

На правах рукописи

КНЯЗЕВА ЕКАТЕРИНА ЛЕОНИДОВНА

**МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ  
 $\alpha$ -ЛАКТАЛЬБУМИНА С ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТОЙ  
И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ**

03.01.02 – биофизика

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Пушино

2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биологического приборостроения РАН.

**Научные руководители:** доктор биологических наук, профессор  
Пермяков Евгений Анатольевич

кандидат физико-математических наук  
Пермяков Сергей Евгеньевич

**Официальные оппоненты:** доктор физико-математических наук, профессор  
Хечинашвили Николай Николаевич

доктор биологических наук  
Орлов Николай Яковлевич

**Ведущая организация:** Биологический факультет  
Московского Государственного Университета

Защита диссертации состоится « 30 » июня 2010 г. в 11-00 часов на заседании совета Д 002.066.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Учреждении Российской академии наук Институте фундаментальных проблем биологии РАН по адресу: 142290, г. Пущино, Институтская ул., 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИФПБ РАН по адресу: 142290, г. Пущино, Институтская ул., 2.

Автореферат разослан «     » мая 2010 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Г.Н. Назарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

В настоящее время известен целый ряд белков природного происхождения, обладающих селективной цитотоксической активностью по отношению к опухолевым клеткам. Одним из таких препаратов является мультимерная форма человеческого  $\alpha$ -лактальбумина (MAL), выделенная из казеиновой фракции молока (Nakansson et al. 1995). Показано, что MAL проявляет цитотоксическую активность по отношению к раковым и недифференцированным клеткам, не затрагивая при этом зрелые и здоровые клетки. MAL также обладает выраженной антибактериальной активностью по отношению к штаммам *Streptococcus pneumonia*. Группе К.Сванборг удалось получить подобное состояние *in vitro* с помощью ионообменной хроматографии апо-формы (свободной от  $\text{Ca}^{2+}$ ) человеческого или коровьего  $\alpha$ -лактальбумина ( $\alpha$ -ЛА) на колонке, предварительно кондиционированной олеиновой кислотой (ОК) (Svensson et al. 2000). Это состояние белка получило название HAMLET/BAMLET (*human/bovine alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells*). Исследование механизма действия HAMLET на клетки обнаружило удивительную способность комплекса запускать в раковых клетках несколько путей клеточной гибели. Это обстоятельство позволяет надеяться на создание на основе HAMLET лекарственных средств, способных бороться с опухолевыми клетками самыми разными путями.

Несмотря на то, что состояние HAMLET активно изучают на протяжении последнего десятилетия, остаются неразрешёнными многие принципиальные вопросы. До сих пор остается не выясненной структура HAMLET, а также взаимодействия, стабилизирующие комплекс  $\alpha$ -ЛА с ОК. Многоступенчатая процедура, применяемая для приготовления HAMLET, представляет собой сложный с физико-химической точки зрения процесс, препятствующий исследованию молекулярных основ формирования комплекса  $\alpha$ -ЛА с ОК. Попытки образования активного комплекса путем простого смешения обоих компонентов в условиях раствора сопряжены с образованием протяженных фаз олеиновой кислоты, что приводит к выраженной гетерогенности системы и высокой степени зависимости результатов от условий смешения компонентов. Согласно некоторым работам, приготовленные таким образом комплексы  $\alpha$ -лактальбумина с ОК обладают низкой в сравнении с HAMLET цитотоксической активностью, однако систематические исследования процесса формирования комплексов  $\alpha$ -ЛА с ОК в условиях раствора в литературе отсутствуют. Наконец, несмотря на интенсивное изучение механизмов, лежащих в основе цитотоксического действия комплекса, до сих пор остаётся не выясненным механизм его проникновения в клетку, а также влияние модификации  $\alpha$ -

лактальбумина олеиновой кислотой на взаимодействие  $\alpha$ -ЛА с одной из основных мишеней HAMLET в клетке - гистонами.

### **Цели и задачи исследования**

Целью настоящей работы было изучение механизма формирования в условиях раствора активных по отношению к раковым клеткам комплексов  $\alpha$ -ЛА с олеиновой кислотой в отсутствие протяженных фаз ОК, а также выяснение влияния модификации  $\alpha$ -ЛА олеиновой кислотой на взаимодействие белка с мембранами и гистонами.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Изучить влияние условий раствора на эффективность образования комплекса  $\alpha$ -ЛА с олеиновой кислотой, с учётом критической концентрации мицеллообразования (ККМ) ОК.
- 2) Исследовать роль различных взаимодействий в стабилизации комплекса  $\alpha$ -ЛА с олеиновой кислотой.
- 3) Провести сравнительное исследование структурных, физико-химических и цитотоксических свойств состояния HAMLET и комплексов  $\alpha$ -ЛА - ОК, получаемых в оптимизированных условиях раствора.
- 4) Исследовать влияние модификации  $\alpha$ -ЛА олеиновой кислотой на взаимодействие белка с искусственными и природными мембранами, а также гистонами, на примере гистона H1.

### **Научная новизна**

В работе впервые проведено исследование взаимодействия  $\alpha$ -лактальбумина с олеиновой кислотой в условиях раствора с учётом критической концентрации мицеллообразования жирной кислоты. Подобраны оптимальные условия раствора, обеспечивающие максимальную ёмкость белка по отношению к ОК. Обнаружено, что  $\alpha$ -лактальбумин обладает множественными центрами связывания олеиновой кислоты. Показано, что стабилизация комплекса  $\alpha$ -ЛА - ОК достигается за счет гидрофобных взаимодействий между белком и ОК. Связывание ОК не вызывает олигомеризации белка, не изменяет его эффективного сродства к ионам  $Ca^{2+}$ , однако приводит к снижению термостабильности апо- $\alpha$ -ЛА, а также к увеличению содержания в нем  $\alpha$ -спиралей. Изучение структурных, физико-химических и цитотоксических свойств комплексов  $\alpha$ -ЛА - ОК, полученных в оптимизированных условиях раствора, обнаружило сходство этих комплексов с состоянием HAMLET.

Впервые показано, что комплексы  $\alpha$ -лактальбумина с ОК наряду с интактным белком взаимодействуют как с искусственными фосфолипидными мембранами, так и

с природными мембранами клеток водорослей *Chara corallina*. При этом модификация  $\alpha$ -ЛА олеиновой кислотой приводит к усилению наблюдаемых эффектов. Комплексы  $\alpha$ -ЛА - ОК вызывают изменения ионных токов через плазмалемму клеток *Chara corallina*, приводя к развитию неспецифической проницаемости мембраны за счёт нарушения её целостности. Также показано, что модификация белка олеиновой кислотой повышает его сродство к гистону H1 *in vitro*, однако не является необходимым условием взаимодействия  $\alpha$ -ЛА с гистонами.

### **Научно-практическая значимость**

Показано, что общепринятый специфический протокол получения состояния HAMLET не является необходимым условием получения комплекса  $\alpha$ -лактальбумина с ОК, обладающего цитотоксической активностью по отношению к раковым клеткам. Тот факт, что подобные комплексы могут быть приготовлены в водном растворе без использования ионообменных носителей, облегчает и удешевляет процесс их приготовления, делает его более контролируемым и гибким. Предлагаемая в работе методика открывает дополнительные возможности для создания активных комплексов  $\alpha$ -ЛА – ОК, обладающих требуемыми свойствами, путем внесения модификаций (добавление дополнительных компонентов в раствор, использование других жирных кислот, и пр.), направленных на увеличение эффективности препаратов, повышение селективности их действия по отношению к раковым клеткам, и пр.

Следует отметить, что предложенная в работе методика определения ёмкости белка по отношению к жирной кислоте, основанная на измерении зависимости величины эффективной критической концентрации мицеллообразования ЖК от концентрации белка, может быть применена для исследования взаимодействия других белков с жирными кислотами и другими амфифильными веществами в отсутствие их протяженных фаз.

### **Апробация работы**

Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на симпозиумах и конференциях: 11-ая международная школа-конференция «Биология - наука XXI века» (Пушино, 2007); Школа – конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Биомедицинская инженерия - 2007» (Пушино, 2007); 12-ая международная школа-конференция «Биология - наука XXI века» (Пушино, 2008); 2<sup>nd</sup> Symposium on HAMLET and tumor-killing proteins (Lund, 2009); 14-ая международная школа-конференция «Биология - наука XXI века» (Пушино, 2010).

## Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 106 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, методической части, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы (151 источник). Работа иллюстрирована 25 рисунками и содержит 9 таблиц.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Материалы.** Человеческий  $\alpha$ -ЛА был выделен из молока по методике, описанной в работе (Kaplanas & Antanavichyus 1975). Коровий  $\alpha$ -ЛА приобретён у фирмы Sigma Chemical Co. Для работы использовали реактивы степени «осч». Проводимость используемой воды составляла не более 0,05 мкСм/см.

**Выбор величины рН и температурных условий.** В большинстве экспериментов использовали рН 8,3 - величину, используемую при приготовлении состояния HAMLET. Титрование  $\alpha$ -ЛА олеиновой кислотой выполняли при температурах 17°C (выше температуры плавления ОК, 16°C, и ниже середины теплового перехода апо- $\alpha$ -ЛА) и 45°C (тепловой переход апо-формы белка завершён).

**Приготовление состояния HAMLET** проводили согласно методике, описанной в работе (Pettersson et al. 2006), с помощью анионообменной хроматографии на колонке с носителем ДЭАЭ-Трисакрил М.

**Приготовление комплексов LA-OA-17 и LA-OA-45.** 50 мл 10 мкМ раствора  $\alpha$ -ЛА, свободного от  $\text{Ca}^{2+}$ , (рН 8,3, 20 мМ  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -KOH, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА) титровали аликвотами 15-20 мкл 50 мМ раствора ОК в 96% этаноле, при постоянном перемешивании до достижения ККМ. Полученные при 17°C (LA-OA-17) или 45°C (LA-OA-45) комплексы диализовали против дистиллированной воды, лиофилизовали и хранили при -18°C.

**Приготовление комплекса bLA-OA-45.** 2-6 мл 600 мкМ раствора коровьего  $\alpha$ -ЛА, свободного от  $\text{Ca}^{2+}$ , (рН 12,0, 5 мМ KOH, 1 мМ ЭДТА) титровали при 45°C аликвотами 10-15 мкл 0,994 М раствора ОК в 96% этаноле до достижения ККМ. Свободную ОК удаляли путём снижения рН до 2,0-2,5 и центрифугирования в течение 30 мин., 12000 г. Нижнюю фазу, не содержащую протяжённых фаз ОК, отбирали и доводили рН до 6. Полученный раствор диализовали против дистиллированной воды и лиофилизовали.

**Приготовление малых униламеллярных везикул дипальмитоил-фосфатидилхолина (ДПФХ)** проводили согласно методике, описанной в работе (Huang 1969). Для разделения смеси везикул использовали носитель Сефароза CL-4В.

Собирали второй пик элюции, соответствующий малым везикулам ДПФХ.

**Выделение комплекса  $\alpha$ -ЛА с липосомами** проводили согласно работе (Berliner & Koga 1987). Связавшийся с липосомами  $\alpha$ -ЛА отделяли от свободного белка при помощи гель-фильтрации на носителе Сефадекс G-200.

**Оценки ёмкости белка по отношению к ОК** проводили на спектрофотометре Cary 100 (Varian Inc.) с термостатируемым кюветодержателем. 3 мл буфера титровали аликвотами 2-6 мкл 1-100 мМ раствора ОК в 96% этаноле. Появление протяжённых фаз ОК контролировали по росту рассеяния света при 310 нм. ККМ свободной кислоты (ККМ<sub>0</sub>) оценивали из спектрофотометрической кривой титрования как концентрацию ОК, соответствующую точке пересечения двух линейно аппроксимированных участков титрационной кривой. Аналогичным способом измеряли кажущееся значение ККМ ОК в присутствии  $\alpha$ -ЛА в концентрации [P], которое прямо пропорционально ёмкости белка по отношению к ОК ( $n_{\max}$ ):

$$\text{ККМ} = \text{ККМ}_0 + n_{\max} \cdot [\text{P}] \quad (1)$$

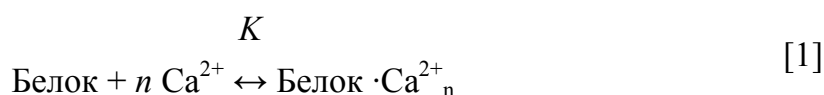
Величину  $n_{\max}$  определяли из наклона зависимости ККМ от [P].

**Флуоресцентные измерения** проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian Inc.) с термостатируемым кюветодержателем. При измерении температурных зависимостей белковой флуоресценции температуру образца изменяли ступенчатым образом, с шагом 2°C. Средняя скорость нагрева составляла 0,5°C/мин.

**Круговой дихроизм (КД).** Измерение КД проводили на спектрополяриметре JASCO J-810 (JASCO Inc.) с термостатируемым кюветным отделением. Конечный спектр являлся результатом усреднения данных трёх измерений за вычетом спектра буфера (20 мМ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-KOH, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,3). Для количественной оценки содержания элементов вторичной структуры белка использовали пакет ПО CDPro (Sreerama et al. 2000).

**Очистка белка от ионов кальция** проводилась с помощью гель-фильтрации смеси белка с хелатором ионов Ca<sup>2+</sup> на носителе Сефадекс G-25 (Blum et al., 1977).

**Измерение сродства белка к кальцию** проводили путём спектрофлуориметрического титрования очищенного от Ca<sup>2+</sup> белка стандартным раствором CaCl<sub>2</sub>. Равновесную константу связывания Ca<sup>2+</sup> белком,  $K$ , определяли из экспериментальных данных согласно кооперативной схеме связывания:



где  $n$  – коэффициент Хилла. Подгонка экспериментальных данных проводилась с помощью программы FluoTitr v.1.2 (ИБП РАН, Пущино), по методу Маркуардта, путём варьирования параметров  $n$  и  $K$ . Абсолютная ошибка определения  $K$  не превышала  $\pm 0,25$  порядка величины.

**Измерение сродства белка к ОК.** Для оценки сродства  $\alpha$ -ЛА к ОК использовали метод, аналогичный описанному выше для оценки сродства к  $\text{Ca}^{2+}$ . Раствор  $\alpha$ -ЛА титровали аликвотами раствора ОК до величины ККМ.

**Исследование взаимодействия  $\alpha$ -ЛА с гистоном H1** проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse. Триптофановую флуоресценцию  $\alpha$ -ЛА возбуждали при 304,5 нм, при спектральной ширине 5 нм. Эффективные параметры ассоциации гистона с  $\alpha$ -ЛА определяли из экспериментальных данных согласно кооперативной схеме связывания [1].

**Гель-фильтрационная хроматография** для проверки наличия олигомеров белка проводилась с помощью системы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) Prominence HPLC (Shimadzu) на колонке Superdex S-200, уравновешенной буфером 20 мМ  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -KOH, 250 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,3. Образцы растворяли в том же буфере с последующим центрифугированием (1300 об./мин. в течение 10 минут при комнатной температуре). Калибровку проводили в тех же условиях.

**Тест на цитотоксичность** проводили совместно с сотрудниками Лаборатории тканевой инженерии ИТЭБ РАН, Пущино. Клетки HEp-2 были выращены на модифицированной Дульбекко питательной среде Игла (DMEM), дополненной 10% зародышевой сывороткой крупного рогатого скота, в присутствии 40 мг/мл гентамицина, 35 мМ бикарбоната натрия и 20 мМ HEPES при 37°C, в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ .

Растворы  $\alpha$ -ЛА и комплексов белка с ОК в ростовой среде, также как и ОК (1 М раствор в этаноле), добавляли в культуральную среду спустя 24 часа после посева клеток. Цитотоксичность оценивали, используя анализ с кристаллическим фиолетовым, по отношению оптических плотностей на 560 нм в обработанной и контрольной культуре спустя 48 часов после добавления токсичного агента (Nomizu et al. 1995). Отношение оптических плотностей прямо пропорционально числу выживших клеток. Каждый эксперимент выполняли не менее трёх раз.

