

Хорн Полина Александровна

**СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ
КАЛЬЦИЙСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА «EF-РУКИ»
НА ПРИМЕРЕ ПАРВАЛЬБУМИНОВ**

Специальность 03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва
2021

Работа прошла апробацию в Институте биологического приборостроения с опытным производством Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

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

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт теоретической и экспериментальной биофизики».

Защита состоится «22» октября 2021 года в 15.00 на заседании диссертационного совета ФБМФ 03.01.02.018 по адресу: 141701, г. Долгопрудный Московской обл., Институтский переулок, д. 9.

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 «23» июня 2021 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

Белки семейства «ЕF-руки», эволюционно древнего, самого многочисленного (свыше 180 генов в геноме человека) и хорошо изученного суперсемейства кальцийсвязывающих белков, задействованы в регуляции множества биологических процессов за счет $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой модуляции активности других белков. Белки этого семейства участвуют в дифференцировке и пролиферации клеток, апоптозе, мышечном сокращении, фоторецепции, нервной проводимости, секреции и прочих жизненно важных процессах. Широкий спектр функциональных ролей белков семейства «ЕF-руки» обуславливает их участие в патогенезе сердечно-сосудистых, онкологических, нейродегенеративных, аутоиммунных, воспалительных и инфекционных заболеваний, что делает белки этого семейства ценным объектом для изучения как с точки зрения фундаментальной науки, так и для многочисленных медицинских и биотехнологических приложений.

Характерная особенность строения белков семейства «ЕF-руки» – наличие Ca^{2+} -связывающего мотива, состоящего из 30 аминокислотных остатков, составляющих две α -спирали, «Е» и «F», и консенсусной петли между ними, состоящей из 12 остатков, координирующей ион $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ атомами кислорода карбоксильных/карбонильных групп и молекул воды (запись PDOC00018 базы данных PROSITE; Рисунки 1Г и 1Д).

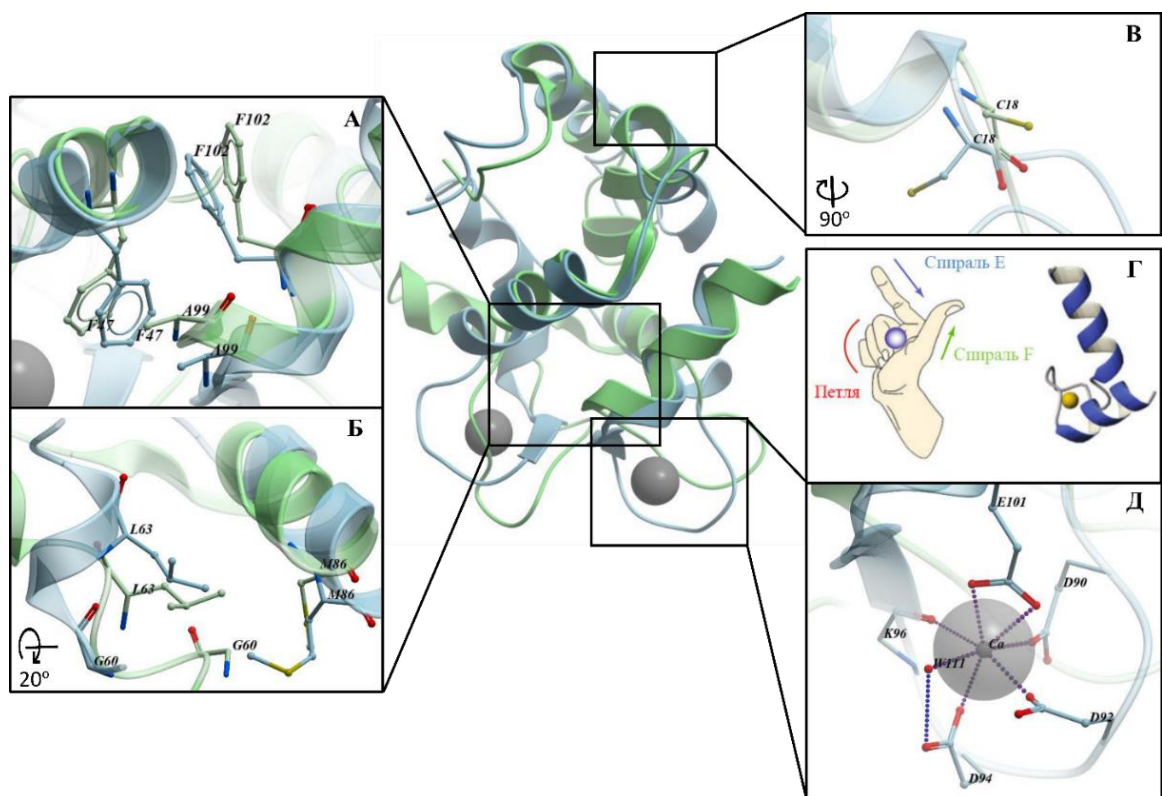


Рисунок 1. Наложенные трехмерные структуры апо-формы (зеленая, код PDB 2NLN) и Ca^{2+} -формы (голубая, код PDB 1RRO) β -ПА крысы. А, аминокислотные остатки «черного» кластера домена «ЕF-руки»; Б, остатки «серого» кластера; В, высококонсервативный Cys18; Г, схематическое изображение мотива «ЕF-руки»; Д, кальцийсвязывающая петля

Впервые мотив «ЕF-руки» был обнаружен в структуре парвальбумина (ПА), небольшого (11–12 кДа) цитозольного белка позвоночных (Рисунок 1), экспрессируемого в мышцах, сердечной ткани, нефронах, специфических нейронах, в некоторых клетках эндокринных желез, сенсорных клетках слухового органа и

некоторых других клетках. В большинстве случаев два мотива «EF-руки» объединены в спаренный домен, что обеспечивает кооперативность процесса связывания Ca^{2+} . Недавнее исследование структурных особенностей спаренного домена «EF-руки» обнаружило неэквивалентность входящих в состав домена единичных мотивов, а также позволило выявить два консервативных кластера аминокислотных остатков, содержащих по три остатка, названных «черным» (Рисунок 1А) и «серым» (Рисунок 1Б) кластерами. «Черный» кластер менее вариабелен и преимущественно содержит ароматические аминокислотные остатки, в то время как «серый» кластер менее консервативен и содержит как гидрофобные, так и полярные остатки. Оба кластера поддерживают структурные и функциональные свойства Ca^{2+} -связывающей петли Dx Dx DG и гидрофобного ядра домена «EF-руки». Предположительно, остатки «черного» кластера обеспечивают структурную целостность домена, в то время как остатки «серого» кластера обеспечивают «настройку» функциональных свойств домена «EF-руки». Тем не менее, структурное и функциональное значение «черного» и «серого» кластеров белков семейства «EF-руки» остается невыясненным.

Сродство белков семейства «EF-руки» к Ca^{2+} варьируется в широких пределах, достигая величин константы диссоциации комплекса, K_d , около 0,1 нМ. Большинство белков семейства «EF-руки» является белками-сенсорами Ca^{2+} , изменяющими свою структуру в ответ на связывание Ca^{2+} , что сопровождается изменениями их взаимодействия с белками-партнерами и соответствующей модуляцией активности последних. Белки-буферы Ca^{2+} , в частности ПА, участвуют в поддержании концентрации свободного Ca^{2+} в клетке. Отметим, что деление Ca^{2+} -связывающих белков на «кальциевые сенсоры» и «кальциевые буферы» является условным. Так, для некоторых β -ПА обнаружены свойства, характерные для кальциевых сенсоров. Более того, функциональная роль большинства белков семейства «EF-руки» не установлена.

Около трети мотивов «EF-руки» в ходе эволюции утратили способность связывать Ca^{2+} . Так, структура ПА включает в себя три мотива «EF-руки», два из которых, EF и CD, проявляют высокое ($K_d \sim 0,1 - 1$ нМ) сродство к кальцию, а один, АВ, неактивен. Тем не менее, он играет важную роль в поддержании структурной стабильности белка и его сродства к Ca^{2+} . β -ПА содержит высококонсервативный остаток цистеина в неактивной АВ-петле (Рисунок 1В), отличающий β изоформу ПА от α изоформы белка. Наличие консервативного цистеина в неактивной EF-петле характерно для многих белков семейства нейрональных кальциевых сенсоров и сопряжено с их редокс-чувствительностью. Тем не менее, функциональная роль высококонсервативного остатка цистеина в структуре β -ПА остается невыясненной.

Несмотря на выраженные различия представителей семейства «EF-руки» в способности связывать Ca^{2+} , координация иона металла в них осуществляется посредством атомов кислорода остатков Asp/Glu или карбонила основной цепи, а также молекул воды. В отсутствие связанного иона Ca^{2+} электростатическое отталкивание отрицательно заряженных атомов кислорода, участвующих в координации Ca^{2+} , дестабилизирует кальцийсвязывающий центр, что в отдельных случаях приводит к потере жесткой структуры белка. Единичные доказанные случаи такого поведения белков не позволяют судить о его распространенности. Термодинамические соображения указывают на то, что неупорядоченность апо-формы белка должна способствовать достижению максимального сродства белка к металлу. Неупорядоченность апо-формы наблюдается и в отдельных парвальбуминах, однако функциональная роль этого явления не ясна.

В целом, несмотря на обилие информации о структурных и функциональных свойствах белков семейства «ЕF-руки», многие фундаментальные аспекты их функционирования остаются невыясненными.

Цель и задачи исследования

Цель настоящей работы - изучить влияние отдельных структурных особенностей кальцийсвязывающих белков семейства «ЕF-руки» на их функционирование. В качестве объекта исследования выбран классический представитель семейства «ЕF-руки», парвальбумин, демонстрирующий все особенности, выбранные для изучения: «черный» и «серый» кластеры консервативных аминокислотных остатков спаренного домена «ЕF-руки», высококонсервативный остаток цистеина в инактивированной «ЕF-петле», внутренняя неупорядоченность апо-формы белка. В соответствии с выбранной целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный экспериментальный анализ роли «черного» и «серого» кластеров β -ПА крысы в поддержании структурных и функциональных свойств белка, используя точечный мутагенез.
2. Изучить окислительно-восстановительные свойства высококонсервативного остатка Cys18 инактивированной «ЕF-петли» β -ПА крысы, а также чувствительность структурно-функциональных свойств белка к малым структурным модификациям остатка Cys18 на примере замены C18S.
3. Оценить распространенность внутренней неупорядоченности апо-формы среди парвальбуминов, а также проверить взаимосвязь этого явления с повышенным сродством белка к катионам кальция.

