

На правах рукописи

ФОНИН
Александр Владимирович



**СТРУКТУРА, СТАБИЛЬНОСТЬ И КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ САХАР-
СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ С ЛИГАНДАМИ. ВОЗМОЖНОСТЬ ИХ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ЭЛЕМЕНТА
БИОСЕНСОРНЫХ СИСТЕМ НА ГЛЮКОЗУ**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН), Санкт-Петербург

Научные руководители:

доктор биологических наук
КУЗНЕЦОВА Ирина Михайловна
ИНЦ РАН

доктор физико-математических наук, профессор
ТУРОВЕРОВ Константин Константинович,
ИНЦ РАН

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук
ТИМКОВСКИЙ Андрей Леонидович
Федеральное государственное бюджетное
учреждение Петербургский институт ядерной
физики им. Б.П. Константинова

доктор биологических наук
БОРОВИКОВ Юрий Сергеевич
ИНЦ РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биологического
приборостроения с опытным производством
Российской академии наук

Защита диссертации состоится «28» июня 2013 года в 14 часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе ИНЦ РАН по адресу: 194064, Санкт-
Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

Адрес электронной почты ИНЦ РАН: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс: 8(812)297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНЦ РАН

Автореферат разослан «27» мая 2013 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В течение последнего десятилетия представления о том, как осуществляется фолдинг белков, и даже представления о нативном белке как о белке с жесткой, строго детерминированной структурой, претерпели существенное изменение. На рубеже столетий стали появляться работы, свидетельствующие о том, что полипептидные цепи многих белков в принципе не способны образовывать компактное глобулярное состояние. Тем не менее, такие белки, будучи частично или полностью неупорядоченными, выполняют в клетке присущую им функцию, т.е. являются нативными [1–3]. Эти белки могут переходить в компактное глобулярное состояние только при взаимодействии со своими партнерами: низкомолекулярными лигандами, другими белками, нуклеиновыми кислотами и т.д. В связи с этим изучение влияния лигандов на стабильность и процесс фолдинга белков представляет значительный интерес.

Двухдоменные лиганд-связывающие белки периплазмы грам-отрицательных бактерий (РВР) могут быть удобной моделью для изучения роли лигандов в процессах фолдинга и стабилизации структуры белков в нативном состоянии. Эти белки участвуют в переносе различных веществ (углеводов, аминокислот, пептидов) через клеточную мембрану, используя энергию, высвобождаемую в результате гидролиза АТФ. Отличительной особенностью РВР, выделяющей их из других классов белковых рецепторов, являются значительные изменения пространственной структуры при взаимодействии со своими лигандами [4]. Понимание механизмов комплексообразования этих белков и роли лигандов в процессах их фолдинга и стабилизации структуры особенно важно в связи с возможностью их использования в качестве чувствительных элементов биосенсорных систем на ряд аналитов, в частности, на глюкозу.

В настоящей работе объектами исследования были сахар-связывающие белки: D-глюкоза/D-галактоза-связывающий белок из *E.coli* (GGBP) и трегалоза/мальтоза-связывающий белок из термофильной бактерии *Thermococcus litoralis* (ТМВР). Связывание этих белков с лигандами (сахарами) приводит к значительным изменениям их третичной структуры, что делает возможным использование этих белков при конструировании социально значимых биосенсоров для определения содержания глюкозы в биологических жидкостях. Последнее имеет важное практическое значение для медицины в связи с острой необходимостью создания неинвазивного глюкометра непрерывного действия. Поскольку при использовании лиганд-связывающих белков в качестве чувствительного элемента биосенсоров важно использовать такие формы белков,

которые отличаются высоким уровнем стабильности к агрессивному действию окружающей среды, немаловажным является изучение стабильности этих белков.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы является исследование структуры, фолдинга, стабильности и комплексообразования с глюкозой сахар-связывающих белков GGBP и TMBP, а также ряда их мутантных форм с точки зрения их возможного использования в качестве чувствительного элемента глюкометра. Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Провести сравнительное изучение устойчивости GGBP и TMBP к действию различных денатурирующих факторов.
2. Исследовать роль лигандов в стабилизации этих белков и, в частности, роль иона Са в фолдинге и стабилизации GGBP.
3. Изучить процессы разворачивания–сворачивания мутантных рекомбинантных форм GGBP и TMBP, которые потенциально могут быть использованы в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Комплексообразование с ионом Са приводит к значительному увеличению устойчивости структуры апоформы GGBP к денатурирующим воздействиям, что позволяет отнести GGBP к белкам с частично неупорядоченной структурой.
2. Комплексообразование с глюкозой существенно повышает стабильность GGBP. Связывание иона Са комплексом GGBP с D-глюкозой не оказывает сколько-нибудь заметного влияния на стабильность структуры холоформы GGBP.
3. Процесс разворачивания как GGBP, так и его комплекса с D-глюкозой под действием GdnHCl является одностадийным и обратимым. Тепловая денатурация GGBP и его комплекса с D-глюкозой осложнена агрегацией. Степень агрегации определяется концентрацией белка, температурой нагрева и продолжительностью инкубации белка при высокой температуре.
4. TMBP обладает исключительно высокой устойчивостью к денатурирующим воздействиям, значительно большей по сравнению с GGBP.
5. Способность связывать глюкозу и чрезвычайно высокая стабильность TMBP делают мутантные рекомбинантные формы этого белка предпочтительными кандидатами на роль чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу по сравнению с мутантными рекомбинантными формами GGBP.
6. Наиболее перспективными из числа исследованных мутантных форм TMBP и GGBP для использования в качестве чувствительного элемента биосенсорной

системы на глюкозу следует считать мутантные формы TMBP/C182S/A14C ($K_d = 3.4 \pm 0.1$ мМ, амплитуда изменения полезного сигнала 40 %) и GGBP/H152C/A213R/L238S ($K_d = 5.2 \pm 0.3$ мМ, амплитуда изменения полезного сигнала 200 %)

Научная новизна работы

В настоящей работе получены новые данные о влиянии комплексообразования GGBP с глюкозой и ионом Са на стабильность этого белка. Обнаружено, что отщепление иона кальция оказывает дестабилизирующее действие на структуру открытой формы GGBP.

В работе впервые проведено подробное изучение устойчивости трегалоза/мальтоза-связывающего белка из термофильной бактерии *Thermococcus litoralis* к денатурирующим воздействиям. Показано, что этот белок обладает значительно большей стабильностью по сравнению с GGBP. Предложены, получены и охарактеризованы мутантные формы TMBP, обеспечивающие ковалентное присоединение флуоресцентного красителя BADAN. Показано, что мутантная форма TMBP/C182S/A14C с красителем, присоединенным по 14-му положению, представляет наибольший интерес для использования в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу.