**Электрофизиологические исследования** были выполнены совместно с Жереловой О.М. (Лаб. Ультраструктуры нейрона ИТЭБ РАН, г. Пущино) и Катаевым А.А. (Лаб. Молекулярной физиологии клетки ИБК РАН, г. Пущино) согласно экспериментальной методике, описанной в работах (Lunevsky et al. 1983) и (Kataev et al. 1984). В работе использовали междоузловые клетки водоросли *Chara corallina*. Представлены усредненные электрофизиологические данные, полученные на 5-7 отдельных клетках.



## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Зависимость ККМ олеиновой кислоты от условий раствора*

Приготовление комплексов  $\alpha$ -ЛА с ОК в условиях раствора проводили при значении pH 8,3, используемом при получении состояния HAMLET. Карбоксильная группа мономерной ОК в данных условиях полностью депротонированна ( $pK_a$  4,8) и способна связывать ионы кальция, что, в свою очередь, может влиять на ККМ олеиновой кислоты. Действительно, значение ККМ в отсутствие ионов  $Ca^{2+}$  (1 мМ ЭДТА) более чем в 5 раз превышало значения, полученные в условиях избытка  $Ca^{2+}$  (1 мМ  $CaCl_2$ ). Добавление NaCl либо KCl оказывало меньшее влияние на величину ККМ.

Таким образом, условия отсутствия  $Ca^{2+}$  наиболее благоприятны для насыщения белка ОК.

### *Ёмкость $\alpha$ -лактальбумина по отношению к олеиновой кислоте*

Для оценки ёмкости  $\alpha$ -ЛА по отношению к олеиновой кислоте ( $n_{max}$ ) нами была определена зависимость эффективной критической концентрации мицеллообразования ОК от концентрации белка при 17°C и 45°C. Величина ККМ увеличивается пропорционально концентрации белка, при этом наклон прямой линии соответствует величине  $n_{max}$  (Уравнение (1)). Показано, что максимальная величина  $n_{max}$  достигается в условиях отсутствия  $Ca^{2+}$ , в присутствии солей и повышенной температуре (Табл. 1). При этом  $n_{max}$  не зависит от типа соли (KCl или NaCl). Повышение температуры с 17°C до 45°C сопровождается 40% увеличением  $n_{max}$ . Важность ионной силы для эффективного связывания ОК  $\alpha$ -лактальбумином подтверждается снижением  $n_{max}$  в 3-8 раз в отсутствие солей.

**Табл. 1.** Зависимость ёмкости  $\alpha$ -ЛА по отношению к ОК ( $n_{max}$ ) от условий раствора.

Температура	1 мМ $CaCl_2$	1 мМ ЭДТА		
	$n_{max}$ , без солей	$n_{max}$ , без солей	$n_{max}$ , 150 мМ NaCl	$n_{max}$ , 150 мМ KCl
17°C	0	3,7	13,5	12,7
45°C	0	2,2	18,5	18,0

Критическим условием для ассоциации ОК явилось отсутствие ионов  $Ca^{2+}$ , что также подтверждается экспериментами по спектрофлуориметрическому и КД- (в дальней УФ-области) титрованию  $\alpha$ -ЛА олеиновой кислотой, которые не выявили каких-либо спектральных изменений для белка, насыщенного кальцием (данные не представлены). Этот вывод хорошо согласуется с имеющимися в литературе данными о невозможности формирования состояния HAMLET из  $Ca^{2+}$ -насыщенного белка

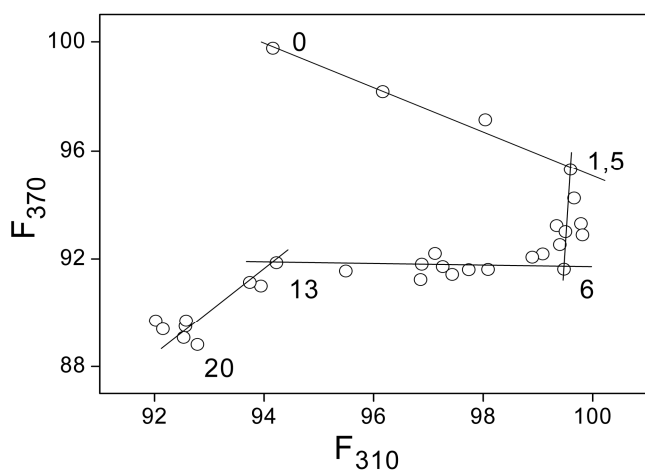
(Svensson et al. 2000).

В целом, Табл. 1 свидетельствует о том, что наиболее благоприятные для формирования комплекса между  $\alpha$ -ЛА и ОК условия, соответствующие максимальной ёмкости белка, достигаются в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  при  $45^\circ\text{C}$  в присутствии 150 мМ NaCl/KCl. Эти условия переводят белок в состояние «расплавленной глобулы», обладающее хорошо выраженной вторичной структурой, но лишенное уникальной пространственной структуры (Dolgikh et al., 1981). Сворачивание  $\alpha$ -ЛА путём понижения температуры или связывания  $\text{Ca}^{2+}$  сопровождается снижением величины  $n_{\text{max}}$ .

### **Механизм связывания олеиновой кислоты $\alpha$ -лактальбумином**

Связывание ОК  $\alpha$ -лактальбумином в оптимальных условиях сопровождается коротковолновым сдвигом максимума спектра флуоресценции на 2 нм, свидетельствуя о снижении подвижности и полярности окружения остатков Trp белка, указывая на уменьшение их доступности растворителю.

Для выяснения деталей механизма связывания ОК белком нами были построены флуоресцентные фазовые графики, представляющие собой зависимость интенсивности флуоресценции при фиксированной длине волны от интенсивности флуоресценции при другой длине волны (Бурштейн, 1977) (Рис. 1). Каждая прямая



**Рис. 1.** Анализ результатов спектрофлуориметрического титрования ОК  $\alpha$ -ЛА, свободного от  $\text{Ca}^{2+}$ , при  $45^\circ\text{C}$ , pH 8,3, с помощью фазового графика. Показаны отношения ОК/белок, соответствующие ключевым точкам фазового графика.

линия на фазовом графике соответствует переходу между двумя конформационными состояниями белка. Таким образом, можно выявить точки, соответствующие максимальной заселённости отдельных состояний белка, а также переходам между этими состояниями.

Фазовый график для спектрофлуориметрического титрования  $\alpha$ -ЛА, свободного от  $\text{Ca}^{2+}$ , олеиновой кислотой до ККМ при  $45^\circ\text{C}$  представлен на Рис. 1. Видно, что процесс связывания ОК  $\alpha$ -лактальбумином протекает с образованием, по меньшей мере, трёх интермедиатов при  $45^\circ\text{C}$  и двух промежуточных состояний белка при  $17^\circ\text{C}$  (данные не представлены). Это, в свою очередь, согласуется с оценками ёмкости апо-белка по отношению к ОК и

свидетельствует о наличии множественных центров связывания олеиновой кислоты в апо-форме  $\alpha$ -лактальбумина.

Несмотря на то, что связывание ОК  $\alpha$ -лактальбумином, свободным от  $\text{Ca}^{2+}$ , - сложный мультстадийный процесс, можно оценить псевдо-равновесную константу связывания ОК  $K$ , используя кооперативную схему связывания  $n$  молекул ОК на молекулу белка. В результате оценки мы получили значения  $K=2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  и  $n=1,3$  при  $17^\circ\text{C}$ . При  $45^\circ\text{C}$  наблюдали повышение сродства  $\alpha$ -ЛА к ОК примерно на порядок величины, что находится в соответствии с данными по увеличению величин  $n_{\text{max}}$  с повышением температуры (Табл. 1).

### ***Исследование взаимодействий, стабилизирующих комплексы $\alpha$ -лактальбумина с олеиновой кислотой***

Повышение ёмкости и эффективного сродства апо- $\alpha$ -ЛА по отношению к ОК в результате разворачивания белка, сопровождающегося экспонированием гидрофобных групп белка растворителю, говорит в пользу решающей роли гидрофобных взаимодействий в образовании комплекса белка с жирной кислотой. Для проверки этой гипотезы нами были выбраны крайне щелочные условия среды (рН 12,0), при которых практически полностью исключается электростатическое взаимодействие между основными аминокислотными остатками белка (за исключением одного остатка аргинина) и отрицательно заряженной карбоксильной группой жирной кислоты. Известно, что при щелочных рН коровий  $\alpha$ -лактальбумин претерпевает структурные изменения, вызванные депротонированием остатков лизина и тирозина (Permyakov et al., 1985). При рН 12,0 щелочной денатурационный переход апо- $\alpha$ -ЛА полностью завершён.

