

UNIVERSITÉ DE NANTES  
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

---

ÉCOLE

Année 2010

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Rôle de l'agrégation et de la formation des ponts disulfure  
dans la génération de structures amyloïdes par les  
protéines intrinsèquement déstructurées: prions et caséines.

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : biochimie  
Spécialité : biochimie

*Présentée  
et soutenue publiquement par*

**Yuliya STROYLOVA (SHCHUTSKAYA)**

*Le 15 novembre 2010, devant le jury ci-dessous*

Président

Rapporteurs:

Human Rezaei, Directeur de Recherche INRA Jouy en Josas, France

Boris I. Kurganov, Professeur à l'Institut Bach d'Académie de Sciences de Russie  
à Moscou.

Examineurs:

Dimitri Levitsky, Professeur à l'Université de Nantes

Alexey Katrukha, Maître de Conférences, HDR à l'Université Lomonossov

*Directeur de thèse : Prof. Thomas Haertl<sup>2</sup> "gv'Rt ql0Xrcf ko k 'Owt qpgv' "*

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	8
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	10
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	15
<i>Механизм агрегации белков</i> .....	15
<i>Естественно развернутые белки</i> .....	18
<i>Агрегация, как причина прионных заболеваний</i> .....	27
<i>Структура и свойства казеинов</i> .....	43
$\alpha$ S1-казеин .....	44
$\alpha$ S2-казеин .....	45
$\beta$ -Казеин .....	46
$\kappa$ -Казеин .....	48
Образование мицелл .....	52
<i>Гомоцистеинилирование как физиологическая посттрансляционная модификация белков</i> .....	54
Гомоцистеин, его свойства и метаболические превращения в клетке ....	54
Гипергомоцистеинемия и ее роль в патологических процессах .....	55
Пути гомоцистеинилирования белков .....	57
<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	63
<i>Материалы</i> .....	63
<i>Получение разных форм казеинов</i> .....	63
Разделение нативных $\alpha$ S1, $\beta$ , $\kappa$ -казеинов молока с помощью анионообменной хроматографии .....	63
Получение разных форм рекомбинантного $\beta$ -казеина .....	64
Экспрессия рекомбинантного $\beta$ -казеина .....	64
Очистка .....	65

Экстракция белков .....	65
Хроматографическая очистка .....	66
1) Обратнофазовая хроматография .....	66
2) Анионообменная хроматография.....	67
3) Повторная обратнофазовая хроматография.....	67
Димеризация мутантных форм рекомбинантного $\beta$ -казеина .....	68
Протеолиз пепсином и трипсином .....	68
Гомоцистеинилирование нативных казеинов .....	69
<b><i>Получение разных форм приона</i></b> .....	69
Экспрессия .....	69
Очистка.....	70
Экстракция .....	70
Аффинная хроматография.....	71
Хранение .....	72
Термоагрегация приона .....	72
Агрегация приона при взаимодействии с фосфатидилинозитолом.....	72
Гомоцистеинилирование приона.....	72
<b><i>Методы исследования структуры белков и их агрегатов</i></b> .....	73
ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле .....	73
Гель-фильтрация .....	73
Метод динамического лазерного светорассеяния (ДЛС) .....	75
Круговой дихроизм.....	75
Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (ИК-спектроскопия) .....	76

Флуоресцентная спектроскопия .....	78
Абсорбционная спектроскопия с Конго красным для выявления амилоидов .....	80
Количественный анализ включения гомоцистеина с помощью метода определения SH-групп по Эллману .....	81
Масс-спектрометрия методом ионизации в электроспрее .....	82
Масс-спектрометрия MALDI TOF .....	82
Электронная микроскопия .....	83
Атомно-силовая микроскопия .....	84
Флуоресцентная микроскопия .....	84
Расщепление протеиназой К .....	85
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....	<b>86</b>
<i><b>Изучение агрегации казеинов</b></i> .....	<i><b>86</b></i>
Получение препаратов: .....	86
а) разделение казеинов молока .....	86
б) получение и очистка цистеинилированных мутантов .....	88
Масс-спектрометрия .....	93
<i><b>Исследование свойств мутантов</b></i> .....	<i><b>95</b></i>
Димеризация N- и C-концевых мутантов казеина .....	95
Мультимеризация двойного мутанта С4-208 .....	101
Изучение влияния димеризации на процесс образования мицелл методом ДЛС .....	103
Изучение влияния димеризации и мицеллизации на вторичную структуру казеина методом кругового дихроизма (КД) .....	105



Протеолиз трипсином .....	110
Расщепление пепсином .....	114
<b><i>Гомоцистеинилирование нативных казеинов молока</i></b> .....	119
Характеристика использованных препаратов казеина .....	120
Изменение агрегационного состояния казеинов после гомоцистеинилирования.....	123
Количественное определение содержания остатков гомоцистеина в препаратах $\beta$ -казеина .....	130
Измерение собственной триптофановой флуоресценции и использование флуоресцентных зондов для выявления структурных изменений казеинов при гомоцистеинилировании.....	131
Флуоресценция ANS.....	138
Взаимодействие казеинов с красителем Конго Красным.....	140
Изучение морфологии гомоцистеинилированных агрегатов казеинов с помощью флуоресцентной микроскопии .....	142
Трансмиссионная электронная микроскопия гомоцистеинилированных казеинов.....	143
<b><i>Изучение агрегации приона</i></b> .....	156
Получение и выделение рекомбинантного овечьего приона .....	156
<b><i>Исследование термоагрегации приона, получение и характеристика свойств малых патологических олигомеров</i></b> .....	158
Электронная микроскопия агрегатов приона.....	163
<b><i>Исследование влияния липидов на амилоидогенную конверсию</i></b> .....	166
Размер прион-липидных агрегатов .....	167
Вторичная структура агрегатов приона.....	170

<b><i>Исследование амилоидогенной конверсии, вызванной гомоцистеинилированием</i></b> .....	177
Подтверждение и качественное определение модификации .....	177
Количественный анализ эффективности включения гомоцистеина в прион.....	179
Анализ наличия гомоцистеина в составе модифицированного приона методом масс-спектрометрии .....	181
Агрегация приона в процессе гомоцистеинилирования .....	185
Изучение изменений во вторичной структуре гомоцистеинилированного приона.....	187
Амилоидогенная конверсия модифицированного приона .....	189
Повышение устойчивости гомоцистеинилированного приона к действию протеиназы К .....	191
Морфология агрегатов гомоцистеинилированного приона .....	191
Трансмиссионная электронная микроскопия гомоцистеинилированного приона.....	193
Роль некоторых лизинов приона в обеспечении устойчивости его структуры .....	195
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	199
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	200
<b><i>Отправленные статьи / Submitted papers / Papiers soumis</i></b> .....	217
Aggregation and structural changes of three types of caseins induced by homocysteinylation .....	217
N-homocysteinylation of ovine prion protein induces amyloid-like transformation .....	263
<b><i>Опубликованные статьи / Accepted papers / Papiers accepté</i></b> .....	284

Chaperone-like activities of different molecular forms of beta-casein. Importance of polarity of N-terminal hydrophilic domain.....	284
Phospholipids influence the aggregation of recombinant ovine prions. From rapid extensive aggregation to amyloidogenic conversion.....	294
Engineering of caseins and modulation of their structures and interactions.....	300
<b><i>Summary / Resume / Резюме</i></b> .....	308

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГАФД – D-глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
- ДЛС – метод динамического лазерного светорассеяния
- ДСН – додецилсульфат натрия
- ДТНБ - 5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота
- ДТТ – 1,4-дитио-DL-треитол
- ИК - инфракрасная спектроскопия
- КД - круговой дихроизм
- ТЕМЕД - тетраметилэтилендиамин
- ТнТ - тиофлавин Т
- Трис - трис(гидроксиметил)метиламин
- УФ - ультрафиолет
- ФИ - фосфатидилинозитол
- ЭДТА - этилендиаминтетраацетат
- ЯМР - ядерный магнитный резонанс
- АНQ- изоформа овечьего прионного белка АНQ
- ANS - натриевая соль 1,8-анилинонафталинсульфоновой кислоты
- ARH - изоформа овечьего прионного белка ARH
- ARQ - изоформа овечьего прионного белка ARQ
- ARR - изоформа овечьего прионного белка ARR
- FTIR - Фурье-инфракрасная спектроскопия
- GABA - гамма-аминомасляная кислота
- GPI - гликофосфатидилинозитол
- IDP - белки с разупорядоченной третичной структурой (intrinsically disordered proteins)
- IPTG - изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид

MALDI-TOF - Масс-спектрометрия с использованием матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации и времяпролетного детектора

MOPS - 3-морфолинопропансульфоная кислота

PMG - пред-расплавленная глобула

PRNP – ген прионного белка млекопитающих

PrP – прионный белок млекопитающих (prion protein)

PrP<sup>C</sup> - нормальная форма PrP

PrP<sup>Sc</sup> - инфекционная форма PrP

TFA - трифторуксусная кислота

VRQ – изоформа овечьего прионного белка VRQ

WT - дикий тип

## ВВЕДЕНИЕ

В течение долгого времени процесс агрегации белков практически не исследовали, считая ее скорее неприятным препятствием, возникающим при изучении белков, однако сейчас ситуация изменилась. Основной причиной всплеска интереса к этим процессам является то, что накопление белковых агрегатов в клетке ведет к развитию нейродегенеративных заболеваний.

В последние годы стало известно, что белки могут быть функционально активны не только в глобулярном, но и в частично или полностью развернутом состоянии.

Глобулярную структуру в нативном состоянии имеют в основном ферменты - белки, функция которых строго детерминирована. Белкам, взаимодействующим с большим числом партнеров, для функционирования требуется гораздо большая лабильность, и макромолекулы таких белков в нативном состоянии частично или полностью не структурированы.

Компактные глобулярные белки образуются в том случае, если полипептидная цепь обеспечивает существование сильных внутримолекулярных взаимодействий.

Многие частично или полностью неупорядоченные белки могут образовывать компактную структуру в комплексах со своими партнерами, которые образуются за счет межмолекулярных взаимодействий атомов полипептидной цепи белка и его партнера.

Межмолекулярные взаимодействия белковых молекул между собой могут приводить к образованию ассоциатов, аморфных агрегатов, амилоидоподобных и амилоидных фибрилл. Для возникновения таких контактов необходимо наличие гидрофобных участков полипептидной цепи, экспонированных растворителю. Поэтому амилоидогенная агрегация частично или полностью неупорядоченных белков более вероятна по

сравнению с глобулярными белками и изучение именно естественно неструктурированных белков представляет особый интерес в связи с изучением амилоидных заболеваний.

**Целью** нашей работы было выявление новых факторов, влияющих на агрегацию белков с естественно развернутой структурой. Особое внимание было уделено изучению таких воздействий, которые характерны для ситуации *in vivo*.

Для проведения исследований нами было выбрано два белка с частично развернутой структурой: овечий прион и казеины молока. Эти два объекта являются типичными представителями двух групп белков с развернутой структуры. Овечий прион относится к частично несвернутым белком (примерно половина последовательности). Казеины молока считаются малоструктурированными белками.

Выбор приона связан прежде всего с тем, что этот белок вовлечен в развитие ряда нейродегенеративных заболеваний (прионовые болезни и, согласно последним данным, болезнь Альцгеймера). Известно, что патологическая агрегация приона и его переход в амилоидную форму вызывают ряд прионовых заболеваний. Интерес к изучению казеинов обусловлен прежде всего тем, что некоторые из них, в частности,  $\kappa$ -казеин, в определенных условиях также способны к образованию амилоидных фибрилл. Таким образом, казеины являются простой, удобной и, главное, доступной модельной системой для исследования агрегации неструктурированных белков.

Сравнение особенностей агрегации двух групп белков интересно еще и по той причине, что эти белки содержат протяженные гидрофобные области, взаимодействие между которыми может приводить к формированию мицелл. Хорошо известно, что  $\beta$ -казеин формирует мицеллы в нативном состоянии,

однако взаимосвязь агрегации, амилоидогенной трансформации и мицеллообразования для казеинов изучена мало, а данные о такого рода процессах для прионов отсутствуют. Необходимость изучения этих аспектов агрегации двух групп белков было одной из причин выбора данных объектов.

При изучении агрегации, амилоидогенной трансформации и мицеллообразования двух выбранных белков нами были использованы такие типы воздействий, которые, с одной стороны, могли бы иметь определенное физиологическое значение, а с другой, относились бы к малоизученным явлениям. По этим причинам, основное внимание было уделено роли образования дисульфидных связей в формировании амилоидных агрегатов и других агрегационных состояний. Особую роль эти исследования играют в связи с тем, что при ряде нейродегенеративных заболеваний в составе амилоидных структур были найдены белки, соединенные дисульфидными связями. Известно, что образование ковалентной дисульфидной связи внутри или между белковыми молекулами может приводить к значительным изменениям в структуре белка. В нашем же случае, когда значительная часть последовательности белка обладает гибкостью и подвижностью, образование дисульфидных связей должно приводить к «обездвиживанию». Из казеинов только  $\alpha$ S2- и  $\kappa$ -казеины имеют в своей последовательности остатки цистеина, и в нативном состоянии они преимущественно участвуют в образовании дисульфидных связей. В составе приона есть два остатка цистеина, но они не участвуют в формировании межмолекулярных комплексов, так как образуют внутримолекулярную дисульфидную связь. Эта связь трудно доступна и не разрушается при действии небольших концентраций восстанавливающих агентов. Таким образом, в нашей работе мы предполагали исследовать влияние образования дисульфидных связей на структуру и агрегацию естественно развернутых белков. На начальном этапе работы для исследования влияния единичной дисульфидной связи



использовали мутанты  $\beta$ -казеина со вставкой цистеинов на периферийных участках молекулы. Затем, для выяснения возможного физиологического значения образования дополнительных дисульфидных связей, мы использовали модификацию казеинов и приона гомоцистеинтиолактоном, присутствующим в клетках при определенных патологических состояниях. В случае приона мы прежде всего предполагали выяснить, приводит ли гомоцистеинилирование, которое может происходить в физиологических условиях, к агрегации приона по амилоидному типу.

В случае прионов мы решили исследовать также влияние фосфолипидов на их агрегацию и амилоидогенную трансформацию. Этот тип воздействия нами был выбран прежде всего потому, что амилоидогенная трансформация прионов, закрепленных *in vivo* с помощью гликофосфолипидного якоря на наружной мембране клеток, прионов может зависеть от фосфолипидного окружения.

Перед нами стояли следующие *задачи*:

- Исследовать влияние образования дисульфидных связей на мицеллизацию и структуру казеина;
- Исследовать амилоидогенную агрегацию приона под действием фосфолипидов;
- Исследовать влияние образования дисульфидных связей при гомоцистеинилировании на агрегацию казеинов и приона.

Следует отметить, что работа была выполнена в двух лабораториях, в лаборатории функциональных взаимодействий белков молока INRA (Nantes) были получены препараты используемых белков, также выполнены исследования по димеризации и мицеллизации мутантов  $\beta$ -казеина и часть работы, посвященная влиянию термоагрегации и фосфолипидов на

агрегацию приона. В лаборатории биохимии животной клетки ФХБ имени А.Н. Белозерского (Москва) проведена основная часть исследования эффекта гомоцистеинилирования на нативные казеины и прион.

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### *Механизм агрегации белков*

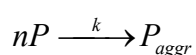
Процесс агрегации белков является популярным объектом исследований, так как агрегаты, как выяснилось недавно, являются одним из важных природных состояний белка (Fink, 1998, Horwich, 2002). Например, экспрессия рекомбинантных белков ведет к образованию так называемых тел включения, и выход получаемого белка снижается из-за его агрегации (Маркосян и Курганов, 2004). Также увеличение количества исследований, посвященных агрегации, было вызвано открытием особых белков - шаперонов, способных ее предотвращать. Их синтез увеличивается в случае теплового шока, вызывающего агрегацию белков клетки, а основная функция - обеспечение правильного сворачивания белков, фолдинга. Исследования, посвященные агрегации модельного белка в присутствии белка, ее предотвращающего, дают информацию как о самой агрегации, так и о механизмах работы шаперонов (Bumagina *et al.*, 2010, Khanova *et al.*, 2007, Khanova *et al.*, 2005, Markossian *et al.*, 2009, Markossian *et al.*, 2009).

Но основной причиной интереса к этому процессу является то, что накопление определенных белковых агрегатов в клетке ведет к развитию нейродегенеративных заболеваний. Такие типы агрегатов называют амилоидными, и они обладают сходной структурой даже несмотря на то, что они могут состоять из различных белков (Mazzola and Sirover, 2003).

Тепловая денатурация обычно сопровождается агрегацией белковых молекул. Такая агрегация является результатом взаимодействий между несвернутыми молекулами белка, ведущих к образованию агрегатов неправильной формы путем «неверных» слипаний. Денатурация белков сопровождается экспонированием гидрофобных остатков, то есть движущей силой агрегации являются гидрофобные взаимодействия.

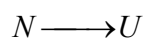
Белковые агрегаты обладают повышенной способностью к рассеиванию света по сравнению с исходными мономерами, поэтому за кинетикой агрегации белков удобно следить по изменению светорассеяния в видимой части спектра (Golub *et al.*, 2009). Согласно литературным данным, строгая пропорциональность между оптической плотностью и количеством агрегировавшего белка наблюдается только в стадии роста уже сформировавшихся агрегатов (Курганов, 2002).

Принято считать, что агрегация это необратимая реакция, в которую вступают  $n$  молекул неагрегировавшего белка:



где  $P_{aggr}$  – агрегированное состояние белка, а  $k$  – константа скорости  $n$ -ого порядка.

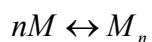
Для множества белков на кривой агрегации можно наблюдать период запаздывания. Это означает, что этап разворачивания предшествует стадии агрегации.



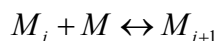
Где  $N$  – нативное состояние белка, а  $U$  – развернутое состояние белка с повышенной склонностью к агрегации.

К настоящему моменту охарактеризованы два возможных механизма роста агрегатов. Первый заключается в прилипании денатурированных молекул белка к сформировавшемуся агрегату. С помощью анализа кинетических кривых было показано, что существует стадия, когда мономер белка исчезает со скоростью, пропорциональной концентрации белка в 1 степени.

Этот процесс можно описать с помощью модели ассоциации белков, которая включает стадию формирования ядра ассоциации – этап нуклеации, а также две обратимых стадии: стадию нуклеации



( $M$  – мономер,  $M_n$  – ядро ассоциации) и стадию роста ассоциата:



С другой стороны, увеличение размера агрегатов происходит путем слияния уже сформированных.

В определенной степени форма кинетических кривых агрегации зависит от концентрации белка. Для белка оболочки вируса табачной мозаики было показано, что в зависимости от концентрации белка отличаются лимитирующие стадии (Rafikova *et al.*, 2003). Для относительно низких концентраций такой стадией является стадия роста агрегата, а для более высоких – стадия предшествующей денатурации белка. Интересно, что размер агрегатов не зависит от концентрации белка, что было продемонстрировано в случае алкогольдегидрогеназы (Курганов *et al.*, 2002).

Какие факторы могут влиять на процесс агрегации? Можно сказать, что к ним можно отнести все изменения в конформации белка, приводящие к экспонированию гидрофобных участков на поверхности белка. Например, изменение таких параметров среды, как рН, ионная сила или температура, могут провоцировать агрегацию белков. Часто, достаточно лишь небольшого изменения концентрации молекул, чтобы вызвать агрегацию. В случае патологических процессов агрегации, происходящих в живых клетках, изучение влияния различных параметров может дать важную информацию для понимания их механизмов.

### *Естественно развернутые белки*

В 1962 году Джон Коудери Кендрю вместе с Максом Перуцем за исследование структуры глобулярных белков были удостоены Нобелевской премии по химии. Кендрю обнаружил нечто, чего никто ранее не видел, - это была трехмерная структура молекулы белка во всей ее сложности. Наиболее поразительной особенностью этой молекулы была ее упорядоченность и полное отсутствие симметрии.

Сейчас все больше данных говорят о том, что существуют белки, не обладающие хоть какой-то упорядоченной структурой. Их называют «белками с разупорядоченной третичной структурой» (“intrinsically disordered proteins”, IDP). Анализ белковой базы данных Swiss Protein Database показывает, что более 15 тысяч белков из этой базы могут содержать неупорядоченные регионы с длиной более 40 аминокислотных остатков. Более тысячи из этих белков по предсказанию имеют высокий показатель неупорядоченности (Dunker *et al.*, 1998). Интересно, что в процессе эволюции эукариотические организмы «приобрели» больше IDP, чем прокариоты. Так, в исследовании Дункера с соавторами было изучено 29 геномов и показано, что более 30% эукариотических белков содержат неупорядоченные участки протяженностью более 50 аминокислотных остатков (Dunker *et al.*, 2001).

При использовании различных денатурирующих агентов или условий (таких, например, как температура) были определены четыре разные конформации глобулярных белков: нативная (полностью упорядоченная), расплавленная глобула ("molten globule") (Ptitsyn, 1995), ее предшественник – пред-расплавленная глобула ("pre-molten-globule state") (Ptitsyn, 1995, Uversky and Ptitsyn, 1996) и полностью развернутая конформация.

Расплавленная глобула характеризуется отсутствием выраженной кооперативно плавящейся третичной структуры, однако белок в этом состоянии продолжает сохранять глобулярную структуру, как было показано, например, на лактальбумине с использованием малоуглового рентгеновского рассеяния (Kataoka *et al.*, 1997). Кроме того, было установлено, что в состоянии расплавленной глобулы происходит увеличение гидродинамического радиуса на 15% по сравнению с нативным состоянием, что соответствует увеличению объема на ~50% (Uversky, 2002).

Белки в состоянии пред-расплавленной глобулы (или «перерасплавленной» глобулы, если анализировать не сворачивание белка, а обратный процесс – его разворачивание) обладают менее компактной структурой, чем белки в состоянии расплавленной глобулы, но более компактной, чем в развернутом состоянии. При сравнении с нативным состоянием, гидродинамический объем белков в состоянии «перерасплавленной» глобулы возрастает в 3 раза, а в полностью развернутом состоянии – в 12 раз (Uversky, 2002).

В состоянии «перерасплавленной» глобулы белки продолжают взаимодействовать с гидрофобным зондом ANS, однако слабее, чем в состоянии расплавленной глобулы (Ptitsyn, 1995). В данном состоянии уже не идет речь о глобулярной структуре белка, поскольку разрушается часть гидрофобных кластеров, связывавших ANS.

Четыре состояния белка различаются по степени неупорядоченности структуры и их можно достаточно легко отличить друг от друга, используя некоторые физико-химические методы, перечисленные ниже (Uversky, 2002):

- Кристаллография (участки, которые не разрешаются данным методом, являются неструктурированными).
- Гетероядерный ЯМР в нескольких измерениях.
- Круговой дихроизм (КД) в ближнем УФ.

- КД в дальнем УФ.
- Гидродинамические параметры, полученные с помощью гель-хроматографии, седиментационного анализа, вискозиметрии или динамического светорассеяния (ДЛС).
- Флуоресцентные характеристики белка.
- Повышенная доступность протеолизу.
- Иммунохимические методы (антитела на разные состояния белка).
- Дифференциальная сканирующая калориметрия (наличие или отсутствие кооперативных тепловых переходов на термограмме).

Применяя несколько из перечисленных выше методов и подходов, можно доказать наличие частично свернутых интермедиатов белка.

Остановимся кратко на терминологии, употребляемой для белков с частично или полностью неупорядоченной структурой. Термин «естественно денатурированный белок» (“natively denatured protein”) был введен Швирзом в 1994 году для того, чтобы отличать Тау белки, обладающие повышенной гибкостью и подвижностью углеродного скелета, от глобулярных белков с упорядоченной третичной структурой (Schweers *et al.*, 1994). Два года спустя в работе Вейнреба появился термин «естественно развернутый белок» (“natively unfolded protein”) для описания  $\alpha$ -синуклеина, представленного в растворе при физиологических условиях как развернутый белок (Weinreb *et al.*, 1996). Существуют также альтернативные термины – «внутренне деструктурированные белки» (“intrinsically unstructured proteins” (Wright and Dyson, 1999)) и “внутренне неупорядоченные белки» (“intrinsically disordered proteins” (Dunker *et al.*, 2001)). В случае синонимов следует проявлять некоторую аккуратность, т. к. термины «денатурированный» (denatured) и «неупорядоченный» (disordered) могут быть использованы как синонимы и описывать набор характеристических конформаций полипептидной цепи,



включающий конформации с разной степенью свернутости: расплавленная глобула, пред-расплавленная глобула и развернутая конформация. Термины «деструктурированный» (unstructured) и «развернутый» (unfolded) также являются синонимами, однако применяться они могут только в качестве характеристики отсутствия какой бы то ни было (или почти какой бы то ни было) упорядоченной структуры.

Отсутствие у белков выраженной упорядоченной структуры при физиологических условиях может отражать особенности их аминокислотной последовательности. Было установлено, что разупорядоченные области демонстрируют некоторые общие особенности первичной структуры, и более 15000 белков из белковой базы данных SwissProt наделены этими особенностями (Romero *et al.*, 1998). Одной из таких особенностей является наличие большого количества некомпенсированных зарядов при нейтральных рН и низкое содержание гидрофобных аминокислотных остатков (Gast *et al.*, 1995, Hemmings *et al.*, 1984).

В соответствии с определением Танфорда, молекула полимера обладает полностью разупорядоченной конформацией тогда, когда вокруг каждой отдельно взятой связи полимера возможно свободное вращение, свойственное для подобной связи в низкомолекулярном соединении. Результаты исследований белков в 6М гуанидингидрохлориде показали, что в этих условиях белки могут быть описаны, как не имеющие упорядоченной структуры (Uversky, 2002). Однако даже в таких условиях глобулярные белки сохраняют некоторое количество остаточной структуры, т.е. полипептидная цепь не достигает полностью развернутой конформации (Pappu *et al.*, 2000). Исходя из названия, белки с разупорядоченной структурой характеризуются отсутствием какой бы то ни было (или почти какой бы то ни было) упорядоченной структуры. Однако, учитывая вышесказанное (а именно то, что глобулярные белки даже в жестких

денатурирующих условиях не всегда достигают полностью развернутого состояния), возникает резонный вопрос: насколько развернуты IDP? В структурном аспекте IDP отличаются от глобулярных белков большим гидродинамическим радиусом, низким содержанием упорядоченной вторичной структуры и высокой внутримолекулярной подвижностью, что следует из данных, полученных с помощью КД, FTIR, ЯМР, ДЛС, гель-хроматографии и многих других методов. Однако данные ЯМР четко показывают, что IDP не образуют единую группу. Так, наряду с белками, не содержащими упорядоченной вторичной или третичной структуры, есть примеры белков, содержащих динамическую, подвижную структуру (в основном  $\alpha$ -спиральную или  $\beta$ -складчатую) и даже белков, содержащих упорядоченные части (Uversky, 2002).

Наиболее точной определяющей характеристикой конформационных состояний являются гидродинамические параметры. Зависимости гидродинамического объема от длины полипептидной цепи для разных состояний белка (нативное состояние, расплавленная глобула, пред-расплавленная глобула, белки, денатурированные 8М мочевиной или 6М гуанидингидрохлоридом, а также естественно разупорядоченные белки со структурой, подобной пред-расплавленной глобуле или с полностью неупорядоченной структурой) описываются линейными зависимостями и заметно отличаются одна от другой.

Денатурированная полипептидная цепь характеризуется довольно специфичной формой спектра КД в дальней ультрафиолетовой области. В области 200 нм (преимущественно неупорядоченные структуры и частично  $\beta$ -складки) наблюдается значительный отрицательный максимум молярной эллиптичности, а в области 222 нм (преимущественно  $\alpha$ -спирали) молярная эллиптичность приближается к нулю (Uversky *et al.*, 1999). Оказалось, что очень удобным способом для разделения IDP на подклассы является

построение зависимости молярной эллиптичности при 200 нм против молярной эллиптичности при 222 нм. Такого рода построение позволяет разделить белки на 2 дискретных поля, одно из которых содержит IDP в полностью развернутом состоянии (coil-like), а второе (PMG-like) – IDP в состоянии, подобном пред-расплавленной глобуле.

В.Н. Уверским был проведен подобный анализ 100 белков, относящихся к семейству IDP, из них для 23 белков были известны гидродинамические параметры. Оказалось, что для IDP в полностью развернутом состоянии значения молярной эллиптичности составляют  $[\theta]_{200} = -18900 \pm 2800$  град\*см\*дмоль<sup>-1</sup> и  $[\theta]_{222} = -1700 \pm 700$  град\*см<sup>2</sup>\*дмоль<sup>-1</sup>, в то время как в состоянии, подобном пред-расплавленной глобуле,  $[\theta]_{200} = -10700 \pm 1300$  град\*см\*дмоль<sup>-1</sup> и  $[\theta]_{222} = -3900 \pm 1100$  град\*см<sup>2</sup>\*дмоль<sup>-1</sup>. Эти данные были сопоставлены с результатами, полученными с использованием гидродинамических методов, для подтверждения предложенного способа разделения IDP на два подкласса (Uversky, 2002). Вывод, который можно сделать, используя подобное построение, говорит о том, что семейство IDP делится на группу с практически полностью денатурированной структурой (состояние, подобное полностью денатурированному состоянию глобулярного белка) и на группу с остатками вторичной или третичной структуры (состояние, подобное пред-расплавленной глобуле). Этот вывод подтверждается данными измерений гидродинамических параметров и данными ЯМР.

Функциональная роль IDP может быть связана с необходимостью пластичности молекулы белка для эффективного узнавания молекул-партнеров (Dunker *et al.*, 2001). Для некоторых IDP было показан переход из неупорядоченного состояния в упорядоченное в процессе функционирования (Dunker *et al.*, 2001). Представляется вполне возможным, что существование белков с разупорядоченной третичной структурой можно объяснить

выгодной подвижностью структуры во время перехода таких белков из неупорядоченного состояния в упорядоченное по сравнению с глобулярными белками (Dunker *et al.*, 1998, Dunker *et al.*, 2001, Romero *et al.*, 1998, Wright and Dyson, 1999). Среди выгод, которые могут обеспечить подобные особенности строения, можно выделить следующие:

- способность взаимодействовать с несколькими разными партнерами (Dunker *et al.*, 2001, Wright and Dyson, 1999);
- возможность обойти стерические ограничения при связывании с партнером и значительно увеличить область контакта по сравнению с белками, обладающими жесткой структурой (Dunker *et al.*, 2001, Meador *et al.*, 1992);
- точный контроль и простая регуляция термодинамики связывания (Dunker *et al.*, 2001, Wright and Dyson, 1999);
- повышенный уровень специфической макромолекулярной ассоциации (Dunker *et al.*, 2001);
- сниженное время жизни IDP в клетках и, следовательно, дополнительный механизм регуляции важных клеточных каскадов (Wright and Dyson, 1999).

В работе П. Томпы отмечается, что IDP не обладают энзиматической активностью, т.к. для ее проявления необходимо плотно свернутое состояние участков активного центра (Tompa, 2002). Автор выделяет 5 функциональных классов IDP:

- Энтропийные цепи. Например, линкерная область белка SNAP-25, выполняющая функцию объединения в белке.
- Эффекторы. Например, кальпаSTATIN, который ингибирует кальпаин при проведении сигналов, опосредованных ионами  $Ca^{2+}$ .
- «Мусорщики». Например, казеины, которые формируют кластеры, депонирующие кальций, и предотвращают сворачивание молока.

- «Сборщики». Например, кальдесмон, ускоряющий полимеризацию актина.

- Неупорядоченные участки белков, играющие определенную роль в различных регуляторных процессах (таких, как протеолитическое расщепление белков по этим участка или их фосфорилирование).

Следует, однако, отметить, что выделение ферментативного функционального класса все-таки вполне возможно, т.к. есть данные относительно лизоцима, у которого около половины молекулы является неупорядоченной, а также ДНК-топоизомеразы I, которая, как и лизоцим, принадлежит к семейству IDP. Не исключено, что со временем будут описаны и другие IDP, обладающие ферментативной активностью.

Особенности, которые демонстрируют белки с разупорядоченной третичной структурой, закладываются в их первичной структуре (Uversky, 2002). Было выяснено, что IDP содержат значительно большее количество пролина, лизина, серина, глутамина и глутаминовой кислоты, чем глобулярные белки. В то же время, содержание таких аминокислот, как триптофан, тирозин, фенилаланин, цистеин, изолейцин, лейцин и аспарагин, сильно снижено в IDP по сравнению с глобулярными белками (Tompa, 2002). Такого рода дисбаланс в аминокислотном составе как раз и объясняет отличия IDP от глобулярных белков. Анализ аминокислотного состава напрямую показывает, что IDP действительно содержат меньшее количество гидрофобных аминокислот. Следовательно, белковая глобула не стабилизируется гидрофобными взаимодействиями, а избыточный заряд еще сильнее дестабилизирует структуру подобных белков.

Таким образом, важным признаком IDP являются высокий заряд молекулы и относительно низкая гидрофобность; однако надо отметить, что именно эти их особенности обеспечивают некоторые дополнительные

свойства IDP, а именно способность предотвращать агрегацию различных белков-субстратов (Uversky *et al.*, 2000). Как указывалось выше, IDP содержат повышенное количество пролина и глутамина. Эти аминокислоты препятствуют образованию вторичной структуры, будь то  $\beta$ -складки или  $\alpha$ -спирали. Однако именно для белков с высоким содержанием пролина было показано формирование специфической вторичной структуры – левозакрученная полипролиновая спираль второго типа (ПП2) (Williamson, 1994). Подобная структура была описана для белка тау, синуклеина и казеина (Syme *et al.*, 2002). Данная конформация предпочтительна и важна для молекулярного узнавания, т.к. в ней отсутствуют внутривещечные водородные связи и она легко переходит в другие конформации. Кроме того, пролин довольно часто вовлекается в белок-белковые взаимодействия (Williamson, 1994). Однако, в этой «сильной стороне» IDP скрывается и немалая опасность, поскольку конформация ПП2 довольно легко переходит в  $\beta$ -складчатую структуру, а также склонна к образованию амилоидов (Wright and Dyson, 1999), что было показано, в частности, для белка тау (von Bergen *et al.*, 2000).

В завершение этого раздела обзора литературы следует отметить, что условия, при которых исследуются IDP, крайне важны, т.к. даже небольшие изменения состава среды могут приводить к значительным изменениям свойств белка. Так, например, протимозин  $\alpha$  и  $\alpha$ -синуклеин частично сворачиваются в присутствии ионов двухвалентных металлов ( $Zn^{2+}$ ) (Uversky, 2002, Uversky *et al.*, 2002). Подобные эффекты можно наблюдать при повышении ионной силы, изменении pH и т.д.

## *Агрегация, как причина прионных заболеваний*

Известна связь прионов и их агрегатов с хроническими нейродегенеративными заболеваниями, такими как скрейпи у овец, губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота, а также куру, болезнь Крейцфельда-Якоба, синдром Герстманна-Штройслера-Шейнкера и хроническая семейная бессонница у человека.

Прионные заболевания были известны с начала XVIII столетия и описаны одновременно, и как наследственные, и как инфекционные. К числу инфекционных заболеваний относятся такие болезни, как куру, скрейпи и губчатая энцефалопатия коров, тогда как синдром Крейцфельда-Якоба и синдром Герстманна-Штройслера-Шейнкера в большинстве случаев имеют наследственную основу. Сейчас известно, что большинство прионных болезней человека и животных имеют экзогенный и генетический компоненты, то есть иметь одновременно как наследственное, так и инфекционное происхождение (Покровский, 2004).

На данный момент все нейродегенеративные заболевания прионной природы являются неизлечимыми и, в конце концов, неминуемо ведут к смерти больного.

Прорыв в понимании природы данных заболеваний произошёл только в начале 80-х годов XX века, когда было установлено, что инфекционный агент, вызывающий эти нейродегенеративные болезни является белком PrP (Oesch *et al.*, 1985, Prusiner, 1994, Prusiner and DeArmond, 1991, Prusiner *et al.*, 1998). PrP является некрупным белком с молекулярной массой всего 23 кДа и длиной 254 аминокислотных остатка.

Функции белков PrP до конца не установлены. Некоторые исследователи указывают на способность PrP связывать ионы меди и других двухвалентных металлов (Aguzzi and Polymenidou, 2004). Высказываются

также предположения, что PrP может участвовать в сигнальных каскадах индукции апоптоза (Aguzzi and Polymenidou, 2004). У мышей, лишенных кодирующего этот белок гена (*PRNP*) не отмечено изменений в поведении и репродуктивной активности, вместе с тем на энцефалограмме проявляются нарушения долговременных потенциалов и дефекты в подавлении активности ГАВА-зависимых потенциалов. Кроме этого, у таких мышей описаны электрофизиологические изменения в области гиппокампа (Kawahara *et al.*, 2000).

В клетках PrP, как и большинство белков, синтезируется в виде предшественника, подвергающегося в последующем протеолитическому расщеплению и посттрансляционной модификации. В процессе созревания от белка предшественника PrP последовательно отщепляются N-концевая сигнальная последовательность и C-концевой гидрофобный сегмент, после чего присоединяется гликофосфатидилинозитол, который интегрируется в липидный бислой и выполняет функцию мембранного якоря PrP. Белок PrP может существовать в виде двух конформеров. PrP<sup>C</sup> – нормальный белок, и PrP<sup>Sc</sup> – его инфекционная форма. Попадая в организм, PrP<sup>Sc</sup> каким-то, ещё до конца не установленным образом, переводит постоянно присутствующий в норме в клетках и тканях PrP<sup>C</sup> в его инфекционную форму PrP<sup>Sc</sup>, а также увеличивает продукцию белка PrP в клетке (Sabuncu *et al.*, 2003). В результате этого происходит накопление патогенного PrP<sup>Sc</sup>, молекулы которого агрегируют, вызывая дегенерацию тканей мозга.

На настоящий момент пространственная структура неинфекционной формы PrP<sup>C</sup> подробно изучена, хотя, с момента открытия белка она долго оставалась нерасшифрованной. Низкий уровень экспрессии PrP в различных системах, а также его плохая растворимость долгое время делали невозможной расшифровку его пространственной структуры методом рентгеноструктурного анализа. В 1993-1995 гг. в лаборатории S.B. Prusiner



был проведён детальный анализ вторичной структуры прионов и их клеточных гомологов с применением инфракрасной и Фурье-спектроскопии. В этих ранних экспериментах было показано, что инфекционный PrP<sup>Sc</sup> отличается от нормального PrP<sup>C</sup> преобладанием  $\beta$ -структур (в PrP<sup>C</sup> они занимают всего 3% от общей длины последовательности, в то время как в PrP<sup>Sc</sup> на  $\beta$ -структурные участки приходится до 43%) (Huang *et al.*, 1994, Huang *et al.*, 1995). Использование данных ЯМР-спектроскопии позволило Z. Huang с соавт. (1995) (Huang *et al.*, 1995) достоверно показать, что до 43% последовательности PrP<sup>C</sup> представлено устойчивой  $\alpha$ -спиральной структурой. В последующие годы методом ЯМР спектроскопии были получены трёхмерные модели PrP<sup>C</sup> многих видов млекопитающих, в том числе и человека (Lysek *et al.*, 2005). К настоящему моменту методом рентгеноструктурного анализа получены пространственные структуры с высоким разрешением некоторых прионных белков (Haire *et al.*, 2004, Knaus *et al.*, 2001, Sawaya *et al.*, 2007).

На Рисунке 1 представлены современные данные о пространственной организации прионных белков. Структура PrP<sup>C</sup> млекопитающих сильно консервативна и представлена двумя принципиально различающимися структурными доменами: N-концевым – неструктурированным (остатки 23 - 128), и C-концевым, обладающим стабильной вторичной и третичной структурами (остатки 134 - 231) (Riek *et al.*, 1997). В состав неструктурированного N-концевого домена входят два консервативных участка последовательности. Первый состоит из октапептидных повторов (51 - 90) (Riek *et al.*, 1997). Предполагается, что этот мотив участвует в известном для прионных белков взаимодействии с ионами меди, а также возможно вовлечён в процесс конверсии и образования амилоидных структур (Brookes, 1999). Второй участок представляет собой высоко консервативный гидрофобный кластер (111-134).

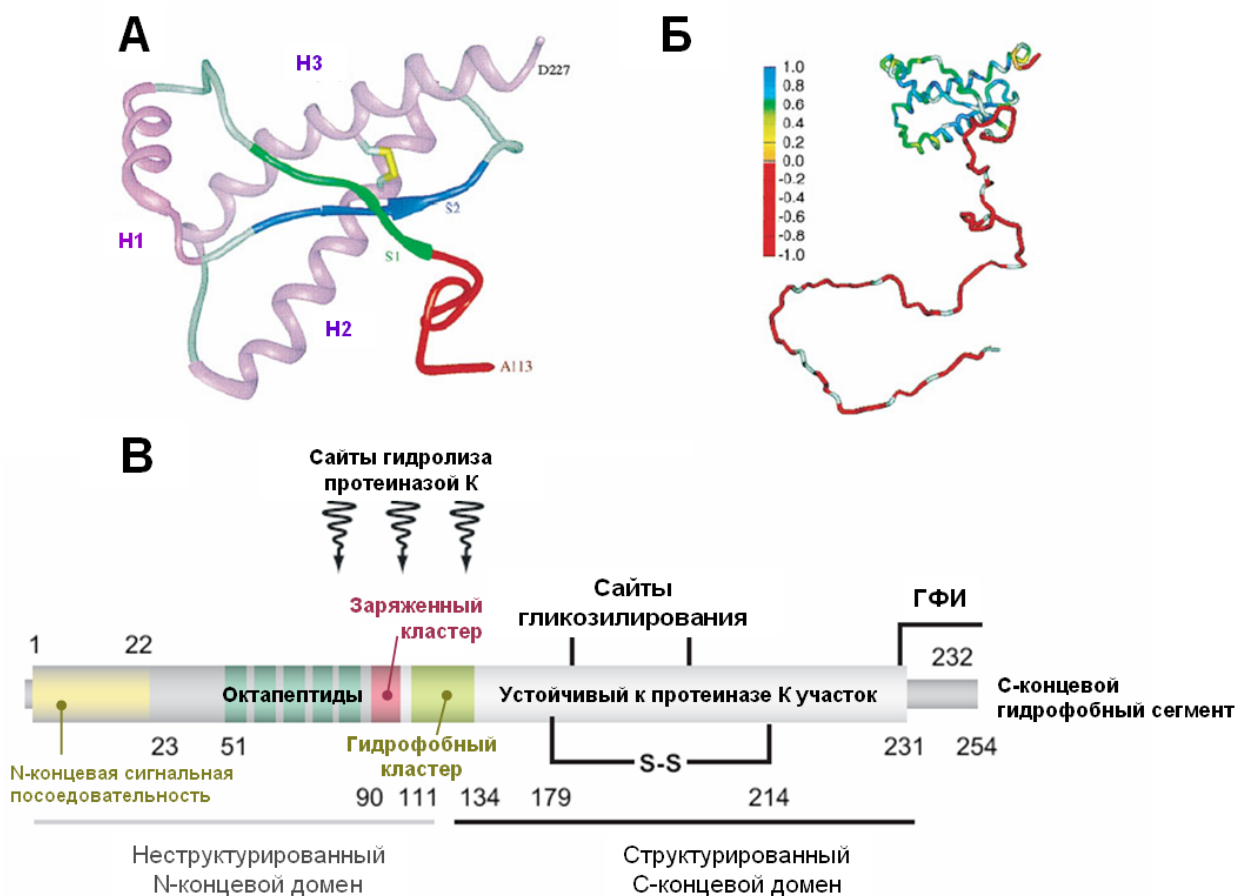


Рис. 1 Структуры прионных белков (Aguzzi *et al.*, 2008, Prusiner, 1998)

**А.** Структура  $\alpha$ -спиральной неинфекционной формы рекомбинантного PrP (90 - 231) сирийского хомячка по данным ЯМР спектроскопии. Отмечены  $\alpha$ -спирали H1, H2 и H3,  $\beta$ -тяжи S1 и S2. Между спиралями H2 и H3 обозначена дисульфидная связь (Cys179 – Cys214). Красным цветом обозначен консервативный гидрофобный участок.

**Б.** Схематичное изображение строения молекулы PrP(29-231). Участок белка представленный остатками 90 – 231 построен по координатам структуры с рисунка (А). Остальная последовательность (29 – 90) достроена вручную, исключительно в целях иллюстрации. Цветом обозначен уровень подвижности структуры. Синим – наиболее стабильные участки, красным – наиболее подвижные.

**В.** Схема первичной структуры PrP. На схеме обозначены положения основных характерных консервативных сайтов в последовательности прионного белка и участки его посттрансляционных модификаций.

Изначально предполагалось, что эта область является трансмембранным доменом, однако в настоящее время это утверждение остаётся спорным (Aguzzi *et al.*, 2008).

Структурированный С-концевой домен представлен тремя  $\alpha$ -спиралями (Н1, Н2 и Н3), и небольшим антипараллельным  $\beta$ -листом. Последний образован двумя  $\beta$ -тяжами S1 и S2, которые по своему положению в последовательности лежат по разные стороны от первой  $\alpha$ -спирали Н1. Тяж S2 и  $\alpha$ -спираль Н2 соединены длинным петлевым участком, который обладает крайне высокой тепловой подвижностью. Согласно некоторым предположениям (Vujdoso *et al.*, 2005, Gossert *et al.*, 2005), эта петля также играет значительную роль в процессе конверсии PrP в его инфекционную форму. Вторичная структура С-концевого домена в значительной степени подвижна и сильно зависит от pH, температуры, ионной силы и других условий среды (Huang *et al.*, 1994, Huang *et al.*, 1995, Prusiner, 1994, Prusiner, 1998). Наиболее стабильными в отношении вторичной структуры являются два последних  $\alpha$ -спиральных участка Н2 и Н3, связанные между собой дисульфидным мостиком.

Из ранних работ по анализу вторичной структуры прионов (Huang *et al.*, 1994, Huang *et al.*, 1995) известно, что при переходе из неинфекционной в инфекционную конформацию PrP утрачивает первый  $\alpha$ -спиральный участок Н1, который полностью переходит в  $\beta$ -структуру. Также в ряде экспериментов по получению укороченных прионных белков были установлены границы амилоидогенного участка приона, который, видимо, целиком принимает участие в формировании  $\beta$ -структурного мотива (приблизительно 88-145 остатки) (Ghetti *et al.*, 1996, Kaneko *et al.*, 2000, Kitamoto *et al.*, 1993, Supattarone *et al.*, 1999). Однако до настоящего времени пространственная организация инфекционной формы прионов PrP<sup>Sc</sup> всё ещё остаётся неизвестной. Полная нерастворимость агрегатов PrP<sup>Sc</sup> делает

невозможной расшифровку их пространственной структуры ни одним существующим на данный момент методом (Govaerts *et al.*, 2004).

Тем не менее, в последние годы начала появляться информация, касающаяся некоторых подробностей структуры амилоидных агрегатов PrP<sup>Sc</sup>. Всё больше новых данных свидетельствуют о том, что амилоидные фибриллы различных амилоидогенных белков, скорее всего, представлены параллельными  $\beta$ -структурами (Der-Sarkissian *et al.*, 2003, Petkova *et al.*, 2002). Так же стало известно, что в амилоидных фибриллах PrP<sup>Sc</sup>  $\beta$ -тяжи ориентированы перпендикулярно оси фибриллы (Dobson, 2001, Sunde *et al.*, 1997).

Недавно в лаборатории Prusiner *et al.* (Govaerts *et al.*, 2004) была предложена модель, согласно которой амилоидная фибрилла PrP<sup>Sc</sup> представляет собой трёхгранную структуру, состоящую из трёх левозакрученных параллельных  $\beta$ -спиралей. Отдельные мономеры PrP<sup>Sc</sup> свёрнуты подобно белкам представителям семейства бактериальных трансфераз и представлены двумя доменами:  $\beta$ -структурным, и  $\alpha$ -спиральным (Рис. 2). В-структурный домен представляет собой короткую правозакрученную  $\beta$ -спираль, образованную фрагментом цепи (89-174). Данный участок соответствует участку неструктурированного N-концевого домена PrP<sup>C</sup>, включающему в себя гидрофобный кластер, а также первому  $\alpha$ -спиральному участку H1 и обоим  $\beta$ -тяжам S1 и S2 C-концевого домена.  $\alpha$ -спиральный домен представлен спиралью H2 и H3, соединёнными дисульфидной связью, не претерпевшими никаких серьёзных конформационных перестроек.

Подобно вышеупомянутым представителям семейства бактериальных трансфераз, мономеры PrP<sup>Sc</sup> могут тримеризоваться, контактируя боковыми сторонами  $\beta$ -спиральных доменов. В свою очередь, тримеры, стыкуясь друг с другом основаниями  $\beta$ -спиральных доменов, соединяются в фибриллу,

подобно монетам в стопке. В-спиральные домены образующих её тримеров сливаются в три непрерывные  $\beta$ -спирали, представляющие собой её структурную основу. Несмотря на то, что окончательно подобная модель организации амилоидной фибриллы прионных белков не является доказанной, она хорошо согласуется с данными, полученными методами электронной микроскопии, ЯМР-спектроскопии и рентген-структурных исследований.

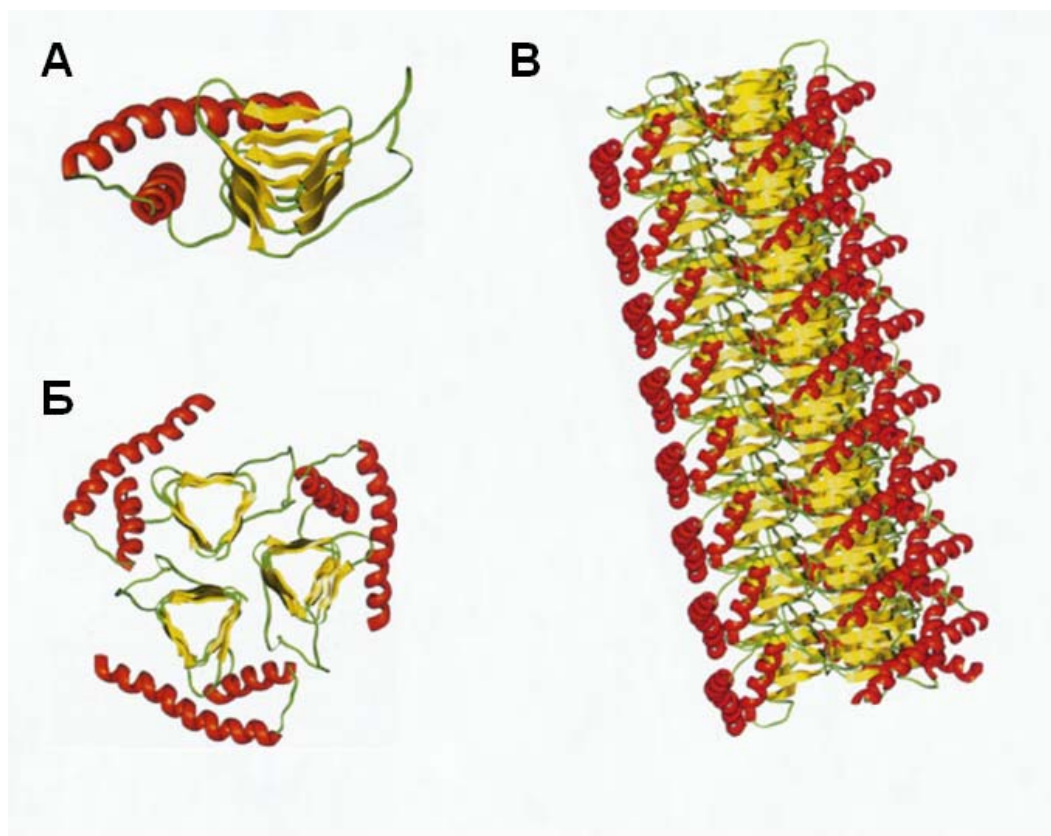


Рис. 2 Гипотетическая модель строения амилоидной фибриллы PrP (Govaerts *et al.*, 2004)

**А.** Предполагаемая пространственная структура инфекционного мономера укороченного мутантного PrP. Участок, соответствующий остаткам 89 – 174, формирует левозакрученную " $\beta$ -спираль" (показано желтым цветом).  $\alpha$ -спиральные участки Н2 и Н3 не претерпевают значительных конформационных изменений.

**Б.** Предполагаемая структура тримера PrP<sup>Sc</sup>

**В.** Предполагаемая структура амилоидной фибриллы PrP<sup>Sc</sup>

Так же, до сих пор является невыясненным и механизм конверсии нормального белка в его инфекционную форму. В работах большого числа исследователей на протяжении последних 15-ти лет высказывалось множество гипотез относительно механизма конверсии PrP и организации инфекционного агента PrP<sup>Sc</sup>. Для удобства их рассмотрения стоит выделить три основных направления, к которым, по сути, сводятся все остальные: 1) модель матричной сборки (template assembly) 2) гетеродимерная модель (heterodimer, or templatedirected refolding model) (Gajdusek, 1988, Prusiner and DeArmond, 1990), и 3) модель некаталитической нуклеации (noncatalytic nucleated polymerization model, NNP) (Come *et al.*, 1993).

Согласно **модели матричной сборки** (рис 3, А), инфекционным агентом является зародыш амилоидной фибриллы PrP<sup>Sc</sup>, с которым взаимодействуют нормальные или частично развёрнутые формы клеточного PrP. После связывания фибриллы с молекулой прионного белка в нём происходят структурные изменения, в результате чего он сам переходит в инфекционную форму и становится частью растущей фибриллы (Kelly, 2000).

**Гетеродимерная модель** (рис. 3, Б) утверждает, что PrP<sup>Sc</sup> связывается с нормальным клеточным PrP<sup>C</sup> или с частично развёрнутой формой PrP\*, образуя гетеродимер. В образовавшейся паре PrP\*-PrP<sup>Sc</sup>, PrP<sup>Sc</sup> направляет сворачивание частично развёрнутого PrP\* по пути образования себе подобного β-структурно насыщенного белка. Вновь образованный после такого взаимодействия PrP<sup>Sc</sup> в свою очередь может сам выступать в качестве катализатора конверсии PrP\* в инфекционную форму. Возможным источником частично развёрнутых интермедиатов фолдинга PrP\* многие исследователи считают молекулярные шапероны (Aguzzi *et al.*, 2008). Согласно этой гипотезе в процессе конверсии важна кинетическая составляющая. Высокий активационный барьер в норме не позволяет

происходить этому процессу спонтанно со сколь-либо заметной скоростью. Образование гетеродимерного комплекса понижает энергию активации на пути к образованию нового PrP<sup>Sc</sup>, увеличивая скорость конверсии.

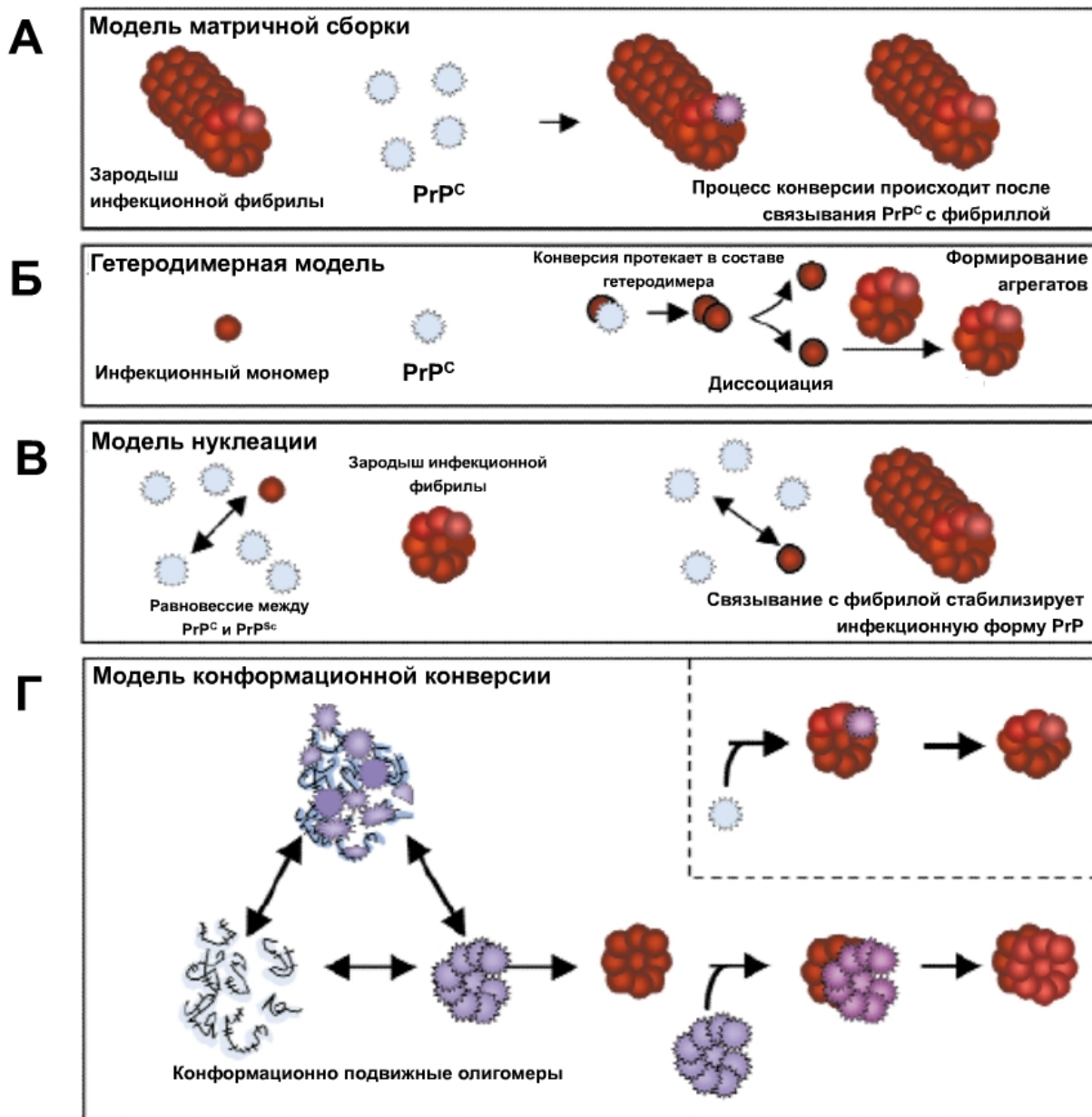


Рис. 3. Четыре основные модели конверсии прионных белков (Kelly, 2000)

Напротив, **модель некаталитической нуклеации** (рис. 3, В) предполагает, что в процессе конверсии решающей является термодинамическая составляющая. В рамках этой гипотезы, переход из PrP<sup>C</sup> в PrP<sup>Sc</sup> является обратимым, однако равновесие сильно смещено в сторону образования PrP<sup>C</sup>. Инфекционный PrP<sup>Sc</sup> может стабильно существовать только в виде строгоупорядоченных агрегатов. Появление в системе небольшого фрагмента такого агрегата запускает процесс присоединения к нему спонтанно образующихся мономеров PrP<sup>Sc</sup>, а это в свою очередь приводит к сдвигу динамического равновесия в сторону образования новых инфекционных форм. Таким образом, в рамках этой гипотезы инфекционным агентом выступают фрагменты амилоидных фибрилл PrP<sup>Sc</sup>.

Отдельного внимания заслуживает также альтернативная модель, недавно предложенная Jeffery W. Kelly (Kelly, 2000) (рис. 3 Г), основанная на исследованиях кинетики конверсии прионного белка дрожжей sup35. Решающую роль в процессе конверсии W. Kelly отводит формированию некрупных олигомерных интермедиатов. Согласно предложенной модели структурно подвижные некрупные агрегаты прионных белков в определённых условиях способны либо спонтанно образовывать в себе ядра – зародыши амилоидной структуры (в случае спонтанного процесса конверсии), либо связываясь с уже существующей амилоидной структурой, претерпевать конформационные перестройки и становиться частью растущей фибриллы. Лимитирующей стадией этого процесса может быть как образование структурно подвижных олигомеров так и их взаимодействие с упорядоченным β-структурным зародышем, и меняться в зависимости от условий (например, концентрации белка или ионной силы раствора). Автор предполагает, что подобные олигомерные агрегаты могут представлять собой мицеллоподобные структуры.



Несмотря на то, что модель W. Kelly основана на исследованиях дрожжевого прионного белка, её основные положения могут быть экстраполированы и на прионный белок млекопитающих PrP. Так в группе H. Rezaei при нагревании овечьего PrP в кислых условиях были получены 2 типа олигомерных агрегатов (Eghiaian *et al.*, 2007, Rezaei *et al.*, 2005), для которых методом малоуглового рассеивания было установлено, что они являются 12-ти и 36-ти мерами PrP. Кратность количества мономеров в таких агрегатах 3-м довольно неплохо согласуется с моделью амилоидной фибриллы PrP, предложенной Prusiner.

В более поздней работе было установлено, что при переходе PrP в олигомеризованное состояние происходит частичная денатурация упорядоченного С-концевого домена прионного белка: утрачивается первый  $\alpha$ -спиральный участок H1, и разрушаются водородные контакты, соединяющие тяжи S1 и S2, сильные конформационные изменения претерпевает петля, соединяющая S2 и H2. Тесты с тиофлавином T демонстрируют повышенное содержание  $\beta$ -структур в таких агрегатах по сравнению с нативным PrP. Для крупных агрегатов при повышении их концентрации показана возможность их трансформации в амилоидные фибриллы.

Существует ряд работ, в которых высказывается предположение, что различные молекулярные шапероны, в норме предназначенные для правильного сворачивания белков и предотвращения их агрегации, могут участвовать в развитии прионных заболеваний (Bukau and Horwich, 1998, Carrell and Lomas, 1997). Актуальным и нерешенным является вопрос о том, как прионо- амилоидогенные белки избегают действия протеаз и шаперонов. Предполагается, что либо в процессе фолдинга таких белков образуются структуры, не узнаваемые шаперонами, либо агрегация амилоидных форм белков происходит значительно быстрее, чем процесс, в результате которого

они могли бы быть исправлены или деградированы (Wickner *et al.*, 1999). С другой стороны, свойство шаперонов стабилизировать интермедиаты фолдинга может способствовать процессу перехода нормального белка в его патогенную форму (Welch and Gambetti, 1998). Такая гипотеза впервые была высказана Prusiner *et al.* (Prusiner *et al.*, 1998) в качестве объяснения феномена наблюдавшегося в исследованиях Telling *et al.* (Telling *et al.*, 1994) по заражению трансгенных мышей человеческим PrP<sup>Sc</sup>. Мыши, экспрессирующие одновременно и мышиный, и человеческий прионные белки, оказывались устойчивыми к заражению человеческим PrP<sup>Sc</sup>, в то время как мыши, экспрессирующие только человеческий PrP<sup>C</sup> были восприимчивы к заражению. Из этих результатов следовало, что присутствие мышинного PrP<sup>C</sup> ингибирует переход PrP<sup>C</sup> человека в инфекционную форму. В качестве возможного объяснения Prusiner *et al.* (Prusiner *et al.*, 1998) предположил, что конверсия человеческого PrP в организме мыши, происходит посредством некоего мышинного белка X, являющегося, по-видимому, молекулярным шапероном. Белок X, вероятно, блокируется мышинным прионным белком, если таковой экспрессирован у мыши, поскольку мышиный PrP имеет более высокое сродство к мышиному белку X, чем человеческий прион. В результате чего, конверсия человеческого приона в его инфекционную форму оказывается невозможной.

Предположение, что белок X, участвующий в конверсии нормального прионного белка в его инфекционную форму, является молекулярным шапероном, косвенно подтверждается нарушениями активации Heat-shock/stress ответа при высокой концентрации PrP<sup>Sc</sup> в клетке (Ptitsyn, 1995).

В популяции овец среди множества существующих однонуклеотидных полиморфизмов в гене *PRNP*, кодирующем прионный белок, только три полиморфизма имеют заметную фенотипическую выраженность. Эти

полиморфизмы проявляются в транслируемом белке в трёх позициях: 136, 154 и 171 (Рис.4.). В позиции 136 может стоять Ala или Val (A136V), в позиции 154 Arg или His (R154H), а в позиции 171 Gln, Arg или His (Q171R/H). В основном они встречаются в следующих комбинациях в виде 5-ти аллелей (из возможных 12-ти) именуемых соответственно ARQ, ARR, ANQ, ARH и VRQ. Особи, гомозиготные по аллелю ARR, практически полностью устойчивы к заражению скреппи, в то время, как гомозиготы по аллелю VRQ, напротив, в значительной степени восприимчивы к заражению.

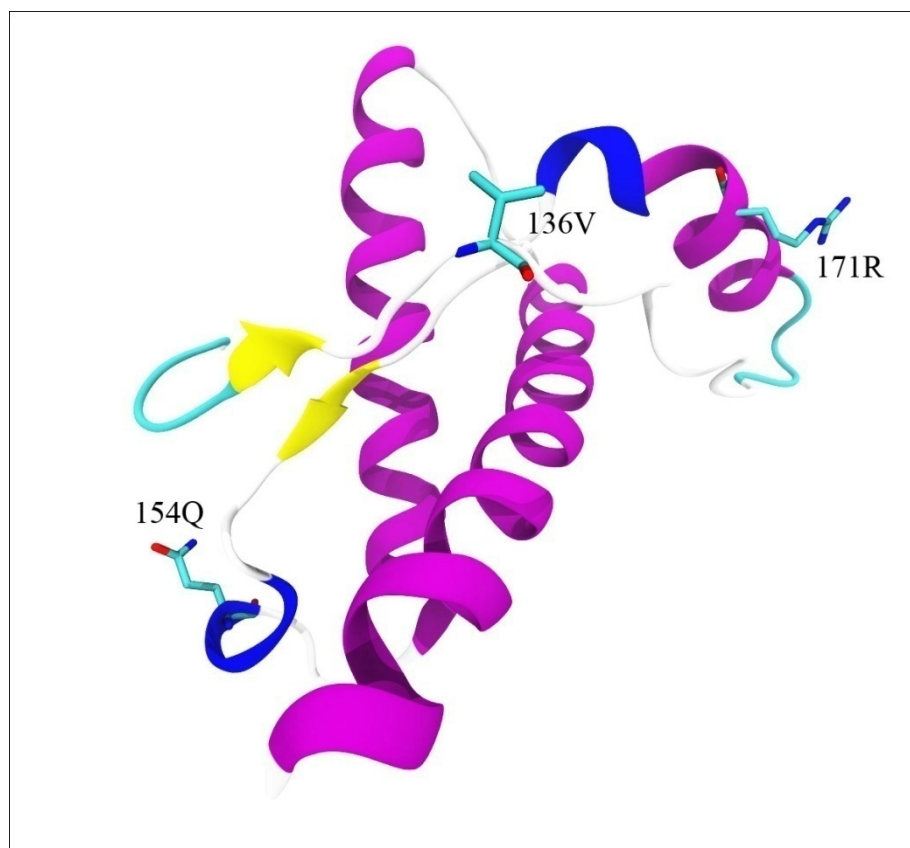


Рис. 4. Пространственная структура С-концевого домена PrP овец. Изображена скреппи-подверженная изоформа VRQ. Синим отмечены три фенотипически значимых полиморфизма.