Теоретическое и практическое значение работы

Новые данные о сворачивании–разворачивании D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка, а также о влиянии глюкозы и иона Са на этот процесс, существенны для понимания роли лигандов при фолдинге этого белка и в стабилизации его структуры к денатурирующему действию химических денатурантов и нагревания. Эти данные существенны также для понимания процессов фолдинга частично неупорядоченных белков. Полученные в работе данные об исключительной стабильности трегалоза/мальтоза-связывающего белка из термофильной бактерии *Thermococcus litoralis* подтверждают представление о взаимосвязи стабильности белков и средой обитания организмов.

Данные о характере процессов сворачивания–разворачивания GGBP и TMBP и их мутантных рекомбинантных форм с присоединенным внешним красителем и измененной константой связывания глюкозы могут иметь важное практическое значение при разработке чувствительных элементов социально значимых биосенсорных систем на глюкозу и ряд других аналитов.

Результаты работы используются при проведении лекционно-практических занятий для студентов 4 курса Кафедры биофизики СПбГПУ.

Личный вклад автора

Все экспериментальные процедуры, описанные в работе, за исключением синтеза плазмид, кодирующих целевые белки, проведены автором лично. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

Апробация работы:

По теме диссертации опубликовано 23 печатные работы (8 статей в отечественных и зарубежных рецензируемых изданиях и 15 тезисов). Материалы работы представлены в качестве устных докладов на следующих конференциях:

1) Политехническом симпозиуме «Молодые ученые – промышленности Северо-Западного региона» (Санкт-Петербург, 2010);

2) VI Международной конференции молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2010);

3) VII Международной конференции молодых ученых «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2011);

5) III конференции молодых ученых Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2012);

6) IV Съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012);

7) Международной конференции “Weak Protein-Ligand Interaction: New Horizons in Biophysics and Cell Biology” (Китай, Пекин, 2012).

Финансовая поддержка:

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (руководитель К.К. Туроверов), Министерства образования и науки РФ (государственные контракты № 16.512.11.2114, № П1198, № 02.512.11.2277, №02.740.11.5141), Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-31708 мол_а), Совета по грантам президента РФ (стипендия СП-2390.2012.4).

Объем и структура диссертации:

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения экспериментальных данных и их обсуждения, представленных в четырех главах, выводов и списка цитируемой литературы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. D-глюкоза (Sigma, США), NaCl (Вектон, Россия), флуоресцентный краситель BADAN (AnaSpec, США), флуоресцентный краситель ATTO-590 (ATTO-TEC GmbH, Германия), гуанидингидрохлорид (Nacalai Tesque, Япония), ацетонитрил (Sigma,

США), глицерин (Merck, Германия), сульфат хинин (AnaSpec, США) использовались без дополнительной очистки. Концентрацию GdnHCl и глицерина определяли с помощью рефрактометра Аббе (ЛОМО, Россия).

На начальных этапах в работе использовали препараты GGBP и TMBP, предоставленные проф. Д'Ауриа (Институт биохимии белка Национального совета по науке Италии, Неаполь). Д'Ауриа также любезно предоставил ген *mglB*, кодирующий белок GGBP, и ген *malE*, кодирующий TMBP. Эти гены были переклонированы из плазмид pTz18u-mglB и pRHo1000, соответственно, в плазмиду pET-11d (Stratagene) с заменой собственного промотора на T7 промотор (вставка гена была проведена по сайтам для рестриктаз *NcoI* и *BglII*). Полученные плазмиды, содержащие нуклеотидные последовательности гена *mglB* и *malE*, использовали для создания мутантных форм GGBP и TMBP, соответственно. Векторная ДНК, подвергаемая мутагенезу, была изолирована из бактериальных клеток с использованием стандартных методик щелочного лизиса [5] с помощью наборов фирмы Omnix (Россия). Сайт-направленный мутагенез выполнен с помощью наборов Quick-Change Mutagenesis Kit (Stratagene) с использованием коммерческих синтетических праймеров, кодирующих соответствующую аминокислотную замену. Очистка праймеров была осуществлена с использованием методов обратной фазной хроматографии или электрофореза в полиакриламидном геле. Химерные конструкции sfGFP-GGBP/W183A/T185C и sfGFP-GGBP/T185C получали в два этапа: сначала были синтезированы плазмиды pET-11d-GGBP/W183A/T185C и pET-11d-GGBP/T185C, затем с помощью ПЦР-амплификации в полученные конструкции были введен ген, кодирующий зеленый белок sfGFP. Эти работы выполнены в лаборатории проф. В.В. Верхуши в Медицинском Колледже им. Альберта Эйнштейна. Плазмиды pET-11d, кодирующие сахар-связывающие белки GGBP и TMBP и их мутантные формы, химерные конструкции sfGFP-GGBP/W183A/T185C и sfGFP-GGBP/T185C, предоставленные проф. В.В. Верхушей, использовали для трансформации клеток *Escherichia coli* BL21(DE3). Экспрессию белков в *Escherichia coli* индуцировали 0.5 мМ IPTG (Nacalai Tesque, Япония). Нарращивание клеточной массы проводили в течение 24 ч при 37 °С. Белки очищали с помощью Ni⁺⁺-агарозы (колонки His GraviTrap, GE Healthcare, Швеция). Контроль чистоты полученных белковых препаратов осуществляли с помощью SDS-электрофореза в денатурирующих условиях в 15 %-ном полиакриламидном геле согласно стандартной методике [6].

Присоединение флуоресцентных красителей к мутантным формам GGBP и TMBP осуществляли согласно методике, описанной Ханом [7].

Эксперименты выполнены при концентрации растворов белков 0.2–0.8 мг/мл. Для образования комплекса белок–лиганд в раствор белка добавляли D-глюкозу в концентрации 10–20 мМ. Измерения проводили в буферных растворах, содержащих лимонную кислоту и Na_2HPO_4 (pH 2.8, 4.2, 6.0, 7.1), PBS pH 7.4, или TrisHCl pH 7.2, 9.6.

Анализ пространственной структуры белков. Свойства микроокружения и особенности локализации аминокислотных остатков в GGBP и TMBP (файлы 2GBP.ent, 2FWO.ent, 1EU8.ent из Международного банка белковых структур PDB [8]) анализировали с использованием данных о координатах атомов пространственной структуры этого белка. Микроокружение аминокислотных остатков определяли как совокупность атомов, расположенных на расстоянии менее r_0 от геометрического центра индольного или фенольного кольца; r_0 было принято равным 7 Å [9].

Флуоресцентные измерения. Флуоресцентные измерения проводили с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, Австралия). Измерение анизотропии флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния выполнены с использованием спектрофлуориметрических установок собственного изготовления [10] со стационарным и импульсным возбуждением в микрокуветах (101.016-QS 5 × 5 мм; Hellma, Германия). Измерение кинетики связывания GGBP/H152C-BADAN с глюкозой было выполнено с помощью аппаратуры остановленного потока MOS 450 (Bio-Logic, Франция).