**Табл. 2.** Зависимость ёмкости коровьего  $\alpha$ -ЛА по отношению к ОК ( $n_{\text{max}}$ ) от условий раствора при рН 12,0.

Температура	1 mM $\text{CaCl}_2$	1 mM ЭДТА	
	$n_{\text{max}}$ 150 mM KCl	$n_{\text{max}}$ без солей	$n_{\text{max}}$ 150 mM KCl
20°C	0	14±1	25±2
45°C	0	34±5	22±3

Спектрофотометрическое измерение величины ККМ ОК при рН 12,0 показывает значительное увеличение ККМ в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  (до миллимолей), по сравнению с ККМ при рН 8,3 (данные не представлены),

что согласуется с литературными данными об увеличении растворимости длинноцепочечных жирных кислот с повышением рН раствора (Kanicky et al., 2002). В то же время, в присутствии 1 mM  $\text{CaCl}_2$  величина ККМ олеиновой кислоты остается достаточно низкой (~4 мкМ).

Необходимо отметить, что увеличение растворимости ОК при рН 12,0

приводит, соответственно, к увеличению ошибки при определении  $KKM_0$  до нескольких сотен микромолей. Поэтому для более точного определения ёмкости  $\alpha$ -ЛА по отношению к ОК при pH 12,0 использовали концентрации белка  $\sim 600$  мкМ. Полученные в результате величины  $n_{max}$  представлены в Табл. 2.

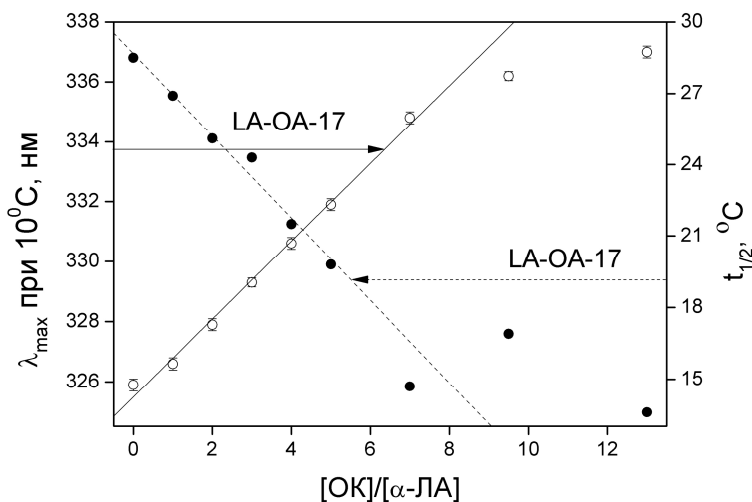
Показано, что ёмкость  $Ca^{2+}$ -насыщенного  $\alpha$ -ЛА по отношению к ОК равна нулю. Для апо-формы белка ёмкость по отношению к ОК была даже выше, чем при pH 8,3 (см. Табл. 1). Это, с одной стороны, свидетельствует о том, что электростатические взаимодействия не играют существенной роли в процессе формирования комплексов  $\alpha$ -лактальбумина с ОК, с другой стороны, увеличение  $n_{max}$  в данных условиях, когда гидрофобная поверхность апо-белка экспонирована растворителю за счёт щелочной денатурации, подтверждает гидрофобный характер взаимодействий, стабилизирующих комплексы  $\alpha$ -ЛА с олеиновой кислотой.

В оптимизированных условиях раствора, обеспечивающих максимальную ёмкость  $\alpha$ -лактальбумина по отношению к ОК при pH 8,3 и pH 12,0, были приготовлены комплексы LA-OA-45 (LA-OA-17) и bLA-OA-45, соответственно, как описано в главе *Методы*. Далее необходимо было провести сравнительное исследование структурных, физико-химических и цитотоксических свойств данных комплексов и состояния HAMLET.

### **Содержание олеиновой кислоты в препаратах LA-OA**

Для оценки числа молекул ОК, приходящихся на молекулу  $\alpha$ -лактальбумина в препарате LA-OA-17 ( $n_{irr}$ ) (после диализа насыщенного ОК белка против воды, с последующей лиофилизацией), некоторые физико-химические параметры LA-OA-17 сравнивали с таковыми для комплексов  $\alpha$ -ЛА с ОК, полученных добавлением при 17°C олеиновой кислоты до достижения фиксированного молярного отношения ОК к белку. На Рис. 2 представлены результаты экспериментов по тепловой денатурации смеси ОК- $\alpha$ -ЛА, полученные методом собственной флуоресценции. Как видно из Рис. 2, ассоциация ОК приводит к значительному снижению термостабильности апо-белка. Дестабилизация  $\alpha$ -ЛА приводит к сдвигу спектра флуоресценции при 10°C в длинноволновую область. Начальную часть зависимости  $\lambda_{max}$  при 10°C и  $t_{1/2}$  от молярного соотношения [ОК]/[белок] можно аппроксимировать прямой линией (Рис. 2). Сравнивая величины этих параметров для LA-OA-17 с калибровочной кривой, получаем значение  $n_{irr}$  равное  $6 \pm 0,4$ .

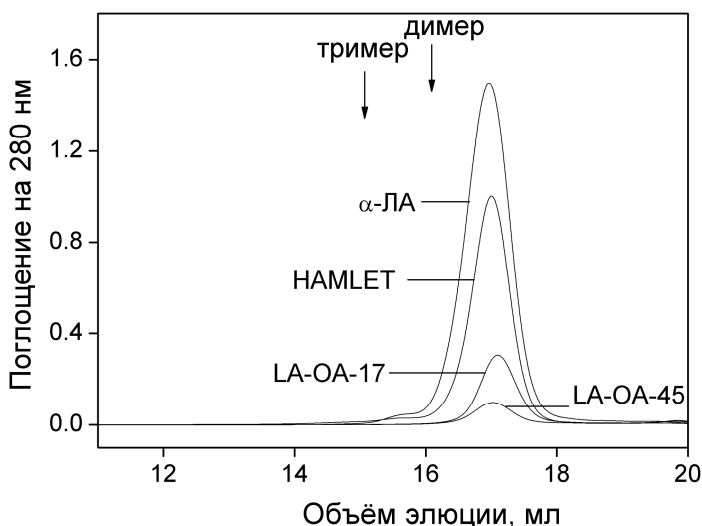
Аналогичным образом, величина  $n_{irr}$  для LA-OA-45 составляет  $\sim 9$ . Однако в этом случае зависимость  $\lambda_{max}$  от молярного соотношения ОК/белок теряла линейность выше отношения 10:1 (данные не представлены), что затрудняло точную оценку  $n_{irr}$ .



**Рис. 2.** Зависимость спектральных и термодинамических параметров  $\alpha$ -ЛА, свободного от  $\text{Ca}^{2+}$ , от молярного соотношения ОК к белку (20 мМ  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -КОН, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, рН 8,3). Горизонтальные линии указывают значения соответствующих параметров для LA-OA-17.

белка, что находится в соответствии с полученными оценками сродства белка к ОК, а также дополнительно подтверждает решающую роль гидрофобных взаимодействий в образовании комплексов.

### Исследование содержания олигомерных форм в комплексах $\alpha$ -лактальбумина с олеиновой кислотой



**Рис. 3.** Гель-фильтрационная ВЭЖХ  $\alpha$ -ЛА (334 мкМ), HAMLET (155 мкМ), LA-OA-17 (49 мкМ) и LA-OA-45 (20 мкМ), свободных от  $\text{Ca}^{2+}$  (1 мМ ЭДТА), на колонке Superdex S-200, 17°C, рН 8,3.

