

На правах рукописи

Вологжанникова Алиса Андреевна

РОЛЬ АВ ДОМЕНА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ПАРВАЛЬБУМИНА

Специальность 03.01.02 - Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино
2020

Работа прошла апробацию в лаборатории новых методов в биологии Института биологического приборостроения с опытным производством Российской академии наук - обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Научный руководитель: Пермяков Сергей Евгеньевич, кандидат физико-математических наук, и.о. директора Института биологического приборостроения с опытным производством Российской академии наук - обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Защита состоится «14» мая 2020 года в 14.00 на заседании диссертационного совета ФБМФ03.01.02.011, по адресу: 115184, г. Москва, Климентовский пер., д.1, стр. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Московского физико-технического института (национальный исследовательский университет) <https://mipt.ru/education/post-graduate/soiskateli-biologicheskie-nauki.php>.

Работа представлена «17» февраля 2020 г. в Аттестационную комиссию федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» для рассмотрения советом по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с п.3.1 ст. 4 Федерального закона «О науке и государственной научно - технической политике»

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Кальций принимает прямое или опосредованное участие практически во всех биологических процессах, включая контроль высвобождения нейромедиаторов, мышечное сокращение, фоторецепцию, клеточную подвижность, и пр. (Carafoli and Krebs 2016). Действие кальция, как правило, опосредовано взаимодействием с кальцийсвязывающими белками, которые можно разделить на «кальциевые сенсоры» и «кальциевые буферы». Связывание кальция Ca^{2+} -сенсорным белком вызывает конформационную перестройку белка, изменяющую его сродство к той или иной мишени (белок, мембрана, и пр.), приводя к (ин)активации биологических процессов. Ca^{2+} -буферные белки позволяют модулировать локальные концентрации свободных катионов Ca^{2+} в клетке. По мере накопления информации по белок-белковым взаимодействиям становится все меньше белков, отнесённых к «чистым» буферам кальция. Парвальбумин (ПА) - один из немногих таких белков, поскольку для него до сих пор не установлены партнеры по связыванию (см. (Пермуяков 2006)). Отметим, что для β -ПА крысы показана способность к взаимодействию с глутатионредуктазой при избытке Ca^{2+} (Palmer et al. 1990).

ПА относится к наиболее многочисленному семейству Ca^{2+} -связывающих белков – семейству белков «EF-руки» (EF-hand), связывающих ион кальция карбоксильными и карбонильными группами петли из 12 остатков, расположенной между двумя α -спиралями («EF-рука» (Kretsinger and Nockolds 1973)). ПА содержит два спаренных мотива типа «EF-руки» (CD и EF домены), а также одну «EF-руку», которая потеряла сродство к кальцию в ходе эволюции, благодаря делеции двух остатков кальцийсвязывающей петли (AB домен) (Kretsinger and Nockolds 1973) (Рис. 1). В то время как высокое сродство ПА к кальцию важно для облегчения процесса релаксации

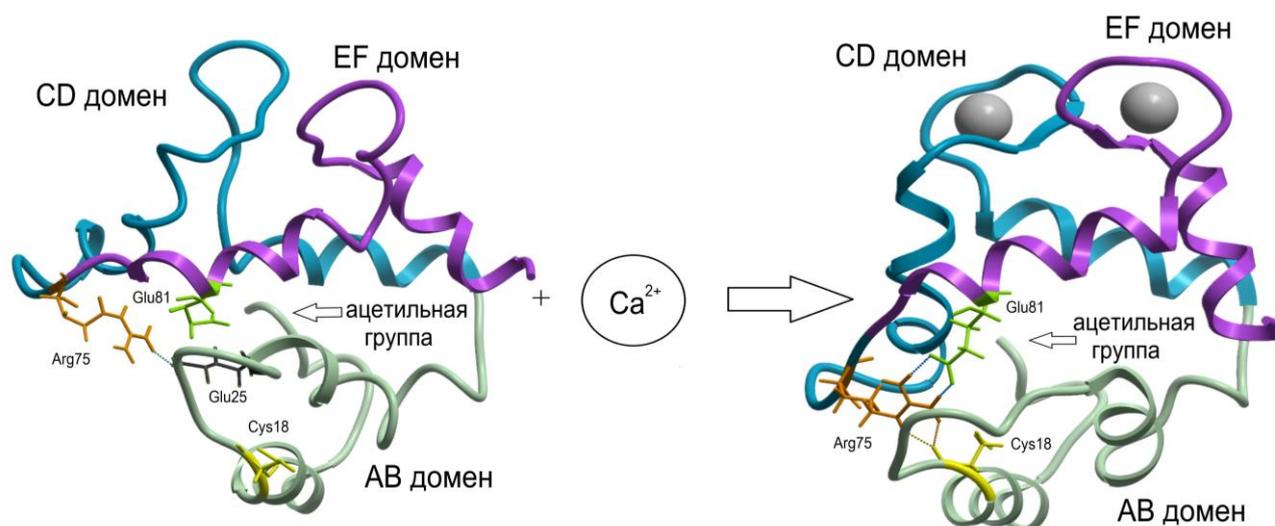


Рис. 1. Трехмерные структуры апо/ Ca^{2+} -форм β -ПА крысы (коды PDB 2NLN и 1OMD, соответственно)

быстрых мышц (Haiech et al. 1979b), функциональная роль неактивного AB домена до сих пор не ясна. Для некоторых ПА показано, что AB домен модулирует сродство белка к $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Пермуяков et al. 1991c, Henzl et al. 2004b), а также важен для стабилизации гидрофобного ядра молекулы белка (McPhalen et al. 1994). Кроме того, связывание Ca^{2+} вызывает структурные перестройки в AB домене β -ПА крысы (Henzl et al. 2011), что

указывает на потенциальную важность АВ домена для кальций-зависимого узнавания мишеней.

Отрыв кальция от ПА приводит к резкому снижению термостабильности белка и его устойчивости к химическим денатурантам (Permyakov 1993a). В отдельных случаях апо-ПА характеризуются отсутствием жесткой третичной структуры, при высокой (состояние «расплавленной глобулы») или частичной сохранности вторичной структуры белка (Permyakov et al. 2008). Такая дестабилизация апо-белка, вероятно, связана с электростатическим отталкиванием карбоксилатов Ca^{2+} -связывающих петель CD и EF. Поскольку не все ортологи ПА демонстрируют дестабилизацию апо-формы, структурные факторы, определяющие структурную стабильность апо-белка, лежат за пределами Ca^{2+} -связывающих петель ПА. Тем не менее, особенности строения ПА, обуславливающие конформационную стабильность апо-белка, остаются невыясненными.

Роль АВ домена в функционировании ПА в основном изучали с использованием фрагментов белка, соответствующих АВ домену и остальной части белка, что сопряжено с глубокими структурными изменениями в белке. Роль же отдельных консервативных остатков АВ домена ПА остается малоизученной. В частности, особый интерес представляет высококонсервативный цистеин в АВ петле β -ПА (Рис. 1). Ранее исследовали реактивность консервативного Cys β -ПА крысы и функциональные последствия его дисульфидной димеризации (Mutus et al. 1988, Clayshulte et al. 1990). Структурные данные подтверждают факт, экспонирования Cys18 растворителю при отрыве катионов кальция (Henzl and Tanner 2007) (Рис. 1), что, в свою очередь, соответствует повышению реакционной способности апо-белка при взаимодействии с реактивом Элмана (Clayshulte et al. 1990). Примечательно, что изучение функциональной роли отдельных остатков ПА с использованием бактериально экспрессированных мутантных форм белка не обеспечивает N-концевого ацетилирования белка, характерного для интактного ПА (Permyakov 2006). Тем не менее, структурно-функциональные последствия для ПА этой широко распространенной (ко)посттрансляционной модификации эукариотических белков неизвестны.

Цель и задачи исследования:

Целью настоящей работы стало изучение роли АВ домена парвальбумина в поддержании структуры и функционального статуса белка. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследование влияния N-концевого ацетилирования (Nt-ацетилирования) α -парвальбумина на его структурные и функциональные свойства.
2. Исследование влияния отдельных консервативных, линий-специфичных остатков АВ домена парвальбумина на структурно-функциональные свойства белка на примере рекомбинантного β -парвальбумина крысы (rWT β -ПА крысы).
3. Поиск парвальбуминов, апо-форма которых глобально неупорядочена; изучение структурной стабильности апо-формы β -парвальбумина кижуча.
4. Установление закономерностей строения парвальбумина, обуславливающих структурную стабильность апо-формы белка; изучение взаимосвязи между стабильностью апо-парвальбумина и средством белка к ионам кальция.

Научная новизна

Показано, что такая распространенная посттрансляционная модификация эукариотических белков, как N-концевое ацетилирование, способна существенным образом влиять на структурно-функциональные свойства парвальбумина. Впервые показана дисульфидная димеризация β -ПА при физиологически значимых величинах редокс-потенциала. Важность высококонсервативного остатка цистеина АВ домена ПА для поддержания конформационной стабильности и функциональных свойств белка предполагает редокс-сенсорную роль β -ПА. Найдена корреляция сродства β -ПА к ионам кальция со структурной стабильностью апо-формы белка. Предложены структурные критерии пониженной конформационной стабильности апо-ПА.

Практическая значимость

Учитывая, что роль парвальбумина в большинстве тканей и органах (внутреннее ухо, зрительный нерв, почки, нейроны) остается неизвестной, полученные данные по склонности белка к дисульфидной димеризации важны для поиска новых функциональных активностей этого белка. Показанная в работе важность N-концевой ацетильной группы парвальбумина для поддержания его структурно-функциональных свойств свидетельствует о необходимости учета этого обстоятельства при экспериментальных исследованиях функциональных свойств парвальбуминов. Полученные в работе данные о чувствительности парвальбумина к «незначительным» структурным воздействиям на уровне его АВ домена открывают новые возможности использования белка в ведущихся работах по коррекции заболеваний сердца при помощи мутантных форм парвальбумина, обладающих измененными кинетическими и равновесными параметрами взаимодействия с ионами кальция/магния. Поскольку мутантные парвальбумины с инактивированными кальцийсвязывающими центрами предложены для иммунотерапии аллергии на морепродукты, предложенный в работе метод поиска парвальбуминов с наименьшим/наибольшим сродством к кальцию полезен для развития этого подхода. Этот же метод востребован при разработке сенсоров катионов металлов на основе парвальбумина, обладающих предельно высокой чувствительностью.