Научная новизна

Все достигнутые результаты работы являются оригинальными. Впервые была экспериментально изучена чувствительность к аминокислотным заменам «черного» и «серого» кластеров консервативных аминокислотных остатков спаренного домена «ЕF-руки» на примере β -ПА крысы, что позволило установить неэквивалентность кластеров в поддержании структурно-функциональных свойств белка. Впервые показана потенциальная возможность редокс-сенсорной роли высококонсервативного остатка Cys в неактивной кальцийсвязывающей петле β -ПА. Предложены структурные критерии внутренней неупорядоченности апо-форм ПА, предсказывающие достаточно широкую распространённость этого явления среди парвальбуминов. Для β -ПА показано, что внутренняя неупорядоченность апо-формы белка сопряжена с повышенным сродством белка к Ca^{2+} , что соответствует теоретическим ожиданиям. В совокупности, на примере классического представителя семейства белков «ЕF-руки», β -ПА крысы, исследовано несколько не-/малоизученных фундаментальных аспектов функционирования белков этого семейства.

Практическая значимость

Белки семейства «ЕF-руки» участвуют в развитии сердечных, воспалительных, эндокринных, аутоиммунных, нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Знания о структурных и функциональных детерминантах этого биологически значимого семейства белков позволяют расширить наши фундаментальные представления о нем, а также использовать их для разработки подходов к терапии социально значимых заболеваний. В частности, возможно, например, расширение способов направленного изменения равновесных и кинетических параметров взаимодействия ПА с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ в целях лечения сердечных заболеваний. Поскольку

ПА является одним из основных пищевых аллергенов, понимание принципов структурной стабилизации ПА важно для разработки способов лечения аллергии на морепродукты. Роль ПА и ПА-содержащих клеток в патогенезе ряда заболеваний (шизофрения, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, аутизм, биполярное расстройство, клиническая депрессия, эпилепсия, бешенство, некоторые виды рака почек, потеря слуха, и пр.) остается невыясненной. Полученные в работе знания позволяют рассчитывать на разработку подходов к диагностике/терапии этих заболеваний, основанных на воздействии на ПА и/или ПА-содержащие клетки.

Положения, выносимые на защиту

1) Точечным мутагенезом показано, что проведенные аминокислотные замены остатков «черного» и «серого» кластеров спаренного домена «EF-руки» β -ПА крысы приводят к выраженным изменениям структурно-функциональных свойств белка, причем влияние замен остатков «черного» кластера β -ПА на величины ряда параметров белка в разы превышает таковое в случае замен остатков «серого» кластера белка.

2) Экспериментальная оценка величины окислительно-восстановительного потенциала высококонсервативного тиола Cys18 неактивной «EF-петли» β -ПА крысы указывает на возможность образования дисульфидного димера белка во внутриклеточных условиях, сопровождающихся повышением величины редокс-потенциала, и/или условиях внеклеточной среды. Полученные данные в совокупности с чувствительностью структурно-функциональных свойств белка к малым структурным модификациям остатка Cys18 (замена C18S) свидетельствуют о редокс-сенсорной роли высококонсервативного тиола неактивной «EF-петли» β -ПА.

3) Анализ базы данных Swiss-Prot с использованием разработанных структурных критериев внутренней неупорядоченности апо-формы ПА показал распространенность этого явления на уровне 16–19%.

4) Внутренняя неупорядоченность апо- β -ПА сопряжена с повышенным сродством белка к Ca^{2+} .

Вклад автора

Совокупность данных, приведенных в настоящей работе, была получена в результате 3-летнего научного исследования, проводимого в рамках очной аспирантуры соискателя. Работа выполнялась лично соискателем, в составе коллектива сотрудников Лаборатории новых методов в биологии Института биологического приборостроения РАН и коллег из НИИ РАН.

Биоинформатический анализ внутренней неупорядоченности и аминокислотного состава ПА проводился совместно с Пермяковым С.Е. и Уверским В.Н. Получение некоторых генно-инженерных конструкций проводилось совместно с Соколовым А.С. Экспрессия, выделение и очистка белков проводились совместно с Вологжанниковой А.А. Анализ полученных белковых препаратов методом масс-спектрометрии проводился совместно с Жаданом А.П., Исмаиловым Р.Г., Сувориной М.Ю. и Суриным А.К. Изучение физико-химических свойств ПА проводилась методами сканирующей калориметрии, равновесной спектрофлуориметрии, спектрофотометрии и спектроскопии кругового дихроизма совместно с Вологжанниковой А.А.; методом атомно-адсорбционной спектроскопии – совместно с Шевелевой М.П.; методом динамического светорассеяния – совместно с Казаковым А.С.; методом остановленного потока со спектрофлуориметрической детекцией – совместно с Емельяненко В.И. Обработка и анализ полученных данных, подготовка

статей к печати и тезисов конференций проводились либо лично соискателем, либо при его активном участии.

Апробация диссертации

Результаты диссертации были представлены на следующих конференциях: Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2016), Съезд биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), The Biophysical Society Virtual Annual Meeting (2021), Russian International Conference on Cryo-EM (RICSEM2021). Результаты диссертации опубликованы в 5 научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и WoS.

Структура и объем работы

Разделы диссертационной работы включают: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа выполнена в объеме 117 страниц, включает 31 рисунок и 13 таблиц. В списке использованной литературы 127 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении приведены: цель и задачи диссертационной работы, положения, выносимые на защиту. Также описана актуальность, научная новизна и практическая значимость проведенных исследований, апробация результатов работы. Указан вклад соискателя в получение и анализ данных.

Глава 1. Литературный обзор

В главе приведены литературные данные о структуре кальцийсвязывающего мотива «EF-руки», способности мотивов «EF-руки» к образованию внутримолекулярных и межмолекулярных доменов, а также особенностях строения и функционирования белков, их содержащих. Отдельно дано описание процесса связывания катионов кальция разными представителями семейства «EF-руки», в том числе, описание Ca^{2+} -индуцируемых изменений свойств этих белков. Более подробно рассмотрены свойства парвальбуминов, выбранных в данном исследовании в качестве модельной системы.

Глава 2. Материалы и методы

В качестве источника аминокислотных последовательностей ПА использовали базу данных Swiss-Prot v.2014_05. Выравнивание аминокислотных последовательностей белков проводили при помощи алгоритмов MUSCLE 3.8 и Clustal Omega v.1.2.1. Распределение индекса Шеннона для выровненных последовательностей ПА рассчитывали при помощи Protein Variability Server (<http://imed.med.ucm.es/PVS/>). Оценку внутренней неупорядоченности белков и анализ их аминокислотного состава проводили при помощи программного обеспечения PONDR analysis v.1 и алгоритма PONDR® VSL2P.

Генетические конструкции мутантных форм ПА получили методом точечного мутагенеза на основе конструкции, содержащей ген белка дикого типа.

Рекомбинантные белки экспрессировали в штамме *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL и очищали с помощью ионообменной хроматографии. Чистоту полученных препаратов белков проверяли с помощью электрофореза в (не)денатурирующих

условиях, спектрофотометрически и флуориметрически, а также методом масс-спектрометрии с ионизацией образца электрораспылением.

Оценку доли восстановленных цистеинов ПА проводили методом Элмана. Восстановленную форму белка поддерживали путем его обработки восстанавливающими агентами. Апо-формы белков получали путем их переосаждения ТХУ с последующей гель-фильтрацией в отсутствие катионов металлов. Дисульфидный димер ПА получали посредством обработки белка хлоридом меди с последующей гель-фильтрацией.

Профиль тепловой денатурации ПА измеряли методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Оценку содержания элементов вторичной структуры в белке проводили методом кругового дихроизма (КД). Четвертичную структуру белков изучали методами динамического светорассеяния (ДСР) и химических сшивок. Сродство ПА к $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ исследовали методами спектрофлуориметрического титрования, равновесного диализа с детектированием концентрации катионов металлов методом атомной адсорбционной спектроскопии (ААС). Кинетику диссоциации комплексов ПА с $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ изучали методом остановленного потока с флуориметрической детекцией.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Роль «черного» и «серого» кластеров спаренного домена «EF-руки» β -ПА в поддержании структурных и функциональных свойств белка

Для оценки вклада «черного» и «серого» кластеров в поддержание структурно-функциональных свойств белков семейства «EF-руки» в качестве модельного объекта исследования нами был взят β -ПА крысы, относящийся к немногочисленной категории белков-буферов кальция. Остатки обоих кластеров белка поочередно заменяли на аланин, с последующим изучением свойств полученных мутантных форм белка.

С использованием точечного мутагенеза экспрессированы в штамме BL21(DE3)-RIL *E. coli*, выделены и очищены до гомогенности следующие мутантные формы β -ПА крысы: F48A, A100V, F103A («черный» кластер, Рисунок 1А), а также G61A, L64A, M87A («серый» кластер, Рисунок 1Б). Методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением образца показано, что 36–77% препаратов белка соответствуют форме с удаленным N-концевым остатком Met.

Изучение четвертичной структуры препаратов β -ПА методом химических сшивок глутаровым альдегидом показало (Таблица 1), что они находятся преимущественно в мономерной форме (содержание мономера 64–100%), причем связывание Ca^{2+} белком приводит к накоплению димерной формы белка. По данным ДСР связывание $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ белком вызывает снижение величины среднего гидродинамического радиуса белка (за исключением M87A) (Рисунок 2), что свидетельствует о компактизации молекулы белка. Замены остатков «черного» кластера β -ПА приводят к достоверно ($p < 0,01$) более выраженным изменениям эффективной степени олигомеризации апо-формы белка (Рисунок 3А), в сравнении с заменами остатков «серого» кластера: $\langle |\Delta MW|/MW_0 \rangle = 0,54 \pm 0,11$ против $0,15 \pm 0,07$ (Рисунок 3Г). Загрузка белка ионами $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ приводит к нивелированию этого эффекта (Рисунок 3Б, В), в соответствии с $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемой компактизацией молекулы белка.

Таблица 1. Олигомеризация β -ПА дикого типа и его мутантных форм (1,5–1,7 мг/мл) по данным метода сшивок глутаровым альдегидом (0,02%, 15°C), а также их гидродинамические свойства по данным ДСР (20°C). R_h , средний гидродинамический радиус; MW , расчетная молекулярная масса белка; MW_0 , молекулярная масса мономера белка. Буфер: 20 мМ H_3BO_3 -KOH, pH 8,4, 1,5 мМ ЭДТА-KOH (апо-ПА), 1 мМ $MgCl_2$ (Mg^{2+} -загруженный ПА) или 1 мМ $CaCl_2$ (Ca^{2+} -загруженный ПА).