Собственную УФ флуоресценцию измеряли при возбуждении светом с длинами волн 280, 297 нм. Флуоресценцию красителя BADAN возбуждали при длинах волн 350, 387 и 405 нм. Флуоресценцию химерных конструкций sfGFP-GGBP/W183A/T185C и sfGFP-GGBP/T185C возбуждали при длинах волн 460 и 490 нм. Для характеристики положения и формы спектров триптофановой флуоресценции использовали параметр $A = I_{320}/I_{365}$ (I_{320} и I_{365} – интенсивность флуоресценции, измеренная при длинах волн 320 и 365 нм, соответственно). Спектры флуоресценции и параметр A корректировали на спектральную чувствительность установки. Квантовый выход флуоресценции BADAN определяли согласно методике, описанной ранее [11]. В качестве эталона использовали раствор хинин сульфата в 0.1 М H_2SO_4 .

Константа диссоциации комплексов белков с глюкозой определена согласно [12]. Равновесные зависимости различных флуоресцентных характеристик GGBP от концентрации GdnHCl измеряли после инкубации белка в растворах GdnHCl соответствующей концентрации при 4 °С в течение 24 ч. Измерения выполнены при 23 °С.

Анализ затухания флуоресценции. Кривые затухания флуоресценции анализировали в мультиэкспоненциальном приближении. Расчет проводили по методу

наименьших квадратов с использованием алгоритма минимизации Маркуардта [13]. В качестве эталона использовали растворы *p*-терфенила в этиловом спирте или *N*-ацетилтриптофанамида в воде [14].

Измерение спектров КД. Измерение спектров КД проводили с использованием спектрополяриметра J-810 (Jasco, Япония). Для измерения спектров КД в дальней УФ области использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 мм, в ближней УФ и видимой областях – кюветы с длиной оптического пути 1 см. Для улучшения соотношения сигнал/шум каждый спектр регистрировали 5 раз и полученные данные усредняли. Спектры КД белков построены с учетом КД соответствующего буферного раствора.

Тушение флуоресценции акриламидом. Для того чтобы получить информацию о доступности триптофановых остатков и хромофора молекулам растворителя, проводили эксперименты по тушению их флуоресценции внешним тушителем акриламидом. Полученные данные представляли в координатах Штерн-Фольмера и аппроксимировали линейной зависимостью. При обработке данных делали поправку на вклад в регистрируемое свечение растворителя. Бимолекулярная константа (k_q) была рассчитана на основании константы Штерн-Фольмера (K_{SV}) и времени жизни (τ) как $k_q = K_{SV}/\tau$.

Дифференциальная сканирующая калориметрия. Калориметрические измерения были выполнены с использованием дифференциального адиабатного сканирующего микрокалориметра ДАСМ-4 (НПО "Биоприбор", Пущино), как описано в работах [15–17]. Раствор белка в концентрации 0.65 мг/мл нагревали с постоянной скоростью 1 К/мин при избыточном давлении 2.4 атм. Обратимость теплового перехода определяли путем сравнения повторного прогрева образца, выполненного сразу после охлаждения образца до исходной температуры, и предыдущего прогрева. Из полученных данных вычитали инструментальную базовую линию, полученную при прогреве калориметра с двумя ячейками, заполненными буферным раствором. Избыточная теплоемкость была рассчитана как описано в работе [18]. Зависимости избыточной теплоемкости от температуры анализировали с помощью программы Origin (Micro-Cal Inc., Northampton, MA). Стабильность белков была охарактеризована температурой, отвечающей максимуму пика теплопоглощения (T_m), и величиной энтальпии теплового перехода (ΔH_{cal}), рассчитанной как площадь под кривой избыточной теплоемкости.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была изучена стабильность двух сахар-связывающих белков, способных связывать глюкозу: D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка из *Escherichia coli* и

трегалоза/мальтоза-связывающего белка из термофильной бактерии *Thermococcus litoralis*. Исследования структуры этих белков были выполнены в апо и холоформах. Было также исследовано влияние иона Са в связи с ролью этого лиганда в процессе фолдинга GGBP и стабилизации его пространственной структуры.

В связи с возможным использованием этих белков в качестве чувствительных элементов биосенсорных систем на глюкозу были исследованы мутантные формы GGBP и ТМВР с присоединенным внешним красителем и с измененными значениями константы связывания глюкозы.

Роль лигандов в стабилизации структуры GGBP

D-галактоза/D-глюкоза-связывающий белок (GGBP) из *Escherichia coli* имеет типичную для лиганд-связывающих белков двухдоменную структуру. Сайт связывания молекулы глюкозы, расположен в глубокой щели между N и C-концевыми доменами, сайт связывания иона кальция локализован в петле C-концевого домена молекулы GGBP и имеет структуру, характерную для мотива “EF-руки”, часто встречающегося у внутрисклеточных кальций-связывающих белков [19].

Показано, что отщепление иона кальция как от GGBP, так и от комплекса GGBP/Glc не приводит к заметным изменениям вторичной структуры белка, о чем свидетельствует неизменность спектров КД в дальней УФ области. В то же время, используя триптофоновую флуоресценцию, удалось зарегистрировать небольшие различия в третичной структуре этих форм белков. Положение спектра флуоресценции сдвигается в длинноволновую область в следующем порядке: GGBP/Glc < GGBP-Ca/Glc \approx GGBP < GGBP-Ca, что свидетельствует о некоторой компактизации пространственной структуры белка при связывании иона кальция. Наибольшее изменение структуры происходит при связывании иона Са с апоформой GGBP. Компактность закрытой формы белка при отщеплении иона Са изменяется незначительно.

Сворачивание–разворачивание апо и холоформы GGBP под действием GdnHCl.

Равновесные и квазиравновесные зависимости различных флуоресцентных характеристик (интенсивности флуоресценции при фиксированной длине волны регистрации, параметра *A* и анизотропии флуоресценции), а также зависимость величины эллиптичности при длине волны 222 нм для GGBP и GGBP/Glc от концентрации GdnHCl имеют S-образную форму, что свидетельствует об одностадийном характере разворачивания GGBP и комплекса GGBP/Glc (Рис. 1). Об этом же свидетельствует линейный характер параметрической зависимости для GGBP и комплекса GGBP/Glc, построенный на

основании измерения зависимостей интенсивности триптофановой флуоресценции при длинах волн регистрации 320 и 365 нм от концентрации GdnHCl.