Признак устойчивости к скрейпи наследуется по принципу неполного доминирования (Baylis and Goldman, 2004), что говорит о зависимости восприимчивости животного к скрейпи от соотношения концентраций продуктов этих двух аллелей в клетках и тканях его нервной системы. Остальные аллели, ARQ, AHQ и ARH, ассоциированы с неполной восприимчивостью к скрейпи. В ряду ARR, AHQ, ARH, ARQ, VRQ восприимчивость к скрейпи возрастает, однако она также сильно зависит от штамма инфекционного PrP<sup>Sc</sup> (Baylis and Goldman, 2004).

Полиморфизмы, влияющие на восприимчивость к трансмиссивным энцефалопатиям, или на длительность их инкубационного периода, также были обнаружены в популяциях мышей и человека, однако стоит подчеркнуть, что только в популяции овец встречается аллель полной невосприимчивости к скрейпи, что делает овец уникальным объектом исследования механизмов лежащих в основе развития прионных заболеваний.

С точки зрения исследования механизмов патогенеза прионных заболеваний, представляется важным установить принципиальную разницу между этими двумя группами изоформ овечьего прионного белка. Поэтому, на данный момент, множество исследований направлено на выявление различий в физико-химических свойствах между этими изоформами и возможных отличий в механизме их конверсии в инфекционную форму (Bujdoso *et al.*, 2005, Rezaei *et al.*, 2002, Thackray *et al.*, 2004, Wong *et al.*, 2004).

Подробные сравнительные исследования аллельных вариантов прионного белка овец были проведены в национальном институте агрономических исследований, Франция.

В экспериментах E. Sabuncu *et al.* на культуре эпителиальных клеток Rov было показано, что клетки, экспрессирующие прион VRQ, после

добавления инфекционного PrP<sup>Sc</sup> начинали активную продукцию прионного белка, в то время как клетки, экспрессирующие ARR, никак не реагировали на заражение (Sabuncu *et al.*, 2003). Таким образом, одним из возможных объяснений механизма устойчивости носителей аллеля ARR к заражению скрейпи, может быть низкий уровень экспрессии приона ARR в ответ на появление в клетке инфекционного PrP<sup>Sc</sup>.

H. Rezaei *et al.* (Rezaei *et al.*, 2002) были детально изучены пути денатурации и рефолдинга четырёх изоформ прионного белка овец (VRQ, ARQ, AHQ и ARR) в широком спектре pH целым набором различных методов, включающих в себя дифференциальную сканирующую калориметрию, снятие спектров кругового дихроизма, исследование динамики образования  $\beta$ -структур по изменению флуоресценции тиофлавина Т. В этих исследованиях было показано, что в диапазоне pH от 4,5 до 6,0 денатурация и рефолдинг всех четырёх изоформ представляет собой одностадийный процесс, в то время как за пределами этого промежутка при температурах от 65 – 80°C наблюдается появление стабильных интермедиатов фолдинга.

Как ни странно, изоформы VRQ и ARQ, ассоциированные с восприимчивостью к скрейпи, демонстрировали большую термостабильность и более высокую энергию активации на пути к формированию интермедиатов фолдинга, чем AHQ и ARR, при всех значениях pH. Также, получаемые в этих экспериментах интермедиаты фолдинга различались по вторичной структуре. Интермедиаты VRQ и ARQ отличались преобладанием  $\beta$ -структур, в то время как интермедиаты AHQ и ARR по структуре представляли собой неупорядоченный клубок. При pH 4,0 изоформы, ассоциированные с восприимчивостью к скрейпи (VRQ и ARQ) демонстрировали более высокую скорость образования интермедиатов фолдинга, чем ассоциированные с устойчивостью (AHQ и ARR).

Охлаждение интермедиатов фолдинга до 20°C вызывало формирование амилоидных фибрилл, с высоким содержанием  $\beta$ -структур. Строение полученных фибрилл, содержание в них  $\beta$ -структур, а также скорость их образования были практически одинаковыми для всех четырёх аллельных вариантов.

В своей недавней работе Н. Rezaei *et al.* (Tsiroulnikov *et al.*, 2006) исследовали взаимодействие двух изоформ овечьего прионного белка VRQ и ARR с ионами меди и цинка. В этих экспериментах было показано, что оба прионных белка в комплексе с ионами меди формируют растворимые протеазорезистентные олигомеры с повышенным содержанием  $\beta$  структур. В присутствии ионов цинка VRQ и ARR образуют  $\alpha$ -спиральные растворимые олигомеры, тоже протеазорезистентные. Никаких отличий в поведении двух белков в этих опытах выявлено не было.

В другой аналогичной работе (Vujdoso *et al.*, 2005) была обнаружена заметная разница в интенсивности образования  $\beta$ -структур двумя вариантами VRQ и ARR при взаимодействии с ионами меди. Так прион ARR практически не претерпевал никаких заметных конформационных изменений, а для VRQ наблюдалось интенсивное образование  $\beta$  структур. Противоречивость этих данных может быть связана с тем, что исследователи проводили эти эксперименты при разных температурных условиях.

Несмотря на существование большого количества работ, в которых исследуются физико-химические характеристики разных аллельных вариантов приона овец при взаимодействии с различными индукторами агрегации, и актуальность такого рода исследований, ясного представления о том, чем и как вызывается спорадическая форма заболевания, на данный момент не существует.

## ***Структура и свойства казеинов***

Основные белки молока по структуре и функциям можно разделить на две основные группы:

- казеины, организованные в мицеллярную суспензию;
- растворимые сывороточные белки (альбумины и глобулины).

Сывороточные белки составляют 15-28% от всех белков коровьего молока, имеют более компактную структуру и большую устойчивость к действию протеаз по сравнению с казеинами, а также денатурируют при нагревании до 100°C. Эта группа включает  $\alpha$ -лактальбумин и  $\beta$ -лактоглобулин, сывороточный альбумин, иммуноглобулины, лактоферин, а также такие ферменты, как каталаза, плазмин, лизоцим, лактопероксидаза, щелочная фосфатаза, протеазы и липазы.

Казеиновая фракция (78% от белка молока) выпадает в осадок при закислении молока до pH 4,6. Коровье молоко содержит 4 типа казеинов ( $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$ ,  $\kappa$ ), кодируемых каждый своим геном. Гены казеинов объединены в общий регион на 6 хромосоме, организация которого достаточно консервативна (Ferretti *et al.*, 1990, Gallagher *et al.*, 1994). Для всех типов казеина описано множество генетических вариантов.

Три гена, кодирующих казеины со способностью связывать кальций ( $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$ ), произошли от общего предка через внутреннее и межгенное дублирование, а также обмен экзонов (Groenen *et al.*, 1993). В отличие от них, ген, кодирующий  $\kappa$ -казеин, не имеет такой эволюционной связи, но при этом имеет аналогичную схему экспрессии и необходим для образования мицелл.

Казеины секретируются клетками молочной железы. Все они синтезируются в виде предшественников, а сигнальный пептид отщепляется при переносе в комплекс Гольджи.

В натуральном молоке казеины формируют надмолекулярные структурные комплексы диаметром около 180 нм, называемые казеиновыми мицеллами.

Для казеинов можно выделить несколько общих характеристик, определяющих функциональные свойства:

высокая степень гидрофобности, причем гидрофильные и гидрофобные остатки расположены неравномерно;

наличие фосфосериновых кластеров (последовательность SerP-SerP-SerP-Glu-Glu) для фиксации фосфатами кальция;

высокое содержание равномерно расположенных пролинов, препятствующих сворачиванию в  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -слои приводит к естественно развернутой структуре.

#### *$\alpha$ S1-казеин*

$\alpha$ S1-казеин (Рис.5.) составляет около 40% от всей казеиновой фракции и представлен двумя формами. Они имеют одинаковую аминокислотную последовательность (Grosclaude *et al.*, 1973, Mercier *et al.*, 1971) и отличаются степенью фосфорилирования. Самый распространенный вариант В  $\alpha$ S1-казеина состоит из 199 аминокислот и имеет молекулярную массу порядка 23 кДа. Последовательность включает 8 фосфосерильных остатков, локализованных в области 43-80 а.о., причем в этом сегменте также располагаются 12 дополнительных карбоксильных группы. То есть в данной области пептидная цепь имеет значительный отрицательный заряд и сильно полярный характер. Пролиновые остатки распределены по всей цепи и, очевидно, это существенно мешает образованию упорядоченной структуры. Во вторичной структуре по данным Рамановской спектроскопии и моделирования преобладают  $\beta$ -повороты: 15% - альфа-спирали, 22% -  $\beta$ -слои,



45% -  $\beta$ -повороты (Byler *et al.*, 1988, Farrell *et al.*, 2001). То есть всего около 30% последовательности считают структурированной. Аминокислоты в области 100-199 преимущественно неполярны и, видимо, ответственны за склонность белка к ассоциации, которая, с другой стороны, ограничена силами отталкивания фосфатных групп. В присутствии ионов кальция, в концентрациях, характерных для молока,  $\alpha$ S1-казеин образует нерастворимую кальциевую соль.

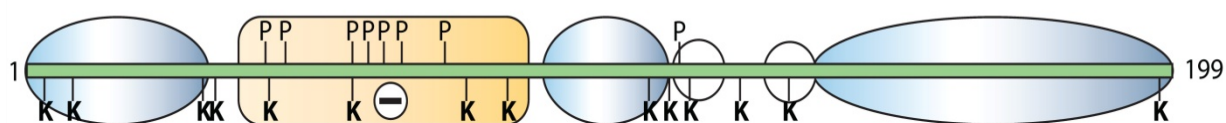


Рис.5. Структура  $\alpha$ S1-казеина. Гидрофобные области показаны овальными, полярные - прямоугольными. Фосфосерины и лизины в последовательности выделены.

#### *$\alpha$ S2-казеин*

Этот казеин составляет всего 8% от всей казеиновой фракции, состоит из 207 аминокислот имеет молекулярную массу около 25 кДа. Его последовательность, по сути, представляет собой "диполь", у которого в N-концевой части сосредоточены отрицательно заряженные группы, а в C-концевой - положительно заряженные. Он содержит 11 фосфосериновых остатков (Swaisgood, 1993) и 2 цистеина.  $\alpha$ S2-казеин способен преципитировать при еще более низких концентрациях кальция по сравнению с  $\alpha$ S1-казеином. Благодаря наличию двух цистеинов, этот казеин способен к образованию димеров (Rasmussen *et al.*, 1992).

## *β-Казеин*

$\beta$ -казеин (Рис.6.) составляет 45% от общего содержания казеинов (Farrell *et al.*, 2004). Наиболее распространенный вариант  $A^2$  состоит из 209 аминокислот и имеет молекулярную массу порядка 24 кДа. Он обладает средней гидрофобностью, при этом самой высокой по сравнению с другими типами казеинов. Его можно считать поверхностно-активным веществом вследствие наличия гидрофильной «головы» и гидрофобного хвоста, получающихся за счет распределения аминокислот.

N-концевой участок 1-41 очень гидрофилен и отрицательно заряжен, что объясняется в основном наличием 5 фосфосерильных остатков, локализованных в области 1-40 а.о. Участок 49-209, наоборот, очень гидрофобен и содержит большое количество нейтрально-заряженных аминокислот (Swaisgood, 1993). Это позволяет  $\beta$ -казеину ассоциировать с другими типами казеинов путем гидрофобных взаимодействий (Kumosinski *et al.*, 1993).

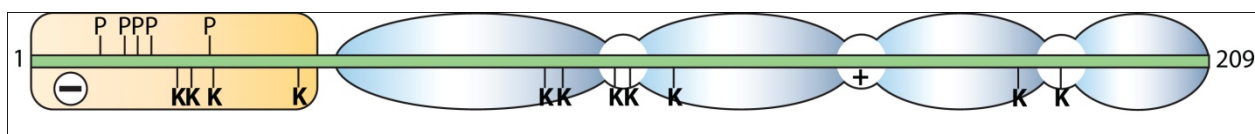


Рис.6. Структура  $\beta$ -казеина. Гидрофобные области показаны овальными, полярные - прямоугольными. Фосфосерины и лизины в последовательности выделены.

Исследователи Creamer *et al.* (Creamer *et al.*, 1981) и Caessens *et al.* (Caessens *et al.*, 1999) подтвердили с помощью различных методов структурного анализа, что  $\beta$ -казеин содержит небольшие в процентном отношении участки, организованные в виде  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев. Однако белок содержит относительно большое количество пролиновых остатков (35

из 209, т.е. 17%), достаточно часто образующих цепочки Pro-Pro или Pro-X-Pro, что приводит к многочисленным  $\beta$ -поворотам во вторичной структуре белка.

Таким образом можно сказать, что  $\beta$ -казеин является малоструктурированным белком, и можно предположить его способность, как реоморфного белка, к подстраиванию своей структуры к окружающим условиям (Livney *et al.*, 2004). Также  $\beta$ -казеин легко подвержен деградации при действии протеолитических ферментов.

Несмотря на то, что третичная структура этого белка еще неизвестна, можно предположить влияние многочисленных  $\beta$ -поворотов. Действительно, Kumosinski *et al.* (Kumosinski *et al.*, 1993) предложили модель, представляющую  $\beta$ -казеин в виде «краба с двумя клешнями». Эти «клешни» являются гидрофильными участками, образованными за счет полипролиновых кривых, с одной стороны, и за счет комбинаций  $\beta$ -слоев,  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -поворотов с другой стороны. Тело «краба» представляет собой достаточно жесткую гидрофобную структуру. Такая модель до сих пор остается гипотетической, хотя она хорошо согласуется с результатами многочисленных экспериментальных данных.

Гидрофобные взаимодействия играют первостепенную роль в структурировании и денатурации белков, равно как и в образовании белковых гелей. Химическое и нехимическое изменение параметров среды чрезвычайно сильно влияет на структуру белка. С другой стороны, конформационные преобразования белков и их способность к агрегации часто являются результатом образования новых дисульфидных связей. Образование и разрыв таких связей влияют на такие свойства белков, как способность к эмульгированию и пенообразованию (Okumura *et al.*, 1990). К тому же дисульфидные связи осуществляют присоединение типа белок-

белок, что приводит к образованию геля на поверхности раздела фаз вода/липиды.

Благодаря своим амфифильным свойствам,  $\beta$ -казеин обладает способностью к самоассоциации в форме мицелл. Такая ассоциация осуществляется за счет гидрофобных взаимодействий, с одной стороны, и электростатических связей, с другой (Horne, 1998).

Между  $\beta$ - и  $\alpha$ S1 казеинами возможно взаимодействие через кальциево-фосфатные мостики, вследствие сильной гомологии соответственно в участках 13-21 и 43-80, богатых фосфосеринами (Mercier *et al.*, 1971). Казеин  $\beta$  не имеет цистеинов в последовательности, в отличие от  $\alpha$ S2-казеина, который благодаря их наличию обладает способностью к димеризации в определенных условиях (Rasmussen *et al.*, 1992), а также к-казеина.

Предложены две модели формирования мицелл: эллипсоидной формы с сердцевинной из слабоуплотненных гидрофобных С-концевых участков с наружной «шевелюрой» из N-терминальных участков (Kajiwara *et al.*, 1988); и сферических мицелл с плотно упакованными самыми гидрофобными С-концевыми участками внутри (Leclerc and Calmettes, 1997).

### *к-Казеин*

Наиболее распространенный вариант В состоит из 169 аминокислот и имеет молекулярную массу около 18 кДа. Этот казеин имеет всего один остаток фосфосерина и 2 остатка цистеина (Рис.7.), реактивность цистеиновых остатков такова, что мономер можно обнаружить только в восстанавливающих условиях. В нативном состоянии к-казеин существует в форме тримера или более сложного олигомера, которые, по всей видимости, образуются за счет дисульфидных связей (Pepper and Farrell, 1982, Vreeman *et*

*al.*, 1977). Это единственный из казеинов, который гликозилирован, причем степень гликозилирования и состав гликозильных остатков неоднороден (Doi *et al.*, 1979, Pujolie *et al.*, 1966, Vreeman *et al.*, 1977, Woychik *et al.*, 1966). В среднем, в составе белка обнаруживается около 1% галактозы, 1,2% галактозамина, 2,4% N-ацетилнейраминовой кислоты, которые присоединены через 131, 133, 135 или 136 остатки треонина.

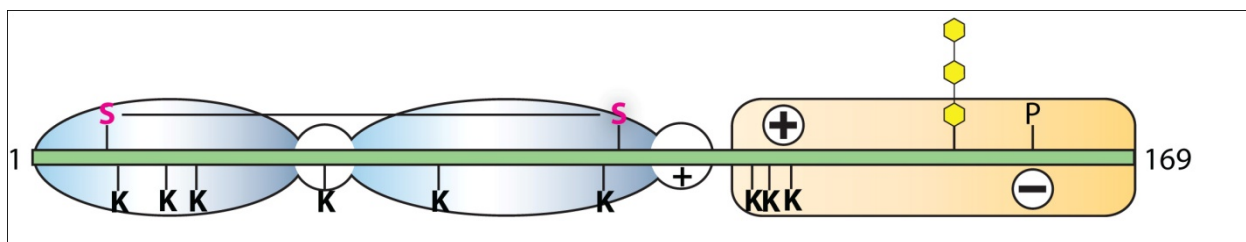


Рис.7. Структура к-казеина. Гидрофобные области показаны овальными, полярные - прямоугольными. Остатки фосфосеринов и лизинов в последовательности выделены.

При электрофоретическом разделении к-казеин разделяется на множество компонентов, которые имеют одинаковый аминокислотный состав, но отличаются по гликозилированию, то есть на одну молекулу белка может приходиться 0-3 моль N-ацетилнейраминовой кислоты, 0-4 моль галактозы и 0-3 моль галактозамина. Один из возможных вариантов гликозилирования показан на Рис. 8. В двух других вариантах гликозилирования отсутствует по одному остатку сиаловой кислоты в каждом случае.

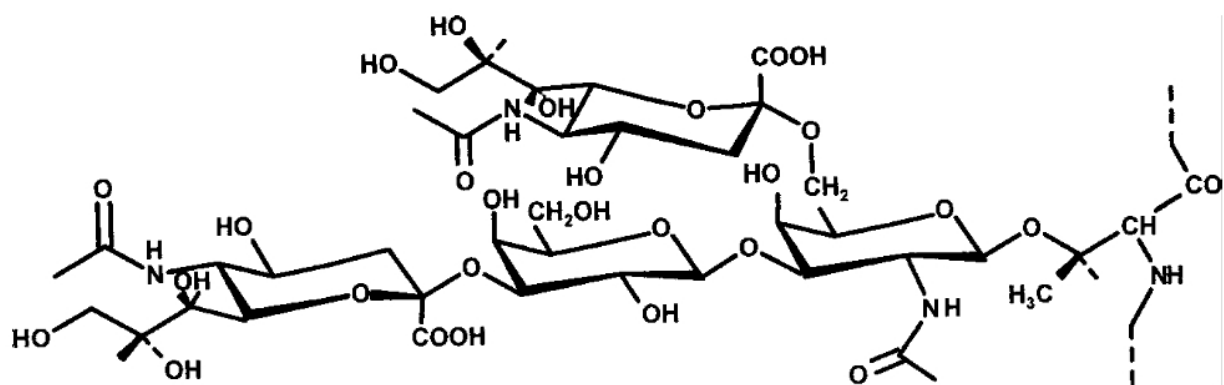


Рис.8. Пример углеводной цепи к-казеина.

к-казеин является единственным из казеинов, который остается растворимым в присутствии существующих в молоке концентраций ионов кальция. Таким образом, он предотвращает коагуляцию  $\alpha$ S1- и  $\beta$ -казеинов, формируя вместе с ними стабильные комплексы и мицеллы.

Некоторые свойства используемых в данной работе  $\alpha$ S1-,  $\beta$ - и к-казеинов собраны в Таблице 1.

Таблица 1. Краткая характеристика казеинов

		$\beta$ -казеин	$\alpha$ S1-казеин	$\kappa$ -казеин
Мол. масса, кДа		24	23	19
Длина, а.о.		209	199	169
pI		5.13	4.91	5.93
Коэффициент гидрофобности, кДж/моль		6.82	4.48	4.69
Pro, доля		35 16%	17 8%	20 12%
Lys		11	14	9
Cys		-	-	2
Trp		1 (Trp 157)	2 (Trp 179, Trp 214)	1 (Trp 97)
Посттрансл. модиф.		<u>Фосфорилирование</u> - Ser 30, 32, 33, 34, 50, $\Sigma$ 5	<u>Фосфорилирование</u> - Ser 56, 61, 63, 79, 81, 82, 83, 90, 130, Thr 68, $\Sigma$ 10	<u>Фосфорилирование</u> - Ser 148, 170, $\Sigma$ 2 <u>О-гликозилирование</u> - Thr 142, 152, 154, 157, 163, 186, $\Sigma$ 0-4 <u>Пироглутамат</u> - Gln 22 <u>S-S связь</u> - 11-88
Вторичная структура	$\alpha$ -спираль	7-16%	13-22%	14-23%
	$\beta$ -слой	17-26%	7-20%	17-31%
	$\beta$ -поворот	15-31%	34%	14-24%
Функции		Играет важную роль в определении поверхностных свойств казеиновых мицелл	Определяет способность молока связывать и транспортировать фосфат кальция.	Стабилизирует образование мицелл, предотвращая преципитацию казеинов в молоке.

## Образование мицелл

Только 10% от всей казеиновой фракции находятся в состоянии мономеров. Их обычно называют сывороточными казеинами и их соотношение относительно постоянно. Основная доля казеинов формирует казеиновые комплексы и мицеллы. Основные факторы, влияющие на это равновесие, показаны на Рис.9.

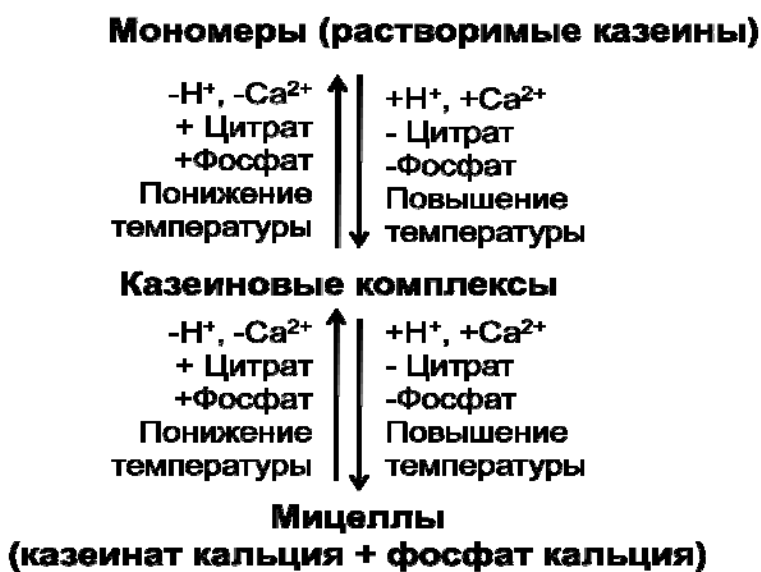


Рис.9. Факторы, влияющие на образование казеиновых комплексов и мицелл.

Диаметр казеиновых мицелл (Рис. 10.) в молоке варьирует от 50 до 300 нм, пик распределения частиц приходится на 150 нм (Banon and Hardy, 1992, Wade and Beattie, 1997). Если считать диаметр равным 140 нм, то объем мицеллы составляет  $1,4 \times 10^6$  нм<sup>3</sup>, а вес частицы будет порядка  $10^7$ - $10^8$  Да, что составляет порядка 25000 мономеров на мицеллу. Казеиновые частицы значительно меньше липидных глобул, диаметр которых составляет 0,1 - 10 мкм. Мицеллы не плотно упакованы и имеют переменную плотность, то есть скорее обладают пористой структурой.

Мономеры ассоциированы друг с другом за счет следующих факторов:



- Гидрофобные взаимодействия, ослабляющиеся при снижении температуры (минимальны при температуре ниже 5°C).

- Электростатические взаимодействия, в основном между кальцием или фосфатом кальция с фосфосериновыми и глутаматными остатками.

- Водородные связи.

Точная структура и организация казеиновой мицеллы до сих пор не определена, однако существует несколько моделей (Banon and Hardy, 1992, Morr, 1967, Shimmin and Hill, 1964, Waugh *et al.*, 1970).

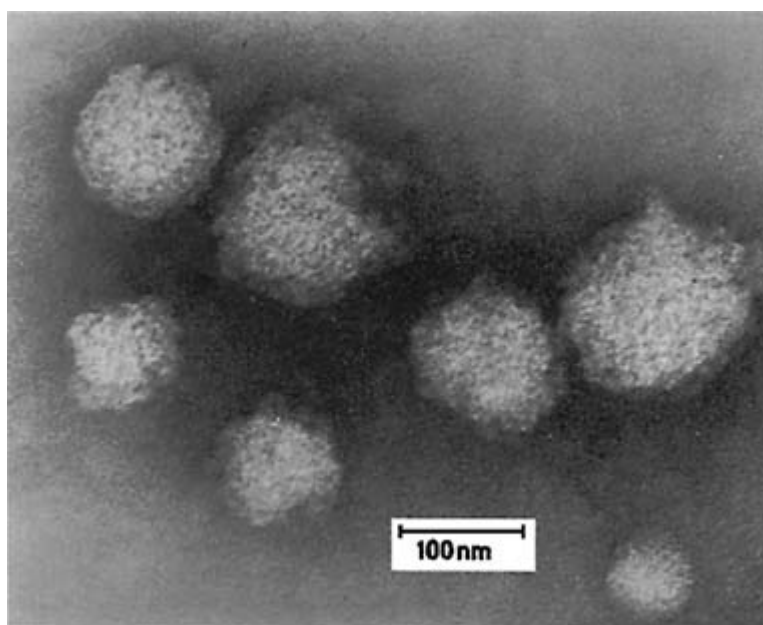


Рис. 10. Электронная микрофотография казеиновых мицелл в обезжиренном молоке (Цит. по Webb, 1974). Мицеллы зафиксированы глутаровым альдегидом и затем окрашены фосфомолибденовой кислотой.

## ***Гомоцистеинилирование как физиологическая посттрансляционная модификация белков***

### *Гомоцистеин, его свойства и метаболические превращения в клетке*

Гомоцистеин является природной небелковой аминокислотой, которая образуется в метаболических путях превращений серосодержащих соединений. Так, основной путь биосинтеза гомоцистеина происходит через деметилирование метионина. Существует три основных пути дальнейшего превращения гомоцистеина: реметилирование до метионина, вхождение в процесс синтеза цистеина и высвобождение во внеклеточную среду. Основные метаболические пути превращений гомоцистеина показаны на Рис. 11. Перенос метильных групп осуществляется во многих реакциях биосинтеза. Основным донором метильных групп является S-аденозилметионин, который при переносе метильной группы превращается в S-аденозилгомоцистеин. При гидролизе S-аденозилгомоцистеина ферментом S-аденозилгомоцистеингидролазой образуются гомоцистеин и аденозин.

Для реметилирования гомоцистеина метильная группа переносится с 5-метилтетрагидрофолата с помощью метионинсинтазы или 5-метилтетрагидрофолат-гомоцистеинметилтрансферазы, использующий витамин В<sub>12</sub> в качестве кофактора. Недавно был предложен еще один путь реметилирования гомоцистеина в метионин (Antonio *et al.*, 1997), включающий образование гомоцистеинтиолактона (Jakubowski, 1999). Одним из источников метионина, а, следовательно, и гомоцистеина, является высвобождающийся во многих случаях N-концевой метионин синтезирующихся белков.

Транссульфирование гомоцистеина в цистеин происходит при участии витамин В<sub>6</sub>-зависимой цистатионин-β-синтазы, которая катализирует конденсацию с серином до цистатионина. Это критический этап

метаболического пути, поскольку при физиологических условиях эта реакция необратима. На последнем этапе синтеза происходит расщепление цистатионина  $\gamma$ -цистатионазой, тоже витамин В<sub>6</sub>-зависимым ферментом, до цистеина и 2-оксобутирата.

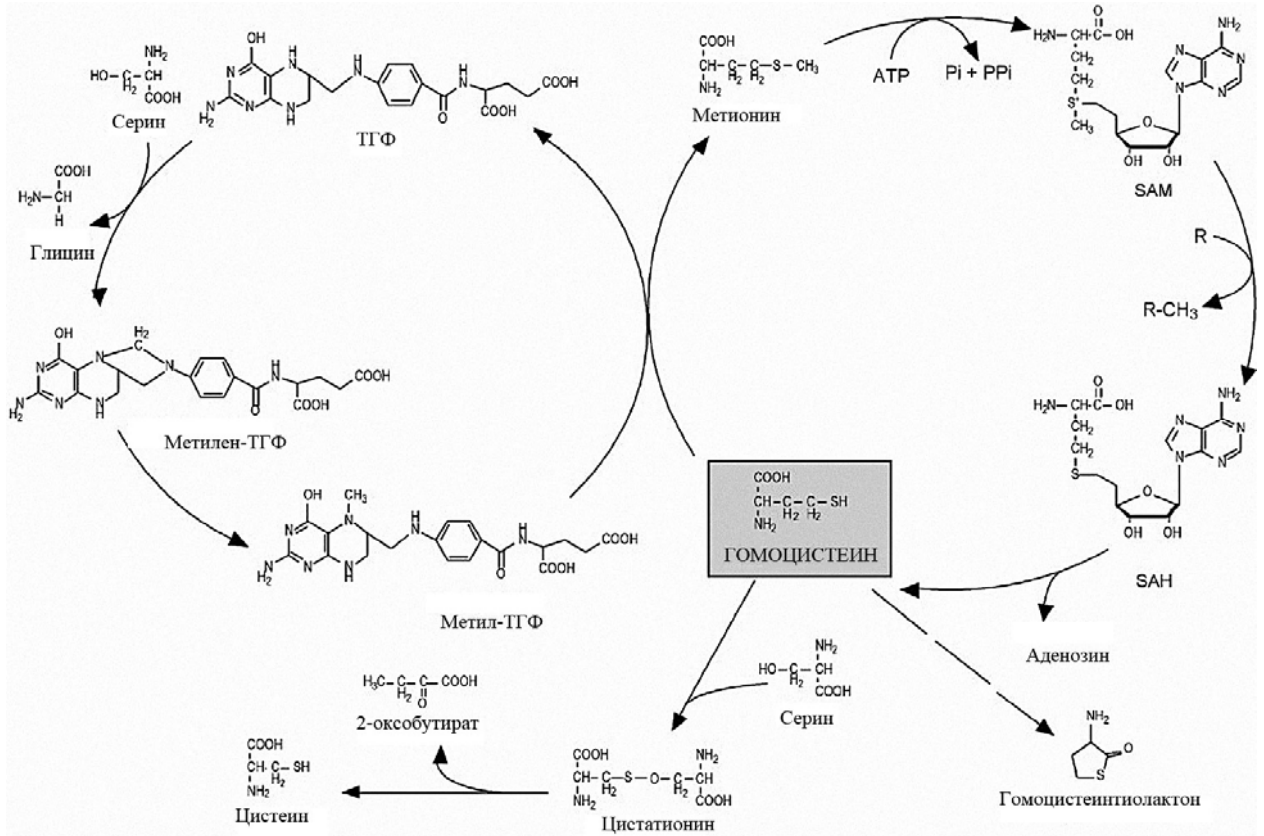


Рис. 11. Основные метаболические превращения гомоцистеина (Цит. по (Medina *et al.*, 2001))

### Гипергомоцистеинемия и ее роль в патологических процессах

Гипергомоцистеинемия является фактором риска для многочисленных патологий, включая сердечно-сосудистые заболевания (Anderson *et al.*, 2000, Cavalca *et al.*, 2001, Lawrence de Koning *et al.*, 2003, Spence *et al.*, 2005), инсульт (Yoo and Lee, 2001) и тромбозы (den Heijer *et al.*, 1996). Повышенный уровень гомоцистеина также играет роль при дефектах нервной трубки (Mills *et al.*, 1996), повышает вероятность развития осложнений при беременности (Kumar *et al.*, 2003, Nelen *et al.*, 1997) и коррелирует с развитием

нейродегенеративных болезней, таких как деменция, болезни Паркинсона и Альцгеймера (Mattson and Shea, 2003, Obeid and Herrmann, 2006, Seshadri, 2006).

Нормальный метаболизм гомоцистеина требует наличия витаминов В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>, поэтому дефицит этих витаминов приводит к гипергомоцистеинемии (Brosnan *et al.*, 2004).

В крови человека гомоцистеин присутствует в свободной или связанной с белком форме. Основная фракция гомоцистеина в крови это гомоцистеин, связанный с остатками лизинов белков крови, доли ассоциированного с гемоглобином и альбумином составляют 75 и 22%, соответственно, из общего гомоцистеинилированного белка в крови человека (Jakubowski, 2006). Небольшое количество гомоцистеина находится в свободной восстановленной форме, также обнаруживаются дисульфиды, гомоцистин и цистеинилгомоцистеин (Mudd *et al.*, 2000). Гомоцистеинтиолактон, другой метаболит гомоцистеина, составляет порядка 0,29% от всего гомоцистеина в плазме и 28% в моче.

Уровень гомоцистеина в плазме определяется рядом факторов, таких как недостаток витаминов группы В и фолатов, генетические дефекты метаболизма гомоцистеина, половые и гормональные особенности, старение, диабет, почечная недостаточность, токсические воздействия, связанные с курением. Концентрация гомоцистеина в плазме здорового взрослого человека находится в пределах 5-15 мкМ. В настоящее время принято деление гипергомоцистеинемии на умеренно выраженную (содержание Нсу в сыворотке от 16 до 30 мкмоль/л), средней выраженности (31 – 100 мкмоль/л) и тяжелую (Нсу более 100 мкмоль/л).

Концентрация гомоцистеина в сыворотке крови является ранним и чувствительным маркером нарушений умственной деятельности. (Gottfries *et al.*, 1993) Показано, что у больных со старческой деменцией и болезнью

Альцгеймера концентрация гомоцистеина превышает норму. Одним из описанных механизмов нейротоксичности гомоцистеина и его производных является взаимодействие с глутаматными рецепторами (Boldyrev A.A., Johnson P., 2007). Уже при средней гипергомоцистеинемии у пациентов проявляются нервно-сосудистые болезни, а также нарушения периферического кровообращения.

### *Пути гомоцистеинилирования белков*

Некоторые аминоксил-тРНК-синтетазы (метионил-, лейцил-, изолейцил-тРНК-синтетазы) способны активировать гомоцистеин присоединением АТР, ошибочно принимая эту аминокислоту за свой субстрат. На следующем этапе вместо переноса гомоцистеин-аденилата на тРНК фермент превращает активированный гомоцистеин в гомоцистеинтиолактон (Jakubowski, 1997, Jakubowski, 2001, Jakubowski and Fersht, 1981, Jakubowski, 1995). За счет энергии ангидридной связи гомоцистеиниладенилата образуется высокоэнергетическая тиоэфирная связь гомоцистеинтиолактона. Таким образом, гомоцистеинтиолактон способен к образованию пептидных связей с аминогруппами лизинов белков (Рис. 12) (Jakubowski, 1999). Эта модификация приводит к уменьшению положительного заряда белка, а появление SH-группы увеличивает вероятность олигомеризации через образование дисульфидных связей.

Гомоцистеин способен активироваться путем превращения в гомоцистеинил-тРНК. Почему же он способен активироваться и присоединяться к тРНК, не являясь протеиногенной аминокислотой? В настоящее время считается, что гомоцистеин является предпочтительной аминокислотой для аминокислирования иницирующей тРНК в эукариотах. Фермент, активирующий гомоцистеин, напоминает бактериальную

метионил-тРНК синтетазу: оба этих фермента ацилируют только иницирующую тРНК млекопитающих, и оба же способны модифицировать ацилированную иницирующую тРНК. По сути, гомоцистеинил-тРНК быстро метилируется до метионил-тРНК с помощью фактора метилирования аналогично тому, как происходит превращение бактериальной метионил-тРНК в формилметионил-тРНК. Это объясняет, почему активированный гомоцистеин не встречается в белках. Предполагается, что гомоцистеинтиолактон образуется при нарушениях метилирования гомоцистеинил-тРНК, которые могут наблюдаться в некоторых злокачественных клетках с нарушениями метаболизма метионина (Jakubowski and Goldman, 1993). Таким образом, новые данные показывают, что образование гомоцистеинтиолактона является знаком не ошибочной активации гомоцистеина, а нарушения метилирования гомоцистеинил-тРНК до метионил-тРНК (Antonio *et al.*, 1997). С другой стороны, благодаря своей структурной схожести с метионином, изолейцином и лейцином, гомоцистеин может активироваться метионил-, изолейцил- и лейцил-тРНК синтетазами *in vivo*. Однако, корректирующие механизмы данных синтетаз, превращающих ошибочно активированный гомоцистеин в тиолактон, как правило не допускают трансляционного включения гомоцистеина в белок. Если бы боковой радикал гомоцистеина был модифицирован небольшой молекулой, улучшающей его связывание с сайтом специфичности и предотвращающей коррекцию, гомоцистеин мог бы включаться в белок при трансляции. Якубовский (Jakubowski, 2000) показал, что S-нитрозогомоцистеин включается в состав белка при трансляции как в *E.coli*, так и в ретикулоцитах кролика. Включение гомоцистеина в белок, опосредованное S-нитрозилированием, может происходить в клетке при нормальных условиях, внося вклад в гомоцистени-индуцированный патогенез.

Гомоцистеинтиолактон содержит внутримолекулярную высокоэнергетическую тиоэфирную связь. Являясь очень реакционноспособной молекулой, он способен ацилировать свободные аминогруппы боковых радикалов аргинина и лизина. Недавно было показано, что различные белки плазмы легко гомоцистеинилируются, в основном по боковым цепям лизина и цистеина (Jakubowski, 1999). Рисунок 12 иллюстрирует образование гомоцистеинтиолактона из гомоцистеинил-тРНК и гомоцистеинилирование белков. Гомоцистеинилирование модельных белков, таких как трипсин, привело к полной потере их ферментативной активности. Различные модификации белков ранее неоднократно связывали с развитием патологических процессов (Booth *et al.*, 1997, Harrington and Colaco, 1994). Гомоцистеинилирование является новым примером повреждения белка, приводящего к патологии. Фибриллин-1 - один из белков внеклеточной соединительной ткани - очень чувствителен к гомоцистеинилированию. Присутствие большого количества EGF-подобных доменов в фибриллине и других внеклеточных белках, участвующих в коагуляции и транспорте липопротеинов, которые нарушаются при гипергомоцистеинемии, показывает, что эти домены могут быть местами предпочтительного гомоцистеинилирования (Krumdieck and Prince, 2000). Недавно было показано, что гомоцистеинтиолактон является важным компонентом метаболизма гомоцистеина в клетках сосудистого эндотелия, в которых гомоцистеин включается в белки, и масштаб образования тиолактона и гомоцистеинилирования белков зависит от внеклеточных концентраций гомоцистеина, фолиевой кислоты и ЛПВП (Jakubowski *et al.*, 2000). Эти данные поддерживают гипотезу о том, что метаболическое превращение гомоцистеина в тиолактон и модификация белков последним могут играть значительную роль в гомоцистеин-индуцированном повреждении сосудов. Кальций-зависимая гомоцистеинтиолактонгидролаза,

связанная с липопротеином высокой плотности в плазме человека, потенциально представляет собой защитный механизм, предотвращающий гомоцистеинилирование (Jakubowski, 2000).

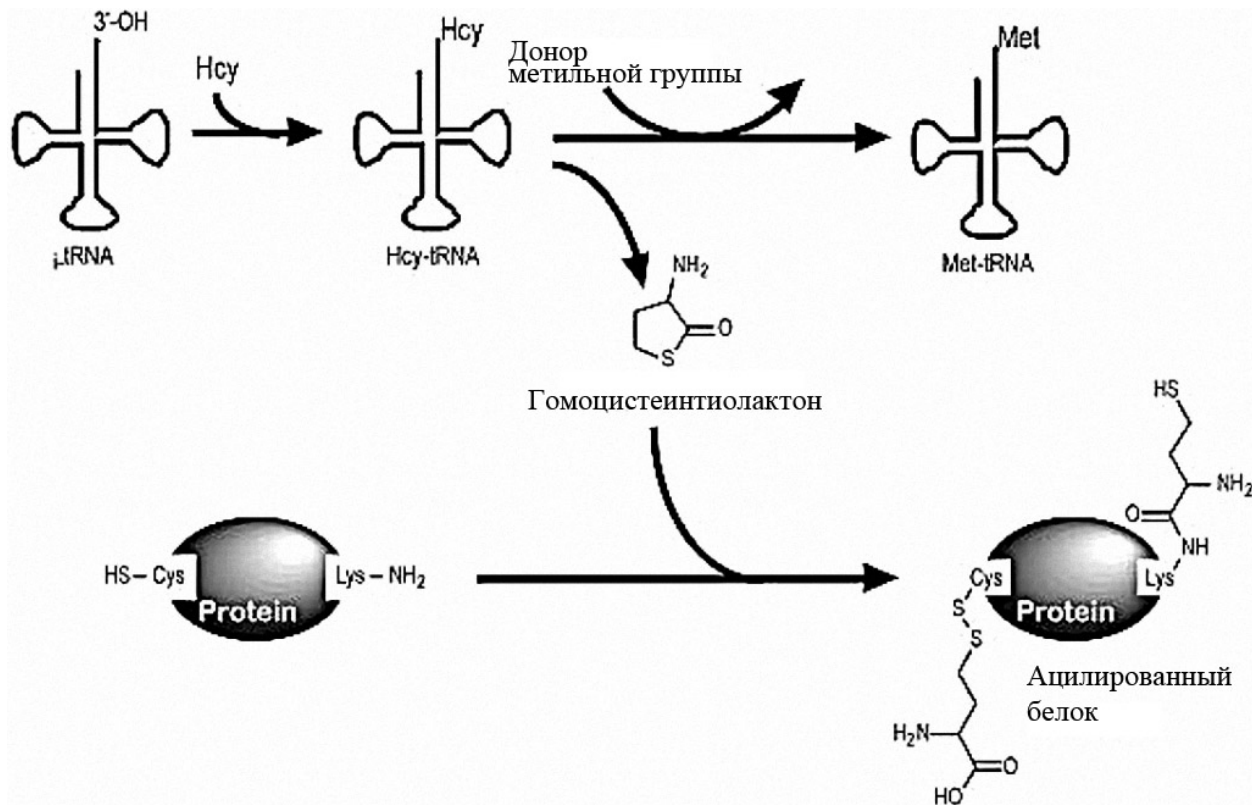


Рис. 12. Схема образования гомоцистеинтиолактона и реакций гомоцистеинилирования белков. (Цит. по (Medina *et al.*, 2001))

В последнее десятилетие было показано, что гомоцистеинтиолактон, способный «сшивать» белки за счет взаимодействия с их лизиновыми остатками и последующего образования дисульфидных связей между введенными свободными сульфгидрильными группами, вовлечен в развитие ряда сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний (Jakubowski, 2008, Lawrence de Koning *et al.*, 2003, Mattson and Shea, 2003, Obeid and Herrmann, 2006, Seshadri, 2006, Spence *et al.*, 2005, Suszynska *et al.*, 2010). Большинство работ такого рода основано на выявлении корреляции между концентрациями гомоцистеинтиолактона, гомоцистеина, активностями ферментов, вовлеченных в их метаболизм, содержанием



гомоцистеинилированных белков, с одной стороны, и теми или иными патологическими проявлениями с другой (Jakubowski, 2008, Lawrence de Koning *et al.*, 2003, Mattson and Shea, 2003, Obeid and Herrmann, 2006, Seshadri, 2006, Spence *et al.*, 2005, Suszynska *et al.*, 2010). Существует также небольшое количество работ, в которых *in vitro* изучали влияние модификации гомоцистеинтиолактоном изолированных белков на их агрегационное состояние и другие свойства (Jakubowski, 1999, Paoli *et al.*, 2010). Немногочисленные последние работы (Jakubowski, 1999, Jakubowski, 2008, Paoli *et al.*, 2010) свидетельствуют о том, что даже при небольшом выходе модификации структура и функция белка могут значительно меняться. Так, гомоцистеинилирование приводит к агрегации таких белков, как БСА и другие белки крови и пр. (Paoli *et al.*, 2010). Именно на основании результатов, полученных с помощью этих двух подходов, был сделан вывод о том, что патологическое воздействие гомоцистеинтиолактона обусловлено стимулированием агрегации и формированием крупных агрегатов. Однако существующие работы описывают этот эффект в основном на глобулярных белках со строго определенной третичной структурой (Paoli *et al.*, 2010). До последнего времени не было работ, посвященных гомоцистеинилированию естественно неструктурированных белков, хотя прежде всего, именно они вовлечены в формирование амилоидных структур (Thorn *et al.*, 2008, Tompa, 2002). Эти белки составляют значительную часть протеома и играют важную роль во множестве биологических процессов, включая нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания (Dunker *et al.*, 2008, Galea *et al.*, 2008, Raychaudhuri *et al.*, 2009).

Патологическое влияние гомоцистеина и гомоцистеинтиолактона через N-гомоцистеинилирование белков изучено в меньшей степени вследствие "трудноуловимости" эффекта *in vivo*. Короткая жизнь и невысокие концентрации гомоцистеинтиолактона затрудняют количественное

определение и эффект модификации. Однако, для долгоживущих белков возможна кумулятивность, когда идет накопление модификации. Тем более, что в случае так называемых конформационных болезней, патологическая конверсия одной молекулы белка приводит к переходу в такое состояние нормальных белков. В нашем случае как модельные белки были использованы овечий прион и казеин.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Материалы*

В работе были использованы липиды, гомоцистеинтиолактон, Трис, ДТТ,  $\beta$ -меркаптоэтанол, глицерин, MOPS, ЭДТА, кумасси бриллиантовый синий, ДСН, коктейль ингибиторов протеаз, протеиназа К, гуанидин гидрохлорид, тиофлавин Т, ANS, Конго красный, мочевины,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  фирмы Sigma.

ГАФД из мышц кролика была выделена по классической методике (Scopes and Stoter, 1982). Используемые культуры с плазмидами рекомбинантных белков были предоставлены лабораторией функциональных исследований белков молока государственного института агрономических исследований в городе Нант.

Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

### *Получение разных форм казеинов*

*Разделение нативных  $\alpha\text{S1}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ -казеинов молока с помощью анионообменной хроматографии*

Казеиновую фракцию коровьего молока растворяли в 50 мМ Трис-НСl буфере, содержащем 8 М мочевины, 20 мМ ДТТ, рН 8, в концентрации 100 мг/мл, а затем центрифугировали со скоростью 10 000 g в течении 10 минут.

Белок наносили на колонку HR 10/10, заполненную носителем Source 15Q и уравновешенную 25 мМ Трис-НСl буфером, 4 М мочевины, 5 мМ ДТТ, рН 8,2. Элюцию проводили градиентом от 0 до 0,3 М NaCl в том же буфере, со скоростью 3 мл/мин, измеряя оптическую плотность раствора при 280 нм.

Полученные фракции анализировали с помощью ДСН-электрофореза, фракции, содержащие чистые  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеины трехкратно диализовали против воды, а затем доводили рН до 8 и лиофилизировали.

Для разделения  $\alpha$ S1- и  $\alpha$ S2-казеинов использовали катионообменную хроматографию на носителе MonoS по описанной в литературе методике (Thorn *et al.*, 2008).

### *Получение разных форм рекомбинантного $\beta$ -казеина*

#### *Экспрессия рекомбинантного $\beta$ -казеина*

Для возобновления культуры 100 мл бактериальной среды LB (Luria Broth, Sigma), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, заражали замороженной культурой и растили в течение ночи при 37°C и перемешивании 250 об/мин. Для продукции в 4 л ферментер (Bio Console ADI 1025, управляемый Bio Controller ADI 1010, Applikon, Нидерланды), содержащий 2 л бактериальной среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 0,7% глицерина, добавляли прекультуру до оптической плотности 0,1 при 600 нм и 200 мкл жидкости, предотвращающей пенообразование (Sigma, Steinheim, Германия). На протяжении всего времени роста культуру оксигенировали сжатым воздухом со скоростью 4 л/мин при температуре 37°C и скорости перемешивания 600 об/мин. Когда оптическая плотность достигала значения 0,6, к культуре добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ для индукции экспрессии.

После продукции в течение 3 часов, культуру центрифугировали 12 минут при 4000g и температуре 4°C. Осадок, содержащий бактерии, промывали буфером (50 мМ Трис-НСl, 0.5 М NaCl, рН 7.4), а затем замораживали до температуры -80°C.

## *Очистка*

### *Экстракция белков*

Бактериальный осадок суспендировали в лизирующем буфере (25 мМ Трис-НСl, рН 8, 8 М мочеви́на). Бактерии разрушали с помощью ультразвуковой обработки 10 импульсами по 10 секунд при максимальном напряжении 130 В. Затем рН лизата доводили до 2 с помощью концентрированной соляной кислоты для преципитации нуклеопротеиновой фракции. Лизаты центрифугировали при 10000g в течение 25 минут при 6°C. Полученный супернатант, содержащий β-казеин и внутриклеточные белки, хранили при 4°C до хроматографической очистки.

## *Хроматографическая очистка*

### *1) Обратнoфазовая хроматография*

На первом этапе использовали обратнoфазовую хроматографию, разделяя белки согласно их гидрофобности. Колонку (HR 16/10) заполняли носителем Source RPC 30 (20 мл) и уравнивали растворителем (H<sub>2</sub>O 95%, ацетонитрил 5%, трифторуксусная кислота (TFA) 0,1%, v/v/v). Лизаты перед нанесением фильтровали во избежание загрязнения колонки. После выхода с колонки не связавшихся с носителем белков производили элюцию линейным градиентом от 30 до 55% растворителя (H<sub>2</sub>O 20%, ацетонитрил 80%, TFA 0,08%, v/v/v). Для работы с колонкой использовали скорость пропускания раствора 5 мл/мин. Фракции собирали в объеме 3 мл.

С помощью ДСН-электрофореза определяли фракции, соответствующие пику β-казеина. Из каждой фракции отбирали 50 мкл, подвергали высушиванию на роторном испарителе под вакуумом (Speed-vas) в течение 10 минут для избавления от ацетонитрила. Оставшийся объем смешивали с буфером нанесения (ДСН 4%, 2-меркаптоэтанол 3%, глицерин 10%, 50 мМ Трис-НСl, рН 6,8) и наносили на ДСН-электрофорез в 12% геле.

Фракции, содержащие β-казеин, помещали в роторный испаритель под вакуумом (Speed-vas) в течение 30 минут до исчезновения ацетонитрила и затем объединяли для следующего этапа хроматографической очистки.

## *2) Анионообменная хроматография*

К предварительно сконцентрированной пробе добавляли восстанавливающий агент дитиотреитол (до концентрации 10 мМ) и мочевины до конечной концентрации 5 М, затем доводили рН до 8,2 с помощью концентрированного раствора Триса.

При данном значении рН  $\beta$ -казеин заряжен отрицательно, т.к. его изоэлектрическая точка равна 5,3. Поэтому с помощью анионообменной хроматографии его можно отделить от других белков. Колонку HR 10/10, содержащую носитель Source 15 Q, уравнивали 25 мМ Трис-НСl буфером, рН 8,2, 4 М мочевины. Элюцию осуществляли при скорости 5 мл/мин линейным градиентом NaCl от 0 до 1 М в буфере. При этом отслеживали оптическую плотность при 220 нм. Для анализа чистоты белка в полученных фракциях использовали метод ДСН-электрофореза. Фракции собирали по 3 мл.

## *3) Повторная обратнофазовая хроматография*

Для избавления от соли производили повторную обратнофазовую хроматографию, используя колонку HR 10/10, заполненную носителем Source 15 RPC. В пробе, полученной после анионообменной хроматографии доводили рН до 2 концентрированной соляной кислотой. После дегазирования насыщением азотом, очистку проводили в тех же условиях, что и при первой обратнофазовой хроматографии со скоростью 4 мл/мин.

Фракции объемом 4 мл, соответствующие пику  $\beta$ -казеина, собирали и избавляли от ацетонитрила с помощью роторного испарителя. Фракции объединяли, замораживали и лиофилизировали аликвотами по 1 мг.

### *Димеризация мутантных форм рекомбинантного $\beta$ -казеина*

Лиофилизированные рекомбинантные формы  $\beta$ -казеина (дикий тип и цистеинилированные мутанты) растворяли в 50 мМ Трис-НСl буфере, содержащем 80 мМ NaCl, 0,05% азид натрия, рН 8,2, до конечной концентрации 20 мкМ. Для получения преимущественно димерных форм белка инкубировали в присутствии 60 мкМ  $H_2O_2$ .

### *Протеолиз пепсином и трипсином*

Для изучения структуры белка часто используется метод ограниченного протеолиза. Данный метод позволяет судить о доступности различных остатков анализируемого белка к действию протеаз, об устойчивости белка к расщеплению и о наличии более или менее устойчивых к протеолизу доменов в структуре белка.

Частичный протеолиз  $\beta$ -казеинов осуществляли пепсином и трипсином. Белки (нативный, дикий тип, мутанты С4, С208, С4-208) в концентрации 40 мкМ в 50 мМ Трис-НСl буфере, рН 8 для гидролиза трипсином и в 50 мМ глициновом буфере, рН 2,5 для гидролиза пепсином. Реакцию проводили при 15, 37 и 50°C и завершали добавлением HCl для трипсина и NaOH для пепсина.

Полученные гидролизаты анализировали с помощью ДСН-электрофореза и обратнофазовой хроматографии (ВЭЖХ), используя аналитическую колонку Waters Symmetry 30. Пептиды разделяли с помощью градиента ацетонитрила (от 95% воды, 5% ацетонитрила, 0,1% трифторуксусная кислота к 20% воды, 80% ацетонитрила, 0,08% трифторуксусная кислота).



## *Гомоцистеинилирование нативных казеинов*

В большинстве экспериментов, если не указано иное, для гомоцистеинилирования использовали 10- или 100-кратный молярный избыток гомоцистеинтиолактона в расчете на остаток лизина белка. Гомоцистеинилирование проводили с 20 мкМ раствором казеина ( $\alpha$ S1,  $\beta$ - и  $\kappa$ -варианты) в 20 мМ MOPS буфере, pH 7,5. Свежеприготовленный раствор гомоцистеинтиолактона добавляли к раствору белка, затем контролировали pH, добавляя NaOH при закислении. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течении 20-24 часов, из литературных данных известно, что за это время непрореагировавший тиолактон полностью гидролизуется.

## *Получение разных форм приона*

### *Экспрессия*

Продукцию вариантов ARR и VRQ приона осуществляли согласно методике, описанной (Rezaei *et al.*, 2000), используя бактериальную культуру BL21 DE3 *E.coli* с плазмидой pET 22b+. Для возобновления культуры 100 мл бактериальной среды LB (Luria Broth, Sigma), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, заражали замороженной культурой и растили в течение ночи при 37°C и перемешивании 250 об/мин. Для продукции к 700 мл бактериальной среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 0,7% глицерина, добавляли прекультуру до оптической плотности 0,05 при 600 нм. Примерно через 4 часа, когда оптическая плотность достигала значения 2, к культуре добавляли 700 мл бактериальной среды и индуцировали экспрессию белка с помощью IPTG (до конечной концентрации 1 мМ). После продукции в течение ночи, культуру центрифугировали 12 минут при 4000g и температуре 4°C. Осадок, содержащий бактерии, промывали буфером (50

мМ Трис-НСl, 0.5 М NaCl, рН 7.4), а затем замораживали до температуры - 80°C.

Эксперименты по верификации и оптимизации продукции производили в конечном объеме 100 мл.

### *Очистка*

### *Экстракция*

Бактериальные осадки суспендировали в лизирующем буфере (50 мМ Трис-НСl, содержащий 0,5 мг/мл лизоцима, 10 мМ ЭДТА, 0,1% Triton X100, рН 8, набор ингибиторов протеаз (Sigma)) и инкубировали в течение 15 минут при температуре 37°C и перемешивании. Затем бактерии разрушали с помощью ультразвуковой обработки (Fisher Bioblock, Illkirch, Франция) 10 импульсами по 10 секунд при максимальном напряжении 130 В. Лизаты центрифугировали при 10000g в течение 12 минут при 6°C.

Осадок, содержащий прион в нерастворимых телах включения, промывали трижды буфером (50 мМ Трис-НСl, рН 8,0), а затем солюбилизировали в буфере, содержащем 6 М гуанидинхлорид (50 мМ Трис-НСl, 0,5 М NaCl) в течении ночи при 4°C при перемешивании. После центрифугирования в течении 20 минут со скоростью 10000 g супернатант хранили при 4°C до проведения хроматографической очистки.

## *Аффинная хроматография*

Хроматографические очистки вариантов приона осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на системе Äkta Purifier с программным обеспечением Unicorn Control (Amersham Biosciences, Piscatway, США).

Фракции собирали с помощью автоматического коллектора. Колонки и носители использовали производства Amersham (GE Healthcare).

Разделение белков в данном случае происходит благодаря наличию в последовательности рекомбинантного белка гистидинового участка, обладающего высоким сродством к ионам никеля. Колонку заполняли носителем Chelating Sepharose FF (20 мл), а затем насыщали раствором  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,2M). Непрочно связавшиеся ионы удаляли, промывая колонку 20 mM ацетатным буфером, pH 4,0, уравнивали колонку буфером (20 mM Трис-HCl, 0,5 M NaCl, 10 mM имидазол, 8 M мочевины, pH 7,4). Лизаты, после фильтрации через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, наносили на колонку. После промывания колонки буфером до выхода оптической плотности на постоянный уровень осуществляли этап ренатурации («рефолдинга») с помощью промывания колонки буфером, содержащим 20 mM Трис-HCl, 0,3 M NaCl, 20 mM имидазол, pH 7,4. Белок элюировали 1 M имидазольным буфером, pH 7,4, который замещает белок, связанный с ионами никеля. Хроматографию проводили со скоростью 2 мл/мин. Фракции собирали в объеме 3 мл.

Наличие приона во фракциях, полученных при выходе пика, анализировали путем ДСН-электрофореза.

### *Хранение*

Для хранения прион переводили в 15 мМ ацетат-аммонийный буфер, рН 5,0 с помощью диализа, затем лиофилизировали.

### *Термоагрегация приона*

Перед агрегацией пробы приона переводили в 20 мМ цитратный буфер, рН 3,4. Термическую агрегацию производили, используя аппарат для ПЦР (Techne) в диапазоне температуры между 45 и 90°C.

### *Агрегация приона при взаимодействии с фосфатидилинозитолом*

Фосфатидилинозитол готовили в стоковой концентрации 10 мг/мл, растворяя в смеси метанол-хлороформ.

### *Гомоцистеинилирование приона*

В большинстве экспериментов, если не указано иное, для гомоцистеинилирования использовали 10- и 100-кратный молярный избыток гомоцистеинтиолактона в расчете на содержание остатков лизина в белке. Гомоцистеинилирование проводили с 20 мкМ раствором приона (вариант VRQ) в 20 мМ MOPS буфере, рН 7,5. Свежеприготовленный раствор гомоцистеинтиолактона добавляли к раствору белка, затем контролировали рН, добавляя NaOH при закислении. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течении 20-24 часов, из литературных данных известно, что за это время непрореагировавший тиолактон полностью гидролизуеться.

Для имитации "физиологических" условий в течение месяца к раствору трижды добавляли гомоцистеинтиолактон до конечной концентрации 100

мкМ, инкубируя при 37°C. При этом использовали 42 мкМ раствор приона в том же буфере, содержащем 0,03% азиды натрия.

### ***Методы исследования структуры белков и их агрегатов:***

#### *ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле*

Все исследования по димеризации проводили методом ДСН-электрофореза в 12% геле. Разделяющий гель имел следующий состав: 1 мл 40% раствора акриламида; 0,665 мл 2 М Трис, рН 8,8; 2,335 мл воды; 40 мкл ДСН 10% ; 40 мкл 10% раствора персульфата аммония и 8 мкл раствора TEMED. Состав концентрирующего геля: 0,2 мл 40% раствора акриламида; 0,3 мл 0,5 М Трис, рН 6,8; 2 мл H<sub>2</sub>O ; 25 мкл ДСН 10% ; 20 мкл 10% раствора персульфата аммония и 4 мкл TEMED. Пробы помещали в буфер нанесения (ДСН 4%, глицерин 10%, 50 мМ Трис-НСl, рН 6,8 и следы бромфенолового синего)

Разделение проводили с помощью аппарата для электрофореза (Biograd, Hercules, CA) в трис-глициновом буфере (50 мМ Трис, 0,384 М глицин, ДСН 0,1%) при силе тока 10 мА на один гель для концентрирующего геля и 20 мА на один гель для основного геля. В лунку наносили около 10 мкг каждого белка.

#### *Гель-фильтрация*

Метод гель-фильтрации использовали для изучения образования олигомеров и агрегатов приона. Колонку для гель-фильтрации для высокоэффективной жидкостной хроматографии TSK 3000SW (Interchim) уравнивали 20 мМ цитратным буфером, рН 3,4. Скорость пропускания буфера была 1 мл/мин. Набор белков-стандартов молекулярной массы (Sigma) использовали для калибровки колонки.



### *Метод динамического лазерного светорассеяния (ДЛС)*

Гидродинамический диаметр приона и казеинов в нативном и агрегированном состоянии был измерен на приборе Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern). Этот метод основан на принципе динамического рассеяния света частицами в условиях случайного теплового движения.

Раствор белка (обычно в концентрации 1 мг/мл) предварительно фильтровали через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Для каждого измерения проводили 6 сканирований. Вязкость и коэффициент преломления принимали такими же, как для воды. Угол рассеяния лазерного луча использовали или стандартный 173°, или 12,8°, который лучше подходит для измерения крупных частиц в сильно рассеивающей системе.

Результаты рассчитывали исходя из данных авто-корреляции с помощью основного алгоритма. Данные представлены в виде распределения по размерам.

### *Круговой дихроизм*

Основу метода кругового дихроизма (КД) составляет взаимодействие поляризованного света с оптически активными молекулами. Различные вещества по-разному поглощают лево- и право-поляризованный свет. Белки и нуклеиновые кислоты, вследствие особенностей их вторичной и третичной структуры, можно изучать с помощью метода кругового дихроизма.

Дихрограф способен измерить разницу между молярными коэффициентами поглощения для лево- и право-вращающего света волн ( $\Delta\epsilon$ ), измеряемые в  $M^{-1}cm^{-1}$ .

Другой единицей измерения кругового дихроизма является молярная эллиптичность ( $\theta$ ), измеряемая в градусах и равная  $3298 \cdot \Delta\epsilon$ . Кроме того, при

исследовании белков часто используют так называемую молярную эллиптичность, приведенную на один аминокислотный остаток, которая также обозначается  $\theta$  и рассчитывается по формуле:

$[\theta] = (M \cdot \theta_\lambda) / 10 \cdot d \cdot C$ , где  $\theta_\lambda$  – молярная эллиптичность в градусах,  $M$  – средняя молекулярная масса на остаток (115 Да),  $d$  – длина оптического пути в см,  $C$  – концентрация белка в г/л. Полученная величина имеет размерность град\*см<sup>2</sup>дмоль<sup>-1</sup>.

Для получения информации о третичной и вторичной структуре белков используют спектры кругового дихроизма в ближнем (250–300 нм) и дальнем (<250 нм) ультрафиолете, соответственно. На спектр КД в дальней ультрафиолетовой области влияет вторичная структура белка ( $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -складки и неупорядоченные структуры). При этом  $\alpha$ -спиральные структуры имеют отрицательные максимумы поглощения при 222 и 208 нм, а также положительный максимум на 192 нм;  $\beta$ -складчатые структуры имеют отрицательный максимум на 215 нм и положительный на 198 нм (Sreerama and Woody, 2004).

Спектры кругового дихроизма записывали при длине волны от 190 до 250 нм на приборе Jobin Yvon CD Mark 6 в кювете с длиной оптического пути 0,01 мм. Каждый спектр усреднен из пяти измерений.

#### *Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (ИК-спектроскопия)*

При приготовлении образца для ИК-спектроскопии 200 мкМ раствор приона в 20 мМ MOPS буфере, рН 7,5 инкубировали с гомоцистеинтиолактоном в 10-кратном избытке на остаток лизина белка при температуре 37°C в течении 15 часов. После проведения реакции белок многократно диализовали против воды, лиофилизировали, затем растворяли



в D<sub>2</sub>O. Для снижения количества протонов, вносящих свой вклад в нужной области спектра, белок снова лиофилизировали и растворяли в D<sub>2</sub>O до конечной концентрации 50 мг/мл.

Любой белок имеет в среднем более 20000 резонансных степеней свободы, т.н. нормальных колебательных мод, которые связаны с внутренними координатами молекул – такими, как длина связи и угол связи. Метод инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье относится к колебательной спектроскопии. Инфракрасный свет может быть поглощен молекулярным колебанием, когда отношение колебания и света совпадают. Отношение колебания и вероятность поглощения зависят от силы и полярности колеблющейся связи – параметров, которые могут сильно изменяться при различных внутри- и межмолекулярных воздействиях.