Величина  $n_{irr}$  для состояния HAMLET не может быть определено аналогичным способом, вследствие специфических условий формирования данного комплекса. Среднее число молекул олеиновой кислоты, связанных на молекулу HAMLET, по литературным данным варьирует от 0,6-1,3 (Svensson et al. 2003) до 5,1-5,4 (Pettersson-Katsberg et al. 2009).

Снижение термостабильности апо- $\alpha$ -ЛА при связывании ОК свидетельствует о большем сродстве к ОК денатурированного состояния

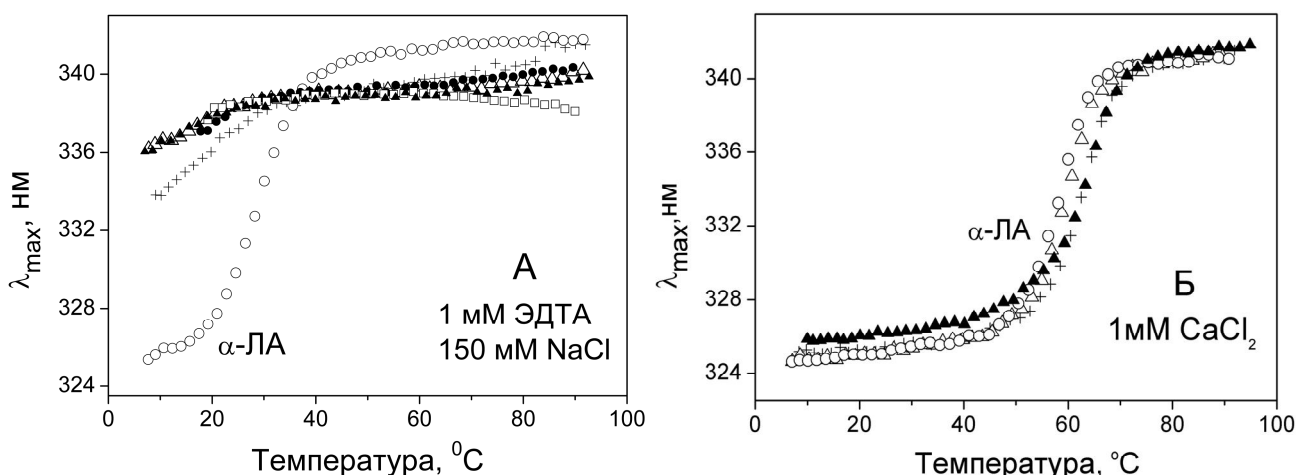
белка, что находится в соответствии с полученными оценками сродства белка к ОК, а также дополнительно подтверждает решающую роль гидрофобных взаимодействий в образовании комплексов. Для проверки возможного наличия олигомерных форм комплексов  $\alpha$ -ЛА с ОК была применена гель-фильтрационная ВЭЖХ на носителе Superdex S-200. Из Рис. 3 видно, что все образцы при 17°C элюируются одним симметричным пиком, соответствующим мономерной форме человеческого  $\alpha$ -ЛА. Тем не менее, при высокой концентрации интактного белка (334 мкМ) обнаружен минорный пик, соответствующий димеру  $\alpha$ -ЛА. Аналогичные результаты были

получены при 40°C, а также в условиях насыщения интактного белка и его ОК-комплексов ионами  $\text{Ca}^{2+}$  (данные не представлены).

Таким образом, гель-фильтрационный анализ показывает, что модификация  $\alpha$ -лактальбумина олеиновой кислотой не приводит к олигомеризации белка.

### **Влияние связывания ОК на термостабильность $\alpha$ -ЛА, его сродство к $\text{Ca}^{2+}$ и вторичную структуру**

Связывание ОК приводит к заметному снижению термостабильности апо- $\alpha$ -ЛА, что видно из Рис. 2, а также из спектрофлуориметрических данных по тепловой денатурации различных состояний  $\alpha$ -ЛА, приведённых на Рис. 4А. В то время как комплекс ЛА-ОА-17 характеризуется сдвигом термостабильности по отношению к интактному  $\alpha$ -ЛА на  $\sim 9^\circ\text{C}$  (Рис. 2), насыщение белка олеиновой кислотой до величины ККМ при 17°C вызывает более значительное изменение термостабильности - на  $\sim 12^\circ\text{C}$ . Более выраженные относительно ЛА-ОА-17 изменения термостабильности, обнаруженные для ЛА-ОА-45 и белка, насыщенного ОК, коррелируют с бóльшим числом молекул ОК, приходящихся на молекулу  $\alpha$ -ЛА ( $n_{irr}$ ).



**Рис. 4.** Термостабильность различных состояний апо- (А) и  $\text{Ca}^{2+}$ -насыщенного (Б)  $\alpha$ -ЛА при pH 8,3: интактный  $\alpha$ -ЛА ( $\circ$ ), HAMLET ( $\Delta$ ), ЛА-ОА-17 ( $+$ ), ЛА-ОА-45 ( $\blacktriangle$ ) и  $\alpha$ -ЛА, насыщенный ОК до ККМ при 17°C ( $\bullet$ ) или 45°C ( $\square$ ).

В отличие от апо-белка, насыщенные  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) комплексы HAMLET, ЛА-ОА-17 и ЛА-ОА-45 демонстрировали слабое (менее, чем на 4°C) повышение термостабильности, по сравнению с интактным  $\alpha$ -ЛА (Рис. 4Б).

Для изучения влияния ассоциации ОК на сродство  $\alpha$ -ЛА к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  проведено спектрофлуориметрическое титрование кальцием белка, очищенного от катионов, при 45°. Несмотря на заметное снижение термостабильности всех комплексов апо- $\alpha$ -ЛА с ОК (Рис. 4А), их эффективное сродство к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  снижалось примерно в 2 раза, что находится в пределах погрешности эксперимента

(Табл. 3). Исключение составляет белок, титрованный ОК до ККМ при 17°C и 45°C, для которого наблюдалось снижение величины  $K$  на 0,5-1 порядок величины. Наиболее заметные изменения сродства к  $\text{Ca}^{2+}$ , обнаруженные для  $\alpha$ -ЛА, насыщенного ОК, возможно, являются следствием конкуренции между белком и ОК за ионы  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Табл. 3.** Равновесные константы связывания  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K$ ) и коэффициенты Хилла ( $n$ ) при 45°C для различных состояний  $\alpha$ -ЛА по данным спектрофлуориметрических титрований (рН 8,2).

Состояние белка	$K, M^{-1}$	$n$
Интактный $\alpha$ -ЛА	$1,3 \times 10^6$	0,95
HAMLET	$8 \times 10^5$	0,98
LA-OA-17	$7 \times 10^5$	0,87
LA-OA-45	$7 \times 10^5$	0,86
Насыщенный ОК при 17°C	$2,7 \times 10^5^*$	1,8
Насыщенный ОК при 45°C	$1,5 \times 10^5$	2,3

\*Обнаружен дополнительный  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий центр с  $K$  около  $10^6$ - $10^7 M^{-1}$ .

Измерения спектров КД в дальней УФ-области для разных состояний белка при 5°C и 45°C показали, что все формы апо- $\alpha$ -ЛА, содержащие ОК, проявляют повышенную отрицательную молярную эллиптичность в области 210-225 нм. Оценка содержания элементов вторичной структуры для различных форм  $\alpha$ -ЛА, свободного от  $\text{Ca}^{2+}$ , с использованием ПО CDPPro, показала, что изменения, вызванные связыванием ОК при 5°C, выражаются, главным образом, в повышении содержания  $\alpha$ -спиралей (Табл. 4). Схожие изменения спиральности обнаружены при 45°C.