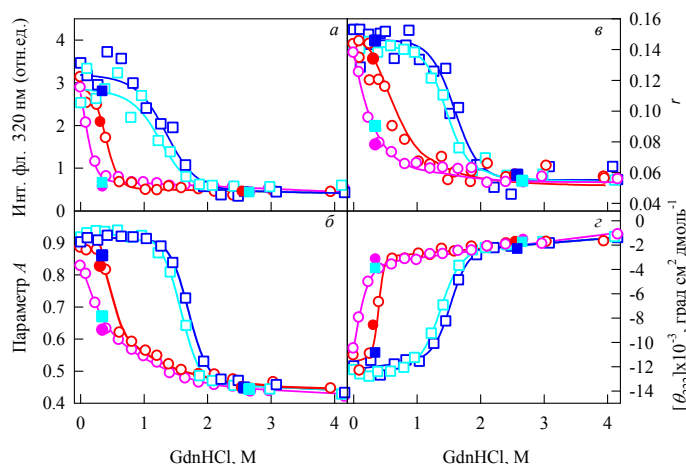
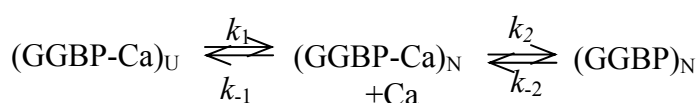


Рис. 1. Конформационные изменения GGBP и GGBP-Ca (красные и розовые кружки, соответственно), GGBP/Glc и GGBP/Glc-Ca (синие и голубые кружки, соответственно) под действием GdnHCl. (а) Изменения интенсивности флуоресценции при длине волн регистрации 320 нм. (б) Изменения параметра А. (в) Изменения анизотропии флуоресценции при длине волны возбуждения 297 нм. (г) Изменения эллиптичности при 222 нм. Открытые символы соответствуют процессу денатурации, закрытые – ренатурации

Середина перехода денатурационной кривой сдвигается в область больших значений GdnHCl в следующем порядке: GGBP-Ca < GGBP < GGBP-Ca/Glc < GGBP/Glc (Рис. 1).

Причем для GGBP-Ca значения всех зарегистрированных характеристик существенно изменяются уже при небольших концентрациях GdnHCl и вся денатурационная кривая для GGBP-Ca сдвинута в область значительно меньших концентраций GdnHCl по сравнению с кривой, зарегистрированной для апоформы GGBP, что свидетельствует о существенной роли иона кальция в стабилизации нативной структуры белка.

Стационарные кривые, отражающие процесс сворачивания – разворачивания GGBP, после инкубации белка в течение 24 ч в растворах, содержащих GdnHCl различной концентрации, совпадают. Это свидетельствует о том, что процесс обратим и что связывание иона Ca при ренатурации белка (GGBP-Ca)_N является достаточно быстрым процессом, а лимитирующей стадией сворачивания белка является формирование его нативной структуры



Взаимодействие GGBP и Glc при ренатурации, вследствие высокой константы связывания GGBP с Glc, казалось бы, не должно являться лимитирующей стадией

образования нативного комплекса GGBP/Glc. Однако оказалось, что кривая, отвечающая ренатурации комплекса, измеренная после 24 ч инкубации предварительно развернутого белка в растворах с различной концентрацией GdnHCl в присутствии глюкозы (Рис. 2, а, синие закрытые квадраты), не совпадает с кривой, отвечающей процессу денатурации, а близка к кривой, отвечающей процессу сворачивания–разворачивания свободного белка (Рис. 2, а, красный цвет).

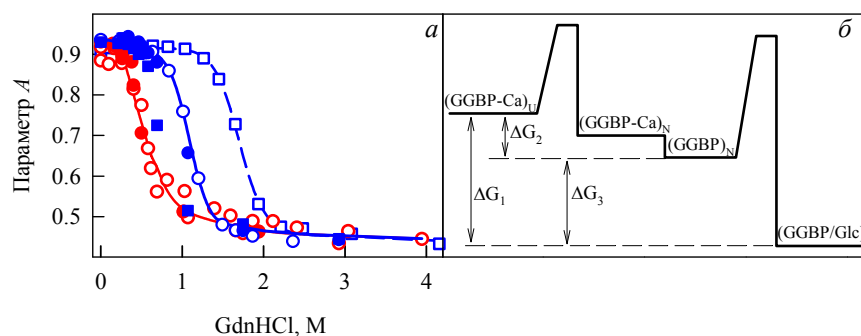
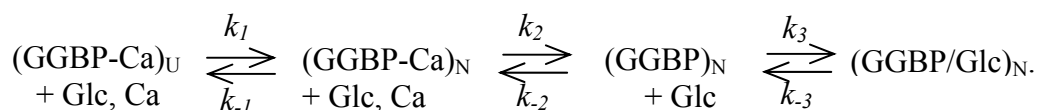


Рис. 2. (а) Конформационные изменения GGBP и GGBP/Glc под действием GdnHCl, зарегистрированные по изменению параметра $A=I_{320}/I_{365}$. Кривые денатурации GGBP были измерены после инкубации белка в растворах с соответствующей концентрацией денатуранта в течение суток при 4 °С (красная сплошная линия и открытые красные кружки) и для GGBP/Glc после инкубации с течение суток (синяя штриховая линия и синие открытые квадраты) и 10 дней (синяя сплошная линия и синие открытые кружки). Данные по ренатурации из полностью развернутого состояния белка были получены после инкубации в растворе соответствующей концентрации денатуранта при 4 °С в течение суток для GGBP (красные закрытые кружки) и в течение суток (синие закрытые квадраты) и 10 дней для GGBP/Glc (синие закрытые кружки). $\lambda_{ex}=297$ нм. (б) Кинетическая схема, характеризующая процессы разворачивания – сворачивания GGBP и GGBP/Glc.

Это означает, что в этих условиях лимитирующей стадией в образовании нативного комплекса GGBP/Glc из $(GGBP)_U$ в присутствии Glc и Ca является взаимодействие белка с глюкозой. Кривые, измеренные после 24 ч инкубации белка в растворах с соответствующей концентрацией GdnHCl, не являются равновесными. Процесс сворачивания – разворачивания комплекса GGBP/Glc, который можно описать следующей кинетической схемой:



Этот процесс оказался очень медленным – равновесные зависимости были получены только после 10 сут инкубации белка в растворах с соответствующей концентрацией GdnHCl (Рис. 2, а, сплошная синяя линия). Наблюдаемые эффекты можно объяснить существованием активационного барьера между нативным и развернутым состоянием. До установления равновесия долгое время сохраняется избыточная концентрация (по

сравнению с равновесным значением) нативного комплекса $(GGBP/Glc)_N$ на пути разворачивания и $(GGBP)_U$ – на пути сворачивания, что объясняется существованием активационного барьера (Рис. 2, б). На пути разворачивания элементарный акт диссоциации комплекса еще не приводит к нарушению конфигурационного соответствия молекул GGBP и Glc и, следовательно, велика вероятность обратной реакции. Напротив, на пути сворачивания необходимо не только возникновение нативной молекулы $(GGBP)_N$, но необходимо также конфигурационное соответствие молекул $(GGBP)_N$ и Glc.

В стабилизации комплекса GGBP/Glc ион Ca также играет существенную роль. В отсутствие иона Ca $(GGBP/Glc-Ca)$ комплекс разворачивается при меньших концентрациях GdnHCl по сравнению с GGBP/Glc. Равновесие достигается через 10 дней инкубации в растворах с соответствующими концентрациями денатуранта, а процесс ренатурации требует даже несколько большего времени.

