

К ЮБИЛЕЮ ЕВГЕНИЯ АНАТОЛЬЕВИЧА ПЕРМЯКОВА



Евгений Анатольевич Пермяков

– главный научный сотрудник Института биологического приборостроения РАН, доктор биологических наук, профессор. Один из ведущих мировых специалистов по изучению металлсвязывающих белков, автор более 200 научных статей и 10 монографий. Основатель и бывший директор ИБП РАН, он прошел путь от молодого исследователя до заместителя председателя крупного научного центра.

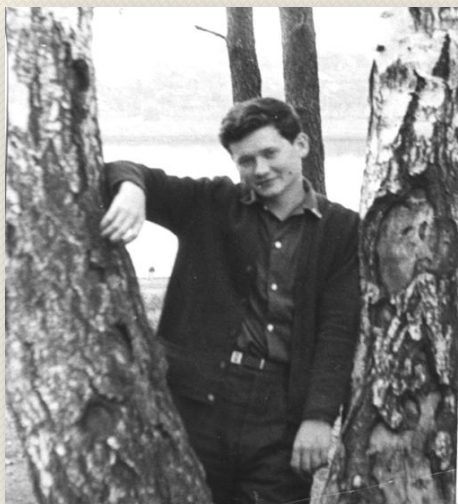




Евгений Анатольевич родился 8 мая 1946 года в г. Иваново. Отец Пермяков Анатолий Алексеевич - участник Великой Отечественной Войны, стрелок-радист на бомбардировщике СБ и Пе-2, преподавал в Ивановском педагогическом институте, кандидат педагогических наук. Мать врач-педиатр работала в больницах г. Иваново.

Учился в Начальной школе № 7 и в Средней школе № 36 г. Иванова. Со школьных лет интересовался естественными науками: физикой, химией, биологией.

В 1964 году поступил в Московский физико-технический институт (Физтех) на факультет молекулярной и химической физики. Специализацию с третьего курса проходил на Кафедре молекулярной биофизики. В 1967 году впервые попал в Пущино. После 3-го курса проходил практику в Институте биологической физики АН СССР в группе Эдуарда Ароновича Бурштейна (Лаборатория физики ферментных систем). После окончания Института в 1970 году продолжил работать в той же группе. Там начал заниматься разработкой метода люминесценции белков – тема, которой посвятил более тридцати лет и написал 2 монографии (Метод собственной люминесценции белка, Luminescence Spectroscopy and Circular Dichroism).



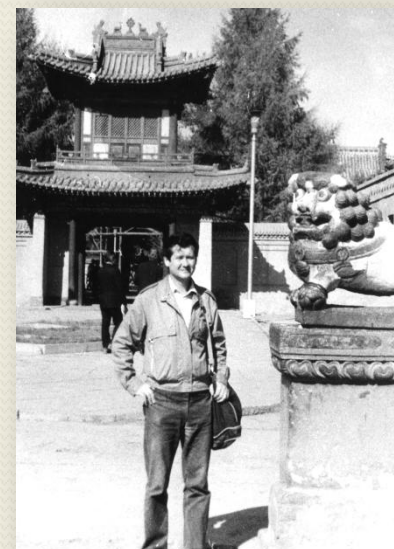
Позднее заинтересовался исследованиями кальций-связывающих белков и стал одним из ведущих ученых, занимающихся этой темой. Можно сказать одним из основоположников данного направления. Ионы металлов – это важнейший компонент живых систем. Их называют металлами жизни: кальций, магний, натрий, калий, цинк и др. Без них невозможно функционирование ни одной живой системы. Взаимодействуя со специфическими белками, ионы металлов выполняют регуляторные, структурные и ферментативные функции. И чтобы понять, как устроены и функционируют живые системы, необходимо знать, как устроены эти металлсвязывающие белки. Эти исследования важны не только для фундаментальной биологии, но и для медицины – для разработки новых лекарственных препаратов. В 1976 году защитил кандидатскую диссертацию на тему «Люминесцентные исследования динамики структуры белка при низких температурах». В 1986 году защитил докторскую диссертацию на тему «Взаимодействие кальцийсвязывающих белков с катионами металлов».



В советские времена ученые г. Пушкино активно сотрудничали с лабораториями социалистических стран. Был налажен регулярный обмен сотрудниками.

В 90-годы появилась возможность ездить и в другие страны. В те времена возможность эта особенно ценилась, поскольку финансирование науки в России было скудным. Тогда Евгений Анатольевич часто работал в США, сотрудничая с профессором Берлинером (Ohio State University, Columbus, Ohio; позднее Denver University, Denver, Colorado) в области исследования кальцийсвязывающих белков. В целом, он проработал в США около трех лет. Бывал в лабораториях в Канаде и Швеции, работал в Японии (Университет Хоккайдо, Саппоро).

В начале 90-х, после распада СССР, финансирование науки резко сократилось, что привело к уходу из организации многих ценных специалистов в поисках более высокооплачиваемой работы. Некоторые ведущие сотрудники уехали за рубеж. Стало ясно, что СКБ БП, будучи хозрасчетной организацией, не выживет. В 1994 году руководство РАН приняло решение преобразовать его в Институт биологического приборостроения с опытным производством (ИБП РАН), который стал финансироваться из госбюджета.



В том же 1994 году Евгений Анатольевич, после возвращения из США, получил предложение возглавить Институт биологического приборостроения РАН (бывшее СКБ БП АН СССР). Как выпускник МФТИ он имел инженерное образование, но всегда главным интересом была фундаментальная наука. Было предложено совместить эти два вида деятельности, и он согласился попробовать. Основные направления деятельности Организации остались как и в СКБ: «разработка научных основ и создание новых методик, приборов и оборудования для биологических и смежных (медицина, сельское хозяйство) областей исследования». Институт только что организовывался, и Евгений Анатольевич стал директором-организатором. Финансовое положение института было плачевным: большие долги, частые задержки с зарплатами, масса других неприятностей, но команда ИБП РАН справилась.



К концу 90-х годов в ИБП РАН сложились следующие основные направления научно-технических разработок:

- Аналитические спектральные приборы.
- Теплофизические приборы.
- Оборудование для клеточных исследований.
- Биотехнологическое оборудование.
- Телемедицинские системы.
- Общелабораторное оборудование.

В 1995 году Евгений Анатольевич организовал в Институте Лабораторию новых методов в биологии, которая и сейчас занимается исследованием металлсвязывающих белков. Ее руководителем в настоящее время является к.ф.м.н. Сергей Евгеньевич Пермяков.

Основные направления деятельности Лаборатории:

- Разработка новых методов диагностики и терапии социально значимых заболеваний на основе биосовместимых нанобиосистем или модуляции активности белков.
- Исследование физико-химических и функциональных свойств металлсвязывающих белков: белки S100, нейрональные кальциевые сенсоры, кальмодулин, парвальбумин, и т.д.
- Физико-химические исследования лекарственных кандидатов на основе белков.





- Разработка методов получения и применения ферментов в пищевой промышленности, косметологии и медицине.
- Разработка картографического метода «Пластика рельефа» в применении к различным областям народного хозяйства.



За годы существования ИБП РАН Лабораторией опубликовано в международных изданиях около 1000 статей, изданы по меньшей мере 8 монографий, получены 2 патента, защищены 15 диссертаций, получены множество грантов РФФИ, РНФ, программ Президиума РАН, Минобрнауки.



В Пущино Евгений Анатольевич встретил свою любимую женщину, с которой поженились в 1968 г. Его супруга Пермякова Татьяна Васильевна - врач-педиатр. Воспитали двоих детей: Екатерину и Сергея.



Сын Сергей всегда интересовался работой своего отца, увлекался физикой и математикой и после окончания школы поступил также в Московский физико-технический институт, а после его окончания стал работать в лаборатории отца. После ухода Евгения Анатольевича с поста директора Института в 2017 году Сергей Евгеньевич в течение ряда лет был директором Института. Сейчас он возглавляет созданную его отцом лабораторию.



● Евгений Анатольевич с сыном и дочерью на своем 60-летии

Его дочь Клам Екатерина Евгеньевна тоже связала свою жизнь с Институтом биологического приборостроения. С 1998 работала конструктором 1 категории в Группе специальных электронных средств и методов биотехнологических исследований. Сейчас работает ведущим конструктором в Лаборатории биотехнологии.

Евгений Анатольевич Пермяков – главный научный сотрудник Института биологического приборостроения РАН, доктор биологических наук, профессор. Один из ведущих мировых специалистов по изучению металлсвязывающих белков, автор более 200 научных статей и 10 монографий. Основатель и бывший директор ИБП РАН, он прошел путь от молодого исследователя до заместителя председателя крупного научного центра. В интервью он рассказал о своем пути в науку, важности металлсвязывающих белков и будущем биологических исследований.

– Евгений Анатольевич, ваша карьера впечатляет: от молодого ученого до руководителя целого института. Когда и как вы начали свой научный путь и что помогло вам выжить вперед?

– Я начал заниматься наукой в 1967 году, на третьем курсе Московского физико-технического института. У нас на факультете молекулярной и химической физики была практика: студентов распределяли по так называемым базовым институтам, где они постепенно вовлекались в научную работу. Мой друг и одноклассник Владимир Новоторцев уговорил меня поехать в Пушкино, где тогда только что образовался научный центр. Мы выбрали Институт биологической физики и я попал в лабораторию, которой руководил Зауряд Аронович Бурштейн. Там я начал заниматься развитием метода собственной люминесценции белковой, которой я посетил более 30 лет и написал две монографии. Кстати, мой друг, который меня «заманил» в Пушкино, впоследствии стал академиком и директором Института общей и неорганической химии РАН в Москве.

Давитесь в профессии или полагали дружелюбную атмосферу в коллективе и, конечно, огромный интерес к тому, как устроена природа.

– Вы – один из основоположников изучения металлсвязывающих белков в мире. Расскажите, пожалуйста, для чего нам нужно знать о таких белках? Где они встречаются и как влияют на нашу жизнь?

– Наверное, назвать меня одним из основоположников – это преувеличение. Эти белки изучали и до меня. Мы просто к своим работам добавили, что связывающие белками ионы металлов имеют очень сильную связь на другие свойства белков, показали, как эти свойства меняются и влияют на их функцию. Ионы металлов – это важнейший компонент живой организмы. Их называют металлами жизни: кальций, магний, натрий, калий, цинк, медь, железо, марганец, кобальт и некоторые другие металлы. Без них невозможно функционирование ни одной живой системы. Достаточно сказать, что нервная проводимость осуществляется за счет переноса электрического тока калия и натрия, а мышечное сокращение управляется ионами кальция. Взаимодействие со специфическими белками, ионы металлов выполняют регуляторные, структурные и ферментативные функции. Наличие связанных ионов меняет физико-химические свойства белков, и чтобы понять, как устроены и функционируют живые системы, необходимо знать, как устроены эти металлсвязывающие белки.

В нашей лаборатории мы много лет исследуем физико-химические и функциональные свойства таких белков, особенно тех, что связывают кальций, магний и цинк. Эти исследования важны не только для фундаментальной биологии, но и для медицины – для разработки новых лекарственных средств.

● Институт биологического приборостроения, в кабинете директора



● Военные лагеря во время учебы в МФТИ, весна 1969 г.



● Институт биологической физики АН СССР, Пушкино, 1970 г.

Института биологического приборостроения и руководил им с 1994 по 2017 год. Чем занимался институт и какие задачи он решает?

– Изначально, в 1965 году было создано Специальное конструкторское бюро биологического приборостроения КББП. Его задача заключалась в разработке и изготовлении уникальных приборов для современной биологической науки. В КББП было опытное производство, оснащенное всеми необходимыми приборами. Благодаря хорошей финансовой поддержке государства регулярно пополнялся парк производственного оборудования.

В начале 90-х, после распада СССР, финансирование науки резко сократилось, что привело к уходу из организации многих ценных специалистов в поисках более высокооплачиваемой работы. Некоторые ведущие сотрудники уехали за рубеж. Стало ясно, что КББП, будучи научной организацией, не выживет. В 1994 году руководством ИБП РАН, который стал финансироваться из бюджета, было принято решение преобразовать его в Институт биологического приборостроения с полным производством (ИБП РАН), который стал финансироваться из бюджета.

В том же 1994 году я вернулся из США и получил неожиданное предложение от тогдашнего директора Пушкинского научного центра академика Александра Сергеевича Спирина воз-

главить институт. Как выпускник МФТИ, я имел инженерное образование, но мои главные интересы всегда были фундаментальной наукой. Мне предложили совмещать эти два вида деятельности, и я согласился попробовать.

– Какие основные вехи и достижения вы бы выделили за годы своего директорства?

– 90-е годы были, пожалуй, самым сложным периодом. Заработки были низкими, их задерживали. Чтобы пополнить стабильный парк, нам пришлось участвовать в проектах, далеких от основной деятельности, например, выпускать автомобильные аптечки.

К концу 90-х в институте сформировались основные направления: аналитические спектральные приборы, телефизиологические приборы, оборудование для клеточных исследований и биотехнологий, телемедицинские системы. Среди наиболее значимых разработок – портативный спектрофлуориметр, термический калориметр, а также широкий спектр оборудования для микроинъекций клеток и биомеханики.