Колебательная спектроскопия исключительно чувствительна к прочности связи и может зафиксировать изменения в 0,02%. Из спектральных характеристик (положение пика, ширина пика и коэффициента абсорбции) можно извлечь информацию о структуре и окружении боковых групп аминокислотных остатков, о связанных лигандах или кофакторах и о структуре углеродного скелета белка. Это делает колебательную спектроскопию ценной для структурных исследований белка (Barth and Zscherp, 2002).

Спектры записывали на спектрометре Bruker Vector 22 (Bruker GmbH, Германия), оборудованном детектором на основе дейтерированного триглицинсульфата. Образцы гомоцистеинилированного и контрольного белка помещали между двумя пластинками из фторида бария с разделителем толщиной 56 нм. Для каждого образца были сняты 128 сканирований со спектральным разрешением 2 см<sup>-1</sup> с последующим преобразованием Фурье.

Для записи и обработки данных использовали программу Bruker OPUS. После компенсации вклада паров воды из каждого спектра вычитали спектр

D<sub>2</sub>O, умноженный на 0,92. Нормирование интенсивности спектров проводили по площади под кривой в области 1750 см<sup>-1</sup> – 1525 см<sup>-1</sup> после вычитания базовой линии.

Вторая производная спектров была получена после сглаживания по алгоритму Савицкого-Голея с помощью программы Origin 7.5 software (Origin, Microcal, США).

Обычно для идентификации вторичной структуры белков исследуют так называемую область Амида I (1600–1700 см<sup>-1</sup>). При этом ИК-спектр можно разложить на составные компоненты. Для этого, вторую производную ИК-спектров используют для идентификации положения полос поглощения отдельных структур. Далее производится разложение ИК-спектра на составляющие компоненты (которые обычно описываются распределением Гаусса) с заданными максимумами расположения полос. Разные типы вторичной структуры имеют максимумы поглощения на разных волновых числах: β-складкам соответствуют волновые числа 1619, 1627 и 1634 см<sup>-1</sup>, а α-спиралям соответствует полоса с максимумом поглощения 1654 см<sup>-1</sup>. Поворотам соответствуют полосы с максимумами поглощения при 1660, 1670 и 1690 см<sup>-1</sup>. Неупорядоченный клубок дает полосу с максимумом поглощения при 1640 см<sup>-1</sup>. Кроме того, считается, что полоса в области 1680 см<sup>-1</sup> может соответствовать сразу двум структурам, поворотам и β-складкам (Barth and Zscherp, 2002, Martinez-Rodriguez *et al.*, 2009, Okuno *et al.*, 2006).

### *Флуоресцентная спектроскопия*

В данной работе для изучения изменений в структуре белков использовали как собственную триптофановую флуоресценцию (для казеинов), так и флуоресцентные метки - тиофлавин Т и ANS (для приона и казеинов).

Казеины имеют остаток триптофана в С-концевой области ( $\beta$ -казеин - один в 157 положении,  $\kappa$ -казеин - один в 97 положении,  $\alpha$ S1-казеин - два остатка, в 179 и 214 (последний остаток) положении), что делает возможным измерение максимума длины волны флуоресценции триптофана ( $T_{tr} \lambda_{max}$ ). Длина максимума интенсивности флуоресценции триптофана меняется в зависимости от окружения, в котором находится триптофан. Когда триптофан попадает в гидрофобное окружение, это приводит к синему сдвигу максимума длины волны флуоресценции (Gryczynski *et al.*, 1999).

Спектры флуоресценции снимали на спектрофлуориметре FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, France) в институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского. Измерения проводили с 8 мкМ раствором казеина в 25 мМ фосфатном буфере, рН 7,5, в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при температуре 20°C. Ширина щели возбуждающего света и флуоресцентной щели составляла 5 нм, длина волны возбуждающего света при изучении флуоресценции составляла 295 нм, спектры флуоресцентного свечения триптофана были записаны в диапазоне длин волн 300-400 нм, каждый 1 нм.

Метод, основанный на измерении изменения флуоресценции тиофлавина Т (ТнТ) при его связывании с белками, позволяет наблюдать динамику образования  $\beta$ -структур амилоидогенных белков. При взаимодействии ТнТ с  $\beta$ -структурными элементами белков в спектре флуоресценции ТнТ появляется дополнительный пик при длине волны 482 нм. Спектры флуоресценции ТнТ также снимали на спектрофлуориметре FluoroMax-3. Все эксперименты с ТнТ проводились в кварцевой флуориметрической кювете с длиной оптического пути 1 см.

Свежеприготовленный раствор ТнТ добавляли к раствору белка (7-8 мкМ белка) перед началом инкубации так, чтобы количество ТнТ в пробе в 10 раз превышало количество белка. После окончания инкубации в течении 5

минут снимали спектр флуоресценции ТнТ при температуре 20°C в диапазоне от 460 нм до 600 нм при фиксированной длине волны возбуждения 435 нм. По интенсивности флуоресценции на длине волны 482 нм судили об интенсивности образования  $\beta$ -структур в пробе.

В случае использования в качестве флуоресцентного зонда гидрофобного красителя 1-анилинонафталин-8-сульфоната (ANS), приготовленные образцы, содержащие 3 мкМ казеина, инкубировали с 50-кратным избытком свежеприготовленного ANS в течение часа в темноте. После окончания инкубации снимали спектр флуоресценции ANS при температуре 20°C в диапазоне от 400 нм до 600 нм при фиксированной длине волны возбуждения 365 нм. Этот зонд интересен тем, что при его взаимодействии с гидрофобными кластерами, появляющимися на поверхности белка при его денатурации или изменении структуры, наблюдается резкий прирост флуоресценции ANS.

#### *Абсорбционная спектроскопия с Конго красным для выявления амилоидов*

Одним из классических методов определения амилоидов является окрашивание красителем Конго красным. Известно, что спектр поглощения красителя Конго Красный изменяется при взаимодействии с амилоидными фибриллами – максимум поглощения сдвигается от 498 нм в красную сторону на 40-50 нм (Frid *et al.*, 2007, Puchtler and Sweat, 1965).

Свежеприготовленный раствор Конго красного добавляли к раствору белка (2 мкМ казеин) перед началом инкубации так, чтобы количество Конго Красного в пробе в 10 раз превышало количество белка. После окончания инкубации в течении 15 минут снимали спектры поглощения Конго красного в кювете с длиной оптического пути 10 мм при температуре 20°C в диапазоне

от 400 нм до 700 нм. Для снятия спектров использовали спектрофотометр UV 1601 Shimadzu (Япония). Спектр фосфатного буфера использовали в качестве контроля и вычитали из всех полученных спектров.

*Количественный анализ включения гомоцистеина с помощью метода определения SH-групп по Элману*

Для количественного анализа включения гомоцистеина в состав приона и казеина был использован метод определения SH-групп по Элману (Ellman, 1959). После проведения гомоцистеинилирования 100-кратным избытком реагента в течение 24 часов, в полученную реакционную смесь для хотя бы частичного растворения агрегатов добавляли гуанидингидрохлорид до конечной концентрации 8 М. Затем белок обессоливали на колонке PD-10 для удаления низкомолекулярных продуктов реакции. Для восстановления дисульфидных связей белок инкубировали в течение часа при 50°C с 2 мМ β-меркаптоэтанола, затем добавляли гуанидингидрохлорид до 8 М и снова обессоливали на колонке PD-10. В полученном растворе анализировали число SH-групп, добавляя в кювету в белком 5-дителиобис-2-нитробензойную кислоту (ДТНБ) и измеряя оптическую плотность при 412 нм. Для расчета количества образуемого продукта использовали коэффициент экстинкции  $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд.

β-казеин не содержит в своей последовательности цистеинов, а два цистеина в составе приона образуют дисульфидную связь и не восстанавливаются при используемой обработке 2 мМ β-меркаптоэтанола, что было подтверждено проведением аналогичных операций с контрольной пробой нативного приона.

### *Масс-спектрометрия методом ионизации в электроспрее*

Масс-спектры полученных рекомбинантных форм  $\beta$ -казеина были получены методом ионизации электроспреем на аппарате LCQ Advantage (Thermo Finnigan), позволяющем разделить ионизированные молекулы в зависимости от соотношения масса/заряд. Молекулы помещаются в электрическое поле под вакуумом и детектируются в газообразном состоянии. Пробы вводили со скоростью 2,5 мкл/мин.

Данные обрабатывали с помощью программы Xcalibur (Thermo Finnigan).

После сглаживания производили выбор спектров в диапазоне от 700 до 2000 m/z. В этом случае можно рассчитать точную молекулярную массу исследуемой молекулы. Исследования проводили в лаборатории масс-спектрометрии ИНРА в Нанте.

### *Масс-спектрометрия MALDI TOF*

Данный анализ был выполнен на базе группы масс – спектрометрии (BIBS) отделения ВИА ИНРА, Нант, Франция ([http://www.angers-antes.inra.fr/plateformes\\_et\\_plateaux\\_techniques/plateforme\\_bibs](http://www.angers-antes.inra.fr/plateformes_et_plateaux_techniques/plateforme_bibs))

Для анализа из полиакриламидного геля была вырезана полоса гомоцистеинилированного приона, соответствующая димерной форме, а также контрольный нативный мономер. Гель промывали 25 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , обезвоживали 50% (v/v) раствором ацетонитрила в 25 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , восстанавливали 10 мМ ДТТ, а затем алкилировали 55 мМ йодоацетамидом. После этого полосы геля высушивали на вакуумной центрифуге. Протеолиз проводили в течение ночи при 37°C, добавляя 15 мкл раствора трипсина, приготовленного с концентрацией 12,5 нг/мл в 25 мМ  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (Promega, Madison, США). Получившуюся смесь пептидов закисляли добавлением 1%

муравьиной кислоты и хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведения анализа.

Идентификацию пептидов проводили на MALDI LR масс-спектрометре, оборудованном лазером с длиной волны 337 нм (Micromass/Waters). Один микролитр образца смешивали с 1 мкл раствора для подготовки матрицы (2,5 г/л  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота, 2,5 г/л 2,5-дигидроксибензойная кислота, 70% [v/v] ацетонитрил, 0,1 % [w/v] трифторуксусная кислота) и вносили для анализа. Запись масс-спектров проводили с помощью управляющей программы Mass Lynx software (Micromass/Waters). Исследования проводили в лаборатории масс-спектрометрии ИНРА в Нанте.

### *Электронная микроскопия*

Пробы гомоцистеинилированных белков для трансмиссионной электронной микроскопии готовили накануне. Приготовленные препараты белков наносили на пленку Formvar, предварительно нанесенную на медную сетку (200 меш). Затем препараты контрастировали с использованием реагента Nano-W (Nanoprobes, США). После высушивания на воздухе и угольного напыления образцы исследовали на электронном микроскопе LEO 912 AB OMEGA (Carl Zeiss, Германия) в отделе микроскопии института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского.

Электронная микроскопия препаратов термоагрегированного приона была проведена на базе лаборатории микроскопии Седриком Гаяром. Для трансмиссионной электронной микроскопии были использованы два варианта контрастирования – фосфовольфрамовой кислотой и ацетатом урана.

### *Атомно-силовая микроскопия*

Пробы (с концентрацией белка 1 мг/мл) для атомно-силовой микроскопии готовили накануне. Для исследования агрегации прион нагревали при 90°C в течении 1 часа. Приготовление проб для анализа и микроскопия были проведены на базе лаборатории микроскопии Седриком Гаяром.

### *Флуоресцентная микроскопия*

Свежеприготовленный раствор тиофлавина Т добавляли к раствору гомоцистеинилированного белка (1 мг/мл) в 20 mM MOPS, pH 7.5 молярном избытке 20:1. Для агрегатов казеина наблюдалась высокая подвижность частиц, поэтому образцы помещали в среду для включения Gel Mount (Sigma).

Образцы исследовали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа (Leica DMRB) в отделе микроскопии института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, используя для возбуждения фильтр BP 450-490 нм с разделителем луча RCP 510 и LP>515 нм. Цифровые фотографии были записаны с помощью камеры Nikon DS-1QM и программы NIS.



### *Расщепление протеиназой К*

Анализируемые образцы в 20 мМ MOPS буфере, рН 7,5, подвергали обработке протеиназой К в концентрации 0,2 мкг/мл в присутствии 5 мкМ концентрации ионов кальция при 37°C. Для остановки реакции к образцам добавляли буфер для образцов (50 мМ Трис-НСl, ДСН 4%, глицерин 10%, рН 6,8 и следы бромфенолового синего) и подвергали кипячению в течение 5 минут. Результаты анализировали с помощью электрофореза по Лэммли (Laemmli, 1970).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### *Изучение агрегации казеинов.*

#### *Получение препаратов:*

##### *а) разделение казеинов молока*

Для разделения нативных казеинов была использована анионообменная хроматография (Mercier *et al.*, 1968). На профиле элюции (Рис.14) можно видеть, что с помощью относительно протяженного градиента хлорида натрия удастся разделить разные типы казеинов. С помощью электрофореза было подтверждено, что фракции пика А содержат  $\beta$ -казеин, в пике Б обнаруживается смесь  $\alpha$ S1- и  $\alpha$ S2-казеинов. к-казеин состоит из белков с разной степенью гликозилирования, поэтому представлен несколькими минорными пиками. Для разделения  $\alpha$ S1-казеинов в дальнейшем была использована катион-обменная хроматография на MonoS носителе по описанной в литературе методике (Thorn *et al.*, 2008).

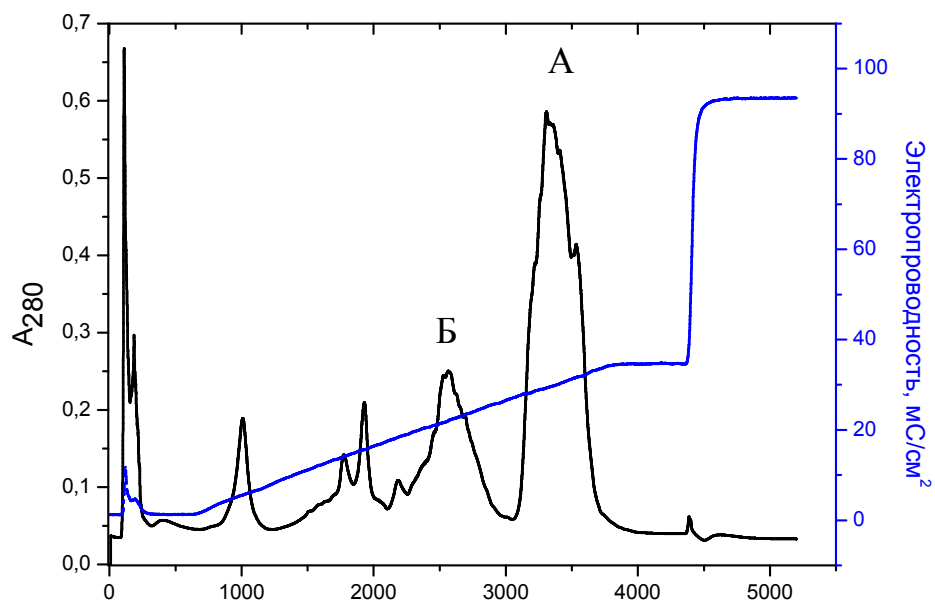


Рис. 14. Профиль элюции при разделении нативных казеинов молока методом анионообменной хроматографии.

Фракция казеинов молока была нанесена на колонку HR 10/10, заполненную носителем Source 15 Q (10 мл) и уравновешенную 25 мМ Трис-НСl буфером, (4 М мочевины, 5 мМ ДТТ, рН 8,2). Элюцию проводили градиентом буфера, содержащего 1 М NaCl, при комнатной температуре и скорости 3 мл/мин.

*б) получение и очистка цистеинилированных мутантов*

В данной работе были экспрессированы и очищены следующие формы рекомбинантного  $\beta$ -казеина:

**Дикий тип**      MRELE<sub>4</sub>ELNVPGEIVESLSSEESITRINKKIEKFQS ----- FPII<sub>208</sub>V

**Мутант C4**      MGREL**C**<sub>4</sub>ELNVPGEIVESLSSEESITRINKKIEKFQS ----- FPII<sub>208</sub>V

**Мутант C208**    MGRELE<sub>4</sub>ELNVPGEIVESLSSEESITRINKKIEKFQS ----- FPI**C**<sub>208</sub>V

**Мутант C4-208** MGREL**C**<sub>4</sub>ELNVPGEIVESLSSEESITRINKKIEKFQS ----- FPI**C**<sub>208</sub>V

В случае рекомбинантного казеина после лизиса бактерий используется супернатант, содержащий значительные количества внутриклеточных белков и нуклеиновых кислот. После первого этапа обратнофазовой хроматографической очистки, можно видеть, что на профиле элюции отсутствует четко выделенный основной пик (Рис. 15). Однако по результатам ДСН-электрофореза понятно, что казеин элюируется в диапазоне 40-50% растворителя. Фракции, обогащенные  $\beta$ -казеином, также содержат много других белков.

Второй этап очистки, анионообменная хроматография, позволила нам избавиться от оставшихся загрязняющих белков. Анализ геля ДСН-электрофореза подтверждает, что казеин элюируется в основном пике при 18% буфера В (Рис. 16) Узкая и симметричная форма полученного пика также указывают на чистоту полученного белка.

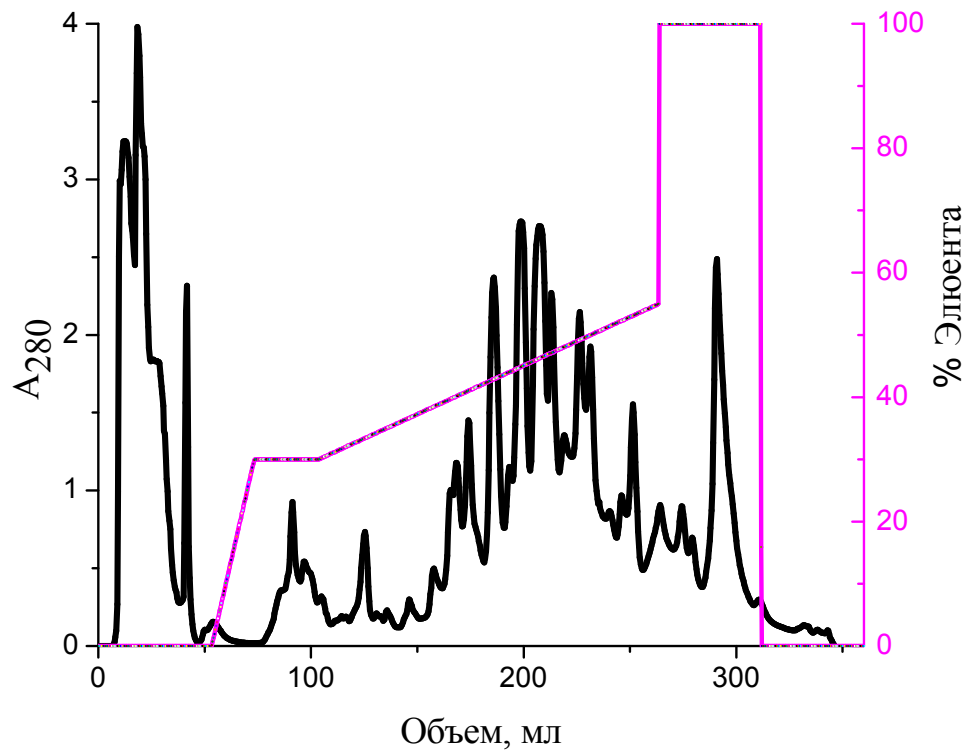


Рис. 15. Профиль элюции при очистке бактериальных лизатов методом обратнофазовой хроматографии

Бактериальный лизат наносили на колонку HR 16/10, заполненную носителем Source RPC 30 (20 мл) и уравновешенную растворителем А (H<sub>2</sub>O 95%, ацетонитрил 5%, TFA 0,1%, v/v/v). Элюцию осуществляли линейным градиентом от 25% до 60% растворителя В (H<sub>2</sub>O 20%, ацетонитрил 80%, TFA 0,08%, v/v/v) при комнатной температуре и скорости 5 мл/мин.

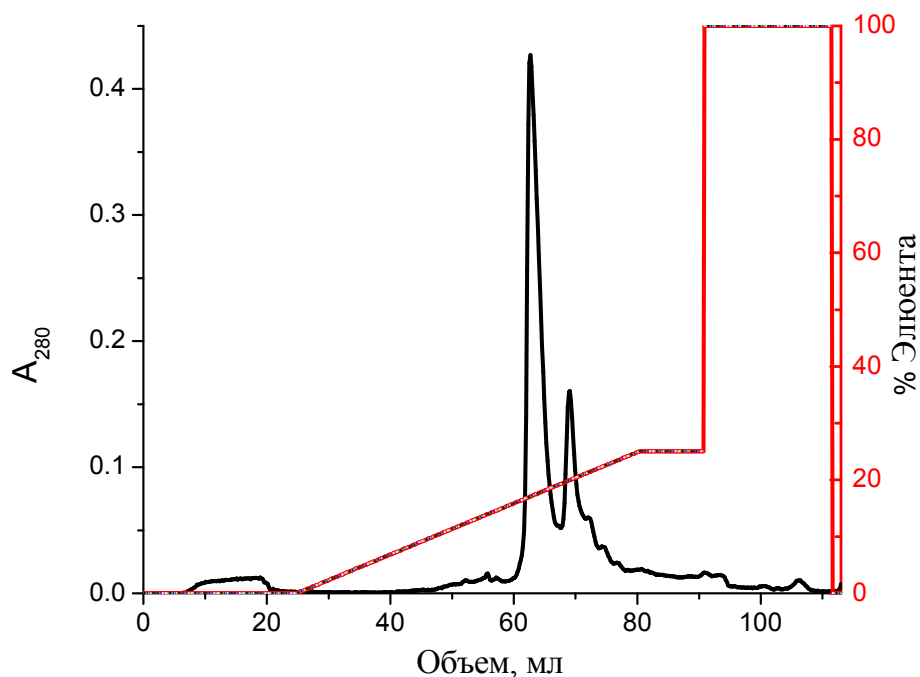


Рис. 16. Профиль элюции белков, полученный при анионообменной хроматографии фракции после первой стадии очистки

Предварительно очищенная фракция, обогащенная рекомбинантным  $\beta$ -казеином, была нанесена на колонку HR 10/10, заполненную носителем Source 15 Q (10 мл) и уравновешенную буфером А (Трис-НСl 25 мМ, рН 8,2, 4 М мочеви́на). Элюцию осуществляли буфером В (Трис-НСl 25 мМ, рН 8,2, 4 М мочеви́на, NaCl 1 М) при комнатной температуре и скорости 5 мл/мин.

После этой стадии очистки казеин находится в денатурирующих условиях (4 М мочевины) и содержит значительную концентрацию NaCl. Третий этап очистки – обратнoфазовая хроматография - позволяет удалить эти компоненты из окружения белка и перевести его в состояние, удобное для лиофилизации и последующего хранения. Белок элюируется с колонки при 50% растворителя В, также как и при первой очистке с помощью обратнoфазовой хроматографии. (Рис. 17.)

Наличие цистеина на N-конце предполагает возможность образования димеров между молекулами белка. Однако использование данной хроматографии позволяет нам избежать димеризации, т.к. при рН 2 реактивность SH-групп очень низкая.

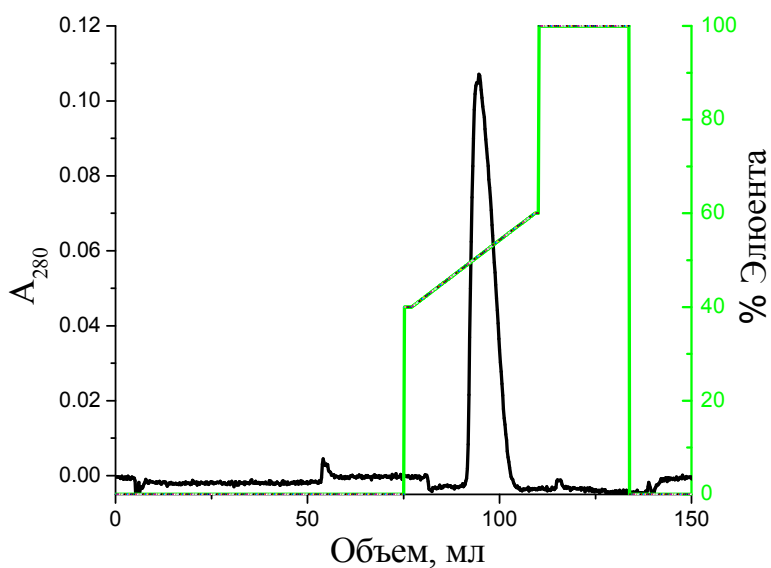


Рис. 17. Профиль элюции при очистке рекомбинантного казеина методом обратнофазовой хроматографии

Рекомбинантный казеин наносили на колонку HR 16/10, заполненную носителем Source RPC 30 (20 мл) и уравновешенную растворителем А (H<sub>2</sub>O 95%, ацетонитрил 5%, TFA 0,1%, v/v/v). Элюцию осуществляли линейным градиентом от 25% до 60% растворителя В (H<sub>2</sub>O 20%, ацетонитрил 80%, TFA 0,08%, v/v/v) при комнатной температуре и скорости 4 мл/мин.



### *Масс-спектрометрия*

Для подтверждения того, что полученные белки это действительно искомые мутанты  $\beta$ -казеина, был осуществлен масс-спектрометрический анализ с помощью ионизации электроспреем. Согласно полученным результатом (Таблица 2, Рис. 18), молекулярные массы анализируемых белков соответствуют теоретическим за вычетом молекулярной массы одной аминокислоты - метионина. Такая особенность процессинга характерна для используемой рекомбинантной системы в *E. coli*. Таким образом, это отсутствие метионина приближает рекомбинантный белок к нативной форме, так как в нативном  $\beta$ -казеине этот метионин удаляется путем посттрансляционной модификации.

Таблица 2. Массы полученных  $\beta$ -казеинов в сравнении с теоретическими.

	MW теор.	MW теор. без Met	MW эксп.
WT $\beta$ CN	23 714,5	-	23 711
$\beta$ CN C <sub>4</sub>	23 747,7	23 596,5	23 610
$\beta$ CN C <sub>208</sub>	23 761,6	23 612,4	23 624
$\beta$ CN C <sub>4-208</sub>	23 735,7	23 586,5	23 604

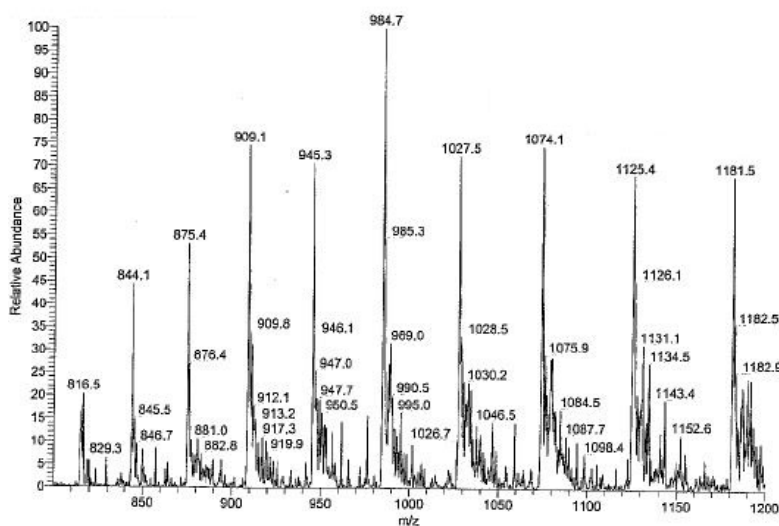


Рис. 18. Масс-спектр одного из полученных мутантов  $\beta$ -казеина

## *Исследование свойств мутантов*

### *Димеризация N- и C-концевых мутантов казеина*

В лаборатории функциональных взаимодействий белков молока были созданы мутанты  $\beta$ -казеина со вставками цистеина на N- и C-концах, которые были использованы в нашей работе. Наличие цистеина на периферии белка позволяет исследовать процесс димеризации. К тому же, так как функциональные свойства казеина при этом изменяются, такие мутанты представляются интересным объектом для изучения характерных для  $\beta$ -казеина процессов мицеллизации и агрегации.

Была исследована скорость димеризации N- и C-концевых мутантов казеина при различных температурах. Пробы инкубировали в разных буферах (используемый буфер отмечен под каждым гелем, 0,1 М Трис-HCl буфер, pH 6,8, ЭДТА 1 мМ или 50 мМ фосфатный буфер, pH 6,8, ЭДТА 1 мМ) при 60°C, 25°C и 4°C.

Анализ геля ДСН-электрофореза (Рис. 19) показывает значительные отличия в скорости димеризации двух изучаемых мутантов. C-концевой мутант обладает значительно более выраженной способностью к димеризации, чем N-концевой в обоих использованных буферах.

Разумеется, рекомбинантный казеин дикого типа не димеризуется по причине отсутствия цистеина и приведен в качестве контроля.

Зависимость скорости реакции от температуры подчиняется общему для всех химических реакций уравнению Аррениуса. Скорость димеризации в обоих буферах растет с увеличением температуры, а при 4°C образование димеров происходит чрезвычайно медленно. Те димеры, которые видны на гелях, это димеры, уже находящиеся в препаратах белка на момент растворения. В процессе же димеризации после растворения, с нашей

исходной точки, в исследуемый промежуток времени увеличения количества димера не происходит.

Кинетические кривые димеризации С- и N-концевого мутантов казеина были получены методом интегрирования оптической плотности соответствующих полос на ДСН-электрофореze с помощью программы OneDScan. Описание полученных данных было проведено методом нелинейной регрессии. Кинетические кривые димеризации аппроксимировались уравнением, соответствующим зависимости концентрации продукта реакции первого порядка от времени:  $A = a * (1 - e^{-kt})$ . Реакция димеризация описывается кинетикой второго порядка. Однако, димеризации, по всей видимости, предшествует конформационный переход белка, который может быть скоростьюлимитирующей стадией. Поскольку в нашей работе мы не ставили цель описать кинетику димеризации, для аппроксимации было использовано кинетическое уравнение, дающее большее согласование с экспериментальными данными. Представленные кривые носят скорее иллюстративный характер и используются в работе для сравнения скоростей димеризации между мутантами.

Надежная аппроксимация кинетических кривых была получена для 60 и 25 градусов в фосфатном буфере (Рис.20). В остальных случаях метод нелинейной регрессии дал неопределенные данные по причине сильной линейной зависимости входных данных. Результаты аппроксимации представлены в таблице 3, из которой следует, что при 25 градусах С-концевой мутант димеризуется примерно в 10 раз быстрее, чем N-концевой. При температуре 60 градусов константы скорости димеризации различаются еще сильнее (почти в 20 раз).

Таблица 3. Оценочные значения констант скорости димеризации мутантов казеина при различных температурах.

<i>Температура, °C</i>	<i>k, мин<sup>-1</sup></i>	
	<i>Мутант С4</i>	<i>Мутант С208</i>
<i>25</i>	<i>0,004</i>	<i>0,04</i>
<i>60</i>	<i>0,008</i>	<i>0,148</i>

Таким образом, при температурах 25 и 60°C димеризация С-концевого мутанта С208 происходит значительно легче, чем N-концевого мутанта С4. При этом при температуре +4 градуса разница в скорости нивелируется. Логично предположить, что при димеризации N-концевого мутанта С4 взаимодействие молекул будет осложнено электростатическим отталкиванием одноименно заряженных участков. Тогда как димеризация С-концевого мутанта облегчается гидрофобными взаимодействиями. При понижении температуры они ослабляются и скорость димеризации падает (Рис. 21).

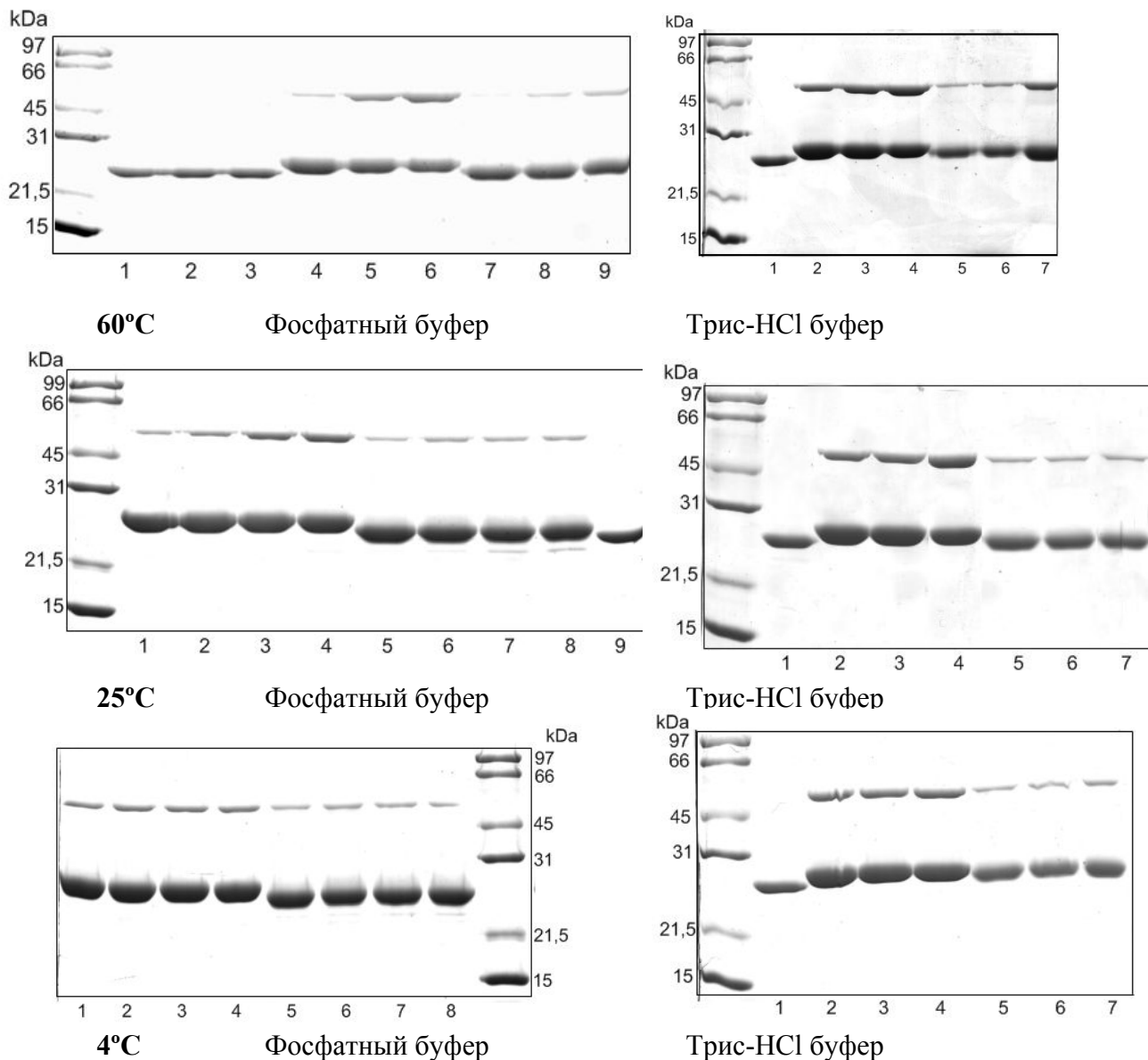


Рис. 19. Результат ДСН-электрофореза, иллюстрирующий димеризацию рекомбинантных казеинов при рН 6,8 и температурах 4°C, 25°C и 60°C

60°C – фосфатный буфер :

- 1, 2, 3 – WT, 0, 10 мин, 1 ч.
- 4, 5, 6 – C208, 0, 10 мин, 1 ч.
- 7, 8, 9 – C4, 0, 10 мин, 1 ч.

25°C – фосфатный буфер :

- 1, 2, 3, 4 – C208, 0, 1 ч, 10 ч, 24 ч.
- 5, 6, 7, 8 – C4, 0, 1 ч, 10 ч, 24 ч.
- 9 – WT.

4°C – фосфатный буфер :

- 1, 2, 3, 4 – C208, 0, 1 ч, 10 ч, 24 ч.
- 5, 6, 7, 8 – C4, 0, 1 ч, 10 ч, 24 ч.

60°C – Трис-НСІ буфер :

- 1 – WT.
- 2, 3, 4 – C208, 0, 10 мин, 1 ч.
- 5, 6, 7 – C4, 0, 10 мин, 1 ч.

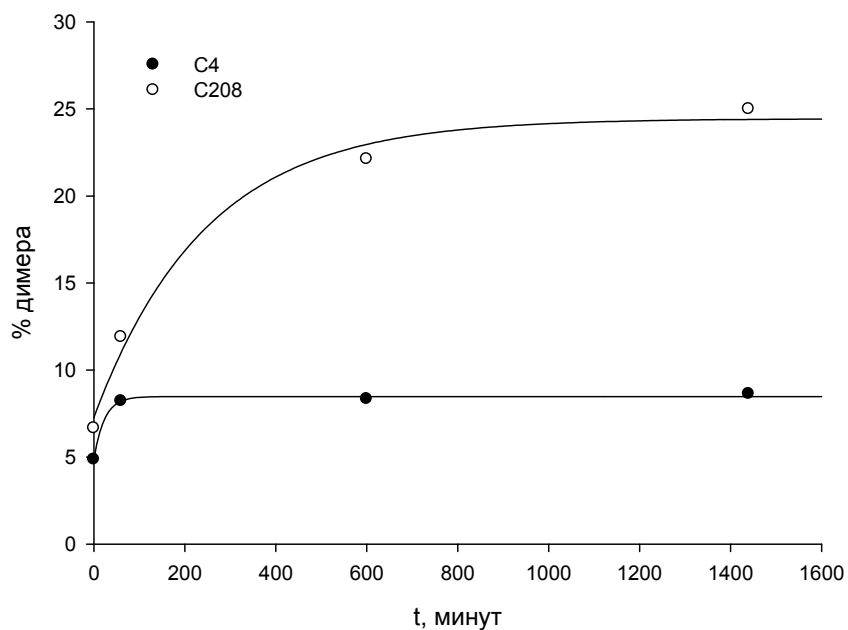
25°C – Трис-НСІ буфер :

- 1 – WT.
- 2, 3, 4 – C208, 0, 1 ч, 48 ч.
- 5, 6, 7 – C4, 0, 1 ч, 48 ч.

4°C – Трис-НСІ буфер :

- 1 – WT.
- 2, 3, 4 – C208, 0, 1 ч, 48 ч.
- 5, 6, 7 – C4, 0, 1 ч, 48 ч.

А



Б

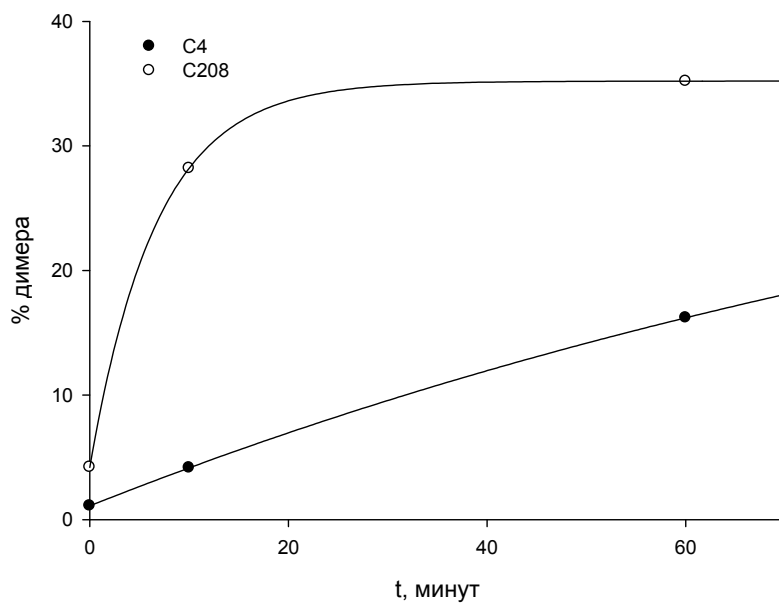


Рис. 20. Кинетические кривые димеризации мутантов С4 и С208  $\beta$ -казеина в 50 мМ фосфатном буфере, рН 6,8, ЭДТА 1 мМ при 25 (А) и 60°C (Б).

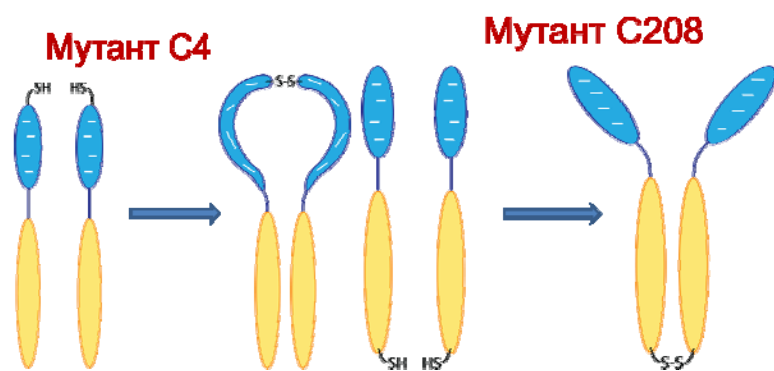


Рис. 21. Схема димеризации цистеинилированных мутантов



### *Мультимеризация двойного мутанта С4-208*

Наличие двух цистеинов на концах белковой молекулы придает мутанту  $\beta$ -казеина С4-208 повышенную способность к полимеризации и делает его интересным объектом для изучения процесса мицеллизации.

В данной работе была показана высокая реакционная способность этой мутантной формы белка, что хорошо видно на электрофореграмме (Рис. 22). Уже при растворении белок обнаруживается в разных полимерных формах, а через 2 часа мономерная форма практически исчезает. По всей видимости, такой белок может формировать длинные цепочки, образуя высокомолекулярные сшитые полимеры.

Интересной особенностью этого мутанта оказалась способность к формированию формы с кажущейся молекулярной массой около 20 кДа. Исчезновение этой полосы при добавлении  $\beta$ -меркаптоэтанола свидетельствует о том, что эта форма не является продуктом гидролиза. Мы предполагаем, что это может быть кольцевая форма с аномальной электрофоретической подвижностью. Возможность такого взаимодействия свидетельствует о гибкости отдельных участков последовательности и их способности взаимодействовать друг с другом.

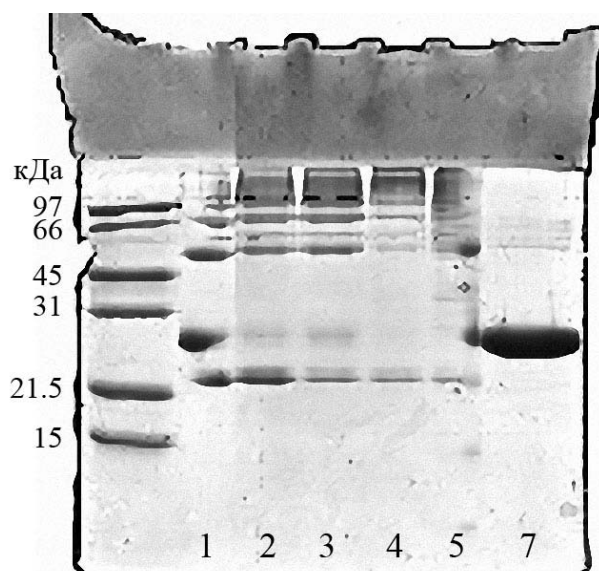


Рис. 22. ДСН-электрофорез мутантной формы  $\beta$ -казеина С4-208 после полимеризации.

Лиофилизированный рекомбинантный  $\beta$ -казеин С4-208 растворяли в 50 мМ Трис-НСl, рН 8.2, 80 мМ NaCl, 0,05% азид натрия, до конечной концентрации 20 мкМ и при 37°C в течение 0, 1, 2, 4, 20 часов (1, 2, 3, 4, 5, соответственно, 7 – проба через 48 часов, восстановленная  $\beta$ -меркаптоэтанолом.

*Изучение влияния димеризации на процесс образования мицелл методом ДЛС*

С помощью метода динамического лазерного светорассеяния было изучено влияние димеризации на формирование казеином мицелл. Гидродинамический диаметр мономеров казеина составляет около 7 нм, а диаметр образующихся мицелл составляет примерно 24-26 нм.

На Рис. 23 можно видеть, что отсутствие фосфорилирования у рекомбинантного  $\beta$ -казеина практически не отражается на способности к мицеллизации, незначительно увеличивая температуру перехода в мицеллярное состояние. N-концевой мутант С4 демонстрирует отсутствие влияния на кривую мицеллизации, как в димерной, так и в мономерной форме.

При этом димеризация по С-концевому остатку цистеина приводит к ощутимому облегчению мицеллизации, которое снимается добавлением  $\beta$ -меркаптоэтанола.

Двойной мутант эффективно полимеризуется, обнаруживая на электрофорезе все возможные олигомеры. При этом кривая мицеллизации значительно сдвинута в сторону меньших температур - фактически с 10-15 градусов белок представлен в растворе в виде самоассоциатов.

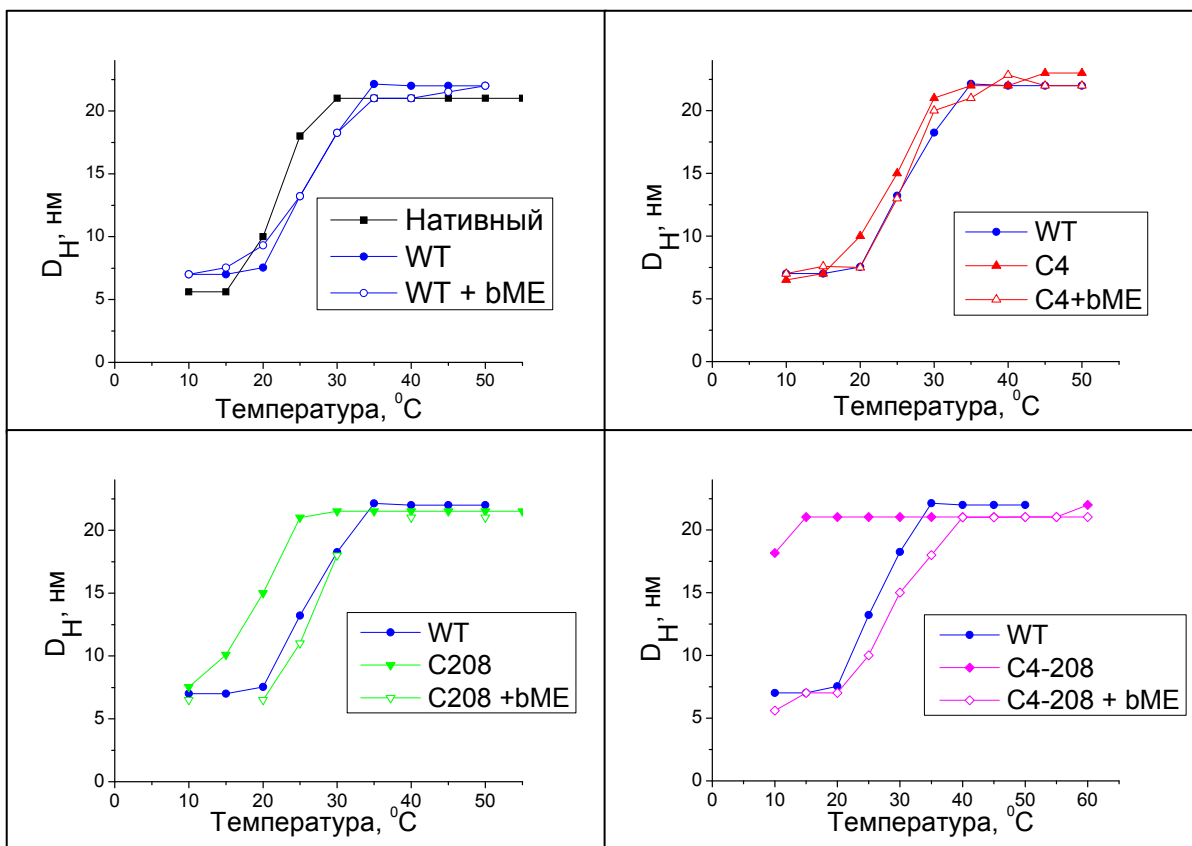


Рис. 23. Гидродинамический диаметр мицелл  $\beta$ -казеинов, полученный с помощью метода динамического светорассеяния

Лиофилизированные белки растворяли в 50 мМ ТрисHCl, 80 мМ NaCl, pH 8,2 до конечной концентрации 20 мкМ. Для получения преимущественно димерной формы мутантные белки инкубировали в присутствии слабого окислителя (60 мкМ перекисью водорода) в течение суток при 37 $^{\circ}\text{C}$ .

Изучение влияния димеризации и мицеллизации на вторичную структуру казеина методом кругового дихроизма (КД)

Спектры кругового дихроизма нативного и рекомбинантных казеинов имеют типичную для неструктурированных белков форму. Однако также во всех полученных спектрах можно наблюдать небольшое количество  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев. При температуре 22°C, когда казеин в растворе находится еще преимущественно в мономерном состоянии, минимум эллиптичности имеет значение около -28 000 для нативного казеина и уменьшается в абсолютном значении для мутантных форм в ряду дикой тип, С4, С4-208, С208 до значения -22 000 (Рис. 24.).

Минимум эллиптичности нативного и рекомбинантного  $\beta$ -казеина дикого типа находится на длине волны 199 нм (Рис. 24.). То есть фосфорилирование нативного белка практически не оказывает влияния на вторичную структуру казеина. Однако для димерных и полимерных форм наблюдается сдвиг от 199 до 202 нм. На обогащение этих форм  $\alpha$ -спиральными элементами структуры указывает положительное значение эллиптичности при длине волны 190 нм.

При повышении температуры до 38°C равновесие между мономерной и мицеллярной формой смещается в сторону мицелл. На Рис. 25. можно видеть, что в мицеллярной форме форма спектров мутантов аналогична спектру нативного белка.

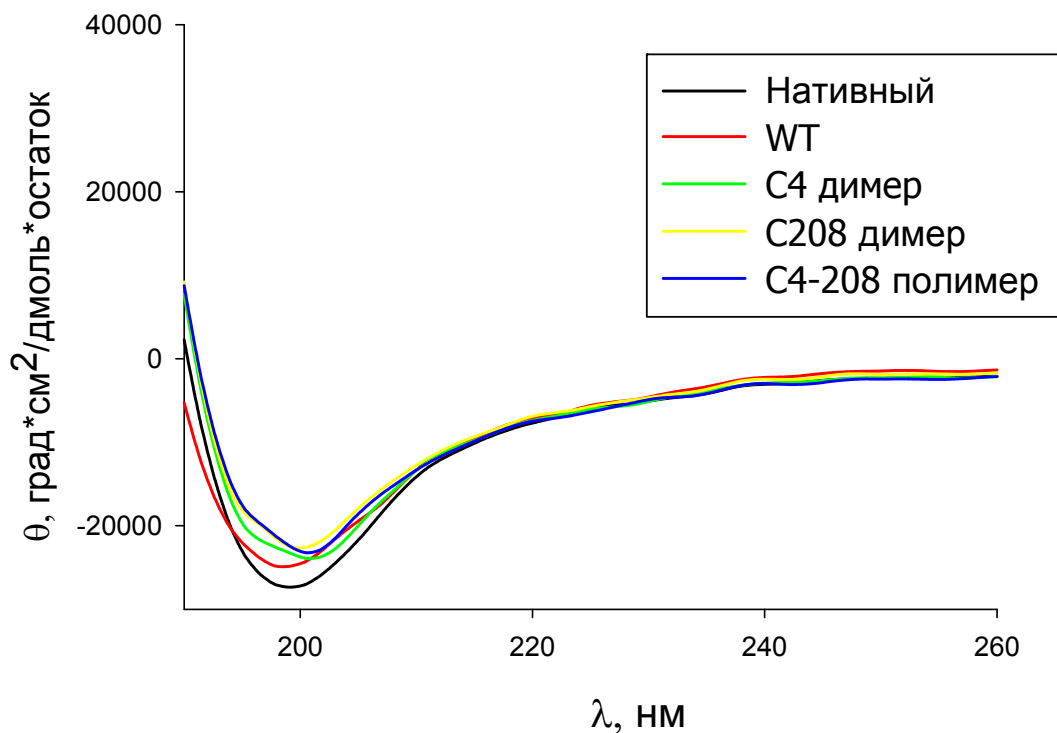


Рис. 24. Спектры кругового дихроизма в дальнем ультрафиолете для мономерного (не мицеллизованного) состояния разных форм  $\beta$ -казеина (нативный - черный, дикий тип - красный, C4 - зеленый, C208 - желтый, C4-208 - синий) при температуре 22°C.

Лиофилизированные  $\beta$ -казеины растворяли в 50 мМ Трис-НСl, рН 8,2, 80 мМ NaCl, 0,05% азид натрия, до конечной концентрации 20 мкМ и инкубировали с 60 мМ  $H_2O_2$  при 37°C в течение 24 часов для образования димеров (полимеров в случае двойного мутанта C4-208).

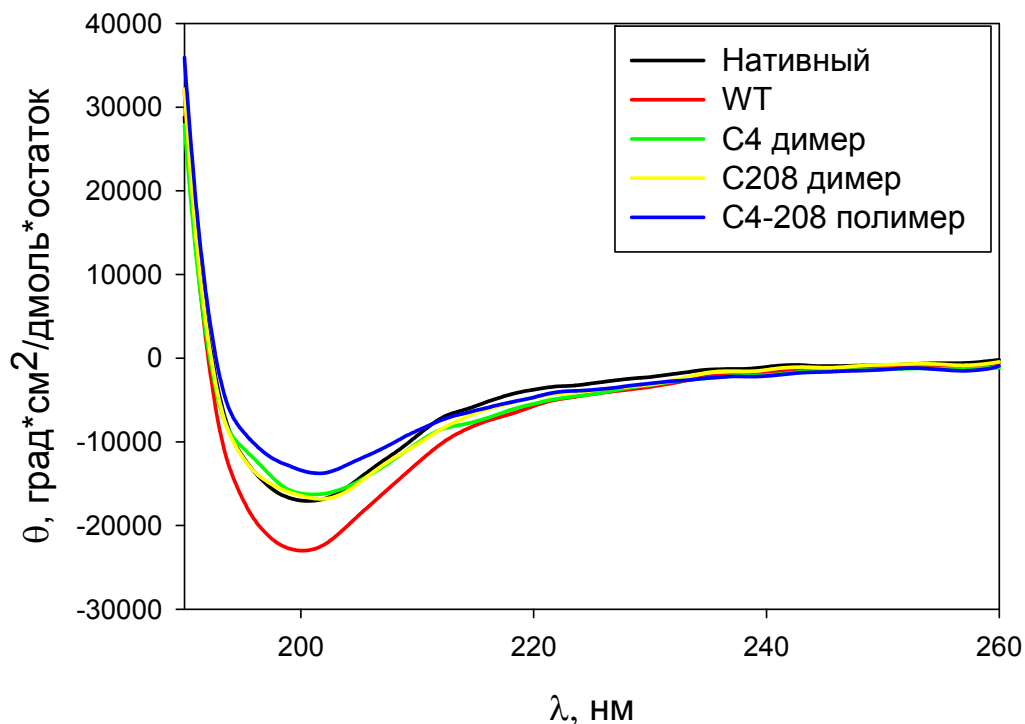


Рис. 25. Спектры кругового дихроизма в дальнем ультрафиолете для мицеллизованного состояния разных форм  $\beta$ -казеина (нативный - черный, дикий тип - красный, С4 - зеленый, С208 - желтый, С4-208 - синий) при температуре 38°C.

Лиофилизированные  $\beta$ -казеины растворяли в 50 мМ Трис-НСl, рН 8.2, 80 мМ NaCl, 0,05% азид натрия, до конечной концентрации 20 мкМ и инкубировали с 60 мМ  $H_2O_2$  при 37°C в течение 24 часов для образования димеров (полимеров в случае двойного мутанта С4-208).

Разложение спектров на составляющие для получения информации о влиянии димеризации и мицелляризации на вторичную структуру  $\beta$ -казеина проводили с помощью K2D Интернет-ресурса (<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/>). Поскольку данный метод предназначен для структурированных белков, применять его для количественной оценки вторичной структуры развернутых белков следует с осторожностью, скорее как показатель качественных изменений и тенденций.

В Таблице 4 и на Рис. 26. представлено разложение спектров КД для мономерных и мицеллярных форм нативного и рекомбинантных  $\beta$ -казеинов. Несмотря на приблизительность количественной оценки, можно сказать, что димеризация и полимеризация приводит к увеличению  $\alpha$ -спиралей в структуре белка для всех мутантных форм. Одновременно снижающееся количество  $\beta$ -слоев указывает на то, что не происходит структуризации по амилоидному типу.



	нативный	Дикий тип	C4	C208	C4-208
$\alpha$ -спирали, %	29	28	38	39	40
$\beta$ -слои, %	28	31	17	16	16
Неорг. участки, %	43	41	45	44	44

Таблица 4. Разложение КД спектров разных форм казеинов в немиецеллярной форме

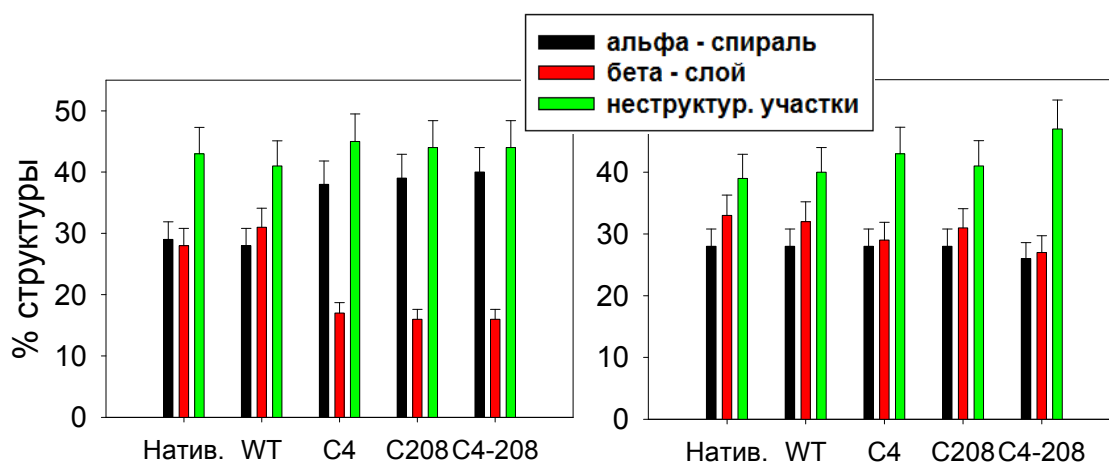


Рис. 26. Разложение КД спектров разных форм  $\beta$ -казеина в немиецеллярной (слева) и в мицеллярной (справа) форме

### *Протеолиз трипсином*

Протеолиз пищеварительными ферментами был осуществлен для исследования влияния димеризации и полимеризации на структуру и свойства  $\beta$ -казеина. Используемые соотношения фермент/субстрат (E/S) приводят к гидролизу до устойчивых к действию трипсина уже после 1 часа инкубации (Рис. 27.). На электрофореграмме (16,5% полиакриамидный гель) можно видеть, что для всех форм казеина остаются два пептида с массой  $\sim 6$  и  $\sim 5$  кДа, которые соответствуют пептидам 49-97 (5319 Да) и 114-169 (6362 Да) (Рис. 28.). В начальной точке до добавления трипсина видно, что С4 и С208 находятся преимущественно в димерной форме, а двойной мутант С4-208 в полимерной.

Наличие цистеина на N-конце приводит к появлению дополнительной размытой полосы с массой около 10 кДа у мутантов С4 и С4-208, у мутанта С208 такая полоса отсутствует.

Образование этого большого пептида не объясняется наличием "удвоенного" пептида вследствие наличия сайта расщепления в самом начале последовательности, и даже если он "спрятан" в димере, масса такого пептида должна быть около 5, а не 10 кДа. Следовательно, при сшивании через N-конец появляются недоступные для расщепления участки.

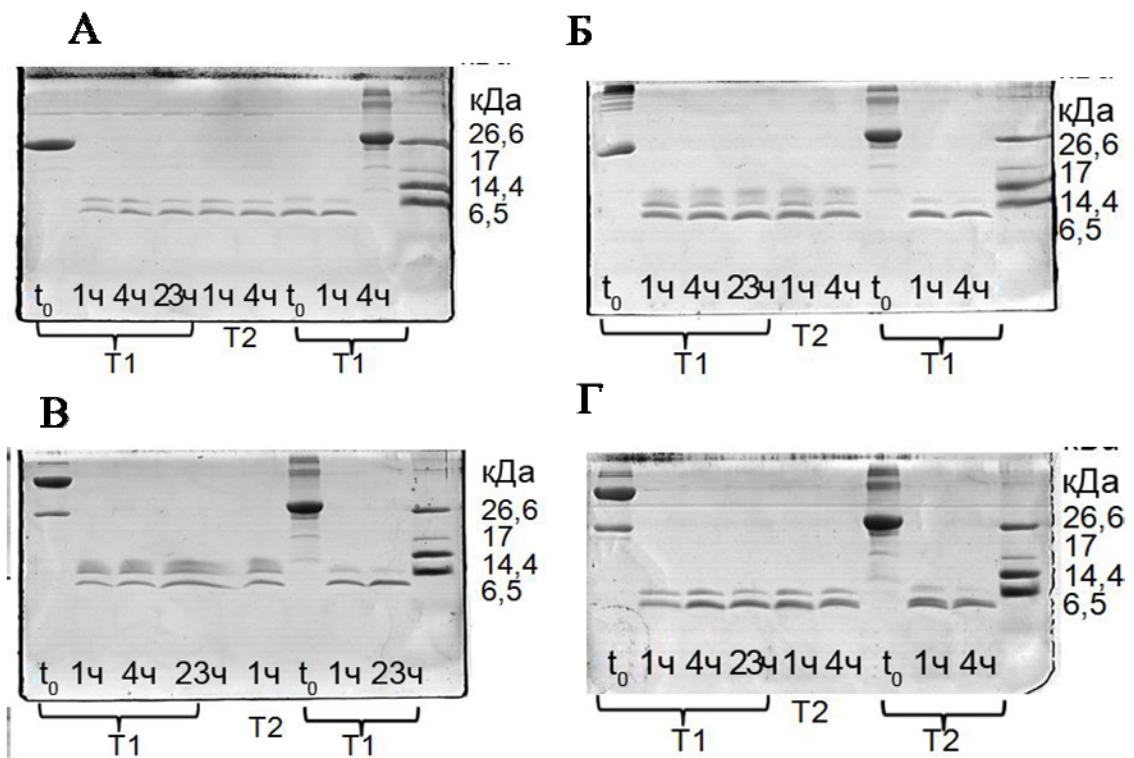


Рис. 27. Расщепление разных форм  $\beta$ -казеина WT(A), C4-208 (Б), С4 (В), С208 (Г) в сравнении с расщеплением нативного  $\beta$ -казеина (справа на каждом геле, три дорожки).

Лиофилизированные  $\beta$ -казеины растворяли в 50 мМ Трис-НСl, рН 8, до конечной концентрации 40 мкМ и инкубировали при температуре 37°C с трипсином в соотношении Е/С (фермент/субстрат) Т1 = 0,2%, Т2 = 0,5%.

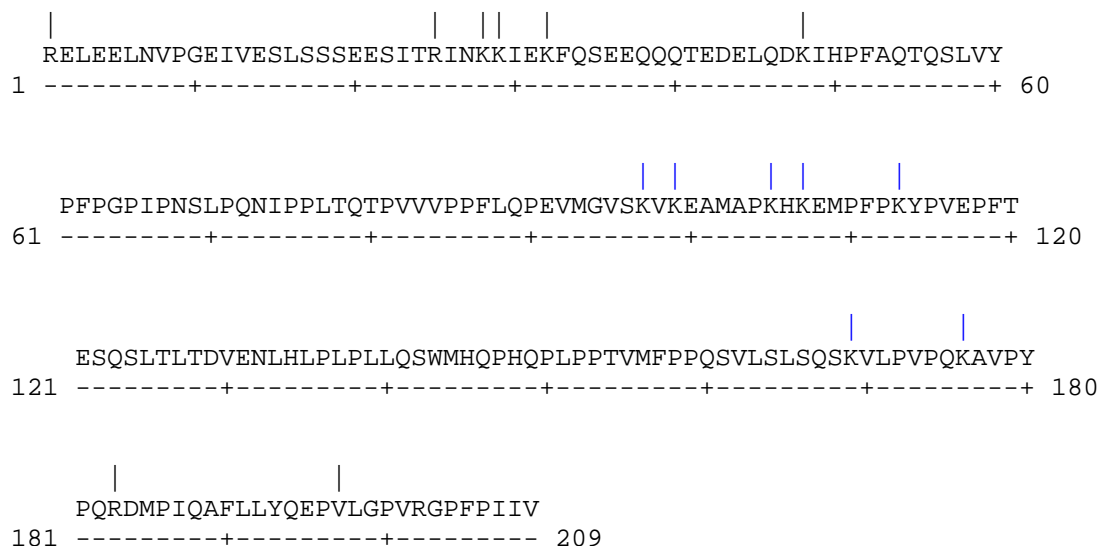


Рис. 28. Сайты расщепления трипсином  $\beta$ -казеина.

С помощью аналитической обратнофазовой ВЭЖХ были проанализированы исходные белки, а затем и гидролизаты. На профиле элюции (Рис. 29) можно видеть, что нативный  $\beta$ -казеин более гидрофилен, чем мутанты, так как он элюируется при более низкой концентрации ацетонитрила. Это объясняется вкладом фосфорилирования, нативный белок имеет 5 остатков фосфорной кислоты на N-конце.