Положения, выносимые на защиту

- 1) N-концевое ацетилирование существенным образом влияет на структурно-функциональные свойства отдельных парвальбуминов, включая стабильность вторичной, третичной и четвертичной структур белка, а также кинетические и равновесные параметры его взаимодействия с ионами кальция/магния. Величина эффектов, вызываемых Nt-ацетилированием парвальбумина, коррелирует с уровнем неупорядоченности АВ домена белка.
- 2) Редокс-потенциал высококонсервативного тиола Cys18 АВ-петли β -парвальбумина крысы составляет от -168 до -176 мВ (глутатионовая редокс-пара), что близко к физиологически значимому уровню. Гомологичная замена C18S существенным образом влияет на структурно-функциональные свойства белка (стабильность его вторичной и третичной структур, равновесные параметры взаимодействия с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$).
- 3) Апо-форма β -ПА кижуча характеризуется существенно дезорганизованной вторичной структурой и потерей жесткой трехмерной структуры, что относит его к семейству внутренне неупорядоченных белков.

- 4) На основе анализа особенностей строения АВ доменов парвальбумина предложены структурные критерии внутренней неупорядоченности апо-форм белка. 16–19% апо-парвальбуминов базы данных Swiss-Prot v.2014_05 удовлетворяют этим критериям.
- 5) Внутренняя неупорядоченность апо-формы β -парвальбумина служит признаком повышенного сродства белка к ионам Ca^{2+} .

Вклад автора

Представленная диссертационная работа является результатом 9-летних научных исследований автора. Работа выполнена лично соискателем, за некоторыми исключениями. Выделение и очистка интактного α -ПА щуки проводились совместно с Бакунц А.Г. Выделение и очистка интактного α -ПА крысы, а также измерения методом динамического светорассеяния проводились совместно с Казаковым А.С. Масс-спектрометрические измерения проводились совместно с Жаданом А.П., Исмаиловым Р.Г., Сувориной М.Ю. и Суриным А.К. Клонирование гена β -ПА кижуча в вектор рЕТ-29а проводилось совместно с Соколовым А.С. Выделение, очистка, исследование термостабильности, эксперименты по спектрофотометрическому рН титрованию и определение редокс-зависимости дисульфидной димеризации рекомбинантного β -ПА крысы проводились совместно с Хорн П.А. Предсказания внутренней неупорядоченности и анализ аминокислотного состава ПА осуществлялись совместно с Пермяковым С.Е. и Уверским В.Н. Оценка кинетических констант ассоциации/диссоциации $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ для исследуемых белков проводилась совместно с Емельяненко В.И. Оценка сродства к Mg^{2+} β -ПА и его мутанта С18S методом равновесного диализа проводилась совместно с Шевелевой М.П. Обработка полученных данных, а также написание статей и тезисов конференций проводились либо лично автором, либо при его непосредственном участии.

Апробация диссертации

Материалы диссертации представлены на международных и российских конференциях: Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2012, 2016) и Съезд биофизиков России (Нижний Новгород, 2012, Ростов-на-Дону, 2015). Результаты диссертации опубликованы в 4 работах в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и WoS.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 184 страницах машинописного текста, включает 24 рисунка и 20 таблиц. Список цитируемых литературных источников представлен 483 наименованиями.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении описана актуальность темы диссертационной работы, поставлена цель и сформулированы задачи исследования, отражены научная новизна и практическая значимость работы, описана апробация полученных результатов, вклад автора, перечислены защищаемые положения диссертации.

Глава 1 представляет собой литературный обзор фундаментальных представлений об основных конформационных состояниях белка, посттрансляционных модификациях

белков и структурно-функциональных свойствах Ca^{2+} -связывающих белков семейства «EF-руки». Подробно описываются локализация и свойства главного объекта исследования, парвальбумина. В обзоре приводятся общие сведения об окислительно-восстановительном равновесии и роли сульфгидрильных групп белков в клетке.

Глава 2. Материалы и методы.

Материалы. Интактные и рекомбинантные (rWT) формы α -парвальбумина (α -ПА) и β -парвальбумина (β -ПА) щуки (*Esox lucius*) и крысы (*Rattus norvegicus*), мутант C18S β -ПА крысы, а также интактный и рекомбинантный β -ПА кижуча (*Oncorhynchus kisutch*) были выделены как описано ранее (Permyakov et al. 2009b) с некоторыми модификациями. В случае экспериментов с β -ПА кижуча за исключением метода дифференциальной сканирующей калориметрии к буферу добавляли 0,18-1 мМ ДТТ. Степень чистоты реактивов была не ниже «хч». Для приготовления буферных растворов использовали реактивы степени «осч».

Методы. Очистка белка от ионов металлов. Очистку ПА от металлов проводили либо с помощью гель-фильтрации белка на колонке с носителем Sephadex G-25 (Blum et al. 1977), либо путем осаждения белка 3% ТХУ (Yazawa et al. 1980) с последующей гель-фильтрацией для очистки от ТХУ.

Дифференциальная сканирующая калориметрия. Измерения избыточного теплопоглощения белков проводили при помощи микрокалориметра Nano DSC (TA Instruments) при скорости нагрева 1 К/мин в 10-20 мМ H_3BO_3 -КОН pH 9,0 буфере с добавлением 1 мМ CaCl_2 или в 10-20 мМ глициновом буфере pH 9,2 с 1 мМ ЭДТА/ЭГТА-КОН, либо с 1 мМ MgCl_2 . Концентрация белка составляла 0,6-2,1 мг/мл. Удельную теплоемкость (C_p) и удельный объем белка рассчитывали согласно работе (Permyakov 2012a). Температурную зависимость C_p анализировали в рамках кооперативной схемы перехода между двумя состояниями, либо схемы двух последовательных переходов (Permyakov, Vakunts et al. 2009a).

Круговой дихроизм. Измерение спектров кругового дихроизма (КД) ПА (4-13 мкМ) проводили при 20°C на спектрополяриметре J-810 (JASCO, Inc.). Оптический путь кварцевой кюветы 1 мм. Проводили усреднение данных по трем спектрам. Из спектра раствора белка вычитали спектр буфера: 10 мМ H_3BO_3 -КОН pH 8,8-8,9, 1 мМ CaCl_2 или 1,5 мМ ЭДТА-КОН, либо 10 мМ Трис-НСl pH 7,3, 1 мМ MgCl_2 , 1 мМ ЭГТА-КОН. Для количественной оценки содержания элементов вторичной структуры белка использовали пакет программного обеспечения CDPPro (Sreerama, Venyaminov et al. 2000).

Разворачивание апо-формы β -ПА кижуча (10-13 мкМ), индуцированное гуанидин гидрохлоридом (Gdn-HCl), проводили при 20°C в 10 мМ H_3BO_3 -КОН, 180 мкМ ДТТ, 1,5 мМ ЭДТА-КОН, pH 8,8 с предварительной инкубацией образцов при комнатной температуре в течение 1 часа.

Ограниченный протеолиз. 3,5-5 мкл α -химотрипсина (0,1 мг/мл) добавляли к 100 мкл раствора ПА (0,7-1,0 мг/мл). Буфер 10 мМ HEPES-КОН pH 7,3, 1 мМ ЭДТА-КОН или CaCl_2 . Реакцию проводили при 37°C в течение ночи и останавливали добавлением 1 мМ ФМСФ в 2-пропанол. Полученные пробы анализировали с помощью SDS-электрофореза в 15% ПААГ. Гель окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250/G-250.

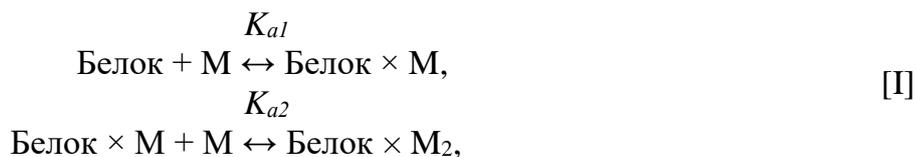
Метод химического сшивания глутаровым альдегидом. 0,02% глутаровый альдегид добавляли к раствору белка (1-2 мг/мл) в 10-30 мМ H_3BO_3 -КОН pH 8,2-9,2 с добавлением 1 мМ $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ или 1,5 мМ ЭДТА-КОН. Реакцию проводили при 20°C в течение ночи и останавливали добавлением к пробам буфера для SDS-электрофореза.

Анализ полученных образцов проводили с помощью SDS-электрофореза в 15% ПААГ. Гель окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250/G-250.

Динамическое светорассеяние. Измерения динамического рассеяния света (ДРС) проводили при 20/25°C с использованием спектрометра Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.) согласно работе (Zernii et al. 2015). Раствор белка (1,0-2 мг/мл) предварительно подвергали фильтрации через фильтр Whatman Anotop 10 с порами 0,02 мкм. Эксперименты проводили в 10-20 мМ H_3BO_3 -КОН pH 8,2-8,4 буфере с добавлением 1,5 мМ ЭДТА-КОН или 1 мМ $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$. Распределение частиц по гидродинамическим радиусам рассчитывали по интенсивности светорассеяния, используя параметры дистиллированной воды при 20-25°C.

Флуоресцентные измерения. Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian Inc.) при 20°C. Длина волны возбуждения флуоресценции остатков фенилаланина в белках составляла 259 нм для α -ПА щуки, 258 нм для α -ПА крысы и β -ПА кижуча, 275 нм в случае остатков тирозина β -ПА крысы; флуоресценцию бис-АНС возбуждали на 385 нм. Концентрация белка составляла 4-23 мкМ. Концентрация бис-АНС 1 мкМ. В качестве буфера использовали 10-30 мМ HEPES-КОН pH 7,3-8,2 (связывание Ca^{2+}); 1 мМ ЭГТА-КОН добавляли при определении параметров связывания Mg^{2+} . Для измерения спектров бис-АНС в присутствии белка к образцам добавляли 1-2 мМ ЭДТА-КОН или 1 мМ $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$.

Оценка равновесных констант связывания $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ белком. Связывание катионов $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ двумя центрами парвальбумина описывали схемой *последовательного заполнения центров* (Permyakov et al. 2009a):



где K_{a1} и K_{a2} – равновесные константы связывания $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, оцениваемые из глобальной подгонки данных спектрофлуориметрического титрования апо-белка стандартными растворами катионов с последующим титрованием металл-загруженного белка сток-раствором ЭДТА-КОН.