Например, наша Лаборатория биотехнологии разработала промышленную технологию для получения из растительных биологических активных соединений – диатриоксидов и диатриоксидов. Эта разработка в 2005 году получила гранты Кондра-русских инноваций. Мы также создали

облачную телемедицинскую систему для мониторинга беременности и уникальный метод анализа земной поверхности «эластика рельефа».

В середине 90-х в основе в ИБП РАН Лабораторию новых методов в биологии, которая занималась выявлением перспективных направлений исследований и формированием новых коллективов. Многие из них, например Лаборатория биотехнологии, выросли в самостоятельные подразделения.

В настоящее время Лаборатория новых методов в биологии руководит д-р-ом С.Е. Пермяков. За годы существования Лаборатории ее сотрудниками опубликованы в международных и российских изданиях около 1000 статей и, по меньшей мере, 6 монографий. За это время деятельность лаборатории получила поддержку в виде множества грантов по программам Президиума РАН, РФФИ, РНФ, Минобрнауки. В Лаборатории длительное время работали одни из наиболее высокооплачиваемых в мире ученых д-р-ов В.Л. Уверский, являющийся одним из основателей переноса направления в науку о белках, изучающего так называемые «клеточные неурегулированные» белки, характеризующиеся частичными или полными отсутствием жесткой третичной структуры.

– Какие направления в изучении белков вы считаете наиболее актуальными для будущего поколения ученых?

– Наука тем и увлекательна, что предсказать открытия практически невозможно. Сейчас активно развиваются методы на основе искусственного интеллекта. Разрабатываются все более точные методы предсказания структуры белков и механизма белок-белкового взаимодействия. Чем больше мы будем знать об устройстве и функционировании клеток, тем лучше сможем лечить болезни. Надеюсь, новые знания будут использоваться исключительно во благо человечества.

Помимо научной деятельности, у вас есть хобби?

– Долгое время я восстанавливался, бегая на длинные дистанции или катаясь на лыжах, наблюдая за природой. Сейчас занимаюсь физкультурой в помещении. Очень люблю путешествовать. А еще вместе с сыном мы рассказываем науку радиолюбителям и уже дошли до начала XIX века. Я рассказываю научным и практическим проектам, которые мы будем делать об устройстве и функционировании клеток, тем лучше сможем лечить болезни. Надеюсь, новые знания будут использоваться исключительно во благо человечества.

В 1999 году Евгения Анатольевича наградили медалью Ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени.



● Евгений Анатольевич с сыном и дочерью на своем 60-летии

фото предоставлено
пресс-службой



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

RU 1580256 A1

(51) G 01 N 33/51

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ПАТ. СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

- (21) 44/06113/31-14
(22) 07.06.88
(46) 23.07.90, Бюл. № 27
(71) Институт биологической физики
АН СССР
(72) Е.А.Пермяков, В.Л.Шварц,
И.В.Литчин и Э.А.Бурштейн
(53) 42.015.1(088.8)
(56) Anal. Bioschem., 1966, 157, 2,
p. 345-352.
(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ
ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В РАСТВОРЕ
(57) Изобретение относится к физико-

химической биологии, биохимии и био-
технологии и может быть использовано
для определения концентрации ионов
кальция в растворе. Цель изобретения -
повышение чувствительности и селек-
тивности способа в присутствии ионов
магния. Для этого в исследуемый рас-
твор помещают чувствительный элемент
в виде образца параболурина, инеоби-
лизованного на коллагене, и регистри-
руют изменения спектра триптофановой
флуоресценции параболурина, зависи-
мые от концентрации свободных ионов
кальция в растворе. 3 ил.

Изобретение относится к физико-хи-
мической биологии, а именно к спосо-
бам определения концентрации ионов
кальция в растворе, и может быть ши-
роко использовано, например, для оп-
ределения параметров связывания кальция
биополимерами, контроля за протека-
нием биохимических реакций, опреде-
ления кальция в тканевых жидкостях и
крови (медиа), контроля за содер-
жанием кальция в жидких пищевых про-
дуктах (пищевая промышленность).

Целью изобретения является повыше-
ние чувствительности способа, а также
селективности при исследовании ионов
кальция в растворе, включающему
помещение чувствительного элемента
в исследуемый раствор и регистрацию
возникающих в нем изменений, а ка-

чество чувствительного элемента ис-
пользуют параболурина, инеобилизова-
ный на коллагене и регистрируют изме-
нения спектра триптофановой флуорес-
ценции параболурина.
На фиг. 1 представлена зависимость
положения максимума спектра флуорес-
ценции параболурина в чувствитель-
ном элементе от концентрации ионов
кальция и длительности обработки его
гипотоническим аликватом на фиг. 2 -
зависимость положения максимума
спектра флуоресценции инеобилизова-
ного на коллагене параболурина от
логарифма концентрации свободного Са²⁺
в растворе при различных pH; на
фиг. 3 - нормированные по максима-
льному изменению зависимости положения
максимума спектра флуоресценции инео-
билизированного параболурина от логари-
фма концентрации свободного кальция



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

RU 1411666 A1

(51) G 01 N 33/12

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

- (21) 4076715/30-13
(22) 12.05.86
(46) 23.07.88, Бюл. № 27
(71) Всесоюзный научно-исследовательский
институт мясной промышленности
(72) Е. Ф. Орешкин, М. А. Борисова,
Г. С. Чубарова, Е. А. Пермяков и Э. А. Бур-
штейн
(53) 637.52(088.8)
(56) Орешкин Е. Ф., Кроха Ю. А., Устино-
ва А. В. Консервированные мясопродукты.
М.: Легкая и пищевая промышленность,
1983.
Орешкин Е. Ф. Исследование влияния ре-
жимов тепловой обработки на качество кон-
сервированной ветчины. М., 1971.

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАКСИ-
МАЛЬНО ДОПУСТИМОЙ ТЕМПЕРАТУ-
РЫ НАГРЕВА МЯСНОГО СЫРЬЯ ВЫСШЕ-
ГО СОРТА
(57) Изобретение относится к мясной про-
мышленности, в частности к способам оп-
ределения режимов тепловой обработки мясо-
продуктов. Согласно изобретению нагрева-
ние образцов проводят непрерывно, анализ
их осуществляют флуоресцентным методом
путем сканирования спектров в диапазоне длин
волн 300-400 нм, а максимально допус-
тимую температуру нагрева устанавливают
из расчета наибольшей величины отноше-
ния интенсивностей флуоресценции в об-
ластях 340-350 и 310-320 нм. 1 ил.



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

- (21) (22) Заявка: 98110240/13, 26.05.1998
(54) Дата начала действия патента: 26.05.1998
(46) Опубликовано: 10.12.1999
(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: 1. S. Hattani et al. "Thermal Short
Tandem Repeat Amplification of Hsp90
Degraded DNA". Amplification, The PCR
Newsletter from PE Applied. Biosystems
Issue - 1996, vol. 1, p. 5. 6. 2. RU
2042947 C1, 27.08.95. 3. RU 2081700 C1,
20.09.97.

Адрес для переписки:
142290, Пушкин Московской обл.,
ул. Институтская, 7, ИБП РАН, Директору ИБП
РАН Д.Н.Н. Пермякову Е.А.

- (71) Заявитель:
Институт биологического приборостроения с
опытным производством РАН
(72) Авторы:
Пермяков Е.А.,
Фрейдман А.А.
(73) Патентообладатель(и):
Институт биологического приборостроения с
опытным производством РАН

СПОСОБ ПРОВЕДЕНИЯ ГРУППОВЫХ АНАЛИЗОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ В ЖИДКОЙ ФОРМЕ

(57) Реферат:
Изобретение относится к медицине,
биохимии и т.п. и может быть
использовано при проведении, например,
полимерной цепной реакции (ПЦР), т. е. реакции
амплификации. Способ включает локализацию
жидких образцов, программируемый нагрев и
охлаждение образцов в реакционной камере,
последующее электрофоретическое разделение в
постычных гелях и сканирование. При этом
локализацию жидких образцов проводят на
гидрофобных участках полосок с чередующимися

гидрофобными и гидрофильными участками.
Полоски после обработки в реакционной камере
помещают на пластинки геля короткой стороной
вдоль направления электрофоретического поля, причем
гидрофобные участки располагают в плоскости
сечения пластинки геля. Способ обеспечивает
повышение эффективности условий проведения
реакции во всех образцах. 3 ил.



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

- (21) (22) Заявка: 200113509/13, 26.12.2001
(54) Дата начала действия патента: 26.12.2001
(46) Опубликовано: 27.11.2002
(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2031933 C1, 27.03.1996, ВЕСТНИК
У.З. и др. Культивирование
микроорганизмов. - М.: Пищевая
промышленность, 1980, с.54. БЕКЕР М.Е.
Введение в биотехнологию. - М.: Пищевая
промышленность, 1978, с.59-74.

Адрес для переписки:
142290, Московская обл., г. Пушкино, ул.
Институтская, ИБП РАН

СПОСОБ КАСКАДНО-ПРОТОЧНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

(57) Реферат:
Изобретение относится к культивированию
микроорганизмов в ферментационных аппаратах
на жидких питательных средах, может быть
использовано при производстве продуктов
микробиологического синтеза и исследовательской практике.
Способ предусматривает порционную подачу
питательной среды в первый ферментер после
отлива избыточного объема культуральной
жидкости. Проводят перемещение культуральной
жидкости в каскадном протоке от первого

ферментера к последующим с заданным
интервалом, причем во всех последующих
ферментерах производят полное замещение
культуральной жидкости объемом культуральной
жидкости из предыдущего ферментера.
Управление каскадным протоком осуществляют
установкой времени культивирования и паузы
между циклами каскадного протока. Способ
позволяет разделить ростовые фазы
микроорганизмов во времени и пространстве. 1 ил.

RU 2193594 C1

1 C 2 1 9 3 5 9 4 C 1

RU 2142638 C1

1 C 2 1 4 2 6 3 8 C 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) 2 763 178⁽¹³⁾ C2(51) МПК
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C07K 16/24 (2021.08); C07K 16/46 (2021.08); G01N 33/53 (2021.08)(21)(22) Заявка: 2020111785, 23.03.2020
с присоединением заявки №2016151730(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.03.2020Дата регистрации:
28.12.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 23.03.2020

(23) Дата поступления дополнительных материалов
к ранее поданной заявке: 14.11.2019,
2016151730 28.12.2016

(43) Дата публикации заявки: 23.09.2021 Бюл. № 27

(45) Опубликовано: 28.12.2021 Бюл. № 1

Адрес для переписки:

119421, Москва, Ленинский пр-т, 111Б, АО "Р-
Фарм", Васильковой О.В.

(54) Антитела для лабораторной диагностики концентрации интерлейкина-11

(57) Реферат:

Изобретение относится к области
биотехнологии, в частности к антителу,
специфичному к ИЛ-11 человека и модельных
животных, таких как японская макака, или его
антигенсвязывающему фрагменту, а также ксодержащему его конъюгату. Изобретение
эффективно для определения в пробе
концентрации ИЛ-11 человека и модельных
животных, таких как японская макака. 3 ил. ф-
лы, 2 экз., 3 пр.

Стр. 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) 2 753 973⁽¹³⁾ C2(51) МПК
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 15/62 (2021.05); C07K 16/24 (2021.05); A61P 35/00 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2019130673, 18.09.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.09.2019Дата регистрации:
25.08.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 18.09.2019

(43) Дата публикации заявки: 18.03.2021 Бюл. № 8

(45) Опубликовано: 25.08.2021 Бюл. № 24

Адрес для переписки:

119421, Москва, Ленинский пр-т, 111, корп. 1,
АО "Р-Фарм", Поповой А.О.(54) Терапевтическое антитело, специфичное к интерлейкину-11, ингибирующее сигнальное через его
рецептор, и способ его использования для лечения пациентов

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области
иммунологии и медицины и представляет собой
терапевтическое антитело, ингибирующее
связывание IL-11 с альфа-субъединицей рецептора
IL-11RA и сигнальное через его рецептор и/или
связывание комплекса IL-11/IL-11RA с бета-(56) (продолжение):
dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically, Cancer
Cell, 2013, Vol.24, N2, pp. 257-271. KOKUTYLEWSKI M. et al. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic stem
cells maintains hematopoietic stem cell self-renewal, Nat Med, 2005, Vol.11, N12, pp. 1314-1321. СНИГЕРЬ М. и др. Гены
и геномы. М.: "Мир", 1998, т. 1, с. 63-64.