Наиболее гидрофильный характер, даже по сравнению с нативным, имеет димер С208, вероятно, в этом случае происходит максимальная компактизация гидрофобных "хвостов". Наиболее гидрофобные свойства продемонстрировал С4 (димер и небольшое плечо мономера), а также мономерная форма С4-208.

На Рис. 30 представлен профиль элюции пептидов после 4 часов расщепления трипсином в соотношении 0,5%. Видно, что в целом профили идентичны, однако есть некоторые отличия. Некоторые пептиды нативного  $\beta$ -казеина смещены в область меньшей концентрации ацетонитрила, видимо, это фосфорилированные пептиды. Интересно, что нет заметных отличий между С4, С4-208 и нативным, которые наблюдались на электрофорезе в виде более крупного пептида. Однако можно видеть два более гидрофильных пептида у С208, что соотносится с аналогичным его поведением на предыдущем профиле разделения целых белков.

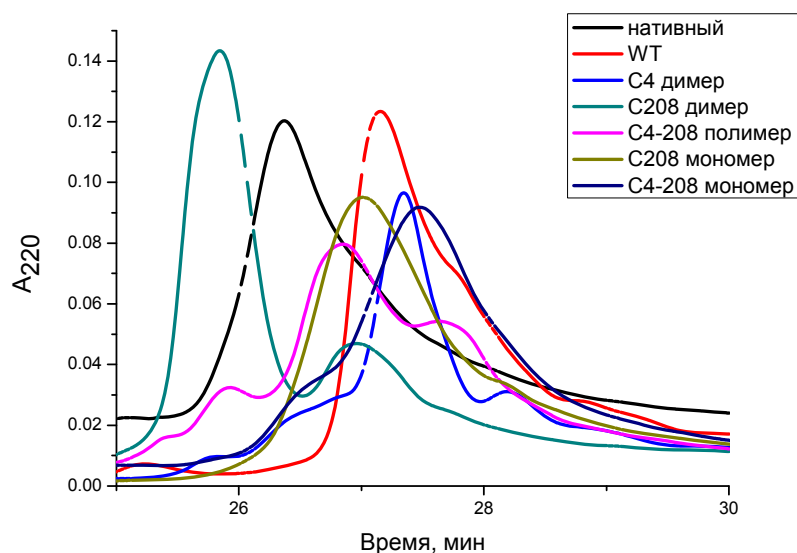


Рис. 29. Профиль элюции разных форм  $\beta$ -казеинов (аналитическая ВЭЖХ, обратнофазовая хроматография)

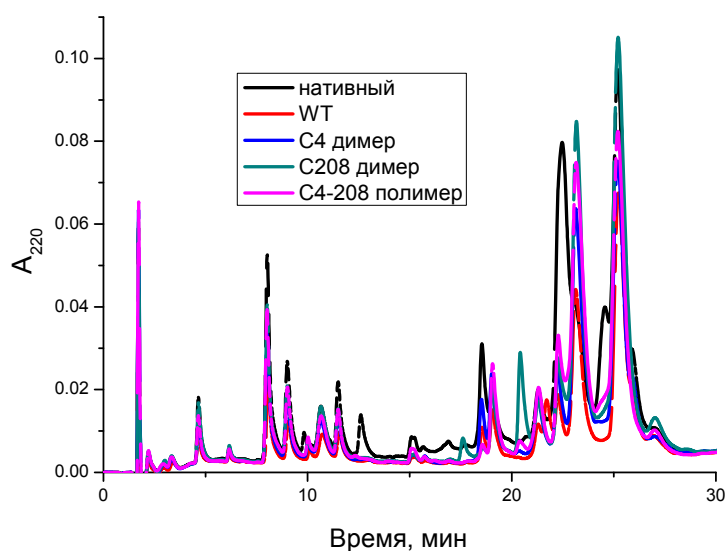


Рис. 30. Профиль элюции разделения пептидов после расщепления разных форм  $\beta$ -казеинов трипсином (аналитическая ВЭЖХ, обратнофазовая хроматография)

Лиофилизированные  $\beta$ -казеины растворяли в 50 мМ Трис-НСl, рН 8, до конечной концентрации 40 мкМ и инкубировали 4 часа при температуре 37°C с трипсином в соотношении Е/С 0,5%.

### *Расщепление пепсином*

Расщепление пепсином проводили в кислой среде с рН 2,5 для создания оптимальных условий ферменту. В этих условиях, согласно данным ДЛС,  $\beta$ -казеин не способен образовывать мицеллы.

На электрофореграмме гидролизатов (Рис. 31) можно видеть, что для всех рекомбинантных форм  $\beta$ -казеина характерно наличие пептида с молекулярной массой около 6,5 кДа, отсутствующего у нативного белка. Наличие "удвоенного" за счет сшивки пептида маловероятно, так как он одинаков и у димера С208. Этот пептид был вырезан из геля и проанализирован с помощью масс-спектрометрии (MALDI TOF). Так, после пепсинолиза, был идентифицирован пептид 32-49, отмеченный желтым цветом на Рис. 32. Следовательно, отсутствие фосфорилирования приводит к снижению доступности N-концевого региона для расщепления пепсином.

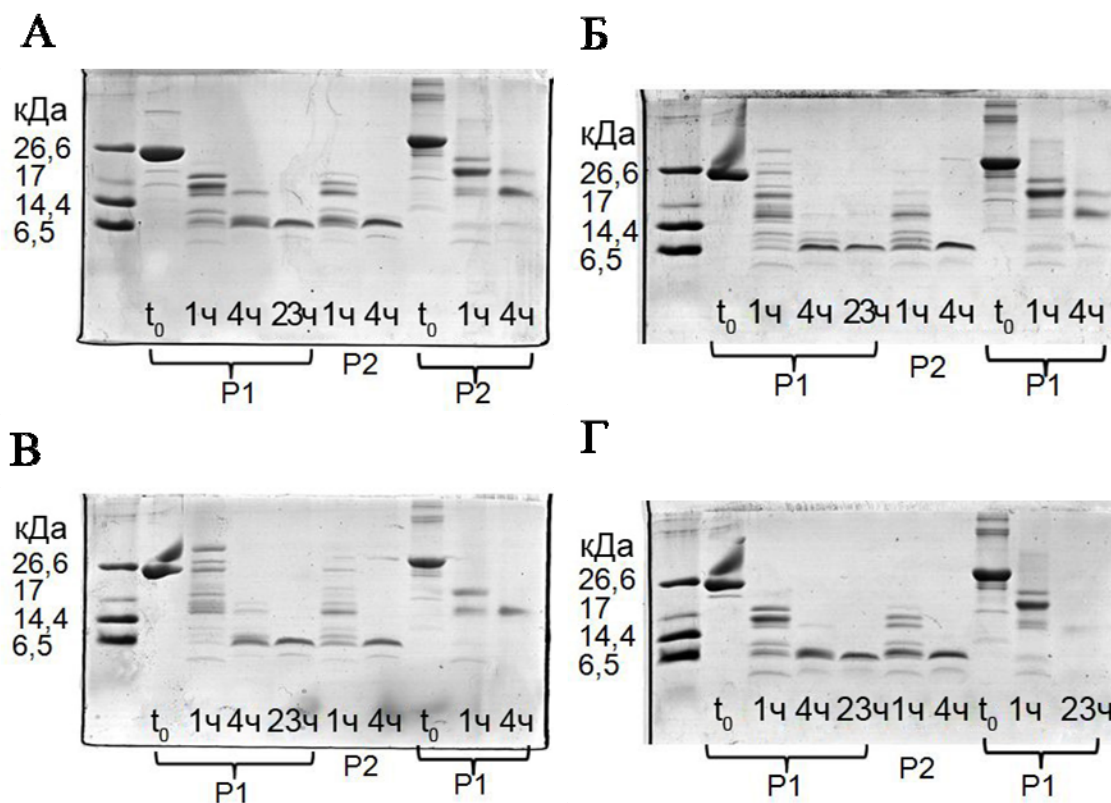


Рис. 31. Расщепление пепсином разных форм  $\beta$ -казеина WT(A), C4-208 (B), C4 (C), C208 (D) в сравнении с расщеплением нативного  $\beta$ -казеина (справа на каждом геле, три дорожки).

Лиофилизированные  $\beta$ -казеины растворяли в 50 мМ глициновом буфере, pH 2,5, до конечной концентрации 40 мкМ и инкубировали при температуре 37°C с пепсином в соотношении E/S P1 = 0,05%, P2 = 0,1%.

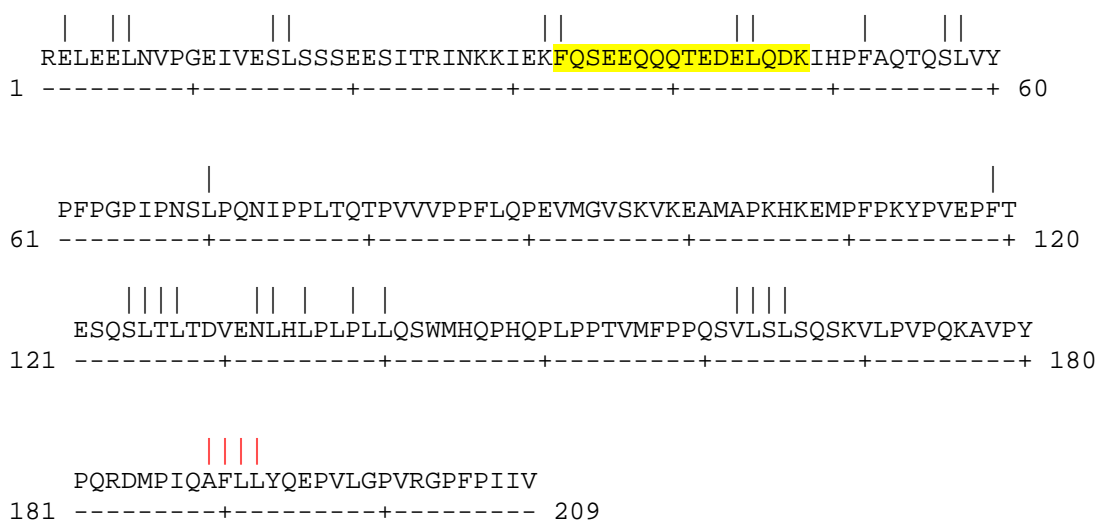


Рис. 32. Сайты расщепления пепсином  $\beta$ -казеина.

На Рис. 33. можно видеть профили элюции гидролизатов  $\beta$ -казеинов после 4 часового протеолиза с пепсином в соотношении 0,1%. Как и в случае расщепления пепсином, профили совпадают за некоторыми исключениями. Снова наблюдаются более гидрофильные пептиды у нативного фосфорилированного белка.

Однако снова не удается обнаружить пептид, который проявляется на электрофореze, видимо, этот пептид обладает похожей гидрофобностью и маскируется другими.

На Рис. 34. представлены профили элюции гидролизатов после более мягкого протеолиза пепсином. Анализируя профили, можно видеть, что восстановление димерных "удвоенных" пептидов не возвращает профили мутантов к профилю дикого типа, то есть вставка цистеина оказывает некоторое влияние на гидрофильность полученных пептидов.



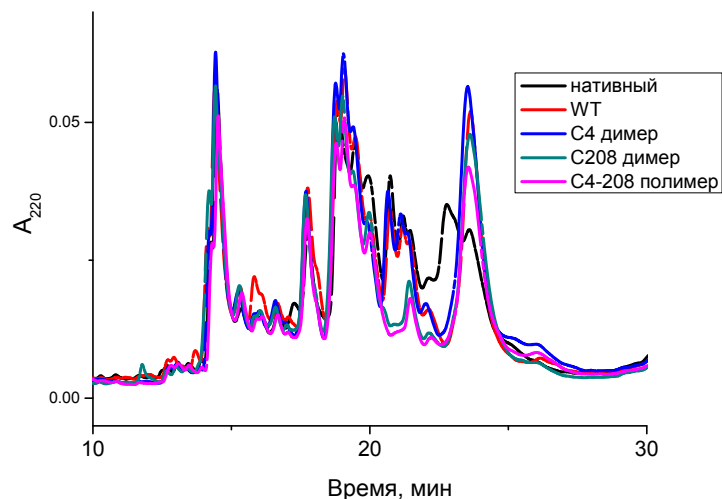
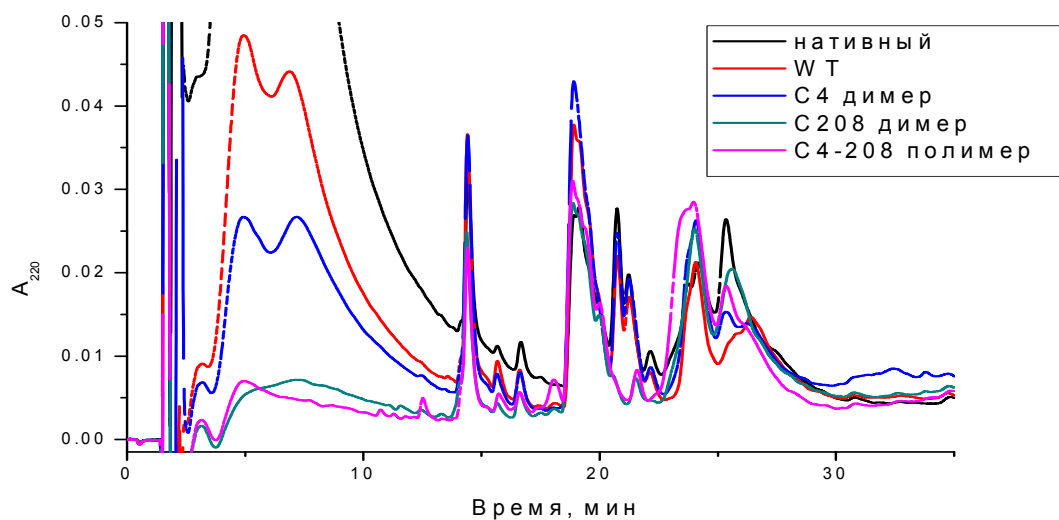


Рис. 33. Профиль элюции разделения пептидов после расщепления разных форм  $\beta$ -казеинов пепсином (аналитическая ВЭЖХ, обратнофазовая хроматография)

Лиофилизированные  $\beta$ -казеины растворяли в 50 мМ глициновом буфере, рН 2,5, до конечной концентрации 40 мкМ и инкубировали 4 часа при температуре 37°C с пепсином в соотношении E/S 0,1%.

А



Б

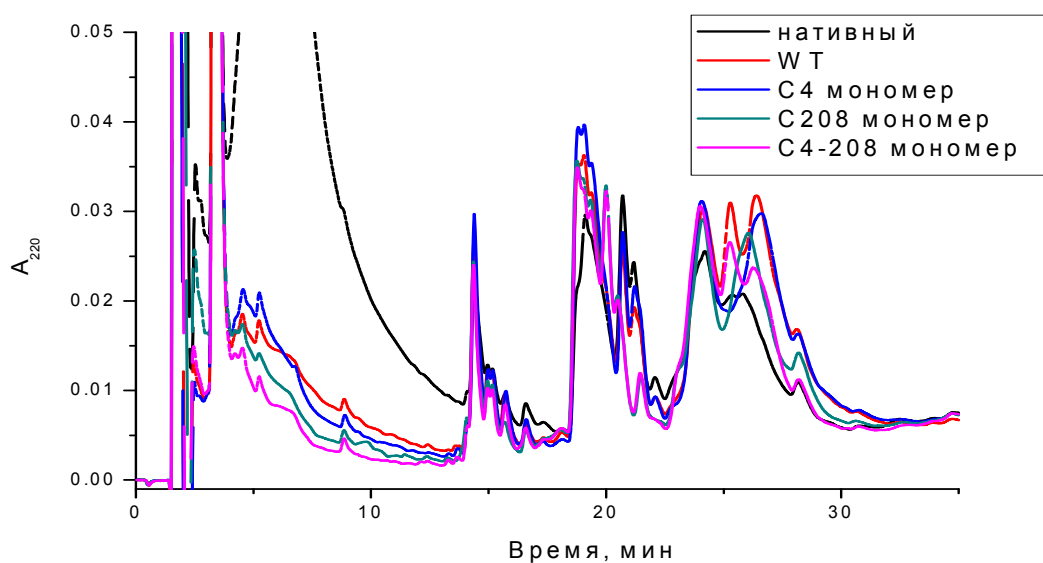


Рис. 34. Профиль элюции разделения пептидов после расщепления разных форм  $\beta$ -казеинов пепсином без (А) и в присутствии  $\beta$ -меркаптоэтанола (Б) (аналитическая ВЭЖХ, обратнофазовая хроматография)

Лиофилизированные  $\beta$ -казеины растворяли в 50 мМ глициновом буфере, рН 2,5, до конечной концентрации 40 мкМ и инкубировали 1 час при температуре 37°C с пепсином в соотношении Е/С 0,05%.

## ***Гомоцистеинилирование нативных казеинов молока***

Особенности гомоцистеинилирования естественно развернутых белков были исследованы нами в данной части работы, в том числе, на примере трех основных молочных казеинов:  $\alpha$ S1-казеина,  $\kappa$ -казеина и  $\beta$ -казеина, основные свойства которых суммированы в таблице 1. С одной стороны, все три исследованных нами казеина относятся к группе белков с частично неупорядоченной структурой (Thorn *et al.*, 2008, Tompa, 2002), а с другой, представляют три принципиально разных класса неупорядоченных белков:  $\alpha$ S1-казеин не образует мицелл,  $\kappa$ -казеин хотя и не образует мицелл, но может димеризоваться или олигомеризоваться за счет присутствия сульфгидрильных групп, а  $\beta$ -казеин формирует мицеллы, благодаря своей амфифильности (Horne, 2002) и также считается "реоморфным", то есть подстраивающим структуру под окружение, белком (Holt and Sawyer, 1988). Таким образом, использование трех разных классов естественно развернутых белков позволяет оценить вклад структурной организации белковых и надбелковых структур в формирование агрегатов. Нами был также изучен индустриальный  $\beta$ -казеин, представляющий собой смесь  $\beta$ -казеина и  $\kappa$ -казеина, в качестве объекта, свойства которого наиболее близки к свойствам подвергающихся гомоцистеинилированию смесей молочных казеинов, а также к свойствам полибелковых надмолекулярных структур, присутствующих в биологических жидкостях. Проведение данной работы необходимо для понимания процессов, которые происходят при гомоцистеинилировании естественно развернутых белков, формирующих надмолекулярные структуры (Farrell *et al.*, 2006, Horne, 2002), и, особенно, их роли в формировании амилоидных структур. Кроме того, следует также отметить, что коровье молоко и сыворотка содержат микромолярные концентрации N-связанного с белком гомоцистеина (Jakubowski *et al.*, 2008),

и, следовательно, такого рода процессы могут иметь важное значение для регуляции потребительских свойств молока (стабильность эмульсионных свойств при хранении, особенности створаживания, эффективность отделения сыворотки и т.д.). Не менее важно учитывать возможное влияние N-связанного с белком гомоцистеина, прежде всего казеина, на особенности переваривания и всасывания других белковых компонентов пищи, включая такие амилоидогенные белки, как прионы. Исследование гомоцистеинилирования отдельных казеинов и их смесей необходимо также для проведения исследований по модификации свойств молочных продуктов с помощью генно-инженерных казеинов, влияющих на их агрегационное состояние.

Таким образом, в данной части работы было исследовано влияние гомоцистеинилирования на агрегационное состояние и амилоидогенные превращения разных классов изолированных молочных казеинов, как представителей естественно неструктурированных белков.

#### *Характеристика использованных препаратов казеина*

В данной работе были использованы нативные  $\alpha$ S1,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеины, полученные при хроматографическом разделении казеиновой фракции коровьего молока, а также препарат  $\beta$ -казеина промышленного происхождения. На Рис. 35. представлены результаты электрофореза используемых белков.

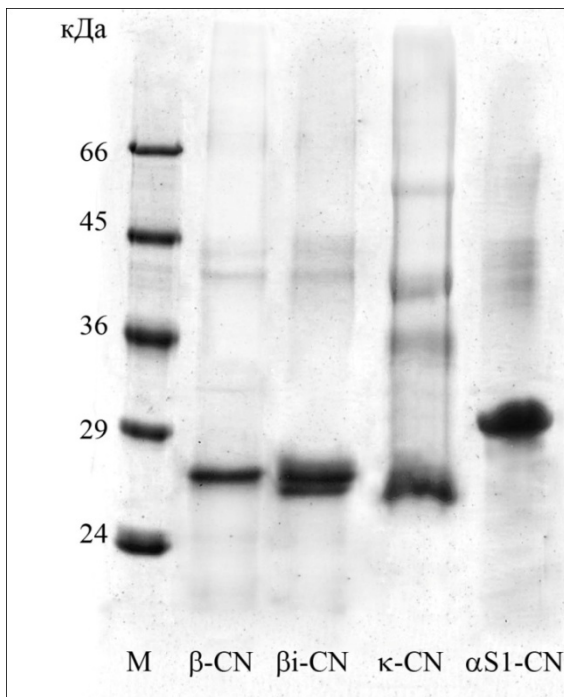


Рис. 35. Электрофореграмма четырех препаратов казеинов.

ДСН-электрофорез в невосстанавливающих условиях проводили в 12% полиакриламидном геле. М - маркеры молекулярных масс (24-66 кДа);  $\beta$ -CN – нативный  $\beta$ -казеин;  $\beta$ i-CN -  $\beta$ -казеин промышленной очистки;  $\kappa$ -CN -  $\kappa$ -казеин;  $\alpha$ S1-CN -  $\alpha$ S1-казеин.

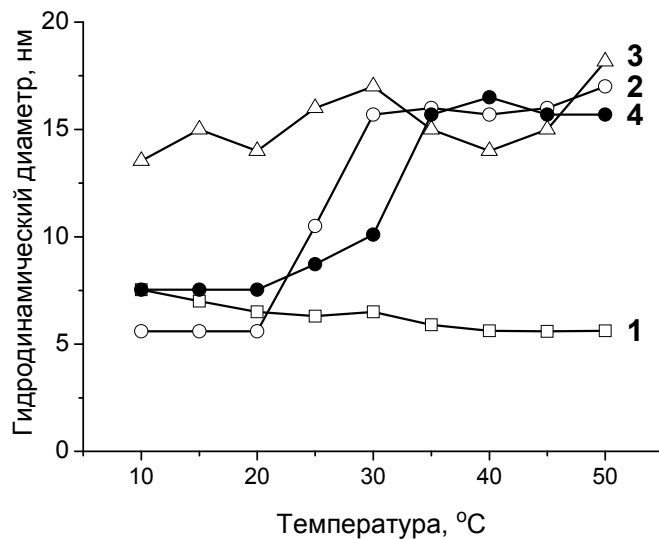


Рис.36. Температурная зависимость гидродинамического диаметра казеинов. Измерения проводили методом динамического лазерного светорассеяния с растворами казеинов (1 мг/мл) в 25 мМ фосфатном буфере, рН 7,5.  $\alpha$ S1-казеин (1, □),  $\beta$ -казеин (2, ○),  $\kappa$ -казеин (3, △),  $\beta$ i-казеин промышленной очистки (4, ●).

Благодаря значительному обогащению аминокислотной последовательности казеинов пролинами, все они обладают аномальной электрофоретической подвижностью, то есть демонстрируют кажущуюся молекулярную массу выше теоретической (19, 23 и 24 кДа для  $\kappa$ -,  $\beta$ - и  $\alpha$ S1-казеина, соответственно). Основным объектом данного исследования  $\beta$ -казеин практически гомогенен по данным электрофореза, а  $\alpha$ S1-казеин содержит некоторое количество минорных компонентов. Наиболее гетерогенен препарат  $\kappa$ -казеина, однако это обусловлено не присутствием примесей. Наличие нескольких полос прежде всего связано с образованием дисульфидных связей между молекулами белка, так как  $\kappa$ -казеин в процессе очистки подвергается восстановлению 50 мМ ДТТ в течение часа при нагревании, а потом в процессе хроматографии и последующих лиофилизации, хранения и растворения частично олигомеризуется. Кроме того, неравномерное гликозилирование  $\kappa$ -казеина также приводит к появлению размытых полос.

В индустриальном препарате  $\beta$ -казеина присутствует дополнительная полоса с меньшей молекулярной массой, которая не является продуктом протеолиза  $\beta$ -казеина (антитела против  $\beta$ -казеина не взаимодействуют с ней) и по молекулярной массе соответствует  $\kappa$ -казеину. Мы полагаем, что использованный нами препарат индустриального казеина содержит примесь  $\kappa$ -казеина, поскольку известно о взаимодействии между двумя этими белками. Исходя из Рис. 35 с помощью программы OneDScan была подсчитана чистота препарата индустриальной очистки - 73%.

На следующем рисунке представлены данные о влиянии температуры на изменение агрегационного состояния трех типов казеинов, а также индустриального казеина, представляющего  $\beta$ -казеин с примесью  $\kappa$ -казеина. Как следует из представленных результатов, по данным ДЛС очищенные препараты  $\beta$ -казеина в зависимости от температуры могут находиться как в

форме мономера, так и мицелл,  $\alpha$ S1-казеин не формирует мицелл, а к-казеин способен формировать олигомеры благодаря наличию двух цистеинов в составе молекулы. Размеры частиц  $\beta$ -казеина индустриальной очистки выше чем размеры очищенного  $\beta$ -казеина, вероятно, за счет его частичной агрегации с к-казеином, причем у индустриального казеина увеличивается температура перехода в состояние мицелл, а сам переход происходит более плавно, также, вероятно, из-за большей гетерогенности системы (Рис.36)

*Изменение агрегационного состояния казеинов после гомоцистеинилирования*

Изменение агрегационного состояния казеинов в процессе их модификации гомоцистеинтиолактоном было исследовано с помощью метода ДСН-электрофореза и лазерного динамического светорассеяния. Проведение экспериментов в невозстанавливающих условиях (без добавления  $\beta$ -меркаптоэтанола или других низкомолекулярных тиолов) позволяло выявить олиго- и полимерные формы казеинов, в которых отдельные мономеры были соединены дисульфидными связями между сульфгидрильными группами гомоцистеинов, введенных по остаткам лизина. В случае к-казеина ди- и олигомеры образовывались также за счет дисульфидных связей между его цистеиновыми остатками. Для модификации белков использовали значительный избыток реагента, 10- и 100-кратный на каждый остаток лизина в молекуле, чтобы получить достаточно высокую степень модификации. Известно, что гомоцистеинтиолактон в растворе нестабилен и часть его гидролизуеться и превращается в гомоцистеин, неспособный модифицировать  $\text{NH}_2$ -группы. По этой причине для эффективной модификации в течение всего эксперимента требуются значительные избытки реагента.

Из приведенных на рисунке 37 (А, Б, В, Г) электрофореграмм следует, что модификация приводит к образованию димеров, а также олигомеров различной молекулярной массы. Происходит также образование крупных агрегатов, которые практически не входят в концентрирующий гель. Такое поведение наблюдается для всех трех нативных казеинов, а также для индустриального казеина, причем видно, что при возрастании концентрации гомоцистеинтиолактона значительно увеличивается количество крупных агрегатов, которые не входят в гель. В процессе модификации раствор становится опалесцирующим, при этом не происходит беспорядочной агрегации по типу преципитации. Однако после центрифугирования опалесцирующих растворов казеина (10 мин при 13 000 оборотов) большая часть белка осаждается, а в супернатанте с помощью электрофореза удается обнаружить небольшое количество мономерного белка (Рис. 37, Д, 1-4).

Обработка осадков в достаточно жестких условиях (кипячение в 720 мМ  $\beta$ -меркаптоэтаноле и ДСН в течение 10 мин) позволяет практически полностью перевести все формы казеинов (димеры, олигомеры и агрегаты) в исходные мономерные формы (Рис. 37 А, Б, В, Г, дорожки 4), что свидетельствует о том, что наблюдаемая агрегация вызвана образованием дисульфидных связей. Однако вероятно, что в образование агрегатов вовлечены не только дисульфидные связи. Полного разрушения агрегатов не происходит после инкубации осадков  $\beta$ -казеина в 2 мМ  $\beta$ -меркаптоэтаноле в течение часа при температуре 40 градусов, а также в 8М гуанидингидрохлориде с добавлением  $\beta$ -меркаптоэтанола. Высокая устойчивость белковых осадков к этим, достаточно жестким воздействиям, является первым указанием на формирование амилоидо-подобных агрегатов при гомоцистеинилировании  $\beta$ -казеина.



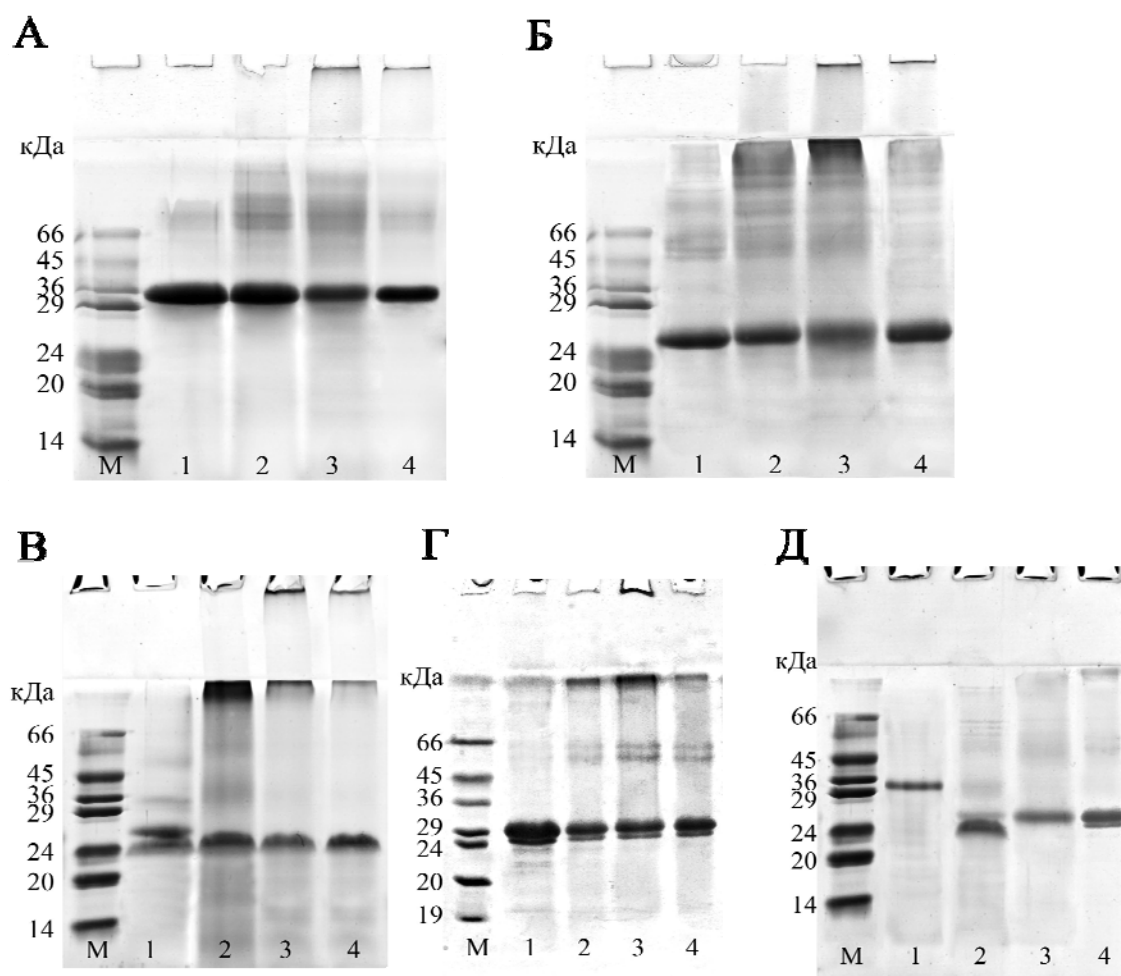


Рис.37. Электрофореграммы гомоцистеинилированных казеинов.

Гомоцистеинилирование  $\alpha$ S1-казеина (А),  $\beta$ -казеина (Б),  $\kappa$ -казеина (В) и  $\beta$ i-казеина индустриальной очистки (Г) было проведено инкубацией казеинов (1 мг/мл) в 25 мМ фосфатном буфере, рН 7,5, с гомоцистеинтиолактоном в течение 24 часов. 1: контрольные казеины, 2: казеины, модифицированные 10-кратным избытком (в расчете на остаток лизина) гомоцистеинтиолактона, 3: казеины, модифицированные 100-кратным избытком (в расчете на остаток лизина) гомоцистеинтиолактона, 4: казеины, модифицированные 100-кратным избытком (в расчете на остаток лизина) гомоцистеинтиолактона с последующим восстановлением  $\beta$ -меркаптоэтанолом (720 мМ).

(Д) Электрофоретический анализ супернатантов, полученных при гомоцистеинилировании казеинов. Гомоцистеинилирование  $\alpha$ S1-казеина (1),  $\beta$ -казеина (3),  $\kappa$ -казеина (2) and  $\beta$ i-казеина индустриальной очистки (4) было проведено инкубацией казеинов (1 мг/мл) в 25 мМ фосфатном буфере, рН 7,5, с гомоцистеинтиолактоном в течение 24 часов. Супернатанты получены с помощью центрифугирования при 13000 об/мин в течение 10 минут.

Изменение агрегационного состояния казеинов было изучено также с помощью метода динамического лазерного светорассеяния. Приведенные на Рис. 38 данные показывают, что в соответствии с результатами электрофоретического анализа, гомоцистеинилирование  $\beta$ -казеинов приводит к их агрегации. В случае очищенного  $\beta$ -казеина образование агрегатов наблюдается при гомоцистеинилировании его мономерных форм (при температуре 10°C), а также сформированных из него мицелл (при температуре 50°C). Агрегация мономерных форм наступает позднее, чем мицеллярных, однако это может быть обусловлено не особенностями модификации  $\beta$ -казеина в двух состояниях, а просто ее замедлением при более низкой температуре. На это указывают эксперименты по ускорению агрегации  $\alpha$ S1-казеина, не образующего мицелл, при гомоцистеинилировании при высокой температуре (данные не приведены). Агрегация  $\beta$ -казеина при модификации происходит скачкообразно (через 120 мин после начала инкубации) и приводит к формированию крупных частиц, размеры которых невозможно определить в стандартных условиях при угле наблюдения 173°. Размеры этих агрегатов, определенные при угле 12,8° составляют около 1000 нм. При гомоцистеинилировании  $\alpha$ S1-казеина образуются частицы такого же размера – более 1000 нм. Определить размеры агрегатов при модификации  $\kappa$ -казеина не удастся из-за гетерогенности системы, в которой, вероятно, присутствует большой набор агрегатов разного размера, возможно, находящихся в динамическом равновесии.

Наиболее удобным объектом для изучения влияния гомоцистеинилирование на агрегацию казеинов оказался индустриальный  $\beta$ -казеин, скачкообразная агрегация которого, вероятно, предотвращается  $\kappa$ -казеином. Приведенные на Рис. 39 данные показывают, что при температуре 10°C в препарате присутствует исключительно мономерная форма казеина, а при 50°C – мицеллярная. В присутствии 10-кратного избытка

гомоцистеинтиолактона возникает два типа агрегатов (около 30 и 120 нм). Дальнейшее повышение концентрации модифицирующего агента (до 100-кратного избытка) стимулирует агрегацию в обоих случаях, причем при высокой температуре размеры агрегатов достигают 1000 нм (угол 12 градусов). После отделения крупных агрегатов в супернатанте остаются олигомеры с размером около 43 нм.

Таким образом, можно сделать заключение, что гомоцистеинилирование действительно приводит к формированию связанных дисульфидными связями агрегатов для всех типов исследованных казеинов, причем устойчивость к действию детергентов агрегатов, сформированных из  $\beta$ -казеинов, указывает на возможность образования амилоидо-подобных структур. Следует также отметить, что несмотря на сходство действия модификации на казеины, агрегация каждого из них имеет свои особенности. Особенно важно то, что параметры агрегации изменяются при смешивании двух типов казеинов (по крайней мере,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинов), что необходимо учитывать при экстраполяции экспериментальных данных, полученных на очищенных казеинах, на многокомпонентные системы.

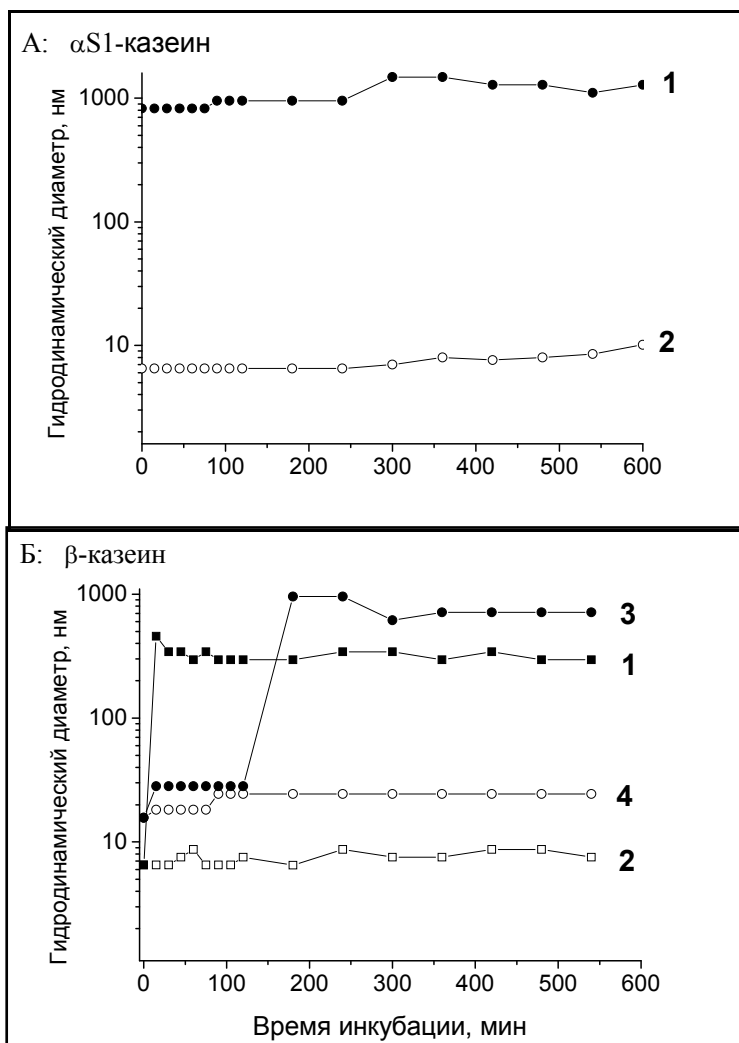


Рис. 38. Гидродинамический диаметр гомоцистеинилированных агрегатов αS1- и β-казеинов.

Измерения проводили методом динамического лазерного светорассеяния с растворами казеинов (1 мг/мл) в 25 мМ фосфатном буфере, pH 7,5. Реакцию гомоцистеинилирования инициировали добавлением прямо в кювету (после измерения контроля) 100-кратного избытка (в расчете на остаток лизина) гомоцистеинтиолактона. Точки, соответствующие измерениям с углом рассеяния 173°, показаны закрашенными символами, с углом рассеяния 12,8° - пустыми. Для β-казеина эксперименты проводили при 10 °С (квадраты) и при 50 °С (круги).

**(А)** Гомоцистеинилированный αS1-казеин, модифицированный при 50°C (мономерная форма), **1** - угол рассеяния 12,8°, **2** - угол рассеяния 173°.

**(Б)** Гомоцистеинилированный β-казеин, **1** и **2** - модифицированный при 10 °С (мономерная форма), с углами рассеяния 12,8° и 173°, соответственно, **3** и **4** - модифицированный при 50 °С (мицеллы), с углами рассеяния 12,8° и 173°, соответственно.

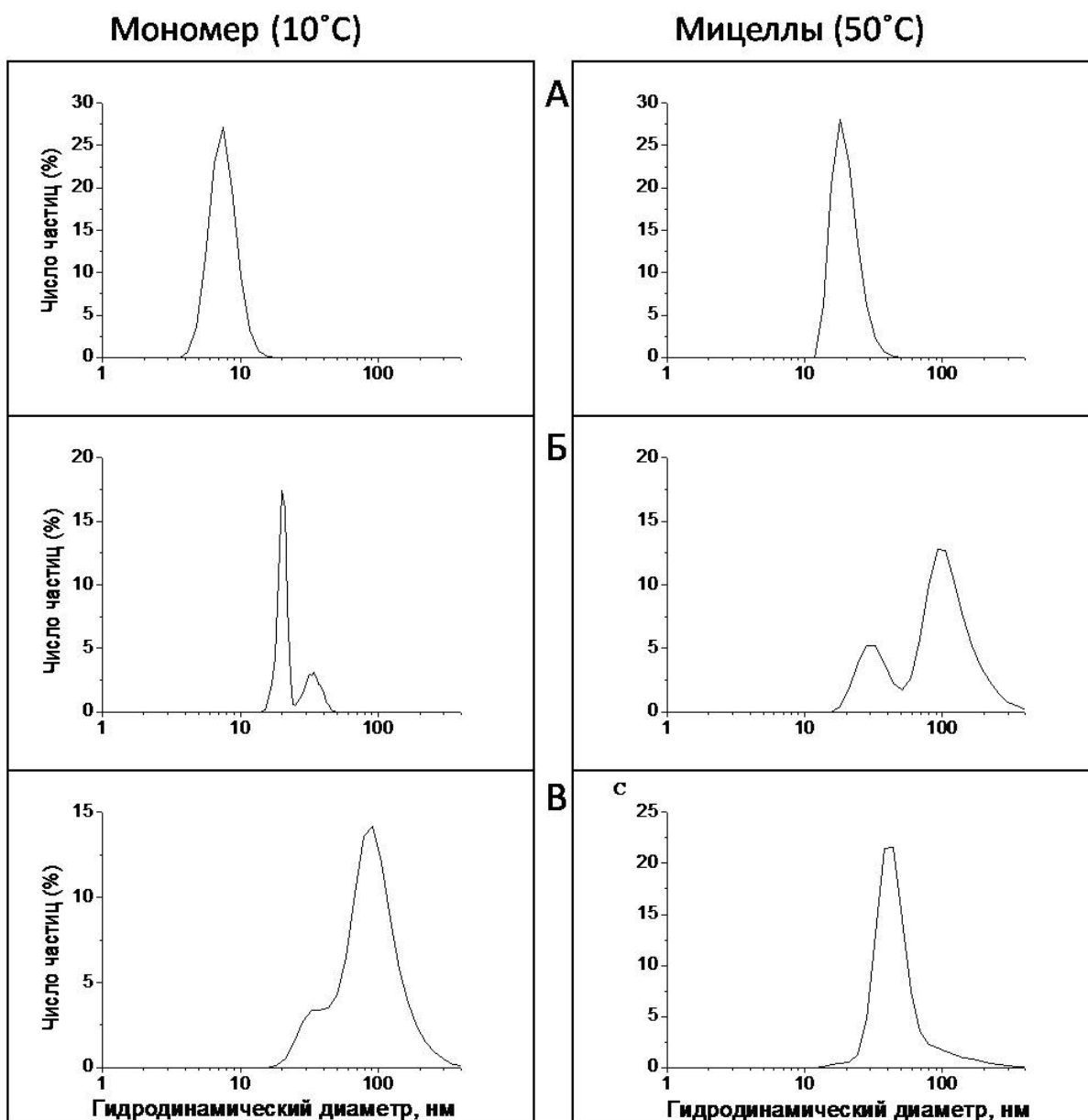


Рис. 39. Распределение гидродинамического диаметра частиц  $\beta$ -казеина индустриальной очистки при гомоцистеинилировании при 10°C и 50°C.

Измерения проводили методом динамического лазерного светорассеяния с растворами казеинов (1 мг/мл) в 25 мМ фосфатном буфере, рН 7,5, при 10 °С (левая сторона, исходно в мономерной форме (А) и при 50 °С (правая сторона, исходно в форме мицелл (А)). Реакцию гомоцистеинилирования инициировали добавлением прямо в кювету (после измерения контроля) 10- (Б) и 100-кратного (В) избытка (в расчете на остаток лизина) гомоцистеинтиолактона. Представлены статистические данные из 10 измерений для контрольных белков и 60 измерений в течение 3 часов для гомоцистеинилированных.

В дальнейшей работе мы исследовали главным образом  $\beta$ -казеин, как наиболее интересный объект, обладающей способностью формировать мицеллы и взаимодействовать с другими казеинами, а также индустриальный  $\beta$ -казеин, по сути представляющий собой смесь  $\beta$ -казеина и  $\kappa$ -казеина и позволяющий имитировать ситуации, которые могут наблюдаться *in vivo*. Остальные казеины мы использовали в качестве контроля и для упрощения интерпретации результатов, полученных с неочищенными препаратами  $\beta$ -казеина.

*Количественное определение содержания остатков гомоцистеина в препаратах  $\beta$ -казеина*

Определение количества остатков гомоцистеина, включенных в  $\beta$ -казеин после 120 минутной инкубации со 100-кратным избытком гомоцистеинтиолактоном, проводили с помощью титрования сульфгидрильных групп ДТНБ. Для этого модифицированный  $\beta$ -казеин обрабатывали 8М гуанидингидрохлоридом, затем подвергали обессоливанию на колонке PD-10 для удаления остатков свободного гомоцистеина и непрореагировавшего тиолактона. Полученный белок инкубировали в присутствии 2 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанола в течение часа при температуре 40°C для восстановления сульфгидрильных групп гомоцистеиновых остатков, и снова подвергали обессоливанию. Для определения SH-групп использовали фракции из начала пика, содержащего белок. Измерения проводили при длине волны 412 нм, для расчетов использовали  $\epsilon = 13\ 600$ . Было показано, что в этих условиях при гомоцистеинилировании  $\beta$ -казеина в среднем включается 1,5 остатков гомоцистеина на мономер казеина. Однако, на самом деле эффективность включения может быть несколько выше, так как

часть агрегатов не растворяется даже в 8М гуанидингидрохлориде и не может быть проанализирована в этом эксперименте.

*Измерение собственной триптофановой флуоресценции и использование флуоресцентных зондов для выявления структурных изменений казеинов при гомоцистеинилировании*

Для анализа изменений в структуре гомоцистеинилированных казеинов было исследовано изменение параметров флуоресценции собственного остатка триптофана, зависящих от его микроокружения. Все казеины имеют остатки триптофана в С-концевой области ( $\beta$ -казеин - один в 157 положении,  $\kappa$ -казеин - один в 97 положении,  $\alpha$ S1-казеин - два остатка, в 179 и 214 положении), что делает возможным измерение максимума длины волны свечения триптофана ( $T_{tr} \lambda_{max}$ ). Поскольку флуоресцентная спектроскопия представляет информацию об окружении триптофана, то можно наблюдать структурные изменения белка в процессе разворачивания, диссоциации, олигомеризации и агрегации. Смещение в синюю область указывает на возникновение гидрофобного окружения триптофана и наоборот. В данных экспериментах мы исследовали только сдвиг максимума флуоресценции триптофана, так как сложно следить за изменениями интенсивности флуоресценции триптофана из-за изменения светорассеяния белка из-за его агрегации.

Для анализа влияния мицеллизации на характер модификации было проведено гомоцистеинилирование  $\beta$ -казеина (очищенного и индустриального) при разных температурах (10°C - мономер, 50°C - мицеллы). Препараты  $\alpha$ S1- и  $\kappa$ -казеинов не образуют мицелл, но измерение также проводили при двух температурах:  $\alpha$ S1-казеин использовали в

качестве контроля, а к-казеин – с целью более однозначной интерпретации данных по индустриальному  $\beta$ -казеину, содержащему примесь к-казеина.

Было показано, что в случае  $\alpha S1$ -казеина сдвиг максимума флуоресценции практически отсутствует при обеих температурах. Для исходного очищенного  $\beta$ -казеина характерно более гидрофильное окружение остатков триптофана, что свидетельствует об их экспонировании в раствор, а при гомоцистеинилировании наблюдается сдвиг максимума флуоресценции в синюю область (Рис. 40), особенно при высокой температуре, способствующей мицеллообразованию и формированию крупных агрегатов.

В препаратах к-казеина триптофан исходно находится в более гидрофобном окружении, чем в двух других казеинах, а введение гидрофильных остатков гомоцистеина приводит к выраженному сдвигу в красную область. В случае индустриального  $\beta$ -казеина, содержащего значительную примесь к-казеина, спектр триптофановой флуоресценции занимает промежуточное положение, а гомоцистеинилирование приводит к сдвигу в синюю область. Изменения спектра флуоресценции триптофана при гомоцистеинилировании сложной смеси двух казеинов трудно интерпретировать однозначно, но исходный спектр индустриального казеина хорошо коррелирует с данными, полученными для индивидуальных белков.



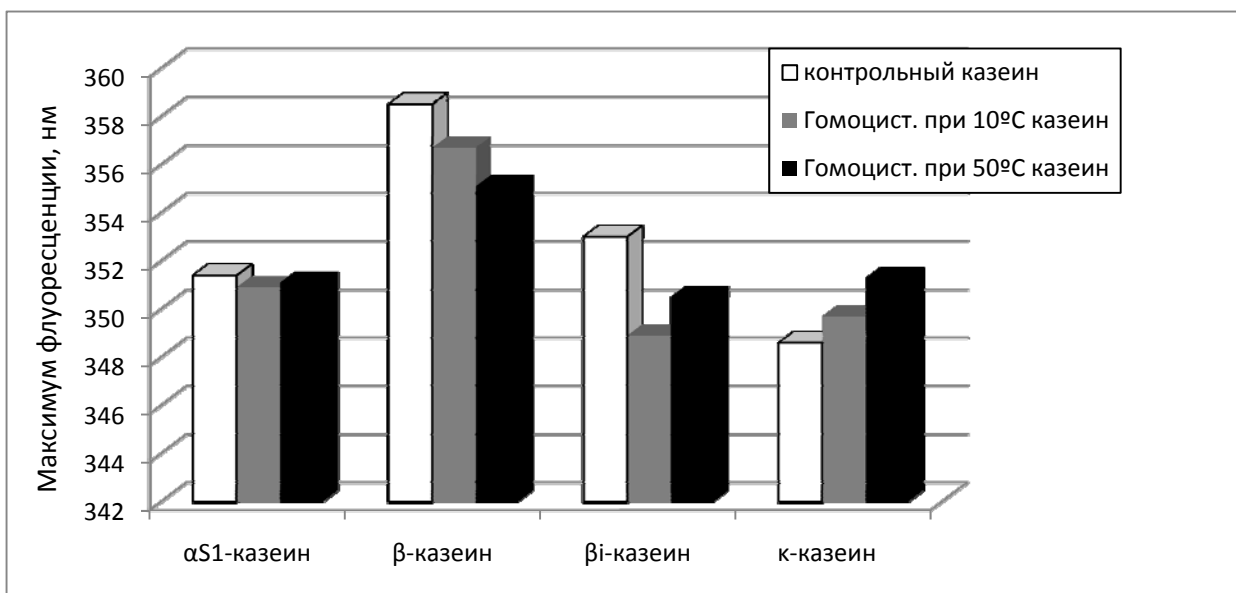


Рис. 40. Расположение максимума собственной флуоресценции триптофана в гомоцистеинилированных казеинах.

Гомоцистеинилирование проводили с растворами казеинов (1 мг/мл) в 25 мМ фосфатном буфере, рН 7,5, при 10 °С (серые столбики) и при 50 °С (черные столбики) инкубацией со 100-кратным избытком (в расчете на остаток лизина) гомоцистеинтиолактона в течение 24 часов. Значения для контрольных казеинов показаны белыми столбиками.

### *Использование флуоресцентных зондов для выявления структурных изменений казеинов при гомоцистеинилировании*

#### *Флуоресценция тиофлавина T*

Флуоресцентный краситель тиофлавин T является маркером амилоидогенных структур, однако также считается, что он способен связываться с мицеллярными формами белка (Kumar *et al.*, 2008). Из приведенных на Рис. 41 данных следует, что очищенный и индустриальный β-казеины практически не взаимодействуют с тиофлавином T ни в мономерной форме, ни в мицеллярной. Для αS1- и κ-казеинов характерно

достаточно эффективное связывание флуоресцентной метки с нативными формами.

При гомоцистеинилировании всех казеинов наблюдается значительное увеличение интенсивности флуоресценции связанного с белком тиофлавина Т (Рис. 42). Для анализа влияния мицеллизации на характер модификации было проведено гомоцистеинилирование двух препаратов  $\beta$ -казеинов при разных температурах (10°C - мономер, 50°C - мицеллы для  $\beta$ -казеина). В качестве контроля использовали  $\alpha$ S1-казеин, которые не образуют мицелл, что позволило установить, как влияет на модификацию само по себе изменение температуры. Оказалось, что гомоцистеинилирование казеинов при температуре 50 градусов вызывает значительно большее увеличение интенсивности флуоресценции тиофлавина Т, чем при температуре 10 градусов.

Однако, так как это характерно для всех типов казеина, то данный эффект вероятно не связан с мицеллообразованием, а обусловлен просто увеличением эффективности модификации при повышении температуры. Было показано, что после центрифугирования гомоцистеинилированных препаратов интенсивность флуоресценции в супернатанте незначительно отличается от контрольной, то есть все формы казеинов, взаимодействующие с тиофлавином, находятся в агрегированном состоянии и осаждаются.

Для связавшегося тиофлавина Т при взаимодействии с амилоидными  $\beta$ -структурами наблюдается характерный красный сдвиг, причем у казеинов максимум сдвигается сильнее в красную область, по сравнению с известным для амилоидных белков сдвигом до максимума флуоресценции на 480 нм (Van *et al.*, 2003).

При сравнении результатов, полученных при разных температурах, основная сложность состоит в том, что при проведении реакции при 10°C

скорость модификации будет заметно ниже, что и наблюдается по интенсивности флуоресценции.

Сравнение очищенного  $\beta$ -казеина и индустриального показывает, что последний модифицируется менее эффективно по сравнению с нативным, что особенно выражено при модификации при температуре 50°C. Также происходит сдвиг максимума флуоресценции в обоих случаях, но с мономером он менее выражен. Однако сложно сказать, обусловлено ли это меньшим выходом модификации или разницей мономер-мицелла.

Таким образом, полученные данные по изменению флуоресценции тиофлавина косвенно свидетельствуют об амилоидо-подобном изменении структуры агрегатов казеина при образовании множественных дисульфидных связей.

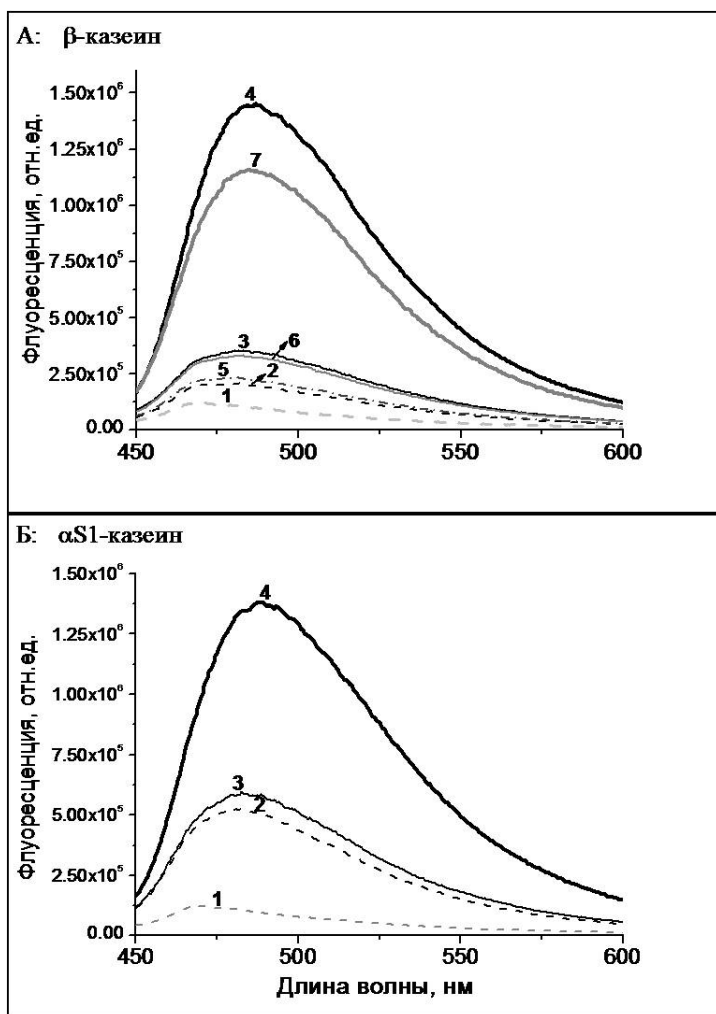


Рис. 41. Спектры флуоресценции тиофлавина Т (в условных единицах) для нативных и модифицированных гомоцистеинтиолактоном при 10°C и 50°C казеинов.

Гомоцистеинилирование проводили с растворами казеинов (1 мг/мл) в 25 мМ фосфатном буфере, рН 7,5, при 10 °С (тонкая линия) и при 50 °С (толстая линия) инкубацией со 100-кратным избытком (в расчете на остаток лизина) гомоцистеинтиолактона в течение 24 часов.

**(А) β-казеины:** 1: свободный тиофлавин Т, 2 и 5: контрольные β-казеин и β<sub>i</sub>-казеин индустриальной очистки, 3 и 6: β-казеин и β<sub>i</sub>-казеин индустриальной очистки, гомоцистеинилированные при 10 °С, 4 и 7: β-казеин и β<sub>i</sub>-казеин индустриальной очистки, гомоцистеинилированные при 50 °С.

**(Б) αS1-казеины:** 1: свободный тиофлавин Т, 2: контрольный αS1-казеин, 3: αS1-казеин, гомоцистеинилированный при 10 °С, 4: αS1-казеин, гомоцистеинилированный при 50 °С.

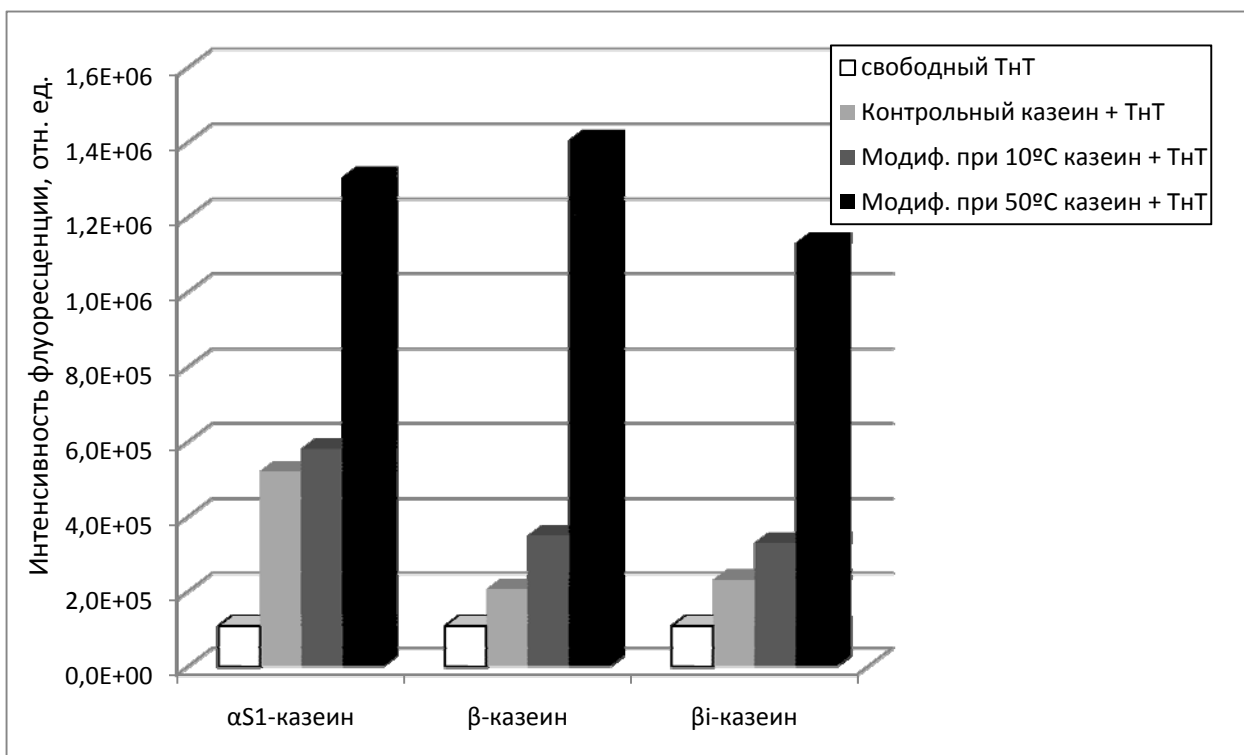


Рис. 42. Значение интенсивности флуоресценции свободного и казеин-связанного тиофлавина Т при длине волны 480 нм.

Гомоцистеинилирование проводили с растворами казеинов (1 мг/мл) в 25 мМ фосфатном буфере, рН 7,5, при 10 °С (темно-серые столбики) и при 50 °С (черные столбики) инкубацией со 100-кратным избытком (в расчете на остаток лизина) гомоцистеинтиолактона в течение 24 часов. Значения для свободного тиофлавина Т показаны белыми столбиками, для контрольных казеинов с тиофлавином Т - светло-серыми столбиками.

## Флуоресценция ANS

Известно, что при связывании ароматического хромофора 1-анилино-8-нафталенсульфоната (ANS) с неполярными областями белка спектр красителя сдвигается в синюю область и интенсивность флуоресценции значительно возрастает (Matulis *et al.*, 1999, Slavik, 1982). Сильное сродство ANS к белку в состоянии расплавленной глобулы обусловлено потерей третичной структуры (Semisotnov *et al.*, 1991). Так как исследованные нами казеины не обладают четкой третичной структурой, то спектр ANS должен быть изначально сдвинут в синюю область. Действительно, как следует из приведенных на Рис. 43 и таблице 5 данных, в присутствии  $\alpha$ S1- и  $\kappa$ -казеинов происходит значительное увеличение интенсивности его флуоресценции и синий сдвиг максимума флуоресценции.

Однако параметры флуоресценции ANS в присутствии обоих типов  $\beta$ -казеинов практически не изменяются, вероятно, из-за того, что гидрофобные «хвосты» этих казеинов взаимодействуют друг с другом, что мешает связыванию с ANS.

При гомоцистеинилировании, проведенном при температуре 50°C, происходит выраженное увеличение интенсивности флуоресценции ANS и синий сдвиг флуоресценции, что говорит об увеличении доступности гидрофобных областей казеинов при гомоцистеинилировании.

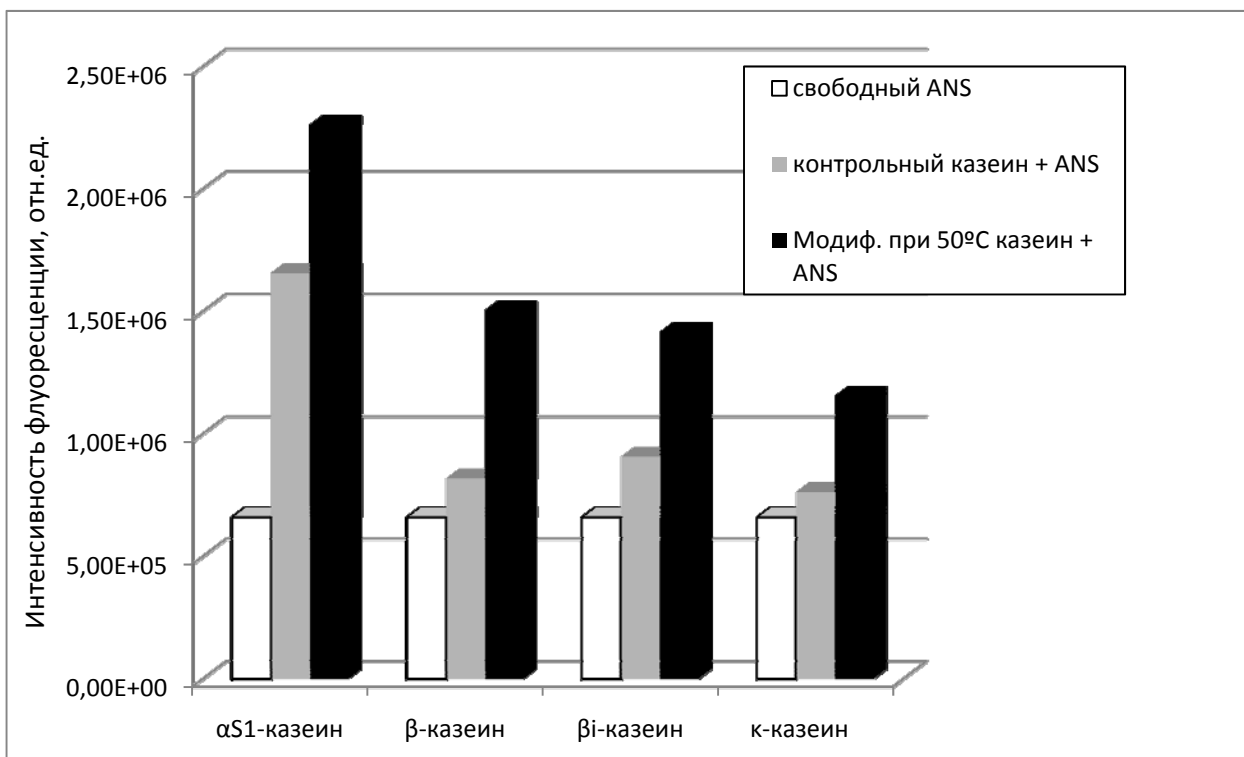


Рис. 43. Значение интенсивности флуоресценции свободного и казеин-связанного ANS при длине волны 480 нм (не максимум).

Гомоцистеинилирование проводили с растворами казеинов (1 мг/мл) в 25 мМ фосфатном буфере, pH 7,5, при 50 °С инкубацией со 100-кратным избытком (в расчете на остаток лизина) гомоцистеинтиолактона в течение 24 часов. Значения для свободного ANS показаны белыми столбиками, для контрольных казеинов с ANS - серыми столбиками, для гомоцистеинилированных казеинов с ANS - черными столбиками.