Состояние белка	β -ПА		Содержание мономера, %	Содержание димера, %	$R_h \pm SD$, нм	$MW/MW_0 \pm SD$	$\Delta MW/MW_0 \pm SD$
апо	WT		100	-	$2,06 \pm 0,03$	$1,49 \pm 0,06$	0
	«черный» кластер	F48A	100	-	$2,39 \pm 0,03$	$2,16 \pm 0,08$	$0,67 \pm 0,12$
		A100V	100	-	$2,29 \pm 0,03$	$1,90 \pm 0,07$	$0,41 \pm 0,11$
		F103A	100	-	$2,31 \pm 0,04$	$2,02 \pm 0,09$	$0,52 \pm 0,12$
	«серый» кластер	G61A	100	-	$1,91 \pm 0,02$	$1,26 \pm 0,05$	$-0,23 \pm 0,10$
		L64A	100	-	$2,02 \pm 0,07$	$1,44 \pm 0,12$	$-0,05 \pm 0,15$
		M87A	83	17	$2,14 \pm 0,11$	$1,65 \pm 0,22$	$0,16 \pm 0,23$
Mg^{2+}	WT		100	-	$1,92 \pm 0,03$	$1,27 \pm 0,05$	0
	«черный» кластер	F48A	100	-	$1,95 \pm 0,02$	$1,34 \pm 0,05$	$0,07 \pm 0,07$
		A100V	100	-	$1,99 \pm 0,02$	$1,37 \pm 0,06$	$0,1 \pm 0,08$
		F103A	100	-	$2,08 \pm 0,02$	$1,53 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,06$
	«серый» кластер	G61A	100	-	$1,85 \pm 0,04$	$1,15 \pm 0,08$	$-0,12 \pm 0,09$
		L64A	80	20	$1,88 \pm 0,02$	$1,22 \pm 0,00$	$-0,05 \pm 0,05$
		M87A	75	25	$2,07 \pm 0,07$	$1,54 \pm 0,12$	$0,27 \pm 0,13$
Ca^{2+}	WT		96	4	$1,81 \pm 0,02$	$1,12 \pm 0,05$	0
	«черный» кластер	F48A	89	11	$1,91 \pm 0,05$	$1,28 \pm 0,09$	$0,16 \pm 0,10$
		A100V	87	13	$1,83 \pm 0,03$	$1,13 \pm 0,06$	$0,01 \pm 0,08$
		F103A	80	20	$1,83 \pm 0,04$	$1,13 \pm 0,05$	$0,01 \pm 0,07$
	«серый» кластер	G61A	64	36	$1,85 \pm 0,03$	$1,15 \pm 0,05$	$0,03 \pm 0,07$
		L64A	70	30	$1,79 \pm 0,03$	$1,09 \pm 0,05$	$-0,03 \pm 0,07$
		M87A	75	25	$1,99 \pm 0,12$	$1,41 \pm 0,19$	$0,29 \pm 0,20$

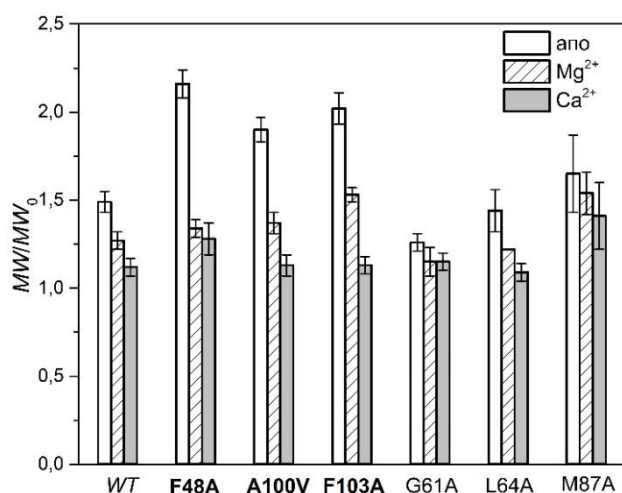


Рисунок 2. Величины эффективной степени олигомеризации различных форм β -ПА по данным ДСР (Таблица 1). Мутантные формы β -ПА с заменами остатков «черного» и «серого» кластеров выделены жирным и обычным шрифтом, соответственно.

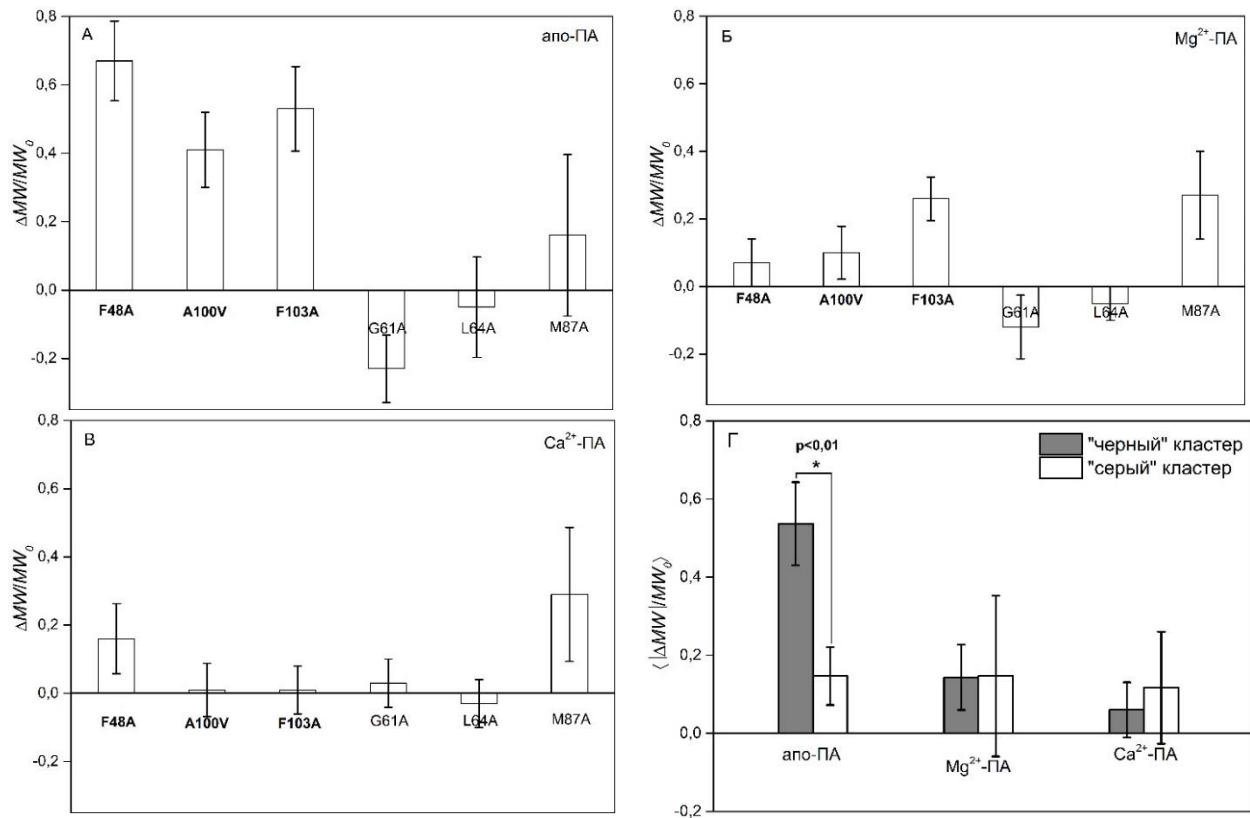


Рисунок 3. Диаграммы изменений эффективной степени олигомеризации β-ПА при введении аминокислотных замен по «черному» (выделены жирным шрифтом) и «серому» кластерам, в зависимости от загруженности белка катионами металлов.

Увеличение гидродинамического радиуса молекулы апо-β-ПА при замене остатков «черного» кластера белка (Рисунок 3А) ожидаемо сопровождаются увеличением гидрофобной поверхности белка, доступной растворителю, что подтверждается повышенной интенсивностью флуоресценции гидрофобного зонда бис-АНС в присутствии β-ПА (Рисунок 4). Аналогичный эффект наблюдается для остальных мутантных форм β-ПА, за исключением апо-формы мутанта G61A, демонстрирующей противоположный эффект в соответствии с повышенной компактностью молекулы G61A (Рисунок 3А). Связывание кальция приводит к снижению интенсивности флуоресценции гидрофобного зонда бис-АНС (Рисунок 4) и повышению содержания α-спиралей (Рисунок 5) для всех изученных форм β-ПА в соответствии с компактизацией молекулы белка (Рисунок 2). Отметим, что Ca²⁺-связанные формы всех мутантов β-ПА демонстрируют повышенную по отношению к белку дикого типа гидрофобность поверхности (Рисунок 4) и соответственно пониженное содержание α-спиралей (Рисунок 5) несмотря на то, что увеличенный гидродинамический радиус наблюдается лишь для F48A и M87A (Рисунок 3В). Связывание магния сопровождается изменениями интенсивности флуоресценции бис-АНС, качественно напоминающими изменения при связывании кальция, за исключением замен в «черном» кластере F48A и F103A, демонстрирующих увеличение гидрофобной поверхности, несмотря на снижение гидродинамического радиуса (Рисунок 2).

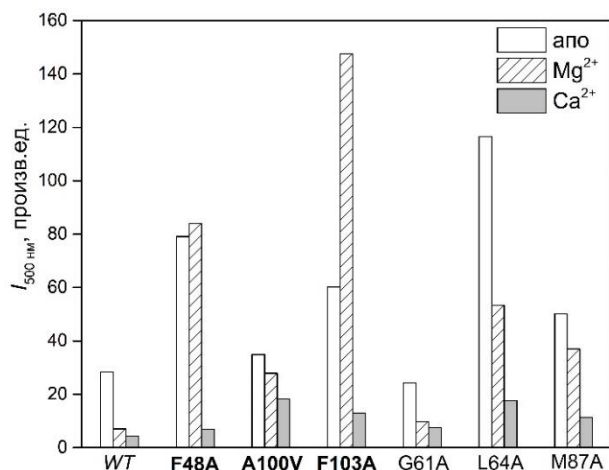


Рисунок 4. Величины интенсивностей флуоресценции бис-АНС (1 мкМ) в присутствии β-ПА (10 мкМ) при 15°C, в зависимости от загруженности белка катионами металлов (10 мМ HEPES-KOH, pH 8,2 для апо- (1,5 мМ ЭДТА) и Ca²⁺-загруженных (1мМ CaCl₂) β-ПА, 10 мМ HEPES-KOH, pH 7,3 для Mg²⁺-загруженных (1мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТА) β-ПА). Длина волны возбуждения бис-АНС 385 нм. Замены остатков «черного» кластера β-ПА выделены жирным шрифтом.