Оценка кинетических констант диссоциации комплексов белка с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Изучение кинетики диссоциации $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ из ПА проводили при 20-25°C методом остановленного потока с флуоресцентной регистрацией, используя спектрофлуориметр Cary Eclipse (Varian Inc.), оснащенный устройством быстрого смешения RX.2000 (Applied Photophysics Ltd) с «мертвым» временем эксперимента 6 мс. Равные объемы (0,3 мл) 5-18 мкМ раствора белка (молярное отношение Ca^{2+} к белку 2:1, в случае Mg^{2+} – 5:1, либо к апо-форме белка добавляли 50-60 мкМ MgCl_2) и раствора 1-2 мМ ЭГТА/ЭДТА-КОН в буфере 10 мМ HEPES-КОН pH 8,2 (для диссоциации Ca^{2+}) или pH 7,3 (для диссоциации Mg^{2+} ; добавляли 1 мМ ЭГТА-КОН) смешивали с использованием пневматического привода. Каждый эксперимент повторяли 6 раз. Экспериментальные данные аппроксимировали теоретической кривой в рамках *схемы последовательного заполнения центров*.

Приготовление дисульфидного димера rWT β -ПА. Дисульфидный димер rWT β -ПА (дПА) получали путем Cu^{2+} -индуцированного окисления белка согласно работе (Clayshulte et al. 1990). Далее катионы металла удаляли, используя осаждение белка 3% ТХУ и гель-фильтрацию (см. выше; без добавления ДТТ). Раствор дПА хранили при –18°C.

Определение редокс-зависимости дисульфидной димеризации rWT β -ПА.

Редокс-потенциал Cys18 rWT β -ПА измеряли согласно методике, описанной в работе (Zernii et al. 2015). Полученные пробы анализировали с помощью SDS-электрофореза в 15% ПААГ в невосстанавливающих условиях. Гели окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250. Окислительно-восстановительное равновесие в системе белка с одной тиольной группой и парой восстановленный/окисленный глутатион (GSH/GSSG) описывали следующей схемой:



где $M - M$ и M обозначают дисульфидный димер и мономер белка, соответственно, а K – эффективная константа диссоциации димера.

Предсказание внутренней неупорядоченности белка. Оценку вероятности нахождения каждого аминокислотного остатка белка в неупорядоченном состоянии проводили с помощью алгоритма PONDR[®] VSL2P (Peng et al. 2006). Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили согласно алгоритму MUSCLE 3.8 (Edgar 2004). Все действия с баллами VSL2P проводили с использованием программного обеспечения PONDR analysis v.1 (ИБП РАН) (Permyakov et al. 2011).

Анализ аминокислотного состава белка. Среднее количество аминокислотных остатков и их стандартные отклонения в пределах групп ПА рассчитывали с использованием программы PONDR analysis v.1. Для поиска полноразмерных последовательностей парвальбуминов была использована база данных Swiss-Prot v.2014_05, при этом исключали ПА-подобные последовательности.

Глава 3. Результаты и обсуждение.

I. Влияние Nt-ацетилирования на структурно-функциональные свойства ПА

Известно, что N-концевой остаток ПА ацетилирован, за исключением изотипа pI 5,44 ПА латимерии (Gerday and Rao 1970). Тем не менее, для детального изучения свойств парвальбумина, как правило, используют рекомбинантный ПА, полученный в бактериальных системах экспрессии, что приводит к отсутствию N-концевого ацетилирования. Информация о влиянии Nt-ацетилирования на свойства ПА в литературе крайне ограничена. Так, сравнение свойств интактной и рекомбинантной форм ПА трески не выявило существенных различий в их IgE-связывающих свойствах (Ma et al. 2008). Для изучения воздействия Nt-ацетилирования на свойства α -парвальбуминов щуки и крысы были получены интактные и бактериально экспрессированные формы обоих белков.

I.1. Выделение и масс-спектрометрическая характеристика α -ПА

Интактные формы α -ПА щуки и крысы выделяли из скелетных мышц, а рекомбинантные формы («rWT») экспрессировали в штамме *E. coli* BL21(DE3) (векторы pET28b/pET29a). Чистоту выделенных белков подтверждали нативным и SDS-электрофорезом в ПААГ, а также отсутствием в спектрах поглощения и флуоресценции препаратов вклада остатков Trp и Tyr (отсутствуют в обоих белках). Молекулярную массу белков определяли методом масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (ESI-MS). Около 95% интактного α -ПА щуки характеризуется массой 11821 Да, что соответствует описанной ранее α_1 -изоформе (Permyakov et al. 2009b). Масса рекомбинантного белка (~95% образца) на 43 Да меньше (11778 Да), что соответствует вкладу ацетильной группы (42 Да). Следовательно, данные масс-спектрометрии свидетельствует об отсутствии в рекомбинантном α -ПА щуки N-концевой ацетильной группы. Аналогичная ситуация наблюдается в случае рекомбинантного α -ПА крысы.

1.2. Тепловая денатурация α -ПА

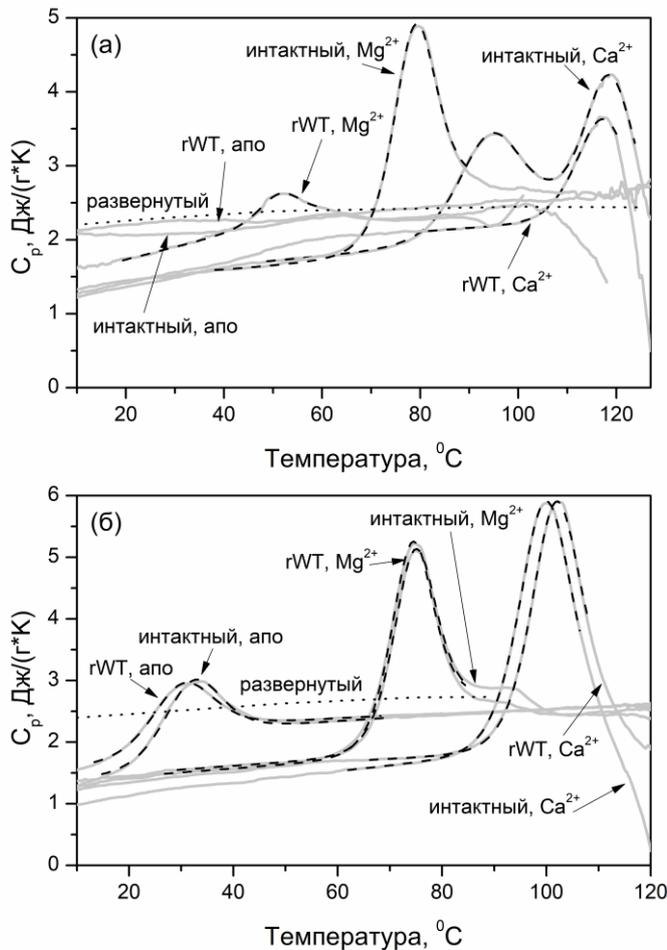


Рис. 2. Температурные зависимости удельной теплоемкости α -ПА щуки (а) и крысы (б), по данным ДСК при рН 9,0-9,2. Пунктирные кривые соответствуют теплоемкостям полностью развернутых ПА, рассчитаным согласно работе (Häckel et al. 1999b)

противоположность α -ПА щуки, интактная и рекомбинантная формы α -ПА крысы демонстрируют лишь незначительные различия в термостабильности, независимо от загрузки белка $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Рис. 2б). Следовательно, Nt-ацетилирование может индуцировать как слабые (α -ПА крысы), так и значительные (α -ПА щуки) изменения в тепловом поведении ортологов ПА.

Наблюдаемые различия термодинамических свойств интактной и рекомбинантной форм α -ПА щуки можно объяснить отличиями механизмов сворачивания белков в прокариотах и эукариотах. Поэтому мы провели рефолдинг интактной и rWT форм α -ПА щуки в условиях *in vitro*. Апо-состояния обеих форм белка были одинаковым способом развернуты гуанидин гидрохлоридом, с последующим пошаговым сворачиванием путем диализа против растворов с возрастающей концентрацией Ca^{2+} . Пересвернутые таким образом препараты α -ПА щуки не отличаются по тепловому поведению от исходных образцов (данные не показаны). Следовательно, различия в стабильности интактной и rWT форм α -ПА щуки связаны не с отличиями механизмов сворачивания белков в прокариотах и эукариотах, а с наличием/отсутствием Nt-ацетильной группы.

Данные метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) (Рис. 2) свидетельствуют об отсутствии детектируемого пика теплопоглощения для апо-форм интактного и рекомбинантного α -ПА щуки, а величины их удельных теплоемкостей близки к таковым для полностью развернутого белка (Рис. 2а). Это говорит об отсутствии жесткой третичной структуры в апо-белке, в соответствии с предыдущими результатами для интактного α -ПА щуки (Permyakov et al. 2008).

Термостабильность Mg^{2+} -связанной формы rWT α -ПА щуки на 26 $^{\circ}\text{C}$ ниже таковой для интактного белка (Рис. 2а). Ca^{2+} -загруженная форма rWT α -ПА щуки демонстрирует отсутствие выраженного низкотемпературного пика теплопоглощения, характерного для интактного белка (температура середины перехода, T_0 , 93 $^{\circ}\text{C}$). Вместо него наблюдается низкоэнтальпийный пик около 60 $^{\circ}\text{C}$, что может означать частичную заселенность отдельных состояний белка. В целом, Nt-ацетилирование α -ПА щуки существенно образом изменяет поведение металл-связанных форм белка в ходе тепловой денатурации. В

В соответствии с ранее предложенной структурной интерпретацией данных ДСК для интактного α -ПА щуки (Permyakov et al. 2009a), его АВ домен разворачивается в ходе низкотемпературного теплового перехода. В этом случае Nt-ацетилирование может влиять на поведение этого пика теплопоглощения, что подтверждается нашими данными (Рис. 2а).

1.3. Сравнение вторичных структур α -ПА

В соответствии с данными по термостабильности α -ПА (Рис. 2), вторичная структура рекомбинантного α -ПА крысы не отличается от интактной формы белка независимо от содержания катионов металлов, согласно данным метода КД (Таблица 1). Вторичная структура рекомбинантной формы α -ПА щуки заметно отличается от таковой для интактного белка, независимо от содержания металлов. Различия в α -спиральности интактной и рекомбинантной форм α -ПА щуки возрастают в следующем порядке: Ca^{2+} -загруженное, Mg^{2+} -загруженное и апо-состояние (7%, 11% и 24%, соответственно). Следовательно, связывание катионов металлов снижает структурные различия между интактной и рекомбинантной формами белка.