Таблица 5. Сдвиги максимумов флуоресценции ANS при связывании с гомоцистеинилированными казеинами.

Максимум флуоресценции ANS после связывания с гомоцистеинилированными казеинами.		
	$\lambda_{\max}$ ANS + контрольный казеин, нм	$\lambda_{\max}$ ANS + модиф. при 50°C казеин, нм
α <sub>S1</sub> -казеин	508.4 ± 0.3	500.3 ± 0.3
β- казеин	527.8 ± 0.1	504.3 ± 0.2
βi- казеин	524.5 ± 0.1	505.6 ± 0.2
κ-казеин	519.6 ± 0.1	512.5 ± 0.2

### *Взаимодействие казеинов с красителем Конго Красным*

Известно, что спектр поглощения красителя Конго Красный изменяется при взаимодействии с амилоидными фибриллами – максимум поглощения сдвигается от 498 нм в красную сторону на 40-50 нм (Frid *et al.*, 2007, Puchtler and Sweat, 1965). Мы исследовали образцы всех казеинов после модификации гомоцистеинтиолактоном.

Было показано, что у всех гомоцистеинилированных в описанных выше условиях казеинов пик свободного Конго Красного пропадает, однако выраженных изменений спектральных характеристик выявить не удается.

Исключением является к-казеин, для которого ранее была показана способность к формированию амилоидных фибрилл (Escroyd *et al.*, 2008, Lencki, 2007). В течение нескольких часов после начала модификации к-казеина гомоцистеинтиолактоном не удается выявить выраженных изменений спектра поглощения Конго Красного. Однако более длительная модификация (24 часа) к-казеина приводит к появлению четкого пика поглощения с максимумом около 540 нм (Рис. 44), что указывает на постепенное формирование амилоидогенных структур.



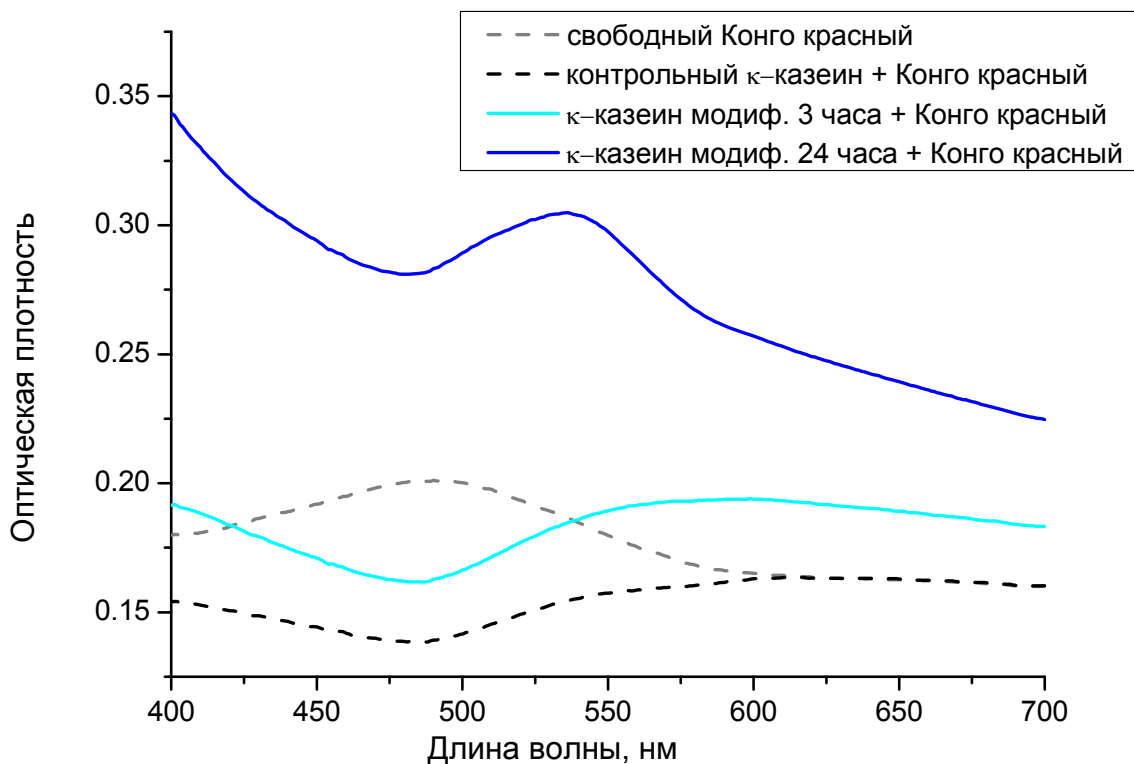


Рис. 44. Спектры поглощения Конго Красного при связывании с гомоцистеинилированным к-казеином.

Казеин (1 мг/мл) гомоцистеинилировали в 25 мМ фосфатном буфере, рН 7,5, инкубируя со 100-кратным избытком гомоцистеинтиолактона в расчете на остаток лизина при 50°C в течение 3 (голубая линия) и 24 часов (синяя линия). Спектр свободного Конго красного показан серой пунктирной линией, контрольный к-казеин в присутствии Конго красного показан черной пунктирной линией.

*Изучение морфологии гомоцистеинилированных агрегатов казеинов с помощью флуоресцентной микроскопии*

Для исследования морфологии полученных после гомоцистеинилирования агрегатов казеинов была использована флуоресцентная микроскопия в присутствии тиофлавина Т. Так, на представленных фотографиях (Рис. 45) можно видеть, что флуоресцирует именно связанный с агрегатами тиофлавин, тогда как свободный тиофлавин и непрореагировавший белок не флуоресцируют (фон остается черным).

В случае  $\alpha$ S1- и  $\beta$ -казеинов наблюдаются практически только крупные частицы правильной сферической формы, диаметром 2-3 микрометра. У к-казеина характер агрегации несколько другой, популяция агрегатов более разнородна, наряду с крупными встречаются также более мелкие агрегаты неправильной формы. Это свидетельствует о том, что агрегация к-казеина идет по несколько иному пути, что согласуется с отсутствием сдвига максимума флуоресценции собственного триптофана для этого типа казеина и с данными о формировании после гомоцистеинилирования амилоидных фибрилл (по данным об изменении спектров поглощения Конго Красного). Индустриальный  $\beta$ -казеин после гомоцистеинилирования не дает столь гомогенной популяции сферических частиц, как очищенный  $\beta$ -казеин, а содержит набор сферических частиц и неправильных частиц разного размера. Таким образом, как и в случае исследования другими методами, параметры индустриального казеина, содержащего примесь к-казеина, занимают промежуточное положение между очищенным  $\beta$ -казеином и к-казеином.

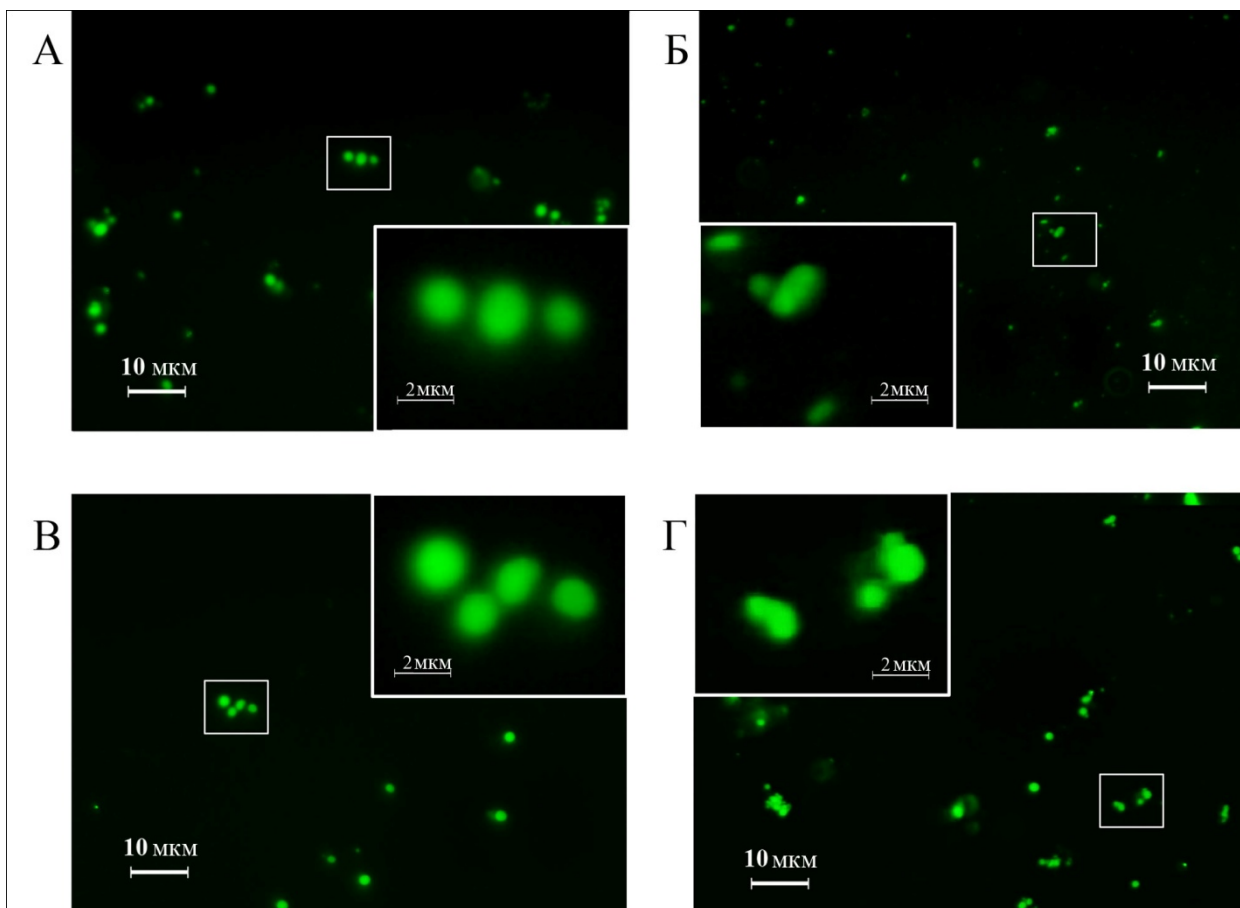


Рис. 45. Эпифлуоресцентная микроскопия гомоцистеинилированных  $\alpha$ S1-казеина (А),  $\kappa$ -казеина (Б), нативного (В) и индустриального (Г)  $\beta$ -казеина в присутствии тиофлавина Т после 24-часовой реакции с гомоцистеинтиолактоном при 50°C. Рамками показаны увеличенные в 5 раз фрагменты.

*Трансмиссионная электронная микроскопия гомоцистеинилированных казеинов*

С помощью флуоресцентной микроскопии было показано наличие в гомоцистеинилированных препаратах агрегатов, способных связывать тиофлавин Т, однако разрешение метода не позволило получить достаточно данных о структуре полученных агрегатов. С помощью флуоресцентной микроскопии было показано, что структура полученных агрегатов

различается для разных казеинов (Рис. 45). Нами было показано, что к-казеин, в отличие от  $\alpha$ S1- и  $\beta$ -казеинов образующий агрегаты со свойствами, характерными для амилоидов (специфическое связывание Конго Красного), формирует при гомоцистеинилировании разнородную популяцию агрегатов (Рис. 45). Электронная микроскопия показала, что гомоцистеинилирование провоцирует формирование к-казеином фибрилл длиной в несколько сотен нанометров (Рис. 46 Г, Д), которые затем склонны объединяться и формировать агрегаты диаметром от нескольких сотен нанометров до нескольких микрометров (Рис. 46 Б, В).

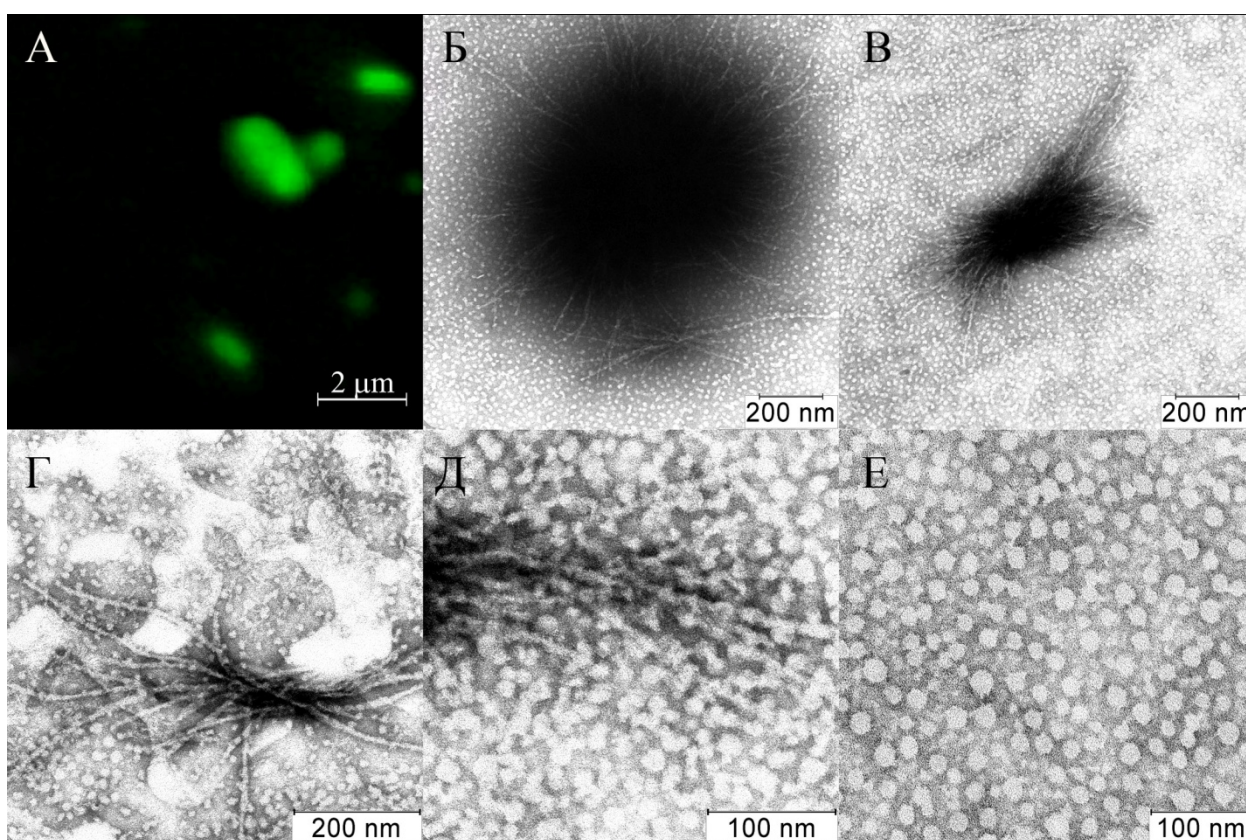


Рис. 46. Флуоресцентная (А) и электронная (Б-Е) микроскопия гомоцистеинилированного к-казеина после 24-часовой реакции с гомоцистеинтиолактоном при 37°C. А-Д - гомоцистеинилированные препараты, Е - контрольный препарат.



В контрольной пробе  $\kappa$ -казеин присутствует в виде небольших ассоциатов диаметром около 10-20 нм, что соответствует данным, полученным с помощью измерения гидродинамического диаметра методом ДЛС. Аналогичные частицы также обнаруживаются вокруг агрегатов в гомоцистеинилированных препаратах, но они не связывают тиофлавин Т.

Как было показано с помощью метода ДЛС и флуоресцентной микроскопии, гомоцистеинилирование  $\beta$ -казеина приводит к формированию сферических агрегатов диаметром 1-2 мкм.  $\beta$ -Казеин склонен к самоорганизации в мицеллы диаметром около 20 нм. С помощью электронной микроскопии можно видеть, что формирующиеся при гомоцистеинилировании сферические агрегаты состоят из мицелл (Рис.47 Г). При этом в контрольной пробе также присутствуют мицеллы.

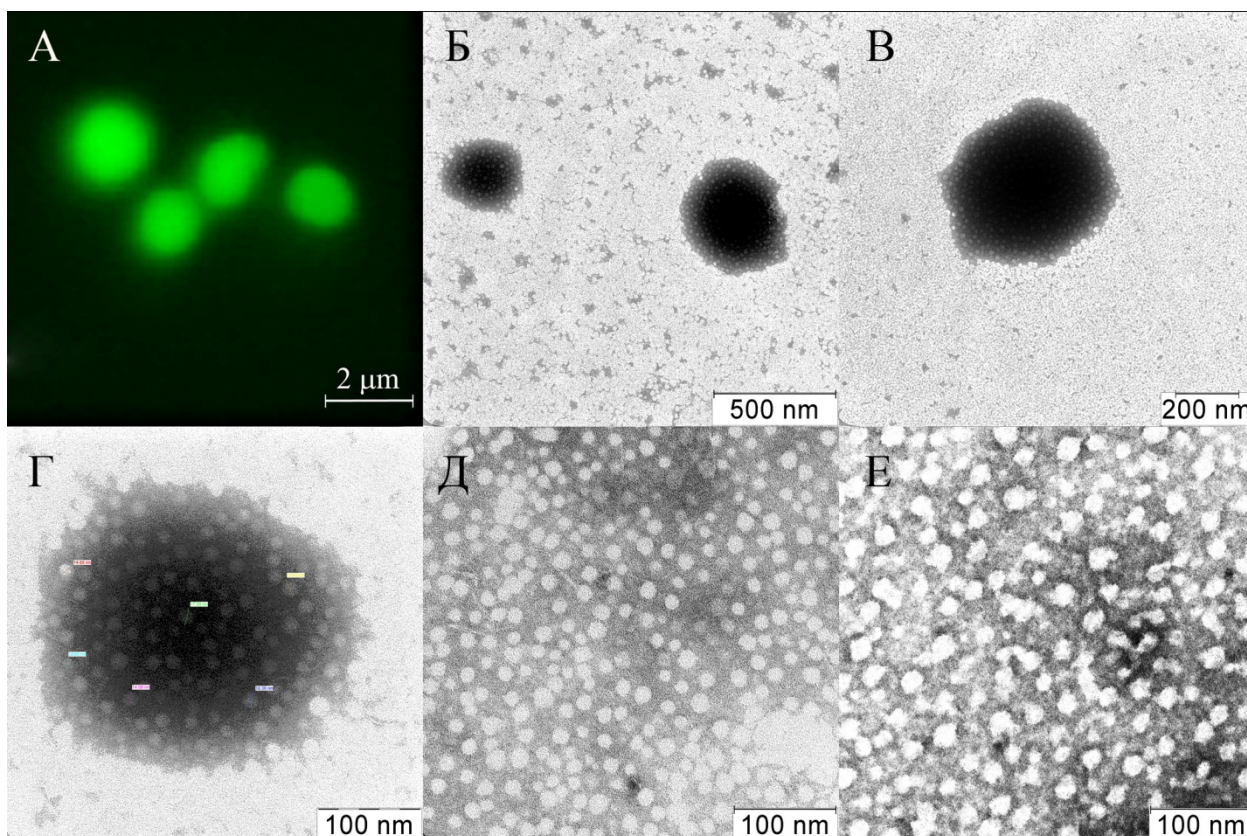


Рис. 47. Флуоресцентная (А) и электронная (Б-Е) микроскопия гомоцистеинилированного  $\beta$ -казеина после 24-часовой реакции с

гомоцистеинтиолактоном при 37°C. А-Д - гомоцистеинилированные препараты, Е - контрольный препарат.

В случае  $\alpha$ S1-казеина по данным светорассеяния и флуоресцентной микроскопии при гомоцистеинилировании формируются сферические агрегаты диаметром 1-2 мкм, однако по результатам электронной микроскопии (Рис. 48) эти агрегаты могут быть двух видов, сплошной структуры (Г) и из фибрилло-подобных структур (Б, В, Д). Поскольку гомоцистеинилированный  $\alpha$ S1-казеин не связывает специфически Конго Красный, в отличие от  $\kappa$ -казеина, однозначно интерпретировать полученные данные не представляется возможным.

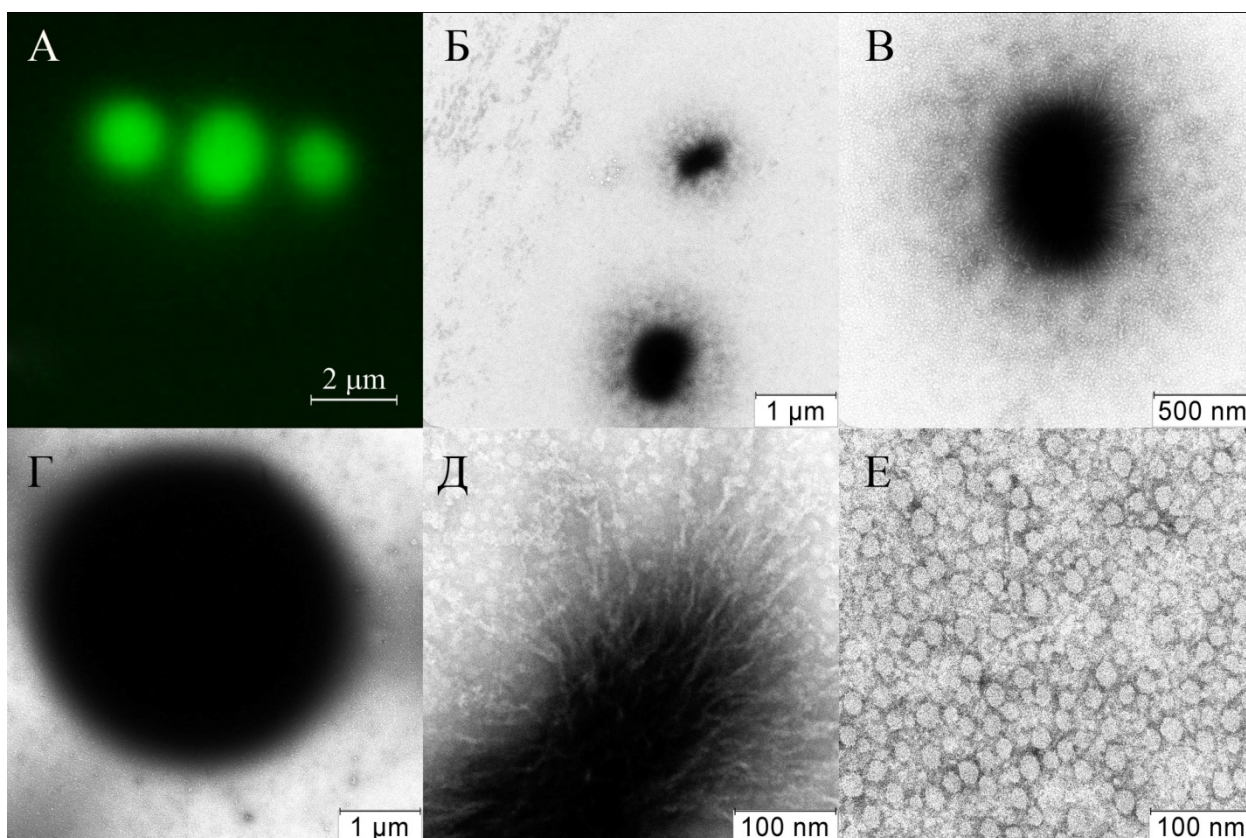


Рис. 48. Флуоресцентная (А) и электронная (Б-Е) микроскопия гомоцистеинилированного  $\alpha$ S1-казеина после 24-часовой реакции с гомоцистеинтиолактоном при 37°C. А-Д - гомоцистеинилированные препараты, Е - контрольный препарат.

Несмотря на то, что гомоцистеинилирование белков было обнаружено более десяти лет назад, и взаимосвязь развития ряда патологий с повышением концентрации гомоцистеина и гомоцистеинтиолактона не вызывает серьезных возражений, однако молекулярные механизмы, приводящие к патологическим изменениям остаются практически неизвестными. Лишь недавно было показано, что гомоцистеинилирование обычного глобулярного белка – бычьего сывороточного альбумина – не только вызывает его агрегацию, но и приводит к формированию амилоидоподобных структур, оказывающих токсическое действие на клетки (Paoli *et al.*, 2010). Однако такого рода формирование амилоидных структур из обычных белков происходит чрезвычайно медленно – в течение нескольких дней и даже недель. В течение этого времени, естественно, происходит денатурация и частичная агрегация исходных, немодифицированных белков, а гомоцистеинилированные белки стимулируют эти процессы и, вероятно, делают их более упорядоченными, выступая в качестве «затравки» для формирования амилоидных фибрилл. По существу в этом случае, даже при модификации исходно глобулярных белков, наблюдается гомоцистеинилирование развернутых (хотя бы частично) белков, а задержка с возникновением амилоидных форм обусловлена необходимостью предварительного разворачивания упорядоченной белковой структуры

Можно предположить, что гомоцистеинилирование белков, которые изначально склонны к формированию амилоидных структур, а это, как правило, естественно неструктурированные белки, должно приводить к более быстрым и глубоким изменениям их свойств. Возможно, модификация может вызывать также появление более прочных фибрилл с более выраженными амилоидными свойствами, за счет дополнительных сшивок дисульфидными связями между включенными остатками гомоцистеина. Все

вышесказанное показывает, что для изучения роли гомоцистеинилирования в изменении функциональных свойств белков наиболее важными объектами являются естественно-неструктурированные белки.

В представленной работе мы провели сравнительное исследование особенностей гомоцистеинилирования трех типов молочных казеинов, так как, с одной стороны, они все обладают обширными участками неупорядоченной структуры, а с другой, имеют специфические особенности. Так,  $\kappa$ -казеины склонны к димеризации благодаря присутствию двух остатков цистеина, а в других казеинах сульфгидрильные группы отсутствуют.  $\beta$ -казеины формируют мицеллы, в отличие от двух других типов казеинов (Horne, 2002). Кроме того, казеины отличаются по степени гидрофобности и пост-трансляционным модификациям. Сравнительный анализ различных казеинов позволяет сопоставить последствия гомоцистеинилирования с особенностями трех типов неструктурированных белков.

В нашей работе было показано, что гомоцистеинилирование  $\kappa$ -казеина приводит к его агрегации и к формированию амилоидных структур. Размеры образующихся агрегатов сложно определить методом ДЛС из-за высокой гетерогенности образующейся смеси, а изменения различных флуоресцентных параметров  $\kappa$ -казеина не столь выражены, как для других казеинов. Это, вероятно, связано с тем, что олигомеризация контрольного  $\kappa$ -казеина за счет образования дисульфидных связей между его собственными остатками цистеина вызывает такие изменения флуоресцентных параметров, на фоне которых трудно оценить вклад гомоцистеинилирования. Однако, только при взаимодействии с агрегированным гомоцистеинилированным  $\kappa$ -казеином появляются выраженные изменения спектра Конго красного – сдвиг пика поглощения от 498 до 540 нм, который характерен для красителя,



связанного с амилоидными фибриллами. Эти результаты подтверждаются наблюдениями о формировании достаточно крупных асимметричных агрегатов, взаимодействующих с тиофлавином Т, по данным флуоресцентной микроскопии. Можно предположить, что в основном особенности формирования амилоидных структур к-казеином при гомоцистеинилировании обусловлены присутствием в нем собственных остатков цистеина, образование дисульфидных связей между которыми создает более упорядоченные структуры, чем при случайном взаимодействии между сульфгидрильными группами введенных при модификации остатков цистеина.

Иное поведение при гомоцистеинилировании характерно для  $\beta$ - и  $\alpha$ S1-казеинов. Хотя оба типа казеинов агрегируют в процессе гомоцистеинилирования с образованием крупных частиц, размером около 1 микрона, однако при этом не образуется амилоидных фибрилл, обладающих способностью изменять спектры поглощения Конго красного, или образовывать выявляемые с помощью флуоресцентной и электронной микроскопии структуры. В обоих случаях образуются симметричные сферические частицы сходного диаметра (1-2 микрона), взаимодействующие с флуоресцентным красителем тиофлавином Т (ТнТ). Для обоих казеинов после гомоцистеинилирования характерно значительное увеличение способности взаимодействовать с флуоресцентными красителями (ТнТ и ANS) и изменять их флуоресцентные характеристики. Эти данные указывают на увеличение содержания  $\beta$ -складчатых структур в образующихся агрегатах, но не позволяют сделать вывод о формировании амилоидных фибрилл (в отличие от ситуации с к-казеином). Следует отметить, что зависимость эффективности агрегации от концентрации добавленного гомоцистеинтиолактона имеет скачкообразный характер. При

низкой степени модификации агрегаты практически не образуются, а их формирование происходит при добавлении 100-кратного избытка реагента. При таком избытке реагента в  $\beta$ -казеин включается около 1,4 молей гомоцистеина на моль белка. Очевидно, что в этом случае хотя бы часть молекул имеет две сульфгидрильные группы, необходимые для формирования димеров, а последующая агрегация происходит как за счет возникновения взаимодействий между гидрофобными сайтами казеинов, так и за счет дополнительных дисульфидных связей между молекулами, модифицированными более чем по двум остаткам. Очевидно, что до появления хотя бы у части молекул казеина двух остатков гомоцистеина никакой агрегации не происходит.

Практически единственным отличием между двумя типами казеинов является выраженное изменение после модификации собственной флуоресценции у  $\beta$ -казеина и отсутствие такого изменения у  $\alpha$ S1-казеина, что скорее указывает на структурные особенности двух белков, чем на эффекты гомоцистеинилирования. Следует однако заметить, что несмотря на то, что в случае  $\beta$ - и  $\alpha$ S1-казеинов не удастся обнаружить явных амилоидных фибрилл, однако образующиеся агрегаты обладают очень высокой стабильностью. Просто разрушение дисульфидных связей  $\beta$ -меркаптоэтанолом не приводит дезинтеграции агрегатов, как и использование 6 М гуанидингидрохлорида. Только кипячение агрегатов в присутствии высоких концентраций детергента и  $\beta$ -меркаптоэтанола приводит к появлению мономерных форм, однако даже в таких условиях не удастся достигнуть полного разрушения агрегатов. Это позволяет сделать вывод, что устойчивые агрегаты гомоцистеинилированных казеинов хотя и не дают амилоидных фибрилл (за исключением  $\kappa$ -казеинов) однако они способны к формированию амилоидоподобных структур.

Мы также попытались установить, влияет ли субмолекулярная организация естественно-развернутых белков на эффективность и последствия гомоцистеинилирования. Сравнение двух типов казеинов – формирующего мицеллы  $\beta$ -казеина и неспособного к мицеллизации  $\alpha$ S1-казеина – не позволило выявить какой-либо закономерности при мицелировании мономерных и мицеллярных форм казеинов. Хотя сравнение модификации мономера и мицелл  $\beta$ -казеина осложняется влиянием температуры не только на мицеллизацию, но и на эффективность модификации, однако дополнение этих данных результатами модификации  $\alpha$ S1-казеинов позволяет сделать вывод, что формирование мицелл не влияет на свойства образующихся агрегатов. Вероятно, гомоцистеинилированию подвергаются в основном мономерные формы казеинов, так как модификация казеинов в составе мицелл может быть затруднена (особенно остатков лизина, которые локализованы гидрофобных сайтах) из-за стерических препятствий и распределения модифицирующего агента между гидрофильной и гидрофобной фазами.

Отдельного рассмотрения заслуживают эксперименты с так называемым индустриальным казеином, который по существу представляет собой смесь  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинов. Флуоресцентные параметры гомоцистеинилированного индустриального казеина представляют собой среднее значение между параметрами изолированных казеинов. Однако образующиеся агрегаты обладают свойствами, отличными от свойств исходных казеинов. Так при гомоцистеинилировании индустриального казеина удастся обнаружить достаточно стабильные агрегаты относительно небольшого размера (Рис. 39), отличающиеся от крупных агрегатов модифицированных  $\beta$ - и  $\alpha$ S1-казеинов. Длительная их инкубация приводит к формированию асимметричных агрегатов, что указывает на то, что

добавление склонного к амилоидизации κ-казеина существенно изменяет свойства агрегатов. Это наблюдение представляется нам достаточно важным, так оно указывает на возможность направленного воздействия на процессы формирования агрегатов путем добавления к индивидуальному гомоцистеинилированному белку другого партнера с заданными свойствами. Так, в случае добавления к β-казеину κ-казеина определяющим может быть способность последнего образовывать олигомеры не только за счет гомоцистеинилирования, но и благодаря наличию собственных цистеиновых остатков. Исследование такого рода процессов важно для понимания механизмов возникновения амилоидных структур в клетках, которое происходит при вовлечении в агрегацию не только самих амилоидогенных белков (β-амилоида, синуклеина, прионов), но и обычных клеточных белков (особенно тех, которые содержат большое количество сульфгидрильных групп). Мы планируем продолжить данные исследования с использованием полученных нами рекомбинатных форм β-казеина, содержащих включенные в различных положениях остатки цистеина, для того чтобы подробно изучить вклад образования дополнительных дисульфидных связей, а также димеризации казеинов, на процессы формирования амилоидных структур при гомоцистеинилировании. Это позволит как создать модели для изучения амилоидогенеза, так и подойти к направленному поиску соединений, препятствующих формированию амилоидных структур.

Кроме того, так как известно, что в коровьем молоке и сыворотке молока содержатся микромолярные концентрации гомоцистеинилированных белков (Jakubowski *et al.*, 2008), то очевидно, что такая модификация может иметь важное значение для регуляции потребительских свойств молока (стабильность эмульсионных свойств при хранении, особенности

створаживания, эффективность отделения сыворотки и т.д.). Также, исследование гоцистеинилирования отдельных казеинов и их смесей необходимо также для получения модифицированных молочных продуктов с помощью полученных нами генно-инженерных казеинов, влияющих на их агрегационное состояние.

Суммируя все вышесказанное, по посвященной исследованию агрегации казеинов части работы можно резюмировать:

1. Мутанты  $\beta$ -казеина со вставками цистеина на N- и C-концах обладают склонностью к димеризации, причем C-концевой мутант С208 димеризуется легче N-концевого.
2. Димеризация C-концевого мутанта приводит к снижению температуры мицеллизации.
3. Полученные мутанты при низких температурах демонстрируют небольшое перераспределение структурированных участков в сторону увеличения  $\alpha$ -спиралей.
4. Димеризация не оказывает значительного влияния на скорость протеолиза казеина трипсином и пепсином.
5. Димер С208 обладает наиболее гидрофильными свойствами, даже по сравнению с фосфорилированным нативным  $\beta$ -казеином.
6. Мутантные формы С4 и С4-208 демонстрируют более гидрофобные свойства в сравнении с нативным  $\beta$ -казеином и диким типом.
7. Гомоцистеинилирование нативных казеинов приводит к образованию крупных агрегатов размером 2-3 нм, симметричных частиц правильной сферической формы в случае  $\alpha$ S1- и  $\beta$ -казеинов, и несимметричных разнородных агрегатов, состоящих из амилоидных фибрилл, в случае  $\kappa$ -казеина.
8. Гомоцистеинилирование нативных казеинов приводит к включению в среднем 1,5 остатков гомоцистеина в состав белка, что приводит к образованию дисульфидных сшивок между молекулами белка.
9. Для казеинов после гомоцистеинилирования характерно значительное увеличение способности взаимодействовать с флуоресцентными красителями (ТнТ и ANS) и изменять их флуоресцентные характеристики, что указывает на изменение их структуры.

10. Мицеллизация  $\beta$ -казеина не оказывает существенного влияния на характер и эффективность гомоцистеинилирования.
11. Гомоцистеинилированный  $\kappa$ -казеин вызывает специфические изменения спектров поглощения Конго красного, характерные для амилоидных структур.
12. Гомоцистеинилирование индустриального  $\beta$ -казеина, содержащего примесь  $\kappa$ -казеина, приводит к получению агрегатов с промежуточными свойствами.

## ***Изучение агрегации приона***

### *Получение и выделение рекомбинантного овечьего приона*

При экспрессии в *E. coli* прион проявляет свою склонность к агрегации и накапливается в нерастворимых телах включения, поэтому необходима стадия очистки. На этой стадии тела включения осаждали центрифугированием и солюбилизировали в 6 М растворе гуанидингидрохлорида. В результате получается фракция, значительно обогащенная рекомбинантным прионом и содержащая внутриклеточные цитоплазматические белки в небольшом количестве. Наличие в рекомбинантной последовательности гистидин-богатого участка позволяет очистить белок в одну стадию на колонке с хелатирующей сефарозой, насыщенной ионами Ni ( $^{2+}$ ) (Rezaei *et al.*, 2000).

На профиле элюции, полученном при измерении оптической плотности при 280 нм, можно видеть основной пик (Рис. 49, отмечено стрелкой). Анализ с помощью ДСН-электрофореза подтвердил, что эта фракция соответствует рекомбинантному приону.

Очень важно соблюдать правильные условия хранения полученного белка, т.к. он обладает очень сильной предрасположенностью к агрегации, поэтому не рекомендуется замораживание.

Выход из одного литра бактериальной культуры в среднем составляет 20 мг. Нами были экспрессированы и очищены варианты PrP ARR и PrP VRQ.



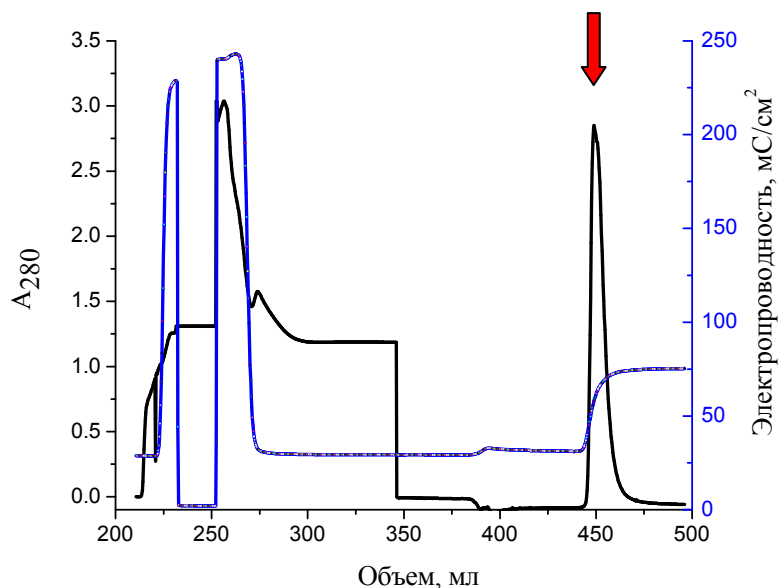


Рис. 49. Профиль элюции при хроматографической очистке приона из бактериального лизата

Фракция, содержащая развернутый белок после извлечения из тел включения, была нанесена на колонку с хелатирующей сефарозой (20 мл), насыщенную ионами никеля и уравновешенную буфером А (20 мМ Трис-НСl, 0,5 М NaCl, 10 мМ имидазол, 8 М мочевины, рН 7,4). После элюции фракции несвязавшихся белков колонку промывали буфером В (20 мМ Трис-НСl, 0,3 М NaCl, 20 мМ имидазол, рН 7,4) для удаления мочевины и восстановления структуры приона. Элюцию производили буфером С (1 М имидазол, рН 7,4) при комнатной температуре.

Следует отметить исключительную важность полной регенерации колонки после ее использования (включающую удаление никеля, отмывание 1М NaOH, новое насыщение никелем) и использования реактивов высокой чистоты, без примесей металлов, т.к., в противном случае, не происходит связывание белка с носителем, и белок практически целиком появляется во фракции несвязавшихся белков. Также нежелательно использование меди вместо никеля, т.к. медь обладает большим сродством к приону, чем к группам носителя, и дальнейшее избавление белка от связанной меди крайне затруднено.

### ***Исследование термоагрегации приона, получение и характеристика свойств малых патологических олигомеров***

Известно, что полиморфизм овечьего приона в позициях 136, 154 и 171 проявляется в различной – повышенной или пониженной устойчивости к скреэпи.

Прион VRQ (Val<sup>136</sup>, Arg<sup>154</sup>, Gln<sup>171</sup>) вариант является наиболее скреэпи-чувствительным, тогда как аллель PrP ARR (Ala<sup>136</sup>, Arg<sup>154</sup>, Arg<sup>171</sup>) проявляет устойчивость к этой болезни.

Было показано, что прион способен к образованию стабильных растворимых амилоидогенных интермедиатов в условиях pH < 4,5 и pH > 6,0, причем такие малые олигомеры обладают повышенной инфекционностью (Rezaei *et al.*, 2002, Rezaei *et al.*, 2005, Simoneau *et al.*, 2007).

В данной части работы мы попытались исследовать, по какому пути идет агрегация в случае термообработки, взаимодействия с фосфолипидами, а также при образовании дисульфидных связей при гомоцистеинилировании.

Для анализа получаемых олигомеров использовали метод гель-фильтрации (ВЖХ).

На Рис. 50 представлены результаты получения малых агрегатов для скрэйпи-устойчивого и скрэйпи-подверженного вариантов белков в кислой среде. Известно, что при такой обработке должны образовываться промежуточные малые олигомеры двух типов (Rezaei *et al.*, 2005).

Данный метод обладает хорошо изученной воспроизводимостью при нейтральных значениях рН, тогда как в нашем случае необходимо работать при значительно более кислой среде – рН 3,4. К сожалению, в данных условиях происходит взаимодействие белков-стандартов с носителем, либо же эти белки недостаточно стабильны, поэтому четкая зависимость между объемом элюции и молекулярной массой не обнаруживается, что не позволяет построить калибровочную кривую и оценить молекулярную массу полученных агрегатов.

Однако, из данного рисунка видно, что при равном времени нагревания скрейпи устойчивый вариант ARR быстрее образует более крупные олигомеры, чем скрейпи-подверженный VRQ.

С помощью метода ДЛС можно видеть, что размеры агрегатов при таком нагревании составляют около 16 и 33 нм (Рис. 51), тогда как при формировании промежуточных олигомеров в слабощелочной среде размер составляет 7,5 нм.

Как уже было сказано, одним из методов, свидетельствующих об амилоидогенности белка, является флуоресценция связанного тиофлавина Т. На Рис. 52 можно видеть, что термоагрегированные малые олигомеры приона связывают тиофлавин Т и вызывают его флуоресценцию.

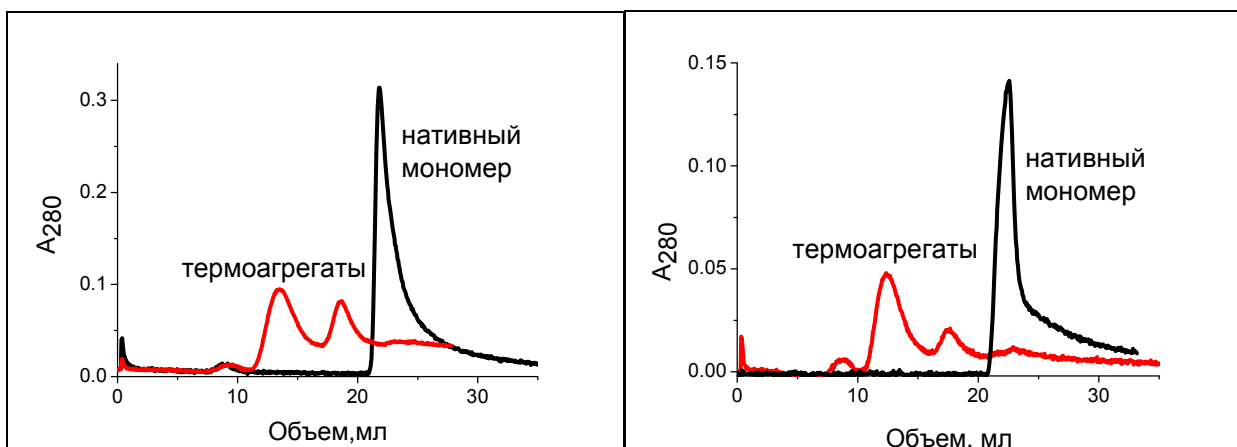


Рис. 50. Профили элюции вариантов ARR (слева) и VRQ (справа) приона на колонке TSK 3000SW (Гель-фильтрация, ВЭЖХ).

Использовали раствор белка с концентрацией 0.5 мг/мл в 20 мМ натрий-цитратном буфере, рН 3,4. Нагревали при температуре 60°C в течение 30 мин, контроль показан черным цветом, агрегаты - красным.

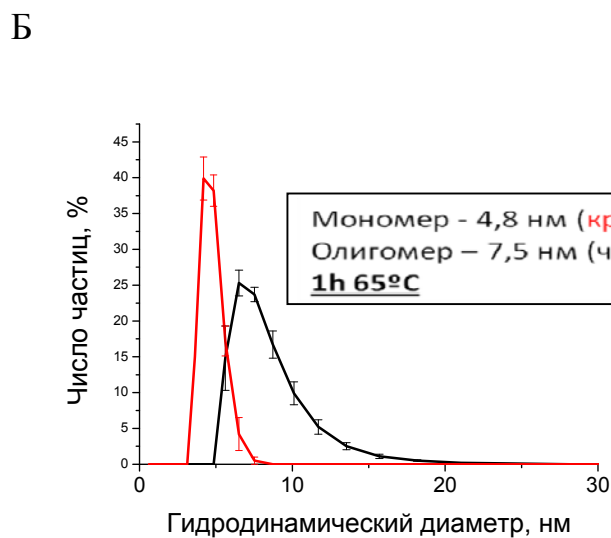
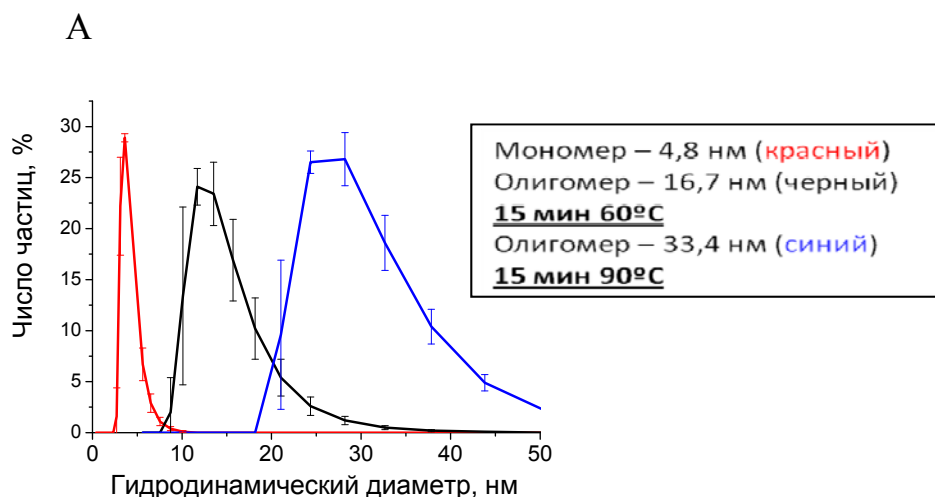


Рис. 51. Гидродинамический диаметр малых олигомеров приона (вариант VRQ), полученных с помощью термоагрегации в кислой (А) и нейтральной (Б) среде.

А - 40 мкМ прион в 20 мМ цитратном буфере, рН 3,4, нагревали в течение 15 минут при 60 и 90°C.

Б - 40 мкМ прион в 20 мМ MOPS буфере, рН 7,2, нагревали в течение 60 минут при 65°C.

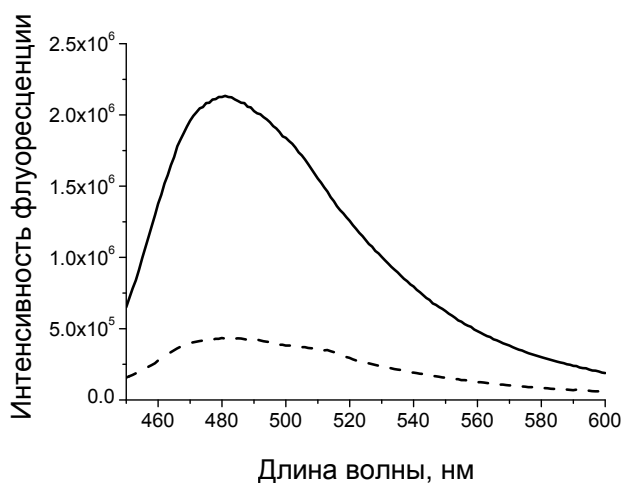


Рис. 52. Спектры флуоресценции тиофлавина Т (в условных единицах) для нативного (пунктирная линия) и термоагрегированного приона (сплошная линия).

60 мкМ прион (вариант VRQ) в 20мМ MOPS буфере, рН 7,2, нагревали при 65°C в течении часа.

### *Электронная микроскопия агрегатов приона*

Для анализа структуры полученных при нагревании агрегатов использовали трансмиссионную электронную микроскопию. В данном случае проводили обработку белка при температуре 90°C в течении часа.

При использовании трансмиссионной электронной микроскопии можно видеть неструктурированную белковую сеть, причем независимо от метода контрастирования: без контрастирования (Рис. 53А), с помощью контрастирования фосфовольфрамовой кислотой (Рис. 53Б) и ацетата урана (Рис. 53В). Диаметр наблюдаемых неорганизованных фибрилл составляет около 50 нм (Рис. 53). В случае контрастирования ацетатом урана можно видеть отдельные агрегаты размером также около 50 нм. Таким образом, можно предположить, что сеть образуется из таких агрегатов.

Показательно, что атомно-силовая микроскопия дала сходные результаты (Рис. 54). Также можно видеть сеть фибрилл диаметром около 100 нм, что несколько больше диаметра наблюдаемого при трансмиссионной электронной микроскопии. Вероятно, это можно объяснить разницей методов, однако размер все-таки сопоставим.

В следующем опыте использовали препарат приона, нагреваемый в течение 30 минут при 90°C. Такая обработка не вызывает преципитации, однако позволяет видеть образование агрегатов.

Пробы для микроскопии были контрастированы фосфовольфрамовой кислотой. Четко видно (Рис. 55), что отсутствие агрегатов в контролях сменяется их образованием в пробах после нагревания.

В используемых условиях нагревания агрегация наблюдается как для скрейпи-подверженного варианта, так и для скрейпи-устойчивого.

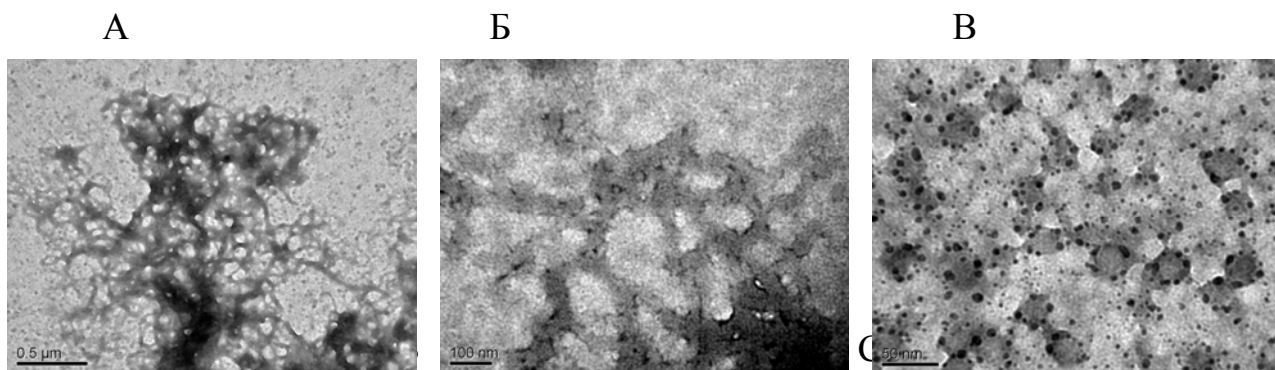


Рис. 53. Фотографии агрегировавшего PrP VRQ, полученные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

PrP VRQ (1 мг/мл в 20 мМ натрий-цитратном буфере, pH 3,4) нагревали при 90°C в течение часа.

А – без контрастирования; В – контрастирование фосфовольфрамовой кислотой; С – контрастирование ацетатом урана.

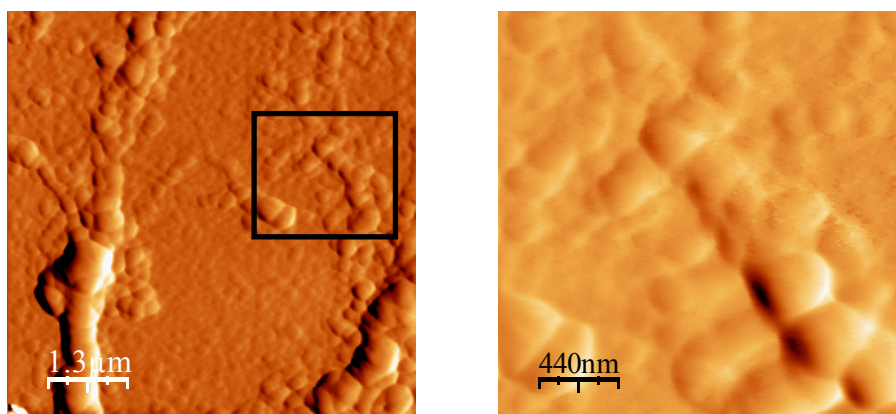
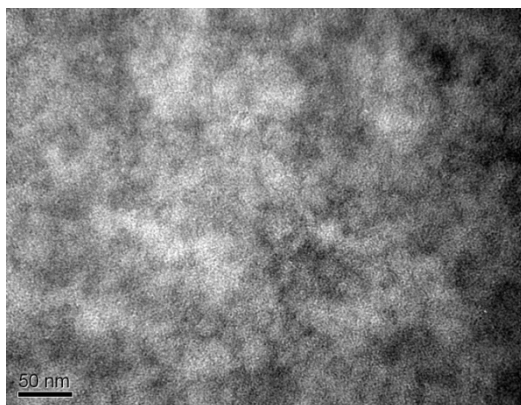


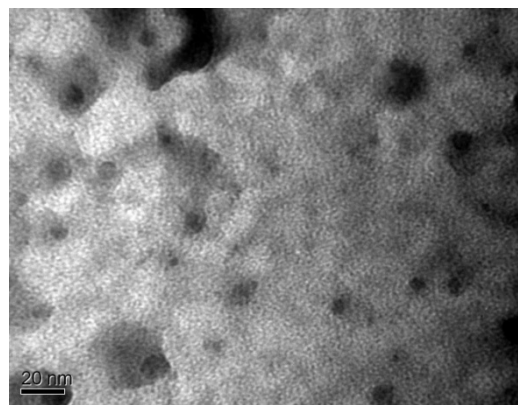
Рис. 54. Фотографии агрегировавшего PrP VRQ, полученные с помощью атомно-силовой микроскопии.

PrP VRQ (1 мг/мл в 20 мМ натрий-цитратном буфере, pH 3,4) нагревали при 90°C в течение часа. В рамку выделен увеличенный фрагмент, показанный справа.

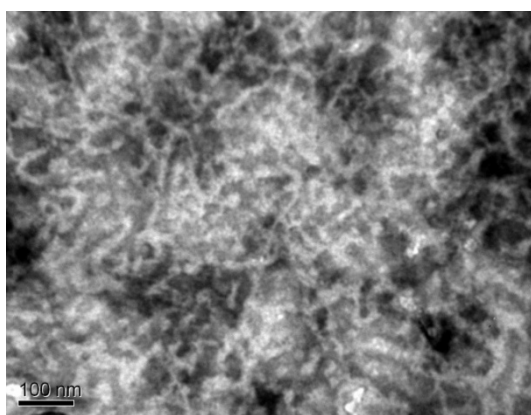




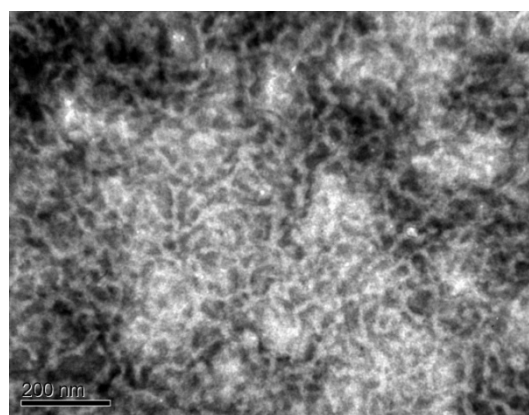
PrP ARR контроль



PrP VRQ контроль



PrP ARR после нагревания



PrP VRQ после нагревания

Рис. 55. Фотографии приона, полученные с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

PrP VRQ и ARR (1 мг/мл в 20 мМ натрий-цитратном буфере, pH 3,4) нагревали при 90°C в течение 30 минут.

## ***Исследование влияния липидов на амилоидогенную конверсию***

Целью данной части работы было исследование влияния мицеллярных и субмицеллярных концентраций фосфолипидов на агрегацию мономерных и олигомерных форм приона, а также на переход приона в конформацию, обогащенную  $\beta$ -слоями. Предполагалось, что прион способен к агрегации в присутствии различных концентраций фосфолипидов из-за дополнительных гидрофобных взаимодействий. Также предполагалось, что заряд липидов очень важен для процесса агрегации.

Кроме того, собственный гликофосфолипидный якорь приона влияет на амилоидогенез, поскольку скрейпи-форма приона без GPI-якоря отличается более интенсивным образованием фибрилл от формы, имеющей GPI-якорь (Chesebro *et al.*, 2005). Предполагается, что гликофосфолипидный якорь напрямую взаимодействует с белком и тем самым влияет на образование фибрилл. Возможно, что липиды, подобно собственному GPI-якорю приона, способны напрямую влиять на амилоидогенез, вызывая агрегацию приона. Закрепление приона с помощью GPI-якоря позволяет как минимум частично предотвратить его агрегацию, отделяя прион от липидов. Таким образом можно сделать заключение о том, что отделение приона от мембраны и свободная циркуляция способны повысить интенсивность образования агрегатов.

С учетом всего вышесказанного, интересным представляется подтверждение влияния различных концентраций фосфатидилинозитола на агрегацию олигомеров приона, токсичность которых была недавно обнаружена (Silveira *et al.*, 2005, Simoneau *et al.*, 2007). В то же время, имеется вероятность того, что в мицеллярных концентрациях (500 мкМ) фосфатидилинозитол может взаимодействовать с мономерами приона по-другому, чем в немицеллярных. Таким образом, мы сравнивали влияние

разных концентраций фосфолипидов как на мономерную, так и на олигомерную форму приона. Также с помощью исследования изменений во вторичной структуре приона под действием фосфолипидов предполагалось установить, является ли агрегация приона под действием фосфолипидов амилоидогенной.

Таким образом, в данной части работы была изучена роль фосфолипидного окружения в регуляции как амилоидогенной конверсии, так и агрегатного состояния приона.

#### *Размер прион-липидных агрегатов*

Для исследования взаимодействий приона и липидов был выбран фосфатидилинозитол, заметно стимулирующий агрегацию приона.

Исходя из данных динамического лазерного светорассеяния, прион в растворе представляет собой мономер с гидродинамическим диаметром 4,8 нм (Рис. 56.). После инкубации 20 мкМ приона с 500 мкМ фосфатидилинозитола при 37°C наблюдалось образование растворимых агрегатов с гидродинамическим диаметром 50 нм (рис. 56). Размер агрегатов не изменяется в течение 20 часов инкубации с липидом. В данной концентрации сам фосфатидилинозитол образует мицеллы диаметром 8,7 нм (Рис. 56, пунктирная линия). Таким образом, можно предположить, что в данных условиях прион образует смешанные мицеллы с фосфатидилинозитолом.

Как уже упоминалось ранее, прион образует нерастворимые агрегаты при инкубации со 100 мкМ фосфатидилинозитола. Такой же эффект наблюдается и при концентрации фосфатидилинозитола, равной 50 мкМ (2,5-кратный мольный избыток фосфатидилинозитола относительно приона). В этих концентрациях фосфатидилинозитола измеряемый гидродинамический

диаметр частиц достигает 530 нм сразу после смешивания приона с липидом, увеличиваясь до 1720 нм после инкубации в течение 10 минут (Рис. 56). Дальнейшие измерения диаметра частиц не представляются возможными из-за быстрого выпадения осадка. Подобное поведение приона стало неожиданным, поскольку его смесь с более высокой (500 мкМ) концентрацией фосфатидилинозитола полностью растворима. Можно предположить, что большой избыток фосфолипида в мицеллах препятствует белок-белковым взаимодействиям, тем самым предотвращая агрегацию.

При уменьшении концентрации фосфолипида до 5 мкМ, что соответствует соотношению фосфатидилинозитол:прион = 1:4, также наблюдалась быстрая агрегация приона, однако образующиеся частицы оставались растворимыми несмотря на то, что их средний диаметр достигал 615 нм через 15 минут, и почти 1000 нм через 120 минут после начала инкубации (Рис. 56). Интересно, что при уменьшении концентрации фосфатидилинозитола еще в 10 раз, т.е. до 0,5 мкМ и молярного соотношения фосфатидилинозитол:прион = 1:40, быстрая агрегация по-прежнему имела место. При таких условиях прион оставался в мономерной форме в течение первых 15 минут инкубации, затем образуя агрегаты диаметром 100 нм через 30 минут, и 350 нм через 120 минут после начала инкубации (Рис. 56). При концентрациях фосфатидилинозитола от 0,5 мкМ до 50 мкМ образование мицелл не наблюдалось.

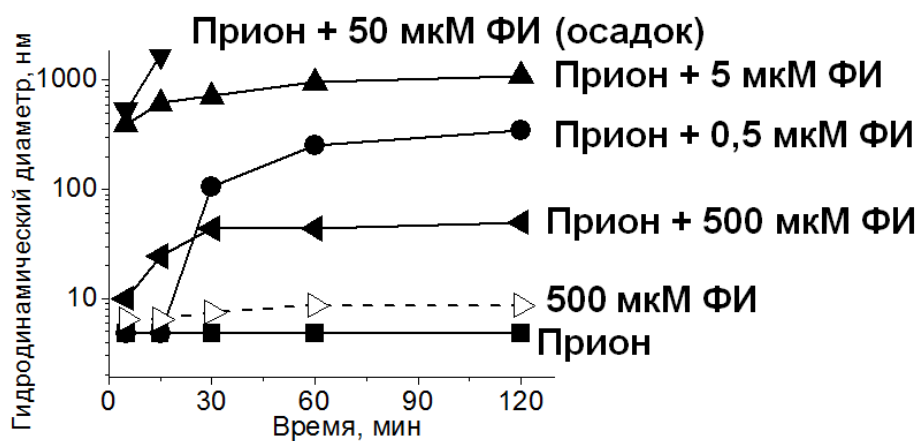


Рис. 56. Гидродинамический диаметр частиц, образующихся при взаимодействии нативного мономера приона с фосфатидилинозитолом (ФИ) в разных концентрациях.

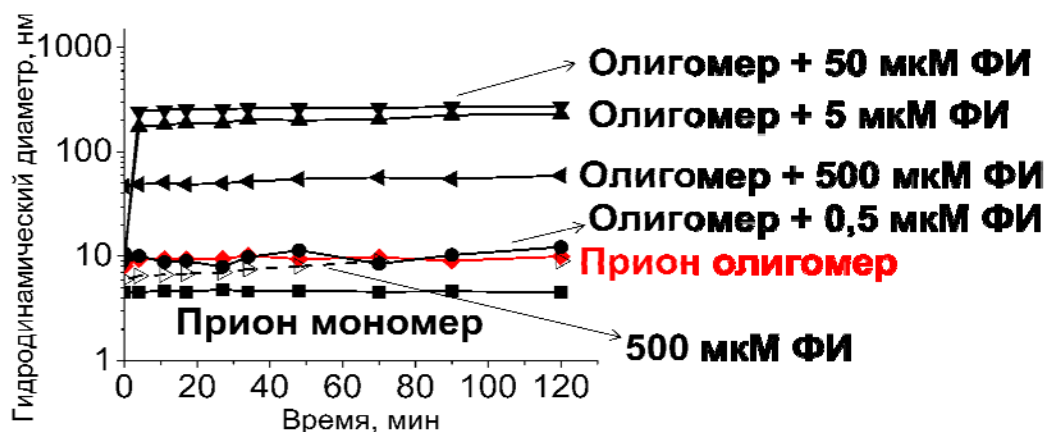


Рис. 57. Гидродинамический диаметр частиц, образующихся при взаимодействии малых термоагрегатов приона с фосфатидилинозитолом в разных концентрациях.

Ранее было показано, что термическая денатурация приона при нейтральных значениях рН с последующим охлаждением до комнатной температуры приводит к образованию белковых агрегатов с амилоидогенными свойствами (Rezaei *et al.*, 2002). Олигомерные формы приона были получены при нагревании его до 65°C в течение 1 часа при рН 7,2. Амилоидогенность перехода подтверждалась изучением флуоресценции тиофлавина Т. В присутствии амилоидной формы приона тиофлавин Т проявляет повышенную интенсивность флуоресценции с максимумом при 490 нм (Рис. 57). Размер частиц приона после термической денатурации возрастает с 4,5 до 9 нм (Рис. 57), что соответствует образованию ранее наблюдавшихся олигомеров (Rezaei *et al.*, 2002, Simoneau *et al.*, 2007).

Было исследовано влияние фосфатидилинозитола на размеры таких агрегатов. Было установлено, что 0,5 мкМ ФИ не изменяет размера олигомеров. Инкубация приона с 5 или 500 мкМ фосфатидилинозитола, напротив, вызывает увеличение размера частиц до 200 и 250 нм, соответственно (Рис. 57). Инкубация с 500 мкМ ФИ приводит к существенному росту наблюдаемого размера мицелл с 8,7 до 50 нм (Рис. 57). Таким образом, при инкубации с высокими концентрациями фосфатидилинозитола образуются смешанные мицеллы, предохраняющие прион от избыточной агрегации.

#### *Вторичная структура агрегатов приона*

Изменения вторичной структуры, происходящие при фосфатидилинозитол-зависимой агрегации приона, изучались методом КД в дальнем ультрафиолете (данные Цирульникова К.). На спектрах КД (данные не приведены) видно, что характерная для приона  $\alpha$ -спиральная конформация практически не изменяется при образовании крупных агрегатов под

действием 0,5 или 5 мкМ фосфатидилинозитола. Напротив, в случае небольших агрегатов, полученных при взаимодействии приона с 500 мкМ ФИ, наблюдаются спектральные признаки перехода  $\alpha$ -спиралей в  $\beta$ -листы. В таблице 6 представлено отношение молярных эллиптичностей  $\theta_{218\text{nm}}/\theta_{207\text{nm}}$ , характеризующее изменение количества  $\beta$ -листов.