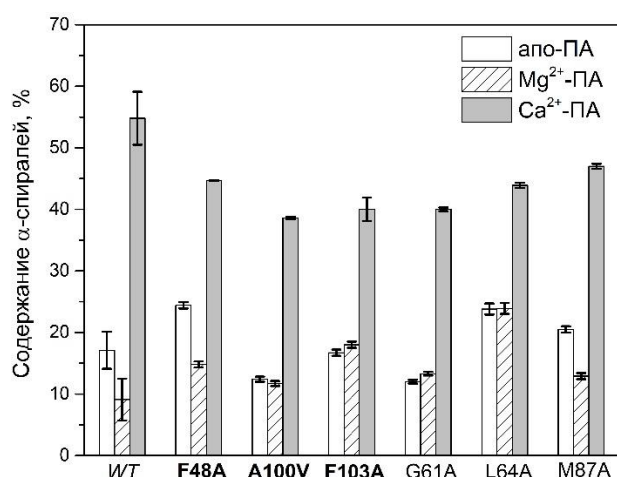


Рисунок 5. Содержание α-спиралей в различных формах β-ПА (6,0–7,2 мкМ) по данным КД (15°C), в зависимости от содержания Ca²⁺/Mg²⁺ (10 мМ H₃BO₃-KOH, pH 8,8, 1мМ CaCl₂ / 10 мМ Трис-HCl, pH 7,3, 1мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТА).

Кальций-индуцируемая компактизация молекулы β-ПА и его мутантных форм ожидаемо приводит к стабилизации третичной структуры белка, что хорошо видно по данным ДСК (Рисунки 6 и 7). Отметим термостабилизацию по отношению к белку дикого типа апо-форм всех мутантов, за исключением F48A (Рисунок 9А), причем величина этого эффекта закономерно снижается по мере увеличения гидродинамического радиуса белка (Рисунок 8). Аминокислотные замены остатков «черного» и «серого» кластеров β-ПА сопровождаются разнонаправленными изменениями термостабильности Mg²⁺/Ca²⁺-загруженных форм белка (Рисунки 9Б, 9В). Тем не менее, анализ усредненных абсолютных величин наблюдаемых изменений температуры полуперехода белка свидетельствует о примерно трехкратном превышении эффектов для замен в «черном» кластере (Рисунок 9Г), что свидетельствует о преимущественном влиянии его остатков на термостабильность Mg²⁺/Ca²⁺-загруженного β-ПА.

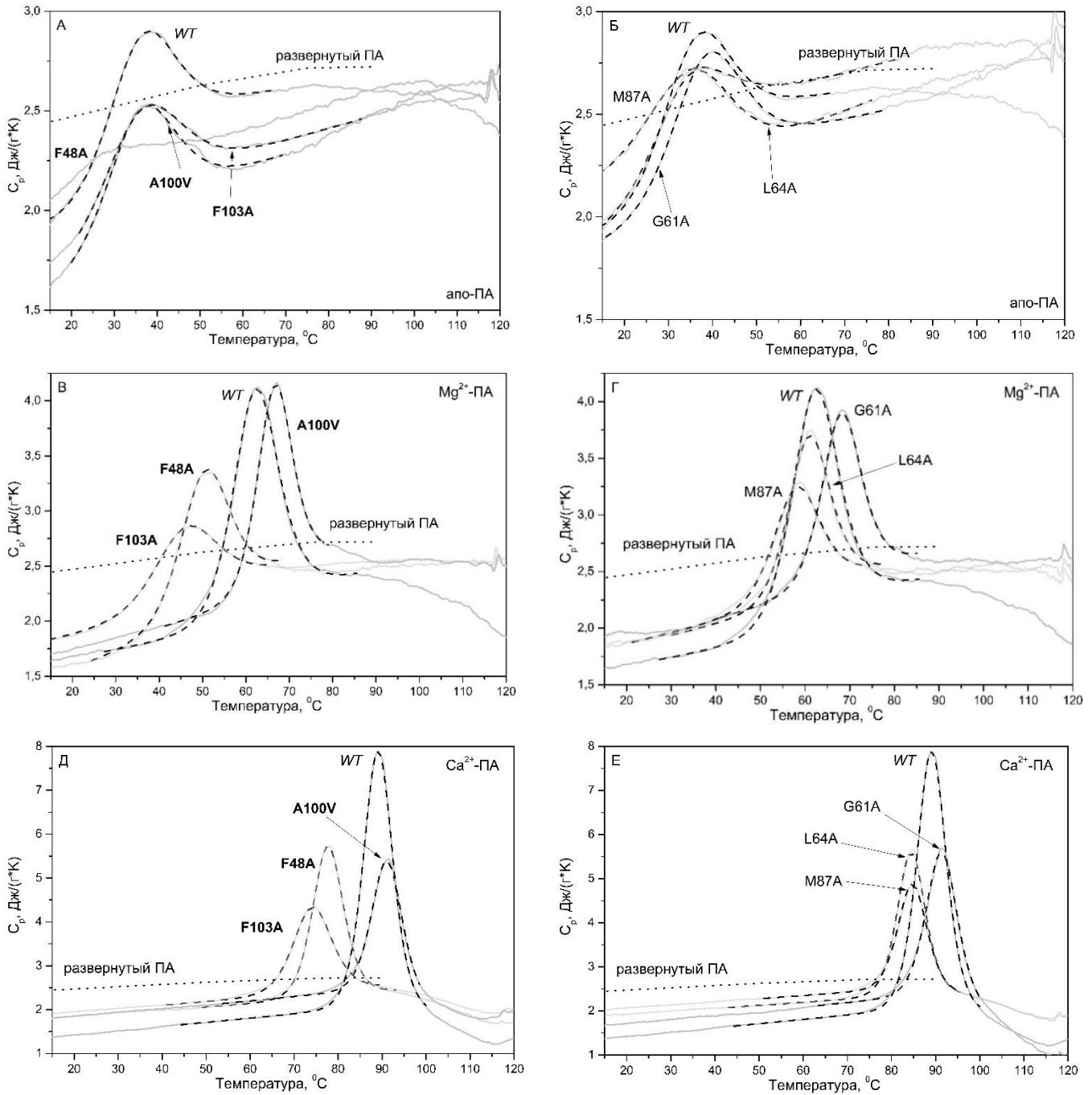


Рисунок 6. Температурные зависимости удельной теплоемкости β -ПА дикого типа и его мутантных форм (1–3,3 мг/мл) в зависимости от содержания $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, по данным ДСК (рН 9,0–9,2, 1мМ ЭДТА/ 1мМ CaCl_2 / 1мМ MgCl_2). Замены остатков «черного» (А, В, Д) и «серого» (Б, Г, Е) кластеров выделены жирным и обычным шрифтом, соответственно. Пунктирные кривые соответствуют теоретическим кривым, рассчитанным в соответствии с кооперативной схемой перехода между двумя состояниями. Удельная теплоемкость, рассчитанная для полностью развернутого белка, показана точками.

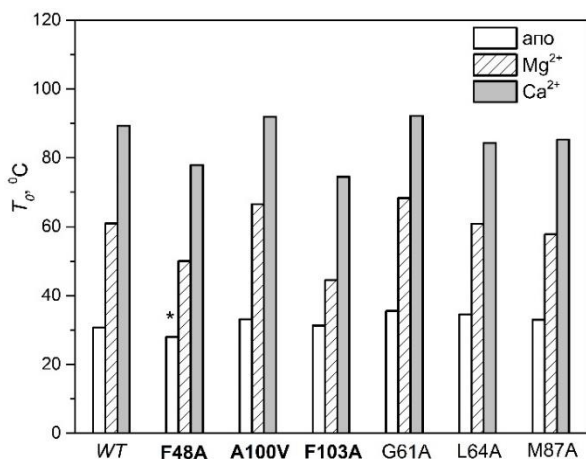


Рисунок 7. Температура середины теплового перехода для различных форм β -ПА по данным ДСК. Замены остатков «черного» и «серого» кластеров выделены жирным и обычным шрифтом, соответственно. Величины T_0 рассчитаны из данных Рисунок 5 в соответствии с кооперативной схемой перехода между двумя состояниями.

* значение температуры середины теплового перехода определено по положению максимума пика теплопоглощения.

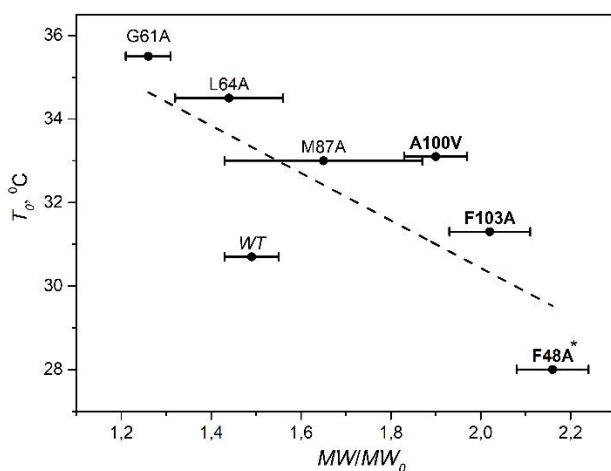


Рисунок 8. Зависимость температуры середины теплового перехода различных форм апо- β -ПА от эффективной степени олигомерности белка по данным ДСК (см. Таблицу 1).

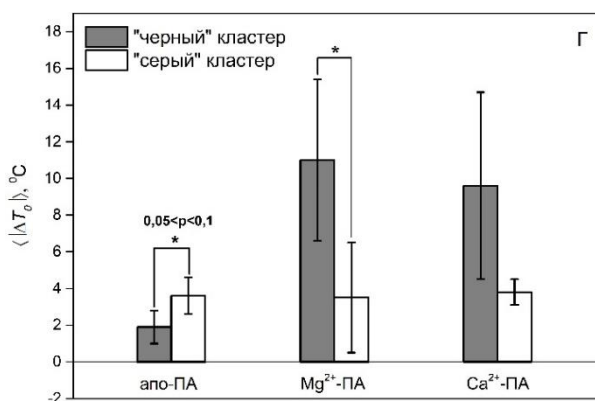
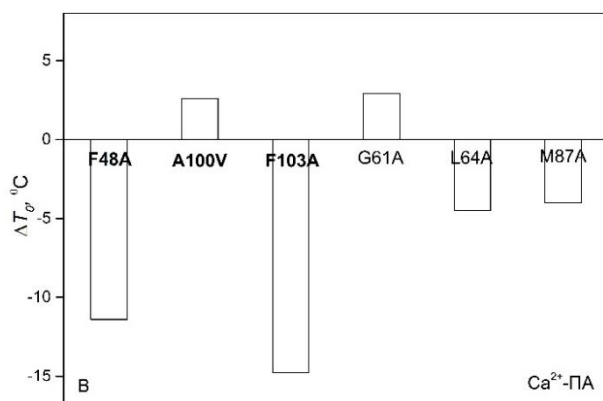
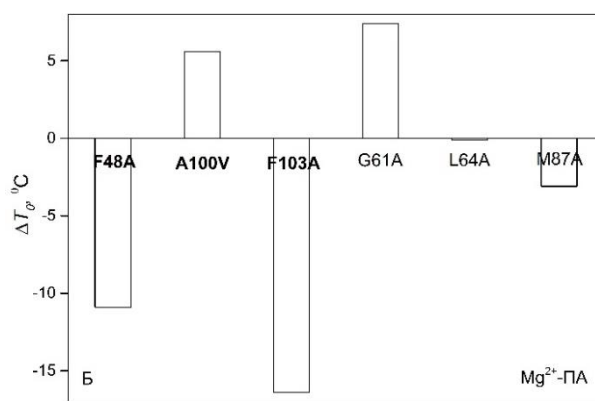
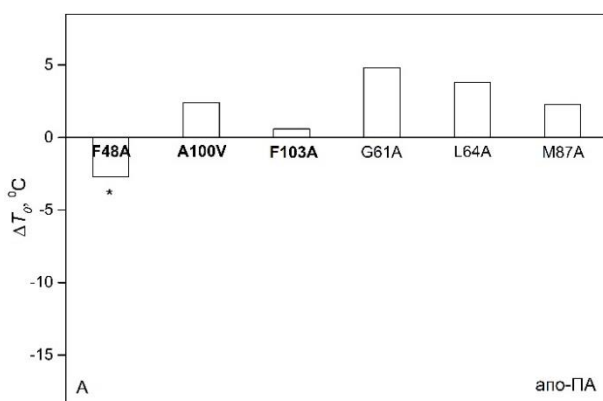