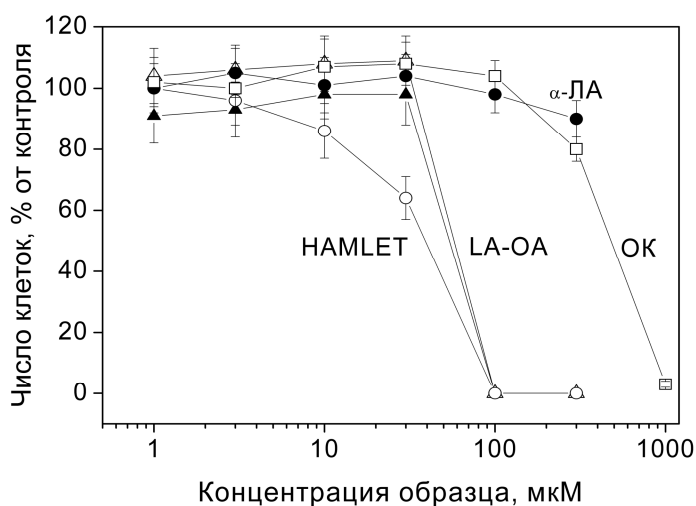
**Табл. 4.** Оценка содержания элементов вторичной структуры (%) для различных форм  $\alpha$ -ЛА, свободного от  $\text{Ca}^{2+}$ , по данным КД, при 5°C, рН 8,3.

Состояние белка	$\alpha$ -спирали	$\beta$ -структуры	Повороты	Неупорядоченные структуры
Интактный $\alpha$ -ЛА	34,1	13,5	19,2	32,5
HAMLET	39,6	11,8	19,2	29,9
LA-OA-17	35,9	12,6	20,2	31,2
LA-OA-45	41,2	12,9	18,6	30,3

Таким образом, модификация апо- $\alpha$ -ЛА олеиновой кислотой приводит к снижению его термостабильности, сохраняет довольно высокое сродство к ионам  $\text{Ca}^{2+}$ , но вызывает повышение содержания  $\alpha$ -спиралей.

## Сравнение цитотоксических свойств HAMLET и комплексов LA-OA

Концентрационная зависимость цитотоксического действия HAMLET и комплексов LA-OA на клетки эпидермоидной карциномы гортани человека *HEp-2 in vitro* представлена на Рис. 5. Олеиновая кислота обладает токсическим действием на клетки *HEp-2* только в концентрациях, превышающих 300 мкМ. Значение  $IC_{50}$  для комплексов LA-OA (~50 мкМ) близко к  $IC_{50}$  для HAMLET (~40 мкМ), однако цитотоксическое действие состояния HAMLET становится заметным при более низких концентрациях (около 20-30 мкМ).



**Рис. 5.** Концентрационная зависимость цитотоксичности по отношению к клеткам *HEp-2* комплексов  $\alpha$ -ЛА-ОК и контролей.

HAMLET (данные не представлены). При этом как интактный, так и контрольный коровий  $\alpha$ -ЛА, не проявляли токсичности по отношению к данным клеткам.

Таким образом, показано, что комплексы LA-OA-17 и LA-OA-45 по своим физико-химическим свойствам и цитотоксическому действию на клетки *HEp-2* схожи с состоянием HAMLET. Тот факт, что образование HAMLET-подобных комплексов  $\alpha$ -ЛА с олеиновой кислотой возможно в условиях раствора без использования ионообменной хроматографии, облегчает и удешевляет процесс их приготовления, делает его более контролируемым и гибким.

## Взаимодействие комплексов $\alpha$ -ЛА - ОК с мембранами

Ранее было показано, что HAMLET способен проникать в раковые клетки (Düringer et al., 2003), однако механизм переноса экзогенного цитотоксичного комплекса  $\alpha$ -ЛА с ОК через плазматическую мембрану остаётся невыясненным до сих пор. Нами был исследован процесс взаимодействия комплексов с двумя модельными системами: малыми униламеллярными везикулами ДПФХ и

Интактный  $\alpha$ -ЛА в концентрации до 1 мМ не проявляет токсичности, несмотря на имеющиеся в литературе данные о том, что белок способен оказывать цитотоксическое действие на определённые клеточные линии (см., напр., Lin et al. 2008).

Нужно отметить, что комплекс bLA-OA-45 также проявлял цитотоксическую активность по отношению к клеткам *HEp-2* ( $IC_{50}$  около 20 мкМ), схожую с токсичностью состояния



плазмалеммой клеток водоросли *Chara corallina*, которая обладает электровозбудимыми ионными каналами, структурно и функционально схожими с ион-транспортными системами многих животных клеток (Берестовский et al. 1987; Hedrich & Jeromin 1992; Lunevsky et al. 1983).

### ***Взаимодействие комплексов α-ЛА-ОК с малыми униламеллярными везикулами динальмитоилфосфатидилхолина***

Для исследования влияния модификации α-ЛА олеиновой кислотой на его сродство к фосфолипидной мембране мы сравнивали сродство интактного белка и его комплексов с ОК к униламеллярным везикулам модельного фосфолипида, ДПФХ. Для этого предварительно инкубированная в течение 15 часов при 4°C смесь белка с везикулами ДПФХ подвергалась гель-фильтрации на колонке Сефадекс G-200. Общее количество свободного и связанного с везикулами белка определяли спектрофотометрически.

**Табл. 5.** Зависимость доли α-ЛА, связанного с униламеллярными везикулами ДПФХ, от концентрации кальция (50 мМ НЕРЕС-КОН, 150 мМ NaCl, pH 7,4).

Состояние α-ЛА	Доля α-ЛА, связанного с везикулами, %	
	1 мМ ЭДТА	1 мМ CaCl <sub>2</sub>
Интактный α-ЛА	34	2
HAMLET	50	8
LA-OA-17	53	32
LA-OA-45	40	33

Доля апо-ЛА-ОА-17, связанного с везикулами ДПФХ, составила 53%, что на 19% выше соответствующего значения для апо-формы интактного α-ЛА. Менее выраженный эффект наблюдали для апо-ЛА-ОА-45 и апо-HAMLET (Табл. 5).

Насыщение белка ионами Ca<sup>2+</sup> приводило к снижению

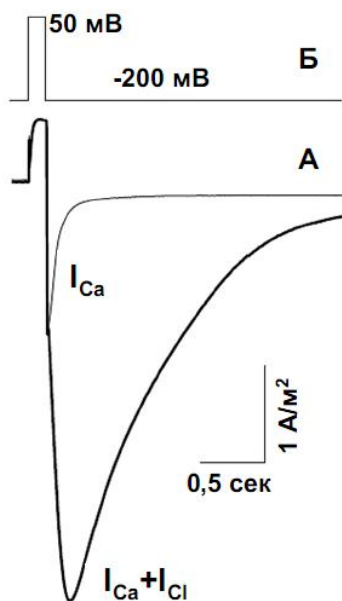
доли α-ЛА, связанного с везикулами, для всех исследуемых форм белка. Наименее выраженный эффект наблюдали для состояний LA-OA-45 и LA-OA-17. Для HAMLET, насыщенного Ca<sup>2+</sup>, сродство к везикулам было близко к таковому для интактного апо-α-ЛА, что, возможно, связано с меньшим количеством молекул ОК, приходящихся на молекулу белка, в данном комплексе.

Эксперименты с везикулами ДПФХ показали, что связывание олеиновой кислоты повышает сродство белка к липосомам независимо от концентрации Ca<sup>2+</sup>. Таким образом, связывание ОК стабилизирует конформацию белка, способную к Ca<sup>2+</sup> независимому взаимодействию с мембранами.