Стр. 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) 2020 111 785⁽¹³⁾ A(51) МПК
C07K 16/24 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2020111785, 23.03.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 23.03.2020

(43) Дата публикации заявки: 23.09.2021 Бюл. № 27

Адрес для переписки:

119421, Москва, Ленинский пр-т, 111Б, АО "Р-
Фарм", Васильковой О.В.(71) Заявитель(ы):
Акционерное общество "Р-Фарм" (RU)(72) Автор(ы):
Мирабеков Тажиб Ахмедханович (RU),
Михайлов Роман Вячеславович (RU),
Яковенко Андрей Романович (RU),
Пермяков Сергей Евгеньевич (RU),
Ермолина Людмила Викторовна (RU),
Соколов Андрей Сергеевич (RU),
Павлова Екатерина Владимировна (RU),
Пермяков Евгений Анатольевич (RU)

(54) Антитела для лабораторной диагностики концентрации интерлейкина-11

(57) Формула изобретения

1. Антитела, специфичные к ИЛ-11 человека и модельных животных, таких как
японская макака, или их производные, или антигенсвязывающие фрагменты антител,
в которых вариабельные домены тяжелой и легкой цепей содержат одну из следующих
комбинаций аминокислотных последовательностей гипервариабельных участков:

1:

HCDR1: Phe Thr Phe Thr Gly Tyr Trp Met Asn Trp Val
Arg,HCDR2: Val Ser Ser Ile Ser Ser Tyr Gly Gly Thr
Tyr Tyr Ala Asp Ser,HCDR3: Cys Ala Arg Glu Ser Leu His Gln Leu Phe Asp
Tyr Trp Gly Gln,

LCDR1: Gln Ser Val Ser Ser Ser,

LCDR2: Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr,

LCDR3: Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Tyr Ala Pro Ile Thr
Phe Gly Gln, и/или

Стр. 1

ЕУ 72.5
П27

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ
И ПРИКЛАДНАЯ
БИОФИЗИКА

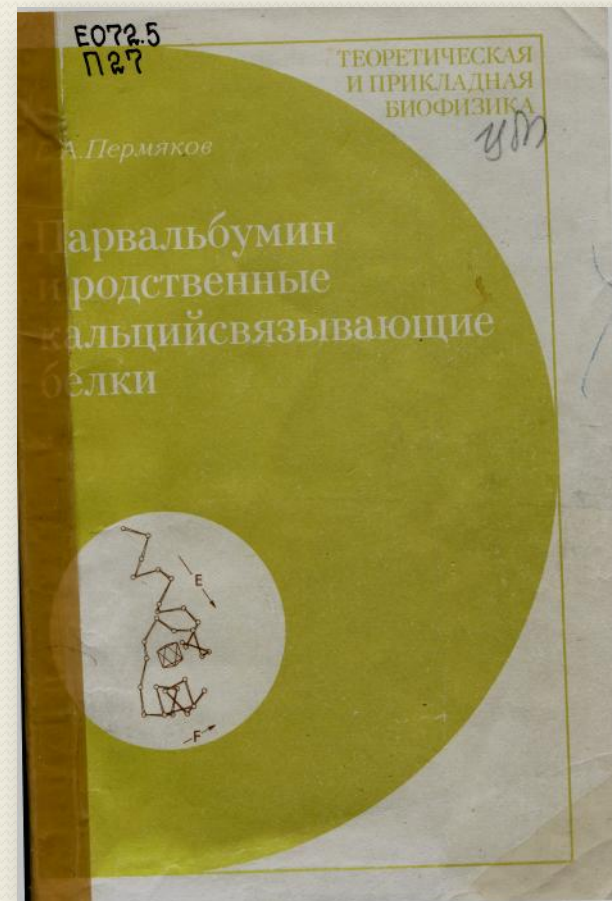
Е.А.Пермяков

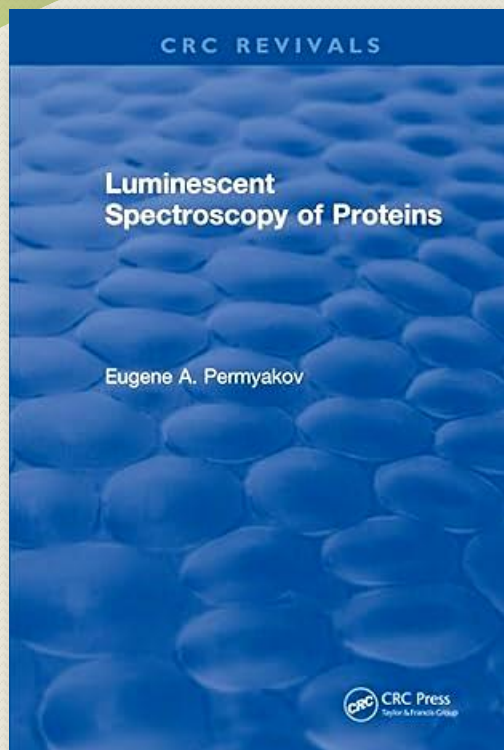
Кальцийсвязывающие белки



Монография посвящена рассмотрению физико-химических и функциональных свойств кальцийсвязывающих белков, важнейших Са-регуляторных элементов в большинстве биологических систем. Особое внимание уделено белкам, обладающим наивысшим сродством к кальцию: парвальбумину, кальмодулину, тропонину С, α -лактальбумину и др. Подробно рассмотрены их физико-химические свойства: сродство к катионам металлов; характер структурных изменений, вызываемых связыванием катионов металлов. Обсуждены механизмы функционирования кальцийсвязывающих белков в различных биологических процессах (мышечное сокращение, нервная проводимость, секреция и т.д.). Рассчитана на биофизиков, биохимиков, физиологов.

Монография посвящена рассмотрению структурных, физико-химических и функциональных свойств кальцийсвязывающих белков парвальбуминового семейства (парвальбумины, тропонин С, калмодулин, белок S-100 и т.д.). Проведены данные об их аминокислотных последовательностях, а также об их вторичной и третичной структуре и ее динамике. Подробно рассмотрены металлсвязывающие свойства белков этого семейства и их определяющее влияние на стабильность структуры этих белков. Рассказано об известных на сегодня физиологических функциях парвальбуминов и других родственных им белков. Книга рассчитана на биофизиков, биологов и медиков.

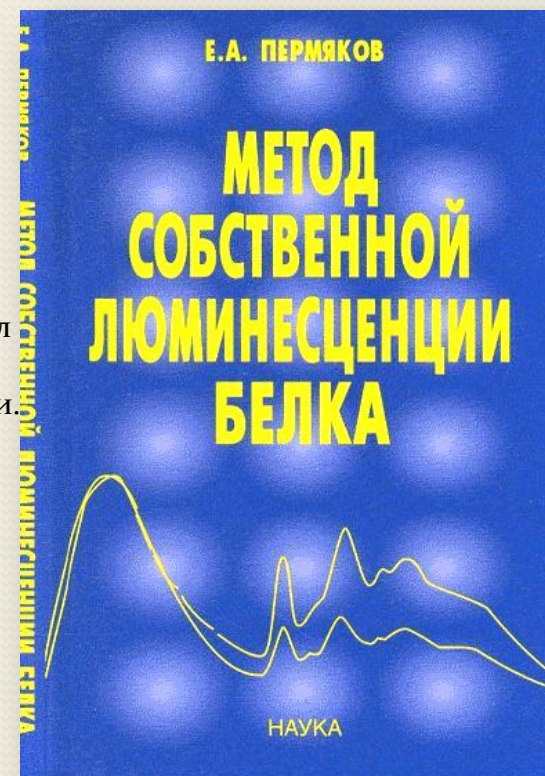


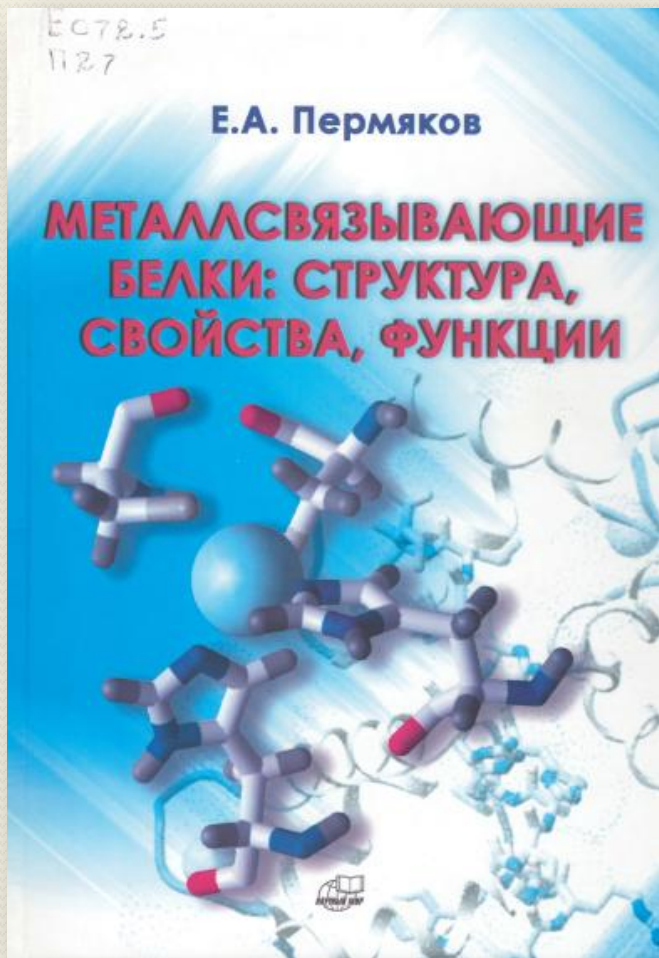


Luminescent Spectroscopy of Proteins is devoted to the method of intrinsic protein luminescence, one of the most popular experimental methods in modern biophysics and biochemistry. The book discusses general physical principles of the luminescence method; spectral properties of the main protein chromophores; and protein luminescence and its use for studies on structural, physico-chemical, and functional properties of proteins. Principles of luminescent spectroscopy are illustrated by real-life applications and problems. Luminescent Spectroscopy of Proteins will be an excellent reference for biophysicists, biochemists, analytical chemists, and other scientists interested in this topic.

Книга содержит общую информацию об уровнях энергии многоатомных молекул и переходах между ними с подробным разбором фотофизических процессов, происходящих в них. Приведены сведения о технике измерения люминесценции. Сообщаются известные в настоящее время сведения о спектральных свойствах изолированных белковых хромофоров: триптофана, тирозина и фенилаланина. Основная часть книги посвящена собственной белковой люминесценции. Обсуждено положение и форма спектров флуоресценции белков, квантовый выход флуоресценции белков, затухание белковой флуоресценции. Рассмотрена общая стратегия люминесцентного исследования белков.

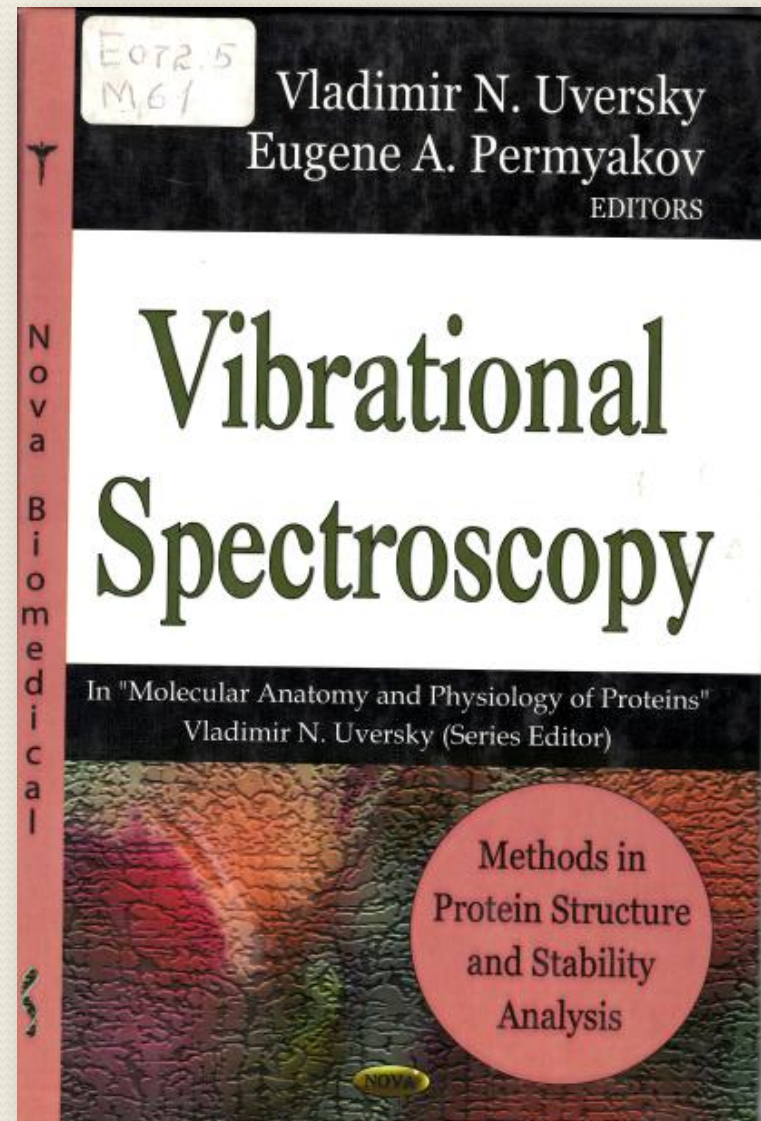
Для студентов, аспирантов и научных сотрудников, специализирующихся в Биофизике, биохимии и физико-химической биологии.

