

## ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ШАПЕРОНОВ НА ПРОЦЕССЫ АГРЕГАЦИИ БЕЛКОВ, ПРОТЕКАЮЩИЕ В РАЗЛИЧНЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ РЕЖИМАХ

© 2023 В.В. Михайлова\*, Т.Б. Еронина, Н.А. Чеботарева, **Б.И. Курганов**

ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии имени А.Н. Баха,  
119071 Москва, Россия; электронная почта: mikhaylova.inbi@inbox.ru

Поступила в редакцию 20.10.2022

После доработки 29.11.2022

Принята к публикации 29.11.2022

Формирование и накопление белковых агрегатов отрицательно сказываются на внутриклеточных процессах в живой клетке и являются негативными факторами при производстве и хранении белковых препаратов. Химические шапероны способны предотвращать агрегацию белков, однако это их свойство не является универсальным и зависит от структуры белка-мишени и кинетики его агрегации. В настоящей работе изучено влияние бетаина (Bet) и лизина (Lys) на тест-системы, основанные на тепловой агрегации мышечной гликогенфосфорилазы *b* (ФБ) при 48 °С, УФ-облученной ФБ (УФ-ФБ) при 37 °С и апо-формы ФБ (апо-ФБ) при 37 °С, характеризующиеся порядком агрегации по белку ( $n$ ), равным 0,5; 1 или 2 соответственно. Методами динамического светорассеяния, дифференциальной сканирующей калориметрии и аналитического ультрацентрифугирования показано, что Bet защищает ФБ и апо-ФБ от агрегации, однако ускоряет агрегацию УФ-ФБ. В то же время Lys препятствует агрегации УФ-ФБ и апо-ФБ, но увеличивает скорость формирования агрегатов ФБ. Обсуждаются механизмы действия химических шаперонов на третичную и четвертичную структуры и кинетику тепловой агрегации белков-мишеней. Сравнение влияния химических шаперонов на тест-системы с разными кинетическими режимами агрегации позволяет получить более полную информацию о механизме их действия.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** агрегация, кинетический режим, химический шаперон, гликогенфосфорилаза *b*.

DOI: 10.31857/S0320972523010062, EDN: PBWUAU

### ВВЕДЕНИЕ

Потеря нативной структуры белка под влиянием повышенной температуры, изменения рН или ионной силы, УФ-облучения и других стрессовых воздействий может приводить к формированию аморфных или фибриллоподобных агрегатов [1, 2]. Накопление белковых агрегатов в живой клетке негативно влияет на внутриклеточные процессы и может провоцировать развитие таких заболеваний, как катаракта, сахарный диабет, нейродегенеративные заболевания [3–5]. Неконтролируемая агрегация также является негативным фактором при производстве и хранении белковых препаратов.

В общем виде процесс агрегации белков включает в себя стадии разворачивания белко-

вой молекулы (intermediate state), нуклеации и роста агрегатов за счет присоединения развернутых молекул к сформировавшимся ядрам [6, 7]. Для олигомерных белков стадия денатурации также включает их диссоциацию на мономеры [8]. Кинетику агрегации модельного белка в заданных условиях будет определять самая медленная стадия процесса. Если рассматривать агрегацию как необратимую реакцию, в которой  $n$  неагрегированных молекул белка (P) переходят в агрегированное состояние, то скорость агрегации ( $v_{agg}$ ) можно интерпретировать как:

$$v_{agg} = -d[P]/dt = nk[P]^n, \quad (1)$$

где [P] – концентрация неагрегированного белка,  $t$  – время,  $n$  – порядок агрегации по белку

Принятые сокращения: апо-ФБ – апо-форма гликогенфосфорилазы *b*; ДЛС – динамическое лазерное светорассеяние; ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; УФ-ФБ – УФ-облученная гликогенфосфорилаза *b*; ФБ – гликогенфосфорилаза *b*; АУС – аналитическое ультрацентрифугирование; Bet – бетаин; IS – ионная сила.

\* Адресат для корреспонденции.

и  $k$  – константа скорости агрегации  $n$ -го порядка [7]. Предложенный подход позволяет делать выводы о кинетическом режиме агрегации белков [9–11], который может определять способность различных агентов воздействовать на этот процесс.

Осмолиты накапливаются в клетке в ответ на неблагоприятные внешние условия и играют важную роль в защите живых клеток от осмотического, теплового и других видов стресса. Многие из осмолитов способны функционировать как химические шапероны: защищать клеточные компоненты от денатурирующих стрессовых воздействий, повышать стабильность белковых молекул, сохранять их структуру и функции [12–15]. Механизмы действия осмолитов и их потенциальное использование в качестве терапевтических молекул в настоящее время активно изучаются [16].

Бетаин (N,N,N-триметилглицин, Bet) является одним из наиболее эффективных и широко распространенных осмолитов как в прокариотических, так и в эукариотических клетках. В условиях стресса концентрация Bet в клетках может достигать значений 0,7–1,0 М [17]. Bet способен стабилизировать белки, ингибировать их агрегацию, активировать рефолдинг белков, а также стимулировать дезагрегацию амилоидных фибрилл [17–21]. С другой стороны, Bet может усиливать агрегацию/фибрилляцию полиглутамина или бычьего сывороточного альбумина [22, 23]. В некоторых тест-системах действие этого осмолита на агрегацию белка может варьироваться в зависимости от его концентрации или pH раствора [24, 25].

В качестве химических шаперонов способны выступать не только осмолиты. Известно, что L-лизин (Lys) может стабилизировать нативную структуру белков, повышать их растворимость, защищать их от аморфной агрегации и от инактивации [26–30]. Lys широко используется биотехнологами для хранения терапевтических белков [31]. Тем не менее существуют тест-системы, в которых Lys ускоряет агрегацию модельного белка или же его влияние на стабильность белковой молекулы и ее склонность к агрегации варьируется в зависимости от условий среды или концентрации аминокислоты [32–34].

Целью настоящей работы являлось изучение влияния химических шаперонов Bet и Lys на тест-системы, характеризующиеся различными кинетическими режимами агрегации. Мышечная гликогенфосфоорилаза  $b$  (ФБ) представляет собой димерный белок с молекулярной массой 194,7 кДа [35]. Ее тепловая агрегация

при 48 °С лимитируется стадией обратимой диссоциации димера на быстро денатурирующие мономеры [36]. Порядок агрегации по белку ( $n$ ) для данной тест-системы равен 0,5 [37]. УФ-Облучение ФБ (УФ-ФБ) или удаление пиридоксаль-5'-фосфата из активного центра фермента (апо-ФБ) приводит к изменению кинетического режима агрегации белка. Лимитирующей стадией тепловой агрегации УФ-ФБ при 37 °С является стадия структурной реорганизации молекулы белка;  $n = 1$  [38]. Агрегация апо-ФБ при 37 °С лимитируется скоростью бимолекулярной реакции присоединения развернутых белковых молекул к образовавшимся ядрам;  $n = 2$  [37]. Различие лимитирующих стадий тепловой агрегации этих белков может приводить к различию механизмов действия на них химических шаперонов.

Имеются данные, что тепловая агрегация ФБ при 48 °С ( $n = 0,5$ ) тормозится в присутствии Bet, но ускоряется в присутствии Lys [39]. В настоящей работе был проведен подробный анализ влияния Bet и Lys на кинетику тепловой агрегации ФБ. Впервые было исследовано влияние данных шаперонов на агрегацию УФ-ФБ и апо-ФБ при 37 °С ( $n = 1$  и  $n = 2$  соответственно). Сравнение действия химических шаперонов на тест-системы с различной кинетикой агрегации позволило более детально охарактеризовать механизмы действия Bet и Lys.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** В работе были использованы Hepes, гидрохлорид L-лизина («Sigma-Aldrich», США), бетаин («ICN Biomedicals Inc.», США), NaCl («Рехим», Россия), дитиотреитол (ДТТ; «Panreac», Испания). Воду для всех растворов готовили с использованием системы Easy-Pure II RF («Barnstead International», США). Все эксперименты проводились в 30 мМ Hepes (pH 6,8) с постоянной ионной силой ( $I_S$ ), равной 150 мМ, создаваемой NaCl там, где это было необходимо.

**Выделение и подготовка белков.** ФБ из скелетных мышц кролика выделяли, хранили и подготавливали к эксперименту согласно методикам, описанным в работах Kurganov et al. [36] и Eronina et al. [40]. УФ-Облучение ФБ проводили с использованием Hg-Xe лампы L8252 («Hamamatsu Photonics», Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при 6 °С, как описано ранее [38]. Мощность падающего света составляла 10,4 мВт/см<sup>2</sup>, время облучения составляло 15 мин, доза облучения составляла 9,4 Дж/см<sup>2</sup>.