### ***Действие комплексов α-ЛА с ОК на ионные токи через плазмалемму Chara corallina***

Электрофизиологические исследования были выполнены нами совместно с сотрудниками Лаборатории ультраструктуры нейрона ИТЭБ РАН и Лаборатории

молекулярной физиологии клетки ИБК РАН на междоузловых нативных и перфузированных клетках *Chara corallina* в условиях фиксации потенциала. Потенциал действия этих клеток, как показано на Рис. 6, представляет собой суперпозицию

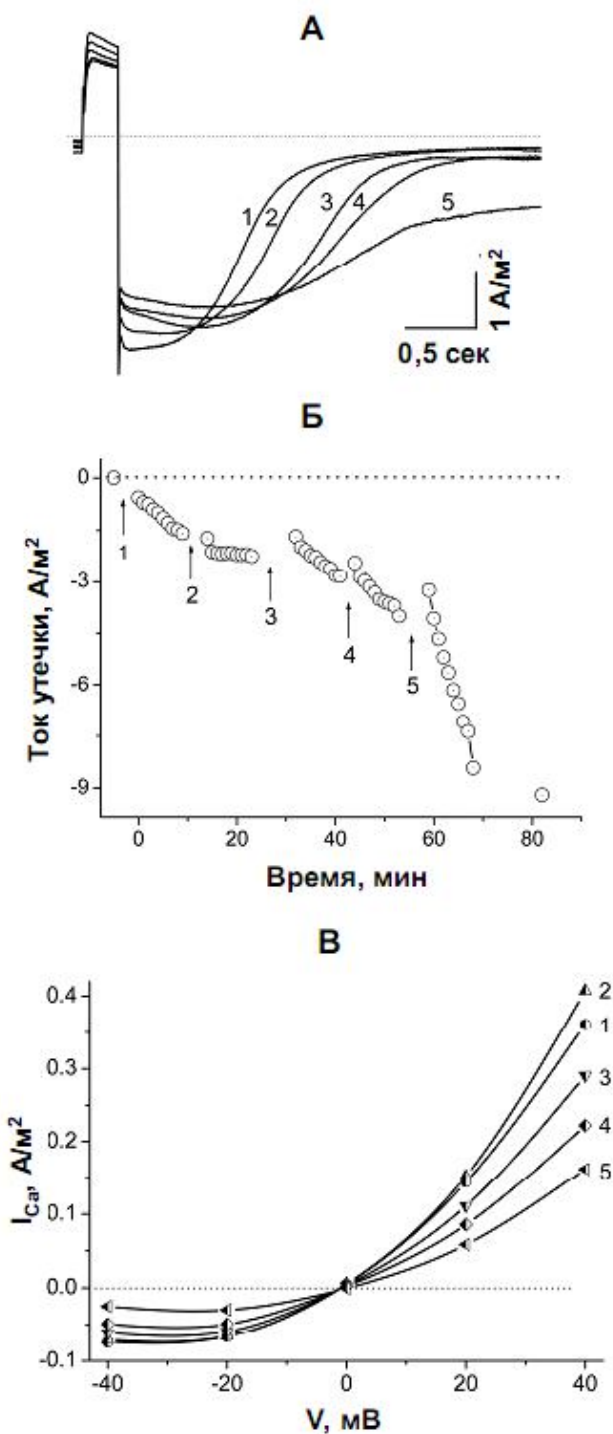


**Рис. 6.** А: Типичные ионные токи, развивающиеся на плазмалемме *Chara corallina* при скачкообразном изменении напряжения. Б: Протокол изменения напряжения на мембране.

входящего  $\text{Ca}^{2+}$  тока,  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемого хлорного тока и  $\text{K}^+$  тока утечки (Kataev et al. 1984). Добавление к омывающему раствору 10 мкМ LA-OA-17 вызывает изменения амплитуды и активационно-инактивационной кинетики развивающегося суммарного тока, в частности, происходит снижение амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$  тока и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого  $\text{Cl}^-$  тока (Рис. 7А). Интересно, что этот эффект сопровождается увеличением неспецифического  $\text{K}^+$  тока утечки и резким падением сопротивления мембраны (Рис. 7Б). Электропроводность мембраны повышается с увеличением концентрации LA-OA-17. Добавление 80 мкМ LA-OA-17 (концентрация, превышающая значение  $\text{IC}_{50}$  для цитотоксического действия комплекса на клетки *HEp-2 in vitro*) вызывает резкое увеличение  $\text{K}^+$  тока утечки и полную инактивацию ионных каналов на 20-30 минут (данные не показаны).

Исследования, выполненные на перфузированных клетках, позволили проследить прямое действие LA-OA-17 на  $\text{Ca}^{2+}$  каналы плазмалеммы. Зависимость плотности  $\text{Ca}^{2+}$  тока от напряжения на плазматической мембране измеряли через определенные промежутки времени, используя пилообразное напряжение длительностью 30 мс (Рис. 7В). Добавление в омывающий раствор 4 мкМ LA-OA-17 вызывало заметные временные изменения вольтамперных характеристик  $\text{Ca}^{2+}$  каналов. Наблюдали краткосрочное усиление  $\text{Ca}^{2+}$  тока в ответ на LA-OA-17 (Рис. 7В, кривая 2), что может быть связано с повышением внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в течение первых двух минут после введения LA-OA-17. За начальным ростом  $\text{Ca}^{2+}$  тока следовало его постепенное снижение (Рис. 7В, кривые 3-5), вызванное ингибированием кальциевых каналов. Необходимо подчеркнуть, что наличие изобестической точки в вольтамперных характеристиках (Рис. 7В) свидетельствует о прямом и селективном взаимодействии LA-OA-17 с  $\text{Ca}^{2+}$  каналами плазмалеммы (Zherelova 1989).

Отмывка плазмалеммы, обработанной LA-OA-17, начальным буферным раствором не восстанавливает ионные токи, что свидетельствует о необратимости процесса взаимодействия комплекса с плазмалеммой *Chara corallina*.



**Рис. 7.** Изменения ионных токов, вызванные LA-OA-17. **А**, временные изменения суммарного тока: (1) контроль, (2) 2 мин. после добавления 10 мкМ LA-OA-17, (3) 9 мин., (4) 16 мин., (5) 29 мин. **Б**, изменения тока утечки, развивающиеся после добавления LA-OA-17: (1) 1,4 мкМ, (2) 2,8 мкМ, (3–5) 10 мкМ. **В**, изменения вольт-амперных характеристик  $\text{Ca}^{2+}$  тока для перфузированных клеток: (1) без LA-OA-17, (2) 2 мин. после введения 4 мкМ LA-OA-17, (3) 9 мин., (4) 16 мин., (5) 29 мин.

Аналогичные исследования, выполненные для состояния HAMLET, показали качественно схожий результат, однако действие HAMLET на ионные каналы было менее выражено количественно, что, вероятно, является следствием меньшего числа молекул ОК, связанных на молекулу HAMLET.

Поскольку ОК может частично диссоциировать из комплексов LA-OA-17 и HAMLET в условиях, используемых для электрофизиологических измерений, необходимо было исследовать действия на ионные токи, индуцируемые свободной ОК и интактным  $\alpha$ -ЛА. Экзогенное введение  $\alpha$ -ЛА вызывает намного менее выраженные изменения в кинетике инактивации тока, нежели LA-OA-17.

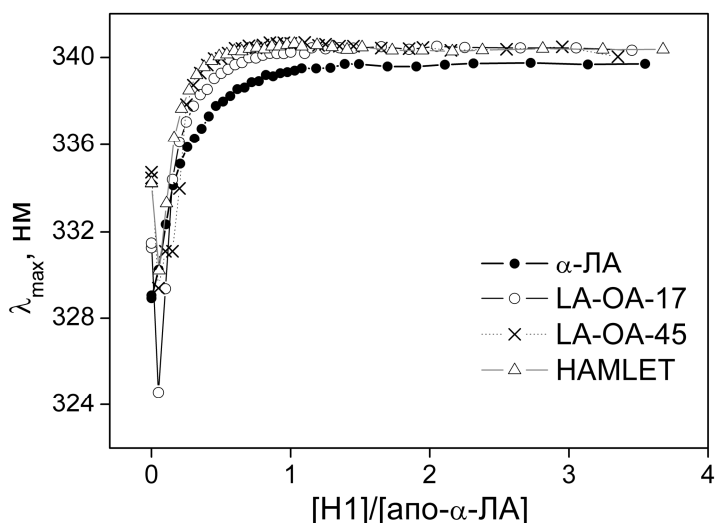
Введение 10 мкМ ОК и повышение её концентрации до 20 мкМ вызывает постепенное ускорение блокировки ионных токов, в зависимости от дозы. Калиевые токи утечки при этом не изменяются. Отмывка плазмалеммы, обработанной ОК, начальным наружным раствором приводит к эффективному восстановлению амплитуды  $\text{Ca}^{2+}$  тока.

Таким образом, полученные данные ясно демонстрируют, что  $\alpha$ -лактальбумин взаимодействует как с искусственными, так и с природными мембранами, причём модификация белка олеиновой кислотой приводит к усилению наблюдаемых эффектов. Комплексы с ОК блокируют  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые  $\text{Cl}^-$  токи, вызывают

неселективную проницаемость мембраны (повышение неспецифических  $K^+$  токов утечки), изменяя, таким образом, структурное и функциональное состояние плазмалеммы.