Тепловая денатурация GGBP и GGBP/Glc. В связи с существованием в литературе различных точек зрения относительно обратимости процесса денатурации GGBP и образования агрегатов [20–22] было проведено исследование тепловой денатурации GGBP. Были зарегистрированы кривые теплопоглощения белка в отсутствие и в присутствии лигандов – D-глюкозы и иона Ca (Рис. 3).

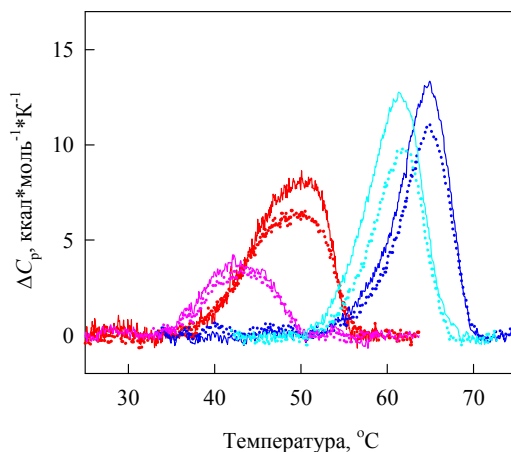


Рис. 3. Температурные зависимости теплоемкости GGBP и GGBP-Ca (красная и розовая кривая, соответственно), GGBP/Glc и GGBP/Glc-Ca (синяя и голубая кривая, соответственно). Концентрация белка была 0.65 мг/мл. Два последовательных скана (сплошная и пунктирная кривая, соответственно) характеризуют обратимость перехода.

Образование комплекса GGBP/Glc приводит к заметному (на 13.9 °C) сдвигу кривой теплопоглощения GGBP/Glc в область более высоких температур ($T_m = 64.4$ °C). При этом пик теплопоглощения становится более выраженным и узким, что свидетельствует о существенном увеличении кооперативности денатурационного перехода для комплекса

GGBP/Glc по сравнению с GGBP и об увеличении стабильности белка при связывании D-глюкозы.

Отщепление иона кальция как от GGBP, так и от комплекса GGBP/Glc приводит к смещению пика теплопоглощения в область более низких температур на 8 и 3 °С, соответственно (Рис. 3). При этом если для GGBP/Glc-Са пик теплопоглощения остается выраженным и узким, то для GGBP-Са его полуширина значительно увеличивается, а амплитуда уменьшается. Это еще раз подтверждает заключение о существенной роли иона кальция в стабилизации структуры апоформы GGBP. Таким образом, данные по тепловой денатурации апоформы GGBP, также как и данные по его денатурации GdnHCl, свидетельствуют о том, что белок становится стабильным только в присутствии иона Са, что позволяет рассматривать GGBP как белок с частично неупорядоченной структурой. Существуют и другие белки, в которых упорядоченная структура возникает только после присоединения ионов металлов [23].

Было показано, что тепловая денатурация GGBP в отсутствие и в присутствии лигандов обратима. При охлаждении растворов белка до комнатной температуры наблюдается восстановление параметра *A* и анизотропии флуоресценции до уровня, присущего этим параметрам белка в нативном состоянии. Однако при нагревании белка до температур выше температуры окончания денатурационного перехода и продолжительной инкубации белка при высокой температуре возникает частичная необратимость тепловой денатурации белка, проявляющаяся в неполном совпадении кривых плавления при повторном нагревании белка (Рис. 3), а также в уменьшении интенсивности триптофановой флуоресценции и сигнала КД в ближней и дальней УФ областях белка, что свидетельствует об агрегации белка в этих условиях. Эти процессы имеют место и в том случае, если тепловая денатурация осуществляется и в присутствии GdnHCl. Степень агрегации определяется концентрацией белка, температурой нагрева и продолжительностью инкубации белка при высокой температуре.

Влияние аминокислотных замен в положении 16 и 183 на стабильность GGBP и комплексообразование этого белка с глюкозой

Активный центр GGBP образуют ароматические аминокислотные остатки Trp 183 и Phe 16, формирующие "карман" из индольного и фенольного колец [19]. Стекинг-взаимодействия между этими остатками и молекулой сахара вносят основной вклад в связывание белка с лигандом. Стерическое соответствие между структурами активного центра и лиганда определяет высокую специфичность и аффинность лиганд-связывающих

белков к своим субстратам и, в частности, высокую специфичность и аффинность связывания GGBP с глюкозой.

Были исследованы мутантные формы с точечными заменами этих аминокислотных остатков: GGBP/W183A и GGBP/F16A. Показано, что в этих мутантах сохранялась способность связывать глюкозу, хотя константа диссоциации комплекса белок/глюкоза значительно увеличилась по сравнению со значением, отвечающим белку дикого типа (Таблица).

Таблица. Комплексообразование мутантных форм GGBP и TMBP с глюкозой

Мутантная форма	K_d комплекса белок/глюкоза, мМ	Изменение амплитуды регистрируемого сигнала, %	
		собственная УФ флуоресценция	флуоресценция присоединенного красителя
GGBP/W183A	0.25	10	-
GGBP/F16A	1.5	15	-
GGBP/H152C	0.0085	10	300
GGBP/H152C/A213R	0.08	8	200
GGBP/H152C/L238S	0.6	10	200
GGBP/H152C/A213R/L238S	5.2	10	200
TMBP/C182S/A14C	3.4	-	40

В то же время, численные значения констант диссоциации этих мутантных форм меньше минимальной концентрации глюкозы в крови здоровых людей (3 мМ) и тем более пациентов, больных диабетом (свыше 8 мМ).

Анализ спектров КД в дальней УФ области и характеристик собственной флуоресценции показал, что структура обеих мутантных форм несколько отличается от структуры белка дикого типа. При связывании глюкозы GGBP/W183A и GGBP/F16A приобретают более компактную пространственную структуру, а их вторичная структура становится сходной со структурой белка дикого типа.

Устойчивость GGBP/W183A и GGBP/F16A к денатурирующему действию гуанидингидрохлорида. Характер равновесных зависимостей интенсивных флуоресцентных характеристик: параметра A и анизотропии флуоресценции (Рис. 4) свидетельствует о разворачивании GGBP/W183A и GGBP/F16A и комплексов этих белков с сахаром под действием гуанидингидрохлорида по принципу «все или ничего». Зависимости экстенсивных флуоресцентных характеристик (интенсивности флуоресценции при длинах волн регистрации 320 и 365 нм) и удельной молярной эллиптичности при 222 нм (Рис. 4) комплексов мутантных форм GGBP с глюкозой от концентрации GdnHCl имеют максимум при небольших концентрациях

гуанидингидрохлорида (0–0.1 М). Это обстоятельство можно объяснить стабилизирующим действием GdnHCl, которое наблюдались для других объектов [24]. Разворачивание мутантных форм GGBP/W183A и GGBP/F16A в отсутствие и в присутствии лиганда под действием GdnHCl является обратимым процессом, что подтверждается совпадением кривых различных флуоресцентных характеристик и эллиптичности при 222 нм при денатурации и ренатурации. Установлено, что середина перехода между нативным и развернутым состоянием открытой формы GGBP/W183A (0.27 М GdnHCl) и GGBP/F16A (0.17 М GdnHCl) смещена в область меньших концентраций денатуранта по сравнению с GGBP дикого типа (0.36 М GdnHCl).