Выделение апо-ФБ проводили согласно методике, описанной в работе Shaltiel et al. [41]. Сульфат-аммонийный осадок, полученный после отделения пиридоксальфосфата (PLP), растворяли в 30 мМ буфере HEPES-NaOH (pH 6,8), содержащем 150 мМ NaCl и 5 мМ ДТТ (для опытов, проводимых методом ДСК (см. ниже), буфер не содержал ДТТ). Оставшийся PLP и сульфат аммония отделяли от апо-ФБ на колонке с Sephadex G-25, уравновешенной тем же буфером. Нанофотометр NP80 («Implen», Германия) использовали для спектрофотометрического определения концентрации белков при 280 нм (коэффициент поглощения  $A_{\text{см}}^{1\%} = 13,2$ ).

#### Динамическое лазерное светорассеяние (ДЛС).

Метод ДЛС применялся для изучения кинетики тепловой агрегации ФБ при 48 °С, УФ-ФБ при 37 °С и апо-ФБ при 37 °С в отсутствие и в присутствии химических шаперонов. Кривые светорассеяния регистрировали с использованием корреляционного спектрометра Photocor Complex («PhotoCor Instruments Inc.», США), как описано в работах Eronina et al. [39, 40]. Буфер или растворы химических шаперонов в буфере инкубировали в ячейке в течение 5 мин при 48 °С для опытов с ФБ или при 37 °С – для опытов с УФ-ФБ или апо-ФБ перед добавлением белка-мишени до конечной концентрации 0,3 мг/мл. Все эксперименты были повторены не менее трех раз.

Полидисперсный анализ корреляционных функций флуктуаций интенсивности рассеянного света, полученных методом ДЛС, проводили с использованием программного обеспечения DynaLS («Alango», Израиль), как описано ранее [38]. Полученное значение коэффициента диффузии частиц ( $D$ ) применялось для расчета размеров гидродинамических радиусов  $R_h$  белковых молекул и их агрегатов в растворе с использованием уравнения Стокса–Эйнштейна:

$$D = k_B T / 6\pi\eta R_h, \quad (2)$$

где  $k_B$  – постоянная Больцмана,  $T$  – абсолютная температура, а  $\eta$  – динамическая вязкость растворителя. Коэффициенты преломления и значения динамической вязкости, необходимые для определения  $R_h$ , представлены в табл. П1 и П2 в Приложении.

#### Анализ кинетических кривых агрегации.

В отсутствие и в присутствии химических шаперонов кинетические кривые тепловой агрегации белков-мишеней можно описать уравнением [42]:

$$I - I_0 = v_0(t - t^*) - B(t - t^*)^2, \quad (t > t^*), \quad (3)$$

где  $I$  – интенсивность светорассеяния,  $t$  – время,  $I_0$  – начальная интенсивность светорассеяния в момент  $t = 0$ ,  $t^*$  – длительность стадии нуклеации, определяемая отрезком на оси абсцисс, отсекаемым теоретической кривой, рассчитанной из этого уравнения,  $v_0$  – начальная скорость процесса агрегации на стадии роста агрегатов и  $B$  – константа. Уравнение (3) применимо только для описания части кинетической кривой выше точки перегиба.

Размеры стартовых агрегатов ( $R_{h,0}$ ), детектируемых в растворе в начальный момент увеличения интенсивности светорассеяния, определяли на основании зависимости  $(I - I_0)$  от  $R_h$ , как описано ранее [43]. Размер агрегатов, детектируемых после завершения стадии нуклеации ( $R_h^*$ ), определяли на основании зависимости  $R_h(t)$  в момент времени  $t = t^*$ .

**Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).** Исследования влияния химических шаперонов на тепловое разворачивание ФБ и апо-ФБ проводились с использованием дифференциального сканирующего калориметра MicroCal VP-Capillary DSC («Malvern Instruments», США) при скорости нагрева 1 °С/мин. Концентрация белка составляла 1 мг/мл. В опытах с химическими шаперонами в контрольную и экспериментальную ячейки добавляли одну и ту же концентрацию шаперона. Корректировку калориметрических сканов, оценку термостабильности белка и расчет калориметрической энтальпии ( $\Delta H_{\text{cal}}$ ) проводили, как описано ранее [44].

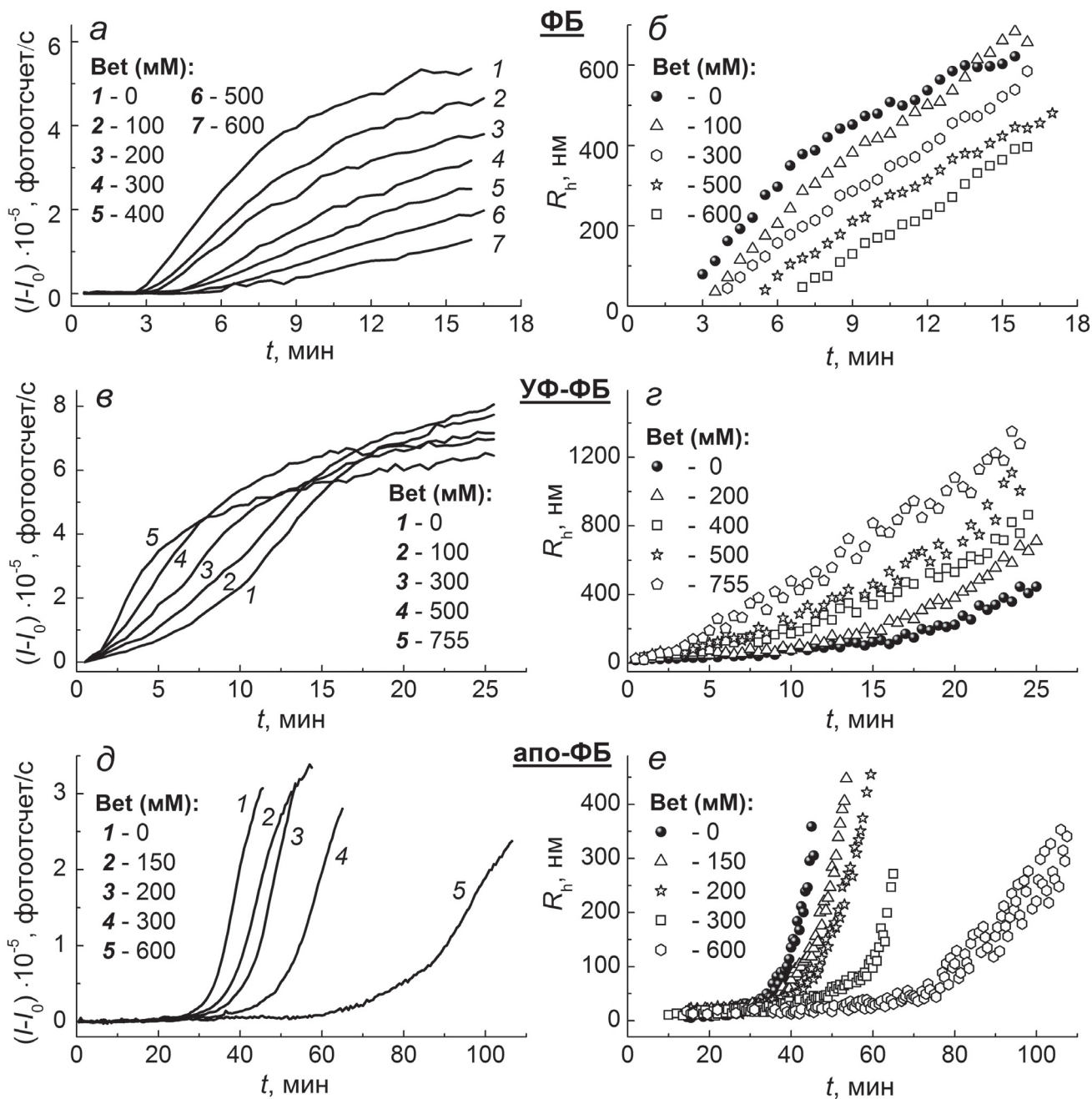
#### Аналитическое ультрацентрифугирование (AUC).

Эксперименты по скоростной седиментации проводились в аналитической ультрацентрифуге модели E («Beckman», США), оснащенной абсорбционной оптикой, фотоэлектрическим сканером, монохроматором и компьютером онлайн. В экспериментах использовали ротор с шестью отверстиями (An-G Ti) и 12-мм двухсекторные ячейки. Перед опытом ротор предварительно грели в термостате при 48 °С в течение ночи. Профили седиментации образцов регистрировали путем измерения оптической плотности при 280 нм. Все ячейки сканировались одновременно с интервалом в 2,5 мин. Распределения дифференциальных коэффициентов седиментации [ $c(s)$  vs  $s$ ] были определены при 48 °С и приведены к стандартным условиям (растворитель с плотностью и вязкостью воды при 20 °С) с помощью программы SEDFIT [45]. Скорость ротора во всех опытах составляла 48 000 об./мин. Значения плотности и динамической вязкости растворов, используемых в опытах AUC, представлены в таблицах П1 и П2 в Приложении.

