399 (2006) 29–35. <https://doi.org/10.1042/BJ20060579>.
- [184] A. Goldin, Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury, *Circulation.* 114 (2006) 597–605. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854>.
- [185] S.J. Humphrey, D.E. James, M. Mann, Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation, *Trends Endocrinol. Metab. TEM.* 26 (2015) 676–687. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.09.013>.
- [186] L.N. Johnson, The regulation of protein phosphorylation, *Biochem. Soc. Trans.* 37 (2009) 627–641. <https://doi.org/10.1042/BST0370627>.
- [187] H. Nishi, A. Shaytan, A.R. Panchenko, Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation, *Front. Genet.* 5 (2014) 270. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00270>.
- [188] N. Watanabe, H. Osada, Phosphorylation-dependent protein-protein interaction modules as potential molecular targets for cancer therapy, *Curr. Drug Targets.* 13 (2012) 1654–1658. <https://doi.org/10.2174/138945012803530035>.

[189] V. Singh, M. Ram, R. Kumar, R. Prasad, B.K. Roy, K.K. Singh, Phosphorylation: Implications in Cancer, *Protein J.* 36 (2017) 1–6. <https://doi.org/10.1007/s10930-017-9696-z>.

[190] S. Wegmann, J. Biernat, E. Mandelkow, A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease, *Curr. Opin. Neurobiol.* 69 (2021) 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.03.003>.

[191] K.F. Medzihradszky, Z. Darula, E. Perlson, M. Fainzilber, R.J. Chalkley, H. Ball, D. Greenbaum, M. Bogyo, D.R. Tyson, R.A. Bradshaw, A.L. Burlingame, O-sulfonation of serine and threonine: mass spectrometric detection and characterization of a new posttranslational modification in diverse proteins throughout the eukaryotes, *Mol. Cell. Proteomics MCP.* 3 (2004) 429–440. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300140-MCP200>.

[192] P. Baeuerle, W. Huttner, Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific protein modification, *J. Cell Biol.* 105 (1987) 2655–2664.

[193] F. Monigatti, B. Hekking, H. Steen, Protein sulfation analysis--A primer, *Biochim. Biophys. Acta.* 1764 (2006) 1904–1913. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.07.002>.

[194] A. Hille, P. Rosa, W.B. Huttner, Tyrosine sulfation: a post-translational modification of proteins destined for secretion?, *FEBS Lett.* 177 (1984) 129–134. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80996-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80996-5).

[195] W.B. Huttner, Tyrosine sulfation and the secretory pathway, *Annu. Rev. Physiol.* 50 (1988) 363–376. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.50.030188.002051>.

[196] A. Maiti, G. Maki, P. Johnson, TNF-alpha induction of CD44-mediated leukocyte adhesion by sulfation, *Science.* 282 (1998) 941–943. <https://doi.org/10.1126/science.282.5390.941>.

[197] J.W. Kehoe, C.R. Bertozzi, Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions, *Chem. Biol.* 7 (2000) R57-61. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00093-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00093-4).

[198] R.K. Scopes, A. Stoter, [79] Purification of all glycolytic enzymes from one muscle extract, in: W.A. Wood (Ed.), *Methods Enzymol.*, Academic Press, 1982: pp. 479–490. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(82\)90175-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(82)90175-6).

[199] M. Medvedeva, K. Barinova, A. Melnikova, P. Semenyuk, V. Kolmogorov, P. Gorelkin, A. Erofeev, V. Muronetz, Naturally occurring cinnamic acid derivatives prevent amyloid transformation of alpha-synuclein, *Biochimie.* 170 (2020) 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.01.004>.

[200] V.A. Izumrudov, M.V. Zhiryakova, S.E. Kudaibergenov, Controllable stability of DNA-containing polyelectrolyte complexes in water-salt solutions, *Biopolymers.* 52 (1999) 94–108. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(1999\)52:2<94::AID-BIP3>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1097-0282(1999)52:2<94::AID-BIP3>3.0.CO;2-O).

[201] J.H. Waterborg, H.R. Matthews, The lowry method for protein quantitation, *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. 1 (1984) 1–3. <https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:1>.

[202] L.K. Muranova, M.M. Perfilov, M.V. Serebryakova, N.B. Gusev, Effect of methylglyoxal modification on the structure and properties of human small heat shock protein HspB6 (Hsp20), *Cell Stress Chaperones.* 21 (2016) 617–629.

[203] Burstein, E.A., Vedenkina, N.S., Ivkova, M.N., Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules, *Phorochemistry and Phofobiology.* 18 (1973) 263–279.