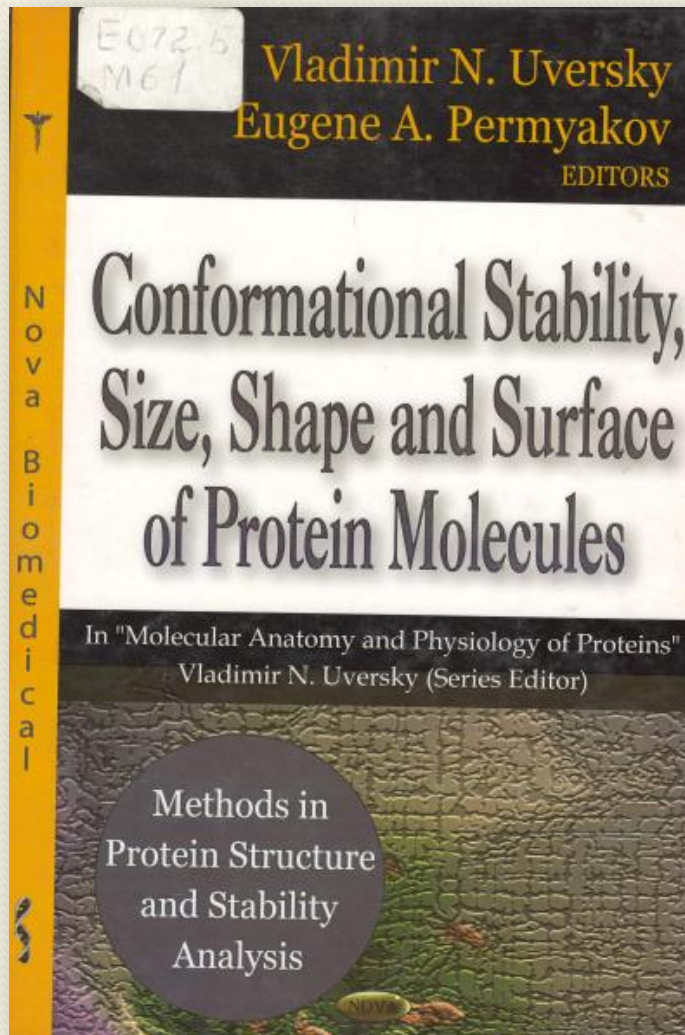




В книге подробно рассмотрены структура, физико-химические свойства и физиологические функции белков, специфически связывающих катионы металлов. Большое внимание уделено строению центров связывания различных металлов и природе взаимодействий металлов с их лигандами в белках. В монографии приведены известные на сегодня трехмерные структуры многочисленных металлсвязывающих белков, обсуждены особенности их строения и функционирования в различных биологических системах, приведены данные о роли катионов металлов в различных заболеваниях. Приведены также известные на сегодня сведения о взаимодействии металлсвязывающих белков с загрязняющими тяжелыми металлами (ртуть, свинец, кадмий, лантаноиды, актиноиды) и их влиянии на биологические процессы. Кратко охарактеризованы основные физические и химические методы исследования металлсвязывающих белков. Монография будет полезна биофизикам, биохимикам, биологам, имеющим дело в своей работе с металлсвязывающими белками. Может быть использована в качестве дополнительного материала студентами, магистрантами и аспирантами при изучении курса биохимии и биофизики.

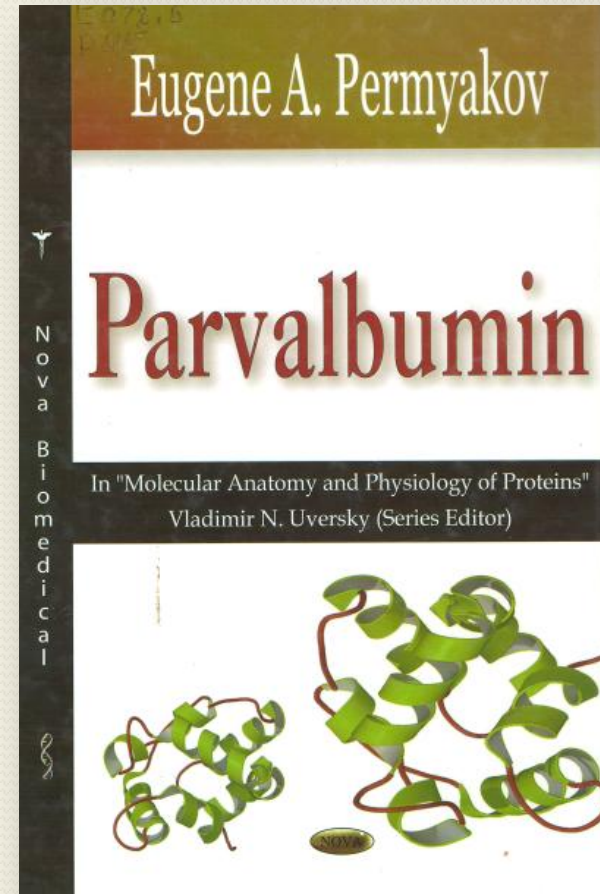
Protein research is a frontier field in science. Proteins are widely distributed in plants and animals and are the principal constituents of the protoplasm of all cells, and consist essentially of combinations of a-amino acids in peptide linkages. This book gathers together research from throughout the world in this field of research.

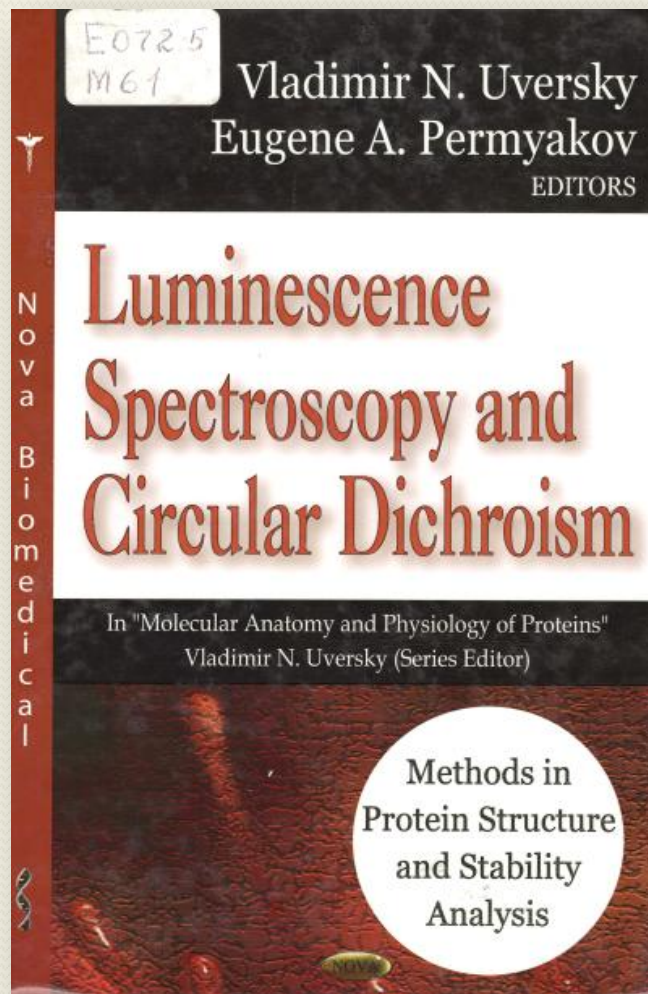




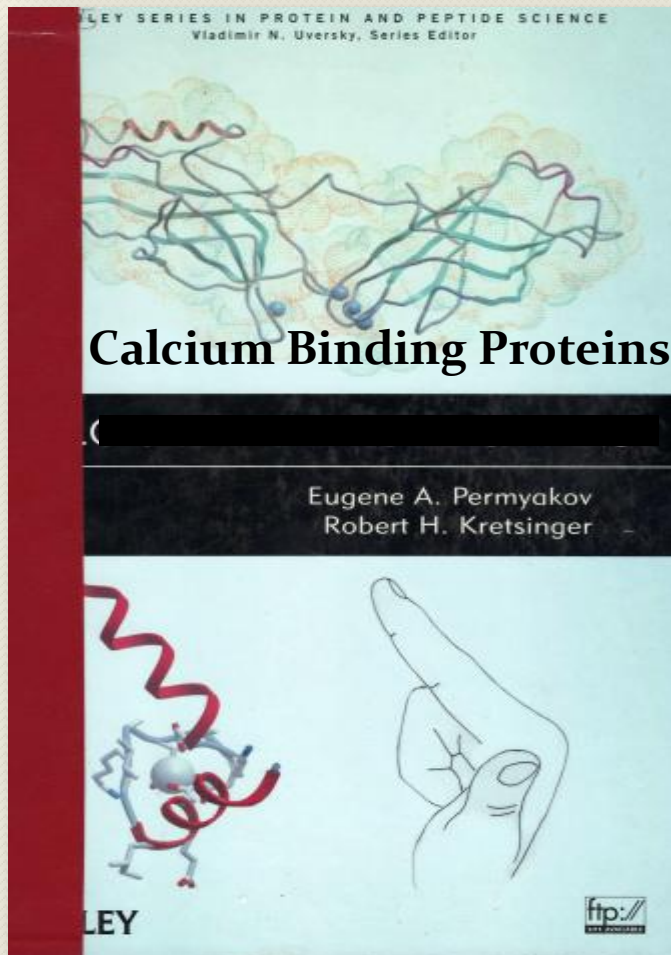
Protein research is a frontier field in science. Proteins are widely distributed in plants and animals and are the principal constituents of the protoplasm of all cells, and consist essentially of combinations of α -amino acids in peptide linkages. Twenty different amino acids are commonly found in proteins, and serve as enzymes, structural elements, hormones, immunoglobulins, etc., and are involved throughout the body, and in photosynthesis. This book gathers new leading-edge research from throughout the world in this exciting and exploding field of research.

Parvalbumin is a small (Mr 12,000), acidic (pI 4-5), Ca^{2+} -binding protein of the EF-hand superfamily, that is very important from several points of view. First of all, this protein takes part in Ca^{2+} regulation of activity of some types of muscle cells, neurons and some other types of cells. At the same time, the exact physiological role of parvalbumin in some of these cells is not clear enough now. Second, parvalbumin has two high affinity Ca^{2+} binding sites and for this reason it is frequently used as a simple model Ca^{2+} binding protein. It is convenient for studies of effects of interactions between two calcium binding sites and is very useful for studies of calcium binding effects on interactions of the protein with another proteins, peptides, membranes and low molecular weight organic compounds, which frequently have physiological significance. Third, parvalbumin forms several partially folded intermediate states, which have been studied by many researchers interested in protein folding and stability problems. It is very attractive for studies of the properties and structure of intermediate molten globule-like states. The present book summarises our knowledge on physical, chemical and physiological properties of parvalbumins.





Protein research is a frontier field in science. Proteins are widely distributed in plants and animals and are the principal constituents of the protoplasm of all cells, and consist essentially of combinations of α -amino acids in peptide linkages. Twenty different amino acids are commonly found in proteins, and serve as enzymes, structural elements, hormones, immunoglobulins, etc., and are involved throughout the body, and in photosynthesis. This book gathers new leading-edge research from throughout the world in this exciting and exploding field of research.



Calcium Binding Proteins explains the unique and highly diverse functions of calcium in biology, which are realized by calcium binding proteins. The structures and physical characteristics of these calcium binding proteins are described, as well as their functions and general patterns of their evolution. Techniques that underlie the description of proteins are discussed, including NMR, circular dichroism, optical rotatory dispersion spectroscopy, calorimetry, and crystallography. The book discusses the patterns of biochemical phenomena such as calcium homeostasis, mineralization, and cell signaling that involve specific proteins. It summarizes ongoing research and presents general hypotheses that help to focus future research, and also provides a conceptual framework and a description of the underlying techniques that permits someone entering the field to become conversant.

Synthesizes the current knowledge in the field and provides new insights into medical applications. Metalloproteomics is the large-scale study of metal-binding proteins. These proteins, which represent about one quarter of all the proteins in the Protein Data Bank, play important roles in all biological systems and all biological processes. *Metalloproteomics* provides the latest information on all major families of metal-binding proteins, including their structural, physico-chemical, and functional properties, enabling readers to better understand these proteins. Moreover, the book demonstrates how understanding the structures, properties, and functions of intracellular and extracellular metal-binding proteins may unlock the key to drug development for the treatment of a myriad of diseases.