**Анализ данных.** Программное обеспечение Origin («OriginLab Corporation», США) версии 8.0 и выше было использовано для анализа полученных данных. Для характеристики соответствия экспериментальных данных теоретическим уравнениям использовался коэффициент детерминации  $R^2$ . Все представленные в работе данные характеризовались значениями  $R^2 \geq 0,98$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние Bet на кинетику тепловой агрегации модельных белков.** Влияние химического шаперона Bet на агрегацию ФБ при 48 °С, УФ-ФБ при 37 °С и апо-ФБ при 37 °С изучалось методом ДЛС. На рис. 1 представлены зависимости интенсивности светорассеяния ( $I-I_0$ ) и размеров гидродинамических радиусов агрегатов ( $R_h$ )



**Рис. 1.** Влияние Bet на кинетику агрегации модельных белков. Зависимости  $(I-I_0)$  (а, в и д) и  $R_h$  (б, г и е) от  $t$  для ФБ при 48 °С (а и б), УФ-ФБ при 37 °С (в и г) и апо-ФБ при 37 °С (д и е) в присутствии Bet. Концентрации шаперона указаны на панелях; концентрация белка во всех экспериментах составляла 0,3 мг/мл. Исследования проводили в 30 мМ Neres (рН 6,8) при постоянной ионной силе ( $IS$ ) 150 мМ, создаваемой NaCl. Для наглядности на рис. 1 приведены данные не для всех изученных концентраций Bet

**Таблица 1.** Изменения основных параметров, характеризующих кинетику агрегации ФБ при 48 °С, УФ-ФБ при 37 °С и апо-ФБ при 37 °С, при повышении концентрации Bet

Основные параметры агрегации	Тест-система и диапазон концентраций Bet		
	ФБ при 48 °С ( $n = 0,5$ ); [Bet]: 0–600 мМ	УФ-ФБ при 37 °С ( $n = 1$ ); [Bet]: 0–755 мМ	апо-ФБ при 37 °С ( $n = 2$ ); [Bet]: 0–600 мМ
Длительность стадии нуклеации, $t^*$ , мин	возрастает с $3,02 \pm 0,04$ до $6,06 \pm 0,18$	снижается с $7,14 \pm 0,11$ до $1,22 \pm 0,07$	возрастает с $33,02 \pm 0,11$ до $73,70 \pm 0,75$
Начальная скорость роста агрегатов, $v_0 \cdot 10^{-4}$ , мин <sup>-1</sup>	снижается с $8,90 \pm 0,14$ до $1,40 \pm 0,09$	возрастает с $8,44 \pm 0,23$ до $12,00 \pm 0,33$	снижается с $3,38 \pm 0,10$ до $0,66 \pm 0,05$
Размер стартовых агрегатов, $R_{h,0}$ , нМ	снижается с $60,1 \pm 2,8$ до $19,8 \pm 2,7$	изменяется с $20,0 \pm 1,0$ до $26,3 \pm 2,1$	снижается с $16,4 \pm 0,9$ до $11,4 \pm 1,2$
Размер ядер, $R_h^*$ , нМ	снижается с $70,3 \pm 3,1$ до $28,8 \pm 1,7$	возрастает с $44,4 \pm 1,1$ до $63,7 \pm 1,3$ (100 мМ Bet); далее снижается до $35,4 \pm 1,2$	возрастает с $40,2 \pm 1,5$ до $67,4 \pm 2,7$

Примечание. Концентрация белка составляла 0,3 мг/мл (30 мМ Herpes (pH 6,8); IS = 150 мМ).

от времени ( $t$ ) для белков-мишеней в присутствии различных концентраций Bet. Согласно полученным данным, рост концентрации Bet в диапазоне 0–600 мМ сопровождается увеличением продолжительности лаг-периода на кинетических кривых агрегации ФБ и апо-ФБ и снижением значений  $I-I_0$  и  $R_h$  (рис. 1, а, б, д и е). Это указывает на то, что Bet защищает данные белки от тепловой агрегации. Прямо противоположное влияние Bet оказывает на УФ-ФБ, и рост концентрации Bet до 755 мМ стимулирует формирование агрегатов (рис. 1, в и з).

При анализе влияния шаперонов на кинетику агрегации модельных белков важно понимать, по какому пути идет агрегация этих белков в отсутствие добавок. Подобные исследования были проведены в наших предыдущих работах [37, 38]. На схеме представлены основные стадии процесса агрегации ФБ, УФ-ФБ и апо-ФБ в выбранных условиях; скорость-лимитирующая стадия для каждой тест-системы выделена серым цветом. Следует отметить, что все предлагаемые механизмы агрегации основаны на предположении, что рост белковых агрегатов происходит за счет присоединения развернутых белковых молекул к сформированным ядрам, а концентрация ядер по завершении стадии нуклеации пропорциональна исходной концентрации белка [46].

Количественная оценка влияния Bet на длительность стадии нуклеации ( $t^*$ ) и на начальную скорость роста агрегатов на стадии

роста агрегатов ( $v_0$ ) модельных белков была получена с использованием уравнения (3). Также были оценены размеры стартовых агрегатов ( $R_{h,0}$ ) и ядер ( $R_h^*$ ) (см. раздел «Материалы и методы»). Таблица 1 демонстрирует изменения значений этих параметров с ростом концентрации Bet для каждой тест-системы. Полный набор полученных данных для ФБ, УФ-ФБ и апо-ФБ в присутствии различных концентраций Bet представлен в табл. ПЗ–П5 в Приложении.

**Влияние Bet на термостабильность модельных белков.** Денатурация белка является одной из ключевых стадий процесса его агрегации (схема). Для оценки влияния Bet на тепловое разворачивание модельных белков использовался метод ДСК. Температурные зависимости избыточного теплопоглощения для ФБ (1 мг/мл) и апо-ФБ (1 мг/мл) в отсутствие и в присутствии 100 мМ или 600 мМ Bet представлены на рис. 2. Получить аналогичные данные для УФ-ФБ не представляется возможным, поскольку нативная третичная структура белка практически утрачивается в процессе УФ-облучения [38].

Температура максимума ( $T_{max}$ ) профиля ДСК для ФБ соответствует значению 57,8 °С (рис. 2, а; сплошная кривая). Добавление 100 или 600 мМ Bet повышает термостабильность ФБ и сдвигает кривую в сторону более высоких температур до  $T_{max} = 58,3$  °С или 59,9 °С соответственно (рис. 2, а; штриховая и штрихпунктирная кривые). Основные калориметрические параметры,

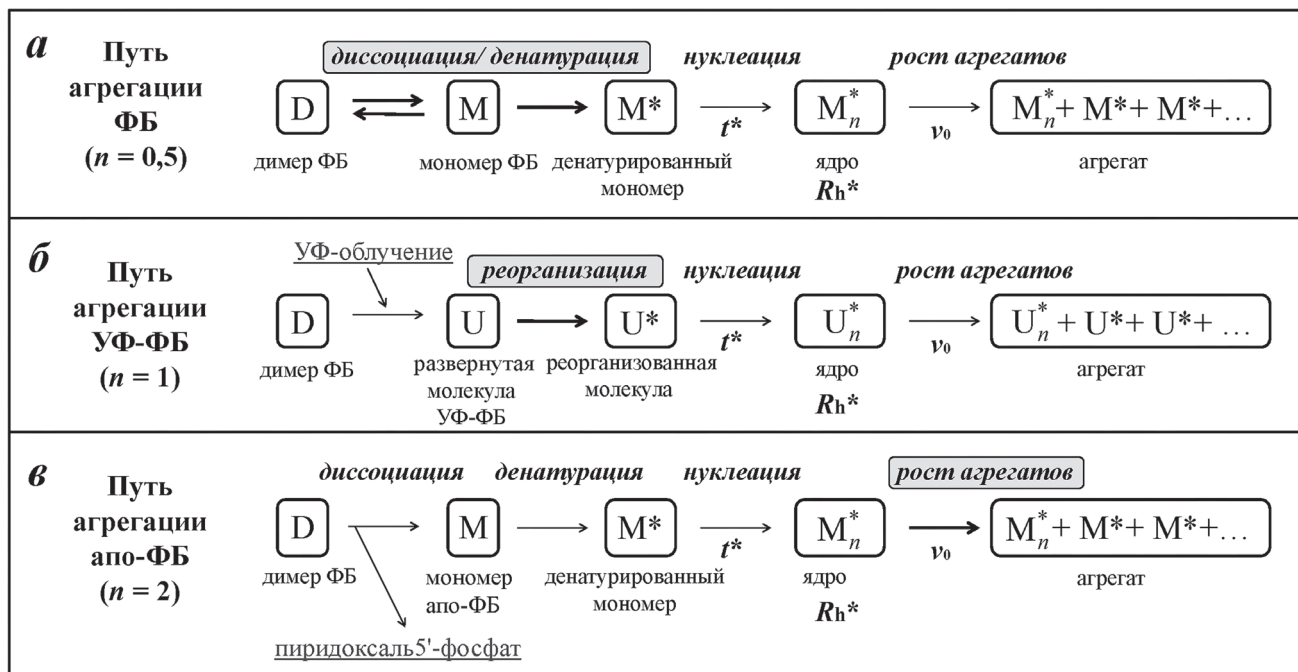


Схема. Механизмы тепловой агрегации ФБ при 48 °С (а), УФ-ФБ при 37 °С (б) и апо-ФБ при 37 °С (в). Для каждой тест-системы обозначены скорость-лимитирующая стадия (выделены серым цветом и жирными стрелками на схеме) и основные параметры, характеризующие стадию нуклеации ( $t^*$ ,  $R_h^*$ ) и стадию роста агрегатов ( $\nu_0$ )