[204] P. Schuck, Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling, *Biophys. J.* 78 (2000) 1606–1619. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76713-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76713-0).

[205] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227 (1970) 680–685.

[206] J. Evrard, R. Siriez, L. Morimont, P. Thémans, J. Laloy, C. Bouvy, D. Gheldof, F. Mullier, J.-M. Dogné, J. Douxfils, Optimal wavelength for the clot waveform analysis: Determination of the best resolution with minimal interference of the reagents, *Int. J. Lab. Hematol.* 41 (2019) 316–324. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12975>.

[207] E. Jurrus, D. Engel, K. Star, K. Monson, J. Brandi, L.E. Felberg, D.H. Brookes, L. Wilson, J. Chen, K. Liles, M. Chun, P. Li, D.W. Gohara, T. Dolinsky, R. Konecny, D.R. Koes, J.E. Nielsen, T. Head-Gordon, W. Geng, R. Krasny, G.-W. Wei, M.J. Holst, J.A. McCammon, N.A. Baker, Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite, *Protein Sci.* 27 (2018) 112–128. <https://doi.org/10.1002/pro.3280>.

[208] F.-Y. Dupradeau, A. Pigache, T. Zaffran, C. Savineau, R. Lelong, N. Grivel, D. Lelong, W. Rosanski, P. Cieplak, The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 7821–7839. <https://doi.org/10.1039/C0CP00111B>.

[209] Firefly Home Page, (n.d.). <http://classic.chem.msu.su/gran/games/index.html> (accessed February 8, 2022).

[210] M.W. Schmidt, K.K. Baldridge, J.A. Boatz, S.T. Elbert, M.S. Gordon, J.H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K.A. Nguyen, S. Su, T.L. Windus, M. Dupuis, J.A. Montgomery, General atomic and molecular electronic structure system, *J. Comput. Chem.* 14 (1993) 1347–1363. <https://doi.org/10.1002/jcc.540141112>.

[211] M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX*. 1–2 (2015) 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.

[212] N. Schmid, A.P. Eichenberger, A. Choutko, S. Riniker, M. Winger, A.E. Mark, W.F. van Gunsteren, Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7, *Eur. Biophys. J.* 40 (2011) 843. <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0700-9>.

[213] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.* 79 (1983) 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.

[214] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, Canonical sampling through velocity rescaling, *J. Chem. Phys.* 126 (2007) 014101. <https://doi.org/10.1063/1.2408420>.

[215] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, A. DiNola, J.R. Haak, Molecular dynamics with coupling to an external bath, *J. Chem. Phys.* 81 (1984) 3684–3690. <https://doi.org/10.1063/1.448118>.

[216] K. Barinova, E. Khomyakova, P. Semenyuk, E. Schmalhausen, V. Muronetz, Binding of alpha-synuclein to partially oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induces subsequent inactivation of the enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.* 642 (2018) 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.02.002>.

[217] H. Kaur, M. Kamalov, M.A. Brimble, Chemical Synthesis of Peptides Containing Site-Specific Advanced Glycation Endproducts, *Acc. Chem. Res.* 49 (2016) 2199–2208. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00366>.

[218] P. Salahuddin, G. Rabbani, R. Khan, The role of advanced glycation end products in various types of neurodegenerative disease: a therapeutic approach, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 19 (2014) 407–437. <https://doi.org/10.2478/s11658-014-0205-5>.

[219] M. Smuda, C. Henning, C.T. Raghavan, K. Johar, A.R. Vasavada, R.H. Nagaraj, M.A. Glomb, Comprehensive Analysis of Maillard Protein Modifications

in Human Lenses: Effect of Age and Cataract, *Biochemistry*. 54 (2015) 2500–2507.
<https://doi.org/10.1021/bi5013194>.

[220] A. Pérez, I. Marchán, D. Svozil, J. Sponer, T.E. Cheatham, C.A. Laughton, M. Orozco, Refinement of the AMBER Force Field for Nucleic Acids: Improving the Description of α/γ Conformers, *Biophys. J.* 92 (2007) 3817–3829.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.106.097782>.

[221] I.S. Joung, T.E. Cheatham, Determination of Alkali and Halide Monovalent Ion Parameters for Use in Explicitly Solvated Biomolecular Simulations, *J. Phys. Chem. B.* 112 (2008) 9020–9041.
<https://doi.org/10.1021/jp8001614>.

[222] M.M. Reif, M. Winger, C. Oostenbrink, Testing of the GROMOS Force-Field Parameter Set 54A8: Structural Properties of Electrolyte Solutions, Lipid Bilayers, and Proteins, *J. Chem. Theory Comput.* 9 (2013) 1247–1264.
<https://doi.org/10.1021/ct300874c>.