Прионные агрегаты, образующиеся в присутствии 0.5 и 5 мкМ фосфатидилинозитола демонстрируют отношение  $\theta_{218\text{nm}}/\theta_{207\text{nm}}$ , близкое к характерному для мономерной формы приона. Напротив, для агрегатов приона, образующихся в присутствии 500 мкМ ФИ характерны повышенные значения отношения  $\theta_{218\text{nm}}/\theta_{207\text{nm}}$ , отвечающие увеличению содержания  $\beta$ -структур (Таблица 6).

Интересно, что агрегаты небольшого размера содержат больше  $\beta$ -листов, чем более крупные частицы. Видимо, образование  $\beta$ -структур по каким-то причинам замедлено в случае быстрой агрегации приона. Можно также предположить, что образование агрегатов небольшого размера и ограниченное число межмолекулярных взаимодействий предпочтительны для изменений во вторичной структуре приона.

Известно, что губчатая энцефалопатия вызывается накоплением сильно агрегированных нерастворимых форм приона. В данной части работы исследовались взаимодействия различных концентраций фосфолипидов с мономерной и термоагрегированной олигомерной формами приона. Было обнаружено, что агрегация приона происходит очень быстро даже при очень низком молярном отношении прион:липид = 1:50 (0.5 мкМ фосфолипида). В случае мольного отношения 2.5:1 (50мкМ липида) агрегация приона сопровождается образованием нерастворимых структур. Однако, взаимодействие мономерной или олигомерной формы приона с 500 мкМ липида (мольное отношение 25:1) приводит к образованию небольших

растворимых агрегатов (или смешанных частиц), содержание  $\beta$ -структур в которых заметно повышено.

Таблица 6. Характеристическое для  $\beta$ -слоев соотношение  $\theta_{218\text{нм}}/\theta_{207\text{нм}}$  для системы прион - фосфатидилинозитол.

Концентрация фосфатидилинозитола, мкМ	$\theta_{218\text{нм}}/\theta_{207\text{нм}}$
0	0.97
0.5	0.92
5	1.02
500	1.38



Проведенное исследование показывает, что агрегация приона происходит незамедлительно при взаимодействии с фосфолипидами, особенно с фосфатидилинозитолом, фосфатидной кислотой, фосфатидилэтаноламином и фосфатидилсерином. Отсюда можно сделать вывод о том, что заряд фосфолипида не является главным фактором, влияющим на агрегацию приона. Интересно отметить, что фосфатидилинозитол и фосфатидилэтаноламин даже в небольших концентрациях вызывали быструю агрегацию мономерного приона. Быстрая агрегация наблюдалась вплоть до концентраций липидов 0,5 и 5 мкМ, соответствующих мольным соотношениям 1:40 и 1:4, и приводила к образованию крупных частиц диаметром 300-1000 нм. Супрамолекулярные структуры, образованные фосфолипидами, в этих условиях не наблюдались. Возможно, что это является следствием ограничений метода динамического лазерного светорассеяния. Учитывая, что реальные концентрации липидных частиц могут быть значительно меньше взятых концентраций свободного липида, наблюдаемая быстрая агрегация приона может означать, что после начального конформационного перехода приона, вызванного липидом, дальнейшая агрегация происходит без участия последнего. Другими словами, взаимодействие с фосфатидилинозитолом или фосфатидилэтаноламином дает белку способность взаимодействовать с "нормальными" молекулами приона, делая их более склонными к агрегации. Образовавшийся олигомер, в свою очередь, взаимодействует с другими моно- или олигомерами, что в конечном итоге приводит к моментальной агрегации. Эту реакцию можно назвать цепной, поскольку после первого контакта приона с фосфатидилинозитолом все свободные молекулы приона приобретают свойства приона, связанного с липидом и рекрутируются в большие агрегаты. Такой механизм согласуется с "белковой" гипотезой, согласно которой небольшие количества инфекционных агрегатов приона способны вызывать

трансформацию нормального приона без помощи других молекул. Очевидно, липиды, и в первую очередь собственный гликофосфолипидный якорь приона, играют важную роль в этом переходе, модулируя агрегационные свойства приона.

В эквимольных соотношениях прион:фосфолипид наблюдается моментальное выпадение в осадок как мономерной, так и олигомерной формы приона. Однако, при увеличении концентрации фосфолипида в 10 раз, т. е. до 500 мкМ, прион образует небольшие растворимые олигомеры. В тех же условиях наблюдается образование липидных мицелл. Можно предположить, что включение приона в смешанные мицеллы предотвращает образование более крупных агрегатов. Участки приона, вовлеченные в белок-белковые взаимодействия, могут быть закрыты при взаимодействии с липидами.

Логично предположить, что гидрофобные взаимодействия с алифатической цепью играют важную роль в индукции агрегации белка. Другие липиды, в частности жирные кислоты, также стимулируют агрегацию приона, однако их эффект заметно слабее по сравнению с фосфатидилэтаноламином и фосфатидилинозитолом. Видимо, природа и окружение алифатической цепи также влияют на свойства получаемых агрегатов.

Изучение вторичной структуры агрегатов приона показало практически полное сохранение  $\alpha$ -спиральных структур в крупных агрегатах, получаемых при взаимодействии приона с 0,5 или 5 мкМ фосфатидилинозитола. Напротив, небольшие агрегаты, получаемые в присутствии 500 мкМ PI демонстрируют повышенное содержание  $\beta$ -структур, характерное для амилоидных форм приона. Таким образом, неограниченная агрегация ингибирует образование элементов  $\beta$ -структуры, либо дестабилизирует ее. Образование элементов  $\beta$ -структуры более эффективно происходит в

небольших агрегатах. Это может быть общим свойством приона, поскольку такой же структурный переход наблюдается у небольших агрегатов приона, связанных с медью (Tsiroulnikov *et al.*, 2006). Однако, несмотря на агрегацию и повышенное содержание  $\beta$ -структур, агрегаты, образующиеся при контакте с фосфатидилинозитолом, не приобретают устойчивости с действием протеиназы К и могут быть гидролизованы, то есть не являются истинно амилоидными.

Ранее было показано, что в определенных условиях термическая денатурация мономерного приона приводит к образованию олигомеров с амилоидными свойствами (Rezaei *et al.*, 2002). Такие олигомеры, в отличие от более крупных агрегатов, наиболее нейротоксичны *in vivo*.

Небольшие агрегаты приона, амилоидогенные свойства которых были подтверждены с помощью флуоресценции тиофлавина Т, также способны изменять свои агрегационные свойства в присутствии фосфолипидов. Инкубация таких структур с 5 и 50 мкМ фосфатидилинозитола приводит к их дальнейшей агрегации, однако конечный размер агрегатов оказывается меньше, чем в случае мономерного приона в тех же условиях. Было показано, что присутствие 0,5 мкМ ФИ не влияет на размер агрегатов. Более высокие концентрации фосфолипидов влияют на агрегацию иным образом. В присутствии 500 мкМ ФИ дальнейшая агрегация небольших олигомеров приона не наблюдалась, предположительно из-за взаимодействия с мицеллами ФИ или включения приона в мицеллы.

Полученные результаты показывают, что молекулы липидов, особенно собственный GPI-якорь приона, могут влиять на амилоидогенные свойства белка. В зависимости от концентрации, фосфолипиды могут совершенно по-разному влиять на образование амилоидогенных структур. Так, фосфатидилинозитол в низких концентрациях вызывает быструю агрегацию как мономерного, так и олигомерного приона. В случае мономерной формы

агрегация не сопровождается повышением содержания  $\beta$ -слоев в белке, что согласуется с имеющимися литературными данными (Silveira *et al.*, 2005, Simoneau *et al.*, 2007). Высокие концентрации липида (500 мкМ, выше критической концентрации мицеллообразования) приводят к совершенно противоположному эффекту. Переход из  $\alpha$ -спиральной к  $\beta$ -листовой изоформе наблюдается в случае мономерного приона, что характерно для образования амилоидогенных структур. Такие структуры, по всей видимости, включаются в смешанные белково-фосфолипидные частицы. Олигомерные формы приона не образуют крупных агрегатов в присутствии высоких концентраций фосфолипидов, однако похожим образом взаимодействуют с мицеллами фосфатидилинозитола. Следовательно, можно заключить, что фосфолипиды в низких концентрациях выступают в роли медиаторов интенсивной агрегации моно- и олигомерных форм приона, понижая их патологическое влияние. В то же время, высокие концентрации фосфолипидов стимулируют процесс амилоидогенеза.

Закрепление приона в мембране с помощью GPI-якоря может как минимум частично предотвратить контакт дистального фрагмента с липидами мембраны и с самим якорем, предохраняя белок от агрегации. Напротив, высвобождение приона из мембраны может привести к его неконтролируемому взаимодействию с липидами мембраны, тем самым повышая риск образования агрегатов с повышенным содержанием  $\beta$ -слоев. Возможно, в клетках существует некая стабилизирующая система, предотвращающая прямой контакт GPI с прионом в случае освобождения последнего из мембраны.

## *Исследование амилоидогенной конверсии, вызванной гомоцистеинилированием*

В данной части работы перед нами стояла задача проверить, вызывает ли гомоцистеинилирование амилоидогенную агрегацию приона, а также изучить влияние образования дисульфидных связей на агрегацию приона. На возможность такой модификации в физиологических условиях указывают следующие факты:

- PrP расположен на наружной клеточной мембране
- Время полужизни приона у млекопитающих составляет 5,5 часов
- Молекула приона содержит 10 остатков лизина
- Гематоэнцефалический барьер проницаем для гомоцистеина

### *Подтверждение и качественное определение модификации*

Нами было показано, что при добавлении гомоцистеинтиолактона к раствору приона происходит его агрегация, проявляющаяся в увеличении мутности раствора. Для анализа образующихся агрегатов после инкубации гомоцистеинтиолактона с прионом реакцию смесь центрифугировали и анализировали как осадок, так и супернатант. На Рис. 58 можно видеть, что при анализе осадка с помощью ДСН-электрофореза по Лэммли в невостанавливающих условиях (дорожка 3) выявляется прион в виде мономеров, димеров и других олигомеров. В то же время в супернатанте прион остается в такой же мономерной форме, как и в контрольном образце. Эти данные свидетельствуют о гомоцистеинилировании приона, так как, благодаря появлению свободных SH-групп из-за включения гомоцистеина в состав белка, происходит их ассоциация за счет образования межсубъединичных дисульфидных связей. Кроме того, гомоцистеинтиолактон также способен реагировать с SH-группами

новоприсоединенного гомоцистеина. Таким образом, гомоцистеин в составе белка может образовать дисульфид либо с другой молекулой белка, что приводит к агрегации, либо прореагировать с гомоцистеинтиолактоном и остаться в растворе.

Другим признаком наличия модификации в составе белка является характерное размытие белковой полосы, объясняемое гетерогенностью полученных продуктов. В аминокислотной последовательности приона насчитывается 10 остатков лизина, следовательно, можно предполагать множественное гомоцистеинилирование. Все полученные эффекты исчезают при добавлении в пробы для электрофореза  $\beta$ -меркаптоэтанола.

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), используемая в качестве контроля, при тех же условиях демонстрирует обширную агрегацию, сопровождающуюся исчезновением белка в супернатанте и появлением в осадке мультимерных форм (Рис. 58). При этом модификация практически не влияет на активность ГАФД, которая сохраняется на протяжении 24 часов, что говорит о поверхностном характере модификации, так как критический для катализа остаток лизина остается недоступным.

Поскольку используемые для модификации концентрации гомоцистеинтиолактона значительно превышают физиологические, была сделана попытка проанализировать наличие модификации при использовании гораздо более низких концентраций реагента. Было показано, что модификация приона низкими концентрациями гомоцистеинтиолактона (100 мкМ) приводит к образованию аналогичных продуктов (Рис. 59).

## *Количественный анализ эффективности включения гомоцистеина в прион*

Определение количества остатков гомоцистеина, включенных в прион после 24 часовой инкубации с 100-кратным избытком гомоцистеинтиолактона, проводили с помощью титрования сульфгидрильных групп ДТНБ. Для этого модифицированный прион обрабатывали 8М гуанидингидрохлоридом в течение часа при 37°C, затем обессоливали на колонке PD-10 для удаления остатков свободного гомоцистеина и непрореагировавшего тиолактона. Полученный белок инкубировали в присутствии 5 мМ β-меркаптоэтанола в течение часа при температуре 40°C для восстановления сульфгидрильных групп гомоцистеиновых остатков, добавляли гуанидингидрохлорид и снова подвергали обессоливанию. Для определения SH-групп использовали фракции из начала пика, содержащего белок. Измерения проводили при длине волны 412 нм, для расчетов использовали  $\epsilon = 13\ 600$ . Было показано, что в этих условиях при гомоцистеинилировании приона в среднем включается 2 остатка гомоцистеина на мономер приона. Однако, на самом деле эффективность включения может быть несколько выше, так как часть агрегатов не растворяется даже в 8М гуанидингидрохлориде и не может быть проанализирована в этом эксперименте. Проведение аналогичных манипуляций с контрольным немодифицированным прионом показало, что восстановление 5 мМ β-меркаптоэтанолом не приводит к восстановлению внутренней дисульфидной связи между двумя собственными цистеинами в составе приона.

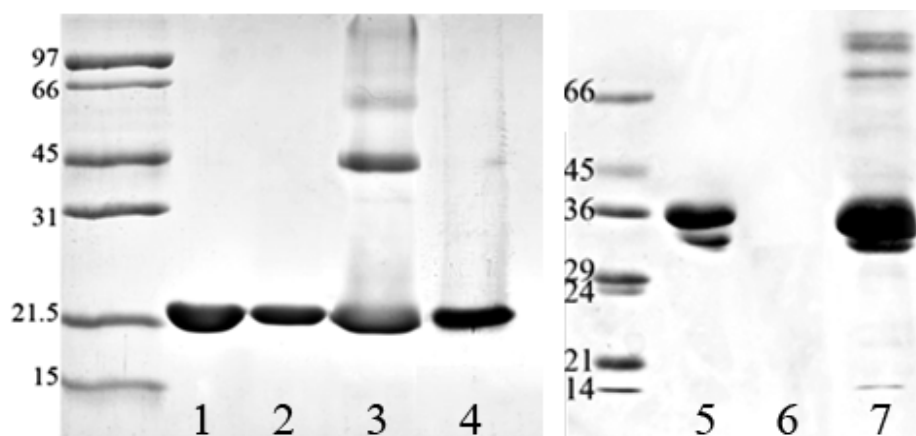


Рис. 58. Электрофореграмма фракций приона при гомоцистеинилировании.

Профиль ДСН-электрофореза в 12% ПААГ в невозстанавливающих условиях при модификации приона и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы гомоцистеинтиолактоном в 100-кратном избытке на остаток лизина. 1 – нативный прион до модификации, 2 – супернатант после модификации, 3 – осадок после модификации, 4 – осадок после модификации при обработке  $\beta$ -меркаптоэтанолом, 5 – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа до модификации, 6 – супернатант после модификации, 7 – осадок после модификации.

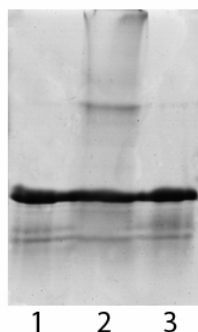


Рис. 59. Электрофореграмма фракций приона при модификации низкими концентрациями гомоцистеинтиолактона.

Профиль ДСН-электрофореза в 12% ПААГ в невозстанавливающих условиях при модификации приона трижды гомоцистеинтиолактоном в количестве 100 мкМ реагента в течении 1 месяца, 37°C. 1 – нативный прион до модификации, 2 – осадок после модификации, 3 – супернатант после модификации



*Анализ наличия гомоцистеина в составе модифицированного приона методом масс-спектрометрии*

Для подтверждения включения гомоцистеина в молекулы приона был проанализирован димерный продукт реакции гомоцистеинилирования в сравнении с контролем методом масс-спектрометрического анализа (MALDI-TOF). Образцы, вырезанные из геля после электрофореза, обработали восстанавливающим SH-группы реагентом, затем ацетамидом для их блокировки, подвергли расщеплению трипсином. Результаты анализа представлены на Рис. 60 и Таблице 7. Для модифицированного приона после расщепления трипсином предполагали наличие пептидов с массой, отличающейся от такого же контрольного на массу гомоцистеина. Всего в карте расщепления трипсином аминокислотной последовательности приона существует восемь лизинсодержащих пептидов. Три коротких последовательности (K, LCK, TNMK) и один длинный пептид (YPPQGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQGGSHSQWNKPSKPK, 58 аминокислот) не анализируются данным методом, так как массы определяемых пептидов должны быть более 820 и менее 3000 Да.

Таким образом, из присутствующих в прионе 10 остатков при данном методическом подходе можно определить гомоцистеинилирование только 5 остатков – 26, 29 и 188, 197, 207. При анализе пептидов, содержащих лизиновые остатки 26 и 29, было показано, что в пептидах 27-40 и 26-40 не было обнаружено признаков модификации. Также это относится к 188 остатку, для которого результаты анализа не позволили однозначно утверждать наличие гомоцистеинилирования.

Четко доказана модификация 197 и 207 остатков лизина. Эти остатки гомоцистеинилируются и алкилируются когда находятся внутри пептидов с

пропущенными сайтами трипсинолиза (пептид 189-207 для 197 остатка и пептид 198-211 для 207 остатка, а также пептид 189-211 для обоих остатков). К сожалению, в последнем случае невозможно продемонстрировать одновременную модификацию обоих остатков, как так молекулярная масса такого пептида выходит за пределы чувствительности прибора (3000 Да).

Гомоцистеинилированные остатки 197 и 207 обнаружены также на концах коротких пептидов (189-197 и 198-207), что подтверждает сделанное ранее заключение об их модификации. Следует отметить, что во всех случаях наблюдается частичный трипсинолиз белка в сайтах, содержащих гомоцистеинилированные остатки лизина, о чем свидетельствует присутствие немодифицированных и модифицированных пептидов. Это указывает, с одной стороны, на возможность трипсинолиза по гомоцистеинилированным остаткам лизина, а с другой, на неполную модификацию приона по всем идентифицированным остаткам лизина.

Таким образом, нами было обнаружено гомоцистеинилирование по 197, 207 и, возможно, 188 остаткам лизина, причем модификации подвергалась только часть остатков в популяции молекул приона. Очевидно, что такая модификация является достаточной для образования димеров, которые были подвергнуты анализу. Возможно, что более крупные ассоциаты гомоцистеинилированных прионов подвергаются более полной модификации.

23	<u>LCK</u> <u>KRP</u> <u>KP</u> GGGWNTGGSRYPGQGS PGGNRYPPQGGGGWGQPHGGGGWQ	70
	PHGGGGWQPHGGGGWQPHGGGGWGQGGSHSQWNKPSKPKT	110
	<u>NMK</u> HVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSVMSRPLIHFGNDYED	150
	RYYRENMYQYPNQVYYRPVDRYSNQNNFVHDCVNI TVKQH	190
	TVTTTTGGENFTETDIKIMERVVEQMCITQYQRESQAYYQRGAS	234

Рис. 60. Подтверждение наличия модификации с помощью масс-спектрометрии.

Анализ последовательности овечьего приона (база данных Swiss Prot, № P23907) [www.exPASy.org] с помощью полученных после MALDI-TOF фрагментов. Показана полноразмерная последовательность аминокислот с 23 по 234 остатки (без сигнального N-концевого и C-концевого пептидов).

Все возможные сайты расщепления трипсином указаны стрелками. Лизины отмечены серым цветом, модифицированные 197 и 207 остатки лизина обведены. Подчеркнутые пептиды ( 3 коротких LCK (23-25), K (26), TNMK (110-113) и один длинный:

YPPQGGGGWGQPHGGGGWQPHGGGGWQPHGGGGWQPHGGGGWGQGGSHSQWNKPSKPK (58 остатков с 52 по 109)) недоступны для анализа вследствие ограничений метода.

Таблица 7. Анализ гомоцистеинилирования приона осуществляли с помощью пептидов, полученных при MALDI-TOF анализе. (База данных Swiss Prot, № P23907) [[www.expasy.org](http://www.expasy.org)]. #MC - число пропущенных сайтов расщепления трипсином, лизины показаны жирным шрифтом и подчеркнуты, цистеины показаны курсивом и жирным шрифтом.

position	#MC	peptide sequence	peptide mass	in control sample	in N-Hcy-PrP sample	modified peptide mass (+117)	in N-Hcy-PrP sample	modified and alkylated peptide mass (+117+57)	in N-Hcy-PrP sample
27-40	0	RP <u>K</u> PGGGWNTGGSR	1426.73	+	+	1543.91	-	1600.93	-
26-40	1	<u>K</u> RP <u>K</u> PGGGWNTGGSR	1554.82	+	+	1672.00	-	1729.02	-
27-51	1	RP <u>K</u> PGGGWNTGGSRYPGQGSPGGNR	2497.22	-	-	2614.40	-	2671.42	-
26-51	2	<u>K</u> RP <u>K</u> PGGGWNTGGSRYPGQGSPGGNR	2625.31	-	-	2742.49	-	2799.51	-
172-188	0	YSNQNNFVHD <u>C</u> VNITV <u>K</u> *	2051.96	-	-	2169.14	-	2226.16	-
172-197	1	YSNQNNFVHD <u>C</u> VNITV <u>K</u> QHTVTTTT <u>K</u> *	3049.48	N/A	N/A	3166.66	N/A	3223.68	N/A
189-197	0	QHTVTTTT <u>K</u>	1016.54	+	+	1133.72	+	1190.74	-
189-207	1	QHTVTTTT <u>K</u> GENFTETDI <u>K</u>	2151.06	+	+	2268.24	-	2325.26	+
198-207	0	GENFTETDI <u>K</u>	1153.54	+	+	1270.72	+	1327.74	+
198-211	1	GENFTETDI <u>K</u> IMER	1682.81	+	+	1799.99	-	1857.01	+
189-211	2	QHTVTTTT <u>K</u> GENFTETDI <u>K</u> IMER**	2680.32	+	+	2797.50	+	2854.52	+

\* Масса пептидов вычислена с учетом алкилирования остатков цистеина.

\*\* Наличие пептидов с двумя гомоцистеинилированными и алкилированными остатками не может быть определено в силу превышения лимита массы 3000 Да.

### *Агрегация приона в процессе гомоцистеинилирования*

Агрегацию белков исследовали методом динамического лазерного светорассеяния. На Рис. 61 можно видеть, что модификация в условиях 100-кратного избытка гомоцистеинтиолактона на остаток лизина белка ведет к образованию крупных (с гидродинамическим диаметром около 1000 нм) агрегатов приона. Образование агрегатов не является следствием изменения окружения белковых молекул, так как использование в качестве контроля аналогичных количеств цистеина не привело к увеличению размера частиц (данные не показаны). При использовании более низких концентраций (50-кратный избыток гомоцистеинтиолактона на остаток лизина белка) реагента, размер агрегатов несколько уменьшается (до нескольких сотен нанометров), а при использовании 25-кратного избытка в кинетике реакции появляется лаг-период, то есть агрегаты начинают появляться только после часа инкубации с реагентом.

При исследовании поведения приона в условиях 10-кратного избытка реагента на остаток лизина, было показано, что в таких условиях не происходит быстрой агрегации.

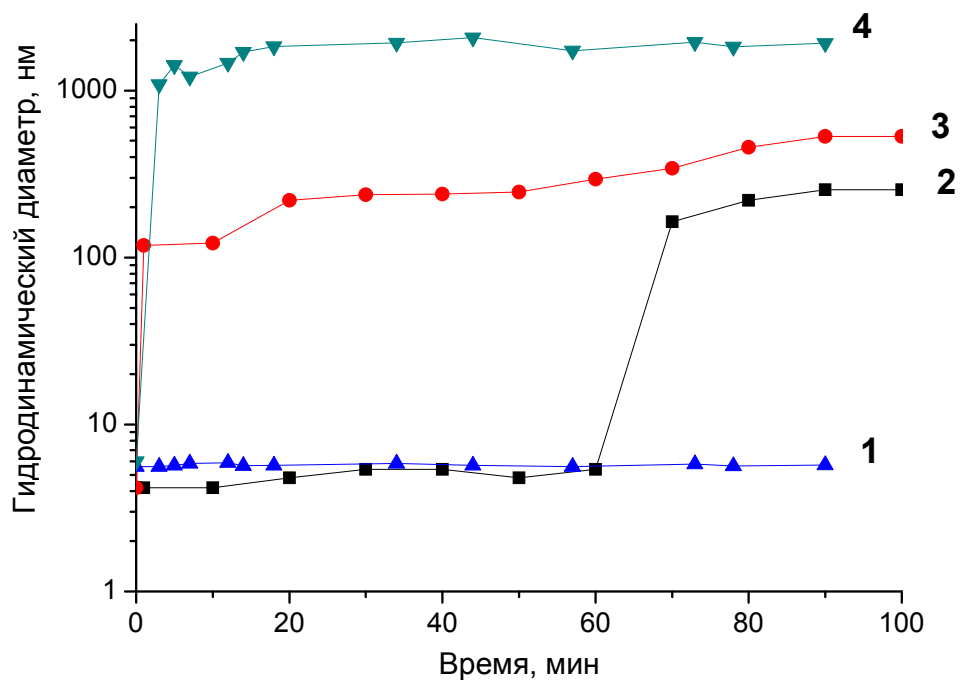


Рис. 61. Гидродинамический диаметр гомоцистеинилированного при разных концентрациях гомоцистеинтиолактона (1 - 10-кратный избыток в расчете на остаток лизина белка, 2 - 25-кратный, 3 - 50-кратный, 4 - 100-кратный) приона, полученный с помощью метода динамического светорассеяния.

*Изучение изменений во вторичной структуре гомоцистеинилированного приона*

Для детекции изменений в структуре модифицированного приона был использован метод инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (Рис. 62). В спектре белка анализировали первую амидную полосу 1610-1690  $\text{см}^{-1}$ , которая соответствует колебаниям связи C=O. Каждый образец был тщательно обессолен, чтобы исключить вклад свободного гомоцистеина, расположение основных пиков интенсивности которого указано стрелками. Два компонента на 1613 и 1690 нм расположены достаточно близко к пикам  $\beta$ -слоев, но все-таки разделимы. Модификация 10-кратным избытком гомоцистеинтиолактона ведет к значительным изменениям во вторичной структуре белка. Из полученных спектров видно, что нативный прион дает широкий пик с максимумом 1650  $\text{см}^{-1}$ , что соответствует наличию  $\alpha$ -спиралей и неорганизованной структуры.

На спектре гомоцистеинилированного приона появляются две полосы, расположенные на 1617 и 1678  $\text{см}^{-1}$ , которые показывают наличие антипараллельных  $\beta$ -слоев. В то же время интенсивность полосы, характеризующей  $\alpha$ -спираль и неорганизованную структуру, снижается.

Расположение пика ниже 1620  $\text{см}^{-1}$  говорит о формировании более сильных водородных связей в межмолекулярных  $\beta$ -слоях, что является характерным признаком для амилоидных структур (Nilsson, 2004).

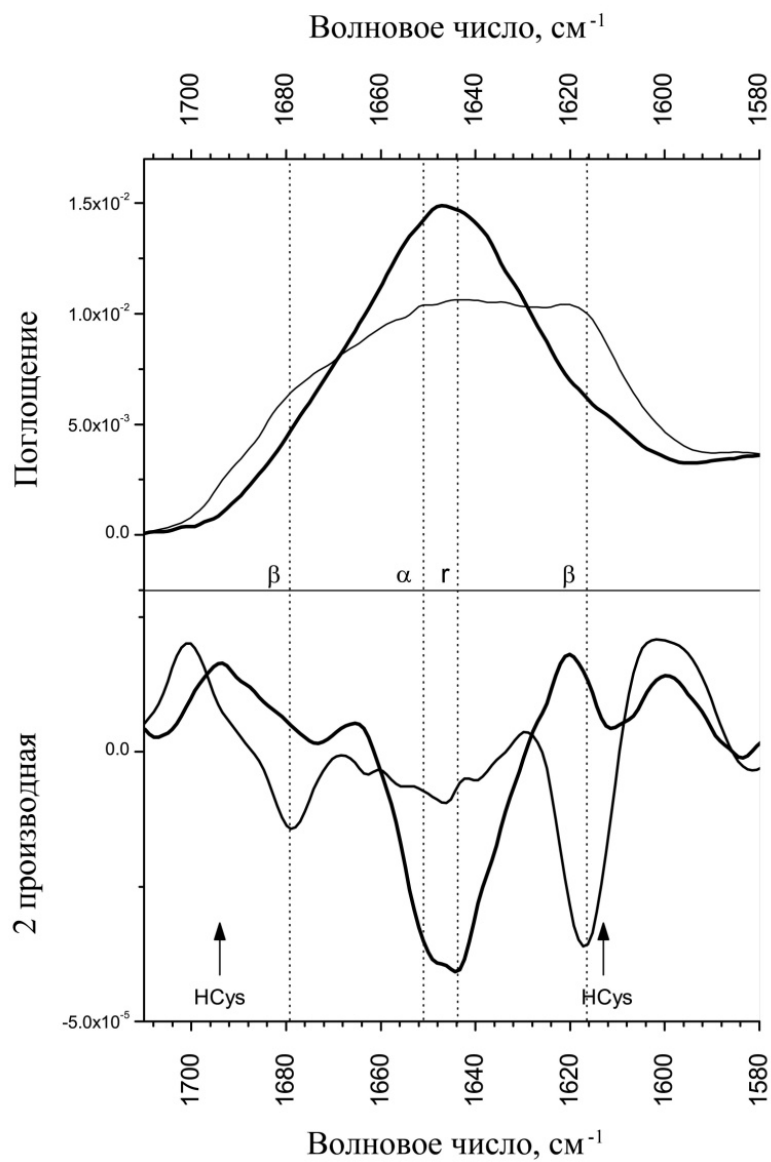


Рис. 62. Нормализованные ИК-спектры и их вторые производные (внизу) нативного (тонкая линия) и гомоцистеинилированного (толстая линия) приона.



### *Амилоидогенная конверсия модифицированного приона*

Характерной структурной особенностью приона является его способность к патологическому изменению вторичной структуры. Переход  $\alpha$ -спиральных элементов последовательности в  $\beta$ -слоистые структуры сопровождается образованием амилоидогенных агрегатов, то есть прион приобретает свойство трансформировать нормальный белок в конвертированный. Одним из методов, позволяющих исследовать такие структурные изменения, является изучение спектров флуоресценции тиофлавина Т. Тиофлавин Т при взаимодействии с амилоидогенным прионом приобретает максимум флуоресценции при 495 нм. Также известна способность тиофлавина Т флуоресцировать при включении в мицеллярные структуры. Для сравнения мы использовали упоминавшиеся ранее условия термообработки приона – нагревание при 80°C в течение 2 минут. На Рис. 63. представлены спектры флуоресценции гомоцистеинилированных белков при возбуждении светом с длиной волны 435 нм. В случае модификации приона 100-кратным избытком гомоцистеинтиолактона в расчете на остаток лизина можно видеть интенсивность флуоресценции, сопоставимую с контрольной, то есть можно сделать вывод, что гомоцистеинилирование приводит к амилоидогенной конверсии белка. При 10-кратном избытке реагента можно видеть, что флуоресценция выше контрольной, но намного меньше флуоресценции термоагрегированного приона, то есть степень модификации значительно ниже.

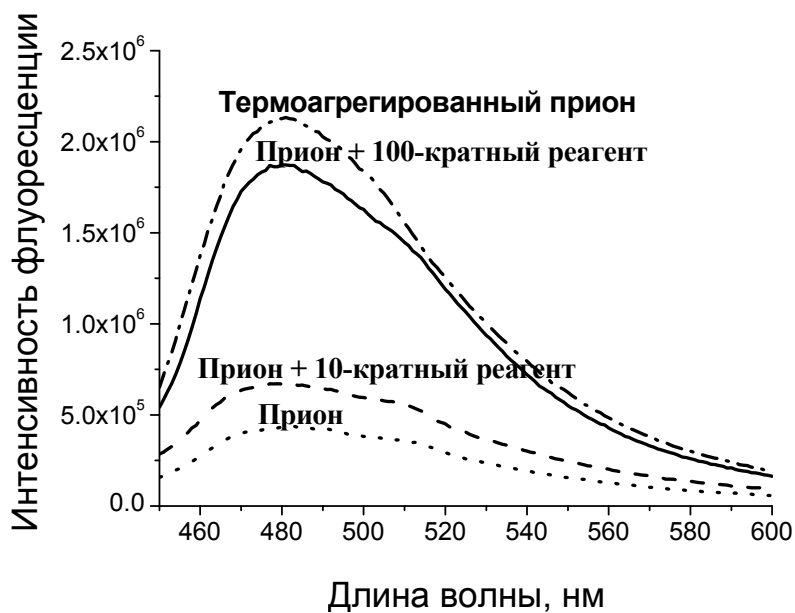


Рис. 63. Спектры флуоресценции тиофлавина Т (в условных единицах) для нативного и модифицированного гомоцистеинтиолактоном приона.

Представлены спектры флуоресценции приона при 100-кратном (сплошная линия) и 10-кратном (пунктирная линия) избытке гомоцистеинтиолактона, контроль показан точками, для приона добавлен спектр термообработанного при 80°C в течении 2 минут белка (штрихпунктирная линия).

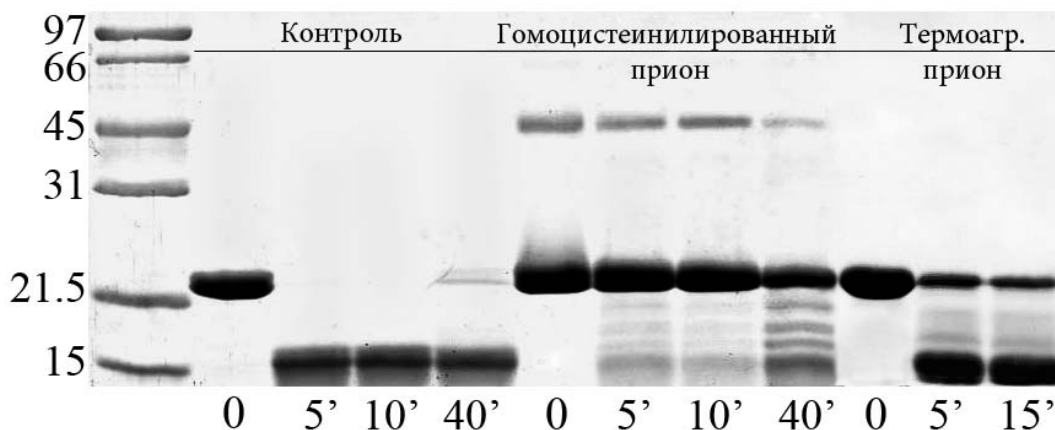


Рис. 64. Устойчивость гомоцистеинилированного приона к расщеплению протеиназой К

Профиль ДСН-электрофореза в 12% ПААГ в невозстанавливающих условиях при обработке нативного, модифицированного и термоагрегированного приона протеиназой К.

### *Повышение устойчивости гомоцистеинилированного приона к действию протеиназы К*

Протеолиз протеиназой К является одним из индикаторов перехода приона в патологическую конформацию, так как обогащенная  $\beta$ -слоями форма демонстрирует повышенную устойчивость к расщеплению этим ферментом. Мы исследовали активность расщепления протеиназой К гомоцистеинилированного приона в сравнении с термоагрегированным, также как в случае измерения флуоресценции тиофлавина Т. Было показано, что модификация приона приводит к заметному увеличению устойчивости белка (Рис. 64), даже через 40 минут остается негидролизированным значительное количество мономерной полноразмерной формы. Гомоцистеинилированный прион менее доступен для протеиназы К в сравнении с термообработанным, у которого уже через 15 минут количество мономерной формы значительно снижено.

### *Морфология агрегатов гомоцистеинилированного приона*

Морфологию образовавшихся в течение 72 часов гомоцистеинилирования наблюдали с помощью фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии. Флуоресценция связанного с полученными частицами тиофлавина Т позволяет получить информацию о размере, форме и морфологии агрегатов, в отличие от метода ДЛС, который дает усредненный размер частиц без учета их геометрии.

В контрольном образце прион находится в нативном мономерном состоянии, не связывает тиофлавин Т и не обнаруживается при использовании флуоресцентной микроскопии. После 24 часов инкубации с гомоцистеинтиолактоном при 37°C в пробе можно видеть образование частиц с размером около 1 мкм (Рис. 65), что хорошо соответствует данным,

полученным методом ДЛС. В тоже время в образце наблюдается образование длинных фибрилл с несколько сниженной интенсивностью флуоресценции по сравнению с агрегатами.

В течении времени можно видеть развитие процесса агрегации, после 48 и 72 часов инкубации (Рис. 65 Б и В) агрегаты демонстрируют тенденцию к дальнейшей агломерации и формированию крупных древоподобных структур, состоящих из фибрилл и агрегатов.

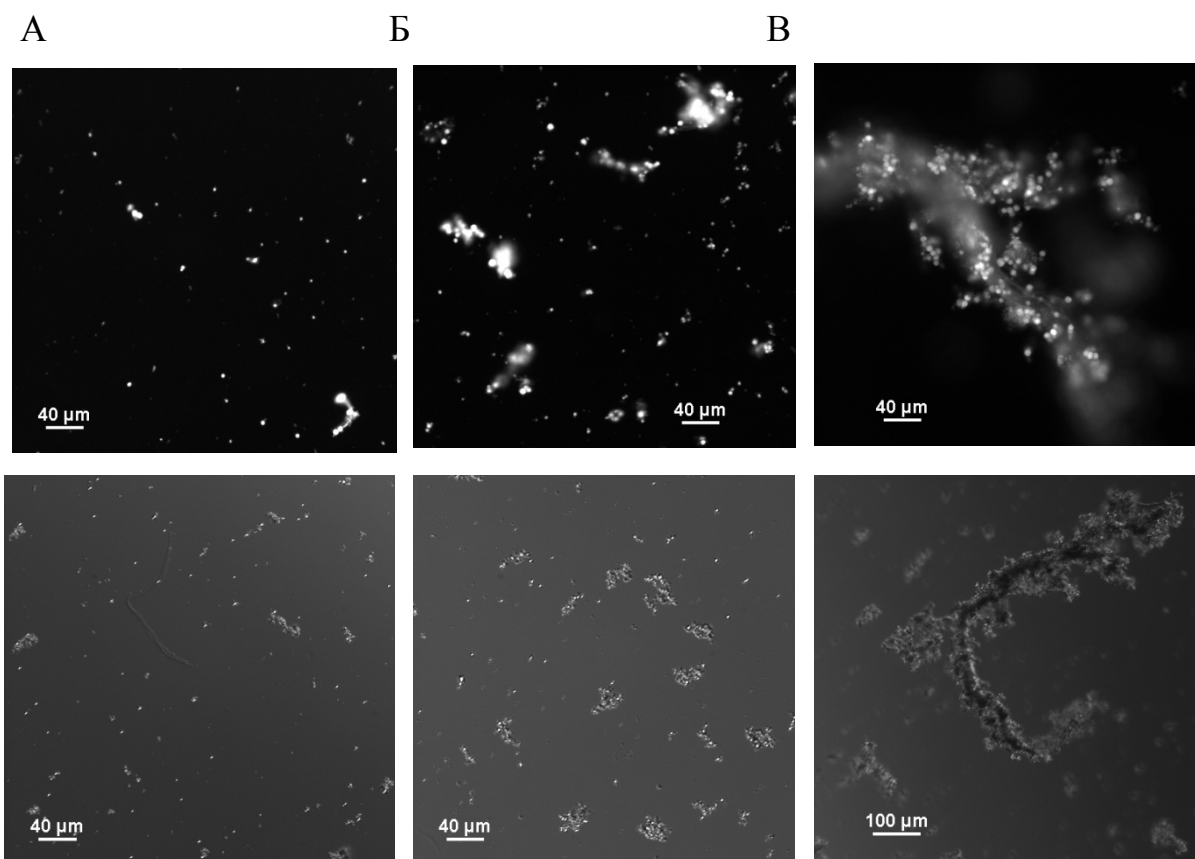


Рис. 65. Фотографии гомоцистеинилированного приона в течение 24 (А), 48 (Б) и 72 (В) часов инкубации с гомоцистеинтиолактоном. Сверху представлена флуоресценция тиофлавина Т, снизу - изображение в фазовом контрасте.

*Трансмиссионная электронная микроскопия гомоцистеинилированного приона*

С помощью метода флуоресцентной микроскопии в присутствии тиофлавина Т было показано, что при гомоцистеинилировании прион формирует крупные агрегаты диаметром около 1-2 мкм, которые при более длительной инкубации способны собираться в древовидные структуры (Рис. 65). Для более детального исследования структуры полученных агрегатов также использовали трансмиссионную электронную микроскопию. На Рис. 66 можно видеть, что при использовании 25-кратного избытка гомоцистеинтиолактона прион формирует агрегаты с плотной структурой, при повышении концентрации реагента до 50-кратной происходит увеличение размеров агрегатов и их "слипание" друг с другом. При этом вокруг агрегатов можно видеть немодифицированный прион в виде аморфных отложений (Рис. 66 Д), такие же структуры можно видеть в контрольной пробе (Рис. 66 Е).

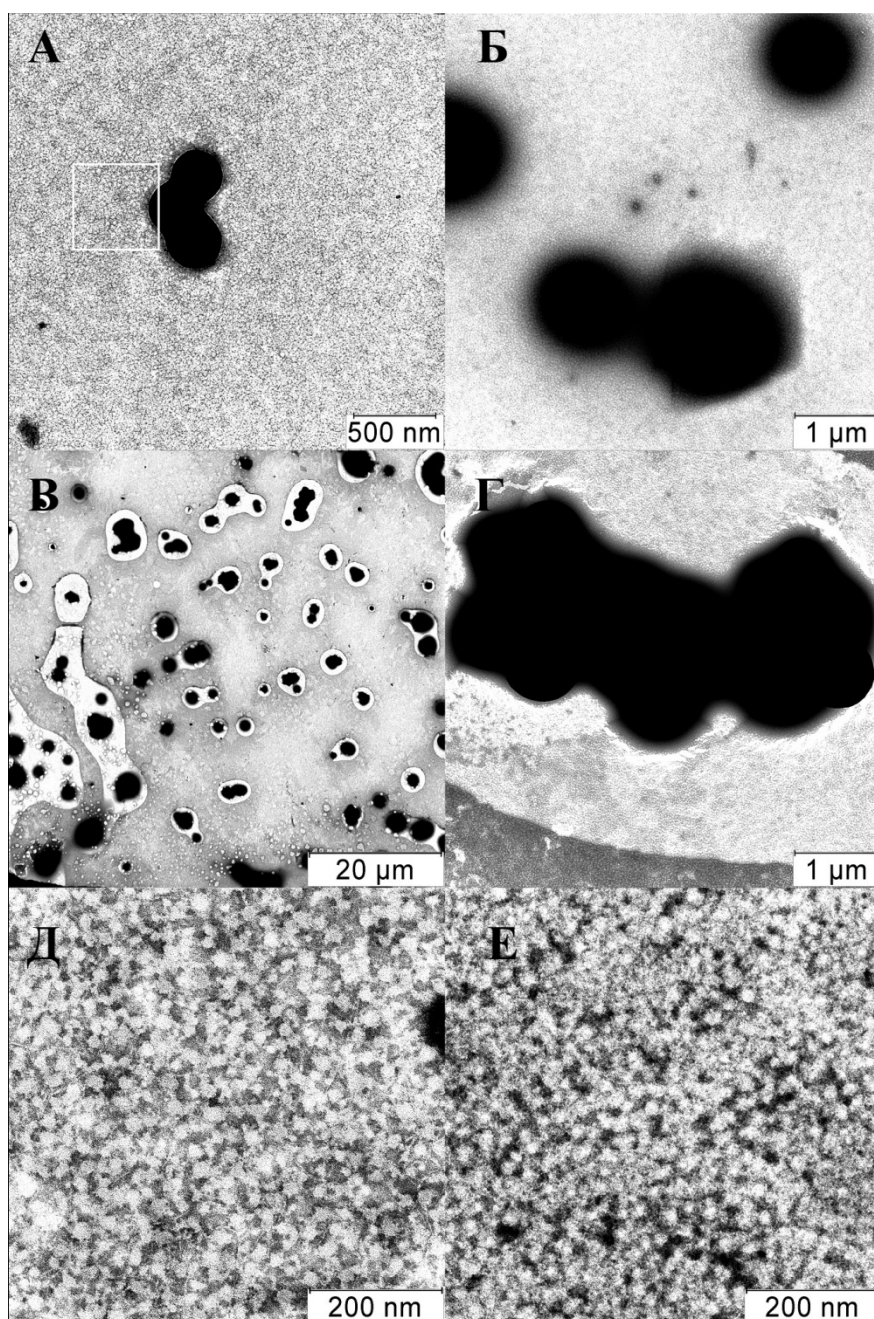


Рис. 66. Электронная микроскопия гомоцистеинилированного приона после 24-часовой реакции с гомоцистеинтиолактоном при 37°C. А-Б - гомоцистеинилированные 25-кратным избытком реагента препараты, В-Г - гомоцистеинилированные 50-кратным избытком реагента препараты, Д - область в модифицированном препарате А (указана выделением), показывающая окружение гомоцистеинилированных агрегатов, Е - контрольный препарат.

### *Роль некоторых лизинов приона в обеспечении устойчивости его структуры*

При анализе трехмерной структуры структурированной части последовательности приона обнаружено, что все остатки лизина экспонированы в раствор и доступны для модификации. Два из них участвуют в поддержании структуры белка - лизин 207 образует солевой мостик с глутаматом 149, повышая стабильность 3-ей спирали (Рис. 67.). Лизин 197 взаимодействует с глутаматом 199, поддерживая конформацию петли. Сравнив структуры мономерной и димерной формы приона, можно предположить, что при димеризации изменяется конформация именно этой петли. Таким образом, модификация лизина 197 должна приводить к дестабилизации нативной конформации приона и облегчать ее переход в патологическую форму.

Учитывая важность 197 и 207 лизинов в поддержании нативной структуры приона и полученные масс-спектрометрические данные, подтверждающие наличие модификации 197 и 207 лизинов, можно сделать вывод об участии этих остатков в структурных изменениях белка, происходящих при гомоцистеинилировании.

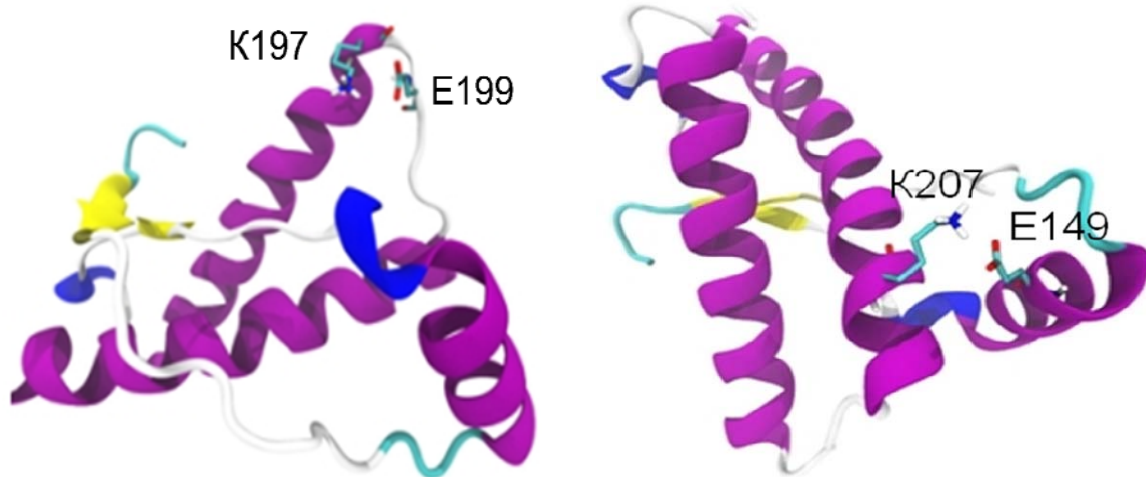


Рис. 67. Трехмерная структура структурированного участка приона (PDB ID 1uw3)



В данной части исследования предполагалось исследовать возможный эффект гомоцистеинилирования в патологической амилоидогенной трансформации приона. Принимая во внимание данные о взаимосвязи (корреляции) высокого уровня гомоцистеина и повышенной вероятности развития нейродегенеративных болезней, данный вопрос представляется актуальным и интересным.

Предложенный Якубовским механизм патологического действия гомоцистеина через его активное производное гомоцистеинтиолактон безусловно способен провоцировать изменения в структуре и свойствах белков, что подтверждено в многочисленных работах на эту тему.

Было показано, что модификация *in vitro* избыточным количеством гомоцистеинтиолактона приводит к агрегации белка и изменению его физико-химических свойств. Повышение устойчивости к действию протеиназы К и значительное увеличение флуоресценции тиофлавина Т свидетельствуют об амилоидогенном характере изменений в структуре модифицированного приона.

Однако, размер и морфология полученных агрегатов не совсем соответствуют типичному для прионовой трансформации типу агрегации. Значительная часть агрегатов представляет собой "нанизанные" на фибриллы сферические частицы, склонные в течении времени образовывать супер-агрегаты, и именно для них характерна усиленная флуоресценция тиофлавина Т.

Очевидно, что используемые для модификации концентрации гомоцистеинтиолактона значительно превышают физиологические, однако вследствие гетерогенности модификации использование низких концентраций сильно затрудняет обнаружение эффекта. Использование низких концентраций при большем времени реакции не оправдано вследствие высокой скорости гидролиза гомоцистеинтиолактона. Однако, так

как *in vivo* модификация может накапливаться благодаря "долгоживучести" приона, данный подход для изучения модификации на уровне структуры белка представляется оправданным.

Таким образом, в данном исследовании были получены данные, свидетельствующие о том, что при модификации тиолактоном гомоцистеин способен встраиваться в состав белка. При использовании значительного избытка тиолактона это приводит к агрегации белка, причем полученные агрегаты демонстрируют структурные изменения, характерные для амилоидной трансформации. Суммируя, можно заключить, что прион может подвергаться гомоцистеинилированию, которое способно приводить к амилоидогенным изменениям в его структуре.

## ВЫВОДЫ

1. При введении остатков цистеина в  $\beta$ -казеин он приобретает способность к димеризации, причем С-концевой мутант С208 димеризуется более эффективно, чем N-концевой С4.
2. Гомоцистеинилирование нативных  $\alpha$ S1- и  $\beta$ -казеинов приводит к формированию крупных сферических агрегатов, содержащих казеины с измененной структурой, а гомоцистеинилированный к-казеин демонстрирует амилоидоподобные свойства и формирует фибриллы.
3. Термоагрегация приона приводит к амилоидогенной трансформации через образование малых олигомеров.
4. В зависимости от концентрации, фосфатидилинозитол может либо приводить к амилоидогенной агрегации приона в случае мицеллярных концентраций (500 мкМ), либо вызывать образование крупных аморфных агрегатов с неизменной структурой для концентраций 0,5 – 50 мкМ.
5. Гомоцистеинилирование приона приводит к агрегации, сопровождающейся изменениями структуры амилоидогенного характера.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Б. И. Курганов. (2002) Кинетика агрегации белков. Количественная оценка шаперонной активности в тестах, основанных на подавлении агрегации белков. *Биохимия*, **67**(4): 409-422.
2. Б. И. Курганов, Э. Р. Рафикова, Е. Н. Добров. (2002) Кинетика тепловой агрегации белка оболочки вируса табачной мозаики. *Биохимия*, **67**(5): 525-533.
3. К. А. Маркосян и Б. И. Курганов. (2004) Фолдинг, неправильный фолдинг и агрегация. Образование телец включения и агресом. *Биохимия*, **69**(9): 971-984.
4. В. Покровский, И., Киселев, О.,И., Черкасский, Б.,Л. (2004) Прионы и прионные болезни. Издательство РАМН, стр. 141-143.
5. A. Aguzzi and M. Polymenidou. (2004) Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*, **116**(2): 313-327.
6. A. Aguzzi, C. Sigurdson and M. Heikenwaelder. (2008) Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, **3**(11-40).
7. J. L. Anderson, J. B. Muhlestein, B. D. Horne, J. F. Carlquist, T. L. Bair, T. E. Madsen and R. R. Pearson. (2000) Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and C-reactive protein in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Circulation*, **102**(11): 1227-1232.
8. C. M. Antonio, M. C. Nunes, H. Refsum and A. K. Abraham. (1997) A novel pathway for the conversion of homocysteine to methionine in eukaryotes. *Biochem J*, **328** ( Pt 1)(165-170).
9. T. Ban, D. Hamada, K. Hasegawa, H. Naiki and Y. Goto. (2003) Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. *J Biol Chem*, **278**(19): 16462-16465.
10. S. Banon and J. Hardy. (1992) A Colloidal Approach of Milk Acidification by Glucono-Delta-Lactone. *Journal of Dairy Science*, **75**(4): 935-941.
11. A. Barth and C. Zscherp. (2002) What vibrations tell us about proteins. *Q Rev Biophys*, **35**(4): 369-430.

- 12.M. Baylis and W. Goldmann. (2004) The genetics of scrapie in sheep and goats. *Curr Mol Med*, **4**(4): 385-396.
- 13.A. A. Boldyrev and P. Johnson. (2007) Homocysteine and its derivatives as possible modulators of neuronal and non-neuronal cell glutamate receptors in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **11**(2): 219-228.
- 14.A. A. Booth, R. G. Khalifah, P. Todd and B. G. Hudson. (1997) In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs). Novel inhibition of post-Amadori glycation pathways. *J Biol Chem*, **272**(9): 5430-5437.
- 15.J. P. Brockes. (1999) Topics in prion cell biology. *Curr Opin Neurobiol*, **9**(5): 571-577.
- 16.J. T. Brosnan, R. L. Jacobs, L. M. Stead and M. E. Brosnan. (2004) Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochim Pol*, **51**(2): 405-413.
- 17.R. Bujdoso, D. F. Burke and A. M. Thackray. (2005) Structural differences between allelic variants of the ovine prion protein revealed by molecular dynamics simulations. *Proteins*, **61**(4): 840-849.
- 18.B. Bukau and A. L. Horwich. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**(3): 351-366.
- 19.Z. M. Bumagina, B. Y. Gurvits, N. V. Artemova, K. O. Muranov, I. K. Yudin and B. I. Kurganov. (2010) Mechanism of suppression of dithiothreitol-induced aggregation of bovine alpha-lactalbumin by alpha-crystallin. *Biophys Chem*, **146**(2-3): 108-117.
- 20.D. M. Byler, H. M. Farrell, Jr. and H. Susi. (1988) Raman Spectroscopic Study of Casein Structure. *Journal of Dairy Science*, **71**(10): 2622-2629.
- 21.P. W. Caessens, H. H. De Jongh, W. Norde and H. Gruppen. (1999) The adsorption-induced secondary structure of beta-casein and of distinct parts of its sequence in relation to foam and emulsion properties. *Biochim Biophys Acta*, **1430**(1): 73-83.
- 22.R. W. Carrell and D. A. Lomas. (1997) Conformational disease. *Lancet*, **350**(9071): 134-138.

23. V. Cavalca, G. Cighetti, F. Bamonti, A. Loaldi, L. Bortone, C. Novembrino, M. De Franceschi, R. Belardinelli and M. D. Guazzi. (2001) Oxidative stress and homocysteine in coronary artery disease. *Clin Chem*, **47**(5): 887-892.
24. B. Chesebro, M. Trifilo, R. Race, K. Meade-White, C. Teng, R. LaCasse, L. Raymond, C. Favara, G. Baron, S. Priola, B. Caughey, E. Masliah and M. Oldstone. (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science*, **308**(5727): 1435-1439.
25. J. H. Come, P. E. Fraser and P. T. Lansbury, Jr. (1993) A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(13): 5959-5963.
26. L. K. Creamer, T. Richardson and D. A. Parry. (1981) Secondary structure of bovine alpha s1- and beta-casein in solution. *Arch Biochem Biophys*, **211**(2): 689-696.
27. M. den Heijer, T. Koster, H. J. Blom, G. M. Bos, E. Briet, P. H. Reitsma, J. P. Vandenbroucke and F. R. Rosendaal. (1996) Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med*, **334**(12): 759-762.
28. A. Der-Sarkissian, C. C. Jao, J. Chen and R. Langen. (2003) Structural organization of alpha-synuclein fibrils studied by site-directed spin labeling. *J Biol Chem*, **278**(39): 37530-37535.
29. C. M. Dobson. (2001) Protein folding and its links with human disease. *Biochem Soc Symp*, **68**: 1-26.
30. H. Doi, F. Ibuki and M. Kanamori. (1979) Heterogeneity of Reduced Bovine {kappa}-Casein. *Journal of Dairy Science*, **62**(2): 195-203.
31. A. K. Dunker, E. Garner, S. Guilliot, P. Romero, K. Albrecht, J. Hart, Z. Obradovic, C. Kissinger and J. E. Villafranca. (1998) Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations. *Pac Symp Biocomput*, 473-484.
32. A. K. Dunker, J. D. Lawson, C. J. Brown, R. M. Williams, P. Romero, J. S. Oh, C. J. Oldfield, A. M. Campen, C. M. Ratliff, K. W. Hipps, J. Ausio, M. S. Nissen, R. Reeves, C. Kang, C. R. Kissinger, R. W. Bailey, M. D. Griswold, W. Chiu, E. C. Garner and Z. Obradovic. (2001) Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model*, **19**(1): 26-59.
33. A. K. Dunker, C. J. Oldfield, J. Meng, P. Romero, J. Y. Yang, J. W. Chen, V. Vacic, Z. Obradovic and V. N. Uversky. (2008) The unfoldomics decade:

- an update on intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics*, **9 Suppl 2**(S1).
- 34.H. Ecroyd, T. Koudelka, D. C. Thorn, D. M. Williams, G. Devlin, P. Hoffmann and J. A. Carver. (2008) Dissociation from the oligomeric state is the rate-limiting step in fibril formation by kappa-casein. *J Biol Chem*, **283**(14): 9012-9022.
- 35.F. Eghiaian, T. Daubenfeld, Y. Quenet, M. van Audenhaege, A. P. Bouin, G. van der Rest, J. Grosclaude and H. Rezaei. (2007) Diversity in prion protein oligomerization pathways results from domain expansion as revealed by hydrogen/deuterium exchange and disulfide linkage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(18): 7414-7419.
- 36.G. L. Ellman. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, **82**(1): 70-77.
- 37.H. M. Farrell, E. D. Wickham, J. J. Unruh, P. X. Qi and P. D. Hoagland. (2001) Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of [beta]-casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization. *Food Hydrocolloids*, **15**(4-6): 341-354.
- 38.H. M. Farrell, P. X. Qi and V. N. Uversky. (2006) New Views of Protein Structure: Applications to the Caseins: Protein Structure and Functionality. *Advances in Biopolymers, A.S.C. Symposium series*, **935**(52-70).
- 39.H. M. Farrell, Jr., R. Jimenez-Flores, G. T. Bleck, E. M. Brown, J. E. Butler, L. K. Creamer, C. L. Hicks, C. M. Hollar, K. F. Ng-Kwai-Hang and H. E. Swaisgood. (2004) Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *J Dairy Sci*, **87**(6): 1641-1674.
- 40.L. Ferretti, P. Leone and V. Sgaramella. (1990) Long range restriction analysis of the bovine casein genes. *Nucleic Acids Res*, **18**(23): 6829-6833.
- 41.D. Fink. (1998) Against medical advice. *Assia Jew Med Ethics*, **3**(2): 36-47.
- 42.P. Frid, S. V. Anisimov and N. Popovic. (2007) Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*, **53**(1): 135-160.
- 43.D. C. Gajdusek. (1988) Transmissible and non-transmissible amyloidoses: autocatalytic post-translational conversion of host precursor proteins to beta-pleated sheet configurations. *J Neuroimmunol*, **20**(2-3): 95-110.

- 44.C. A. Galea, Y. Wang, S. G. Sivakolundu and R. W. Kriwacki. (2008) Regulation of cell division by intrinsically unstructured proteins: intrinsic flexibility, modularity, and signaling conduits. *Biochemistry*, **47**(29): 7598-7609.
- 45.D. S. Gallagher, C. P. Schelling, M. M. A. Groenen and J. E. Womack. (1994) Confirmation that the casein gene cluster resides on cattle Chromosome 6. *Mammalian Genome*, **5**(8): 524-524.
- 46.K. Gast, H. Damaschun, K. Eckert, K. Schulze-Forster, H. R. Maurer, M. Muller-Frohne, D. Zirwer, J. Czarnecki and G. Damaschun. (1995) Prothymosin alpha: a biologically active protein with random coil conformation. *Biochemistry*, **34**(40): 13211-13218.
- 47.B. Ghetti, P. Piccardo, M. G. Spillantini, Y. Ichimiya, M. Porro, F. Perini, T. Kitamoto, J. Tateishi, C. Seiler, B. Frangione, O. Bugiani, G. Giaccone, F. Prelli, M. Goedert, S. R. Dlouhy and F. Tagliavini. (1996) Vascular variant of prion protein cerebral amyloidosis with tau-positive neurofibrillary tangles: the phenotype of the stop codon 145 mutation in PRNP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(2): 744-748.
- 48.N. V. Golub, K. A. Markossian, M. V. Sholukh, K. O. Muranov and B. I. Kurganov. (2009) Study of kinetics of thermal aggregation of mitochondrial aspartate aminotransferase by dynamic light scattering: protective effect of alpha-crystallin. *Eur Biophys J*, **38**(5): 547-556.
- 49.A. D. Gossert, S. Bonjour, D. A. Lysek, F. Fiorito and K. Wuthrich. (2005) Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(3): 646-650.
- 50.C. Govaerts, H. Wille, S. B. Prusiner and F. E. Cohen. (2004) Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(22): 8342-8347.
- 51.M. A. M. Groenen, R. J. M. Dijkhof, A. J. M. Verstege and J. J. van der Poel. (1993) The complete sequence of the gene encoding bovine [alpha]2-casein. *Gene*, **123**(2): 187-193.
- 52.F. Grosclaude, M. F. Mahe and B. Ribadeau-Dumas. (1973) [Primary structure of alpha casein and of bovine beta casein. Correction]. *Eur J Biochem*, **40**(1): 323-324.
- 53.I. Gryczynski, Z. Gryczynski and J. R. Lakowicz. (1999) Polarization sensing with visual detection. *Anal Chem*, **71**(7): 1241-1251.



54. L. F. Haire, S. M. Whyte, N. Vasisht, A. C. Gill, C. Verma, E. J. Dodson, G. G. Dodson and P. M. Bayley. (2004) The crystal structure of the globular domain of sheep prion protein. *J Mol Biol*, **336**(5): 1175-1183.
55. C. R. Harrington and C. A. Colaco. (1994) Alzheimer's disease. A glycation connection. *Nature*, **370**(6487): 247-248.
56. H. C. Hemmings, Jr., A. C. Nairn and P. Greengard. (1984) DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated neuronal phosphoprotein. II. Comparison of the kinetics of phosphorylation of DARPP-32 and phosphatase inhibitor 1. *J Biol Chem*, **259**(23): 14491-14497.
57. C. Holt and L. Sawyer. (1988) Primary and predicted secondary structures of the caseins in relation to their biological functions. *Protein Eng*, **2**(4): 251-259.
58. D. S. Horne. (1998) Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *Int Dairy J*, **8**(3): 7.
59. D. S. Horne. (2002) Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **7**(5-6): 456-461.
60. A. Horwich. (2002) Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. *The Journal of Clinical Investigation*, **110**(9): 1221-1232.
61. Z. Huang, J. M. Gabriel, M. A. Baldwin, R. J. Fletterick, S. B. Prusiner and F. E. Cohen. (1994) Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(15): 7139-7143.
62. Z. Huang, S. B. Prusiner and F. E. Cohen. (1995) Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold Des*, **1**(1): 13-19.
63. H. Jakubowski and A. R. Fersht. (1981) Alternative pathways for editing non-cognate amino acids by aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res*, **9**(13): 3105-3117.
64. H. Jakubowski and E. Goldman. (1993) Synthesis of homocysteine thiolactone by methionyl-tRNA synthetase in cultured mammalian cells. *FEBS Lett*, **317**(3): 237-240.

- 65.H. Jakubowski. (1997) Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. Possible mechanism for pathological consequences of elevated homocysteine levels. *J Biol Chem*, **272**(3): 1935-1942.
- 66.H. Jakubowski. (1999) Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J*, **13**(15): 2277-2283.
- 67.H. Jakubowski. (2000) Translational incorporation of S-nitrosohomocysteine into protein. *J Biol Chem*, **275**(29): 21813-21816.
- 68.H. Jakubowski. (2000) Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem*, **275**(6): 3957-3962.
- 69.H. Jakubowski, L. Zhang, A. Bardeguet and A. Aviv. (2000) Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis. *Circ Res*, **87**(1): 45-51.
- 70.H. Jakubowski. (2001) Translational accuracy of aminoacyl-tRNA synthetases: implications for atherosclerosis. *J Nutr*, **131**(11): 2983S-2987S.
- 71.H. Jakubowski. (2006) Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr*, **136**(6 Suppl): 1741S-1749S.
- 72.H. Jakubowski. (2008) The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *J Physiol Pharmacol*, **59 Suppl 9**(155-167).
- 73.H. Jakubowski, G. H. Boers and K. A. Strauss. (2008) Mutations in cystathionine beta-synthase or methylenetetrahydrofolate reductase gene increase N-homocysteinylation protein levels in humans. *FASEB J*, **22**(12): 4071-4076.
- 74.J. Jakubowski. (1995) Blood supply, blood flow and autoregulation in the adenohipophysis, and altered patterns in oestrogen-induced adenomatous hyperplasia. *Br J Neurosurg*, **9**(3): 331-346.
- 75.K. Kajiwara, R. Niki, H. Urakawa, Y. Hiragi, N. Donkai and M. Nagura. (1988) Micellar structure of beta-casein observed by small-angle X-ray scattering. *Biochim Biophys Acta*, **955**(2): 128-134.
- 76.K. Kaneko, H. L. Ball, H. Wille, H. Zhang, D. Groth, M. Torchia, P. Tremblay, J. Safar, S. B. Prusiner, S. J. DeArmond, M. A. Baldwin and F. E.