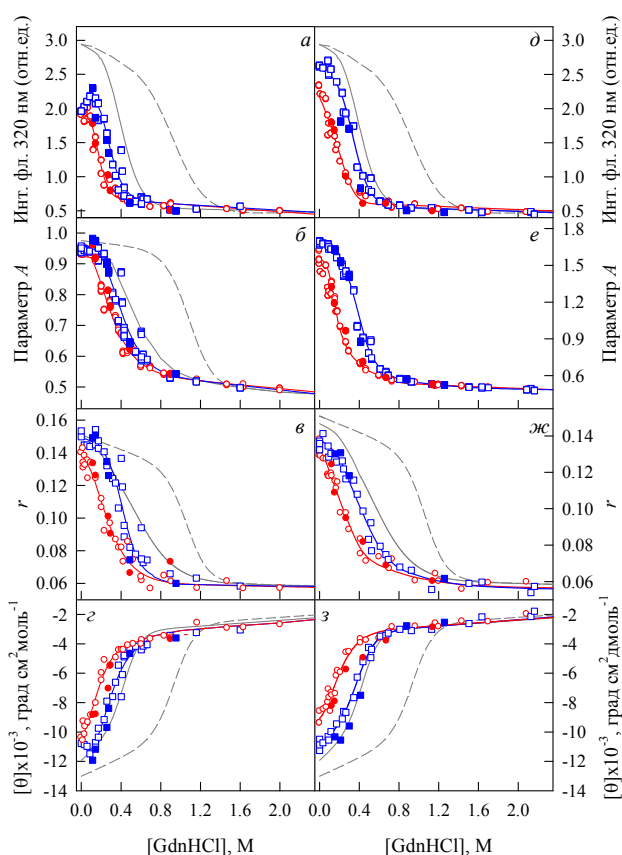


Рис. 4. Конформационные изменения GGBP/F16A и GGBP-F16A/Glc (красные кружки и синие квадраты, соответственно; левые панели) и GGBP/W183A и GGBP/W183A/Glc (красные кружки и синие квадраты, соответственно; правые панели) под действием GdnHCl. Флуоресцентные характеристики GGBPwt (серая сплошная кривая) и GGBPwt/Glc (серая пунктирная кривая). (а и д) – изменения интенсивности флуоресценции при длине волны регистрации 320 нм. (б и е) – изменения параметра А. (в и ж) – изменения анизотропии. (з и з) – изменения эллиптичности при 222 нм. Открытые символы соответствуют процессу денатурации, закрытые символы соответствуют ренатурации.

Это свидетельствует о том, что аминокислотная замена в положении 16 оказывает большее дестабилизирующее действие на открытую форму GGBP по сравнению с заменой в 183-м положении.

Показано, что связывание глюкозы с мутантными формами белка практически не влияет на ход денатурационных кривых и на разность свободной энергии Гиббса белков в развернутом и нативном состояниях.

Тепловая денатурация мутантных форм GGBP-W183A и GGBP-F16A, а также комплексов этих белков с глюкозой. Тепловая денатурация мутантных форм GGBP/W183A и GGBP/F16A, так же как и комплексов этих белков с глюкозой, является обратимым процессом, что подтверждается совпадением различных флуоресцентных параметров этих белков в нативном состоянии и при охлаждении до комнатной температуры после нагревания.

Введение точечных аминокислотных замен в активный центр GGBP-wt приводит к значительному снижению температуры, при которой наблюдается максимум кривой теплопоглощения: для GGBP/W183A T_m составляет 42.3 °C, для GGBP/F16A – 38.9 °C. Комплексообразование с глюкозой приводит к смещению максимума пика теплопоглощения T_m мутантной формы GGBP/F16A на 6.6 °C. Кооперативность денатурационного перехода при этом значительных изменений не претерпевает. В то же время взаимодействие с глюкозой мутантной формы GGBP/W183A выражается в увеличении T_m на 9.7 °C и резком увеличении кооперативности денатурационного перехода, что свидетельствует о более высокой стабильности мутантной формы GGBP/W183A по сравнению с GGBP/F16A, а также о том, что GGBP/W183A при связывании с глюкозой в значительной степени восстанавливает свою структуру.

Структура и стабильность ТМВР

Так же как и GGBP, ТМВР из термофильной бактерии *Thermococcus litoralis* относится к одному из подклассов АВС транспортеров – периплазматическим лиганд-связывающим белкам. Третичная структура ТМВР состоит из двух доменов, связанных подвижным участком, сформированным двумя антипараллельными β -слоями и одной α -спиралью. В щели между доменами расположен активный центр ТМВР. Природными лигандами этого белка являются трегалоза и мальтоза, однако ТМВР способен также связывать глюкозу со значительной большей константой диссоциации комплекса белок/глюкоза (3–8 мМ), чем GGBP.

Для оценки стабильности ТМВР и его комплекса с глюкозой (ТМВР/Glc) было выполнено исследование конформационных изменений белка и комплекса ТМВР/Glc под действием GdnHCl (Рис. 5). Были измерены зависимости различных флуоресцентных характеристик, таких как интенсивности флуоресценции при разных длинах волн регистрации и степени поляризации флуоресценции, а также эллиптичности при 222 нм,

от концентрации GdnHCl. Сигмоидальный характер зависимости интенсивности флуоресценции и эллиптичности свидетельствует о том, что разворачивание ТМВР и ТМВР/Glc осуществляется по принципу «всё или ничего». Линейный характер параметрической зависимости ТМВР и ТМВР/Glc, построенной на основании зависимостей интенсивности флуоресценции белка при длинах волн регистрации 320 и 365 нм, от концентрации GdnHCl, подтверждает вывод об одностадийности разворачивания ТМВР и его комплекса с D-глюкозой. Однако наличие максимума на кривых зависимости степени поляризации белка и его комплекса с глюкозой от концентрации GdnHCl позволяет предположить существование промежуточного состояния, в котором степень поляризации выше, чем в нативном и развернутом состояниях. Степень поляризации флуоресценции нативного белка имеет очень низкое значение ($P = 0.08$). Одной из возможных причин этого может быть безызлучательный перенос энергии возбуждения практически между всеми 12 триптофановыми остатками белка. Можно предположить, что при увеличении концентрации GdnHCl возникают локальные изменения структуры белка, приводящие к уменьшению эффективности переноса энергии, что приводит к увеличению степени поляризации белка в области предденатурационных концентраций GdnHCl. На основании зависимостей I_{320} и I_{365} от концентрации GdnHCl была рассчитана разница между величиной свободной энергией нативного и развернутого состояний ТМВР и ТМВР/Glc (Рис. 5), которая оказалась в несколько раз выше соответствующих значений, рассчитанных для белков из мезофильных организмов (Рис. 5).