[223] C. Margreitter, D. Petrov, B. Zagrovic, Vienna-PTM web server: a toolkit for MD simulations of protein post-translational modifications, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) W422–W426. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt416>.

[224] S. Kumar, J.M. Rosenberg, D. Bouzida, R.H. Swendsen, P.A. Kollman, THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method, *J. Comput. Chem.* 13 (1992) 1011–1021.
<https://doi.org/10.1002/jcc.540130812>.

[225] J.S. Hub, B.L. de Groot, D. van der Spoel, g_wham—A Free Weighted Histogram Analysis Implementation Including Robust Error and Autocorrelation Estimates, *J. Chem. Theory Comput.* 6 (2010) 3713–3720.
<https://doi.org/10.1021/ct100494z>.

[226] V.V. Voevodin, A.S. Antonov, D.A. Nikitenko, P.A. Shvets, S.I. Sobolev, I.Y. Sidorov, K.S. Stefanov, V.V. Voevodin, S.A. Zhumatiy,

Supercomputer Lomonosov-2: large scale, deep monitoring and fine analytics for the user community, *Supercomput. Front. Innov.* 6 (2019) 4–11.

[227] I.N. Shalova, R.A. Asryants, M.V. Sholukh, L. Saso, B.I. Kurganov, V.I. Muronetz, V.A. Izumrudov, Interaction of polyanions with basic proteins, 2(a) : influence of complexing polyanions on the thermo-aggregation of oligomeric enzymes, *Macromol. Biosci.* 5 (2005) 1184–1192. <https://doi.org/10.1002/mabi.200500142>.

[228] K. Henzler, B. Haupt, K. Lauterbach, A. Wittemann, O. Borisov, M. Ballauff, Adsorption of β -Lactoglobulin on Spherical Polyelectrolyte Brushes: Direct Proof of Counterion Release by Isothermal Titration Calorimetry, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 3159–3163. <https://doi.org/10.1021/ja909938c>.

[229] P. Semenyuk, V. Orlov, V. Muronetz, V. Izumrudov, Two-stage binding of a protein to the polyanion: Non-denaturing interaction followed by denaturation, *Polymer.* 65 (2015) 210–214. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.03.075>.

[230] S.V. Stogov, V.I. Muronets, V.A. Izumrudov, Basic guidelines for the selection of polyelectrolytes that can effectively prevent thermal aggregation of enzymes without any substantial loss in their catalytic activity¹, *Polym. Sci. Ser. C.* 53 (2011) 97–106. <https://doi.org/10.1134/S1811238211030027>.

[231] Y.Y. Stroylova, J. Zimny, R. Yousefi, J.-M. Chobert, H. Jakubowski, V.I. Muronetz, T. Haertlé, Aggregation and structural changes of α S1-, β - and κ -caseins induced by homocysteinylolation, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics.* 1814 (2011) 1234–1245. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.05.017>.

[232] Mikheeva, L.M., Grinberg, N.V., Grinberg, V.Y., Khokhlov, A.R., de Kruif, C.G., Thermodynamics of Micellization of Bovine beta-Casein Studied by High-Sensitivity Differential Scanning Calorimetry, 19 (2003) 2913–2921.

[233] J.R. Lakowicz, ed., Protein Fluorescence, in: *Princ. Fluoresc. Spectrosc.*, Springer US, Boston, MA, 2006: pp. 529–575. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_16.

[234] PeptideCutter, (n.d.). http://web.expasy.org/peptide_cutter/ (accessed May 31, 2017).

[235] D.B. Evstafyeva, V.A. Izumrudov, V.I. Muronetz, P.I. Semenyuk, Tightly bound polyelectrolytes enhance enzyme proteolysis and destroy amyloid aggregates, *Soft Matter*. 14 (2018) 3768–3773. <https://doi.org/10.1039/C8SM00101D>.

[236] E.D. Garcin, GAPDH as a model non-canonical AU-rich RNA binding protein, *Semin. Cell Dev. Biol.* 86 (2019) 162–173. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.03.013>.

[237] A. Karshikov, W. Bode, A. Tulinsky, S.R. Stone, Electrostatic interactions in the association of proteins: An analysis of the thrombin-hirudin complex, *Protein Sci.* 1 (1992) 727–735. <https://doi.org/10.1002/pro.5560010605>.

[238] C. Seibert, T.P. Sakmar, Toward a framework for sulfoproteomics: Synthesis and characterization of sulfotyrosine-containing peptides, *Biopolymers*. 90 (2008) 459–477. <https://doi.org/10.1002/bip.20821>.