- Cohen. (2000) A synthetic peptide initiates Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) disease in transgenic mice. *J Mol Biol*, **295**(4): 997-1007.
- 77.M. Kataoka, K. Kuwajima, F. Tokunaga and Y. Goto. (1997) Structural characterization of the molten globule of alpha-lactalbumin by solution X-ray scattering. *Protein Sci*, **6**(2): 422-430.
- 78.M. Kawahara, Y. Kuroda, N. Arispe and E. Rojas. (2000) Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line. *J Biol Chem*, **275**(19): 14077-14083.
- 79.J. W. Kelly. (2000) Mechanisms of amyloidogenesis. *Nat Struct Biol*, **7**(10): 824-826.
- 80.H. A. Khanova, K. A. Markossian, B. I. Kurganov, A. M. Samoilov, S. Y. Kleimenov, D. I. Levitsky, I. K. Yudin, A. C. Timofeeva, K. O. Muranov and M. A. Ostrovsky. (2005) Mechanism of chaperone-like activity. Suppression of thermal aggregation of betaL-crystallin by alpha-crystallin. *Biochemistry*, **44**(47): 15480-15487.
- 81.H. A. Khanova, K. A. Markossian, S. Y. Kleimenov, D. I. Levitsky, N. A. Chebotareva, N. V. Golub, R. A. Asryants, V. I. Muronetz, L. Saso, I. K. Yudin, K. O. Muranov, M. A. Ostrovsky and B. I. Kurganov. (2007) Effect of alpha-crystallin on thermal denaturation and aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biophys Chem*, **125**(2-3): 521-531.
- 82.T. Kitamoto, R. Iizuka and J. Tateishi. (1993) An amber mutation of prion protein in Gerstmann-Straussler syndrome with mutant PrP plaques. *Biochem Biophys Res Commun*, **192**(2): 525-531.
- 83.K. J. Knaus, M. Morillas, W. Swietnicki, M. Malone, W. K. Surewicz and V. C. Yee. (2001) Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat Struct Biol*, **8**(9): 770-774.
- 84.C. L. Krumdieck and C. W. Prince. (2000) Mechanisms of homocysteine toxicity on connective tissues: implications for the morbidity of aging. *J Nutr*, **130**(2S Suppl): 365S-368S.
- 85.K. S. Kumar, V. Govindaiah, S. E. Naushad, R. R. Devi and A. Jyothy. (2003) Plasma homocysteine levels correlated to interactions between folate status and methylene tetrahydrofolate reductase gene mutation in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *J Obstet Gynaecol*, **23**(1): 55-58.

- 86.S. Kumar, A. K. Singh, G. Krishnamoorthy and R. Swaminathan. (2008) Thioflavin T displays enhanced fluorescence selectively inside anionic micelles and mammalian cells. *J Fluoresc*, **18**(6): 1199-1205.
- 87.T. F. Kumosinski, E. M. Brown and H. M. Farrell, Jr. (1993) Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: an energy-minimized beta-casein structure. *J Dairy Sci*, **76**(4): 931-945.
- 88.U. K. Laemmli. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259): 680-685.
- 89.A. B. Lawrence de Koning, G. H. Werstuck, J. Zhou and R. C. Austin. (2003) Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clin Biochem*, **36**(6): 431-441.
- 90.E. Leclerc and P. Calmettes. (1997) Structure of [beta]-casein micelles. *Physica B: Condensed Matter*, **241-243**(1141-1143).
- 91.R. W. Lencki. (2007) Evidence for fibril-like structure in bovine casein micelles. *J Dairy Sci*, **90**(1): 75-89.
- 92.Y. D. Livney, A. L. Schwan and D. G. Dalgleish. (2004) A study of beta-casein tertiary structure by intramolecular crosslinking and mass spectrometry. *J Dairy Sci*, **87**(11): 3638-3647.
- 93.D. A. Lysek, C. Schorn, L. G. Nivon, V. Esteve-Moya, B. Christen, L. Calzolari, C. von Schroetter, F. Fiorito, T. Herrmann, P. Guntert and K. Wuthrich. (2005) Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(3): 640-645.
- 94.K. A. Markossian, N. V. Golub, S. Y. Kleymentov, K. O. Muranov, M. V. Sholukh and B. I. Kurganov. (2009) Effect of alpha-crystallin on thermostability of mitochondrial aspartate aminotransferase. *Int J Biol Macromol*, **44**(5): 441-446.
- 95.K. A. Markossian, I. K. Yudin and B. I. Kurganov. (2009) Mechanism of suppression of protein aggregation by alpha-crystallin. *Int J Mol Sci*, **10**(3): 1314-1345.
- 96.S. Martinez-Rodriguez, J. A. Encinar, E. Hurtado-Gomez, J. Prieto, J. M. Clemente-Jimenez, F. J. Las Heras-Vazquez, F. Rodriguez-Vico and J. L. Neira. (2009) Metal-triggered changes in the stability and secondary structure of a tetrameric dihydropyrimidinase: a biophysical characterization. *Biophys Chem*, **139**(1): 42-52.

97. M. P. Mattson and T. B. Shea. (2003) Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, **26**(3): 137-146.
98. D. Matulis, C. G. Baumann, V. A. Bloomfield and R. E. Lovrien. (1999) 1-anilino-8-naphthalene sulfonate as a protein conformational tightening agent. *Biopolymers*, **49**(6): 451-458.
99. J. L. Mazzola and M. A. Sirover. (2003) Subcellular alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in Alzheimer's disease fibroblasts. *J Neurosci Res*, **71**(2): 279-285.
100. W. E. Meador, A. R. Means and F. A. Quijcho. (1992) Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Å structure of a calmodulin-peptide complex. *Science*, **257**(5074): 1251-1255.
101. M. Medina, J. L. Urdiales and M. I. Amores-Sanchez. (2001) Roles of homocysteine in cell metabolism: old and new functions. *Eur J Biochem*, **268**(14): 3871-3882.
102. J. C. Mercier, J. L. Maubois, S. Poznanski and B. Ribadeau-Dumas. (1968) [Preparative fractionation of caseins from cattle and sheep by chromatography on D.E.A.E. cellulose using urea and 2-mercaptoethanol]. *Bull Soc Chim Biol (Paris)*, **50**(3): 521-530.
103. J. C. Mercier, F. Grosclaude and B. Ribadeau-Dumas. (1971) [Primary structure of bovine s1 casein. Complete sequence]. *Eur J Biochem*, **23**(1): 41-51.
104. J. L. Mills, J. M. Scott, P. N. Kirke, J. M. McPartlin, M. R. Conley, D. G. Weir, A. M. Molloy and Y. J. Lee. (1996) Homocysteine and neural tube defects. *J Nutr*, **126**(3): 756S-760S.
105. C. V. Morr. (1967) Effect of Oxalate and Urea upon Ultracentrifugation Properties of Raw and Heated Skimmilk Casein Micelles. *Journal of Dairy Science*, **50**(11): 1744-1751.
106. S. H. Mudd, J. D. Finkelstein, H. Refsum, P. M. Ueland, M. R. Malinow, S. R. Lentz, D. W. Jacobsen, L. Brattstrom, B. Wilcken, D. E. Wilcken, H. J. Blom, S. P. Stabler, R. H. Allen, J. Selhub and I. H. Rosenberg. (2000) Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**(7): 1704-1706.

107. W. L. Nelen, E. A. Steegers, T. K. Eskes and H. J. Blom. (1997) Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. *Lancet*, **350**(9081): 861.
108. M. R. Nilsson. (2004) Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*, **34**(1): 151-160.
109. R. Obeid and W. Herrmann. (2006) Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett*, **580**(13): 2994-3005.
110. B. Oesch, D. Westaway, M. Walchli, M. P. McKinley, S. B. Kent, R. Aebersold, R. A. Barry, P. Tempst, D. B. Teplow, L. E. Hood and et al. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, **40**(4): 735-746.
111. K. Okumura, Y. Miyake, H. Taguchi and Y. Shimabayashi. (1990) Formation of stable protein foam by intermolecular disulfide cross-linkages in thiolated .alpha.s1-casein as a model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**(6): 1303-1306.
112. A. Okuno, M. Kato and Y. Taniguchi. (2006) The secondary structure of pressure- and temperature-induced aggregates of equine serum albumin studied by FT-IR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, **1764**(8): 1407-1412.
113. P. Paoli, F. Sbrana, B. Tiribilli, A. Caselli, B. Pantera, P. Cirri, A. De Donatis, L. Formigli, D. Nosi, G. Manao, G. Camici and G. Ramponi. (2010) Protein N-Homocysteinylation Induces the Formation of Toxic Amyloid-like protofibrils. *J Mol Biol*,
114. R. V. Pappu, R. Srinivasan and G. D. Rose. (2000) The Flory isolated-pair hypothesis is not valid for polypeptide chains: implications for protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(23): 12565-12570.
115. L. Pepper and H. M. Farrell, Jr. (1982) Interactions Leading to Formation of Casein Submicelles. *Journal of Dairy Science*, **65**(12): 2259-2266.
116. A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio and R. Tycko. (2002) A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(26): 16742-16747.

117. S. B. Prusiner and S. J. DeArmond. (1990) Prion diseases of the central nervous system. *Monogr Pathol*, 32): 86-122.
118. S. B. Prusiner and S. J. DeArmond. (1991) Molecular biology and pathology of scrapie and the prion diseases of humans. *Brain Pathol*, 1(4): 297-310.
119. S. B. Prusiner. (1994) Neurodegeneration in humans caused by prions. *West J Med*, 161(3): 264-272.
120. S. B. Prusiner. (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(23): 13363-13383.
121. S. B. Prusiner, M. R. Scott, S. J. DeArmond and F. E. Cohen. (1998) Prion protein biology. *Cell*, 93(3): 337-348.
122. O. B. Ptitsyn. (1995) Molten globule and protein folding. *Adv Protein Chem*, 47(83-229).
123. H. Puchtler and F. Sweat. (1965) Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J Histochem Cytochem*, 13(8): 693-694.
124. J. Pujolie, B. Ribadeau-Dumas, J. Garnier and R. Pion. (1966) A study of k-casein components : I - Preparation. Evidence for a common C-terminal sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 25(3): 285-290.
125. E. R. Rafikova, B. I. Kurganov, A. M. Arutyunyan, S. V. Kust, V. A. Drachev and E. N. Dobrov. (2003) A mechanism of macroscopic (amorphous) aggregation of the tobacco mosaic virus coat protein. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(10): 1452-1460.
126. L. K. Rasmussen, P. Hojrup and T. E. Petersen. (1992) Localization of two interchain disulfide bridges in dimers of bovine alphaS<sub>2</sub>-casein. *European Journal of Biochemistry*, 203(3): 381-386.
127. S. Raychaudhuri, S. Dey, N. P. Bhattacharyya and D. Mukhopadhyay. (2009) The role of intrinsically unstructured proteins in neurodegenerative diseases. *PLoS One*, 4(5): e5566.
128. H. Rezaei, D. Marc, Y. Choiset, M. Takahashi, G. Hui Bon Hoa, T. Haertle, J. Grosclaude and P. Debey. (2000) High yield purification and physico-chemical properties of full-length recombinant allelic variants of

- sheep prion protein linked to scrapie susceptibility. *Eur J Biochem*, **267**(10): 2833-2839.
129. H. Rezaei, Y. Choiset, F. Eghiaian, E. Treguer, P. Mentre, P. Debey, J. Grosclaude and T. Haertle. (2002) Amyloidogenic unfolding intermediates differentiate sheep prion protein variants. *J Mol Biol*, **322**(4): 799-814.
  130. H. Rezaei, F. Eghiaian, J. Perez, B. Doublet, Y. Choiset, T. Haertle and J. Grosclaude. (2005) Sequential generation of two structurally distinct ovine prion protein soluble oligomers displaying different biochemical reactivities. *J Mol Biol*, **347**(3): 665-679.
  131. R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber and K. Wuthrich. (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett*, **413**(2): 282-288.
  132. P. Romero, Z. Obradovic, C. R. Kissinger, J. E. Villafranca, E. Garner, S. Guilliot and A. K. Dunker. (1998) Thousands of proteins likely to have long disordered regions. *Pac Symp Biocomput*, 437-448.
  133. E. Sabuncu, S. Petit, A. Le Dur, T. Lan Lai, J. L. Vilotte, H. Laude and D. Vilette. (2003) PrP polymorphisms tightly control sheep prion replication in cultured cells. *J Virol*, **77**(4): 2696-2700.
  134. M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. I. Apostol, M. J. Thompson, M. Balbirnie, J. J. Wiltzius, H. T. McFarlane, A. O. Madsen, C. Riekel and D. Eisenberg. (2007) Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature*, **447**(7143): 453-457.
  135. O. Schweers, E. Schonbrunn-Hanebeck, A. Marx and E. Mandelkow. (1994) Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J Biol Chem*, **269**(39): 24290-24297.
  136. R. K. Scopes and A. Stoter. (1982) Purification of all glycolytic enzymes from one muscle extract. *Methods Enzymol*, **90 Pt E**(479-490).
  137. G. V. Semisotnov, N. A. Rodionova, O. I. Razgulyaev, V. N. Uversky, A. F. Gripas and R. I. Gilmanshin. (1991) Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*, **31**(1): 119-128.



138. S. Seshadri. (2006) Elevated plasma homocysteine levels: risk factor or risk marker for the development of dementia and Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis*, **9**(4): 393-398.
139. P. D. Shimmin and R. D. Hill. (1964) An electron microscope study of the internal structure of casein micelles. *Journal of Dairy Research*, **31**(01): 121-123.
140. J. R. Silveira, G. J. Raymond, A. G. Hughson, R. E. Race, V. L. Sim, S. F. Hayes and B. Caughey. (2005) The most infectious prion protein particles. *Nature*, **437**(7056): 257-261.
141. S. Simoneau, H. Rezaei, N. Sales, G. Kaiser-Schulz, M. Lefebvre-Roque, C. Vidal, J. G. Fournier, J. Comte, F. Wopfner, J. Grosclaude, H. Schatzl and C. I. Lasmezas. (2007) In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers. *PLoS Pathog*, **3**(8): e125.
142. J. Slavik. (1982) Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim Biophys Acta*, **694**(1): 1-25.
143. J. D. Spence, H. Bang, L. E. Chambless and M. J. Stampfer. (2005) Vitamin Intervention For Stroke Prevention trial: an efficacy analysis. *Stroke*, **36**(11): 2404-2409.
144. N. Sreerama and R. W. Woody. (2004) Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol*, **383**(318-351).
145. M. Sunde, L. C. Serpell, M. Bartlam, P. E. Fraser, M. B. Pepys and C. C. Blake. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol*, **273**(3): 729-739.
146. S. Supattapone, P. Bosque, T. Muramoto, H. Wille, C. Aagaard, D. Peretz, H. O. Nguyen, C. Heinrich, M. Torchia, J. Safar, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner and M. Scott. (1999) Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell*, **96**(6): 869-878.
147. J. Suszynska, J. Tisonczyk, H. G. Lee, M. A. Smith and H. Jakubowski. (2010) Reduced homocysteine-thiolactonase activity in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **19**(4): 1177-1183.
148. H. E. Swaisgood. (1993) Review and update of casein chemistry. *J Dairy Sci*, **76**(10): 3054-3061.

149. C. D. Syme, E. W. Blanch, C. Holt, R. Jakes, M. Goedert, L. Hecht and L. D. Barron. (2002) A Raman optical activity study of rheomorphism in caseins, synucleins and tau. New insight into the structure and behaviour of natively unfolded proteins. *Eur J Biochem*, **269**(1): 148-156.
150. G. C. Telling, M. Scott, K. K. Hsiao, D. Foster, S. L. Yang, M. Torchia, K. C. Sidle, J. Collinge, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner. (1994) Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(21): 9936-9940.
151. A. M. Thackray, S. Yang, E. Wong, T. J. Fitzmaurice, R. J. Morgan-Warren and R. Bujdoso. (2004) Conformational variation between allelic variants of cell-surface ovine prion protein. *Biochem J*, **381**(Pt 1): 221-229.
152. D. C. Thorn, H. Ecroyd, M. Sunde, S. Poon and J. A. Carver. (2008) Amyloid fibril formation by bovine milk alpha s2-casein occurs under physiological conditions yet is prevented by its natural counterpart, alpha s1-casein. *Biochemistry*, **47**(12): 3926-3936.
153. P. Tompa. (2002) Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci*, **27**(10): 527-533.
154. K. Tsiroulnikov, H. Rezaei, M. Dalgalarrrondo, J. M. Chobert, J. Grosclaude and T. Haertle. (2006) Cu(II) induces small-size aggregates with amyloid characteristics in two alleles of recombinant ovine prion proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1764**(7): 1218-1226.
155. V. N. Uversky and O. B. Ptitsyn. (1996) Further evidence on the equilibrium "pre-molten globule state": four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. *J Mol Biol*, **255**(1): 215-228.
156. V. N. Uversky, J. R. Gillespie, I. S. Millett, A. V. Khodyakova, A. M. Vasiliev, T. V. Chernovskaya, R. N. Vasilenko, G. D. Kozlovskaya, D. A. Dolgikh, A. L. Fink, S. Doniach and V. M. Abramov. (1999) Natively unfolded human prothymosin alpha adopts partially folded collapsed conformation at acidic pH. *Biochemistry*, **38**(45): 15009-15016.
157. V. N. Uversky, J. R. Gillespie and A. L. Fink. (2000) Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins*, **41**(3): 415-427.

158. V. N. Uversky. (2002) Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci*, **11**(4): 739-756.
159. V. N. Uversky, S. E. Permyakov, V. E. Zagranichny, I. L. Rodionov, A. L. Fink, A. M. Cherskaya, L. A. Wasserman and E. A. Permyakov. (2002) Effect of zinc and temperature on the conformation of the gamma subunit of retinal phosphodiesterase: a natively unfolded protein. *J Proteome Res*, **1**(2): 149-159.
160. M. von Bergen, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow. (2000) Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(10): 5129-5134.
161. H. J. Vreeman, P. Both, J. A. Brinkhuis and C. Van Der Spek. (1977) Purification and some physicochemical properties of bovine [kappa]-casein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, **491**(1): 93-103.
162. T. Wade and J. K. Beattie. (1997) Electroacoustic determination of size and zeta potential of fat globules in milk and cream emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **10**(2): 73-85.
163. D. F. Waugh, L. K. Creamer, C. W. Slattery and G. W. Dresdner. (1970) Core polymers of casein micelles. *Biochemistry*, **9**(4): 786-795.
164. P. H. Weinreb, W. Zhen, A. W. Poon, K. A. Conway and P. T. Lansbury, Jr. (1996) NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*, **35**(43): 13709-13715.
165. W. J. Welch and P. Gambetti. (1998) Chaperoning brain diseases. *Nature*, **392**(6671): 23-24.
166. S. Wickner, M. R. Maurizi and S. Gottesman. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, **286**(5446): 1888-1893.
167. M. P. Williamson. (1994) The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J*, **297** ( Pt 2)(249-260).
168. E. Wong, A. M. Thackray and R. Bujdoso. (2004) Copper induces increased beta-sheet content in the scrapie-susceptible ovine prion protein PrP<sup>V</sup>RQ compared with the resistant allelic variant PrP<sup>A</sup>R. *Biochem J*, **380**(Pt 1): 273-282.

169. J. H. Woychik, E. B. Kalan and M. E. Noelken. (1966) Chromatographic isolation and partial characterization of reduced kappa-casein components. *Biochemistry*, **5**(7): 2276-2282.
170. P. E. Wright and H. J. Dyson. (1999) Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol*, **293**(2): 321-331.
171. J. H. Yoo and S. C. Lee. (2001) Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis*, **158**(2): 425-430.

## Aggregation and structural changes of three types of caseins induced by homocysteinylation

Yulia Y. Stroylova<sup>1, 4</sup>, Jaroslaw Zimny<sup>2</sup>, Reza Yousefi<sup>3</sup>, Jean-Marc Chobert<sup>4</sup>, Vladimir I. Muronetz<sup>1</sup> and Thomas Haertlé<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Biotechnology, Agricultural University, 60637 Poznan, Poland

<sup>3</sup> Department of Biology, Shiraz University, Shiraz, Iran

<sup>4</sup> UR 1268 Biopolymères Interactions Assemblages, INRA, équipe Fonctions et Interactions des Protéines Laitières, B.P. 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France.

Running title: Homocysteinylation induces structural conversion of casein

Address correspondence to: Thomas Haertlé, INRA BIA FIPL, B.P. 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France, phone: + 332 40 67 50 91, fax: + 332 40 67 52 44, e-mail: [haertle@nantes.inra.fr](mailto:haertle@nantes.inra.fr)

## Introduction

Homocysteine thiolactone, which after substitution of  $\epsilon$ -amino functions of lysyl residues forms disulphide bonds between the introduced sulfhydryl groups hence cross-linking substituted protein molecules, was recently shown to be associated with a number of pathologies [1-7].

Most of these reports are based on the strong correlation between contents of homocysteine and of its thiolactone, activities of enzymes involved in their synthesis and the excessive presence of homocysteinylated proteins and occurrence of various pathologies[1-7]. Less numerous studies of the effect of modification of purified proteins with homocysteine thiolactone *in vitro*, demonstrate marked affect of this modification on the aggregation state and other properties of substituted proteins [8, 9]. Some reports [1, 8, 9] suggest that protein functions and structures can be changed considerably by homocysteinylation. For example, homocysteinylation induces aggregation of such proteins as bovine serum albumin (BSA) and other blood proteins [9]. The data obtained by Paoli et al. [9] indicate that plausible pathologic role of homocysteine thiolactone could be due to the aggregation and the formation of large protein aggregates it induces. Until now, homocysteinylation of globular proteins with well defined tertiary structures was studied. Not much is known about the impact of homocysteinylation of Intrinsically Unstructured Proteins (IUPs) on their structures although some of them like for example prions [10, 11], can be involved in the formation of amyloid structures even without being modified. IUPs constitute a significant portion of the proteome and play an important role in many biological processes [12-14]. One of recent studies demonstrate that homocysteinylation of ovine prion, which is also classified as an IUP, leads to the formation of amyloid-like structures (submitted). The study of the impact of the homocysteinylation of such IUPs as are caseins [10, 11] was

carried out in the present work using as substrates 3 main bovine caseins ( $\alpha_{S1}$ , beta and kappa), the properties of which are summarized in Table 1.

On one hand, all the caseins investigated belong to the group of IUP [11]. On the other hand, each of them has somehow different properties:  $\alpha_{S1}$ -casein and  $\kappa$ -caseins do not form micelles, whereas the latter is capable of di- and oligomerization owing to the presence of cysteines and their sulfhydryl groups in kappa-casein sequence. Beta-casein is forming micelles thanks to its amphiphilicity [15] and is also considered to be “rheomorphic protein” [16]. Impact of homocysteinylation of industrial beta-casein, containing a mixture of beta- and kappa-caseins was also studied, as bound together caseins that may be homocysteinylated as such in milk. The aim of this part of the study was to understand what happens with the folding after homocysteinylation of IUPs such as caseins forming in unmodified state large supramolecular structures [15, 17] and to understand the role of homocysteinylation in the formation of even more complex casein structures.

It should also be highlighted that cow milk and whey contain micromolar concentrations of protein N-linked homocysteine [18]. Homocysteinylation of dairy proteins may influence milk functional properties during processing, storage, clotting, whey separation effectiveness, etc. One should also consider the possible influence of protein N-linked Hcy, first of all in case of caseins, on the digestion and the intestinal absorption of different food components containing dairy proteins. Homocysteinylation may also modify immunoreactivities of homocysteinylated caseins. An investigation of homocysteinylation of individual caseins and their mixtures is an essential initial step before the study of modifications of whole milk and of diverse dairy products that can be altered by increased aggregations and changed interactions of composing them most important “core” proteins [15].

## **Materials and Methods**

### *Materials*

L-Hcy-thiolactone, HCl, thioflavin T, ANS, Congo red and MOPS were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Industrial  $\beta$ -CN extracted from bovine milk by rennet coagulation and solubilization at 4 °C was purchased from Lactalis (Laval, France).

### *Purification of caseins*

Native alphaS1-, beta- and kappa-caseins were purified according to a two-step purification procedure [19]. Fresh bovine milk was defatted by centrifugation and casein fraction was precipitated at pH 4.6. Casein enriched pellet was isolated by centrifugation ( $5860 \times g$ , 8400 rpm, 60 min, 4 °C), washed, lyophilized, and stored at  $-20$  °C until use. Whole casein fraction in concentration 100 mg/ml was prepared in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8, containing 8 M urea, 20 mM dithiothreitol, and centrifuged at 10000 g during 10 min. Supernatant was loaded on the column, filled by Source 15Q and equilibrated by 25 mM Tris-HCl, 4 M urea, 5 mM DTT, pH 8.2. Linear gradient 0 - 0.3 M NaCl in the same buffer, performed elution of proteins. After detection on SDS-PAGE, fractions containing pure beta- and kappa-caseins were dialyzed against water three times. After addition of NaOH to pH 8, proteins were lyophilized. For purification of alphaS1-casein from mix with alphaS2-casein previously described procedure of cation-exchange chromatography on MonoS resin was applied [15] with the same preparation of lyophilized product. Protein bands of eluted fractions were detected on SDS PAGE after Coomassie blue staining and their purity was judged to be greater than 95%.

### *N-Homocysteinylation*



Studied caseins (1 mg/ml) in 25 mM potassium phosphate, pH 7.5 were modified with Hcy-thiolactone (10- and 100-fold molar excess / one lysyl residue) at 10 °C and 50 °C for 24 h. AlphaS1, beta and kappa-casein molecules contain, respectively, 14, 11 and 9 lysyl residues. The reaction mixture was centrifuged and the pellet was washed with buffer to remove low-molecular-weight compounds. Initial casein concentrations were determined with Bradford assay.

#### *SH-groups determination by Ellman's assay*

The fraction containing homocysteinyllated beta-casein was solubilized in 8 M guanidine hydrochloride and desalted passed through PD-10 desalting column. Casein fraction was treated with 2 mM beta-mercaptoethanol and incubated for 1 h at 40 °C. Then, the reaction mixture was passed again through a PD-10 desalting column in order to separate the modified beta-casein from homocysteine released from beta-casein-mixed disulfides. The quantities of thiol groups in control and in homocysteinyllated beta-casein were measured using dithionitrobenzoic acid, the Ellman's reagent [20]. The absorbencies of the samples were measured at 412 nm, using a 10-mm- path-length cuvette. The amount of 5' -nitrothiobenzoate released was calculated from the molar extinction coefficient of  $13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### *Dynamic light scattering (DLS)*

DLS experiments were carried out by using Zetasizer Nano-ZS apparatus (Malvern Instruments, Malvern, U.K.). Laser wavelength was 532 nm. Size distribution by number was used for interpretation of results. DLS measurements were carried out at 10 °C and 50 °C using 1 mg/ml caseins in 25 mM phosphate buffer, pH 7.5. In case of studies of aggregation after *N*-homocysteinyllation, hydrodynamic diameter of caseins was measured at 10 °C

or 50 °C and Hcy-thiolactone was added directly into the same cuvette. The hydrodynamic diameters of caseins were measured in triplicate. Each measurement corresponded to five auto-correlation functions recorded during 40 s. The viscosity and the refractive index of the solvent were those of water, known to change with the temperature. The index of protein was set at 1.45, independently of the temperature. The angle of the laser beam was 173° or 12.8°, depending on aggregative status of sample. Each measurement was an average of 5 runs, 30 s each. Data sets obtained were analyzed using the Malvern DTS software.

#### *Fluorescence spectroscopy*

Fluorescence spectra were measured using Hitachi F-4500 spectrofluorimeter fitted with a right angle holder. The slit widths were set at 5 nm in emission and 5.0 nm in excitation pathways. Homocysteinylation caseins prepared as described above were placed in quartz cuvettes with optical pathway of 1 cm. The spectra were collected in triplicate at temperature 20°C. Emission spectra were recorded between 300 nm and 450 nm, every 1 nm, with excitation wavelength set at 295 nm. The fluorescence emission of tryptophanyl residue shows a blue shift when its local environment becomes more hydrophobic. The scan speed was set at 60 nm·min<sup>-1</sup>.

#### *Thioflavin T fluorescence*

Freshly prepared water solution of thioflavin T was added to 8 µM homocysteinylation caseins in 25 mM phosphate buffer, pH 7.5 at a molar *ratio* of 10:1. Thioflavin T was incubated for 5 min with protein samples before the measurements. Spectra of thioflavin T fluorescence were acquired on Hitachi F 4500 spectrofluorimeter at 20°C using an excitation wavelength of 435 nm.

### *ANS fluorescence*

For the ANS experiments, 3  $\mu\text{M}$  casein samples were incubated at 20 °C with a 50-fold molar excess of freshly prepared ANS for 60 min in the dark before the analysis. For the acquisition, the excitation was fixed at 365 nm and the emission was collected between 400 and 600 nm at 20 °C, using a 10-mm-path-length cuvette. Spectra of ANS fluorescence were acquired with a Hitachi F 4500 spectrofluorimeter.

### *Congo red binding assay*

Freshly prepared water solution of Congo red was added to 2  $\mu$ M homocysteinylated caseins in 25 mM phosphate buffer, pH 7.5 at a molar *ratio* of 10:1. Congo red was incubated for 15 min with protein samples before the measurements. Spectra of Congo red absorption were acquired using UV 1601 Shimadzu spectrophotometer (Japan) at 20°C with a 10-mm-path-length cuvette. The buffer spectrum was used as blank and subtracted from all other spectra.

### *Epifluorescence microscopy*

Freshly prepared water solution of thioflavin T was added to homocysteinylated casein solution (1 mg/ml) in 20 mM phosphate buffer, pH 7.5 in a molar ratio of 20 : 1. Samples were included in GelMount media (Sigma) and observed with an inverted fluorescence microscope (Leica DMRB) using band-pass excitation filter 450 - 490 nm, reflection short pass beam splitter RKP 510 and long pass filter >515 nm. Digital pictures were acquired using a Nikon DS-1QM camera and NIS software.

### *Transmission electron microscopy*

Modified proteins were absorbed onto Formvar film, attached to 200-mesh copper grids and contrasted with Nano-W reagent (Nanoprobes, USA). After air-drying, the specimens were shadowed with carbon and examined using an LEO 912 AB OMEGA electron microscope (Carl Zeiss, Germany) operated at 100 kV.

## Results

### *Characterization of used caseins*

Objects of the present work include native  $\alpha_{S1}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins obtained by chromatographic purification of cow milk  $\alpha_{S1}$ ,  $\beta$  and  $\kappa$  caseins were as shown by PAGE close to homogeneity and also industrially-purified  $\beta$ -casein contained only small amounts of  $\kappa$  casein (results not shown).

All caseins have somewhat aberrant electrophoretic mobility because of the excessive amounts of prolyl residues constituting about 1/6 of their all amino acid content. When separated electrophoretically they demonstrate higher masses than it could be expected (19, 23, and 24 kDa for  $\kappa$ ,  $\beta$ , and  $\alpha_{S1}$ -caseins, respectively). According to the electrophoretic results the main object of this study,  $\beta$ -casein, is homogenous, while  $\alpha_{S1}$ -casein preparation contains small amounts of minor components. Although  $\kappa$ -casein preparation shows the highest heterogeneity, it is not caused by impurities. During purification,  $\kappa$ -casein preparation is reduced with 50 mM DTT (1 h, heating). However, it undergoes partial oligomerization by formation of intermolecular disulphide bonds during chromatography, storage and dissolution, what accounts for the presence of multiple bands on the gel. Furthermore, irregularities in  $\kappa$ -casein glycosylation lead to band smearing.

Electrophoresis of the industrial preparation of  $\beta$ -casein shows an additional band with lower molecular mass. Given the absence of anti- $\beta$ -casein antibody reactivity, this band cannot be regarded as a proteolytic fragment of  $\beta$ -casein. The exhibited molecular mass of the additional band corresponds to  $\kappa$ -casein. Since an interaction between these two proteins is known, we presume that the used industrial  $\beta$ -casein preparation contained some  $\kappa$ -casein as well. The analysis of electrophoretic lane of industrial  $\beta$ -casein with

OneDScan program allowed to assess the purity of the industrial beta-casein preparation to be close to 73%.

Figure 1 illustrates the temperature dependence of the aggregation of three different casein types and the industrial casein preparation. According to the DLS data, beta-casein can exist either in monomeric or in micellar forms depending on the temperature. AlphaS1-casein is unable to form micelles, while kappa-casein can form oligomers because its molecule contains cysteyl residues. The industrial beta-casein preparation shows the formation of larger particles compared to purified beta-casein what is caused by its partial co-aggregation with kappa-casein. This partial heterogeneity of the industrial beta-casein preparation is also the probable cause for the smoother transition to micellar state at higher temperature.

### ***Homocysteinylation induces aggregation state shift in caseins***

Changes of aggregation of studied caseins after their homocysteinylation were investigated by SDS-electrophoresis and by dynamic light scattering (DLS). The experiments were carried out in a non-reductive medium, therefore allowing the observation and identification of oligo- and polymeric casein forms composed of monomeric casein molecules connected with disulphide bonds between homocysteine sulfhydryl groups introduced by homocysteinylation. In case of kappa-casein, its dimers and oligomers can also be formed by the intrinsic cysteyl residues. Excessive amounts of homocysteine thiolactone, namely 10- and 100-fold per lysyl residue, were used for casein modification in order to achieve significant substitution. Homocysteine thiolactone is known to be unstable in aqueous solutions, being hydrolyzed to homocysteine, which is unable of modifying amino groups. This justifies the use of excess of homocysteine thiolactone in protein modification in water media.

Electrophoretic data (Figures 2A-C) indicate the formation of casein dimers and oligomers of different masses after modification. Large aggregates hardly entering the stacking gel are also formed. Such behavior is observed in case of all three native caseins, as well as in case of the industrial beta-casein. Additionally, an increase in large aggregate content is observed together with an increase in homocysteine thiolactone concentration. The solution becomes opalescent after the homocysteinylation but the precipitation is not seen. However, centrifugation for 10 min at 14000 rpm causes a significant protein precipitation (some quantity of monomeric protein can be still found in the supernatant, Figure 2-D).

The monomeric casein can be restored with a severe treatment (boiling in 720 mM  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ ME) and SDS for 10 min) indicating that the observed aggregation is caused by the formation of disulphide bonds.

Another aggregation mode beside disulphide bond formation exists since beta-casein aggregates are not fully degraded neither upon incubation with 2 mM  $\beta$ ME at 40°C for 1 h, nor in 8 M guanidine hydrochloride with added  $\beta$ ME, and not even in the sample buffer. That high resistance to severe reductive conditions might indicate that some portions of the aggregates formed upon beta-casein homocysteinylation are of amyloid-like nature.

DLS was also applied to the investigation of changes of aggregation of caseins. Consistent with the electrophoresis data, DLS experiments had shown beta-caseins to form aggregates upon homocysteinylation (Figure 3B). In case of purified beta-casein, aggregates are formed upon homocysteinylation of both monomeric (at 10°C) and micellar (at 50°C) forms. Compared to the micellar form, aggregation of monomeric form takes longer time. However, it might be explained by slower kinetics of modification of beta-casein at lower temperature rather than by different features of modification of monomeric and micellar forms. An acceleration of aggregation observed in higher temperatures such as

the homocysteinylation of non-micellizing alphaS1-casein (data not shown) confirms this. Beta-casein aggregation occurs step-like upon modification (after 120 min from the beginning of incubation) and leads to formation of large particles whose size could not be determined by the standard DLS measurements at the angle of 173°. At the scattering angle of 12.8°, the size of these particles was found, however, to be about 1000 nm. AlphaS1-casein homocysteinylation yields particles of the same size - about 1000 nm (Figure 3A). In case of kappa-casein, the size of the particles formed after the homocysteinylation cannot be determined due to their heterogeneity. Probably, it forms a large number of diversely sized aggregates remaining in a dynamic equilibrium.

Industrial beta-casein, step-like aggregation of which is inhibited by kappa-casein, was found to be the most convenient object for the study of the influence of the homocysteinylation on aggregation. The data presented in Figure 4 show that at 10 °C the sample consists solely of monomeric molecules of beta casein, whereas at 37 °C it contains a mixture of monomers and micelles. Two populations of aggregates are formed upon addition of 10-fold excess of homocysteine thiolactone, measuring 30 and 120 nm in diameter, and at 10 °C a small amount of monomers coexists with these aggregates. Further increase of concentration of homocysteine thiolactone up to 100-fold excess stimulates aggregation both at 10 °C and at 37 °C. Moreover, the aggregates formed at 37 °C are as large as 1000 nm (detected at scattering angle of 12°), and after their separation, oligomers sized about 43 nm remain in the supernatant .

Thus, one can conclude that homocysteinylation does lead to the formation of disulphide-linked aggregates in case of all the investigated caseins and the stability of the aggregates formed by beta-casein in detergents suggests the formation of stable amyloid-like structures. It should also be noted that despite the similarity of the modification with homocysteine thiolactone of studied



caseins, their aggregations show the distinctive features for each type of studied casein. The change in aggregation parameters after mixing two types of caseins (what is true at least for beta- and kappa-caseins) is of great importance and should be carefully considered in case of a possible extrapolation of the data obtained with purified caseins to such multi-component systems as is milk or derived foods.

Beta-casein properties were investigated as the principal casein object, which is forming micelles and interacts with other caseins, and also with industrial beta-casein containing small amounts of kappa-casein what put it closer to composition of caseins “*in vivo*”. Other caseins were used as controls and for the interpretation of results obtained for industrial beta-casein.

#### ***Quantitative determination of homocysteine residues in beta-casein samples.***

The quantity of homocysteine residues introduced into beta-casein upon the treatment with 100-fold excess of homocysteine thiolactone for 24 h was determined by titrating sulfhydryl groups with DTNB. Modified beta-casein was treated with 8 M guanidine hydrochloride and then desalted on a PD-10 column in order to remove free homocysteine and the intact thiolactone from the protein. The sample was then incubated with 2 mM  $\beta$ ME for 1 h at 40 °C in order to reduce sulfhydryl groups in homocysteyl residues, and then were desalted one more time. Initial fractions of the casein peak were collected and used in SH-groups determinations. Photometric measurements were carried out at  $\lambda = 412$  nm, and the molar extinction coefficient used in calculations was  $\epsilon = 13600$ . It was shown that in conditions used for homocysteinylation of beta-casein the average quantity of substituting SH-groups per casein molecule equals to  $1.45 \pm 0.1$ . However, the effectiveness of modification might be higher, because some

of the aggregates cannot be dissolved even in 8 M guanidine hydrochloride and thus cannot be analyzed by the used method.

### ***Study of protein structure by intrinsic and extrinsic fluorescence markers***

Fluorescence of tryptophan fluorophore depends to great extent on its close microenvironment. Hence the measurement of the evolution of the Trp fluorescence spectra can provide informations about the structural changes in homocysteinyllated caseins folding. All studied bovine caseins have tryptophan residues - one Trp157 in beta-casein, one Trp97 in kappa-casein, and two Trp (Trp179 and Trp214) in alphaS1-casein. Fluorescent spectroscopy provides informations about environment of tryptophan and it allows the monitoring of structural changes of protein structure during folding-unfolding, dissociation, oligomerization and aggregation. Blue spectral shift indicates the increase of hydrophobicity in Trp environment. In the performed experiments only the changes of maximum of tryptophan fluorescence was monitored, because of light scattering from aggregates changing the fluorescence intensity.

In this study, the homocysteinylation of two different molecular forms of beta-casein was analyzed, such as homocysteinylation of monomeric beta-casein form at 10 °C and homocysteinylation of micellar beta-casein form at 50 °C. Isolated alphaS1- and kappa-caseins are unable to form micelles in used conditions, but also in their case the measurements were carried out in two temperatures of homocysteinylation. The results obtained previously at 50 °C for alphaS1-casein served as control of the results obtained for industrial beta-casein containing also some kappa-casein.

It was shown that in case of alphaS1-casein shift of fluorescence maximum is undetectable in both temperatures of homocysteinylation. In contrast, the tryptophan in native beta-casein is placed in more hydrophilic environment being more exposed to the aqueous medium. Homocysteinylation of native beta-

casein leads to blue shift of fluorescence maximum (Figure 5), in particular in high temperature, when micellization and formation of big-size aggregates is occurring.

Tryptophan in kappa-casein is initially placed in more hydrophobic environment. Homocysteinylation of kappa-casein results in significant red shift of its tryptophan fluorescence maximum. In case of industrial beta-casein, which contains some kappa-casein,  $\lambda_{\text{max}}$  of tryptophan fluorescence is seen at intermediate wavelength and homocysteinylation leads to its blue shift. Hence, it is difficult to explain changes of fluorescence spectra for a mixture of these two unstructured caseins, but the fluorescence spectrum of industrial casein correlates well with data obtained for individual beta- and kappa- unmodified caseins.

## ***Study of extrinsic fluorescence of homocysteinyllated caseins for detection of structural changes***

### ***ThT fluorescence upon binding with homocysteinyllated caseins***

Labeling with fluorescent dye thioflavin T is one of the known markers for amyloidogenic structures, but thioflavin T also binds to micellar forms of proteins [21]. It can be seen from results presented in Figure 6 that native and industrial beta-caseins do not interact with ThT. In contrast, despite the fact that they are unable to form micelles in these conditions, native alphaS1- and kappa-caseins show quite strong binding of ThT.

After homocysteinyllation of all studied caseins, significant increase of fluorescence intensity of protein-bound ThT (Figure 6) was observed. Both (native and industrial) beta-caseins were modified in different temperatures (at 10 °C for monomeric state and at 50 °C for micelles) to allow the analysis of influence of monomeric or micellar state on specific character of homocysteinyllation. AlphaS1-casein was treated in the same manner as a control, because it is unable to form micelles. Thus, it is possible to check temperature effect on the homocysteinyllation itself. It was found that homocysteinyllation of caseins at 50 °C induces higher fluorescence intensity of ThT as compared with homocysteinyllation at 10 °C.

However, while this effect was observed for all studied caseins, it is rather associated with the increase of temperature and, as a consequence, with higher yield of modification being independent from micellization. It was shown that after centrifugation of the homocysteinyllated samples the intensity of fluorescence in supernatant is slightly different from initial, so all the interacting with ThT derivatives of caseins aggregate and precipitate.

The binding of ThT with amyloid structures leads to specific red shift of its fluorescence maximum to 480 nm [22]. In our case for caseins ThT fluorescence maximum shifts to 485 nm (Figure 7).

Comparison between native and industrial beta-caseins shows that native beta-casein is more susceptible to modification, in particular at temperature 50 °C.

Thus, obtained from ThT assay fluorescence results implicitly point to amyloid-like character of folding changes of studied caseins after formation of disulfide bonds between their homocysteinyllated forms.

### ***Measurements of ANS fluorescence after its binding with homocysteinyllated caseins***

It is known that binding of aromatic chromophore 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid with non-polar regions of protein leads to blue shift of its fluorescence maximum and raise of its fluorescence intensity [23, 24]. Known strong affinity of ANS to proteins in "molten globule" state is caused by the lack of tertiary structure [25]. As long as studied caseins do not have well-defined tertiary structure, their ANS spectra should have blue shift. As it can be seen in Figure 8 and Table 1 in presence of native alphaS1- and kappa-caseins fluorescence maximum of protein-bound ANS has a blue shift and consequently the increase of ANS fluorescence intensity is observed.

Nevertheless, ANS fluorescence in presence of both (native and industrial) types of beta-caseins remains constant. It can be explained by the possibility that the interactions between hydrophobic "tails" with each other block the interactions of beta casein with ANS.

Homocysteinyllated both forms of beta caseins in temperature 50 °C demonstrate significant increase of ANS fluorescence and a blue shift of its maximum. So, it can be assumed that homocysteinyllation results in rearrangement of protein structure and increase of exposed hydrophobic regions in modified beta casein.

### ***Congo red absorbance when bound by homocysteinylated caseins***

It is known that visible absorbance spectrum of dye Congo red specifically changes after interaction of Congo red with amyloid fibrils [26, 27]. Such interaction results in red shift of absorbance maximum from 498 nm by 40-50 nm. Spectra of all homocysteinylated caseins in presence of Congo red were studied. It was shown that in case of homocysteinylated caseins alpha and beta peaks of free Congo red disappears and intensity of absorbance increases, but there is no appearance of well-defined other peak except in case of homocysteinylated form of kappa-casein, which capacity to form amyloid fibrils is already known [28, 29]. During 3 h after addition of homocysteine thiolactone it could be found some raise of the absorbance. Long-time incubation leads to the formation of distinct peak at 540 nm (see Figure 9). So, it can be assumed that homocysteinylation of kappa-casein leads to progressive formation of amyloid structures.

### ***Study of the morphologies of homocysteinylated casein aggregates by fluorescence microscopy and transmissional electron microscopy***

Morphology of homocysteinylated casein aggregates was investigated also by fluorescence microscopy in presence of thioflavin T. Presented on the Figure 10 pictures show that thioflavin T fluoresces only when associated with homocysteinylated casein aggregates. In case of alphaS1- and beta-caseins mostly huge regular spherical particles with diameter about 2  $\mu\text{m}$  are observed. Kappa-casein produces different kind of aggregation with variable sizes of aggregates. Beside big kappa-casein aggregates there are also small particles of irregular shapes. This result indicates different modes of aggregation after homocysteinylation for kappa-casein and is coherent with previously obtained spectroscopic data. In case of tryptophan in homocysteinylated kappa-casein the

peak of its fluorescence maximum remains stable, in comparison with alphaS1- and beta-caseins. Also peak of Congo red absorbance with homocysteinyllated kappa-casein is characteristic of amyloid fibrils.

Comparing with native beta-casein, industrial beta-casein demonstrates less homogenous population of aggregates, but also contains some spherical particles and amorphous small aggregates. Therefore, these data confirm that industrial beta-casein adopts intermediate aggregative state between pure forms of native beta- and kappa-caseins.

Although the presence of ThT binding aggregates in homocysteinyllated samples was shown with fluorescence microscopy, the resolution of the latter was insufficient to give information on the structure of the aggregates. As it was shown by TEM, homocysteinyllation provokes the formation of kappa-casein fibrils measuring ~100 nm in length (Figure 11, A3), capable of coalescing and forming supramolecular structures ~100-1000 nm in diameter (Figure 11, A1-A2). Consistently with DLS-derived hydrodynamic diameter, kappa-casein is present in the control sample in the form of small (~10-20 nm) associates (data not presented). Similar particles are found around the aggregates in homocysteinyllated samples, although they don't bind ThT.

As it was shown with DLS and fluorescent microscopy, homocysteinyllation of beta-casein leads to formation of spherical aggregates of 1-2  $\mu\text{m}$  in diameter. B-casein is prone to self-assembly into micelles of ~20 nm in diameter. TEM shows that the aggregates formed upon homocysteinyllation are made of micelles (Figure 11, B), that also are present in the control sample. In the case of alphaS1-casein, DLS and fluorescent microscopy present evidence of spherical aggregates of 1-2  $\mu\text{m}$  in diameter formed upon homocysteinyllation. However, according to TEM (Figure 11, C), these aggregates can be divided into solid-(C1) and fibril-structured (C2-C3). Since homocysteinyllated alphaS1-casein,

unlike kappa-casein, does not specifically bind Congo Red, one cannot unambiguously interpret the obtained data.

## **Discussion**

Despite that protein homocysteinylation was first discovered more than 10 years ago [8] and that the connection between the development of several pathological processes and the elevated levels of homocysteine and homocysteine thiolactone is well established [2-6], the molecular mechanisms of the homocysteinylation remain unknown. It was recently shown that homocysteinylation of a well structured globular protein, such as bovine serum albumin, not only induces its aggregation but also leads to the formation of amyloid-like structures toxic to cells [9]. However, the formation of amyloid-like structures from globulins occurs very slowly. During this time, denaturation and partial aggregation of the native unmodified proteins occur spontaneously. Homocysteinylation of proteins stimulates and accelerates these processes acting as an inducer of the formation of amyloid fibrils or of aggregates of less ordered type.

The slower kinetics of HCy-mediated formation of amyloid-like structures by globular proteins can be explained by slow and sporadic unfolding of ordered globulins.

One can presume that the homocysteinylation of proteins able to form amyloid structures (usually IUP), should lead to faster and deeper changes of their properties. It is possible that modification can lead to emergence of fibrils that are more stable and more amyloid-like thanks to the additional disulphide bonds generated by the introduced cysteine residues. All the above shows that intrinsically unstructured proteins (IUPs) can be of importance in study of the role of homocysteinylation and changes of protein functional properties.



Moreover, the study of the homocysteinylation of ovine prions (also classified as IUP) (submitted) shows that prion modification leads to its instantaneous aggregation and to the rapid formation of amyloid structures, what is coherent with observations reported by Paoli et al [9].

This study present the results of a comparative study of the structural consequences of homocysteinylation of three different bovine caseins, as members of different types of IUP (some of their properties are shown in Table 2). All of them have large portions disordered structure, however, differ somewhat in functional properties. Thus, kappa- and alpha S2- caseins are prone to aggregation due to the presence in their sequences of 2 cysteine residues, while beta- and alphaS1-caseins have no sulfhydryl groups. Unlike two other studied caseins, beta-casein is forming micelles [15]. Additionally, these caseins differ in hydrophobicities and post-translational modifications. The comparative analysis allows for the correlation of the impact of the homocysteinylation on the molecular properties of three types of bovine caseins.

The obtained results (Figure 9) show that the homocysteinylation of kappa-casein leads to its aggregation and to the formation of amyloid structures. Due to a high degree of their heterogeneity, the size of the formed aggregates cannot be determined by the DLS method. The changes of various fluorometric parameters in homocysteinylated kappa-casein are less significant compared to other caseins. It is possibly due to the natural oligomerization of kappa-casein in control samples, which occurs by the formation of disulphide bonds between the intrinsic cysteine residues and to the induced by such oligomerization changes of spectral properties. This is making difficult the estimation of the contribution of homocysteinylation to kappa casein folding by fluorimetry. However, the change in the Congo red absorbance spectrum and its maximum blue shift from 498 to 540 nm characteristic for the binding of Congo red with amyloid fibrils (Figure 9) occurring only after its interaction with homocysteinylated kappa-

casein. These findings are confirmed by the formation of large asymmetric kappa casein aggregates, which, according to the fluorescence microscopy pictures (Figure 10), are interacting with Thioflavin T. Also fibrillar structure of these aggregates was confirmed by TEM. Hence it is clear that that the homocysteinylation of kappa-casein induces the formation of amyloid structures. This can be attributed to the presence of the intrinsic cysteines and to the presence of the introduced Hcy residues. After the formation of disulphide bonds between them imposing stronger organization of the resulting structures than what could be expected from completely random disulphide bond formation fibrillar aggregates are formed.

Homocysteinylation of beta- and alphaS1-caseins has different structural outcome (Figure 10). Despite the fact that both of these casein aggregate forming big particles with size about 1  $\mu\text{m}$ , they do not form amyloid fibrils (Figure 10). This can be deduced from their absorbance spectra in presence of Congo red (Figure 9) and from the microscopic pictures of their aggregates (Figure 10). These caseins (alpha S1 and beta) aggregate forming regular symmetric spheres with similar diameter (1-2  $\mu\text{m}$ ) and when homocysteinylated they interact with fluorescent marker ThT. Binding of fluorescent dyes ThT and ANS and the resulting fluorometric spectral changes indicate that homocysteinylation of alphaS1- and beta-caseins provokes different folding changes from what is observed in case of homocysteinylated kappa-casein (increase of proportions of beta-sheets). In contrast to what is observed with homocysteinylated kappa-casein they do not fold into of amyloid fibrils.

It should be mentioned that homocysteinylation of caseins has heterogenous and “stick-slip” nature. Low concentrations of homocysteine thiolactone do not induce aggregation. It can be assumed that the modification yield is not strong enough to be detected by the used techniques. Formation of described aggregates occurs when 100 fold excess of homocysteinyllactone per

each lysyl residue is used. In such conditions the incorporation of about 1,4 mole homocysteine per mole of beta-casein is observed by the DTNB analysis. Apparently, in this case at least a portion of homocysteinylated casein molecules has two sulfhydryl groups. This is sufficient for the dimerisation and the initiation of aggregation. However, the induced aggregation is driven also by the interactions between hydrophobic sites on caseins and through additional disulfide bonds between molecules with more than two homocysteinyl residues on their surfaces. It is evident that aggregation doesn't start before at least part of casein molecules incorporate adequate amount of homocysteinyl residues.

There is practically no difference between homocysteinylation of alphaS1- and beta-casein, except in changes of their tryptophan fluorescences for modified beta-casein in contrast to modified alphaS1-casein (Figure 5). This is rather due to their initial structural differences than to the effects of homocysteinylation. Despite the stability of their homocysteinylated aggregates amyloid fibrils formed from modified alphaS1 and beta-caseins were not found. Simple reduction of disulfide bonds doesn't lead to total disintegration of aggregates, as well as solubilization by 4 M guanidine hydrochloride. Only the strong heating (boiling) of aggregates in presence of high concentrations of beta-mercaptoethanol and detergents results in re-appearance of monomeric forms, but even in these conditions complete destruction of aggregates can not be accomplished. One can presume that although resistant aggregates of homocysteinylated caseins do not form amyloid fibrils (with exception of kappa-casein), but demonstrate some amyloid-like characteristics especially as their stabilities are concerned.

Also in this study an attempt was made to determine the effect of sub-molecular organization of IUP on efficiency and character of homocysteinylation. Comparison between two different types of caseins: beta-, which is capable to form micelles, and alphaS1, which is unable to micellise,

did not reveal any difference between homocysteinylation of monomeric and micellar forms of caseins. Comparison between monomeric and micellar form is complicated by temperature effect, which influences not only on the micellization, but also the yield homocysteinylation. Nevertheless, comparison of these data with the results of homocysteinylation of alphaS1-casein allows to conclude that the micellization does not have any influence on the outcome of homocysteinylation nor on the properties of homocysteinylation aggregates.

Experiments with industrial beta-casein, which is a mixture of beta- and kappa-caseins, are of particular interest. Fluorescent spectra of homocysteinylation industrial beta-casein show intermediate properties when compared with of isolated caseins. Spectral and molecular properties of homocysteinylation aggregates show different patterns from spectra and molecular properties of native caseins. So, in case of homocysteinylation industrial beta-casein in contrast to alphaS1- and beta-caseins, in DLS studies (Figure 4) quite stable aggregates of relatively small size were revealed. Long-term incubation of these structures leads to formation of asymmetric aggregates, and these results confirm that the presence of susceptible to amyloidization kappa-casein can influence significantly the final properties of aggregates.

These observations are important because they indicate the possibility of somehow directed influence on the formation of aggregates by homocysteinylation proteins by the addition of other protein with predetermined molecular properties. So, in case of addition of kappa-casein to beta-casein, the capacity of kappa-casein to oligomerize not only after the homocysteinylation, but also due to existence of his own cysteyl residues, can be crucial. Investigation of such proces could be important for better understanding the induction of apparition of amyloid structures in the cells, which could occur also thank to the recruitment of not only amyloidogenic proteins themselves

(beta-amyloid, synuclein, prions), but also normal cellular proteins (especially with a lot of sulfhydryl groups) initially unable to fibrillate. Detailed study of impact of supplementary disulfide bonds and dimerization of caseins on homocysteinylation mechanism and its amyloidogenic properties should help to create models for amyloidogenesis and for more efficient of compounds preventing the formation of amyloid structures.

It should also be mentioned that cow milk and whey contain micromolar concentrations of protein N-linked homocysteine [18] and that homocysteinylation of dairy proteins might influence milk functional properties during storage, clotting, whey separation effectiveness, etc.

One should also consider the possible influence of protein N-linked Hcy, first of all in case of caseins, on digestion and intestinal absorption of different food components containing dairy proteins. An investigation of homocysteinylation of individual caseins and their mixtures is an essential initial step before the study of modifications of whole milk and diverse dairy products that can be altered by increased aggregation of input proteins.

Present study shows using milk caseins as model proteins, that N-homocysteinylation of natively unfolded proteins provokes essential structural changes and somehow "directed" aggregation in comparison with homocysteinylation of globular proteins. Instead of unordered aggregation, alphaS1- and beta-caseins form regular symmetric spheres, whereas kappa-casein forms some amyloid-like fibrillar structures. Fluorometric measurements of extrinsic and intrinsic structural probes reveal increase of easily accessible hydrophobic regions in protein structure in all studied caseins and typical for amyloid transformation of N-homocysteinylation of kappa-casein. In conclusion, the results, reported in current study, could be useful for better understanding of mechanisms underlying protein condensation pathologies and changes of

technofunctional properties connected with incorrect unfolding and amyloid-type aggregation.

Table 1.

Fluorescence maxima of ANS after binding with homocysteinylylated caseins.		
	$\lambda_{\max}$ ANS + control casein, nm	$\lambda_{\max}$ ANS + Hcy 50°C casein, nm
$\alpha_{s1}$ -CN	508.4 $\pm$ 0.3	500.3 $\pm$ 0.3
$\beta$ -CN	527.8 $\pm$ 0.1	504.3 $\pm$ 0.2
$\beta$ i-CN	524.5 $\pm$ 0.1	505.6 $\pm$ 0.2
$\kappa$ -CN	519.6 $\pm$ 0.1	512.5 $\pm$ 0.2

Table 2.

		<b><math>\beta</math>-casein</b>	<b><math>\alpha</math>S1-casein</b>	<b><math>\kappa</math>-casein</b>
Molecular weight, kDa		24	23	19
Sequence, aa		209	199	169
pI		5.13	4.91	5.93
Hydrophobicity, kJ/mole		6.82	4.48	4.69
Pro, %		35 16%	17 8%	20 12%
Lys		11	14	9
Cys		-	-	2
Secondary structure	$\alpha$ -helix	7-16%	13-22%	14-23%
	$\beta$ -sheet	17-26%	7-20%	17-31%
	$\beta$ -turn	15-31%	34%	14-24%
Functions		Important role in determination of the surface properties of the casein micelles	Important role in the capacity of milk to transport calcium phosphate	Kappa-casein stabilizes micelle formation, preventing casein precipitation in milk



## Legend to the Figures

### **Figure 1. Temperature dependence of hydrodynamic diameters of caseins particles.**

Measurements were performed via Dynamic Light Scattering method with casein solutions (1 mg/ml) in 25 mM phosphate buffer, pH 7.5.  $\alpha$ S1-CN (**1**, squares),  $\beta$ -CN (**2**, empty circles),  $\kappa$ -CN (**3**, triangles),  $\beta$ i-CN (**4**, full circles).

### **Figure 2. SDS-PAGE analyses of *N*-homocysteinylated caseins.**

*N*-Homocysteinylation of  $\alpha$ S1-CN (**A**),  $\beta$ -CN (**B**),  $\kappa$ -CN (**C**) and  $\beta$ i-CN (**D**) caseins was performed by incubation with Hcy-thiolactone for 24 h. **1**: control caseins, **2**: caseins after modification with 10-fold excess (per lysine) Hcy-thiolactone, **3**: caseins after modification with 100-fold excess (per lysine) Hcy-thiolactone, **4**: caseins after modification by 100-fold excess Hcy-thiolactone and the subsequent reduction with beta-mercaptoethanol (720 mM). Modification was performed using 1 mg/ml casein solutions in 25 mM phosphate buffer, pH 7.5. Electrophoresis of the samples was performed in 12% SDS-PAGE.

(**E**) SDS-PAGE analyses of supernatants of *N*-homocysteinylated caseins. *N*-Homocysteinylation was performed by incubation with 100-fold excess of Hcy-thiolactone for 24 h. Supernatants were obtained with centrifugation at 13000 rpm for 10 minutes. **1**:  $\alpha$ S1-CN, **2**:  $\kappa$ -CN, **3**:  $\beta$ -CN, **4**:  $\beta$ i-CN.

**Figure 3. Hydrodynamic diameter of homocysteinylated caseins particles.**

Measurements were performed using 1 mg/ml casein solutions in 25 mM phosphate buffer, pH 7.5. The reactions were initiated by adding 100-fold excess of Hcy-thiolactone directly into the cuvette. Data points obtained at scattering angle of 173° are shown with full symbols, in case of scattering angle of 12.8° - with empty symbols. For  $\beta$ -CN experiments were performed at 10 °C (squares) and 50 °C (circles)

(A) Hcy- $\alpha$ S1-CN, modified at 50°C (monomeric form), **1** - at scattering angle of 12.8°, **2** - at scattering angle of 173°

(B) Hcy- $\beta$ -CN, **1** and **2** - modified at 10 °C (monomeric form), at scattering angle of 12.8° and 173°, respectively, **3** and **4** - modified at 50 °C (micelles), at scattering angle of 12.8° and 173°, respectively.

**Figure 4. Distribution of hydrodynamic diameters of industrial  $\beta$ -casein particles upon homocysteinylation at 10 °C and 50 °C.**

Measurements were performed using 1 mg/ml casein solutions in 25 mM phosphate buffer, pH 7.5 at 10 °C (left side, initially in monomeric form (A)) and at 50 °C (right side, initially in micellar form (A)). The reaction was initiated by adding of 10- (B) and 100-fold (C) excesses of Hcy-thiolactone directly into the cuvette. Statistical data from 10 scans for controls and from 60 scans during 3 hours of homocysteinylation are presented.

**Figure 5. Changes of Trp fluorescence maxima of homocysteinylated caseins.**

Homocysteinylation of casein solutions (1 mg/ml) in 25 mM phosphate buffer, pH 7.5, was performed at 10 °C (gray bars) and at 50 °C (black bars) by incubation with 100-fold excess of Hcy-thiolactone for 24 h. Control caseins – white bars.

**Figure 6. Fluorescence spectra of ThT interacting with homocysteinyllated caseins at 10°C and 50°C.**

Homocysteinylation of casein solutions (1 mg/ml) in 25 mM phosphate buffer, pH 7.5, was performed at 10 °C (thin line) and at 50 °C (thick line) by incubation with 100-fold excess of Hcy-thiolactone for 24 h. **(A)  $\beta$ -caseins:** **1:** free ThT, **2 and 5:** control  $\beta$ -CN and  $\beta$ i-CN, **3 and 6:** Hcy- $\beta$ -CN and Hcy- $\beta$ i-CN at 10 °C, **4 and 7:** Hcy- $\beta$ -CN and Hcy- $\beta$ i-CN at 50 °C.

**(B)  $\alpha$ S1-caseins:** **1:** free ThT, **2:** control  $\alpha$ S1-CN, **3:** Hcy- $\alpha$ S1-CN at 10 °C, **4:** Hcy-  $\alpha$ S1-CN at 50 °C.

**Figure 7. Intensity of fluorescence at 480 nm of free and casein-bound ThT.**

Homocysteinylation of casein solutions (1 mg/ml) in 25 mM phosphate buffer, pH 7.5, was performed at 10 °C (dark gray) and at 50 °C (black) by incubation with 100-fold excess of Hcy-thiolactone for 24 h. ThT free - white bars, control caseins + ThT – gray bars.

**Figure 8. Intensity of fluorescence at 480 nm of free and casein-bound ANS.**

Homocysteinylation of casein solutions (1 mg/ml) in 25 mM phosphate buffer, pH 7.5, was performed at 50 °C by incubation with 100-fold excess of Hcy-thiolactone for 24 h. ANS free - white bars, control caseins + ANS – gray bars, Hcy-caseins+ANS – black bars.

**Figure 9. Congo red absorbance spectra of homocysteinyllated kappa-casein.**

Homocysteinylation of casein solutions (1 mg/ml) in 25 mM phosphate buffer, pH 7.5, was performed by incubation with 100-fold excess of Hcy-thiolactone at 50 °C for 3h (black thin line) and 24 h (black thick line). Congo red free - gray dashed line, control kappa-casein + Congo red - black dashed line.

**Figure 10. Epifluorescence microscopy of homocysteinylated caseins.** Microphotographs of  $\alpha$ S1-CN (**A**),  $\kappa$ -CN (**B**),  $\beta$ -CN (**C**) and  $\beta$ i-CN (**D**) in the presence of thioflavin T after 24 h of incubation with Hcy-thiolactone at 50 °C. White frame shows 5-fold zoom of selected image.

**Figure 11. Transmission electron microscopy of homocysteinylated caseins.** Microphotographs of  $\kappa$ -CN (**A**),  $\beta$ -CN (**B**),  $\alpha$ S1-CN (**C**) after 24 h of incubation with 25-fold excess of Hcy-thiolactone at 50 °C.

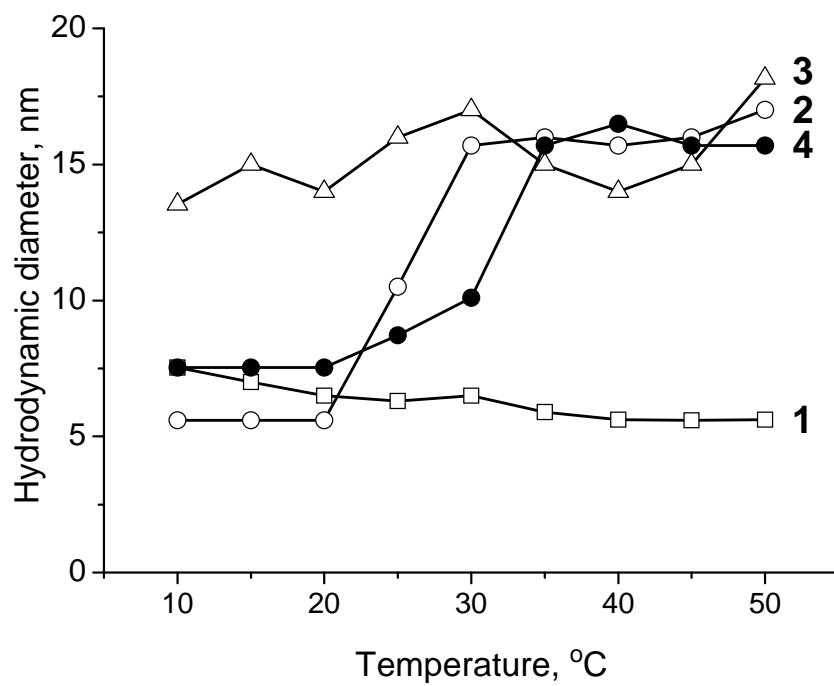


Figure 1.