Таблица 1. Содержание элементов вторичной структуры в α -ПА при 3°C, согласно данным метода КД в дальней УФ-области при pH 7,3-8,9

Источник α -ПА	Форма белка	Состояние белка	Содержание α -спиралей, %	Содержание β -складок, %
Щука	интактный	апо	43±3	11±3
	rWT		19±3	20±3
	интактный	Mg^{2+}	57±3	5±3
	rWT		46±3	6±3
	интактный	Ca^{2+}	55±3	5±3
	rWT		48±3	5±3
Крыса	интактный	апо	54±3	6±3
	rWT		53±3	5 ±3
	интактный	Mg^{2+}	54±3	6±3
	rWT		53±3	6±3
	интактный	Ca^{2+}	53±3	7±3
	rWT		52±3	7±3

Отрыв ионов металлов сопровождается существенным снижением содержания α -спиралей в рекомбинантном α -ПА щуки, что частично компенсируется увеличением содержания β -складок. Интактная форма белка демонстрирует аналогичные, но существенно менее выраженные изменения. В целом, изменения вторичной структуры ПА, вызываемые Nt-ацетилированием, коррелируют с изменениями термодинамических свойств белков, наблюдаемых с помощью метода ДСК, за исключением апо-состояния α -ПА щуки.

1.4. Ограниченный протеолиз α -ПА

Дестабилизация вторичной структуры рекомбинантной формы α -ПА щуки (Таблица 1) предполагает дезорганизацию его полипептидной цепи. Для проверки склонности белка к протеолизу Ca^{2+} -загруженные формы интактного и рекомбинантного α -ПА щуки были обработаны α -химотрипсином при 37°C. В отличие от интактного α -ПА, оставшегося не расщепленным, рекомбинантный белок в основном расщепился до фрагментов с молекулярной массой менее 5 кДа. Для α -ПА крысы такой эффект не наблюдался.

Следовательно, Nt-ацетилирование α -ПА шуки придает белку устойчивость к расщеплению химотрипсином. Устойчивость ПА к воздействию пищеварительной системы человека считается фактором, способствующем его аллергенности, поэтому защитный эффект N-концевой ацетильной группы α -ПА шуки в отношении ферментов желудочно-кишечного тракта указывает на то, что эта группа служит одной из детерминант аллергенности ПА.

1.5. Металлсвязывающие свойства α -ПА

Поскольку апо- и металл-загруженные состояния рекомбинантного α -ПА шуки отличаются от таковых интактного белка по вторичной структуре (Таблица 1) и стабильности третичной структуры (Рис. 2), следует ожидать различий металлсвязывающих свойств этих форм белка. Равновесные константы связывания $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ α -ПА шуки, K_{a1} и K_{a2} , определяли методом собственной флуоресценции белка согласно схеме последовательного заполнения «EF-рук» белка [I] (Таблица 2). Величины K_{ai} ($i=1,2$) для связывания Ca^{2+} интактным α -ПА шуки соответствуют ранее опубликованным данным (Permyakov et al. 2008). Сродство к Ca^{2+} обеих «EF-рук» рекомбинантной формы α -ПА шуки на 1,3-3,4 порядка величины ниже такового для интактного белка. Аналогичный эффект наблюдается для связывания Mg^{2+} рекомбинантной формой белка: ее сродство к Mg^{2+} снижено на 1,9-2,3 порядка величины.

Таблица 2. Параметры связывания $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ α -ПА шуки при 25°C и pH 8,2, определенные методом собственной флуоресценции белка в рамках механизма последовательного заполнения «EF-рук» белка (Permyakov et al. 2009a). K_{ai} и k_{on1}/k_{off1} ($i=1,2$) обозначают равновесные и кинетические константы взаимодействия белка с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, соответственно

Форма α -ПА	K_{a1}, M^{-1}	K_{a2}, M^{-1}	$k_{on1}, M^{-1}c^{-1}$	$k_{on2}, M^{-1}c^{-1}$	k_{off1}, c^{-1}	k_{off2}, c^{-1}
Ca^{2+}						
интактный	$(6,8 \pm 0,2) \times 10^8$	$(3,5 \pm 0,5) \times 10^9$	$(3,3 \pm 0,6) \times 10^8$	$(3,5 \pm 0,9) \times 10^8$	$0,49 \pm 0,08$	$0,099 \pm 0,012$
rWT	$(3,7 \pm 0,2) \times 10^7$	$(1,4 \pm 0,3) \times 10^6$	$(2,9 \pm 0,4) \times 10^7$	$(5,3 \pm 1,7) \times 10^6$	$0,80 \pm 0,11$	$3,8 \pm 0,6$
Mg^{2+}						
интактный	$(4,47 \pm 0,09) \times 10^5$	$(1,3 \pm 0,6) \times 10^6$	$(3,5 \pm 1,0) \times 10^7$	$(1,4 \pm 0,9) \times 10^7$	80 ± 20	10 ± 2
rWT	$(5,5 \pm 2,4) \times 10^3$	$(7,2 \pm 0,6) \times 10^3$	$> 8,9 \times 10^5$	н/о*	> 160	н/о*

*н/о – не определено

Поскольку стабилизация интермедиата теплового разворачивания Ca^{2+} -загруженного состояния интактной формы α -ПА шуки (Рис. 2а, 105-110°C), по-видимому, достигается за счет высокого сродства белка к Ca^{2+} (Permyakov et al. 2009a), сниженное сродство к Ca^{2+} рекомбинантного α -ПА шуки должно приводить к дестабилизации этого интермедиата. Вероятно, этот эффект объясняет исчезновение у rWT α -ПА ярко выраженного низкотемпературного пика теплопоглощения, наблюдаемого для интактного α -ПА шуки.

В противоположность α -ПА шуки, для рекомбинантного α -ПА крысы не было выявлено существенных отличий от интактного белка в отношении сродства к

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, в соответствии с минимальными эффектами Nt-ацетилирования, зафиксированными при помощи других методов.

В соответствии с пониженным сродством к Ca^{2+} рекомбинантной формы α -ПА шуки, она демонстрирует в 1,6-38 раз повышенную кинетическую константу диссоциации ионов Ca^{2+} (k_{off}), согласно методу остановленного потока с регистрацией изменений собственной флуоресценции белка (Таблица 2). Кинетическая константа ассоциации ионов Ca^{2+} (k_{on}) при этом понижается в 11-66 раз. В целом, сродство к Ca^{2+} рекомбинантной формы α -ПА шуки, в основном, уменьшается вследствие замедления связывания Ca^{2+} (эффект больше выражен для «ЕF-руки», заполняющейся второй). Диссоциация Mg^{2+} из рекомбинантной формы белка происходит в пределах «мертвого» времени прибора (6 мсек), что не менее, чем в 2-16 раз быстрее диссоциации Mg^{2+} из интактной формы α -ПА, в соответствии с ослабленным сродством к Mg^{2+} рекомбинантного белка. Полученные здесь впервые величины кинетических констант взаимодействия $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ с ПА шуки близки к таковым для ортологов ПА (см. (Permyakov 2006)).

Nt-ацетилирование α -ПА шуки приводит к характерным изменениям в величинах K_{ai} ($i = 1,2$). Для связывания Ca^{2+} с интактной формой белка $K_{a1} < K_{a2}$, и наоборот для рекомбинантной формы белка ($K_{a2} < K_{a1}$) (Таблица 2). Аналогичная закономерность наблюдается для связывания Mg^{2+} белком и для констант скорости диссоциации Ca^{2+} . Эти факты указывают на то, что Nt-ацетилирование α -ПА шуки может сопровождаться изменением порядка заполнения металлами «ЕF-рук» белка.

Таким образом, в отличие от α -ПА крысы, Nt-ацетилирование α -ПА шуки существенным образом влияет на его равновесные и кинетические параметры связывания/диссоциации $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, что свидетельствует об изменении функционального статуса белка как растворимого фактора релаксации скелетных мышц. Способность N-концевой ацетильной группы изменять металлсвязывающие свойства ПА согласуется с данными о том, что АВ домен α -ПА шуки и ПА крысы модулирует их Ca^{2+} -связывающие свойства (Permyakov et al. 1991c, Henzl et al. 2004c).

Суммируя вышеприведенные данные, подробная характеристика апо- и металлсвязанных состояний различных форм ортологов α -ПА с помощью комбинации теплофизических, спектральных и биохимических методов показала для некоторых из них широкий спектр различий в физико-химических свойствах интактной и рекомбинантной форм α -ПА. В то время, как для α -ПА крысы отличия свойств этих форм не выявлены, для α -ПА шуки обнаружены неожиданно существенные различия структурных и функциональных свойств этих форм. Следовательно, Nt-ацетилирование необходимо для поддержания структурного и функционального статуса отдельных парвальбуминов.

Поскольку АВ домен интактного α -ПА шуки электростатически неактивен (Permyakov et al. 2008), изменение заряда, сопровождающее Nt-ацетилирование белка, вряд ли влияет на его стабильность. Поэтому структурная стабилизация α -ПА шуки вследствие Nt-ацетилирования может происходить за счет изменения гидрофобности N-конца белка, влияющего на четвертичную структуру белка.

По данным химического сшивания α -ПА 0,02% глутаровым альдегидом, в противоположность интактному белку rWT α -ПА шуки в Mg^{2+} -связанном и апо-состояниях обнаруживает существенную фракцию высокомолекулярных олигомеров и/или агрегатов (67-72%). Эти формы белка не обнаруживаются в Ca^{2+} -связанном состоянии α -ПА шуки и отсутствуют у α -ПА крысы. Процессы ассоциации белка, вероятно, связаны с его низкой структурной стабильностью (Рис. 2, Таблица 1), приводящей к экспонированию гидрофобных групп белка. Таким образом, по-

видимому, Nt-ацетилирование α -ПА щуки защищает белок от олигомеризации и агрегации посредством его структурной стабилизации.

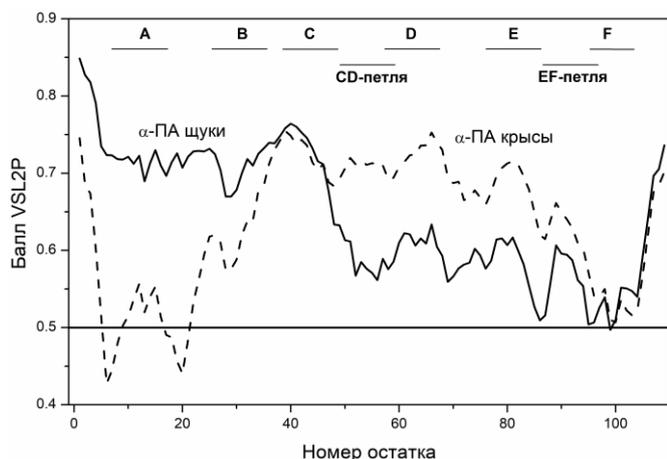


Рис. 3. Предсказания внутренней неупорядоченности в α -ПА щуки и крысы согласно алгоритму PONDR[®] VSL2P (Peng et al. 2006). Размечено расположение спиралей A-F белка.