Written by Eugene Permyakov, an international expert and pioneer in the structural analysis of metal-binding proteins, the book offers

Theoretical introduction to cation binding

Broad range of methods for investigating the binding of different cations to proteins

Characteristics of interactions of physiologically important cations of Ca, Mg, Zn, Fe, Mn, Co, Cu, Ni, Mo, W, Na, and K with proteins

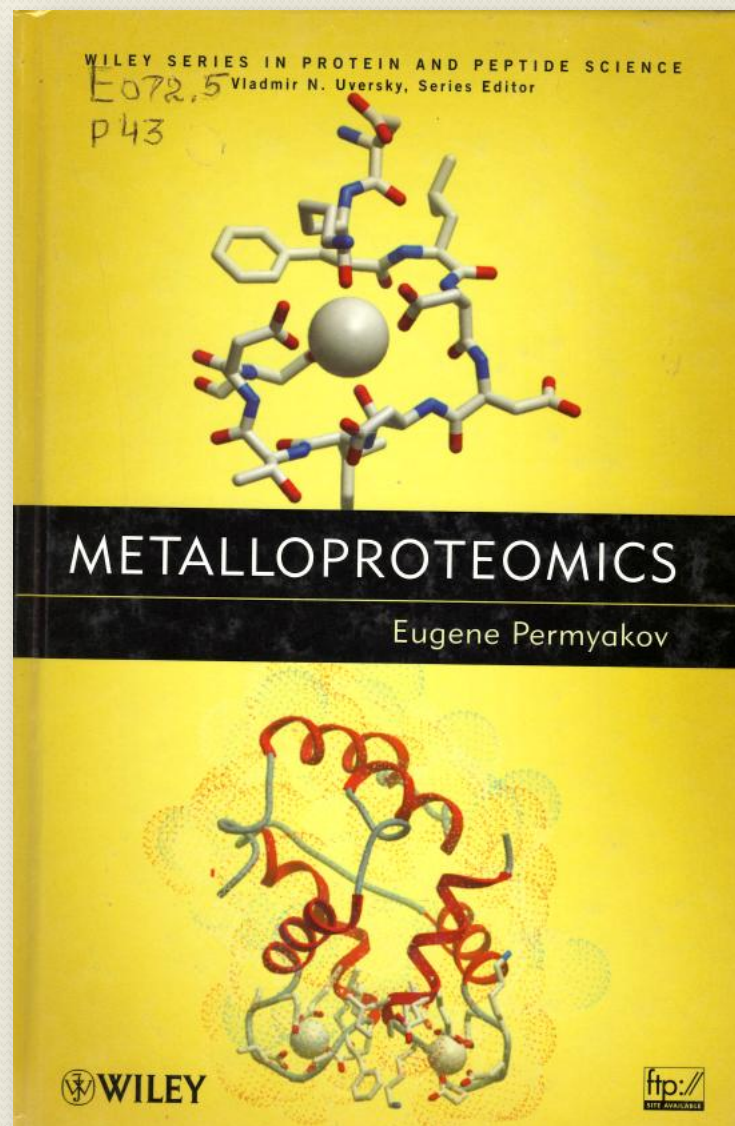
Detailed considerations of structural and physico-chemical properties of the metal-binding proteins

Interactions of all other metal cations with proteins

Interactions of different types of cations with nucleic acids

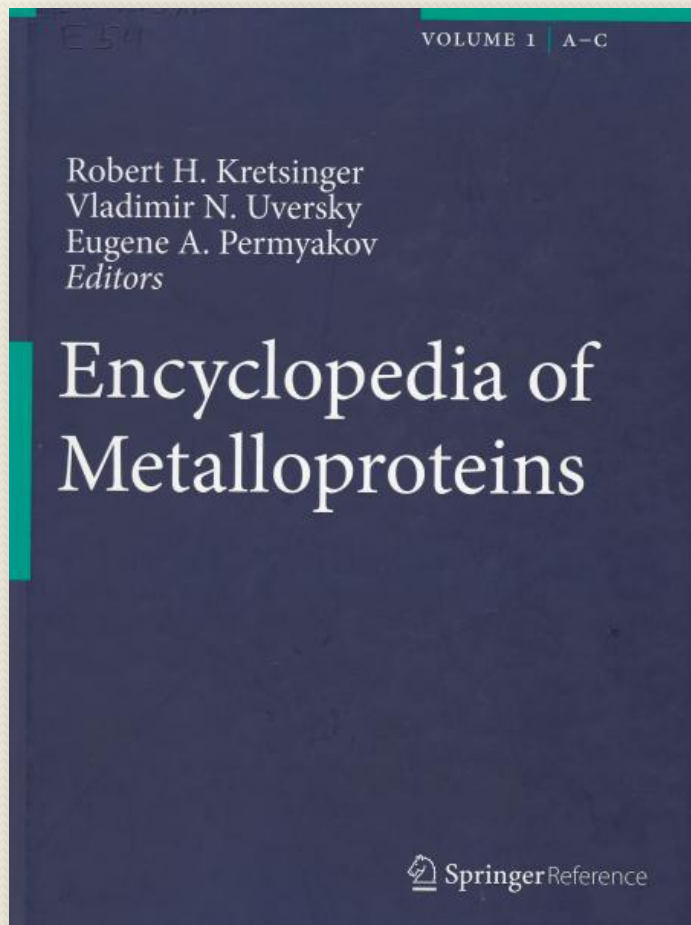
Throughout the text, the author integrates principles of proteomics. In addition, detailed examples underscore the role metal-binding proteins play in health and medicine.

Bringing together and analyzing all the latest findings, *Metalloproteomics'* scope and level of insight are unparalleled. It is recommended for biophysicists, biochemists, enzymologists, cell and molecular biologists, protein and peptide scientists, organic and bioinorganic chemists, and chemical biologists.





encyclopedia



In biochemistry, a metalloprotein is a generic term for a protein that contains a metal cofactor. The metal may be an isolated ion or may be coordinated with a nonprotein organic compound, such as the porphyrin found in hemoproteins. In some cases, the metal is co-coordinated with a side chain of the protein and an inorganic nonmetallic ion. This kind of protein-metal-nonmetal structure is seen in iron-sulfur clusters

Metalloproteins deals with all aspects related to the intracellular and extracellular metal-binding proteins, including their structures, properties and functions. The biological roles of metal cations and metal-binding proteins are endless. They are involved in all crucial cellular activities. Many pathological conditions are related to the problematic metal metabolism.

Research in metalloprotein-related topics is therefore rapidly growing, and different aspects of metal-binding proteins progressively enter curricula at Universities and even at the High School level on occasion. However, no key resource providing basic, but comprehensible knowledge on this rapidly expanding field exists. The Encyclopedia of Metalloproteins aims to bridge this gap, and will attempt to cover various aspects of metalloprotein/metalloproteomics and will deal with the different issues related to the intracellular and extracellular metal-binding proteins, including their structures, properties and functions. The goal is to cover exhaustively all catalytically and biologically crucial metal ions and to find at least one interacting protein for other metal ions. The Encyclopedia of Metalloproteins will provide a key resource for advanced undergraduate and graduate students, researchers, instructors, and professors interested in protein science, biochemistry, cell biology, and genetics.

В номере:

Л.В. Липенко
Об Арктической зоне
Российской Федерации

Е.М. Коростылевская и др.
Кластеры компетенции, как
инструмент коммерциализации
технологических разработок
в условиях глобализации —
регионализации мировой
экономики

М.С. Камзалева,
Н.Е. Терещкина
Оценка доступности
финансирования
малому инновационному
предпринимательству

В.К. Копыток
Игры с Черной Королевой:
как фирмы выбирают уровень
инвестиций в исследования
и разработки

Н.В. Котова, Е.А. Министирский
Инновационный сектор
экономики Томской области
в 2009–2016 годах по данным
федеральной и региональной
статистики

В.В. Спицын
Анализ определяющих
факторов роста
высокотехнологичных отраслей
промышленности и услуг

Г.Ф. Деттер
Краткая история научно-
технологического развития
Ямало-Ненецкого автономного
округа, итоги

Н.Е. Егорова
Оценка вклада участников
инновационной деятельности
в субъектах Арктической
зоны РФ

Инновационная деятельность в Пущинском научном центре РАН

Е. А. Пермяков,

д. б. н., профессор, директор Института биологического
приборостроения РАН, заместитель Председателя
Президиума Пущинского научного центра РАН



В Пущинском научном центре РАН (ПНЦ РАН) сосредоточен существенный научный потенциал в области современной биологии. Несмотря на то, что основной задачей десяти имеющихся в ПНЦ РАН институтов является получение фундаментальных знаний о живой природе, в Центре достаточно много интересных практических разработок, некоторые из которых уже нашли свое применение в производстве. Коммерциализация научных достижений в ПНЦ РАН содержится несколькими причинами: отсутствием специалистов в области коммерциализации, отсутствием реальных инвестиций и реального спроса на практические разработки со стороны производства.

Significant scientific potential is concentrated in the Pushchino Research Center of the Russian Academy of Sciences (PRC RAS). In spite of the fact that the main task of the ten institutes of the PRC RAS is obtaining fundamental knowledge on living nature, the Center has many interesting applied developments, some of which are already used in various branches of industry. Commercialization of scientific results in PRC RAS is kept back by several reasons: the lack of experts in commercialization, the absence of real investments and the lack of real demand for applied developments from industry.

Пущинский научный центр РАН (ПНЦ РАН) является уникальным образованием, имеющим мировое значение и объединяющим около 30% потенциала России в области физико-химической биологии. В настоящее время численность населения города составляет около 20,5 тысяч человек. В научном комплексе ПНЦ РАН работают 3,3 тыс.

человек, из них 1,3 тыс. — научные сотрудники, причем более 800 из них — это доктора и кандидаты наук. ПНЦ РАН является градообразующей структурой муниципального образования (г. Пущино Московской обл.). В состав ПНЦ РАН входят следующие институты, относящиеся, в основном, к Отделению биологических наук РАН:



Biochimica et Biophysica Acta 1586 (2002) 1–10



Human α -fetoprotein as a Zn^{2+} -binding protein. Tight cation binding is not accompanied by global changes in protein structure and stability

Serge E. Permyakov^a, Keith A. Oberg^b, Alexandra M. Cherskaya^a, Mikhail M. Shavlovsky^c, Eugene A. Permyakov^a, Vladimir N. Uversky^{a,b,*}

^a Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, 142292, Pushchino, Moscow Region, Russia

^b Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Santa Cruz, CA 95064, USA

^c Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russia

Received 25 May 2001; received in revised form 7 August 2001; accepted 30 August 2001

Abstract

The binding of zinc to human α -fetoprotein (AFP) isolated from human umbilical cord serum was studied by fluorimetric Zn^{2+} -titration. We found that the total number of strong binding sites for zinc on this protein was 5: AFP has one very strong (dissociation constant, $K_d < 10^{-8}$ M) and at least four lower affinity zinc binding sites ($K_d < 10^{-5}$ M). Fourier transform infrared (FTIR) analysis revealed that aspartate and histidine residues could be involved in the strong coordination of zinc. Intriguingly, binding of zinc to the protein does not induce structural changes that can be detected by circular dichroism, FTIR, intrinsic fluorescence or (1,1')-bi-(4-anilino)naphthalene-5,5'-disulfonic acid (bis-ANS) binding. Finally, scanning microcalorimetry measurements showed that stability of the protein is also unaffected by zinc binding in spite of the strength of the coordination. Such strong interactions without major structural consequences are highly unusual, and AFP may therefore be the first characterized representative of a new class of ligand-binding proteins. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: α -Fetoprotein; Carcinoembryonic protein; Protein structure; Structural transition; Conformational stability; Zn^{2+} binding

1. Introduction

α -Fetoprotein (AFP) is an oncofetal glycoprotein consisting of 590 amino acid residues [1] that is produced primarily by fetal liver and yolk sack cells. AFP levels correlate with fetal maturity, being very

high during embryo development and decreasing abruptly just after birth. An increase in the AFP content in adult sera is evidence of the development of several disorders [2].

AFP is a well-known molecular marker indicating either the development of cancer or fetal abnormalities [2–9]. In addition to its substantial diagnostic importance, the physiological functions of AFP are also of great interest. It has been established that AFP isolated from amniotic fluid or the fetal sera of rats is capable of binding estrogens [9–12]. It was shown that AFP strongly binds to fatty acids [9,13,14] – material isolated from human fetuses contains from 2–3 molecules of fatty acid per protein



FEBS Letters 473 (2000) 269–274

Minireview

α -Lactalbumin: structure and function

Eugene A. Permyakov^{a,*}, Lawrence J. Berliner^b

^a Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, 142292 Pushchino, Moscow region, Russia

^b Department of Chemistry, The Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA

Received 6 March 2000; received in revised form 14 April 2000

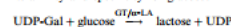
Edited by Vladimir Skulachev

Abstract Small milk protein α -lactalbumin (α -LA), a component of lactose synthase, is a simple model Ca^{2+} binding protein, which does not belong to the EF-hand proteins, and a classical example of molten globule state. It has a strong Ca^{2+} binding site, which binds Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , and K^+ , and several distinct Zn^{2+} binding sites. The binding of cations to the Ca^{2+} site increases protein stability against action of heat and various denaturing agents, while the binding of Zn^{2+} to the Ca^{2+} -loaded protein decreases its stability. Functioning of α -LA requires its interactions with membranes, proteins, peptides and low molecular weight substrates and products. It was shown that these interactions are modulated by the binding of metal cations. Recently it was found that some folding variants of α -LA demonstrate bactericidal activity and some of them cause apoptosis of tumor cells.
© 2000 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: α -Lactalbumin; Structure; Function; Metal cation binding

1. Introduction

α -Lactalbumin (α -LA) is a small (M , 14 200), acidic (pI 4–5), Ca^{2+} binding milk protein, which is very important from several points of view. First of all, α -LA performs an important function in mammary secretory cells: it is one of the two components of lactose synthase, which catalyzes the final step in lactose biosynthesis in the lactating mammary gland [1]. The other component of this system is galactosyltransferase (GT), which is involved in the processing of proteins in various secretory cells by transferring galactosyl groups from UDP-galactose to glycoproteins containing N -acetylglucosamine. In the lactating mammary gland, the specificity of GT is modulated by interaction with α -LA, which increases its affinity and specificity for glucose:



The reaction takes place in the Golgi lumen and requires Mn^{2+} ions.