Рисунок 9. Диаграммы изменений температуры середины теплового перехода β -ПА при введении аминокислотных замен в «черном» (выделены жирным шрифтом) и «сером» кластерах, в зависимости от содержания $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

загруженных форм β -ПА в ответ на аминокислотные замены (Рисунок 9) указывают на измененное сродство белка к Mg^{2+}/Ca^{2+} . Оценка констант связывания Ca^{2+} методом кальциевых буферов (Рисунок 10А) обнаруживает пониженное сродство к Ca^{2+} обоих центров связывания Ca^{2+} в случае замен F48A, F103A и M87A. Увеличение общей свободной энергии связывания Ca^{2+} β -ПА при введении замены в «черном»/«сером» кластерах на 2,4 кДж/моль сопряжено со снижением термостабильности Ca^{2+} -связанной формы белка на 1°C (Рисунок 11А). Таким образом, изменения термостабильности Ca^{2+} -связанного β -ПА, вызванные аминокислотными заменами, определяются изменением сродства белка к Ca^{2+} . Отметим, что усредненные значения абсолютных величин изменений общей свободной энергии связывания Ca^{2+} в ответ на замены остатков «черного» кластера превышают таковые при замене остатков «серого» кластера в 4,5 раза (Рисунок 11Б).

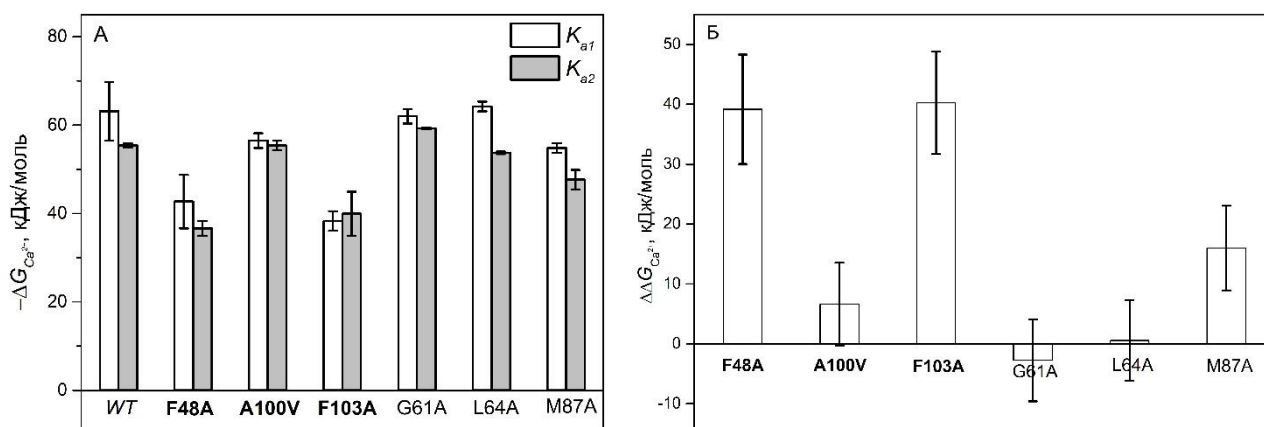


Рисунок 10. Диаграммы абсолютных величин (А) и изменений (Б) общей свободной энергии связывания Ca^{2+} при введении мутаций для различных форм β -ПА при 15°C, по данным экспериментов с использованием кальциевых буферов с флуоресцентной детекцией. Оценка констант связывания кальция проведена в рамках схемы последовательного заполнения центров связывания Ca^{2+} ($\Delta G_{Ca} = -RT \ln (K_{a,i} \times [H_2O])$, $i=1..2$).

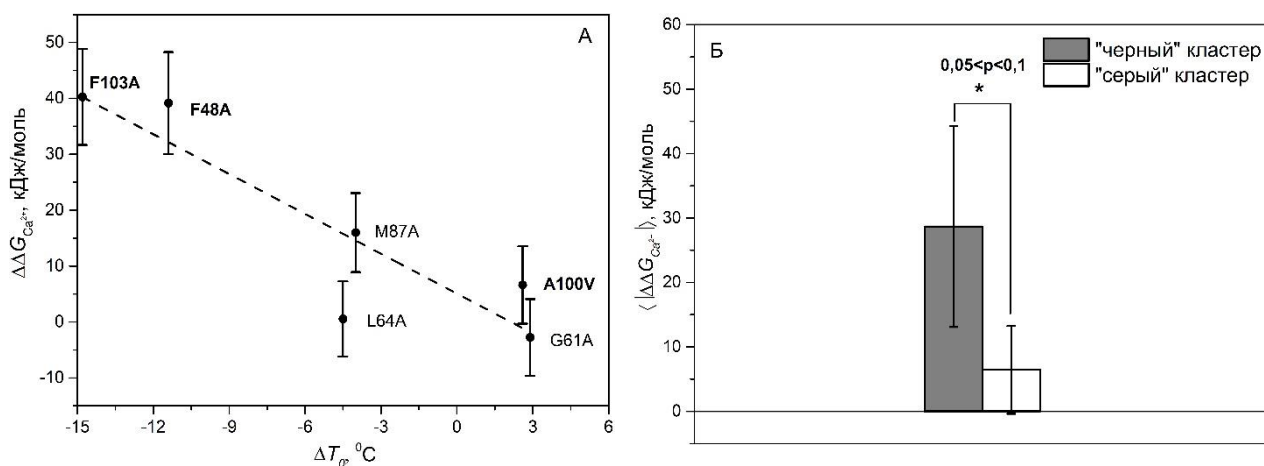


Рисунок 11. А, зависимость изменения общей свободной энергии связывания Ca^{2+} β -ПА при введении аминокислотной замены в «черном» (выделены жирным шрифтом) или «сером» кластере от изменения температуры середины теплового перехода Ca^{2+} -насыщенной формы белка. Б, усредненные значения абсолютных величин изменения общей свободной энергии связывания Ca^{2+} в ответ на аминокислотные замены.

Оценка сродства к катионам магния для различных форм β -ПА методами буферов магния и равновесного диализа с детекцией атомной адсорбционной

спектроскопией (ААС) (Рисунок 12) обнаруживает пониженное сродство к Mg^{2+} для всех мутантных форм белка (Рисунок 13А). Примечательно, что в случае мутантов G61A и L64A более выраженное снижение сродства к магнию наблюдается для центра, заполняющегося вторым. Снижение сродства β -ПА к Mg^{2+} при введении замен остатков в «черном» кластере сравнимо с таковым для замен остатков в «сером» кластере (Рисунок 13Б).

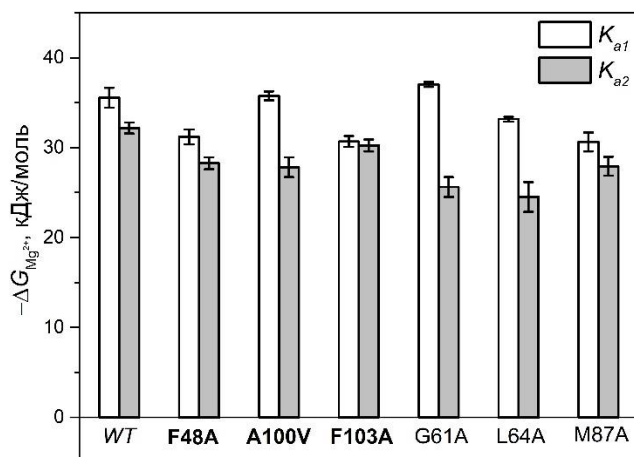


Рисунок 12. Величины свободной энергии связывания Mg^{2+} при 15°C различными формами β -ПА, оцененные методами буферов магния с флуоресцентной детекцией и равновесного диализа с детекцией методом ААС. Оценка констант связывания Mg^{2+} проведена в рамках схемы последовательного заполнения центров связывания ($\Delta G_{Mg} = -RT \ln (K_{a,i} \times [H_2O])$, $i=1..2$).

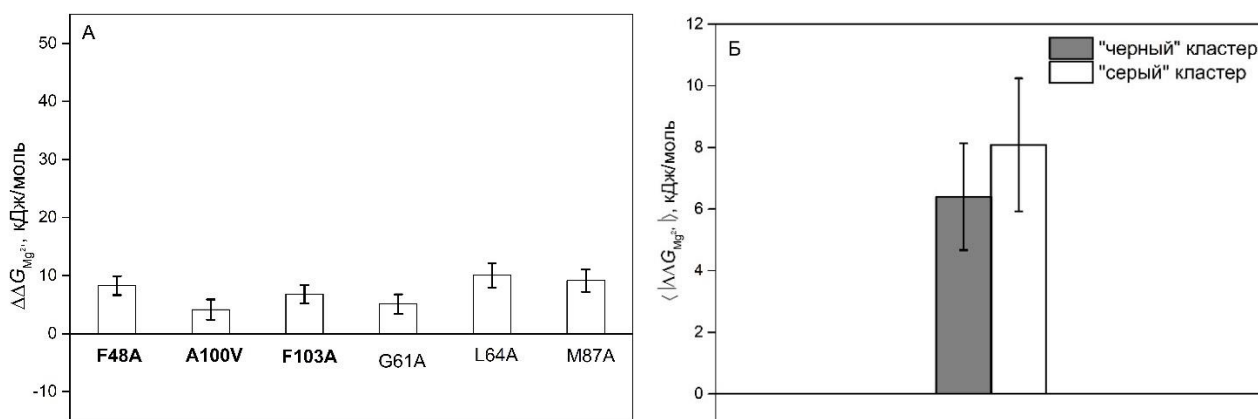


Рисунок 13. А, диаграмма изменения общей свободной энергии связывания Mg^{2+} β -ПА при введении мутации в «черном» (выделены жирным шрифтом) или «сером» кластере. Б, усредненные значения абсолютных величин изменения общей свободной энергии связывания Mg^{2+} в ответ на аминокислотные замены.