Резкие различия в эффектах, вызываемых Nt-ацетилированием в изученных ортологах ПА (идентичность аминокислотной последовательности 60%), можно объяснить повышенной склонностью к неупорядоченности АВ домена α -ПА щуки: средние величины балла VSL2P составляют 0,73 и 0,57 для α -ПА щуки и крысы, соответственно (Рис. 3). Кроме того, в отличие от α -ПА крысы (Henzl and Graham 1999) апо- α -ПА щуки лишен жесткой третичной структуры (Permyakov et al. 2008), что может повышать чувствительность белка к различным структурным воздействиям.

II. Консервативный цистеин β -ПА в качестве возможного редокс-сенсора

Высококонсервативные остатки неактивной АВ-петли обеих изоформ ПА расположены в позициях 3, 5, 8 и 9 (Рис. 4). В положениях 5, 8 и 9, независимо от линии ПА, расположены преимущественно остатки Ala, Ser и Phe, соответственно. Различие между изоформами α и β заключается в остатке, расположенном в позиции 3: Cys для β -ПА, и Phe для α -ПА. Высококонсервативный остаток цистеина в инактивированной АВ-петле β -ПА потенциально способен участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, определяя функциональную специализацию β -ПА. Для изучения окислительно-восстановительных свойств этого остатка в качестве модельной системы нами был выбран β -ПА крысы. Изменения микроокружения Cys18 β -ПА крысы, вызываемые связыванием Ca^{2+} (Henzl and Tanner 2007), указывают на то, что структурные модификации этого остатка способны влиять на структурно-функциональные свойства белка. Мы апробировали это предположение путем введения в β -ПА крысы гомологичной аминокислотной замены C18S.

II.1. Выделение и масс-спектрометрическая характеристика β -ПА

Рекомбинантный β -ПА крысы и его мутантную форму C18S экспрессировали в штамме *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (вектор pET28a). Выделение и очистку белка проводили по ранее описанной методике (Kazakov et al. 2017). Чистоту выделенных препаратов белков подтверждали результатами нативного и SDS-электрофореза в ПААГ, а также отсутствием в спектрах поглощения и флуоресценции белка вклада Trp (отсутствует в β -ПА крысы). Для предотвращения окисления остатка C18 препарат β -ПА хранили в присутствии 2-МЕ. Удаление молекул 2-МЕ проводили гель-фильтрацией белка, предварительно обработанного свежеприготовленным раствором ДТТ. Согласно тесту Элмана содержание свободных тиольных групп в белке составляло ~89%.

Исследование молекулярной массы рекомбинантной формы β -ПА методом ESI-MS показало наличие двух основных фракций восстановленной формы белка. Одна из них (около 45%) имеет массу 12057 Да, что соответствует массе восстановленного белка без иницирующего остатка метионина (Met1). Вторая основная фракция (около 46%)

имеет массу на 131 Да больше, что соответствует вкладу Met1. Около 9% β -ПА соответствует Ca^{2+} -загруженному и окисленному состояниям вышеупомянутых форм белка. Основная часть (около 81%) C18S β -ПА имеет массу 12041 Да, что соответствует массе, ожидаемой для белка без Met1. Оставшаяся часть C18S β -ПА имеет массу, соответствующую белку с Met1.

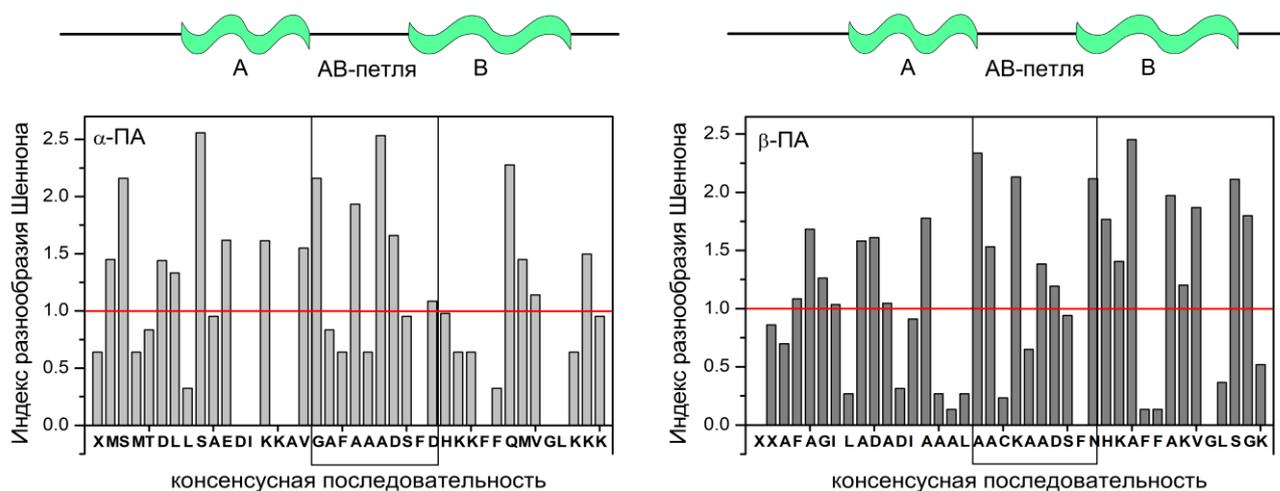


Рис. 4. Распределение индекса разнообразия Шеннона (H) для выравненных аминокислотных последовательностей α -ПА и β -ПА в области АВ-петли (черная рамка). Размечены положения спиралей А и В. Остаток вариабелен при величине $H > 2$; для высококонсервативных остатков $H < 1$.

II.2. Редокс-потенциал Cys18 β -ПА

Для исследования тиол-дисульфидного обмена

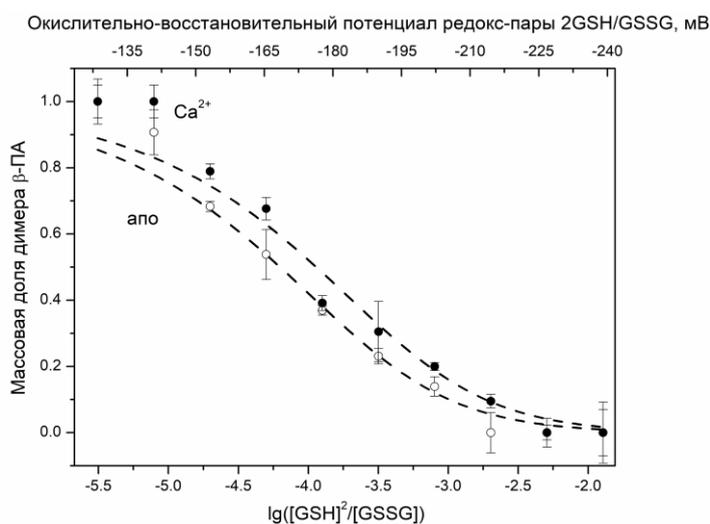


Рис. 5. Изучение равновесия между апо/ Ca^{2+} -формой дПА и редокс-парой GSH/GSSG при 35°C и pH 7,4 методом SDS-электрофореза в ПААГ в невозстанавливающих условиях

соответственно. Полученные значения близки к некоторым величинам E_h для внутриклеточных условий (от -179 мВ до -160 мВ) (Samiec et al. 1998), что указывает на возможность дисульфидной димеризации β -ПА *in vivo*. Внеклеточный β -ПА подвергается еще более окисляющему воздействию: величины E_h варьируют от -140 мВ до -131 мВ, достигая с возрастом и при некоторых патологиях -65 мВ (Samiec et al. 1998).

между рекомбинантной формой β -ПА крысы и редокс-парой GSH/GSSG использовали дисульфидный димер белка (дПА), полученный путем его Cu^{2+} -индуцированного окисления. Равновесие между дПА (1,5 мкМ) и редокс-парой GSH/GSSG (схема [II]) при 35°C изучали в зависимости от содержания Ca^{2+} согласно работе (Zernii et al. 2015) (Рис. 5). Независимо от содержания Ca^{2+} восстановление дПА наблюдали при величинах редокс-потенциала редокс-пары GSH/GSSG, E_h , около -170 мВ. Экспериментальные данные хорошо описываются схемой [II] (Рис. 5), приводя к следующим величинам E_h : $(-176,5 \pm 1,9)$ мВ и $(-168,4 \pm 0,9)$ мВ для Ca^{2+} -загруженной и апо-формы β -ПА,

Дисульфидный димер β -ПА, накопленный в окисляющих условиях, вероятно, будет обладать измененными функциональными свойствами. Так, ранее была показана эффективная активация димером β -ПА двух кальмодулин-зависимых ферментов (Mutus et al. 1988). Поскольку β -ПА регулирует уровень GSH/GSSG посредством Ca^{2+} -зависимого ингибирования глутатионредуктазы (Palmer et al. 1990), дисульфидная димеризация β -ПА способна влиять на внутриклеточный редокс-потенциал.

II.3. Влияние замены C18S на структурно-функциональные свойства β -ПА

Вторичная структура Ca^{2+} -загруженного состояния мутанта C18S β -ПА крысы эквивалентна таковой для белка дикого типа (Таблица 3). Содержание α -спиралей в апо- и Mg^{2+} -загруженной формах C18S снижено на 19-20%, частично за счет увеличения содержания β -складок. То есть существенно дезорганизованная вторичная структура апо-C18S полностью восстанавливается лишь при связывании Ca^{2+} . Изменения во вторичной структуре β -ПА крысы, вызванные заменой C18S, сопровождаются ростом доступности растворителю гидрофобных остатков белка, отслеживаемому по увеличению интенсивности флуоресценции бис-АНС в присутствии белка независимо от содержания $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ (Таблица 3).

Таблица 3. Вторичная структура β -ПА по данным КД и максимальная интенсивность флуоресценции бис-АНС (I_{max}) в присутствии белка при 20°C и pH 7,3-8,8

Форма β -ПА	rWT		C18S		rWT	C18S	бис-АНС
	α -спиралы, %	β -складки, %	α -спиралы, %	β -складки, %	I_{max} , произв.ед.		
апо	32±3	17±3	13±3	26±3	90	115	8
Mg^{2+}	53±3	9±3	33±3	16±3	74	98	8
Ca^{2+}	55±3	8±3	54±3	8±3	34	58	8

SDS-электрофорез в ПААГ препаратов β -ПА крысы, подвергнутых химическому сшиванию глутаровым альдегидом при 20°C, показал, что независимо от содержания $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ белок дикого типа и мутант C18S в основном мономерны. Поэтому увеличение среднего гидродинамического радиуса (R_h) rWT и C18S β -ПА, сопровождающее удаление катионов металлов или замену Ca^{2+} на Mg^{2+} (Таблица 4), отражает увеличение размеров молекулы белка вследствие дезорганизации его структуры, отслеживаемой методом КД (Таблица 3). Апо-состояние C18S характеризуется меньшей компактностью в сравнении с белком дикого типа. Связывание $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ приводит к исчезновению различий в гидродинамических размерах молекул rWT и C18S β -ПА (соответствуют свернутому мономеру белка).