Second, α -LA possesses a single strong Ca^{2+} binding site

[2,3] and for this reason it is frequently used as a simple, model Ca^{2+} binding protein. It is very convenient for studies of calcium binding effects on interactions of the protein with proteins, peptides, membranes and low molecular weight organic compounds, which frequently have physiological significance.

Third, α -LA has several partially folded intermediate states, which are being studied by many researchers interested in protein folding problems. It is very attractive for studies of the properties and structure of intermediate molten globule-like states since at acidic pH and in the apo-state at elevated temperatures α -LA is the classic 'molten globule' [3–5].

Fourth, it has been found recently that some forms of α -LA can induce apoptosis in tumor cells [6,7] which suggests that this protein can fulfill many important biological functions.

2. Primary, secondary and tertiary structure

Most of α -lactalbumins, including human, guinea pig, bovine, goat, camel, equine and rabbit proteins, consist of 123 amino acid residues (see for example [8]). Only rat α -LA contains 17 additional C-terminal residues. α -LA is homologous in sequence to the lysozyme family, but it exhibits cell lysis activity about 10^{-6} of the specific activity of hen egg white lysozyme [9]. X-ray crystallography has shown that the three-dimensional structure of α -LA is very similar to that of lysozyme [10,11]. Native α -LA consists of two domains: a large α -helical domain and a small β -sheet domain, which are connected by a calcium binding loop (Fig. 1). The α -helical domain is composed of three major α -helices (residues 5–11, 23–24, and 86–98) and two short 3_{10} helices (residues 18–20, and 115–118). The small domain is composed of a series of loops, a small three-stranded antiparallel β -pleated sheet (residues 41–44, 47–50, and 55–56) and a short 3_{10} helix (three residues per turn and an intrachain hydrogen bond loop containing 10 atoms; residues 77–80). The two domains are divided by a deep cleft between them. At the same time, the two domains are held together by the cysteine bridge between residues 73 and 91, forming the Ca^{2+} binding loop. A second important disulfide bridge 61–77 connects the two domains as well. Overall, the structure of α -LA is stabilized by four disulfide bridges (6–120, 61–77, 73–91, and 28–111).

3. Location of cation binding sites

One of the most interesting features of α -LA is its ability to bind metal cations. It does not belong to the EF-hand protein family. The protein has a single strong calcium binding site, which is formed by oxygen ligands from carboxylic groups of

* Corresponding author. Present address: Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Santa Cruz, CA 95064, USA. Fax: +1-831-459-2935.

E-mail address: uversky@hydrogen.ucsc.edu (V.N. Uversky).

*Corresponding author. Fax: (7)-0967-79 05 22.
E-mail: permyakov@ibp.serpukhov.ru

Abbreviations: α -LA, α -lactalbumin; GT, galactosyltransferase; DMPC, dimyristoylphosphatidylcholine; DPPC, dipalmitoylphosphatidylcholine; DSA, 5-deoxyoctanoic acid; DSC, differential scanning calorimetry

cell calcium

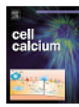


Cell Calcium 80 (2019) 152–159

Contents lists available at ScienceDirect

Cell Calcium

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/ceca



Monomeric state of S100P protein: Experimental and molecular dynamics study

Sergei E. Permyakov^{a,*}, Alexander I. Denesyuk^{a,b}, Konstantin A. Denesiouk^{b,c}, Maria E. Permyakova^a, Aliyev S. Kazakov^a, Ramis G. Ismailov^a, Victoria A. Rastrygina^a, Andrei S. Sokolov^a, Eugene A. Permyakov^{a,c}

^a Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, Moscow region 142290, Russia

^b Structural Bioinformatics Laboratory, Faculty of Science and Engineering, Abo Akademi University, Turku 20520, Finland

^c Pharmaceutical Sciences Laboratory, Faculty of Science and Engineering, Pharmacy, Abo Akademi University, Turku 20520, Finland

ARTICLE INFO

Keywords:
S100P protein
Monomeric S100P
Interleukin
Molecular dynamics
EF-hand

ABSTRACT

S100 proteins constitute a large subfamily of the EF-hand superfamily of calcium binding proteins. They possess one classical EF-hand Ca^{2+} -binding domain and an atypical EF-hand domain. Most of the S100 proteins form stable symmetric homodimers. An analysis of literature data on S100 proteins showed that their physiological concentrations could be much lower than dissociation constants of their dimeric forms. It means that just monomeric forms of these proteins are important for their functioning. In the present work, thermal denaturation of apo-S100P protein monitored by intrinsic tyrosine fluorescence has been studied at various protein concentrations within the region from 0.04–10 μM . A transition from the dimeric to monomeric form results in a decrease in protein thermal stability shifting the mid-transition temperature from 85 to 75 °C. Monomeric S100P immobilized on the surface of a sensor chip of a surface plasmon resonance instrument forms calcium dependent 1 to 1 complexes with human interleukin-11 (equilibrium dissociation constant 1.2 nM). In contrast, immobilized interleukin-11 binds two molecules of dimeric S100P with dissociation constants of 32 nM and 288 nM. Since effective dissociation constant of dimeric S100P protein is very low (0.5 μM as evaluated from our data) the sensitivity of the existing physical methods does not allow carrying out a detailed study of S100P monomer properties. For this reason, we have used molecular dynamics methods to evaluate structural changes in S100P upon its transition from the dimeric to monomeric state. 80-ns molecular dynamics simulations of kinetics of formation of S100P, S100B and S100A11 monomers from the corresponding dimers have been carried out. It was found that during the transition from the homo-dimer to monomer form, the three S100 monomer structures undergo the following changes: (1) the helices in the four-helix bundles within each monomer rotate in order to shield the exposed non-polar residues; (2) almost all lost contacts at the dimer interface are substituted with equivalent and newly formed interactions inside each monomer, and new stabilizing interactions are formed; and (3) all monomers recreate functional hydrophobic cores. The results of the present study show that both dimeric and monomeric forms of S100 proteins can be functional.

1. Introduction

S100 proteins constitute a large subfamily of the superfamily of EF-hand calcium binding proteins [1–3]. All the proteins within this superfamily have a common structural domain (EF-hand) consisting of a Ca^{2+} -binding loop flanked by two α -helices [1–3]. S100 proteins are

the smallest members of the EF-hand superfamily and their molecules consist of only two EF-hand domains. Acidic amino acid residues within the Ca^{2+} -binding loop provide ligands for Ca^{2+} binding in a pentagonal, bipyramidal fashion. The C-terminal EF-hand of S100P is conformational and binds calcium with dissociation constant, $K_d \approx 10$ to 50 μM [1]. The N-terminal EF-loop has two more residues [14 instead of 12] in

Abbreviations: IL-11, interleukin-11; rWT IL-11, recombinant human interleukin-11 omitting the N-terminal Pro residue of the mature protein (residues 23–199 of Swiss-Prot entry P20809); S100P, recombinant human S100P; SPR, surface plasmon resonance; RU, resonance unit.

* Corresponding author at: Protein research group, Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Institutskaya str., 7, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia.

E-mail addresses: permyakov.s@gmail.com (S.E. Permyakov), apermyakov@yandex.ru (E.A. Permyakov).

<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.04.008>

Received 11 March 2019; Received in revised form 13 April 2019; Accepted 27 April 2019

Available online 29 April 2019

0143-4160/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

ISSN 0868-5586

НАУЧНОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ, 200.

ОБОЗРЫ

УДК 681.2: 57

© Е. А. Пермяков, А. А. Фрейдин

РАЗВИТИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРИБОРОСТРОЕНИЯ В РОССИИ

Рассматривается положение в отечественном научном приборостроении, сложившееся за последние десятилетия, конкретно в биологическом приборостроении. Приводятся примеры последних разработок Института биологического приборостроения РАН. Дается анализ перспектив развития отрасли.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Биологическое приборостроение является важной частью научного приборостроения, призванной прежде всего обеспечивать приборами и оборудованием исследования в области биологических наук (физико-химическая биология, молекулярная биология, биофизика, биохимия, клеточная биология и др.). Хорошо известно, что в настоящее время эти области науки приобрели ведущее значение для развития Человечества. Сегодня развитые государства мира большую часть средств, идущих на развитие науки, направляют преимущественно на развитие биологии и медицины — наук, определяющих здоровье и безопасность людей.

Очевидно, что успешное развитие биологических наук невозможно без надлежащего приборного и методического обеспечения. Казалось бы, этот тезис в своей очевидности граничит с банальностью. Всегда отсутствие приборов и методов блокировало развитие науки, а появление принципиально новых приборов и методов обеспечивало и обеспечивает прорывы в различных областях наук, в том числе и биологических. К сожалению, у ряда отечественных ученых бытует мнение, что "настоящим" делом является только фундаментальная наука, а методы и приборы играют лишь вспомогательную роль и обеспечивать развитие отечественного приборостроения — это не задача для фундаментальной науки. Более того, в ряде случаев высказывается еще более удивительное утверждение, что развивать приборостроение в России, даже в рамках Российской академии наук для обеспечения ее нужд, вообще не имеет смысла: все возникающие научные задачи можно решить с помощью закупки приборов и оборудования, производимых за рубежом. "Это, конечно, дорого, но ведь "нам" все равно такого не сделают, да и с дилеммой у нас слабовато, не говоря обо всем прочем..."

На наш взгляд, это в лучшем случае — глубокое заблуждение, способное серьезно осложнить развитие отечественной науки. Только один пример: поскольку исследования в области биологии и медицины имеют непосредственное отношение к национальной безопасности нашей страны [1], для сохранения независимости отечественных научных исследований от политической позиции зарубежных стран по отношению к нашей стране Россия должна научиться обеспечивать себя практически полностью реактивами и препаратами, приборами и оборудованием для проведения разработок хотя бы в этой области. С этой точки зрения сохранение, поддержка и развитие академической приборостроительной базы в широком смысле этого слова — одна из серьезных и принципиальных стратегических задач сохранения и развития Российской академии наук. В рамках этой задачи скрыта еще одна горящая проблема — обеспечение кадрами, жизненно важная не только для приборостроения, но и для всей российской науки. Эта тема заслуживает отдельного серьезного рассмотрения и выходит за рамки данной статьи.

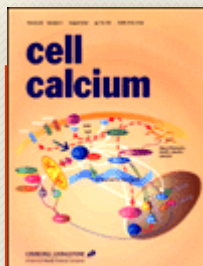
Как известно, последние десять лет российская наука, в том числе и биологическая, переживает глубокий кризис, определяющийся прежде всего совершенно недостаточным финансированием и как следствие этого массовым оттоком наиболее способных научных кадров как за границу, так и в другие виды деятельности. Потеря активных и квалифицированных специалистов в связи с мизерной оплатой труда, отсутствие средств на приобретение расходных материалов для текущей работы, моральное и физическое старение основных средств, в том числе приборов и оборудования, составляют фон, на котором в течение этих десяти лет старалась выжить фундаментальная наука. Несмотря на эти крайне неблагоприятные условия, за счет усилий президиума РАН приборостроительные организации (в том числе и биологиче-

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
НАУЧНОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ
II

том 26 № 1
январь—март

2016

Санкт-Петербургская
издательско-книгопечатная
фирма «Наука»



Cell Calcium 80 (2019) 152–159

Contents lists available at ScienceDirect

Cell Calcium

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ceca



Monomeric state of S100P protein: Experimental and molecular dynamics study

Sergei E. Permyakov^{a,*}, Alexander I. Denesyuk^{a,b}, Konstantin A. Denesiouk^{a,c}, Maria E. Permyakova^a, Alixey S. Kazakov^a, Ramis G. Ismailov^a, Victoria A. Rastrygina^a, Andrei S. Sokolov^a, Eugene A. Permyakov^{a,*}

^aInstitute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, Moscow region 142290, Russia

^bStructural Bioinformatics Laboratory, Faculty of Science and Engineering, Ahi Evran University, Turkey 20520, Finland

^cPharmaceutical Sciences Laboratory, Faculty of Science and Engineering, Pharmacy, Ahi Evran University, Turkey 20520, Finland

ARTICLE INFO

Keywords:
S100P protein
Monomeric S100P
Interleukin
Molecular dynamics
EF-hand

ABSTRACT

S100 proteins constitute a large subfamily of the EF-hand superfamily of calcium binding proteins. They possess one classical EF-hand Ca^{2+} -binding domain and an atypical EF-hand domain. Most of the S100 proteins form stable symmetric homodimers. An analysis of literature data on S100 proteins showed that their physiological concentrations could be much lower than dissociation constants of their dimeric forms. It means that just monomeric forms of these proteins are important for their functioning. In the present work, thermal denaturation of apo-S100P protein monitored by intrinsic tyrosine fluorescence has been studied at various protein concentrations within the region from 0.04–10 μM . A transition from the dimeric to monomeric form results in a decrease in protein thermal stability shifting the mid-transition temperature from 85 to 75 °C. Monomeric S100P immobilized on the surface of a sensor chip of a surface plasmon resonance instrument forms calcium dependent 1 to 1 complexes with human interleukin-11 (equilibrium dissociation constant 1.2 nM). In contrast, immobilized interleukin-11 binds two molecules of dimeric S100P with dissociation constants of 32 nM and 288 nM. Since effective dissociation constant of dimeric S100P protein is very low (0.5 μM as evaluated from our data) the sensitivity of the existing physical methods does not allow carrying out a detailed study of S100P monomer properties. For this reason, we have used molecular dynamics methods to evaluate structural changes in S100P upon its transition from the dimeric to monomeric state. 80-ns molecular dynamics simulations of kinetics of formation of S100P, S100B and S100A11 monomers from the corresponding dimers have been carried out. It was found that during the transition from the homo-dimer to monomer form, the three S100 monomer structures undergo the following changes: (1) the helices in the four-helix bundles within each monomer rotate in order to shield the exposed non-polar residues; (2) almost all lost contacts at the dimer interface are substituted with equivalent and newly formed interactions inside each monomer, and new stabilizing interactions are formed; and (3) all monomers recreate functional hydrophobic cores. The results of the present study show that both dimeric and monomeric forms of S100 proteins can be functional.