Суммируя, наблюдается сложная картина влияния замен отдельных аминокислотных остатков в «черном» и «сером» кластерах спаренного домена «ЕФ-руки» β -ПА крысы на физико-химические свойства белка. В целом, замены остатков в «черном» кластере β -ПА сопровождаются более выраженными эффектами, нежели замены остатков в «сером» кластере по ряду параметров, включая гидродинамический радиус апо-формы белка, термостабильность Mg^{2+}/Ca^{2+} -загруженных форм белка, общую энергию связывания кальция. Этот результат указывает на более существенный вклад аминокислотных остатков «черного» кластера β -ПА в поддержание структурно-функционального статуса белка, в сравнении со вкладом остатков «серого» кластера.

3.2 Структурно-функциональная роль высококонсервативного цистеина инактивированной «EF-петли» β -ПА

Для изучения чувствительности свойств β -ПА крысы к малым структурным модификациям высококонсервативного остатка Cys18 неактивной «EF-петли» белка, отсутствующего в α -ПА крысы, с помощью точечного мутагенеза провели гомологичную замену C18S с последующим исследованием свойств мутантного белка.

Наработанные в штамме BL21(DE3)-RIL *E. coli* белок дикого типа и его мутант

Таблица 2. Олигомеризация β -ПА дикого типа и C18S (1,3–1,7 мг/мл) по данным метода сшивок глутаровым альдегидом (0,02%, 20°C, 1 ч), а также их гидродинамические свойства по данным ДСР (20°C). R_h , средний гидродинамический радиус белка; MW , расчетная молекулярная масса белка; MW_0 , молекулярная масса мономера белка. Буфер: 20 мМ H_3BO_3 -KOH, pH 8,4, 1,5 мМ ЭДТА-KOH (апо-ПА), 1 мМ $MgCl_2$ (Mg^{2+} -загруженный ПА) или 1 мМ $CaCl_2$ (Ca^{2+} -загруженный ПА).

Состояние белка	β -ПА	Содержание мономера, %	Содержание димера, %	$R_h \pm SD$, нм	$MW/MW_0 \pm SD$
апо	WT	100	-	2,22 $\pm$ 0,08	1,80 $\pm$ 0,1
	C18S	100	-	2,42 $\pm$ 0,04	2,13 $\pm$ 0,1
Mg^{2+}	WT	100	-	2,01 $\pm$ 0,06	1,42 $\pm$ 0,1
	C18S	100	-	1,97 $\pm$ 0,04	1,33 $\pm$ 0,0
Ca^{2+}	WT	96	4	1,80 $\pm$ 0,03	1,09 $\pm$ 0,0
	C18S	95	5	1,81 $\pm$ 0,04	1,10 $\pm$ 0,0

Таблица 3. Содержание элементов вторичной структуры в образцах β -ПА (7–13 мкМ) при 20°C по данным КД (10 мМ H_3BO_3 -KOH pH 8,8/10 мМ Трис-HCl pH 7,3), а также величины интенсивности флуоресценции бис-АНС (1 мкМ) в присутствии β -ПА (18–23 мкМ) при 20°C, в зависимости от содержания Mg^{2+}/Ca^{2+} (10 мМ HEPES-KOH pH 7,3/8,2; 1,5 мМ ЭДТА-KOH/1 мМ ЭГТА-KOH, 1 мМ $MgCl_2$ /1 мМ $CaCl_2$).

Состояние белка	β -ПА	α -спирали, %	β -складки, %	I_0 , произв.ед.
апо	WT	32 $\pm$ 3	17 $\pm$ 3	90
	C18S	13 $\pm$ 3	26 $\pm$ 3	115
Mg^{2+}	WT	53 $\pm$ 3	9 $\pm$ 3	74
	C18S	33 $\pm$ 3	16 $\pm$ 3	98
Ca^{2+}	WT	55 $\pm$ 3	8 $\pm$ 3	34
	C18S	54 $\pm$ 3	8 $\pm$ 3	58

присутствии β -ПА, в сравнении с Ca^{2+} -загруженным состоянием белка (Таблица 3).

Отметим, что для апо-C18S в сравнении с апо-WT β -ПА наблюдается снижение содержания α -спиралей в 2,5 раза, а связывание Ca^{2+} (но не Mg^{2+}) мутантом восстанавливает спиральность белка до уровня Ca^{2+} -загруженного состояния WT (Таблица 3). Повышенная интенсивность флуоресценции бис-АНС в присутствии C18S

C18S были выделены и очищены до гомогенности. Методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением показали, что 45% и 81% препаратов WT и C18S соответствуют формам белка с удаленным N-концевым остатком Met. Анализ олигомерного состояния белка методом сшивок глутаровым альдегидом показал мономерность препаратов WT и C18S независимо от содержания Mg^{2+}/Ca^{2+} (Таблица 2).

Соответственно, повышенные величины эффективной степени олигомеризации апо- и Mg^{2+} -связанного состояний WT и C18S, детектируемые методом ДСР, отражают пониженную компактность молекулы белка; связывание Ca^{2+} приводит к ее компактизации. Сниженная компактность молекулы белка для апо- и Mg^{2+} -загруженных форм WT/C18S выражается также в пониженном содержании α -спиралей, и повышенной интенсивности флуоресценции гидрофобного зонда бис-АНС в

независимо от содержания Mg^{2+}/Ca^{2+} свидетельствует о повышенном в сравнении с WT экспонировании растворителю гидрофобных остатков белка (Таблица 3). Это приводит к пониженной в сравнении с WT термостабильности C18S независимо от содержания Mg^{2+}/Ca^{2+} , вплоть до исчезновения пика теплопоглощения для апо-C18S и снижению температуры середины теплового перехода Mg^{2+}/Ca^{2+} -связанного белка на 5/3,7°C, соответственно (Рисунок 14).

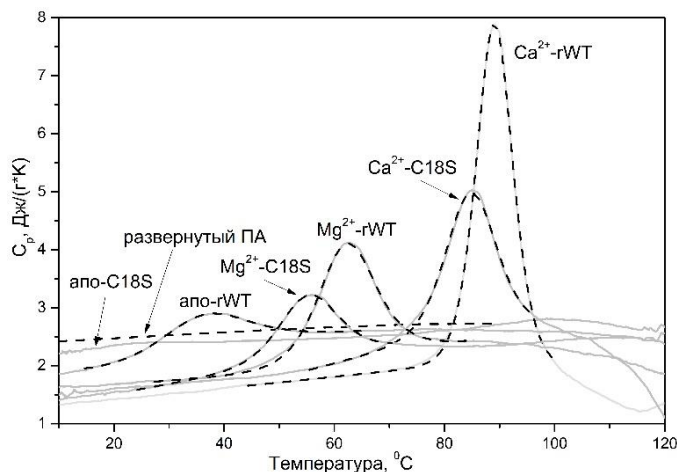


Рисунок 14. Температурная зависимость удельной теплоемкости β -ПА WT и C18S (1,2–2,1 мг/мл) в зависимости от содержания Mg^{2+}/Ca^{2+} , по данным ДСК (рН 9,0–9,2, 1мМ ЭДТА/ 1мМ $CaCl_2$ / 1мМ $MgCl_2$).

Снижение термостабильности β -ПА, вызванное заменой C18S, сопровождается ослаблением сродства белка к Mg^{2+}/Ca^{2+} , согласно данным методов буферов Ca^{2+} с флуоресцентной детекцией и равновесного диализа Mg^{2+} с детекцией методом ААС (Рисунок 15А). В соответствии с пониженным сродством C18S к Ca^{2+} (на 1,5 порядка величины одной из «ЕФ-рук») изучение кинетики диссоциации Ca^{2+} методом остановленного потока с флуоресцентной детекцией демонстрирует ускоренную на 38% в сравнении с WT диссоциацию комплекса Ca^{2+} с мутантом C18S (Рисунок 15Б).

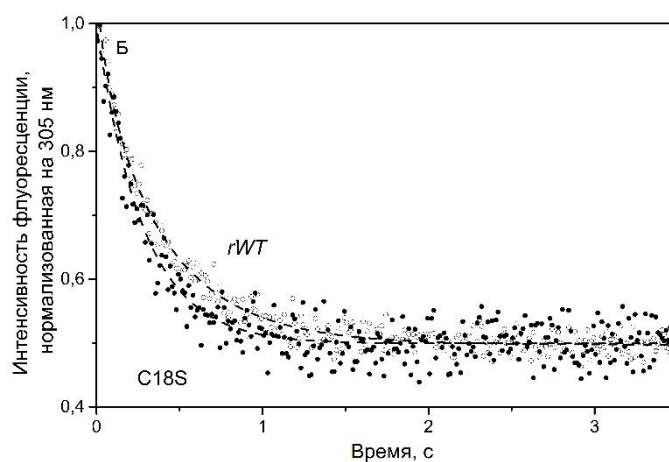
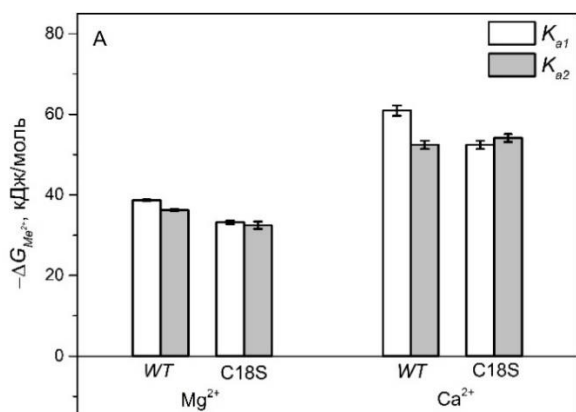


Рисунок 15. А, величины свободной энергии связывания Mg^{2+}/Ca^{2+} различными формами β -ПА при 20°C, оцененные методами буферов Ca^{2+} с флуоресцентной детекцией и равновесного диализа Mg^{2+} с детекцией методом ААС. Оценка констант связывания металлов проведена в рамках схемы последовательного заполнения центров связывания ($\Delta G_{Me} = -RT \ln (K_{a,i} \times [H_2O])$, $i=1..2$). Б, кинетика диссоциации комплекса Ca^{2+} и β -ПА (5-23 мкМ; $[Ca^{2+}]:[\beta\text{-ПА}]=2:1$) при 20°C при добавлении 1 мМ ЭГТА, по данным метода остановленного потока с флуоресцентной детекцией (10 мМ НЕРЕС-КОН, рН 8,2, $\lambda_{\text{возбуждения}}=275$ нм). Пунктиром обозначены теоретические кривые, рассчитанные согласно схеме последовательного заполнения центров связывания Ca^{2+} .