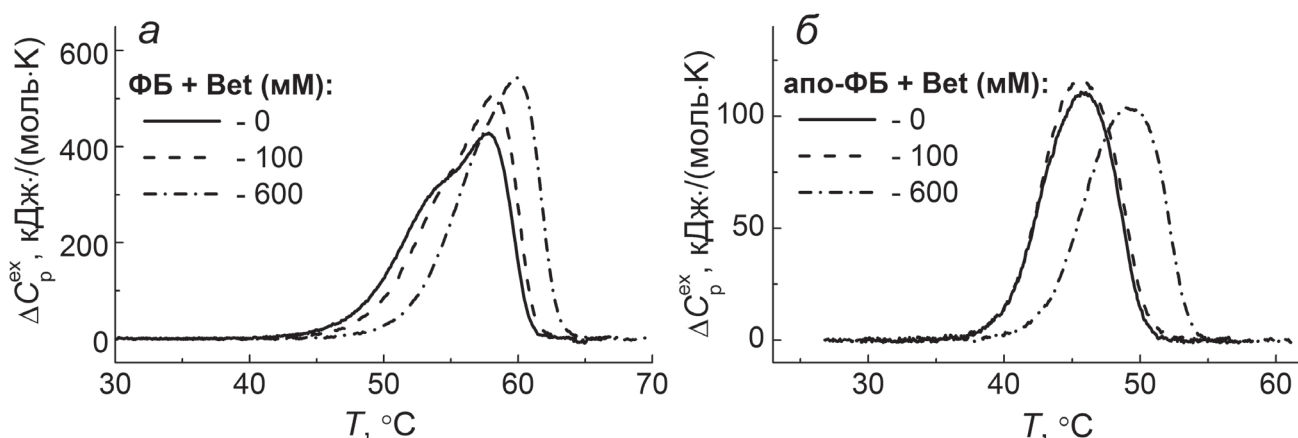


Рис. 2. Влияние Bet на термостабильность ФБ и апо-ФБ. Температурные зависимости избыточного теплопоглощения ( $\Delta C_p^{ex}$ ), полученные для ФБ (1 мг/мл, панель а) и апо-ФБ (1 мг/мл, панель б) в отсутствие и в присутствии 100 или 600 мМ Bet

характеризующие профили ДСК, представлены в табл. 2. Согласно табл. 2, калориметрическая энтальпия ( $\Delta H_{cal}$ ) теплового перехода ФБ, определяемая как площадь под кривой ДСК, незначительно увеличивается при добавлении шаперона, а сам переход становится более кооперативным, о чем свидетельствует уменьшение ширины пика. Это указывает на конформационные изменения, происходящие в молекуле ФБ под влиянием Bet.

Тепловая денатурация молекулы апо-ФБ (рис. 2, б; табл. 2) в отсутствие добавок характеризуется значениями  $T_{max} = 45,9$  °С и  $\Delta H_{cal} = 725$  кДж·моль<sup>-1</sup>. Присутствие Bet прак-

тически не влияет на энтальпию, ширину и форму пика, а положение  $T_{max}$  смещается в сторону более высоких температур до 49,2 °С только при высоких (600 мМ) концентрациях шаперона. Это означает, что Bet может повышать термостабильность апо-ФБ, однако не инициирует значительных структурных перестроек в молекуле белка.

**Механизм действия Bet на агрегацию ФБ при 48 °С.** Согласно схеме, первым этапом процесса тепловой агрегации ФБ является стадия денатурации белковой молекулы. Эта стадия неразрывно связана с обратимой диссоциацией нативного димера ФБ на мономеры ( $D \leftrightarrow M$ ).

**Таблица 2.** Основные калориметрические параметры тепловых переходов ФБ и апо-ФБ в присутствии химических шаперонов

Белок	Шаперон	$T_{max}$ , °C	$\Delta H_{cal}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	Ширина пика, °C
ФБ (1 мг/мл)	нет	57,8 ± 0,1	3470 ± 210	7,97 ± 0,09
	100 мМ Bet	58,3 ± 0,1	3620 ± 230	6,85 ± 0,07
	600 мМ Bet	59,9 ± 0,1	3700 ± 245	6,45 ± 0,09
	100 мМ Lys	53,9 ± 0,1	3750 ± 260	8,93 ± 0,11
апо-ФБ (1 мг/мл)	нет	45,9 ± 0,1	725 ± 45	6,30 ± 0,07
	100 мМ Bet	45,7 ± 0,1	775 ± 47	6,44 ± 0,09
	600 мМ Bet	49,2 ± 0,1	730 ± 45	6,74 ± 0,08
	100 мМ Lys	46,1 ± 0,1	783 ± 50	6,38 ± 0,07

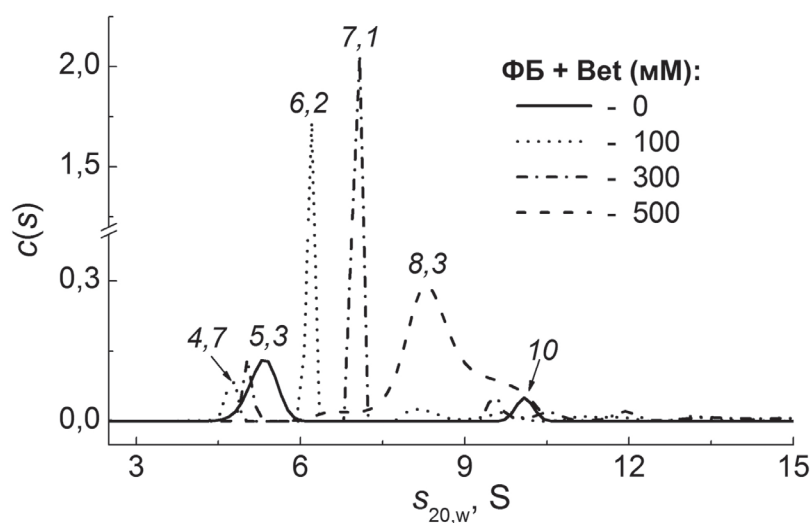
Примечание. В таблице приведены средние значения полученных данных ± стандартное отклонение.

Поскольку химические шапероны могут оказывать значительное влияние на этот процесс, олигомерное состояние ФБ в отсутствие и в присутствии Bet было исследовано методом АУС. Полученные данные седиментации представлены на рис. 3.

Распределение  $c(s)$  для ФБ показывает два пика с коэффициентами седиментации ( $s_{20,w}$ ) 5,3 и 10 S, которые соответствуют мономерной и димерной формам белка. Сравнение этого распределения с таковыми для смесей ФБ в присутствии Bet (100, 300 и 500 мМ; рис. 3) показало, что доля мономера ФБ (5,3 S) уменьшалась с ростом концентрации шаперона. При этом появляются новые пики с  $s_{20,w}$ , равные

6,2; 7,1 и 8,3 S, которые могут соответствовать частично развернутым димерам с разной конформацией. Небольшое плечо  $s_{20,w} = 10$  S на распределении  $c(s)$  в присутствии 500 мМ Bet указывает на то, что небольшая часть димера может находиться в нативной форме.