Данные метода ДСК для апо-C18S не обнаруживают пик теплопоглощения, наблюдаемый в rWT апо- β -ПА (Рис. 6), причем удельная теплоемкость апо-C18S близка к таковой, предсказанной для полностью развернутого белка. Следовательно, введение замены C18S приводит к потере жесткой третичной структуры в апо-белке. $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -загруженные состояния C18S демонстрируют выраженный пик теплопоглощения, сдвинутый относительно rWT β -ПА в сторону низких температур на 4-5°C. То есть связывание $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ сглаживает различия в термостабильности rWT и C18S β -ПА, в соответствии с данными по гидродинамическому радиусу (Таблица 4) и содержанию α -спиралей (Таблица 3).

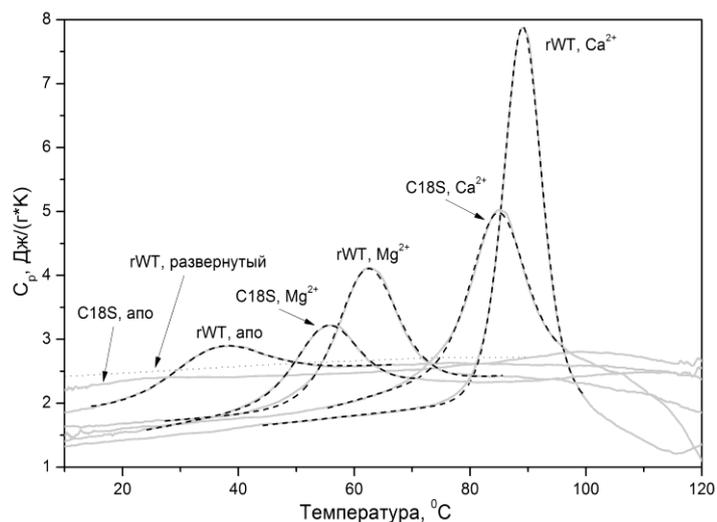


Рис. 6. Температурные зависимости удельных теплоемкостей различных форм rWT и C18S β -ПА крысы по данным ДСК при pH 9,0-9,2

В соответствии с пониженным сродством к Ca^{2+} C18S β -ПА метод остановленного потока с флуоресцентной регистрацией обнаруживает ускоренную диссоциацию Ca^{2+}

Таблица 4. Распределение β -ПА крысы по олигомерным формам при 20°C и pH 8,4, согласно методу химического сшивания глутаровым альдегидом. R_h - средний гидродинамический радиус белка по данным ДРС

Форма β -ПА	Состояние белка	Содержание мономера, %	Содержание димера, %	R_h , нм
rWT	апо	100	-	2,22±0,08
C18S		100	-	2,42±0,04
rWT	Mg^{2+}	100	-	2,01±0,06
C18S		100	-	1,97±0,04
rWT	Ca^{2+}	96	4	1,80±0,03
C18S		95	5	1,81±0,04

основном происходит вследствие замедления связывания Ca^{2+} .

В целом, редокс-потенциал высококонсервативного остатка Cys18 β -ПА крысы составляет от -168 до -176 мВ (редокс-пара GSH/GSSG), что близко к физиологическому уровню. Структурные данные обнаруживают экспонирование Cys18 растворителю при отрыве катионов кальция (Henzl and Tanner 2007) (Рис. 1), что объясняет повышенную реакционную способность апо-белка в отношении реактива Элмана (Clayshulte et al. 1990). Высвобождение Cys18 β -ПА крысы сопровождается разрывом водородных связей между карбонильным кислородом Cys18 и атомами азота боковой цепи Arg75, а также исчезновением солевого мостика между боковыми цепями Arg75 и Glu81. При этом происходит образование водородной связи между боковыми цепями Arg75 и Glu25. Заметные Ca^{2+} -индуцируемые изменения в доступности Cys18 к растворителю и его вовлеченность в сети взаимодействий указывают на то, что структурные модификации этого остатка способны влиять на процесс связывания Ca^{2+} и/или структурные свойства

Равновесные константы связывания Ca^{2+} β -ПА, K_{a1} и K_{a2} , определяли методом собственной флуоресценции белка согласно схеме последовательного заполнения «EF-рук» белка [I] (Таблица 5). Поскольку «EF-руки» CD и EF β -ПА относят к центрам с пониженным и повышенным сродством к Ca^{2+} , соответственно (Henzl, Agah et al. 2003a), величины K_{a1} и K_{a2} отражают параметры «EF-рук» EF и CD, соответственно (см. Таблицу 5). То есть «EF-рука» EF заполняется кальцием первой, причем введение замены C18S снижает ее сродство к Ca^{2+} на 1,5 порядка величины. При этом сродство к Ca^{2+} «EF-руки» CD остается на прежнем уровне.

Для C18S β -ПА наблюдается ускорение диссоциации Ca^{2+} из «EF-руки» EF на 38%, в то время как диссоциация Ca^{2+} из «EF-руки» CD происходит в пределах «мертвого» времени прибора (6 мсек). Поскольку связывание Ca^{2+} «EF-рукой» EF замедляется при введении замены C18S в 20 раз, падение сродства к Ca^{2+} мутанта C18S β -ПА в

Ca²⁺-связанной и/или апо-формы белка. Действительно, замена С18S заметным образом повлияла на структурно-функциональные свойства белка, что подразумевает возможность отклика β-ПА на разнообразные окислительные модификации тиольной группы, указывая на потенциальную редокс-сенсорную роль высококонсервативного тиола в неактивной петле «ЕF-руки» β-ПА. Потеря активности «ЕF-руки» за счет появления остатка Cys в петлевом участке наблюдается в нейрональных кальциевых сенсорах. Так, для высококонсервативного остатка Cys39 рековерина показано образование дисульфидного димера и окисленного мономера белка в условиях *in vivo* при окислительном стрессе, вызванном продолжительным интенсивным облучением глаз, причем окисленные формы рековерина обладают измененными функциональными свойствами (Zernii et al. 2018). Поэтому эволюционная потеря кальцийсвязывающей способности «ЕF-руки» в таких случаях, по-видимому, сопровождается приданием белку редокс-чувствительности.

Таблица 5. Параметры связывания Ca²⁺ rWT и С18S β-ПА крысы при 20°C и рН 8,2, определенные методом собственной флуоресценции белка в рамках схемы последовательного заполнения «ЕF-рук» белка [I] (Permyakov et al. 2009a). K_{ai} и k_{oni}/k_{offi} (i=1,2) обозначают равновесные и кинетические параметры взаимодействия, соответственно

β-ПА	K_{a1}, M^{-1}	K_{a2}, M^{-1}	$k_{on1}, M^{-1}c^{-1}$	$k_{on2}, M^{-1}c^{-1}$	k_{off1}, c^{-1}	k_{off2}, c^{-1}
rWT	$(1,3\pm 0,9)\times 10^9$	$(4\pm 2)\times 10^7$	$(3\pm 2)\times 10^9$	$(5\pm 4)\times 10^8$	$2,6\pm 0,3$	14 ± 5
С18S	$(4\pm 2)\times 10^7$	$(8\pm 4)\times 10^7$	$(1,5\pm 0,8)\times 10^8$	н/о*	$3,6\pm 0,4$	н/о*

*н/о - не определено

III. Структурная стабильность апо-парвальбуминов и ее предсказание

III.1. Структурная стабильность β-ПА кижуча

Отсутствие жесткой третичной структуры показано лишь для нескольких ПА: α и β изоформ ПА щуки (Permyakov et al. 2008) и β-ПА трески (Laberge et al. 1997). В прочих случаях структурная информация об апо-ПА недостаточно полная, либо показано наличие в апо-ПА жесткой третичной структуры с пониженной по сравнению с Ca²⁺-формой стабильностью (Таблица 6). Поскольку денатурированные апо-ПА обнаружены исключительно в холодолюбивых видах рыб, а апо-ПА с повышенной стабильностью найдены в теплокровных животных, внутренне неупорядоченные апо-ПА, по-видимому, свойственны холоднокровным видам, адаптированным к низкотемпературной среде обитания. Кижуч (серебряный лосось) является одним из наиболее приспособленных к холодной среде видов: средняя предпочтительная температура обитания +4°C (Cheung et al. 2013). Для изучения структурных свойств апо-ПА кижуча мы получили интактную и рекомбинантную формы белка.

β-1 ПА кижуча был выделен из скелетных мышц или экспрессирован в штамме *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (вектор рЕТ29а). Чистота белка была подтверждена нативным и SDS-электрофорезом в ПААГ. Молекулярная масса белка, оцененная методом ESI-MS, соответствует массе полностью восстановленного белка без остатка Met1, но с N-концевой ацетильной группой в интактном белке: 11752 Да и 11710 Да для интактной и рекомбинантной форм белка, соответственно.

Таблица 6. Изменение общей свободной энергии в ходе связывания Ca^{2+} парвальбумином, ΔG_{Ca} ($\Delta G_{\text{Ca}} = -RT \sum \ln(K_{a,i} \times [\text{H}_2\text{O}])$, $i=1,2$). Показаны средние величины балла PONDR[®] VSL2P (Peng et al. 2006) для участка 1-35 выравненной аминокислотной последовательности ПА ($\langle \text{VSL2P} \rangle_{1-35}$)

Организм, изоформа ПА (код UniProtKB) /интактный или rWT	$\langle \text{VSL2P} \rangle_{1-35}$	ΔG_{Ca} , кДж/моль	Ссылки
<i>Апо-форма не свернута</i>			
Щука, α (P02628)/интактный	0,726	-124	(Permyakov et al. 2008)
Кижуч, β (E1UJ20)/rWT	0,612	-114	данная работа
Щука, β (P02619)/интактный	0,768	-118	(Permyakov et al. 2008)
Треска, β (P02622)/интактный	0,569	-115	(Permyakov et al. 1987c)
<i>Апо-форма свернута</i>			
Крыса, α (P02625)/интактный	0,560	-123	данная работа
Карп, β (P02618)/интактный	0,575	-110	(Permyakov 2007)
Тимус курицы, β (P19753)/rWT	0,402	-112	(Henzl and Agah 2006, Tan and Henzl 2009)
Тимус курицы CPV3, β (P43305)/rWT	0,606	-104	(Henzl and Agah 2006)
Крыса, β (P02631)/rWT	0,524	-99	(Henzl et al. 2004c)

Согласно данным КД в дальней УФ-области, содержание α -спиралей в Ca^{2+} -загруженном rWT β -ПА кижуча составляет 54%, что согласуется с данными для β -ПА щуки, его ближайшего ортолога с известной третичной структурой (Таблица 7). Отрыв Ca^{2+} снижает содержание α -спиралей β -ПА кижуча в 2,5 раза, при росте содержания β -складок до 22%. Аналогичные Ca^{2+} -зависимые изменения α -спиральности белка показаны для β -ПА щуки (Таблица 7, (Permyakov et al. 2008)). В целом, Ca^{2+} -загруженный β -ПА кижуча обладает выраженной α -спиральной структурой, типичной для ПА, в то время как апо-белок существенно неупорядочен.