1. Introduction

S100 proteins constitute a large subfamily of the superfamily of EF-hand calcium binding proteins [1,2]. All the proteins within this superfamily have a common structural domain (EF-hand) consisting of a Ca^{2+} -binding loop flanked by two α -helices [1–3]. S100 proteins are

the smallest members of the EF-hand superfamily and their molecules consist of only two EF-hand domains. Acidic amino acid residues within the Ca^{2+} -binding loop provide ligands for Ca^{2+} binding in a pentagonal, bipyramidal fashion. The C-terminal EF-hand of S100s is canonical and binds calcium with dissociation constant, $K_d \approx 10$ to 50 μM [1]. The N-terminal EF-loop has two more residues (14 instead of 12) in

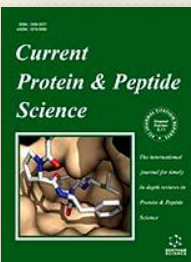
Abbreviations: IL-11, interleukin-11; rWT IL-11, recombinant human interleukin-11 omitting the N-terminal Pro residue of the mature protein (residues 23–199 of Swiss-Prot entry P23089); S100P, recombinant human S100P; SPR, surface plasmon resonance; RU, resonance unit.
* Corresponding authors at: Protein research group, Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Institutskaya str., 7, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia.
E-mail addresses: permyakov.s@gmail.com (S.E. Permyakov), permyakov@yandex.ru (E.A. Permyakov).

<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.04.008>

Received 11 March 2019; Received in revised form 13 April 2019; Accepted 27 April 2019

Available online 29 April 2019

0143-4160/© 2019 Published by Elsevier Ltd.



Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.se

352

Current Protein and Peptide Science, 2016, 17, 352–367

Disorder in Milk Proteins: α -Lactalbumin. Part A. Structural Properties and Conformational Behavior

Eugene A. Permyakov^{1,2}, Serge E. Permyakov¹, Leonid Breydo², Elrashdy M. Redwan^{3,4}, Hussein A. Almhedar³ and Vladimir N. Uversky^{1,2,3,*}



Permyakov

¹Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; ²Department of Molecular Medicine and USF Health Byrd Alzheimer's Research Institute, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, Florida 33612, USA; ³Department of Biological Science, Faculty of Science, King Abdulaziz University, Jeddah, PO Box 80203, Jeddah 21589, Saudi Arabia; ⁴Protective and Therapeutic Proteins Laboratory, Protein Research Department, Genetic Engineering and Biotechnology Research Institute GEBRI, City for Scientific Research and Technology Applications, New Borg EL Arab 21934, Alexandria, Egypt



Vladimir N. Uversky

Abstract: This is a first part of the two-part article that continues a series of reviews on the abundance and roles of intrinsic disorder in milk proteins. We introduce here α -lactalbumin, a small (M_r 14 200), simple, acidic (pI 4–5), Ca^{2+} -binding protein that might constitute up to 20% of total milk protein. Although function (it is one of the two components of lactose synthase that catalyzes the final step of the lactose biosynthesis in the lactating mammary gland), structure (protein has two domains, a large α -helical domain and a small β -sheet domain connected by a calcium binding loop), and folding mechanisms (α -lactalbumin is well-known as a classic example of the molten globule state) of this model globular protein are relatively well understood, α -lactalbumin continues to surprise researchers and clearly continues to have high discovery potential. The goal of this review is to summarize some recent advances in the field of α -lactalbumin research and to analyze the peculiarities of the “intrinsic disorder code” of this protein.

Keywords: α -Lactalbumin, molten globule, calcium binding, intrinsic disorder, structure, stability.

INTRODUCTION

Being the first source of nutrition for mammalian infants, milk is known to have numerous health benefits, with milk proteins possessing a wide spectrum of different biological functions in addition to their role as the primary source of amino acids. The composition of milk of different mammals has been adapted during evolution of the species to fulfill the needs of the offspring [1]. As a result, milk proteomes of different species are rather different. This divergence in the protein composition begins already at the levels of the ratios of whey to casein protein in milk from different species, with cow milk containing 20% of whey proteins and 80% of casein [2], and with human milk possessing these proteins at the 60% to 40% ratio [3]. The major proteinaceous constituents of the whey from cow milk are β -lactoglobulin (β -LG, ~35%), α -lactalbumin (α -LA, ~12%, note, according to other sources, the content of α -LA in cow's milk whey could also be as low as 5% [4, 5]), glycomacropeptide (GMP, ~12%, a casein-derived peptide), proteose peptone (~12%, another casein derivative), immunoglobulins (IG, ~8%), serum al-

bumin (SA, ~5%), lactoferrin (LF, ~1%), lactoperoxidase (LPO, ~0.5%), and amylase [6]. On the other hand, human whey contains 25% of α -LA, but does not have β -LG, which, being the major protein in bovine milk, is not also found in rat, mouse, guinea pig, or camel milks [4, 5]. Also, high concentrations of proteins involved in the mucosal immune system, immunoglobulin A, CD14, lactoferrin, and lysozyme, were found in human milk [1]. Even relatively close species might possess dramatic variability in the sizes and compositions of their proteomes. For example, a recent proteomics study identified 1606 and 518 proteins in human and macaque milk, respectively [7]. Furthermore, human milk was shown to contain significantly larger quantities of such proteins as lactoferrin, polymeric immunoglobulin receptor, vitamin D-binding protein, α_1 -antichymotrypsin, and lactoperoxidase. At a more general level, 82 of 88 differentially abundant proteins in these proteomes were more common in human milk relative to macaque [7].

By this article, we continue the series of reviews on abundance and functional roles of intrinsic disorder in milk proteins. Three previous papers in this series were dedicated to the representation of functional disorder in lactoferrin [8], caseins [9], and lactoperoxidase [10]. Here, α -lactalbumin (α -LA), is presented, which is one of the major whey proteins. We discuss structural properties of this protein and the peculiarities of its refolding *in vitro*.

*Address correspondence to these authors at the Department of Molecular Medicine, College of Medicine, University of South Florida, 12901 Bruce B. Downs Blvd, MDC3540, Tampa, FL 33612, USA; E-mail: vversky@health.usf.edu; Eugene A. Permyakov, Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Institutskaya str., 7, Pushchino, Moscow region 142290, Russia; E-mail: permyakov@yandex.ru

1875-5550/16 \$58.00+00

© 2016 Bentham Science Publishers

What Is Parvalbumin for?

Eugene A. Permyakov ^{1,*} and Vladimir N. Uversky ^{1,2,*}

- ¹ Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino 142290, Moscow Region, Russia
- ² Department of Molecular Medicine, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, FL 33647, USA

* Correspondence: epermyakov@yandex.ru (E.A.P.); vversky@usf.edu (V.N.U.)

Abstract: Parvalbumin (PA) is a small, acidic, mostly cytosolic Ca^{2+} -binding protein of the EF-hand superfamily. Structural and physical properties of PA are well studied but recently two highly conserved structural motifs consisting of three amino acids each (clusters I and II), which contribute to the hydrophobic core of the EF-hand domains, have been revealed. Despite several decades of studies, physiological functions of PA are still poorly known. Since no target proteins have been revealed for PA so far, it is believed that PA acts as a slow calcium buffer. Numerous experiments on various muscle systems have shown that PA accelerates the relaxation of fast skeletal muscles. It has been found that oxidation of PA by reactive oxygen species (ROS) is conformation-dependent and one more physiological function of PA in fast muscles could be a protection of these cells from ROS. PA is thought to regulate calcium-dependent metabolic and electric processes within the population of gamma-aminobutyric acid (GABA) neurons. Genetic elimination of PA results in changes in GABAergic synaptic transmission. Mammalian oncomodulin (OM), the β isoform of PA, is expressed mostly in cochlear outer hair cells and in vestibular hair cells. OM knockout mice lose their hearing after 3–4 months. It was suggested that, in sensory cells, OM maintains auditory function, most likely affecting outer hair cells' motility mechanisms.

Keywords: parvalbumin; oncomodulin; structure; stability; calcium binding; physiological functions

1. Introduction

Parvalbumin (PA) is a small, acidic, mostly cytosolic Ca^{2+} -binding protein of the EF-hand superfamily. It was found in lower and higher vertebrates, including humans (for reviews, see [1–4]). PA was found in fast twitch muscle cells, heart tissue, nephrons, specific neurons of the central and peripheral nervous system, certain cells of several endocrine glands, and sensory cells of the mammalian auditory organ, the organ of Corti, and some other cells.

Intracellular PA was suggested and partially proved to serve as a soluble relaxing factor accelerating the Ca^{2+} -mediated relaxation phase in fast muscles (reviewed in [1]). It is assumed that PA serves as a slow metal buffer in non-muscle tissues, modulating flows of metal ions. An extracellular form of PA was found in some biological systems [5–7]. Biological functions proposed for extracellular PA include antibacterial, chemoattractant, and immunomodulatory actions.

Despite many years of research on PAs, which have provided a good understanding of their structure and physicochemical properties, the physiological functions of PAs are still far from being clear. This short review covers some new findings on structural and physicochemical properties of PAs and focuses on their potential physiological significance.

2. Parvalbumin Structure

PA consists of 106–113 amino acid residues and its molecular mass is ~11–12 kDa. Isoelectric points of PAs are within the range of 3.9 to 6.6 (see Table 1). PAs are characterized



Analysis of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ selectivity in α -lactalbumin and Ca^{2+} -binding lysozyme reveals a distinct Mg^{2+} -specific site in lysozyme

Sergei E. Permyakov, ^{1,2,*} Tatyana I. Khokhlova, ¹ Vladimir N. Uversky, ^{1,3,4,*} and Eugene A. Permyakov ^{1,2}

- ¹ Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region 142290, Russia
- ² Department of Biomedical Engineering, Pushchino State University, Pushchino, Moscow region 142290, Russia
- ³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center for Computational Biology and Bioinformatics, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana 46202
- ⁴ Institute for Intrinsically Disordered Protein Research, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana 46202

ABSTRACT

The triggering of Ca^{2+} signaling pathways relies on $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ specificity of proteins mediating these pathways. Two homologous milk Ca^{2+} -binding proteins, bovine α -lactalbumin (bLA) and equine lysozyme (EQL), were analyzed using the simplest "four-state" scheme of metal- and temperature-induced structural changes in a protein. The association of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ by native proteins is entropy-driven. Both proteins exhibit strong temperature dependencies of apparent affinities to Ca^{2+} and Mg^{2+} , due to low thermal stabilities of their apofor- and relatively high unfavorable enthalpies of Mg^{2+} association. The ratios of their apparent affinities to Ca^{2+} and Mg^{2+} , being unusually high at low temperatures (5.3–6.5 orders of magnitude), reach the values inherent to classical EF-hand motifs at physiological temperatures. The comparison of phase diagrams predicted within the model of competitive Ca^{2+} and Mg^{2+} binding with experimental data strongly suggests that the association of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions with bLA is a competitive process, whereas the primary Mg^{2+} site of EQL is different from its Ca^{2+} -binding site. The latter conclusion is corroborated by qualitatively different molar ellipticity changes in near-UV region accompanying Mg^{2+} and Ca^{2+} association. The $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ selectivity of Mg^{2+} -site of EQL is below an order of magnitude. EQL exhibits a distinct Mg^{2+} -specific site, probably arising as an adaptation to the extracellular environment.

Proteins 2010; 78:2609–2624.
© 2010 Wiley-Liss, Inc.

Key words: α -lactalbumin; lysozyme; thermodynamics; phase transitions; phase diagram; state diagram; thermal stability; ligand binding; metal binding; metal selectivity.