Таким образом, данные АУС указывают на смещение равновесия  $D \leftrightarrow M$  в сторону димерной формы ФБ под влиянием Bet, что коррелирует с полученными ранее данными [40]. Способность осмолитов стабилизировать нативную структуру белков широко обсуждается в недавнем обзоре Sharma et al. [47]. Следует отметить, что краудинг, возникающий из-за присутствия высоких концентраций шаперонов,



**Рис. 3.** Влияние Bet на олигомерное состояние ФБ. Дифференциальные распределения по коэффициентам седиментации,  $c(s)$ , для ФБ (0,37 мг/мл) в отсутствие и в присутствии 100, 300 или 500 мМ Bet. Значения коэффициента седиментации выделены курсивом. Распределения  $c(s)$  были получены при 48 °C и приведены к стандартным условиям. Общее время при 48 °C составило 80 мин

также может препятствовать диссоциации ФБ и стабилизировать димерную форму белка на этой стадии.

Димер ФБ денатурирует медленнее, чем его мономер [36], что объясняет повышение термостабильности белка в присутствии Vet (данные ДСК). Стабилизация третичной и четвертичной структуры молекулы ФБ с ростом концентрации Vet приводит к снижению скорости его разворачивания под действием температуры. Согласно данным ДЛС (табл. 1), снижение параметра  $v_0$  свидетельствует о замедлении процесса слипания развернутых белковых молекул. Длительность стадии нуклеации возрастает (параметр  $t^*$ ), а значительное уменьшение размеров  $R_{h,0}$  и  $R_h^*$  может означать, что в образовании стартовых агрегатов и ядер участвует меньшее количество развернутых белковых молекул или что конформация этих молекул более компактна.

Можно заключить, что защитный эффект Vet при тепловой агрегации ФБ при 48 °С обусловлен в первую очередь ингибированием лимитирующей для данной тест-системы стадии диссоциации/денатурации ФБ ( $n = 0,5$ ; схема, а). Вследствие этого количество развернутых молекул белка в растворе нарастает медленно, что приводит к снижению скоростей формирования ядер и роста агрегатов.

**Механизмы действия Vet при тепловой агрегации апо-ФБ и УФ-ФБ.** В отличие от нативной ФБ, апо-ФБ является мономерным термолабильным белком, поскольку удаление пиридоксаль-5'-фосфата из активного центра фермента приводит к его диссоциации [48, 49]. При 37 °С стадия денатурации апо-ФБ протекает быстро, а скорость-лимитирующей становится стадия роста агрегатов ( $n = 2$ ; схема, в) [37]. Данные ДЛС (рис. 1, д) показывают, что Vet в концентрации 600 мМ замедляет агрегацию белка-мишени, увеличивая значение  $t^*$  и снижая  $v_0$  (табл. 1). Это может быть связано со способностью осмолитов повышать термостабильность белков и защищать их от разворачивания в денатурирующих условиях [47], как это было показано для ФБ. Однако данные ДСК показывают, что Vet в концентрации 100 мМ практически не влияет на тепловое разворачивание апо-ФБ (рис. 2, б; табл. 2). Повышение термостабильности белка при высокой концентрации шаперона (рис. 2, б; штрихпунктирная кривая) может быть связано с эффектом краудинга, который стабилизирует более компактную конформацию и препятствует разворачиванию белка. В рамках предложенного механизма (схема, в) полученные результаты можно объяснить тем, что Vet неэффективно

ингибирует относительно быструю стадию разворачивания апо-ФБ, однако он значительно замедляет стадию роста агрегатов. Стабилизирующее воздействие осмолитов на структуру белков во время стресса обсуждается во многих работах [13, 14, 17, 47]. Однако исследования группы Pielak указывают на необходимость учитывать влияние осмолитов не только на стабильность белков, но и на белок-белковые взаимодействия, такие как ассоциация/агрегация и формирование комплексов [50]. Это коррелирует с полученными нами данными по защитному действию Vet при агрегации апо-ФБ. Сравнение эффекта Vet на ФБ и апо-ФБ показывает, что данный шаперон может стабилизировать как нативное состояние белка, так и снижать скорость слипания белковых молекул друг с другом.

В то же время Vet стимулирует агрегацию УФ-ФБ при 37 °С (рис. 1, в и з). Известно, что УФ-излучение повреждает конформационные замки димеров ФБ, что приводит к диссоциации и разворачиванию белковой молекулы и утрате ее нативной структуры [38]. Это сопровождается изменением гидрофобности поверхности белка и образованием относительно устойчивых первичных кластеров размером ~10 нм [38, 51]. В результате процесс агрегации УФ-ФБ не включает стадию денатурации (схема, б). Стадиям нуклеации и роста агрегатов предшествует медленная стадия структурной реорганизации молекул УФ-ФБ, и порядок агрегации по отношению к белку становится равным единице ( $n = 1$ ) [38].

Недавние исследования показали, что метиламины способны образовывать комплексы с гидрофобными участками на поверхности белка [52, 53]. На поверхности УФ-облученной молекулы ФБ такие участки могут образовываться за счет экспонирования колец ароматических аминокислот, с которыми Vet преимущественно связывается, нежели исключается с поверхности [54]. Можно предположить, что взаимодействие Vet с УФ-ФБ ускоряет структурную перестройку молекулы белка (скорость-лимитирующая стадия на схеме, б). Конформация молекул/кластеров изменяется и становится менее компактной, о чем свидетельствует увеличение гидродинамических радиусов  $R_{h,0}$  и  $R_h^*$  в присутствии 100 мМ Vet (табл. 1; табл. П4 в Приложении). Снижение значений  $R_h^*$  при дальнейшем увеличении концентрации Vet может быть обусловлено эффектом краудинга, который, с одной стороны, стимулирует формирование более компактной структуры белка, а с другой – ускоряет стадию агрегации. Увеличение значения  $v_0$  (табл. 1)



**Таблица 3.** Изменение основных параметров, характеризующих кинетику агрегации ФБ при 48 °С, УФ-ФБ при 37 °С и апо-ФБ при 37 °С при повышении концентрации Lys

Основные параметры агрегации	Тест-система и диапазон концентраций Lys		
	ФБ при 48 °С ( $n = 0,5$ ); [Lys]: 0–125 мМ	УФ-ФБ при 37 °С ( $n = 1$ ); [Lys]: 0–120	апо-ФБ при 37 °С ( $n = 2$ ); [Lys]: 0–124 мМ
Длительность стадии нуклеации, $t^*$ , мин	возрастает с $3,02 \pm 0,04$ до $3,55 \pm 0,05$	возрастает с $7,14 \pm 0,11$ до $12,46 \pm 0,36$	возрастает с $33,02 \pm 0,11$ до $48,71 \pm 0,32$
Начальная скорость роста агрегатов, $v_0 \cdot 10^{-4}$ , мин $^{-1}$	возрастает с $8,90 \pm 0,14$ до $10,17 \pm 0,18$	снижается с $8,44 \pm 0,23$ до $4,96 \pm 0,40$	снижается с $3,38 \pm 0,10$ до $0,98 \pm 0,14$
Размер стартовых агрегатов, $R_{h,0}$ , нм	возрастает с $60,1 \pm 2,8$ до $78,2 \pm 1,9$	снижается с $20,0 \pm 1,0$ до $13,9 \pm 0,8$	снижается с $16,4 \pm 0,9$ до $4,2 \pm 0,6$
Размер ядер, $R_h^*$ , нм	возрастает с $70,3 \pm 3,1$ до $112,5 \pm 1,7$	снижается с $44,4 \pm 1,1$ до $37,5 \pm 1,6$	не изменяется, $\langle R_h^* \rangle = 40,9 \pm 1,0$

Примечание. Концентрация белка составляла 0,3 мг/мл (30 мМ Herpes (pH 6,8);  $IS = 150$  мМ).

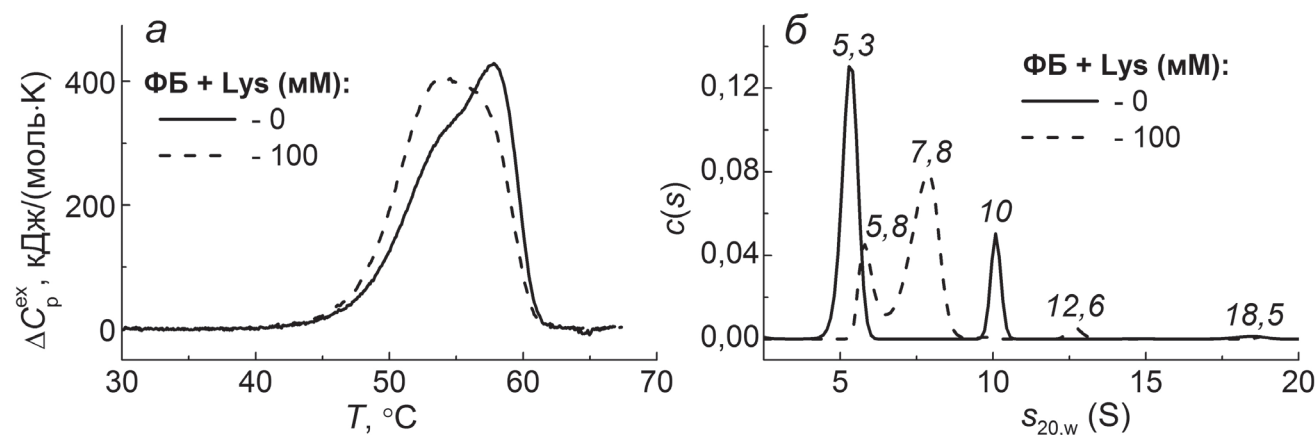
указывает на то, что Vet-индуцированное изменение конформации молекул УФ-ФБ стимулирует их слипание с ядрами. Ранее было показано, что добавление Vet к ФБ на стадии роста агрегатов ускоряет процесс агрегации белка [39]. Данные настоящей работы указывают на способность Vet взаимодействовать с поверхностью развернутого белка и усиливать его агрегацию.