Аналогично α -ПА щуки и ПА трески (Permyakov et al. 2009a), данные метода ДСК для Ca^{2+} -загруженного rWT β -ПА кижуча обнаруживают сложное тепловое поведение белка (Рис. 7а): наличие двух пиков теплопоглощения с максимумами при 70°C и 116°C, с признаками агрегации белка при температурах выше 120°C. Апо- β -ПА демонстрирует отсутствие выраженного пика теплопоглощения и величину удельной теплоемкости, достигающую уровня, предсказанного для полностью развернутого белка, что свидетельствует об отсутствии жесткой третичной структуры. Отсутствие плато в начале кривой денатурации апо- β -ПА гуанидин гидрохлоридом при 20°C, отслеживаемой по молярной эллиптичности на 222 нм (Рис. 7б), свидетельствует об отсутствии устойчивости структуры белка к действию денатурирующего агента, что характерно для флуктуирующих структур. В отличие от Ca^{2+} -загруженного состояния апо- β -ПА расщепляется под действием α -химотрипсина (Рис. 7в), что указывает на экспонирование растворителю ароматических аминокислот белка (Hudaky, Kaslik et al. 1999). Вызываемое отрывом кальция увеличение доступности растворителю гидрофобных участков β -ПА подтверждается 8-кратным увеличением интенсивности флуоресценции бис-АНС и коротковолновым сдвигом максимума спектра его флуоресценции на 2 нм (Таблица 7). Суммируя, апо-форма β -ПА кижуча характеризуется отсутствием жесткой третичной структуры, что относит его к семейству внутренне неупорядоченных белков. Ранее, аналогичные результаты были получены для апо-форм α - и β -ПА щуки (Permyakov et al. 2008).

Таблица 7. Содержание элементов вторичной структуры в β -ПА по данным КД и литературным данным, и параметры флуоресценции бис-АНС в присутствии rWT β -ПА кижуча (λ_{max} , положение максимума спектра флуоресценции; I_{max} , максимальная интенсивность флуоресценции) при 20°C и pH 8,2/8,8

Форма ПА	β -ПА кижуча		β -ПА щуки		Флуоресценция бис-АНС в присутствии β -ПА кижуча	
	α -спирали, %	β -складки, %	α -спирали, %	β -складки, %	λ_{max} , нм	I_{max} , произв.ед.
апо	21 \pm 3	22 \pm 3	28 [#]	н.д. [#]	505	850
Ca ²⁺	54 \pm 3	6 \pm 3	58 [#] , 56 [†]	2 [†]	507	105

н.д., нет данных

[#] по данным работы (Permyakov et al. 2008)

[†] рентгеноструктурный анализ, код PDB 2рvb

Учитывая, что Nt-ацетилирование β -ПА кижуча способно повлиять на его структурно-функциональные свойства, мы сравнили свойства интактной и рекомбинантной форм белка на уровне вторичной, третичной и четвертичной структуры, а также их сродство к кальцию. Различия, выявленные между ними, менее выражены, нежели в случае α -ПА щуки, но более выражены в сравнении с эффектами, наблюдаемыми для α -ПА крысы. При этом вывод о глобальной неупорядоченности молекулы апо- β -ПА кижуча остается верным и для интактного белка.

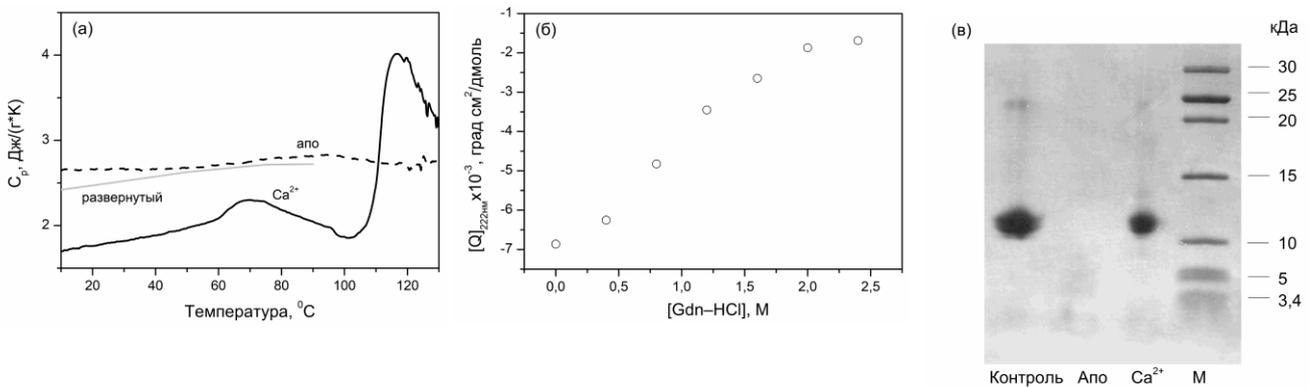


Рис. 7. Стабильность третичной структуры rWT β -ПА кижуча: профиль теплопоглощения при pH 9,0-9,2 (метод ДСК, а), разворачивание гуанидин гидрохлоридом при pH 8,8 (КД, б), химотрипсинолиз при pH 7,3 (SDS-электрофорез в ПААГ, в)

III.2. Предсказания относительной стабильности апо-ПА

Согласно бинарным методам предсказания неупорядоченности в белке CH-plot (Oldfield et al. 2005a) и CDF (Xue, Oldfield et al. 2009) все апо-ПА, представленные в Таблице 6, должны быть свернуты, за исключением β -ПА крысы. В поисках структурных основ неупорядоченности апо-форм отдельных ПА мы применили алгоритм предсказания внутренней неупорядоченности PONDR[®] VSL2P (Peng et al. 2006), выявивший повышенную склонность таких ПА к неупорядоченности участка 1-35 выравненной аминокислотной последовательности, включающего в себя спираль А, петлю АВ и N-концевую половину спирали В (Рис. 8). Беря в качестве граничного значения среднюю величину балла PONDR[®] VSL2P участка 1-35, равную 0,609 (критерий №1), удастся

правильно предсказать стабильность апо-форм всех ПА в Таблице 6, за исключением β -ПА трески. Анализ аминокислотного состава участка 1-35 показал, что апо-ПА будет развернут в случае отсутствия остатков Gln и наличия не менее четырех остатков Lys (критерий №2, Таблица 8). Применение этого критерия позволило точно предсказать стабильность всех апо-ПА в Таблице 6.

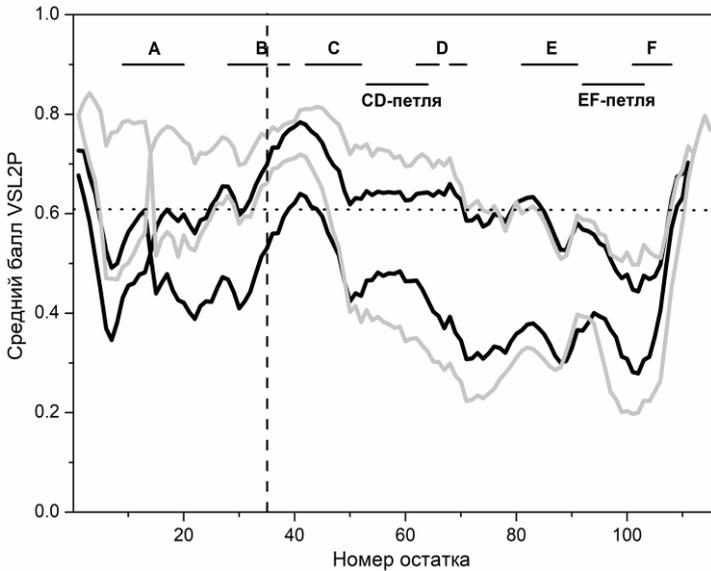


Рис. 8. Предсказания внутренней неупорядоченности в ПА: распределение средних баллов PONDR® VSL2P (Peng et al. 2006) по выравненной аминокислотной последовательности для ПА со свернутой (чёрные кривые) и развернутой (серые кривые) апо-формой. Показаны кривые, соответствующие максимальной и минимальной оценке баллов VSL2P. Размечены положения основных элементов вторичной структуры ПА. Вертикальная линия отмечает положение 35

Таблица 8. Особенности аминокислотного состава групп ПА, различающихся по стабильности их апо-форм, для участка 1-35 выравненной аминокислотной последовательности

Остаток	Количество остатков	
	Апо-форма не свернута	Апо-форма свернута
Lys	4,8±1,3	2,4±1,0
Gln	0	1,6±1,4

точностью критерия №1. Тем не менее, не свернутые апо-ПА, предсказанные с помощью критерия №1, в 2,5 раза чаще встречаются среди апо-ПА, неупорядоченность которых предсказана строгим критерием №2.

Несмотря на то, что предложенные нами структурные критерии неупорядоченности апо-ПА нуждаются в уточнении, можно заключить, что развернутость апо-формы ПА, по-видимому, является достаточно распространённым явлением, потенциально влияющим на сродство белка к ионам Ca^{2+}/Mg^{2+} (Gifford et al. 2007).