[239] N. Makukhin, A. Ciulli, Recent advances in synthetic and medicinal chemistry of phosphotyrosine and phosphonate-based phosphotyrosine analogues, *RSC Med. Chem.* 12 (2021) 8–23. <https://doi.org/10.1039/D0MD00272K>.

[240] J.A. Cooper, B.M. Sefton, T. Hunter, Detection and quantification of phosphotyrosine in proteins, *Methods Enzymol.* 99 (1983) 387–402. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(83\)99075-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(83)99075-4).

[241] A.U. Singer, J.D. Forman-Kay, pH titration studies of an SH2 domain-phosphopeptide complex: unusual histidine and phosphate pKa values., *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 6 (1997) 1910–1919.

[242] J.A. Kellum, Determinants of blood pH in health and disease, *Crit. Care.* 4 (2000) 6–14. <https://doi.org/10.1186/cc644>.

[243] Z. Zhang, M. Tan, Z. Xie, L. Dai, Y. Chen, T. Zhao, Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification, *Nat. Chem. Biol.* 7 (2011) 58–63. <https://doi.org/10.1038/nchembio.495>.

[244] S.K. Nandi, S. Rakete, R.B. Nahomi, C. Michel, A. Dunbar, K.S. Fritz, R.H. Nagaraj, Succinylation Is a Gain-of-Function Modification in Human Lens α B-Crystallin, *Biochemistry.* 58 (2019) 1260–1274. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b01053>.

[245] N. Homeyer, A.H.C. Horn, H. Lanig, H. Sticht, AMBER force-field parameters for phosphorylated amino acids in different protonation states: phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosine, and phosphohistidine, *J. Mol. Model.* 12 (2006) 281–289. <https://doi.org/10.1007/s00894-005-0028-4>.

[246] T. Yamashita, R. Okajima, K. Miyanabe, K. Tsumoto, Modified AMBER force-field (FUJI) parameters for sulfated and phosphorylated tyrosine residues: Development and application to CCR5-derived peptide systems, in: Rhodes, Greece, 2019: p. 030013. <https://doi.org/10.1063/1.5137924>.

[247] A. Betz, J. Hofsteenge, S.R. Stone, Role of interactions involving C-terminal nonpolar residues of hirudin in the formation of the thrombin-hirudin complex, *Biochemistry.* 30 (1991) 9848–9853. <https://doi.org/10.1021/bi00105a006>.

[248] S.J.T. Mao, M.T. Yates, T.J. Owen, J.L. Krstenansky, Interaction of hirudin with thrombin: identification of a minimal binding domain of hirudin that

inhibits clotting activity, *Biochemistry*. 27 (1988) 8170–8173.
<https://doi.org/10.1021/bi00421a027>.

[249] V. Agouridas, V. Diemer, O. Melnyk, Strategies and open questions in solid-phase protein chemical synthesis, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 58 (2020) 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.02.007>.

[250] K.B. Højlys-Larsen, K.J. Jensen, Solid-phase synthesis of phosphopeptides, *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. 1047 (2013) 191–199.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-544-6_13.

[251] S.W. Pedersen, L. Albertsen, G.E. Moran, B. Levesque, S.B. Pedersen, L. Bartels, H. Wapenaar, F. Ye, M. Zhang, M.E. Bowen, K. Strømgaard, Site-Specific Phosphorylation of PSD-95 PDZ Domains Reveals Fine-Tuned Regulation of Protein—Protein Interactions, *ACS Chem. Biol.* 12 (2017) 2313–2323.
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00361>.

[252] W. Lu, K. Shen, P.A. Cole, Chemical dissection of the effects of tyrosine phosphorylation of SHP-2, *Biochemistry*. 42 (2003) 5461–5468.
<https://doi.org/10.1021/bi0340144>.

[253] Z. Wang, L. Raines, R.M. Hooy, H. Roberson, D.J. Leahy, P.A. Cole, Tyrosine Phosphorylation of Mig6 Reduces its Inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor, *ACS Chem. Biol.* 8 (2013) 10.1021/cb4005707.
<https://doi.org/10.1021/cb4005707>.

[254] R.E. Thompson, T.W. Muir, Chemoenzymatic Semisynthesis of Proteins, *Chem. Rev.* 120 (2020) 3051–3126.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00450>.

[255] N.L. Pirman, K.W. Barber, H.R. Aerni, N.J. Ma, A.D. Haimovich, S. Rogulina, F.J. Isaacs, J. Rinehart, A flexible codon in genomically recoded *Escherichia coli* permits programmable protein phosphorylation, *Nat. Commun.* 6 (2015) 8130. <https://doi.org/10.1038/ncomms9130>.