**Ускорение тепловой агрегации ФБ под влиянием Lys.** Представляло интерес сравнить механизмы действия Vet на агрегацию модельных белков с действием другого шаперона. Согласно данным ДЛС (рис. П1 в Приложении), Lys стимулирует агрегацию ФБ при 48 °С, но значительно тормозит агрегацию УФ-ФБ и апо-ФБ при 37 °С. Изменения параметров, характеризующих кинетику агрегации белков при

повышении концентрации Lys, представлены в табл. 3 и табл. П6–П8 в Приложении.

Исследования стабильности ФБ методом ДСК (рис. 4, а; табл. 2) показали, что в присутствии 100 мМ Lys значение  $T_{max}$  смещается на 3,9 °С в сторону более низких температур. Это сопровождалось существенным изменением формы профиля ДСК и уменьшением кооперативности теплового перехода. По-видимому, Lys вызывает значительные конформационные перестройки в молекуле ФБ, что приводит к снижению ее термостабильности, и процесс разворачивания белка под влиянием температуры заметно ускоряется.

Важную информацию может дать оценка влияния Lys на олигомерное состояние ФБ. Данные АУС (рис. 4, б), полученные при нагревании белка в течение 100 мин при 48 °С,



**Рис. 4.** Влияние Lys на термостабильность и олигомерное состояние ФБ. а – Зависимости избыточного теплопоглощения ( $\Delta C_p^{ex}$ ) от температуры для ФБ (1 мг/мл); б – распределения  $c(s)$  для ФБ (0,38 мг/мл) в отсутствие и в присутствии 100 мМ Lys. Значения коэффициентов седиментации показаны курсивом. Распределения  $c(s)$  были получены при 48 °С и скорректированы до стандартных условий; общее время при 48 °С составило 100 мин

показывают, что распределение  $s(s)$  для ФБ в присутствии 100 мМ Lys (штриховая кривая) имеет два основных пика с  $s_{20,w}$ , равными 5,8 и 7,8 S, что может соответствовать смесям комплексов Lys с денатурированными мономерными и димерными формами белка различной конформации. Кроме того, в растворе присутствуют мелкие агрегаты 12,6 S. Оценка доли агрегированной ФБ ( $\gamma_{agg}$ ), осаждающейся при ускорении ротора в экспериментах АУС, указывает на тенденцию к увеличению значения  $\gamma_{agg}$  в присутствии Lys. Зарегистрировано, что через 100 мин при 48 °С величина  $\gamma_{agg}$  для ФБ изменяется от 69 до 73% в отсутствие и в присутствии 100 мМ Lys соответственно. При увеличении общего времени нагрева до 3,5 ч (данные АУС не представлены) значение  $\gamma_{agg}$  изменялось от 82% (для ФБ) до 92% в присутствии 25 мМ Lys. Коэффициент седиментации оставшегося в растворе неагрегированного белка составлял 3,5 S, что может соответствовать развернутой асимметричной мономерной форме. При увеличении концентрации Lys до 50 мМ в этих условиях весь белок преципитировал.

Можно заключить, что индуцированные Lys конформационные изменения в молекуле ФБ в процессе ее нагрева приводят к существенной дестабилизации как третичной, так и четвертичной структуры белка (данные ДСК и АУС). За счет смещения равновесия  $D \leftrightarrow M$  в сторону мономерной формы и снижения термостабильности белка стадия диссоциации/денатурации ФБ ускоряется (схема, а). Незначительное замедление стадии нуклеации, вероятно, связано с формированием более крупных агрегатов в присутствии Lys, о чем свидетельствует рост значений  $R_{h,0}$ ,  $R_h^*$  (ДЛС, табл. 3) и  $\gamma_{agg}$  (АУС).

Здесь интересно сравнить механизмы действия Lys и другой аминокислоты, аргинина (Arg), который часто влияет на белки сходным с Lys образом [26–30]. Arg ускоряет тепловую агрегацию ФБ, однако не вызывает значительных конформационных изменений в молекуле белка, не влияет на размеры  $R_{h,0}$  и  $R_h^*$  и уменьшает  $t^*$  [44]. Сходный с Lys эффект Arg на агрегацию ФБ также обусловлен сдвигом равновесия  $D \leftrightarrow M$  вправо. Однако Arg дестабилизирует преимущественно четвертичную структуру молекулы ФБ, обладая способностью разрушать конформационные замки и стимулировать диссоциацию олигомерного белка [44]. Дальнейшее ускорение стадии роста агрегатов характерно для обоих агентов, хотя увеличение параметра  $v_0$  с ростом концентрации Lys не очень значимо (табл. 3).

**Защитное действие Lys на тепловую агрегацию УФ-ФБ и апо-ФБ.** В случае УФ-ФБ и апо-ФБ при 37 °С Lys действует как химический шаперон, тормозя их тепловую агрегацию. В обоих случаях взаимодействие модельных белков с Lys характеризуется увеличением длительности стадии нуклеации и снижением скорости роста агрегатов (табл. 3; параметры  $t^*$ ,  $v_0$ ). Однако механизмы защиты от агрегации для двух белков, демонстрируемые Lys, различны из-за различий в путях агрегации самих белков (схема, б и в).

Согласно схеме и данным табл. 3, защитное действие Lys при тепловой агрегации УФ-ФБ обусловлено ингибированием процесса структурной реорганизации белковых молекул/кластеров УФ-ФБ, что приводит к снижению скорости их слипания. Уменьшение размеров  $R_{h,0}$  и  $R_h^*$  (табл. 3; табл. П7 в Приложении) может свидетельствовать о более компактной конформации/конфигурации белковой молекулы в присутствии Lys.

Интерпретация полученных данных для апо-ФБ при 37 °С иная. Согласно данным ДСК (табл. 2; рис. П2 в Приложении), основные калориметрические параметры, характеризующие плавление апо-ФБ в отсутствие и в присутствии 100 мМ Lys, практически не изменяются. Это означает, что основное защитное действие как Lys, так и Vet на тепловую агрегацию апо-ФБ направлено на снижение скорости слипания белковых молекул без существенного влияния на процесс их разворачивания.

Однако анализ размеров  $R_{h,0}$  и  $R_h^*$ , детектируемых в присутствии Vet или Lys (табл. 1 и 3), указывает на различия во влиянии этих шаперонов на комплексообразование и белок-белковые взаимодействия. Увеличение концентрации Lys от 0 до 124 мМ сопровождается снижением значений  $R_{h,0}$  в ~4 раза, что может быть следствием уменьшения количества молекул апо-ФБ, образующих стартовые агрегаты, или их более компактной конформацией. Это приводит к более длительному формированию ядер, размер которых остается постоянным независимо от концентрации Lys (табл. 3). Интересно отметить, что одинаковые размеры  $R_h^*$  получены для ФБ [44] и апо-ФБ (неопубликованные данные) и в присутствии различных концентраций Arg при  $IS = 150$  мМ. Возможно, это обусловлено влиянием электростатического взаимодействия зарядов аминокислот с поверхностью формирующихся стартовых агрегатов и ядер. Нейтрально заряженный Vet незначительно снижает значение  $R_{h,0}$ , но стимулирует рост ядер  $R_h^*$ . Скорость присоединения

белковых молекул к сформировавшимся ядрам (параметр  $v_0$ ) также снижается заметнее в присутствии Lys, чем Vet (табл. 3; табл. П5 и П8 в Приложении). Подобная эффективность Lys может быть связана с тем, что сродство этого шаперона к апо-ФБ в 3 раза выше, чем у Vet (данные не представлены).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были проанализированы и описаны различные механизмы действия химических шаперонов Vet и Lys на модельные белки, характеризующиеся различной кинетикой агрегации (ФБ при 48 °С,  $n = 0,5$ ; УФ-ФБ при 37 °С,  $n = 1$ ; апо-ФБ при 37 °С,  $n = 2$ ). Были сформулированы следующие выводы. 1) Механизм действия химических шаперонов на комплекс белок–мишень зависит от структуры и кинетического режима агрегации белка. 2) Сходный эффект на агрегацию белков может быть результатом разных механизмов действия шаперонов. 3) Сравнение действия химического шаперона на тест-системах с различной кинетикой агрегации дает более полную информацию о возможностях применения данного шаперона. Характеристика механизмов функционирования шаперонов, приведенная в данной работе, расширяет наши представления о влиянии химических шаперонов на разные стадии общего процесса агрегации белков и может быть полезна другим исследователям.