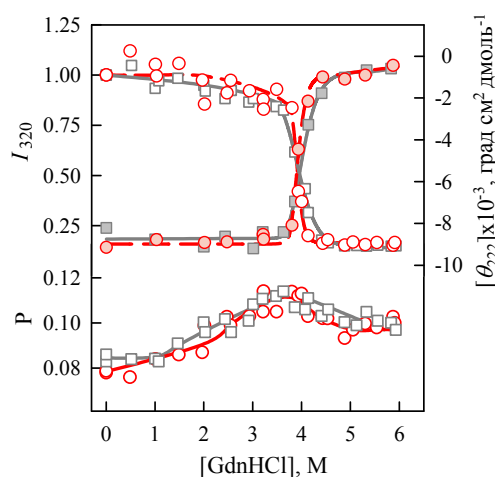


Рис. 5. Денатурация ТМВР (красные символы) и ТМВР/Glc (серые символы) под действием GdnHCl. Зависимости интенсивности флуоресценции I_{320} (открытые символы), эллиптичности θ_{222} (закрытые символы) и степени поляризации флуоресценции P от концентрации GdnHCl, зарегистрированные через 24 ч инкубации белка в растворах GdnHCl.

Сделан вывод о том, что уникальная стабильность ТМВР может сделать этот белок и его мутантные рекомбинантные формы хорошими кандидатами на роль чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу.

Возможность использования сахар-связывающих белков GGBP и ТМВР в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу

Перспективным направлением развития непрерывных методов мониторинга глюкозы является разработка биосенсорной системы, чувствительный элемент которой представлял бы собой белок, реакция которого с глюкозой носила бы обратимый характер. Именно такими белками являются GGBP и ТМВР. Для того, чтобы динамический диапазон чувствительности биосенсорной системы отвечал диапазону концентраций глюкозы в крови здоровых людей (3–6 мМ) и пациентов, больных диабетом (свыше 8 мМ), константа диссоциации комплекса белок/глюкоза должна быть численно близка к этим значениям. K_d комплекса GGBP/Glc составляет 1 мкМ (Vyas et al., 1988), что на три порядка ниже содержания глюкозы в крови человека. Для разработки чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу на основе GGBP необходимо создать мутантные формы этого белка с более низким сродством к глюкозе по сравнению с белком дикого типа.

С этой целью нами были созданы и исследованы мутантные формы GGBP/W183A и GGBP/F16A (см. раздел «Влияние аминокислотных замен в положении 16 и 183 на стабильность GGBP и комплексообразование этого белка с глюкозой»). Численные значения констант диссоциации комплексов этих белков с глюкозой (0.25 мМ и 1.5 мМ (таблица), соответственно), определенные с помощью собственной УФ флуоресценции, несколько меньше концентрации глюкозы в крови здоровых людей. Кроме того, изменение полезного сигнала при комплексообразовании GGBP/W183A и GGBP/F16A с глюкозой не превышает 15 %. Это означает, что использование этих белков в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу малоперспективно. Вряд ли перспективным можно считать использование собственной УФ флуоресценции в качестве полезного сигнала биосенсорной системы. Флуоресцентный сигнал с большой амплитудой изменения в ответ на связывание глюкозы может быть получен путем регистрации флуоресценции связанного с белком красителя или FRET-сигнала химерной конструкции на основе GGBP.

В связи с этим нами была создана серия мутантных форм GGBP с различным сродством к глюкозе, меченных тиол-реактивным флуоресцентным красителем BADAN:

GGBP/H152C/W183A, GGBP/H152C/F16A, GGBP/H152C/W183F, GGBP/W183A/T185C, GGBP/T185C, GGBP/H152C, GGBP/H152C/A213R, GGBP/H152C/L238S, GGBP/H152C/A213R/L238S, GGBP/E149C/D154L/A213R/L238S, а также синтезированы FRET-конструкции sfGFP-GGBP/W183A/T185C и sfGFP-GGBP/T185C с присоединенным по 185-му положению красителем АТТО-590.

Показано, что оптимальным сайтом посадки флуоресцентного красителя (BADAN является тиол-реактивным красителем и присоединяется к цистеиновому аминкислотному остатку) является 152-е положение – амплитуда изменения интенсивности флуоресценции BADAN, присоединенного к GGBP/H152C, составляет 300 % при связывании этим белком глюкозы. BADAN незначительно снижает сродство белка к глюкозе – K_d комплекса GGBP/H152C/Glc, определенная с помощью собственной УФ-флуоресценции для несвязанного с красителем белка, составляет 5.6 мкМ, K_d комплекса GGBP/H152C-BADAN/Glc, определенная по изменению интенсивности флуоресценции BADAN, равна 8.5 мкМ (Таблица). Этот эффект можно объяснить стерическим нарушением BADAN конфигурационного соответствия между активным центром белка и молекулой глюкозы.

Аминокислотные замены – мишени точечного сайт-специфического мутагенеза, введенные в GGBP с целью оптимизации константы его связывания с глюкозой, были выбраны исходя из анализа пространственной структуры GGBP в закрытой форме. Установлено, что точечные замены аминокислотных остатков, расположенных вблизи остатков, непосредственно участвующих в связывании сахара, могут изменить сродство GGBP к глюкозе. Из всего числа созданных мутантных рекомбинантных форм GGBP наиболее перспективной для использования в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу следует считать GGBP/H152C/A213R/L238S. При связывании глюкозы интенсивность флуоресценции присоединенного к этому белку BADAN возрастает в 2 раза, константа диссоциации комплекса GGBP/H152C/A213R/L238S-BADAN/Glc составляет 5.2 мМ.

Известно, что константа диссоциации комплекса TMBP/Glc лежит в пределах изменения содержания сахара в крови здоровых людей [25]. Поэтому в качестве основы для разработки чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу можно использовать дикий тип TMBP. Так же, как и в случае с GGBP, собственная УФ-флуоресценция TMBP мало изменяется при взаимодействии этого белка с глюкозой. TMBP содержит один собственный цистеиновый остаток, расположенный в активном центре белка. Нами не обнаружено изменения флуоресценции BADAN, присоединенного к дикому типу TMBP при комплексообразовании этого белка с глюкозой. Это

обусловлено тем, что цистеиновый остаток 182 расположен глубоко внутри лиганд-связывающего центра ТМВР и микроокружение этого остатка практически не изменяется при взаимодействии белка с глюкозой. Из анализа пространственной структуры ТМВР в комплексе с трегалозой, а также на основании знаний, полученных при работе с GGBP, следует, что наиболее перспективной областью для присоединения красителя являются периферийные участки активного центра ТМВР. В связи с этим были созданы мутантные формы ТМВР/C182S/A14C и ТМВР/C182S/A43C (замена C182S введена для обеспечения специфичности пришивки красителя). Показано, что мутантная форма ТМВР/C182S/A14C с присоединенным флуоресцентным красителем BADAN перспективна для использования в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу: константа диссоциации комплекса ТМВР/C182S/A14C-BADAN/Glc составляет 3.4 мМ, амплитуда изменения полезного сигнала – 40 %. Следует отметить, что использование мутантных форм ТМВР в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу представляется более перспективным, чем использование мутантных форм GGBP, так как ТМВР обладает исключительно высокой устойчивостью к денатурирующим воздействиям (см. раздел «Структура и стабильность ТМВР»).