### Взаимодействие комплексов $\alpha$ -ЛА-ОК с гистоном H1 *in vitro*

Установлено, что одной из главных мишеней комплекса HAMLET в раковой клетке являются гистоны (Düringer et al., 2003). С помощью спектрофлуориметрических методов нами исследовано влияние модификации  $\alpha$ -ЛА олеиновой кислотой на взаимодействие с гистонами *in vitro* на примере гистона H1.



**Рис. 8.** Спектрофлуориметрическое титрование различных состояний апо- $\alpha$ -ЛА гистоном H1 при 5°C (10 мМ HEPES-KOH, 1 мМ ЭДТА; pH 7,6).

добавление в раствор гистона выше эквимольной концентрации не приводит к дальнейшим изменениям в спектрах флуоресценции. При очень низком молярном соотношении гистона к комплексам  $\alpha$ -ЛА с ОК (1:20-1:10) наблюдается заметный сдвиг спектра флуоресценции в коротковолновую сторону, не наблюдаемый в случае

Благодаря тому, что гистоны не содержат остатков триптофана (Isenberg, 1979), мы селективно возбуждали триптофановую флуоресценцию  $\alpha$ -ЛА в ходе титрования его гистоном.

титрования интактного белка. По-видимому, данный эффект вызван агрегацией  $\alpha$ -ЛА вследствие перенасыщения гистона молекулами белка.

Следующий за данным изгибом участок кривой титрования можно описать кооперативной схемой

**Табл. 6.** Равновесные константы связывания гистона H1 ( $K$ ) и коэффициенты Хилла ( $n$ ) для различных состояний апо- $\alpha$ -ЛА при 5°C.

Состояние белка	$K, M^{-1}$	$n$
Интактный $\alpha$ -ЛА	$1,4 \times 10^5$	2,8
LA-OA-17	$1,4 \times 10^6$	1,3
LA-OA-45	$0,8 \times 10^6$	2,0
HAMLET	$1,2 \times 10^6$	2,4

связывания  $n$  молекул  $\alpha$ -ЛА на молекулу гистона. Полученные в рамках такой модели величины кажущихся констант связывания гистона приведены в Табл. 6. Видно, что модификация  $\alpha$ -ЛА олеиновой кислотой повышает примерно в 10 раз эффективное сродство белка к Н1 *in vitro*, однако связывание олеиновой кислоты не является необходимым условием взаимодействия  $\alpha$ -лактальбумина с гистоном.

Данные по тепловой денатурации различных состояний апо- $\alpha$ -ЛА, связанных с гистоном Н1 при 5°C (конечное молярное отношение гистона к белку составляло ~5:1), свидетельствуют о том, что взаимодействие с гистоном приводит к заметному снижению термостабильности  $\alpha$ -лактальбумина независимо от присутствия олеиновой кислоты (данные не приведены).

Полученные данные свидетельствуют о том, что связывание ОК способствует ассоциации  $\alpha$ -ЛА с гистоном Н1, однако модификация белка олеиновой кислотой не является необходимым условием для взаимодействия  $\alpha$ -лактальбумина с гистоном *in vitro*.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что апо-форма  $\alpha$ -лактальбумина обладает множественными центрами связывания олеиновой кислоты (ОК). Связывание ОК вызывает снижение термостабильности апо- $\alpha$ -ЛА. Тепловое разворачивание апо- $\alpha$ -ЛА вызывает увеличение его ёмкости по отношению к олеиновой кислоте, а также повышение эффективного сродства белка к ней. Повышение рН раствора до 12 не вызывает снижения эффективности связывания ОК белком. В целом показано, что образование комплексов  $\alpha$ -ЛА с олеиновой кислотой определяется гидрофобными взаимодействиями между белком и ОК.
2. Определены оптимальные условия раствора, обеспечивающие максимальную ёмкость белка по отношению к олеиновой кислоте, в условиях отсутствия протяженных фаз ОК. Приготовленные в оптимизированных условиях раствора комплексы LA-OA-17 и LA-OA-45 мономерны, сохраняют нативноподобное сродство к ионам  $\text{Ca}^{2+}$ , однако демонстрируют повышенное содержание  $\alpha$ -спиралей.
3. Показано, что комплексы LA-OA-17 и LA-OA-45 по своим физико-химическим свойствам и цитотоксическому действию на клетки *Hep-2* схожи с состоянием HAMLET. Таким образом, образование HAMLET-подобных комплексов  $\alpha$ -ЛА с олеиновой кислотой возможно в условиях раствора без использования ионообменной хроматографии.

4. Модификация  $\alpha$ -лактальбумина олеиновой кислотой повышает его сродство к малым униламеллярным визикулам ДПФХ независимо от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , а также вызывает изменения ионных токов через плазмалемму клеток *Chara corallina*, приводя к развитию неспецифической проницаемости мембраны за счёт нарушения её целостности.
5. Показано, что модификация  $\alpha$ -лактальбумина олеиновой кислотой повышает примерно в десять раз его сродство к гистону H1 *in vitro*, однако не является необходимым условием взаимодействия  $\alpha$ -ЛА с гистонами.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

### Статьи:

1. Knyazeva EL, Grishchenko VM, Fadeev RS, Akatov VS, Permyakov SE, Permyakov EA. Who is Mr. HAMLET? Interaction of human  $\alpha$ -lactalbumin with monomeric oleic acid. *Biochemistry*, 2008, V. 47, N. 49, p. 13127-37.
2. Permyakov SE, Bakunts AG, Denesyuk AI, Knyazeva EL, Uversky VN, Permyakov EA Apo-parvalbumin as an intrinsically disordered protein. *Proteins*, 2008, Vol. 72, N. 3, P. 822-836.
3. Zherelova OM, Kataev AA, Grishchenko VM, Knyazeva EL, Permyakov SE, Permyakov EA. Interaction of antitumor alpha-lactalbumin-oleic acid complexes with artificial and natural membranes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2009, V. 41, N. 3, p. 229-37.

### Тезисы сообщений:

1. Князева Е.Л., Грищенко В.М., Першикова И.В., Пермяков С.Е. Взаимодействие  $\alpha$ -лактальбумина с олеиновой кислотой. 11-ая международная школа-конференция «Биология – наука XXI века», Пущино, 29 октября – 2 ноября 2007 г., стр. 10.
2. Князева Е.Л., Грищенко В.М., Першикова И.В., Пермяков С.Е. Исследование природы состояния HAMLET. Школа – конференция молодых ученых, аспирантов и студентов «Биомедицинская инженерия - 2007», Пущино, 10-12 декабря 2007 г., стр. 5-9.
3. Князева Е.Л., Грищенко В.М., Пермяков С.Е., Фадеев Р.С., Акатов В.С. Исследование природы комплексов  $\alpha$ -лактальбумин-олеиновая кислота, обладающих цитотоксической активностью. 12-ая международная школа-конференция «Биология – наука XXI века», Пущино, 10 – 14 ноября 2008 г., стр. 176.
4. Permyakov, S.E., Knyazeva, E.L., Grishchenko, V.M., Zhadan, A.P., Fadeev, R.S., Acatov, V.S., Permyakov, E.A. Interaction of human  $\alpha$ -lactalbumin with monomeric oleic acid. 2<sup>nd</sup> Symposium on HAMLET and tumor-killing proteins. May 12-14, Lund, 2009, p.10.
5. Леонтьева М.В., Князева Е.Л., Фадеев Р.С., Акатов В.С., Пермяков С.Е. Разработка метода приготовления комплексов  $\alpha$ -лактальбумина с олеиновой кислотой, обладающих цитотоксической активностью. 14-ая международная школа-конференция «Биология – наука XXI века», Пущино, 19 – 23 апреля 2010 г., стр. 84.
6. Князева Е.Л., Грищенко В.М., Жерелова О.М., Катаев А.А., Жадан А.П.,

Пермяков С.Е. Молекулярные аспекты цитотоксического действия комплексов  $\alpha$ -лактальбумина с олеиновой кислотой. 14-ая международная школа-конференция «Биология – наука XXI века», Пущино, 19 – 23 апреля 2010 г., стр. 207.