[256] C. Fan, K. Ip, D. Söll, Expanding the genetic code of *Escherichia coli* with phosphotyrosine, FEBS Lett. 590 (2016) 3040–3047. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12333>.

[257] X. Luo, G. Fu, R.E. Wang, X. Zhu, C. Zambaldo, R. Liu, T. Liu, X. Lyu, J. Du, W. Xuan, A. Yao, S.A. Reed, M. Kang, Y. Zhang, H. Guo, C. Huang, P.-Y. Yang, I.A. Wilson, P.G. Schultz, F. Wang, Genetically encoding phosphotyrosine and its nonhydrolyzable analog in bacteria, Nat. Chem. Biol. 13 (2017) 845–849. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2405>.

[258] C. Hoppmann, A. Wong, B. Yang, S. Li, T. Hunter, K.M. Shokat, L. Wang, Site-specific incorporation of phosphotyrosine using an expanded genetic code, Nat. Chem. Biol. 13 (2017) 842–844. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2406>.

[259] S.M. Hecht, Expansion of the Genetic Code Through the Use of Modified Bacterial Ribosomes, J. Mol. Biol. (2021) 167211. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167211>.

[260] S. Venkat, H. Chen, Q. Gan, C. Fan, The Application of Cell-Free Protein Synthesis in Genetic Code Expansion for Post-translational Modifications, Front. Pharmacol. 10 (2019) 248. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00248>.

[261] J.P. Oza, H.R. Aerni, N.L. Pirman, K.W. Barber, C.M. Ter Haar, S. Rogulina, M.B. Amroffell, F.J. Isaacs, J. Rinehart, M.C. Jewett, Robust production of recombinant phosphoproteins using cell-free protein synthesis, Nat. Commun. 6 (2015) 8168. <https://doi.org/10.1038/ncomms9168>.

[262] L. Hromadkova, R. Kupcik, M. Vajrychova, P. Prikryl, A. Charvatova, B. Jankovicova, D. Ripova, Z. Bilkova, M. Slovakova, Kinase-loaded magnetic beads for sequential in vitro phosphorylation of peptides and proteins, The Analyst. 143 (2018) 466–474. <https://doi.org/10.1039/c7an01508a>.

[263] H. Liu, C. Queffélec, C. Charlier, A. Defontaine, A. Fateh, C. Tellier, D.R. Talham, B. Bujoli, Design and Optimization of a Phosphopeptide Anchor for

Specific Immobilization of a Capture Protein on Zirconium Phosphonate Modified Supports, *Langmuir*. 30 (2014) 13949–13955. <https://doi.org/10.1021/la5036085>.

[264] R. Lei, J.P. Lee, M.B. Francis, S. Kumar, Structural Regulation of a Neurofilament-Inspired Intrinsically Disordered Protein Brush by Multisite Phosphorylation, *Biochemistry*. 57 (2018) 4019–4028. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00007>.

[265] M. Slovakova, Z. Bilkova, Contemporary Enzyme-Based Methods for Recombinant Proteins In Vitro Phosphorylation, *Catalysts*. 11 (2021) 1007. <https://doi.org/10.3390/catal11081007>.

[266] B. Kobe, T. Kampmann, J.K. Forwood, P. Listwan, R.I. Brinkworth, Substrate specificity of protein kinases and computational prediction of substrates, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*. 1754 (2005) 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.036>.

[267] J.C. Obenauer, L.C. Cantley, M.B. Yaffe, Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3635–3641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg584>.

[268] D.A. Sabbah, R. Hajjo, K. Sweidan, Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors, *Curr. Top. Med. Chem.* 20 (2020) 815–834. <https://doi.org/10.2174/1568026620666200303123102>.

[269] G. Ghosh, X. Yan, S.J. Kron, S.P. Palecek, Activity Assay of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer Cells Using Peptide-Conjugated Magnetic Beads, *Assay Drug Dev. Technol.* 11 (2013) 44–51. <https://doi.org/10.1089/adt.2012.454>.

[270] G. Pérez-Mejías, A. Velázquez-Cruz, A. Guerra-Castellano, B. Baños-Jaime, A. Díaz-Quintana, K. González-Arzola, M. Ángel De la Rosa, I. Díaz-Moreno, Exploring protein phosphorylation by combining computational

approaches and biochemical methods, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18 (2020) 1852–1863. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.06.043>.

[271] J. Xie, L. Supekova, P.G. Schultz, A Genetically Encoded Metabolically Stable Analogue of Phosphotyrosine in *Escherichia coli*, *ACS Chem. Biol.* 2 (2007) 474–478. <https://doi.org/10.1021/cb700083w>.