ВЫВОДЫ

1. Апоформа GGBP приобретает стабильную структуру только после присоединения иона Са, что позволяет отнести GGBP к белкам с частично неупорядоченной структурой.
2. Лиганды играют существенную роль в стабилизации белка: ион Са – в стабилизации апоформы, D-глюкоза – в стабилизации холоформы.
3. Процесс разворачивания как GGBP, так и его комплекса с D-глюкозой под действием GdnHCl является одностадийным и обратимым. Тепловая денатурация GGBP и его комплекса с D-глюкозой осложнена агрегацией. Степень агрегации определяется концентрацией белка, температурой нагрева и продолжительностью инкубации белка при высокой температуре.
4. ТМВР обладает исключительно высокой устойчивостью к денатурирующим воздействиям, значительно большей по сравнению с GGBP.
5. Способность связывать глюкозу и высокая стабильность ТМВР делают мутантные рекомбинантные формы этого белка предпочтительными кандидатами на роль чувствительного элемента биосенсора на глюкозу по сравнению с мутантными рекомбинантными формами GGBP.

6. Наиболее перспективными из числа исследованных мутантных форм ТМВР и GGBP для использования в качестве чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу следует считать мутантные формы ТМВР/С182S/А14С ($K_d = 3.4 \pm 0.1$ мМ, амплитуда изменения полезного сигнала 40 %) и GGBP/Н152С/А213R/Л238S ($K_d = 5.2 \pm 0.3$ мМ, амплитуда изменения полезного сигнала 200 %)

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1) Stepanenko Olga V., Povarova O.I., Stepanenko O.V., **Fonin A.V.**, Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Staiano M., D'Auria S. (2010). Structure and stability of D-galactose/D-glucose-binding protein. The role of D-glucose binding and Ca ion depletion. *Spectroscopy* **24(3-4)**: 355-359.

2) Stepanenko Olga V., Povarova O.I., Stepanenko O.V., **Fonin A.V.**, Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Staiano M., Varriale A., D'Auria S. (2011). New insight into protein-ligand interactions. The case of the D-galactose/D-glucose-binding protein from *E. coli*. *J. Phys. Chem. B* **115(12)**: 2765-2773.

3) Stepanenko Olga V., **Fonin A.V.**, Stepanenko Olesya V., Morozova K.S., Verkhusha V.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Staiano M., D'Auria S. (2011). New insight in protein-ligand interactions. 2. Stability and properties of two mutant forms of the D-galactose/D-glucose-binding protein from *E. coli*. *J. Phys. Chem. B* **115(29)**: 9022-9032.

4) Степаненко Ольга В., Поварова О.И., **Фонин А.В.**, Степаненко Олеся В. (2010). Стабильность сахар-связывающих белков: D-галактоза/D-глюкоза-связывающего белка из *Escherichia coli* и трегалоза/мальтоза-связывающего белка из *Thermococcus litoralis*. *Цитология* **52 (11)**: 950-954.

5) **Фонин А.В.**, Степаненко Ольга В., Верхуша В.В., Щербакова Д.М., Кузнецова И.М., Туроверов К.К. (2011). Перспективы создания чувствительного элемента биосенсорной системы на глюкозу. *Вестник СпбГУ* **4(4)**: 180-185.

6) Степаненко Ольга В., Степаненко Олеся В., **Фонин А.В.**, Щербакова Д.М., Верхуша В.В., Кузнецова И.М., Туроверов К.К. (2011). D-галактоза/D-глюкоза-связывающий белок – как чувствительный элемент социально значимой биосенсорной системы. Взаимодействие белка с глюкозой. *Вестник СпбГУ* **4(4)**: 171-179.

7) Stepanenko Olga V., Stepanenko Olesya V., **Fonin A.V.**, Verkhusha V.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K. (2012). Protein – ligand interactions of the D-galactose/D-glucose-binding protein as a potential sensing probe of glucose biosensors. *Spectroscopy - Biomedical Applications* **27(5-6)**: 373-379.

8) Stepanenko Olga, **Fonin A.**, Stepanenko Olesya, Kuznetsova I., Turoverov K. (2012). Ligand-binding proteins: structure, stability and practical application. In: Protein structure. *InTech Chapter 12*: 265 – 277.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Turoverov K.K. et al., 2010. *Prog Biophys Mol Biol.* 102(2-3):73-84. **2.** Dunker A.K. et al., 2005. *Febs J.* 272: 5129-5148. **3.** Uversky V.N. et al., 2008. *Annu Rev Biophys* 37: 215-246. **4.** Yesylevskyy S.O. et al., 2006. *Biophys J.* 91(8):3002-3013. **5.** Birnboim H.C. et al., 1979. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523. **6.** Laemmli U.K. 1970. *Nature.* 227: 680-685. **7.** Khan F. et al., 2010. *Anal. Biochem.* 399: 39–43. **8.** Berman H.M. et al., 2000. *Nucleic Acids Res* 28: 235–242. **9.** Turoverov K.K. et al., 1985. *Biophys. Chem.* 23: 79-89. **10.** Туроверов К.К. и др., 1998. *Цитология* 40 (8/9): 806-817. **11.** Kuznetsova I.M. et al., 2012. *PLoS One* 7: e40845. **12.** Nölting B. 1999. *Protein folding kinetics.* Berlin. Springer. 222 p. **13.** Marquardt D.W. 1963. *J.*

Soc. Indust. Apl. Math. 11: 431-441. **14.** Zuker M. et al., 1985. Rev. Sci. Instrum. 56: 14-22. **15.** Levitsky D.I. et al., 2000. Eur J Biochem 267: 1869-1877. **16.** Kremneva E. et al., 2004. Biophys J 87: 3922-3933. **17.** Levitsky D.I. et al., 2004. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London. **18.** Privalov P. L. and Potekhin S.A. 1986. Methods Enzymol 131: 4-51. **19.** Vyas N.K. et al., 1988. Science 242: 1290-1295. **20.** D'Auria S. et al., 2004. Biotechnol Prog 20: 330-337. **21.** D'Auria S. et al., 2006. J Biochem 139: 213-221. **22.** Piszczek G. et al., 2004. Biochem J 381: 97-103. **23.** Permyakov S.E. et al., 2008. Proteins 72:822–836. **24.** Povarova O.I. et al., 2010. PloS One 5: e15035. **25.** Herman P. et al., 2007. BBA 1774: 540-544.