III.3. Взаимосвязь между стабильностью апо-ПА и сродством белка к Ca^{2+}

Одной из причин высокого сродства к Ca^{2+} некоторых представителей семейства «EF-руки» является неупорядоченность апо-формы белка (Gifford et al. 2007). В целях изучения влияния стабильности апо-формы ПА на его сродство к Ca^{2+} мы провели сравнительный анализ величин изменения свободной энергии в ходе связывания Ca^{2+} обоими центрами ПА, ΔG_{Ca} , между двумя группами ПА, демонстрирующими отсутствие или наличие жесткой третичной структуры в апо-состоянии (Таблица 6). Сродство рекомбинантного β -ПА кижуча к Ca^{2+} определяли методом собственной флуоресценции

белка (Permyakov et al. 2009a) согласно механизму последовательного заполнения «EF-рук» белка (схема [I]). Вне зависимости от стабильности апо-формы белка сродство к Ca^{2+} α -ПА (ΔG_{Ca} около -123 кДж/моль) заметно превышает таковое для β -ПА (ΔG_{Ca} от -118 до -99 кДж/моль). Среди β -ПА с развернутой апо-формой наблюдается тенденция к повышенному сродству к Ca^{2+} : ΔG_{Ca} от -118 до -114 кДж/моль против от -112 до -99 кДж/моль для свернутых апо- β -ПА. Для α -ПА такая закономерность не прослеживается, возможно, вследствие недостаточного объема экспериментальных данных. Таким образом, структурная нестабильность апо- β -ПА может служить фактором, способствующим повышению сродства белка к Ca^{2+} . Обнаруженная взаимосвязь между стабильностью апо-ПА и его сродством к Ca^{2+} может облегчить поиск ПА, обладающих высоким/низким сродством к Ca^{2+} и, соответственно, демонстрирующих повышенную/пониженную стабильность их Ca^{2+} -связанных форм, что востребовано при иммунотерапии аллергии к рыбе, а также разработке сенсоров катионов металлов, обладающих предельно высокой чувствительностью.

Заключение

Набором физико-химических, биохимических и теоретических методов нами изучены структурные и функциональные свойства ряда форм и конформационных состояний нескольких ортологов парвальбумина с целью установления роли АВ домена парвальбумина в поддержании структурно-функционального статуса белка.

В сравнении с интактным α -ПА щуки, его рекомбинантная форма демонстрирует существенным образом измененную конформационную стабильность и функциональную активность, свидетельствуя о влиянии N-концевой ацетильной группы на свойства ПА. При этом наличие N-концевой ацетильной группы не сказывается на свойствах α -ПА крысы. Такая разница в чувствительности парвальбуминов к введению данной модификации, по-видимому, объясняется большей склонностью некоторых ортологов ПА к мультимеризации при удалении N-концевой ацетильной группы. АВ домен α -ПА крысы менее склонен к неупорядоченности, что повышает устойчивость молекулы белка к структурным воздействиям в этой области.

Впервые показанная нами редокс-чувствительность высококонсервативного тиола β -парвальбумина требует проведения дополнительных исследований в условиях *in vivo*, а также изучения функциональной роли дисульфидной димеризации белка. Гомологичная замена С18S в рекомбинантном β -ПА крысы сопровождается снижением сродства белка к магнию и кальцию, а также потерей жесткой третичной структуры и существенной дезорганизацией вторичной структуры апо-белка. Наблюдаемые эффекты, по-видимому, являются следствием вовлеченности остатка 18 в систему внутримолекулярных взаимодействий. Предположительно, окислительные модификации этой тиольной группы также способны вызывать заметные изменения в функционировании β -ПА, что указывает на редокс-сенсорную роль С18.

Обнаружено, что наборы парвальбуминов, отличающиеся стабильностью апо-формы, различаются аминокислотным составом и склонностью к неупорядоченности N-концевого участка 1-35, включающего в себя спираль А, АВ-петлю и N-концевой участок спирали В. Структурная жесткость/гибкость АВ домена, по-видимому, имеет решающее значение для поддержания третичной структуры апо-ПА. Мы разработали два структурных критерия глобальной неупорядоченности апо-ПА на основе специфических свойств N-концевого фрагмента 1-35, что позволило предсказать неупорядоченность 16-19% апо-ПА. Таким образом, развернутость апо-формы ПА

является достаточно распространённым явлением, влияющим на сродство белка к ионам $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ в случае β -ПА.

Суммируя, структурно-функциональные свойства парвальбумина демонстрируют выраженную чувствительность к таким малым структурным воздействиям в области АВ домена, как Nt-ацетилирование и замена C18S, причем особенности строения АВ домена белка определяют структурную стабильность его апо-формы и сродство белка к катионам кальция. В целом, неактивный в отношении связывания $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ АВ домен парвальбумина выступает в качестве участка, модулирующего структурно-функциональные свойства белка, а также в роли потенциального редокс-сенсора.

Важность N-концевой ацетильной группы парвальбумина для поддержания его структурно-функционального статуса требует учета этого обстоятельства при экспериментальных исследованиях свойств рекомбинантных форм парвальбумина. Поскольку функциональная роль парвальбумина в большинстве тканей и органах остается неизвестной, полученные данные по чувствительности структуры белка к состоянию Cys18 и склонности белка к дисульфидной димеризации важны для поиска новых функциональных активностей этого белка. Поскольку мутантные парвальбумины с инактивированными кальцийсвязывающими центрами предложены для иммунотерапии аллергии на рыбу, предложенный в работе метод поиска парвальбуминов с наименьшим/наибольшим сродством к кальцию полезен для развития этого подхода. Этот же метод востребован при разработке сенсоров катионов металлов на основе парвальбумина, обладающих предельно высокой чувствительностью. Полученные в работе данные о чувствительности парвальбумина к «незначительным» структурным воздействиям на уровне его АВ домена открывают новые возможности использования белка в ведущихся в мире работах по коррекции заболеваний сердца при помощи мутантных форм парвальбумина, обладающих измененными кинетическими и равновесными параметрами взаимодействия с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

В приложении А представлены спектры КД в дальней УФ-области для исследуемых белков. **В приложении Б** представлена таблица, отражающая результаты анализа аминокислотного состава N-концевого участка 1-35, и теоретическое предсказание глобальной неупорядоченности апо-форм 69 единичных последовательностей ПА из базы данных Swiss-Prot.

ВЫВОДЫ

1) N-концевое ацетилирование существенным образом влияет на структурно-функциональные свойства α -парвальбумина щуки, включая стабильность вторичной, третичной и четвертичной структур белка, а также кинетические и равновесные параметры его взаимодействия с ионами кальция/магния. N-концевое ацетилирование α -парвальбумина крысы подобных эффектов не вызывает. Величина эффектов, вызываемых Nt-ацетилированием парвальбумина, коррелирует с уровнем неупорядоченности АВ домена белка.

2) Редокс-потенциал высококонсервативного тиола Cys18 АВ-петли β -парвальбумина крысы составляет от -168 до -176 мВ (глутатионовая редокс-пара), что близко к физиологически значимому уровню. Гомологичная замена C18S существенным образом влияет на структурно-функциональные свойства белка (стабильность его вторичной и третичной структур, равновесные параметры взаимодействия с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$). Полученные данные указывают на редокс-сенсорную роль остатка Cys18 парвальбумина.

- 3) Апо-форма β -ПА кижуча характеризуется существенно дезорганизованной вторичной структурой и потерей жесткой трехмерной структуры, что позволяет отнести его к семейству внутренне неупорядоченных белков.
- 4) На основе анализа особенностей строения АВ доменов парвальбумина предложены структурные критерии внутренней неупорядоченности апо-форм белка. 16–19% апо-парвальбуминов базы данных Swiss-Prot v.2014_05 удовлетворяют этим критериям.
- 5) Показано, что внутренняя неупорядоченность апо-формы β -парвальбумина служит признаком повышенного сродства белка к ионам Ca^{2+} .

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Статьи в журналах, индексируемых в базах данных Scopus и WoS:

1. Permyakov, S.E., Vologzhannikova, A.A., Emelyanenko, V.I., Knyazeva, E.L., Kazakov, A.S., Lapteva, Y.S., Permyakova, M.E., Zhadan, A.P., Permyakov, E.A. The impact of alpha-N-acetylation on structural and functional status of parvalbumin // Cell Calcium. 2012. Vol. 52. №5. P. 366-76.
2. Kazakov, A.S., Sokolov, A.S., Vologzhannikova, A.A., Permyakova, M.E., Khorn, P.A., Ismailov, R.G., Denessiouk, K.A., Denesyuk, A.I., Rastrygina, V.A., Baksheeva, V.E., Zernii, E.Yu., Zinchenko, Dm.V., Glazatov, V.V., Uversky, V.N., Mirzabekov T.A., Permyakov E.A., Permyakov S.E. Interleukin-11 binds specific EF-hand proteins via their conserved structural motifs // Journal of Biomolecular Structure & Dynamics. 2017, Vol. 35, №1. P. 78-91.
3. Vologzhannikova, A.A., Khorn, P.A., Kazakov, A.S. Ismailov, R.G., Sokolov, A.S., Uversky, V.N., Permyakov, E.A., Permyakov S.E. In search for globally disordered apo-parvalbumins: Case of parvalbumin β -1 from coho salmon // Cell Calcium. 2017, Nov. Vol. 67. P. 53-64.
4. Vologzhannikova, A.A., Khorn, P.A., Kazakov, A.S., Permyakov, E.A., Uversky, V.N., Permyakov, S.E. Effects of his-tags on physical properties of parvalbumins // Cell Calcium. 2019, Vol. 77. P. 1-7.

II. Тезисы конференций по теме диссертации:

1. Вологжанникова А.А., Пермяков С.Е., Емельяненко В.И., Князева Е.Л., Казаков А.С., Лаптева Ю.С., Пермякова М.Е., Жадан А.П., Пермяков Е.А. Влияние α -N-ацетилирования на структурный и функциональный статус парвальбумина // IV Съезд биофизиков России. – Сборник тезисов – Нижний Новгород, 2012. с. 65.
2. Вологжанникова А.А., Емельяненко В.И., Жадан А.П., Казаков А.С., Пермякова М.Е., Лаптева Ю.С., Князева Е.Л., Пермяков С.Е. Влияние N-концевого ацетилирования на структурно-функциональные свойства парвальбумина // 16-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Сборник тезисов – Пущино, 2012. с. 98-99.
3. Вологжанникова А.А., Хорн П.А., Казаков А.С., Соколов А.С., Пермяков Е.А., Пермяков С.Е. Структурная стабильность апо-парвальбуминов на примере β -парвальбумина кижуча (*Oncorhynchus kisutch*) // V Съезд биофизиков России. – Сборник тезисов – том 1 – Ростов-на-Дону, 2015. с. 75.
4. Вологжанникова А.А., Хорн П.А., Казаков А.С., Соколов А.С., Пермяков Е.А., Пермяков С.Е. Изучение закономерностей строения парвальбуминов, обуславливающих структурную стабильность их апо-форм // 20-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Сборник тезисов – Пущино, 2016. с. 162.