Суммируя, введение гомологичной замены C18S в β -ПА крысы сопровождается существенными изменениями на всех уровнях структурно-функциональной организации белка, что свидетельствует о чувствительности β -ПА к малым структурным модификациям высококонсервативного остатка Суs18 инактивированной

«EF-петли». Тем самым, окисление тиольной группы остатка Cys18 β -ПА крысы способно влиять на свойства белка.

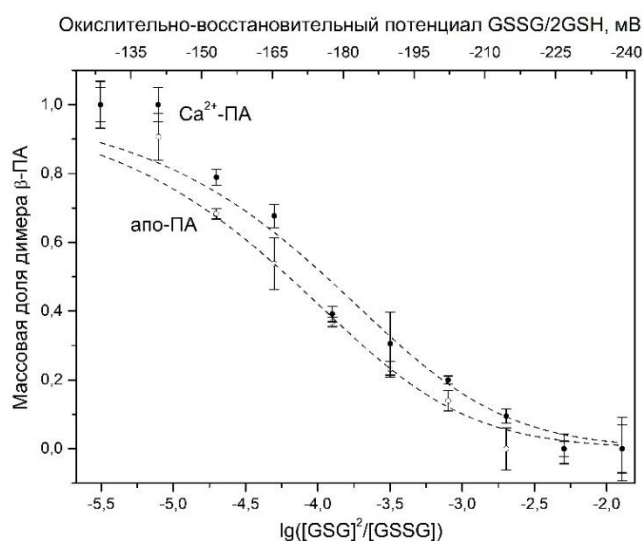


Рисунок 16. Тиол-дисульфидное равновесие апо/ Ca^{2+} -формы β -ПА (1,5 мкМ) в присутствии окислительно-восстановительной пары глутатиона при 35°C (50 мМ HEPES-KOH, 100 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА/ CaCl_2 , pH 7,4) с последующей оценкой доли дисульфидного димера белка с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ в невосстанавливающих условиях.

изменение функциональных свойств β -ПА крысы при его дисульфидной димеризации (Biochemistry 1988, 27, 5615-5622).

Совокупность полученных нами данных свидетельствует о том, что эволюционная потеря сродства к Ca^{2+} неактивной «EF-петли» β -ПА сопровождалась приобретением белком редокс-чувствительности за счет появления в ее составе тиольной группы, склонной к дисульфидной димеризации в условиях повышенного редокс-потенциала. Аналогичная ситуация имеет место для рековерина, белка семейства «EF-руки», в котором неактивная «EF-петля» содержит консервативный остаток цистеина с величиной редокс-потенциала -152 мВ / -128 мВ для Ca^{2+} /апо-форм белка, соответственно.

3.3 Распространенность внутренней неупорядоченности апо-формы среди парвальбуминов, влияние этого явления на сродство белка к Ca^{2+}

В целях поиска ПА с развернутой апо-формой, в штамме BL21(DE3)-RIL *E. coli* экспрессировали, наработали и очистили до гомогенности β -ПА кижуча, одного из наиболее хладолюбивых видов рыб. Чистоту белкового препарата подтвердили данными электрофореза в нативных и денатурирующих условиях; данные масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением подтвердили отсутствие N-концевого Met у 75% белка.

Для определения редокс-потенциала Cys18 β -ПА крысы устанавливали тиол-дисульфидное равновесие апо/ Ca^{2+} -загруженного белка в присутствии окислительно-восстановительной пары глутатиона с последующей оценкой доли дисульфидного димера белка с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле в невосстанавливающих условиях (Рисунок 16). Величины окислительно-восстановительного потенциала SH-группы Cys18 составили: $-168,4 \pm 0,9$ мВ для апо-состояния и $-176,5 \pm 1,9$ мВ для Ca^{2+} -загруженного белка, что указывает на возможность образования дисульфидного димера β -ПА во внутриклеточных условиях, сопровождающихся повышением величины редокс-потенциала, а также в условиях внеклеточной среды. Отметим, что ранее было показано

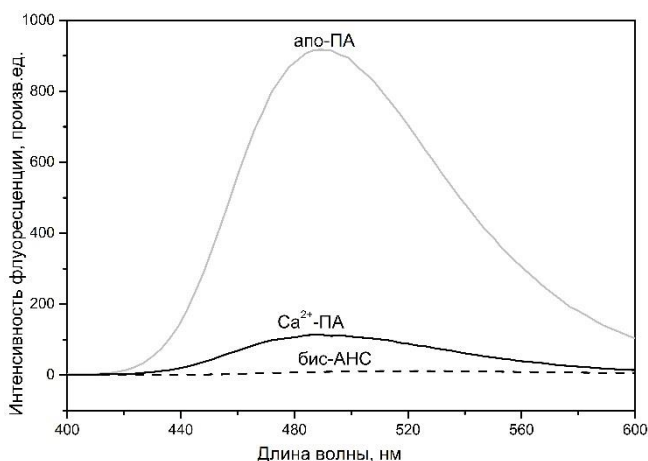


Рисунок 17. Спектры флуоресценции бис-АНС (1 мкМ) в присутствии β-ПА кижуча (10 мкМ) при 20°C, в зависимости от загруженности белка Ca^{2+} (10 мМ НЕРЕС-КОН, pH 8,2, 2мМ ЭДТА/ 1 мМ CaCl_2). Длина волны возбуждения бис-АНС 385 нм.

Спектры флуоресценции бис-АНС в присутствии β-ПА кижуча продемонстрировали экспонирование гидрофобных аминокислотных остатков белка при удалении Ca^{2+} (Рисунок 17), что связано со снижением компактности белковой молекулы, согласно данным методов ДСР и сшивок глутаровым альдегидом (Таблица 4). Дестабилизации апо-β-ПА кижуча проявляется в 2,6-кратном снижении относительно Ca^{2+} -загруженного состояния белка содержания α-спиралей (Рисунок 18А). Отсутствие жесткой третичной структуры в апо-ПА следует из отсутствия пика теплопоглощения на термограммах ДСК, а также уровня

удельной теплоемкости белка, близкому к таковому, предсказанному для полностью

Таблица 4. Олигомеризация β-ПА кижуча (1,5–2 мг/мл) по данным метода сшивок глутаровым альдегидом (0,02%, 20°C), а также гидродинамические свойства белка по данным ДСР (25°C). R_h , средний гидродинамический радиус.

Состояние белка	Содержание мономера, %	Содержание димера, %	Содержание мультимера, %	$R_h \pm SD$, нм		
				Экспериментальные данные	Предсказания для мономера белка	
					свернутый белок	развернутый белок
апо	55	33	12	$2,78 \pm 0,04$	$1,77 \pm 0,02$	$3,16 \pm 0,06$
Ca^{2+}	41	28	31	$1,95 \pm 0,03$		

развернутого ПА (Рисунок 18Б).

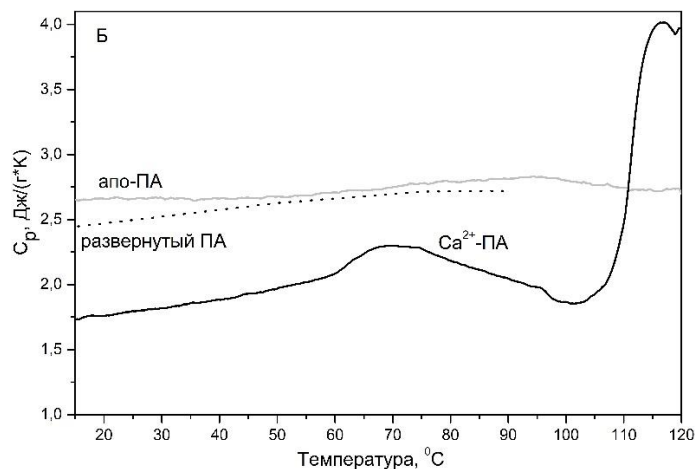
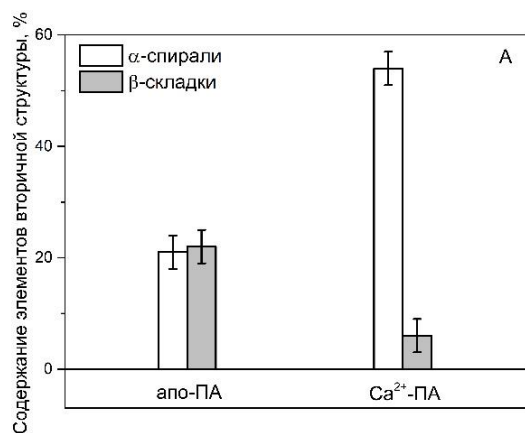


Рисунок 18. А, содержание элементов вторичной структуры в образцах β-ПА кижуча (10–16 мкМ) при 20°C по данным КД (10 мМ H_3BO_3 -КОН pH 8,8). Б, температурные зависимости удельной теплоемкости β-ПА кижуча (1,5–1,7 мг/мл) в зависимости от содержания Ca^{2+} , по данным ДСК (pH 9,0–9,2).

Совокупность полученных структурных данных свидетельствует о том, что апо-β-ПА кижуча – внутренне неупорядоченный белок.

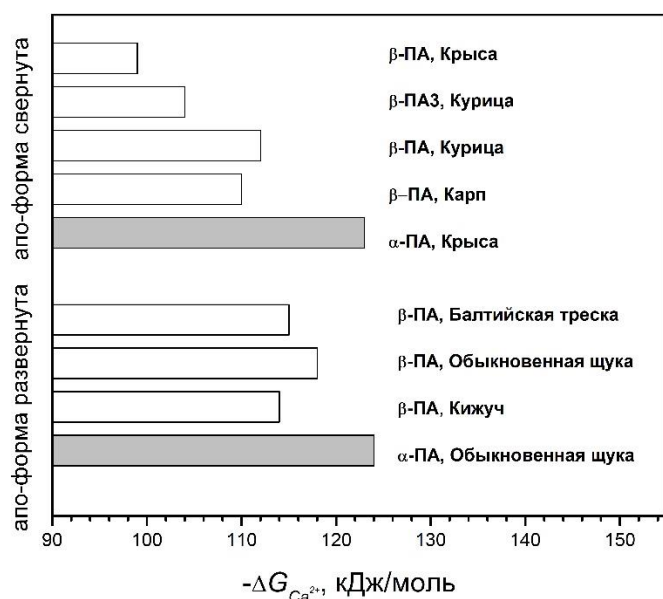


Рисунок 19. Диаграмма величин общей свободной энергии связывания Ca^{2+} ПА, различающимися стабильностью апо-формы, согласно экспериментальным и литературным данным ($\Delta G_{\text{Ca}} = -RT \sum \ln (K_{a,i} \times [\text{H}_2\text{O}])$, $i=1..2$).