**Вклад авторов.** Б.И. Курганов – концепция и руководство работой; В.В. Михайлова, Т.Б. Еронина, Н.А. Чеботарева – проведение

экспериментов и анализ полученных данных; В.В. Михайлова, Т.Б. Еронина, Н.А. Чеботарева, Б.И. Курганов – обсуждение результатов исследования; В.В. Михайлова – написание текста; В.В. Михайлова, Т.Б. Еронина, Н.А. Чеботарева – редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-14-10055 для В.В.М., Т.Б.Е., Н.А.Ч., Б.И.К.) и Министерства науки и высшего образования РФ (для В.В.М., Т.Б.Е., Н.А.Ч.).

**Благодарности.** Эта статья посвящена памяти нашего научного руководителя, профессора Бориса Ивановича Курганова (1938–2021 гг.). Свою жизнь Б.И. Курганов посвятил изучению структуры и функций аллостерических ферментов, а также процессов их денатурации и агрегации. Основной сферой его интересов в последние годы было изучение кинетики агрегации белков и влияния на нее химических и белковых шаперонов. Б.И. Кургановым были разработаны подходы по установлению механизмов агрегации белков в различных тест-системах и методы количественной оценки и сравнения антиагрегационной активности шаперонов различной природы. Работы, выполненные под руководством Б.И. Курганова, свидетельствуют об успешном применении предложенных методов.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang, W., and Roberts, C. J. (2018) Protein aggregation – mechanisms, detection, and control, *Int. J. Pharm.*, **550**, 251-268, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.08.043.
2. Siddiqi, M. K., Alam, P., Chaturvedi, S. K., Shahein, Y. E., and Khan, R. H. (2017) Mechanisms of protein aggregation and inhibition, *Front. Biosci.*, **9**, 1-20, doi: 10.2741/e781.
3. Hartl, F. U. (2017) Protein misfolding diseases, *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 21-26, doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044518.
4. Harding, J. J. (1998) Cataract, Alzheimer's disease, and other conformational diseases, *Curr. Opin. Ophthalmol.*, **9**, 10-13, doi: 10.1097/00055735-199802000-00003.
5. Stefani, M., and Dobson, C. M. (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution, *J. Mol. Med. (Berl)*, **81**, 678-699, doi: 10.1007/s00109-003-0464-5.
6. Wang, W., Nema, S., and Teagarden, D. (2010) Protein aggregation-pathways and influencing factors, *Int. J. Pharm.*, **390**, 89-99, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.02.025.
7. Kurganov, B. I. (2002) Kinetics of protein aggregation. Quantitative estimation of the chaperone-like activity in test-systems based on suppression of protein aggregation, *Biochemistry (Moscow)*, **67**, 409-422, doi: 10.1023/a:1015277805345.

8. Chebotareva, N. A., Roman, S. G., and Kurganov, B. I. (2016) Dissociative mechanism for irreversible thermal denaturation of oligomeric proteins, *Biophys. Rev.*, **8**, 397-407, doi: 10.1007/s12551-016-0220-z.
9. Chebotareva, N. A., Eronina, T. B., Roman, S. G., Mikhaylova, V. V., Kleymenov, S. Y., and Kurganov, B. I. (2019) Kinetic regime of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>-induced aggregation of phosphorylase kinase at 40°C, *Int. J. Biol. Macromol.*, **138**, 181-187, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.240.
10. Borzova, V. A., Markossian, K. A., Kara, D. A., and Kurganov, B. I. (2015) Kinetic regime of dithiothreitol-induced aggregation of bovine serum albumin, *Int. J. Biol. Macromol.*, **80**, 130-138, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.06.040.
11. Kurganov, B. I. (2018) Kinetic regime of aggregation of UV-irradiated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **495**, 1182-1186, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.166.
12. Kinne, R. K. (1993) The role of organic osmolytes in osmoregulation: from bacteria to mammals, *J. Exp. Zool.*, **265**, 346-355, doi: 10.1002/jez.1402650403.
13. Yancey, P. H. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses, *J. Exp. Biol.*, **208**, 2819-2830, doi: 10.1242/jeb.01730.
14. Bolen, D. W. (2001) Protein stabilization by naturally occurring osmolytes, *Methods Mol. Biol.*, **168**, 17-36, doi: 10.1385/1-59259-193-0:017.
15. Kumar, R. (2009) Role of naturally occurring osmolytes in protein folding and stability, *Arch. Biochem. Biophys.*, **491**, 1-6, doi: 10.1016/j.abb.2009.09.007.
16. Khan, S. H., Ahmad, N., Ahmad, F., and Kumar, R. (2010) Naturally occurring organic osmolytes: from cell physiology to disease prevention, *IUBMB Life*, **62**, 891-895, doi: 10.1002/iub.406.
17. Caldas, T., Demont-Caulet, N., Ghazi, A., and Richarme, G. (1999) Thermoprotection by glycine betaine and choline, *Microbiology (Reading)*, **145**, 2543-2548, doi: 10.1099/00221287-145-9-2543.
18. Mortazavi, M., Shokrgozar, M. A., Sardari, S., Azadmanesh, K., Mahdian, R., et al. (2018) Physicochemical screening for chemical stabilizer of erythropoietin to prevent its aggregation, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, **48**, 121-127, doi: 10.1080/10826068.2017.1405270.
19. Venkatraman, A., Murugan, E., Lin, S. J., Peh, G. S. L., Rajamani, L., and Mehta, J. S. (2020) Effect of osmolytes on in-vitro aggregation properties of peptides derived from TGFβ1p, *Sci. Rep.*, **10**, 4011, doi: 10.1038/s41598-020-60944-0.
20. Bhojane, P. P., Joshi, S., Sahoo, S.J., and Rathore, A. S. (2021) Unexplored excipients in biotherapeutic formulations: natural osmolytes as potential stabilizers against thermally induced aggregation of IgG1 biotherapeutics, *AAPS PharmSciTech.*, **23**, 26, doi: 10.1208/s12249-021-02183-8.
21. Dar, M. A., Wahiduzzaman, Islam, A., Hassan, M. I., and Ahmad, F. (2018) Counteraction of the deleterious effects of urea on structure and stability of mammalian kidney proteins by osmolytes, *Int. J. Biol. Macromol.*, **107**, 1659-1667, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.021.
22. Saha, I., Singh, V., Burra, G., and Thakur, A. K. (2018) Osmolytes modulate polyglutamine aggregation in a sequence dependent manner, *J. Pept. Sci.*, **24**, e3115, doi: 10.1002/psc.3115.
23. Dasgupta, M., and Kishore, N. (2017) Selective inhibition of aggregation/fibrillation of bovine serum albumin by osmolytes: mechanistic and energetics insights, *PLoS One*, **12**, e0172208, doi: 10.1371/journal.pone.0172208.
24. Natalello, A., Liu, J., Ami, D., Doglia, S. M., and de Marco, A. (2009) The osmolyte betaine promotes protein misfolding and disruption of protein aggregates, *Proteins*, **75**, 509-517, doi: 10.1002/prot.22266.
25. Singh, L. R., Dar, T. A., Rahman, S., Jamal, S., and Ahmad, F. (2009) Glycine betaine may have opposite effects on protein stability at high and low pH values, *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 929-935, doi: 10.1016/j.bbapap.2009.02.005.
26. Sabbaghian, M., Ebrahim-Habibi, A., Hosseinkhani, S., Ghasemi, A., and Nemat-Gorgani, M. (2011) Prevention of thermal aggregation of an allosteric protein by small molecules: some mechanistic insights, *Int. J. Biol. Macromol.*, **49**, 806-813, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.07.016.
27. Li, S., Zheng, Y., Xu, P., Zhu, X., and Zhou, C. (2018) L-Lysine and L-arginine inhibit myosin aggregation and interact with acidic amino acid residues of myosin: The role in increasing myosin solubility, *Food Chem.*, **242**, 22-28, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.09.033.
28. Saadati-Eskandari, N., Navidpour, L., Yaghmaei, P., and Ebrahim-Habibi, A. (2019) Amino acids as additives against amorphous aggregation: *in vitro* and *in silico* study on human lysozyme, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **189**, 305-317, doi: 10.1007/s12010-019-03010-4.
29. Haghghi-Poodeh, S., Kurganov, B., Navidpour, L., Yaghmaei, P., and Ebrahim-Habibi, A. (2020) Characterization of arginine preventive effect on heat-induced aggregation of insulin, *Int. J. Biol. Macromol.*, **145**, 1039-1048, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.196.
30. Shiraki, K., Kudou, M., Fujiwara, S., Imanaka, T., and Takagi, M. (2002) Biophysical effect of amino acids on the prevention of protein aggregation, *J. Biochem.*, **132**, 591-595, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003261.
31. Arakawa, T., Dix, D. B., and Chang, B. S. (2003) The effects of protein stabilizers on aggregation induced by multiple-stresses, *Yakugaku Zasshi.*, **123**, 957-961, doi: 10.1248/yakushi.123.957.
32. Rishi, V., Anjum, F., Ahmad, F., and Pfeil, W. (1998) Role of non-compatible osmolytes in the stabilization