INTRODUCTION

The most abundant metal in the human body, calcium, is involved in a myriad of vital biological processes (for reviews, see Refs. 1–5). In fact, it is almost impossible to find a truly Ca^{2+} -independent physiological process. Being the most versatile cellular messenger, calcium reversibly binds to either specific sensor proteins decoding cellular calcium signals or to Ca^{2+} buffer proteins modulating the free Ca^{2+} concentrations and fluxes in temporal, spatial, and amplitude domains. A set of proteins integrated into membranes is intended for control of the Ca^{2+} concentration via its transport across membranes. To meet the need for the fulfillment of a vast range of functions, Ca^{2+} -binding proteins were adapted to bind Ca^{2+} with over a million-fold range affinities (nM to mM), thereby covering all possible free Ca^{2+} concentrations within an organism, spanning from 0.1–0.2 μM (cytosol, nucleus, and mitochondrion; resting state) to 1–2 mM (extracellular milieu).^{1,2}

The observed coordination number for Ca^{2+} varies from 6 to 8; "hard" (low polarizability) oxygen-containing ligands are preferred: carboxylates, carbonyls, water, and hydroxyl oxygen atoms.⁶ As the Mg^{2+} ion also prefers "hard" ligands, with oxygen being the most preferred coordinating atom (carboxylates, side chains of Asn/Gln, backbone carbonyl groups, Ser/Thr and Tyr side chains, water oxygen atoms), and tends to occupy the center

Abbreviations: bLA, α -lactalbumin, isolated from bovine milk; CD, circular dichroism; DSC, differential scanning calorimetry; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EQL, equine lysozyme; isolated from equine milk; HEPES, N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-[2-(2-hydroxyethyl)carboxylic acid]; LA, α -lactalbumin; PD, phase diagram; λ_{max} , position of fluorescence spectrum maximum; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane.

Grant sponsor: Program of the Russian Academy of Sciences (Molecular and Cellular Biology).
***Correspondence to:** Dr. Vladimir N. Uversky, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, 410 W. 10th Street, HS 5000, Indianapolis, IN 46202. E-mail: vversky@iupui.edu or Dr. Sergei E. Permyakov, Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Institutskaya str., 7 Pushchino, Moscow region 142290, Russia. E-mail: permyakov@rambler.ru
Received 1 January 2010; Revised 3 May 2010; Accepted 19 May 2010
Published online 28 May 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
DOI: 10.1002/prob.22776



Citation: Permyakov EA, Uversky VN. What Is Parvalbumin for? *Biomolecules* 2022; 12, 656. <https://doi.org/10.3390/biom12050656>

Academic Editor: Luigi Vitagliano

Received: 5 April 2022
Accepted: 28 April 2022
Published: 30 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



The Use of UV-Vis Absorption Spectroscopy for Studies of Natively Disordered Proteins Protocol

First Online: 01 January 2012

PP 421–433

Eugene A. Permyakov

Abstract

Absorption spectroscopy can be used to monitor structural changes upon transitions from ordered to disordered state in proteins. Changes in environment of tryptophan, tyrosine, and phenylalanine residues result in changes of their absorption spectra. In most cases the changes are small and can be measured only in a differential mode.

Vol. 39, No. 6, August 1996 BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERFACES Pages

Pb²⁺ and Hg²⁺ binding to α -lactalbumin¹

Dmitry B. Veprintsev¹, Eugene A. Permyakov^{1,2,4}, Lina P. Kalinichenko² and Lawrence J. Berliner³

¹Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 142292, Russia.

²Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, 142292, Russia.

³Ohio State University, Chemistry Dep., 120 West 18th Av., Columbus, OH 43210.

Received May 24, 1996
Received after revision July 1, 1996

SUMMARY

Interactions of human α -lactalbumin with Pb²⁺ and Hg²⁺ were studied by intrinsic protein fluorescence. Lead ions bind to the strong Ca²⁺ binding site of α -lactalbumin (association constant $K_{\text{ass}} \approx 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) with concomitant spectral changes which are similar to those induced by the binding of Ca²⁺. Pb²⁺ also binds to the strong Zn²⁺ site with $K_{\text{ass}} \approx 10^3 \text{ M}^{-1}$ and some secondary binding site(s) (which probably contain histidine residues) with apparent $K_{\text{ass}} \approx 10^4 \text{ M}^{-1}$, causing pronounced aggregation of the protein. Mercury ions bind to α -lactalbumin at the primary Zn²⁺ sites with $K_{\text{ass}} \approx (1-4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, although the stoichiometry of the binding depends on the conformational state of the protein. Secondary Hg²⁺ binding sites were suggested to contain histidines, while the strong Hg²⁺ site contains carboxylates in the coordination sphere and seems to coincide with the strong Zn²⁺ site. The binding of both Pb²⁺ and Hg²⁺ decreases the thermal stability of the Ca²⁺-loaded protein and in some conditions causes pronounced protein aggregation.

Keywords: α -lactalbumin, fluorescence, metal binding, lead, mercury

INTRODUCTION

Metal binding regulatory proteins are potential targets for polluting heavy metal ions, hence studying their binding parameters is important for understanding their toxic mechanisms in cells.

α -Lactalbumin (α -LA) is the modifier protein of the lactose synthase (E.C. 2.4.1.22) complex. This small (Mr=14,200, 123 amino acid residues) globular protein contains 3 or 4

¹ This research was supported in part by grants from International Science Foundation (MJ3000 and MJ3300) and in part by grants from NATO (LG 930245 and LG 940412).

⁴ To whom all correspondence should be addressed. Fax: +7-(0967)79-05-22;
e-mail: permyakov@ibpm.serpukhov.su

IUBMB
Life



WILEY

1039-9712/96/061255-11\$05.00/0
Copyright © 1996 by Academic Press Australia.
All rights of reproduction in any form reserved.



Eur. J. Biochem. 169, 307–315 (1988)
& by FEBS 1988

Fluorescence Studies of the Calcium Binding to Whiting (*Gadus merlangus*) Parvalbumin

Eugene A. PERMYAKOV, Vladimir V. YARMOLENKO, Viktor I. EMEL'YANENKO, Edward A. BURSTEIN, Juliette CLOSSET, and Charles GERDAY

Institute of Biological Physics U.S.S.R., Academy of Sciences, Pushchino

(Received January 28, 1980/May 6, 1980)

The calcium binding by parvalbumin of whiting (*Gadus merlangus*) has been studied using tryptophan fluorescence characteristics. Titration of Ca^{2+} -free parvalbumin with Ca^{2+} leads to a very pronounced blue shift, narrowing and intensification of the fluorescence spectrum. These spectral changes proceed in two stages reflecting the existence of at least three forms which can be interpreted as (a) the protein without Ca^{2+} , (b) with one Ca^{2+} and (c) with two bound Ca^{2+} ions/molecule. The fluorescence of these forms has been identified and the fluorescence spectra measured at varied Ca^{2+} concentrations were resolved into three components corresponding to these spectral forms. The dependence of the relative concentration of the three forms on Ca^{2+} concentrations agree well with the two-step binding of Ca^{2+} to parvalbumin:



The equilibrium binding constants K_1 and K_2 obtained by the computer fit are approximately $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ and $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. This scheme and the K_1 and K_2 values are in a good agreement with the independent experimental data resulting from EGTA titration of Ca^{2+} -saturated parvalbumin and pH titration of parvalbumin in the presence of EGTA and Ca^{2+} .

Parvalbumins are a family of Ca^{2+} -binding proteins (M_r 10000–13000) found in rather high concentrations in the sarcoplasm of vertebrate skeletal muscles [1]. The three-dimensional structure of one of the carp parvalbumins [2] shows that the molecule contains six helical regions. Two pairs of them (CD and EF) together with connecting loops form two high-affinity Ca^{2+} -binding sites. Different association constants for the binding of Ca^{2+} to parvalbumin are found in the literature: 10^7 M^{-1} [3]; 2.5×10^8 and $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ [4]; 10^9 M^{-1} [5]; 7×10^8 and $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ [6]. This may be due either to the diversity of physicochemical conditions and techniques of measurements or to the type of parvalbumin investigated [7]. Various figures are also proposed for the binding of Mg^{2+} to parvalbumins; some authors [5,7] report that Mg^{2+} competes successfully with Ca^{2+} for both EF and CD sites with binding constants of $2.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ and about $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ respectively, others report that Mg^{2+} binds not only to EF and CD sites, but to other low-affinity sites [8]. It has also been shown that K^+ and Na^+ bind to parvalbumin with much lower bind-

ing constants [9,10]. Therefore the study of the mechanism and energy of Ca^{2+} and Mg^{2+} binding to parvalbumins is important, especially when it is carried out systematically in a wide range of physicochemical conditions which approach those existing in living muscle.

Until now intrinsic fluorescence properties of parvalbumins have been investigated in the case of parvalbumins devoid of tryptophan but containing phenylalanine or tyrosine [12]. It is well known, however, that the fluorescence properties of tryptophan residues are much more sensitive to the chromophore environment than those of phenylalanine and tyrosine residues [12]. Therefore, the location of the single tryptophan residue (Trp-102) in close vicinity to the Ca^{2+} -binding sites of whiting parvalbumin [11] gives rise to the possibility of obtaining, by means of its fluorescence, information about the physico-chemical and structural peculiarities of this parvalbumin and, particularly, about the calcium-binding mechanism. The pH and temperature dependences of the fluorescence properties were also investigated. In this work we took advantage of the extensive changes of fluorescence occurring on Ca^{2+} binding to develop a method of estimating the Ca^{2+} -binding equilibrium constants

Abbreviation: Hepes, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.

БИОФИЗИКА, 2000, том 45, вып.6, с.990–1006



УДК 577.3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БЕЛКОВОЙ ИНЖЕНЕРИИ В ИССЛЕДОВАНИИ КАЛЬЦИЙСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

© 2000 г. С.Е. Пермяков, Е.А. Пермяков

Институт биологического приборостроения РАН, 142290, Пушкино Московской области

Поступила в редакцию 05.07.2000 г.

Рассмотрены основные результаты применения методов генной инженерии в исследованиях кальцийсвязывающих белков с наивысшим сродством к кальцию с известной трехмерной структурой – парвальбумина, кальмодулина, тропонина С, кальбиндина, реверина, α -лактальбумина и др. Обсуждены особенности рекомбинантных кальцийсвязывающих белков. Приведены данные по генетическому введению в белки флуоресцентных меток – остатков триптофана и тирозина. Обсуждено влияние мутаций в различных частях молекулы (кальцийсвязывающие петли, гидрофобное ядро и др.) на структуру и свойства кальцийсвязывающих белков, а также обсуждены попытки создания искусственных кальцийсвязывающих центров.

Ключевые слова: кальцийсвязывающие белки, белковая инженерия, структура, стабильность.

В настоящее время известно, что ионы кальция служат внутриклеточным посредником в самых разнообразных клеточных процессах, таких как секреция и пролиферация, мышечное сокращение и зрение. При наиболее общем способе передачи сигналов с участием ионов кальция, реализованном почти во всех эукариотических клетках, посадка сигнальной молекулы на рецептор клеточной поверхности приводит к высвобождению кальция из Ca^{2+} -запасяющих органелл. Основными мишенями для выделяющихся при этом ионов кальция являются белки, что превращает исследование функционирования кальцийсвязывающих белков в крайне актуальную задачу.

Кальцийсвязывающие белки с наивысшим сродством к Ca^{2+} составляют отдельный класс белков, существенно отличающийся от других классов белков. На сегодня известно несколько сотен белков, входящих в этот класс. Подробное исследование их структуры и свойств началось примерно 30 лет назад, и в настоящее время о некоторых из этих белков мы имеем очень детальную структурную и физико-химическую информацию (см., например, [1,2]). Достаточно сказать, что для нескольких десятков кальцийсвязывающих белков известна трехмерная структура, причем в некоторых случаях она определена методом рентгеноструктурного анализа для кристаллов белка, а в некоторых – также и методом ЯМР для белка в растворе. В последние десятилетия для исследования структуры и свойств кальцийсвязывающих бел-

ков были довольно широко привлечены методы белковой инженерии. Применение этих мощных современных методов к исследованию кальцийсвязывающих белков имеет свои специфические особенности, определяющиеся особыми свойствами этого класса белков. Настоящий обзор посвящен некоторым промежуточным итогам применения методов белковой инженерии для исследования кальцийсвязывающих белков, особенностям их применения, сложностям в их использовании, обсуждению наиболее значимых результатов, полученных с их помощью, а также обсуждению перспектив дальнейшего использования этих методов.

КАЛЬЦИЙСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ. ИХ СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ

В этом обзоре мы рассмотрим результаты применения методов белковой инженерии для исследования наиболее известных кальцийсвязывающих белков, обладающих наивысшим сродством к ионам кальция, с давно известной трехмерной структурой. Необходимо отметить, что последний фактор является одним из основных условий возможности эффективного использования методов генной инженерии для исследования структуры и свойств белка. Только в этом случае можно осознанно планировать соответствующие поставленной задаче замены аминокислотных остатков. Поскольку кристаллизация апоформа, как правило, сильно затруднена, подавляющее большинство имеющихся



**ЕВГЕНИЙ
АНАТОЛЬЕВИЧ!
С ЮБИЛЕЕМ!!!**