отдельных апо-ПА мы предсказали склонность к неупорядоченности для двух групп ПА, отличающихся стабильностью апо-формы (см. Рисунок 19), с использованием алгоритма PONDR® VSL2P (Рисунок 20). Анализируемые группы ПА отличаются

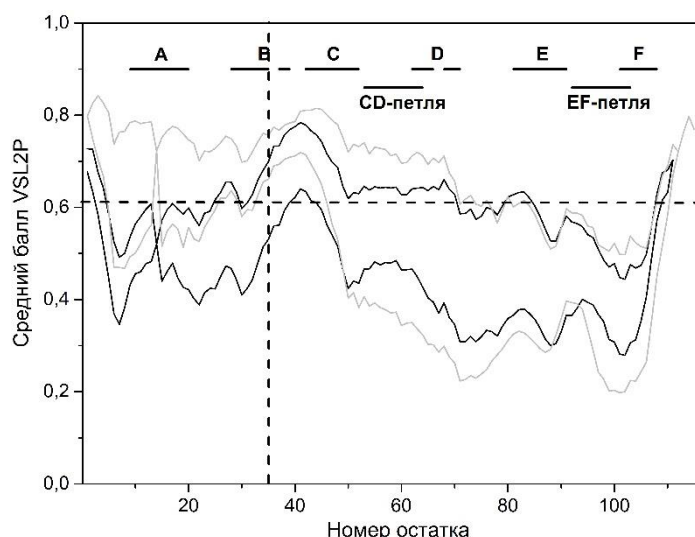


Рисунок 20. Распределение средних баллов PONDR® VSL2P по выровненным последовательностям ПА с развернутой (серые линии) и свернутой (черные линии) апо-формой. Приведенные кривые соответствуют максимальной и минимальной оценкам средних баллов VSL2P с учетом стандартных отклонений. Буквами обозначены участки белка, соответствующие спиралям и Ca^{2+} -связывающим петлям.

Величина общей свободной энергии связывания Ca^{2+} β-ПА кижуча, оцененная с помощью метода спектрофлуориметрического титрования белка Ca^{2+} /ЭДТА ($\Delta G_{\text{Ca}} = -114$ кДж/моль), ниже таковой для β-ПА, для которых ранее была подтверждена свернутость апо-формы ($\Delta G_{\text{Ca}} = -112 \div -99$ кДж/моль) (Рисунок 19). Повышенное сродство к Ca^{2+} наблюдается для прочих β-ПА с развернутой апо-формой. Недостаток информации по стабильности апо-α-ПА не позволяет судить о влиянии неупорядоченности апо-α-ПА на его сродство к Ca^{2+} . В целом, отсутствие жесткой третичной структуры в апо-β-ПА указывает на повышенное сродство белка к Ca^{2+} .

Для установления структурных причин пониженной стабильности повышенной склонностью к неупорядоченности N-концевого участка белка с 1-го по 35-й аминокислотный остаток у ПА с развёрнутой апо-формой. На основе этого признака неупорядоченности апо-формы ПА при краевом значении $\langle \text{VSL2P} \rangle_{1-35}$, равном 0,609, предсказано, что 16% из 69 последовательностей ПА базы данных Swiss-Prot относятся к категории белков с развернутой апо-формой.

Анализ аминокислотного состава N-концевого участка 1-35 анализируемых групп ПА показал, что по сравнению с ПА со свернутой апо-формой неупорядоченные в апо-форме ПА содержат повышенное количество остатков Lys и не содержат остатков Gln. Использование этого критерия неупорядоченности апо-формы ПА

(количество Lys не менее 4) предсказывает развернутость апо-формы белка в 19% ПА базы данных Swiss-Prot. Таким образом, в зависимости от используемого критерия неупорядоченности апо-формы ПА это явление предсказано для 16–19% ПА.

Заключение

На примере классического представителя белков семейства «ЕF-руки», парвальбумине, набором физико-химических методов изучена структурная и функциональная значимость малоизученных структурных особенностей кальцийсвязывающих белков этого семейства, включая «черный» и «серый» кластеры консервативных аминокислотных остатков спаренного домена «ЕF-руки», консервативный остаток цистеина в инактивированной «ЕF-петле», а также внутреннюю неупорядоченность апо-формы белка.

Несмотря на сложную картину влияния замен отдельных аминокислотных остатков «черных» и «серых» кластеров β -ПА крысы на структурно-функциональные свойства белка, для ряда свойств белка замены остатков «черного» кластера β -ПА сопровождаются более выраженными эффектами, нежели замены остатков «серого» кластера, что указывает на большую значимость остатков «черного» кластера β -ПА для поддержания свойств белка.

Полученные данные по свойствам высококонсервативного остатка Cys18 β -ПА крысы свидетельствуют о том, что эволюционная потеря сродства неактивной «ЕF-петли» к Ca^{2+} сопровождалась приобретением β -ПА редокс-чувствительности, что наблюдается и в других представителях семейства белков «ЕF-руки».

На основе разработанных структурных критериев внутренней неупорядоченности апо-формы ПА предсказана неупорядоченность апо-форм для 16–19% ПА базы данных Swiss-Prot. Неупорядоченность апо- β -ПА связана с повышенным сродством белка к Ca^{2+} .

Полученные в работе данные дополняют существующие представления о функционировании белков семейства «ЕF-руки», открывают новые возможности для манипулирования их структурными свойствами в целях терапии сердечных, аллергических, нейродегенеративных, психических, аутоиммунных, онкологических и прочих заболеваний, опосредованных ПА и/или ПА-содержащими клетками.

ВЫВОДЫ

1) Методом точечного мутагенеза показано, что проведенные замены аминокислотных остатков «черного» и «серого» кластеров спаренного домена «ЕF-руки» β -ПА крысы вызывают изменения таких параметров белка, как гидродинамический радиус апо-белка, термостабильность $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -загруженных форм белка и общая свободная энергия связывания ионов Ca^{2+} , причем эффекты, вызываемые заменами в «черном» кластере, в 2,5–4,5 раза превышают таковые в случае замен в «сером» кластере белка.

2) Обнаружено, что окислительно-восстановительный потенциал высококонсервативного тиола Cys18 неактивной «ЕF-петли» β -ПА крысы составляет -168/-176 мВ, и эта величина близка к физиологически значимому уровню.

3) Гомологичная замена C18S вызывает дестабилизацию вторичной и третичной структур апо- и Mg^{2+} -загруженных форм β -ПА крысы и снижение сродства к Ca^{2+} одной из «ЕF-рук» белка на 1,5 порядка величины.

4) Полученные результаты указывают на редокс-сенсорную роль высококонсервативного тиола неактивной «ЕF-петли» β -ПА.

5) Повышенная склонность к неупорядоченности N-концевого участка парвальбумина с 1-го по 35-й остаток выровненной аминокислотной последовательности, а также отдельные особенности аминокислотного состава этого участка белка указывают на развёрнутость его апо-формы.

6) Теоретическая оценка распространённости парвальбуминов с неупорядоченной апо-формой в базе данных Swiss-Prot v.2014_05 составляет 16–19%.

7) Показано, что внутренняя неупорядоченность апо-формы белка сопряжена с повышенным сродством β -ПА к Ca^{2+} .

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

1. Permyakov, S. E. Comprehensive analysis of the roles of ‘black’ and ‘gray’ clusters in structure and function of rat β -parvalbumin / S. E. Permyakov, A. A. Vologzhannikova, P. A. Khorn, M. P. Shevelyova, A. S. Kazakov, V. I. Emelyanenko, A. I. Denesyuk, K. A. Denessiouk, V. N. Uversky, E. A. Permyakov // *Cell Calcium*. – 2018. – N 75. – P. 64–78.

2. Vologzhannikova, A. A. The Highly Conservative Cysteine of Oncomodulin as a Feasible Redox Sensor / A. A. Vologzhannikova, P. A. Khorn, M. P. Shevelyova, A. S. Kazakov, V. I. Emelyanenko, E. A. Permyakov, S. E. Permyakov // *Biomolecules*. – 2021. – N 11. – P. 66.

3. Vologzhannikova, A. A. In search for globally disordered apo-parvalbumins: Case of parvalbumin β -1 from coho salmon / A. A. Vologzhannikova, P. A. Khorn, A. S. Kazakov, R. G. Ismailov, A. S. Sokolov, V. N. Uversky, E. A. Permyakov, S. E. Permyakov // *Cell Calcium*. – 2017. – N. 67. – P. 53–64.

4. Kazakov, A. S. Interleukin-11 binds specific EF-hand proteins via their conserved structural motifs / A. S. Kazakov, A. S. Sokolov, A. A. Vologzhannikova, M. E. Permyakova, P. A. Khorn, R. G. Ismailov, K. A. Denessiouk, A. I. Denesyuk, V. A. Rastrygina, V. E. Baksheeva, E. Yu. Zernii, D. V. Zinchenko, V. V. Glazatov,

V. N. Uversky, T. A. Mirzabekov, E. A. Permyakov, S. E. Permyakov // *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. – 2017. – N 1 (35). – P. 78–91.

5. Vologzhannikova, A. A. Effects of his-tags on physical properties of parvalbumins / A. A. Vologzhannikova, P. A. Khorn, A. S. Kazakov, E. A. Permyakov, V. N. Uversky, S.E. Permyakov // *Cell Calcium*. – 2019. – N 77. – P. 1–7.

Тезисы конференций по теме диссертации:

1. Вологжанникова, А. А. Структурная стабильность апо-парвальбуминов на примере β -парвальбумина кижуча (*Oncorhynchus kisutch*) / А. А. Вологжанникова, П. А. Хорн, А. С. Казаков, А. С. Соколов, Е. А. Пермяков, С.Е. Пермяков // V Съезд биофизиков России: сборник тезисов / Южный федеральный университет. – Ростов-на-Дону, 2015. – том 1. – С. 75.

2. Вологжанникова, А. А. Изучение закономерностей строения парвальбуминов, обуславливающих структурную стабильность их апо-форм / А. А. Вологжанникова, П. А. Хорн, А. С. Казаков, А. С. Соколов, Е. А. Пермяков, С.Е. Пермяков // 20-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века»: сборник тезисов / КТ «Буки-Веди». – Магнитогорск, 2016. – С. 162.

3. Maslov, I. Single-molecule fluorescence-based measurements of conformational dynamics of calcium-binding protein recoverin / I. Maslov, P. Khorn, A. Bogorodskiy, A. Volgozhannikova, I. Zykov, A. Belousov, S. Permyakov, E. Zernii, J. Hendrix, T. Gensch, V. Borshchevskiy // *Biophysical Journal*. – 2021. – N 120(3). – 183a

4. Belousov A., Maslov I., Khorn P., Mishin A, Baranov M., Gensch Th., Borshchevskiy V. Solvatochromic fluorescent dyes tested for spectroscopic measurements of protein conformational dynamics // *IJBM*. – 2021. – N 11(Suppl_1). – P. 15.