- of proteins during heat stress, *Biochem. J.*, **329**, 137-143, doi: 10.1042/bj3290137.
33. Wang, X., Feng, T., Wang, X., Zhang, X., and Xi, S. (2021) Gelation and microstructural properties of fish myofibrillar protein gels with the incorporation of L-lysine and L-arginine at low ionic strength, *J. Sci. Food Agric.*, **101**, 5469-5477, doi: 10.1002/jsfa.11195.
34. Smirnova, E., Safenkova, I., Stein-Margolina, B., Shubin, V., and Gurvits, B. (2013) L-arginine induces protein aggregation and transformation of supramolecular structures of the aggregates, *Amino Acids*, **45**, 845-855, doi: 10.1007/s00726-013-1528-7.
35. Barford, D., and Johnson, L. N. (1989) The allosteric transition of glycogen phosphorylase, *Nature*, **340**, 609-616, doi: 10.1038/340609a0.
36. Kurganov, B. I., Kornilaev, B. A., Chebotareva, N. A., Malikov, V. P., Orlov, V. N., et al. (2000) Dissociative mechanism of thermal denaturation of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase *b*, *Biochemistry*, **39**, 13144-13152, doi: 10.1021/bi000975w.
37. Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., and Kurganov, B. I. (2016) Kinetic regime of thermal aggregation of holo- and apoglycogen phosphorylases *b*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **92**, 1252-1257, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.08.038.
38. Mikhaylova, V. V., Eronina, T. B., Chebotareva, N. A., Kleymenov, S. Y., Shubin, V. V., and Kurganov, B. I. (2017) A thermal after-effect of UV irradiation of muscle glycogen phosphorylase *b*, *PLoS One*, **12**, e0189125, doi: 10.1371/journal.pone.0189125.
39. Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., Kleymenov, S. Y., Pivovarova, A. V., and Kurganov, B. I. (2022) Combined action of chemical chaperones on stability, aggregation and oligomeric state of muscle glycogen phosphorylase *b*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **203**, 406-416, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.106.
40. Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., Tugaeva, K. V., and Kurganov, B. I. (2022) Effect of betaine and arginine on interaction of alphaB-crystallin with glycogen phosphorylase *b*, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3816, doi: 10.3390/ijms23073816.
41. Shaltiel, S., Hedrick, J. L., and Fischer, E. H. (1966) On the role of pyridoxal 5'-phosphate in phosphorylase. II. Resolution of rabbit muscle phosphorylase *b*, *Biochemistry*, **5**, 2108-2116, doi: 10.1021/bi00870a044.
42. Mikhaylova, V. V., Eronina, T. B., Chebotareva, N. A., Shubin, V. V., Kalacheva, D. I., and Kurganov, B. I. (2020) Effect of arginine on chaperone-like activity of HspB6 and monomeric 14-3-3 $\zeta$ , *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2039, doi: 10.3390/ijms21062039.
43. Khanova, H. A., Markossian, K. A., Kurganov, B. I., Samoïlov, A. M., Kleïmenov, S. Y., et al. (2005) Mechanism of chaperone-like activity. Suppression of thermal aggregation of betaL-crystallin by alpha-crystallin, *Biochemistry*, **44**, 15480-15487, doi: 10.1021/bi051175u.
44. Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., Shubin, V. V., Kleymenov, S. Y., and Kurganov, B. I. (2020) Effect of arginine on stability and aggregation of muscle glycogen phosphorylase *b*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **165**, 365-374, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.101.
45. Brown, P. H., and Schuck, P. (2006) Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation, *Biophys. J.*, **90**, 4651-4661, doi: 10.1529/biophysj.106.081372.
46. Kurganov, B. I. (2002) Estimation of the activity of molecular chaperones in test-systems based on suppression of protein aggregation, *Usp. Biol. Khim.*, **42**, 89-138.
47. Sharma, G. S., Krishna, S., Dar, T. A., Khan, K. A., and Singh, L. R. (2021) Protecting thermodynamic stability of protein: the basic paradigm against stress and unfolded protein response by osmolytes, *Int. J. Biol. Macromol.*, **177**, 229-240, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.102.
48. Hedrick, J. L., Shaltiel, S., and Fischer, E. H. (1966) On the role of pyridoxal 5'-phosphate in phosphorylase. 3. Physicochemical properties and reconstitution of apophosphorylase *b*, *Biochemistry*, **5**, 2117-2125, doi: 10.1021/bi00870a045.
49. Gunar, V. I., Sugrobova, N. P., Chebotareva, N. A., Stepanova, S. V., Poznanskaya, A. A., Kurganov, B. I. in Fukui, T., Kagamiyama, H., Soda, K., and Wada, H. (Eds) (1990) *Enzymes Dependent on Pyridoxal Phosphate and Other Carbonyl Compounds as Cofactors*, Pergamon Press, Oxford, pp. 417-419.
50. Rydeen, A. E., Brustad, E. M., and Pielak, G. J. (2018) Osmolytes and protein-protein interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 7441-7444, doi: 10.1021/jacs.8b03903.
51. Roman, S. G., Chebotareva, N. A., Eronina, T. B., Kleymenov, S. Y., Makeeva, V. F., et al. (2011) Does the crowded cell-like environment reduce the chaperone-like activity of alpha-crystallin? *Biochemistry*, **50**, 10607-10623, doi: 10.1021/bi201030y.
52. Su, Z., Mahmoudinobar, F., and Dias C. L. (2017) Effects of trimethylamine-N-oxide on the conformation of peptides and its implications for proteins, *Phys. Rev. Lett.*, **119**, 108102, doi: 10.1103/PhysRevLett.119.108102.
53. Mukherjee, M., and Mondal, J. (2020), Unifying the contrasting mechanisms of protein-stabilizing osmolytes, *J. Phys. Chem. B.*, **124**, 6565-6574, doi: 10.1021/acs.jpcc.0c04757.
54. Felitsky, D. J., Cannon, J. G., Capp, M. W., Hong, J., Van Wynsberghe, A. W., et al. (2004) The exclusion of glycine betaine from anionic biopolymer surface: why glycine betaine is an effective osmoprotectant but also a compatible solute, *Biochemistry*, **43**, 14732-14743, doi: 10.1021/bi049115w.

## EFFECT OF CHEMICAL CHAPERONES ON PROCESSES OF PROTEIN AGGREGATION PROCEEDING IN DIFFERENT KINETIC REGIMES

V. V. Mikhaylova\*, T. B. Eronina, N. A. Chebotareva, and **B. I. Kurganov**

*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology"  
of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; e-mail: mikhaylova.inbi@inbox.ru*

The formation and accumulation of protein aggregates adversely affect intracellular processes in a living cell and are a negative factor in the production and storage of protein preparations. Chemical chaperones can prevent protein aggregation, but this property is not universal and depends on the structure of the target protein and the kinetics of its aggregation. In this work, we studied the effect of betaine (Bet) and lysine (Lys) on test systems based on thermal aggregation of muscle glycogen phosphorylase *b* (Phb) at 48°C, UV-irradiated Phb (UV-Phb) at 37°C and apo-form of Phb (apo-Phb) at 37°C and characterized by the order of aggregation with respect to the protein (*n*) equal to 0.5, 1 or 2, respectively. Dynamic light scattering, differential scanning calorimetry, and analytical ultracentrifugation have shown that Bet protects Phb and apo-Phb from aggregation, but accelerates the aggregation of UV-Phb. At the same time, Lys prevents UV-Phb and apo-Phb aggregation, but increases the rate of Phb aggregate formation. The mechanisms of chemical chaperone action on the tertiary and quaternary structures and the kinetics of thermal aggregation of the target proteins are discussed. Comparison of the effect of chemical chaperones on test systems with different kinetic regimes of aggregation provides more complete information about the mechanism of their action.

*Keywords:* aggregation, kinetic regime, chemical chaperone, glycogen phosphorylase *b*