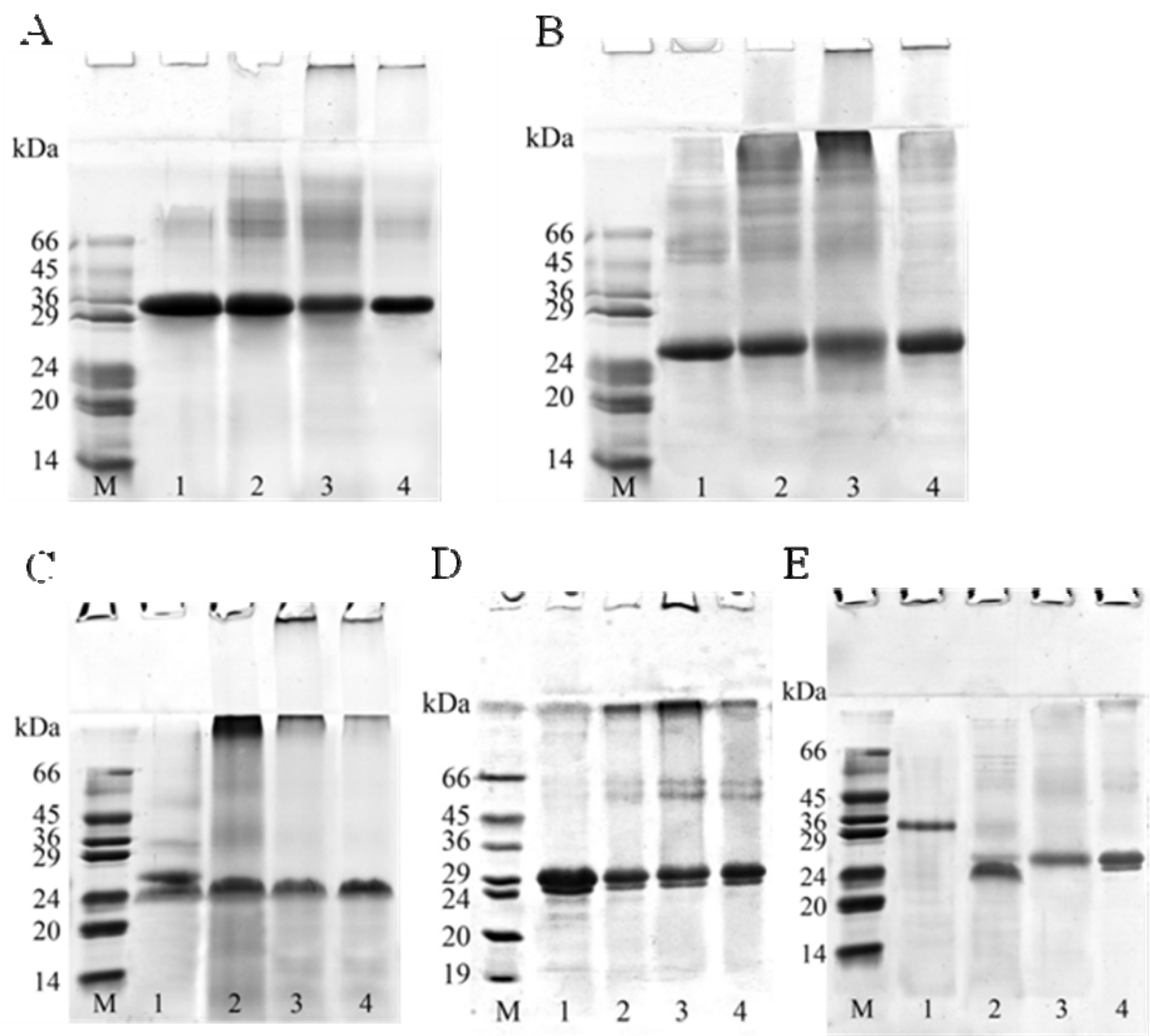


Figure 2.

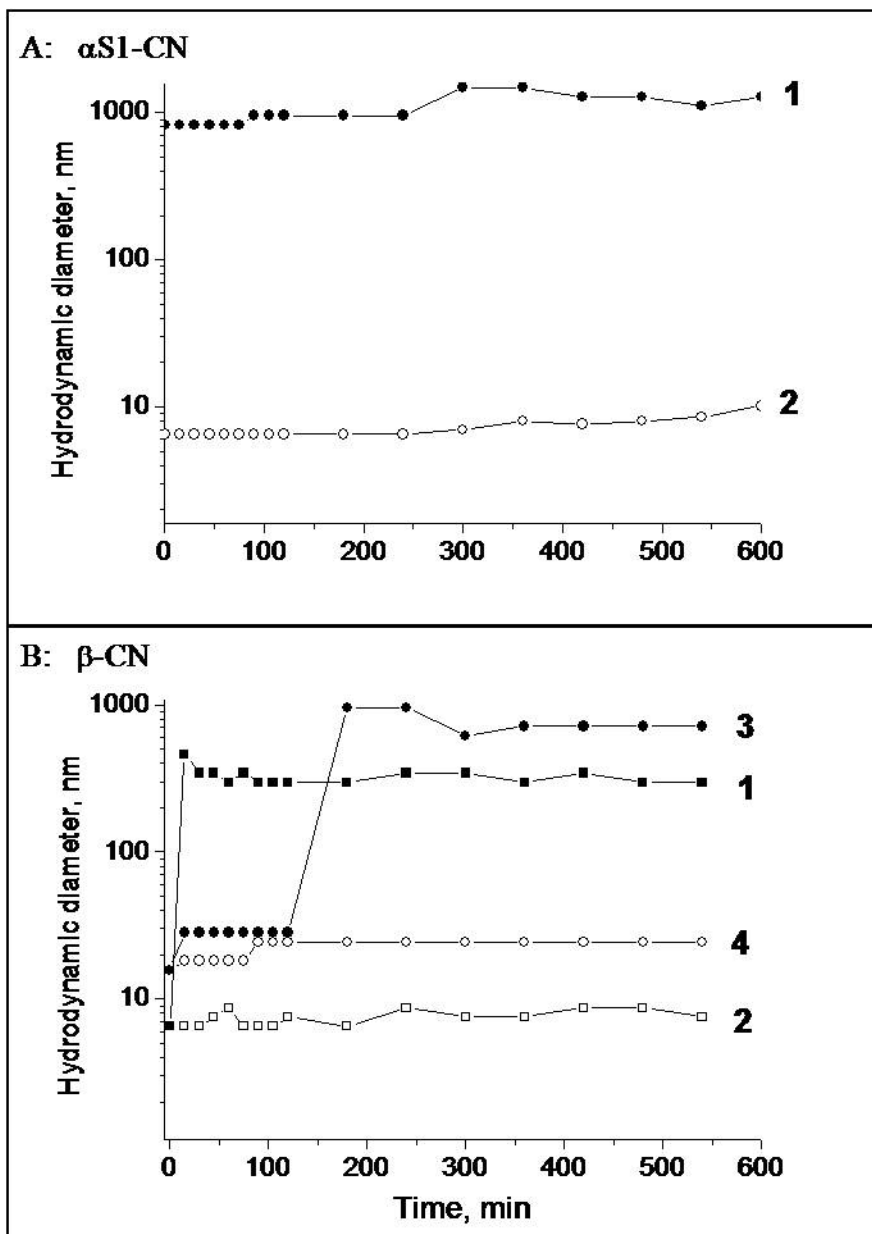


Figure 3.

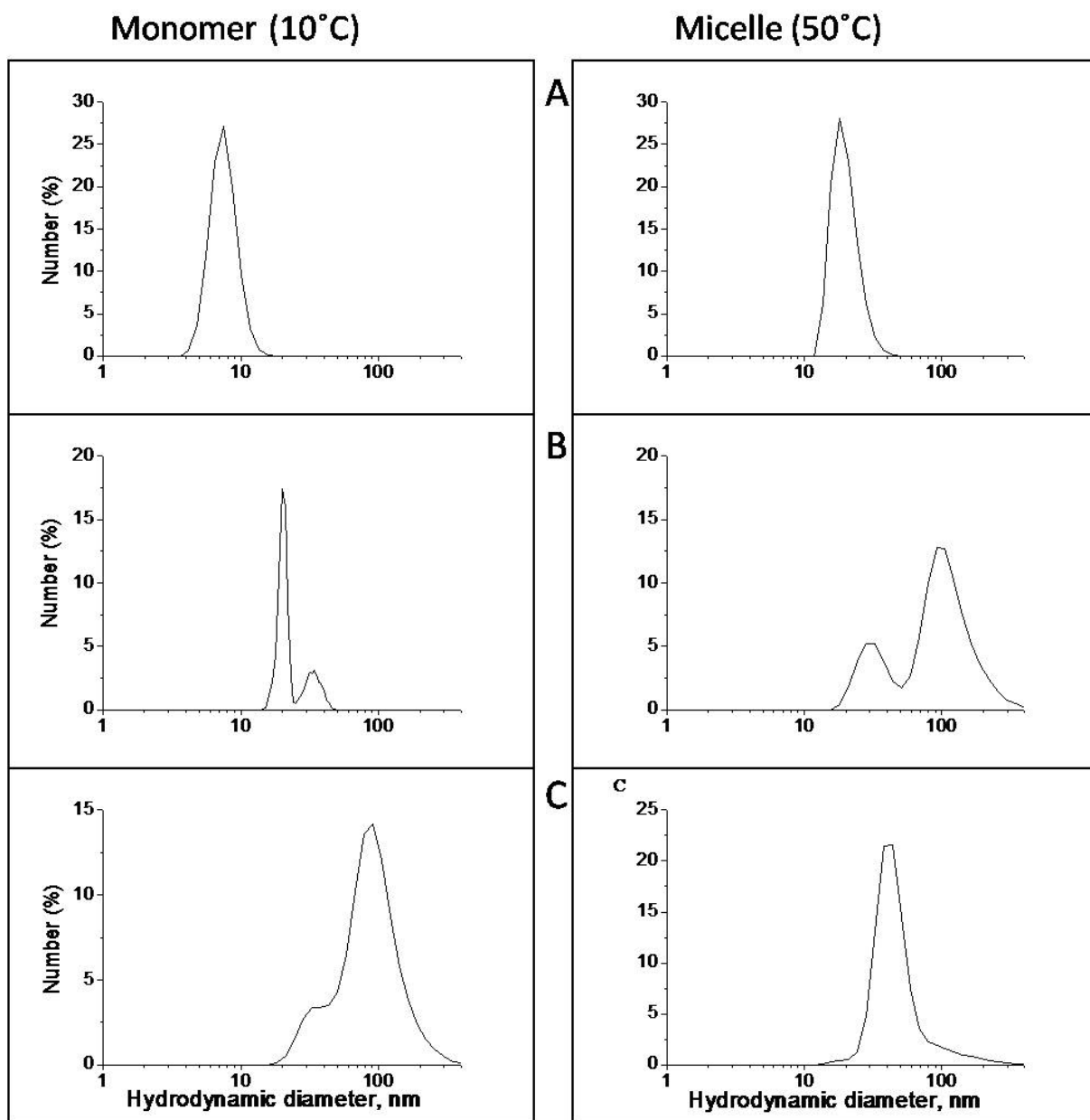


Figure 4.



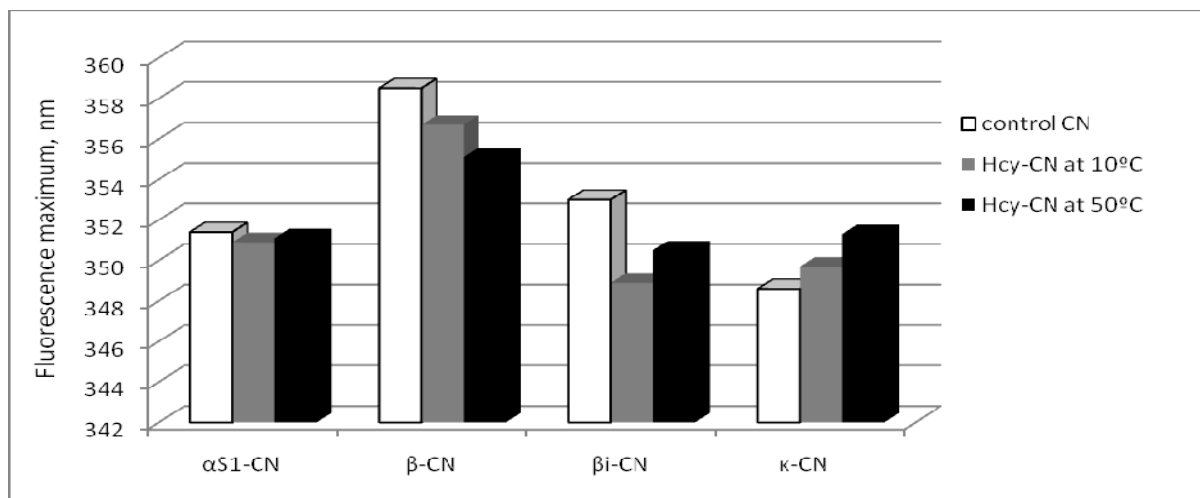


Figure 5.

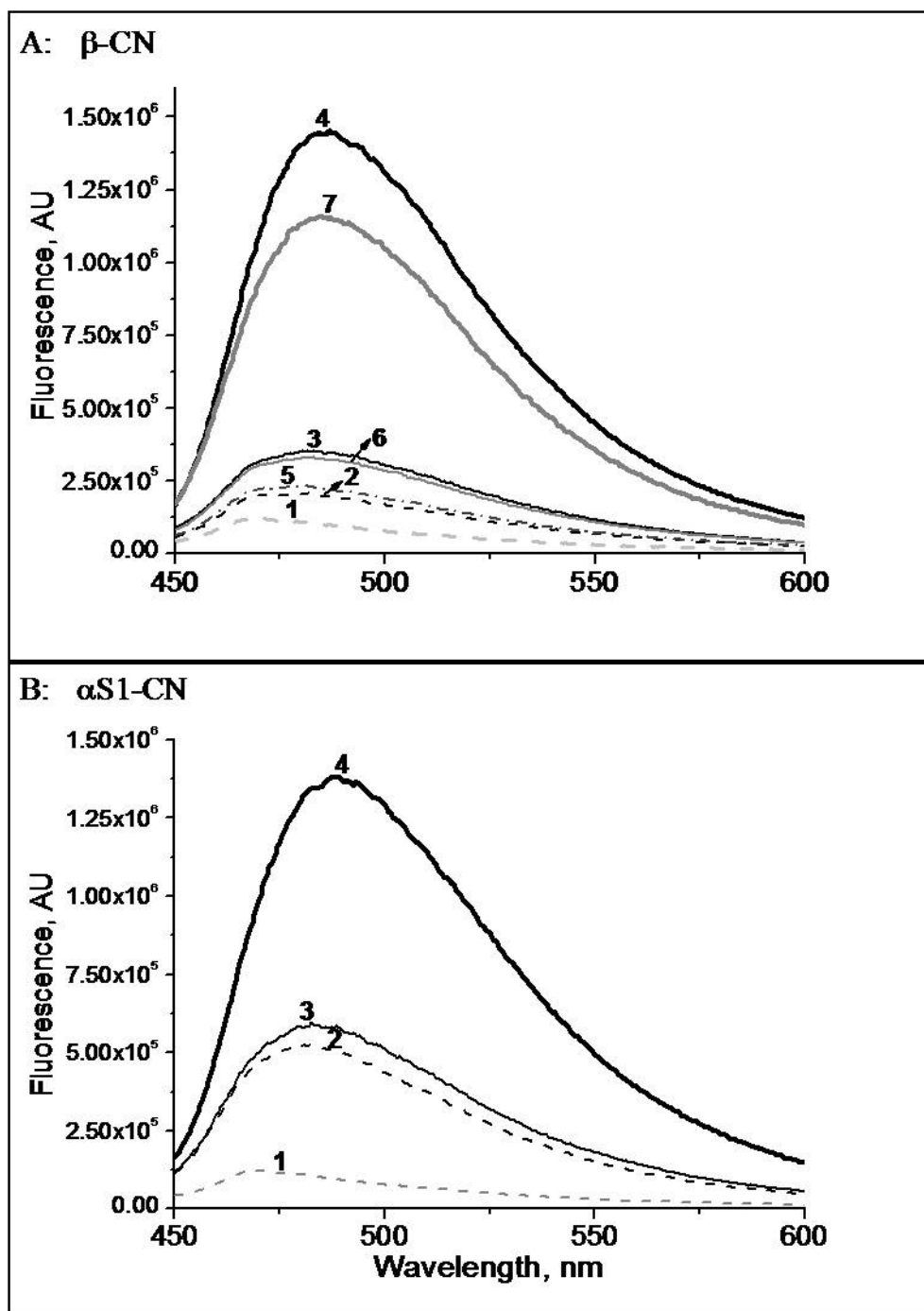


Figure 6.

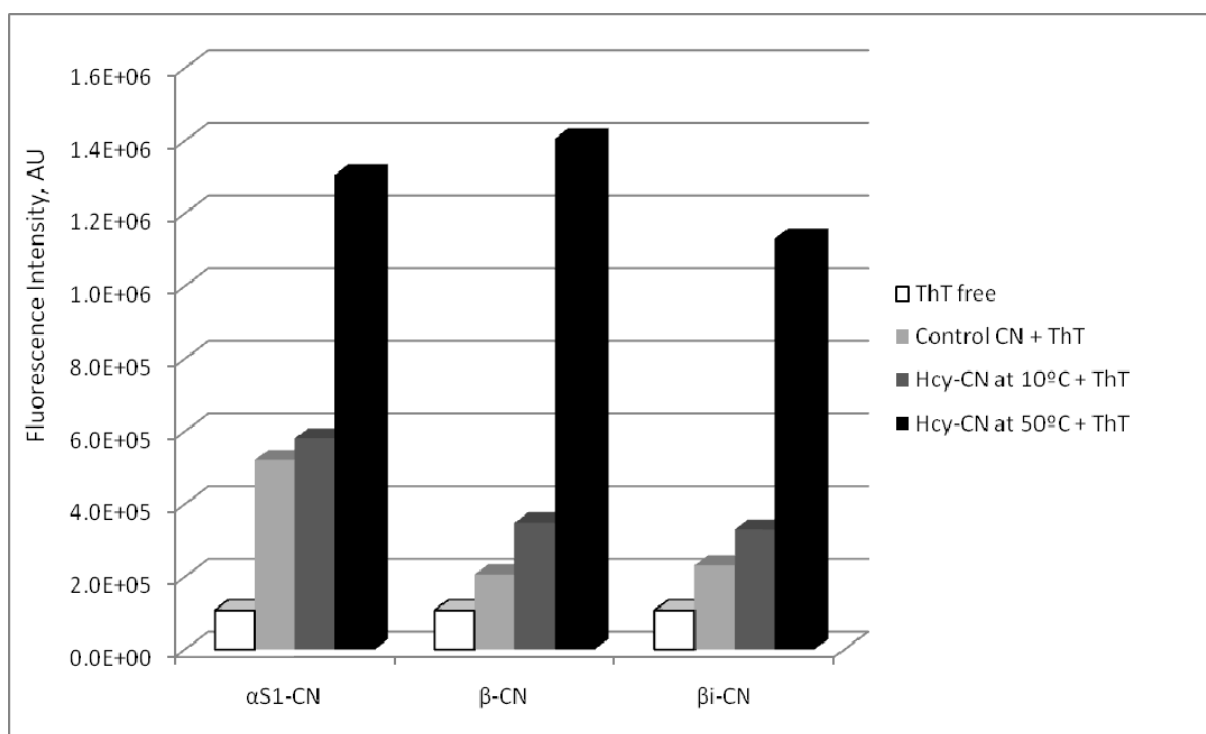


Figure 7.

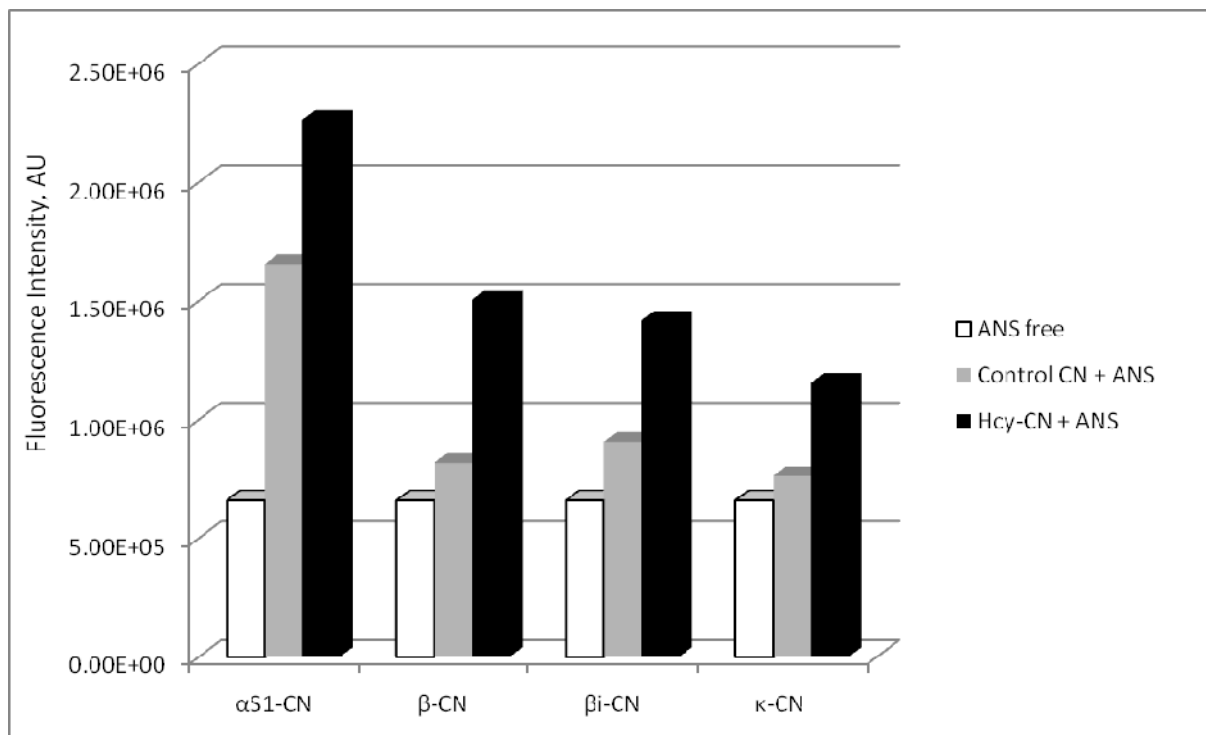


Figure 8.

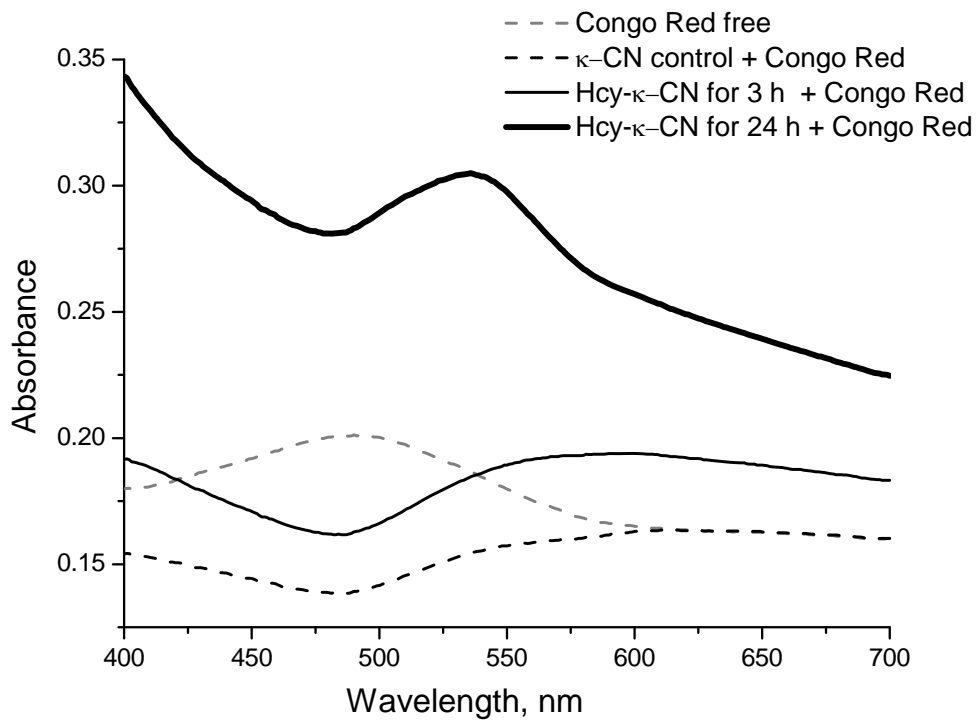


Figure 9

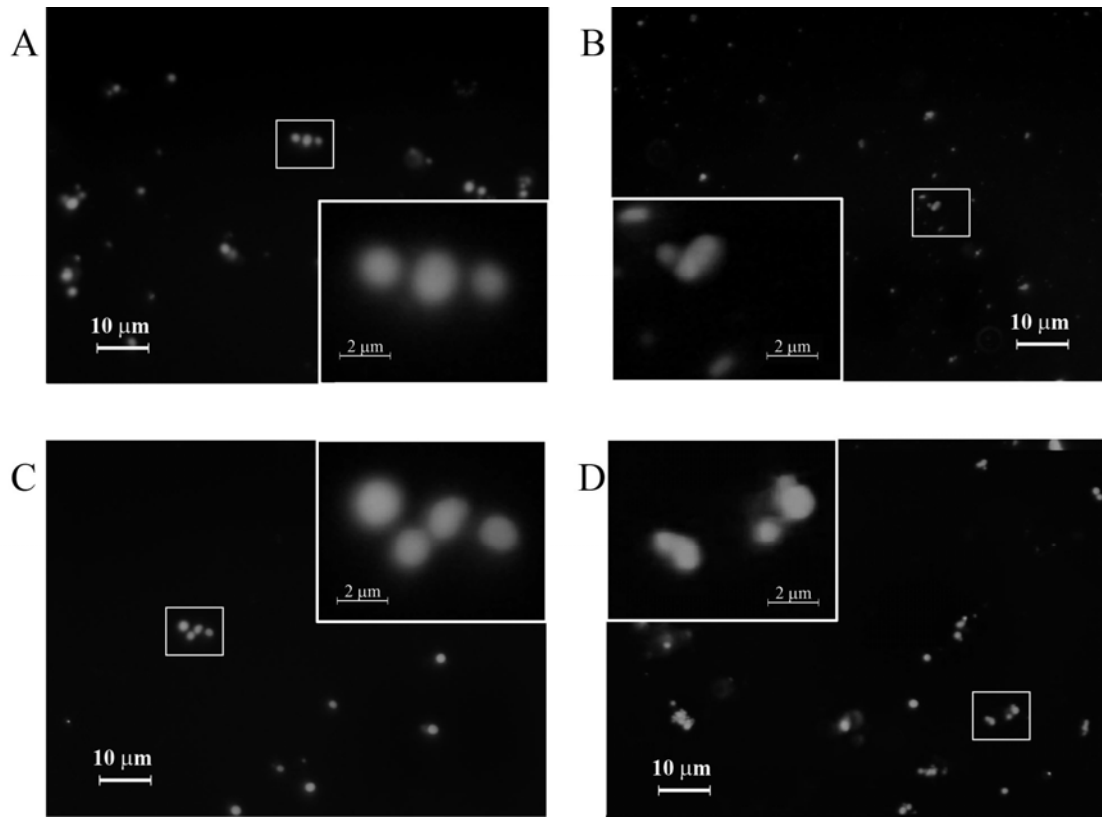


Figure 10.

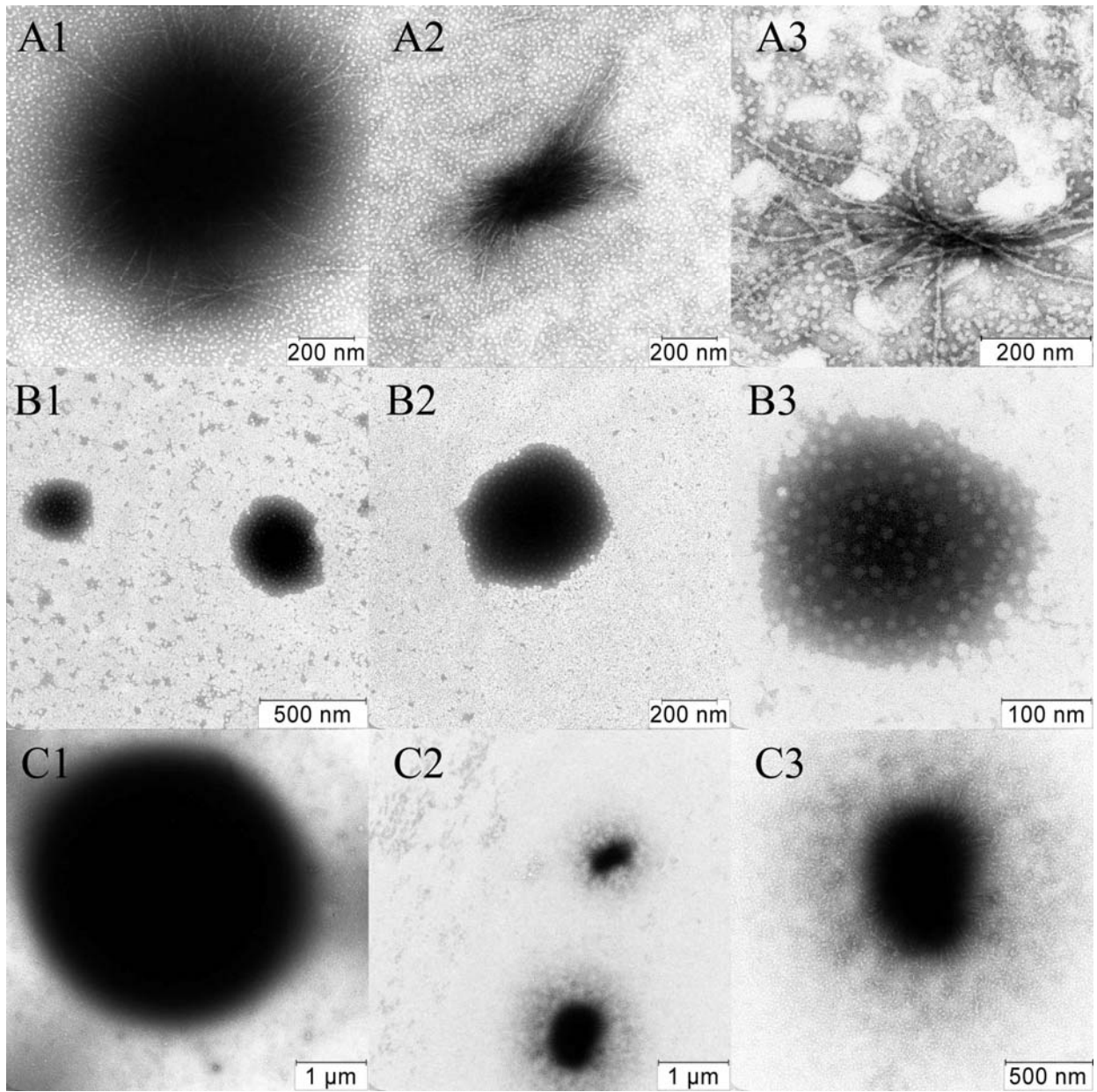


Figure 11.

## Bibliography

- [1] H. Jakubowski, The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease, *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 9 (2008) 155-167.
- [2] A.B. Lawrence de Koning, G.H. Werstuck, J. Zhou, R.C. Austin, Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis, *Clin Biochem* 36 (2003) 431-441.
- [3] M.P. Mattson, T.B. Shea, Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders, *Trends Neurosci* 26 (2003) 137-146.
- [4] R. Obeid, W. Herrmann, Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia, *FEBS Lett* 580 (2006) 2994-3005.
- [5] S. Seshadri, Elevated plasma homocysteine levels: risk factor or risk marker for the development of dementia and Alzheimer's disease?, *J Alzheimers Dis* 9 (2006) 393-398.
- [6] J.D. Spence, H. Bang, L.E. Chambless, M.J. Stampfer, Vitamin Intervention For Stroke Prevention trial: an efficacy analysis, *Stroke* 36 (2005) 2404-2409.
- [7] J. Suszynska, J. Tisonczyk, H.G. Lee, M.A. Smith, H. Jakubowski, Reduced homocysteine-thiolactonase activity in Alzheimer's disease, *J Alzheimers Dis* 19 (2010) 1177-1183.
- [8] H. Jakubowski, Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels, *FASEB J* 13 (1999) 2277-2283.
- [9] P. Paoli, F. Sbrana, B. Tiribilli, A. Caselli, B. Pantera, P. Cirri, A. De Donatis, L. Formigli, D. Nosi, G. Manao, G. Camici, G. Ramponi, Protein N-Homocysteinylation Induces the Formation of Toxic Amyloid-like protofibrils, *J Mol Biol* (2010).
- [10] D.C. Thorn, H. Ecroyd, M. Sunde, S. Poon, J.A. Carver, Amyloid fibril formation by bovine milk alpha s2-casein occurs under physiological conditions yet is prevented by its natural counterpart, alpha s1-casein, *Biochemistry* 47 (2008) 3926-3936.
- [11] P. Tompa, Intrinsically unstructured proteins, *Trends Biochem Sci* 27 (2002) 527-533.
- [12] A.K. Dunker, C.J. Oldfield, J. Meng, P. Romero, J.Y. Yang, J.W. Chen, V. Vacic, Z. Obradovic, V.N. Uversky, The unfoldomics decade: an update on intrinsically disordered proteins, *BMC Genomics* 9 Suppl 2 (2008) S1.



- [13] C.A. Galea, Y. Wang, S.G. Sivakolundu, R.W. Kriwacki, Regulation of cell division by intrinsically unstructured proteins: intrinsic flexibility, modularity, and signaling conduits, *Biochemistry* 47 (2008) 7598-7609.
- [14] S. Raychaudhuri, S. Dey, N.P. Bhattacharyya, D. Mukhopadhyay, The role of intrinsically unstructured proteins in neurodegenerative diseases, *PLoS One* 4 (2009) e5566.
- [15] D.S. Horne, Casein structure, self-assembly and gelation, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 7 (2002) 456-461.
- [16] C. Holt, L. Sawyer, Primary and predicted secondary structures of the caseins in relation to their biological functions, *Protein Eng* 2 (1988) 251-259.
- [17] H.M. Farrell, P.X. Qi, V.N. Uversky, New Views of Protein Structure: Applications to the Caseins: Protein Structure and Functionality, *Advances in Biopolymers*, A.S.C. Symposium series 935 (2006) 52-70.
- [18] H. Jakubowski, New method for the determination of protein N-linked homocysteine, *Anal Biochem* 380 (2008) 257-261.
- [19] J.C. Mercier, J.L. Maubois, S. Poznanski, B. Ribadeau-Dumas, [Preparative fractionation of caseins from cattle and sheep by chromatography on D.E.A.E. cellulose using urea and 2-mercaptoethanol], *Bull Soc Chim Biol (Paris)* 50 (1968) 521-530.
- [20] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys* 82 (1959) 70-77.
- [21] S. Kumar, A.K. Singh, G. Krishnamoorthy, R. Swaminathan, Thioflavin T displays enhanced fluorescence selectively inside anionic micelles and mammalian cells, *J Fluoresc* 18 (2008) 1199-1205.
- [22] T. Ban, D. Hamada, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto, Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence, *J Biol Chem* 278 (2003) 16462-16465.
- [23] D. Matulis, C.G. Baumann, V.A. Bloomfield, R.E. Lovrien, 1-anilino-8-naphthalene sulfonate as a protein conformational tightening agent, *Biopolymers* 49 (1999) 451-458.
- [24] J. Slavik, Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function, *Biochim Biophys Acta* 694 (1982) 1-25.
- [25] G.V. Semisotnov, N.A. Rodionova, O.I. Razgulyaev, V.N. Uversky, A.F. Gripas, R.I. Gilmanshin, Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe, *Biopolymers* 31 (1991) 119-128.
- [26] P. Frid, S.V. Anisimov, N. Popovic, Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases, *Brain Res Rev* 53 (2007) 135-160.
- [27] H. Puchtler, F. Sweat, Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid, *J Histochem Cytochem* 13 (1965) 693-694.

- [28] H. Ecroyd, T. Koudelka, D.C. Thorn, D.M. Williams, G. Devlin, P. Hoffmann, J.A. Carver, Dissociation from the oligomeric state is the rate-limiting step in fibril formation by kappa-casein, *J Biol Chem* 283 (2008) 9012-9022.
- [29] R.W. Lencki, Evidence for fibril-like structure in bovine casein micelles, *J Dairy Sci* 90 (2007) 75-89.

## N-HOMOCYSTEINYLATION OF OVINE PRION PROTEIN INDUCES AMYLOID-LIKE TRANSFORMATION

Yulia Y. Shchutskaya<sup>1,2</sup>, Jean-Marc Chobert<sup>1</sup>, Vladimir I. Muronetz<sup>2</sup>, Hieronim Jakubowski<sup>3,3a</sup>, and Thomas Haertlé<sup>1,\*</sup>

From <sup>1</sup> UR 1268 Biopolymères Interactions Assemblages, INRA, équipe Fonctions et Interactions des Protéines Laitières, B.P. 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France

<sup>2</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Department of Microbiology & Molecular Genetics, UMDNJ-New Jersey Medical School, International Center for Public Health, Newark, NJ, USA

<sup>3a</sup> Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland

Running title: Homocysteinylation induces amyloid-like conversion of prion

Address correspondence to: Thomas Haertlé, INRA BIA FIPL, BP 71627, Cedex 3, Nantes, 44316, France, phone: + 332 40 67 50 91, fax: + 332 40 67 52 44, e-mail: [haertle@nantes.inra.fr](mailto:haertle@nantes.inra.fr)

**Modification of protein lysyl residues by homocysteine (Hcy)-thiolactone generates proteins with altered structure and function, and has been linked to human pathology, including brain diseases. To test a hypothesis that N-homocysteinylation causes amyloidogenic conversion, ovine prion protein (PrP) was modified with Hcy-thiolactone and its physico-chemical properties were studied. N-Hcy-PrP formed multimers, which precipitated from the solution. Mass spectrometry analyses showed that at least K197 and K207 residues of PrP were the site of N-homocysteinylation. In dynamic light scattering measurements, large aggregated N-Hcy-PrP particles of 1 µm diameter were observed. These structures exhibited increased resistance to proteinase K digestion, and enhanced ThT-binding fluorescence, which are characteristic of amyloid prion. CD and infrared spectroscopy measurements showed increased content of beta-sheet structures in N-Hcy-PrP relative to unmodified PrP. Epifluorescence microscopy in the presence of thioflavin T revealed cluster-like aggregates of N-Hcy-PrP. Taken together, data indicate that the N-homocysteinylation causes amyloidogenic transformation of PrP *in vitro*, which is likely to contribute to amyloidogenesis in neurodegenerative diseases *in vivo*.**

Mechanisms underlying neurodegenerative diseases of amyloidogenous nature are not fully understood. Although the role of genetics in inherited Alzheimer and Creutzfeldt-Jacob diseases is well-established, causes of sporadic

and infectious neurodegenerative diseases such as senile Alzheimer and prion protein diseases are less clear. An interrelation between Alzheimer and prion protein diseases was recently discovered for the beta-amyloid peptide capability to interact with prion protein which is located at the surface of neurons (1,2). Although the detailed mechanism for processes that follow such interaction is still unclear (3), interactions between beta-amyloid peptide and its precursors with normal and infectious prion protein forms are likely to affect the onset and development of these diseases.

The causes of low susceptibility to infectious spongiform encephalopathy and its long latent period in humans are still unknown. In the case of so called "conformational/condensation diseases" pathological conversion of a single protein molecule triggers the transformation of normal prion protein molecules. Pathologic prion aggregation is believed to be the cause of scrapie in sheep, spongiform encephalopathy in cattle, and hereditary Creutzfeldt-Jacob disease in humans. Pathologic transformation of a prion protein is accompanied by enrichment in β-layer content and by its decrease of susceptibility to proteolysis (4). Amyloidogenic transformation of prion proteins proceeds under specific conditions of pH and temperature through a stage of small oligomer formation (5). Submicellar lipid concentrations and copper ions can induce rapid prion conversion into amyloid (6-8). The available data thus suggests that multiple factors contribute to PrP aggregation and pathogenic conversion, making the search of new ways to regulate these transformations via

disease-associated compounds even more important.

Clinical studies have linked elevated homocysteine (Hcy) levels with Alzheimer's disease (9). One possible, albeit unproven, mechanism underlying this link is protein *N*-homocysteinylation by Hcy-thiolactone (10). *N*-homocysteinylation introduces sulfhydryl groups on proteins, which increases the protein's susceptibility to aggregation and stabilizes the aggregates (11,12). An attractive hypothesis is that protein *N*-homocysteinylation is contributing to amyloidogenic transconformation of PrP. Aside from being an important factor in prion disease development, *N*-homocysteinylation might also play a certain role in Alzheimer disease progress by altering the above-mentioned beta-amyloid peptide interaction with prion receptors.

Hcy is a natural non-protein sulfur-containing amino acid. It is normally metabolized to methionine by remethylation or to cysteine by trans-sulfation. In addition, aminoacyl-tRNA synthetases metabolize Hcy to the thioester Hcy-thiolactone (13-16), which further reacts with proteins by forming isopeptide bond with  $\epsilon$ -amino groups of protein lysyl residues. This reaction induces changes in protein structure and function (11,12,14,17-20).

Hyperhomocysteinemia is caused by genetic and/or nutritional deficiencies. Hyperhomocysteinemia is categorized as mild (16-30  $\mu$ M), moderate (31-100  $\mu$ M) and severe (> 100  $\mu$ M) (21). Elevated Hcy levels are associated with increased incidence of cardiovascular diseases including atherosclerosis and thrombosis (22,23), pregnancy disorders (24) and with neurodegenerative pathologies such as dementia, Parkinson and Alzheimer diseases (9,25,26). Plasma Hcy level is an early and sensitive marker of mental disorders (27). Interaction with glutamate receptors has been suggested as a mechanism of Hcy neurotoxicity (28). However, the propensity of *N*-Hcy-proteins to aggregate (12) and accumulation of elevated levels of *N*-Hcy-protein in several human pathologies (e.g., cystathionine beta-synthase or methylenetetrahydrofolate reductase deficiency) (29) suggest that *N*-Hcy-protein aggregates could also contribute to Hcy neurotoxicity. The normal prion protein is exposed on the outer side

of cellular membranes and neuronal membranes, in particular being linked to them through a glycopospholipid anchor. The half-life of PrP in mammals is of the order of hours, long enough to be modified by Hcy-thiolactone, whose synthesis is greatly enhanced in hyperhomocysteinemia in humans. Because of its neutral character ( $pK=6.67$ ), (30), Hcy-thiolactone freely crosses cell membranes (18) and is also expected to cross the blood-brain barrier, which is known to become compromised in hyperhomocysteinemia (31).

The aim of the present study was to examine how *N*-homocysteinylation of PrP with Hcy-thiolactone affects the protein's structure and ability to aggregate.

## Experimental Procedures

**Materials-**L-Hcy-thiolactone.HCl, thioflavin T, proteinase K (PK) and MOPS were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), trypsin from Promega (Madison, WI, USA). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD) from rabbit muscles was purified as described (32).

The variant PrP VRQ (V136, R154, Q171) 23-234 (full-length amino acid sequence without N-terminal signal peptide and C-terminal peptide, with one additional seryl residue on the N-terminus) of ovine PrP was expressed and purified following a procedure previously described (33). Before each experiment, freeze-dried PrP was dissolved in 15 mM sodium-acetate buffer, pH 4.5, and transferred into the desired buffer by elution on a Sephadex-G25 desalting column.

***N*-Homocysteinylation-** PrP (20-200  $\mu$ M) in 20 mM MOPS (or 25 mM potassium phosphate), pH 7.5 was modified with Hcy-thiolactone (10-100-fold molar excess/ one lysyl residue (one PrP molecule contains 10 lysyl residues)) at 37°C for 24 h. The reaction mixture was centrifuged and the pellet washed with buffer to remove low-molecular-weight compounds. As a control, GAPD was modified under the same conditions.

*N*-homocysteinylation was also carried out with 42  $\mu$ M PrP in 20 mM MOPS, pH 7.5, 0.03% NaN<sub>3</sub> at 37°C by adding Hcy-thiolactone 3 times to a final concentration of 100  $\mu$ M during 1 month period.

Initial and final PrP concentrations were determined with Bradford assay.

*Dynamic light scattering (DLS)*- DLS experiments were carried out by using Zetasizer Nano-ZS apparatus (Malvern Instruments, Malvern, U.K.) equipped with 173° optics for detection of scattered intensity. Laser wavelength was 532 nm. Size distribution by number was used for interpretation of results. DLS measurements were carried out at 37°C using 20 µM protein in 20 mM MOPS buffer, pH 7.5. For studies of aggregation after *N*-homocysteinylation, hydrodynamic diameter of native PrP was measured at 37°C and Hcy-thiolactone was added directly into the same cuvette. Each measurement was an average of 5 runs, 30 s each. Data sets obtained were analyzed using the Malvern DTS software.

*Epifluorescence microscopy*- Freshly prepared water solution of thioflavin T was added to 43 µM homocysteinylation prion solution in 20 mM MOPS, pH 7.5 in a molar ratio of 20:1. Sample was observed with an inverted fluorescence microscope (Leica DMRB) using band-pass excitation filter 450-490 nm, reflection short pass beam splitter RKP 510 and long pass filter >515 nm. Digital pictures were acquired using a Nikon DS-1QM camera and NIS software.

*Transmission electron microscopy* - Modified and control  $\alpha$ -msh proteins were absorbed onto Formvar film, attached to 200-mesh copper grids and contrasted with Nano-W reagent (Nanoprobes, USA). After air-drying, the specimens were shadowed with carbon and examined using an LEO 912 AB OMEGA electron microscope (Carl Zeiss, Germany) operated at 100 kV.

*Infrared spectroscopy (IR)*- PrP (200 µM in 20 mM MOPS, pH 7.5) was modified with Hcy-thiolactone used at a *ratio* of 10 molecules for one lysyl residue at 37°C for 15 h. After modification, control and *N*-Hcy-PrP samples were lyophilized twice and resolubilized in appropriate amounts of D<sub>2</sub>O to give a final protein concentration of 2.1 mM.

Spectra were recorded using a Bruker Vertex 70 spectrometer (Bruker GmbH, Germany) equipped with a DTGS (deuterated triglycine sulfate) detector. The samples were placed between two BaF<sub>2</sub> windows separated by a spacer of about 5 µm in thickness. All the 128

scans with a spectral resolution of 2 cm<sup>-1</sup> were collected at 20°C and subjected to Fourier transformation after one level of zero filling.

Bruker OPUS software was used for data recording and processing. All spectra were compensated for water vapor contribution. A compensation for D<sub>2</sub>O contribution was obtained by subtracting its spectrum multiplied by 0.92 from each sample spectrum. An elastic baseline was subtracted in the amide region (1750 cm<sup>-1</sup> – 1525 cm<sup>-1</sup>) and the spectra were normalized to the integral intensity of the amide I band. Second derivatives were calculated after 5 point Savitsky-Golay smoothing using Origin 7.5 software (Origin, Microcal, Ma, USA).

*Thioflavin T fluorescence*- Freshly prepared water solution of thioflavin T was added to 7 µM *N*-Hcy-PrP in 20 mM MOPS, pH 7.5 at a molar *ratio* of 10:1. Thioflavin T was incubated for 5 min with protein samples before the measurements. Spectra of thioflavin T fluorescence were acquired with a Hitachi F 4500 spectrofluorimeter at 20°C using an excitation wavelength of 435 nm.

*Mass-spectrometry*- Mass-spectrometry analyses were carried out by the platform “Biopolymers-Interaction-Structural Biology” located at the INRA Centre of Angers-Nantes, France ([http://www.angers-nantes.inra.fr/plateformes\\_et\\_plateaux\\_techniques/plateforme\\_bibs](http://www.angers-nantes.inra.fr/plateformes_et_plateaux_techniques/plateforme_bibs)).

The protein spots were excised, washed with 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, dehydrated with 50% (v/v) acetonitrile in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, reduced with 10 mM dithiothreitol (DTT) and alkylated with 55 mM iodoacetamide. The gel bands were further washed and dehydrated as described above and finally dried in a vacuum centrifuge. The proteins were digested overnight at 37°C by addition of 15 µl of trypsin, 12.5 ng/ml in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. The resulting peptide mixture was acidified with 1% (v/v) formic acid and stored at -20°C until analysis.

Protein identification was performed by MALDI-TOF mass spectrometry. Analyses were performed with a MALDI LR instrument equipped with a conventional 337 nm laser (Micromass/Waters). One microliter of the sample was mixed with 1 µl of the matrix preparation (2.5 g/l  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 2.5 g/l 2,5-dihydroxybenzoic acid, 70%

[v/v] acetonitrile, and 0.1 % [w/v] trifluoroacetic acid) and deposited onto the MALDI sample probe. Mass-data acquisitions were piloted by the Mass Lynx software (Micromass/Waters).

*Digestion by Proteinase K (PK)*- Protein samples (20  $\mu$ M in 20 mM MOPS, pH 7.5) were incubated with 0.2  $\mu$ g/ml PK in the presence of 5  $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$  ions at 37°C. Proteolysis was stopped by the addition of Laemmli buffer (without beta-mercaptoethanol) to the samples and by the instant boiling of the sample during 5 min. Effectiveness of 99.5% of PK inactivation was confirmed by using synthetic substrate Suc-Ala-Ala-Pro-Phe *p*-nitroanilide. Further 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and consequent staining of gel with Coomassie blue R-250 were then performed. Five microgram of protein was charged on each lane.

## RESULTS

*The modification of PrP by Hcy-thiolactone.* After addition of Hcy-thiolactone, PrP solutions become opalescent, suggesting aggregation. The insoluble and soluble PrP forms were separated by centrifugation and analyzed by SDS-PAGE. The emergence of prion oligomers upon homocysteinylation was confirmed by non-reducing SDS-electrophoresis using unmodified ovine PrP as controls. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homocysteinylation was performed in order to obtain a positive control. Fig. 1a shows that PrP was present as mono-, di-, and oligomers in the pellet (lane 3). Lane 2 shows that the PrP molecules remaining in the supernatant are in the same monomeric form as the control sample of native unmodified PrP (lane 1).

Treatment of the aggregated form of *N*-Hcy-PrP with beta-mercaptoethanol resulted in disappearance of dimer and polymer bands on the gel (lane 4), which is likely due to the reduction of disulphide bonds between *N*-Hcy-PrP. Another feature of the modification is a characteristic smear visible in lane 3, which indicates heterogeneity of the products. One can assume that introduction of *N*-linked Hcy into the protein structure increased its ability to form multimers due to oxidation of free SH-groups of the introduced Hcy.

In experiments using 100  $\mu$ M final "physiological" concentration of Hcy-thiolactone, added three times during one month, the formation of similar oligomeric forms in the pellet was observed on SDS-PAGE (Fig. 1B, lane 2).

There are 10 lysyl residues in the primary structure of prion, 3 of which are located in the structured domain. According to known PDB-structure (1UW3) the latter lysyl residues are exposed to solvent and thus are accessible for modification.

GAPD which contains 6 lysyl residues per molecule, was also modified by Hcy-thiolactone.

After modification all GAPD aggregated and was present in the pellet (Fig. 1C, lane 7) but not in the supernatant (lane 6). Furthermore, the content of disulphide-linked dimers and oligomers in homocysteinylation GAPD is notably lower compared to that in prion. This is probably due to the feature of tetrameric molecule modification. The latter is likely to be capable of aggregation even upon the formation of a single disulphide bond between two tetramers, i.e. in a case when only 2 of 8 subunits are bound covalently.

*Identification of homocysteinylation lysyl residues in PrP by MALDI-TOF analysis*

The dimeric product obtained by *N*-homocysteinylation of PrP was analyzed by mass-spectrometry (MALDI-TOF) and compared with unmodified control PrP. Samples were cut out from the gel, treated with DTT, then with iodoacetamide to block SH-groups of cysteyle residues and incorporated homocysteyle residues, and digested with trypsin. Since the sample homogeneity is crucial for mass-spectrometry analysis, only the part of a band strictly corresponding to the dimer was analyzed. The results of the analysis are shown in Table 1 and Fig. 2.

We expected to detect peptides that differ from these in control samples by the mass of added *N*-linked Hcy in the products of tryptic digest of *N*-Hcy-PrP. Only 8 tryptic peptides of PrP contain lysyl residue. Our analytic method detects peptides with molecular masses in a range between 820 and 3000 Da. Because of this limitation, 3 short: LCK (23-25), K (26), TNMK (110-113) and one long peptide sequences : YPPQGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQ

PHGGGWGQPHGGGGWGQGGSHSQWNKP SKPK (58 residues from 52 to 109) cannot be detected.

Therefore, only 5 out of 10 lysyl residues in PrP are accessible to homocysteinylation analysis, namely residues 26, 29, 188, 197 and 207. Revising peptides containing 26 and 29 lysyl residues, we didn't find peptides with molecular mass, which fits to molecular mass of peptide after homocysteinylation and alkylation (+117+57).

Only two analyzed peptides contain 188 lysyl residue: 172-188 and 172-197. Presence in the sequence of cysteine 182 will include alkylation in the molecular mass of peptides. So, peptide 172-197 has molecular mass more than 3000 Da and cannot be identified. Peptide 172-188 was not found either in native, or in homocysteinylation state. Observed miscleavage can be explained as specific property of digestion of this site by trypsin.

Modification of 197 and 207 lysyl residues has been properly confirmed. Analysis of peptides with miscleavages (peptide 189-207 for lysine 197 and peptide 198-211 for lysine 207, and also peptide 189-211 for both) shows that these residues were homocysteinylation and alkylated. Unfortunately, it is impossible to observe the double modification of peptide 189-211 because in this case molecular mass of the modified peptide exceeds the upper bound of sensitivity which is 3000 Da.

Homocysteinylation residues 197 and 207 were also found at the end of short completely cleaved peptides (189-197 and 198-207). It is to be mentioned that in all cases we can see partial trypsinolysis in sites with homocysteinylation lysines, as evidenced by presence of modified and unmodified peptides. On one hand, it can indicate a possibility of trypsinolysis at the sites with modified lysines. On the other hand, homocysteinylation was incomplete for all identified lysyl residues.

Therefore, homocysteinylation of 197 and 207 lysyl residues was discovered, however the modification was non-homogenous and only partial. It is obvious that such degree of homocysteinylation is sufficient for dimer formation. In our case only dimeric form was

analyzed, but it is quite possible that the degree of modification could be higher in case of larger associates of homocysteinylation prion.

*Prion aggregation induced by N-homocysteinylation.* Protein aggregation was investigated with laser dynamic light scattering. Fig. 3 illustrates that PrP modification with a 100-fold Hcy-thiolactone excess leads to the formation of large aggregates (hydrodynamic diameter of ~1000 nm) in case of proteins with partially stable tertiary structure such as PrP and GAPD. Aggregate formation is not caused by alteration of protein oxido-reductive environment, because increase in particle size was not detected when applying the same amount of cysteine as a control. The study of protein behavior after modification with smaller amount of Hcy-thiolactone (10-fold excess per lysyl residue) has shown that prion protein and GAPD do not undergo rapid aggregation, which can be measured by DLS during 20 h. Such a long time was selected because it has been demonstrated that under these conditions, all Hcy-thiolactone has reacted (12).

*N-Homocysteinylation leads to changes in PrP secondary structure (IR spectroscopy).* Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was used to detect the increase in  $\beta$ -sheet content since it is a characteristic feature of PrP amyloidogenic conversion. IR spectra of proteins show a characteristic band in the range of 1610 – 1690  $\text{cm}^{-1}$ , which corresponds to the Amide I vibrations (mainly C=O stretching vibration). The energy of this vibration is sensitive to the secondary structure of the protein.

Each sample was extensively dialyzed to eliminate possible effects of free Hcy, which absorbs in the same spectral region. Nevertheless, an IR spectrum of Hcy was acquired as a control (data not shown, peak positions are indicated by the arrows on Fig. 4). It shows two components at 1613  $\text{cm}^{-1}$  and 1690  $\text{cm}^{-1}$ , which is close to the  $\beta$ -sheet peaks but far enough to be resolved. It could be shown that the contribution of Hcy to the acquired protein spectra is negligible.

Modification of concentrated PrP (200  $\mu\text{M}$ ) leads to significant changes in the secondary structure of PrP even with 10-fold excess of Hcy-thiolactone per lysine. At the same time

using 10-fold excess of Hcy-thiolactone per lysine with 20  $\mu\text{M}$  PrP didn't allow to see considerable changes by DLS and fluorescence methods.

Spectra of native and *N*-Hcy-PrP are shown in Fig. 4. The broad band is a superposition of several amide I vibrational bands of different secondary structures. Second derivatives were used to enhance the resolution of the spectra and reveal the principal band components of the complex spectra. According to the broad peak at  $1650\text{ cm}^{-1}$ , native prion protein is mainly composed of  $\alpha$ -helices and random coil structures. The spectrum of *N*-Hcy-PrP shows two bands located at  $1617\text{ cm}^{-1}$  and  $1678\text{ cm}^{-1}$ , what is typical of the presence of anti-parallel  $\beta$ -sheets. At the same time, the intensity of  $\alpha$ -helical and random coil vibrations decreases. Peak location below  $1620\text{ cm}^{-1}$  is likely to be caused by stronger hydrogen bonding in intermolecular  $\beta$ -sheets, which is representative for amyloid fibrils formation (34). The IR spectra clearly indicate that the protein, consisting mainly of random coils in its native form aggregates upon incubation with Hcy-thiolactone leading to the formation of amyloid fibrils, stabilized by intermolecular beta-sheets.

*Amyloidogenic conversion of modified prion protein.* The ability to cause pathological secondary structure change in normal protein is a distinctive feature of PrP. A transition from alpha-helical to beta-sheets dominant structure is followed by the formation of amyloid aggregates. Thioflavin T fluorescence at 495 nm is a diagnostic test for amyloid structures. Because sheep PrP forms stable unfolding amyloidogenic intermediates at elevated temperature, we have used thermal treatment (heating to  $80^\circ\text{C}$  for 2 min with subsequent cooling to  $20^\circ\text{C}$ ) (35) to obtain a positive control.

The fluorescence spectra ( $\lambda_{\text{exc}} = 435\text{ nm}$ ) of thioflavin T in the presence of *N*-Hcy-PrP are shown in Fig. 5. A significant increase of thioflavin T fluorescence was observed for PrP modified with 100-fold Hcy-thiolactone/lysyl residue. Thioflavin T fluorescence in the presence of *N*-Hcy-PrP was similar to the fluorescence in the presence of heat-treated unmodified PrP. These observations suggest that *N*-homocysteinylation leads to amyloidogenic-

like conversion of PrP. PrP modification with 10 Hcy-thiolactone/lysine was less efficient in inducing thioflavin T fluorescence.

*Resistance of N-Hcy-PrP to proteinase K digestion.* Beta-sheet enriched (amyloid-like) forms of prion protein are resistant to PK. Such a resistance may serve as an indicator of structural transition of PrP. We studied the susceptibility of *N*-Hcy-PrP to PK digestion relative to that of PrP amyloid obtained by heat-treatment of native PrP.

We found that *N*-Hcy-PrP became significantly resistant to PK. After 5 min incubation with PK, control native PrP was completely hydrolyzed (Fig. 6), while a significant amount of a full-size monomeric form was still detected even after 40 min of digestion of *N*-Hcy-PrP. Even monomeric *N*-Hcy-PrP was more resistant to PK digestion as compared with heat-induced amyloid form, which shows significant decrease in full-size monomer content after 15 min proteolysis (Fig. 6). The observed peptide patterns are partially similar for both cases but not completely identical because of the presence of disulfide-bonded prion multimers.

*Morphology of N-Hcy-PrP aggregates.* Morphology of PrP aggregates formed after 72 h of modification with Hcy-thiolactone was monitored by phase contrast and epifluorescence microscopy. Epifluorescence of thioflavin T in the presence of PrP aggregates allows getting information about size, shape and morphology of particles in contrast to the DLS, which gives only averaged sizes without any data about the geometries of particles.

In the initial state, PrP is native, monomeric and invisible by microscopy due to its small size and absence of thioflavin T fluorescence. After 24 h of reaction with Hcy-thiolactone at  $37^\circ\text{C}$ , intensively fluorescent particles of about  $1\text{ }\mu\text{m}$  diameter appeared (Fig. 7A), what is in agreement with DLS data. In the same time, long fibrils with relatively small fluorescence levels were formed in the sample. After 48 and 72 h (Figs. 7B and C, respectively), these structures showed a tendency for a further agglomeration and reorganization into cluster-like structures.

Transmission electron microscopy was used in order to further explore the structure of the aggregates. Fig 8 shows, that upon treatment



with a 50-fold excess homocysteine thiolactone, opaque aggregates are formed. The intact prion protein can be seen as amorphous deposits, similar to those seen in control sample (data not shown). Thus, both used techniques reveal aggregation of prion upon homocysteinylation, however, no fibril structures are formed upon extensive modification.

## DISCUSSION

This study provides evidence that *N*-homocysteinylation affects the amyloidogenic transition of PrP. Even in case of "physiological" concentrations (100  $\mu$ M), Hcy-thiolactone demonstrates ability to provoke such a transition. Dimerization, oligomerization and aggregation of PrP begin to occur within minutes after addition of Hcy-thiolactone, despite that amyloidogenic structural transition takes hours.

Because elevated Hcy is present in patients with neurodegenerative amyloid diseases, the analysis of the consequences of *N*-homocysteinylation of PrP is of substantial interest for study of both prion diseases and Alzheimer's disease that is probably related to prions.

It is well established that *N*-homocysteinylation induces significant changes in protein structures and properties (11,12,18,19,36) and that *N*-linked Hcy is present in human proteins (37,38). Other studies have linked *N*-Hcy-protein with human pathology by demonstrating increased accumulation of *N*-Hcy-protein in cystathionine beta-synthase and methylenetetrahydrofolate reductase deficiencies (29), and in kidney disease (39). Major pathophysiological consequences of protein *N*-homocysteinylation include increased susceptibility to thrombogenesis (caused by *N*-Hcy-fibrinogen, (40) and an autoimmune response elicited by *N*-Hcy-proteins, associated with stroke and coronary artery disease (41-44).

The amyloidogenic effect of homocysteinylation was recently proven on the serum blood albumin. However, such transformation requires 10 mM Hcy-thiolactone concentration and takes about 7 days (45).

Obviously, true amyloidogenic proteins such as prion, which is susceptible to transformation under treatment by numerous

relatively nonspecific factors, could appear as a target for homocysteinylation.

The current study demonstrates that modification of PrP, in opposite to normal proteins, occurs faster and is possible even with "physiological" concentrations of Hcy-thiolactone. This could indicate the possible reason of sporadic form of prion pathology and regulate its development and severity.

The presence of normal PrP on the neurons surface and its potential engagement into Alzheimer's disease could also point out that homocysteinylation could be involved in pathogenesis of both diseases.

Our present data show that *in vitro* modification with Hcy-thiolactone causes PrP aggregation and alters its physico-chemical properties. Resistance to proteinase K digestion and increase in thioflavin T fluorescence suggest that changes in properties of *N*-Hcy-PrP are of an amyloidogenic nature. However, size and morphology of the aggregates obtained do not correspond exactly to the expected sizes and morphologies of typical PrP amyloidogenic forms. A significant fraction of the aggregates appears as spherical particles beaded on the fibrillar structures. This fraction tends to form super-aggregates in time, and the increased thioflavin T fluorescence appears to come from these super-aggregates.

Hcy-thiolactone concentrations used for PrP modification in the present study (millimolar) are significantly higher than physiologic values. An increase of the time of exposure with 3 repeated additions of much lower (micromolar) Hcy-thiolactone concentrations lead to similar changes as for excessively modified PrP revealed by SDS-PAGE. It should be noted that *N*-Hcy-PrP is likely to accumulate *in vivo* due to relatively long half-life of PrP and increased resistance of *N*-Hcy-PrP to proteolytic degradation.

One of the possible mechanisms of dimerization of PrP was a swapped form of the 3<sup>rd</sup>  $\alpha$ -helix (46). The available 3D structures of both monomer and dimer forms of PrP were analyzed in order to find possible causes of sheep prion dimerization upon *N*-homocysteinylation. It is readily seen that all of the lysyl residues are exposed to the solution and thus available for modification. We have also

found 2 lysyl residues that apparently contribute to the stability of the native form of prion protein *via* salt bridges. Namely, lysine 207 interacts with glutamate 149 improving the spatial stability of the 3<sup>rd</sup> spiral; lysine 197 also takes part in stabilizing the native form of the prion protein *via* interaction with glutamate 199 (Fig. 9), thus fixating the coil conformation. Conformational changes are inevitable during the transition from native to dimeric forms of protein. Additionally, both K197 and K207 obviously contribute more to stabilizing the monomeric form of the PrP and thus cannot be considered as essential to the dimer stability. Summarizing all of the above with experimentally confirmed modification of K197 and K207 residues, one can conclude that *N*-homocysteinylation can enable the PrP to enter a

pathogenic pathway by disabling one or more of the electrostatic interactions essential for maintaining the monomeric structure.

A note should be made that not every solvent-exposed lysyl residue undergoes homocysteinylation thus pointing towards specificity of this process. This data correlates well with the observation that only 4 of 60 lysyl residues are modified upon homocysteinylation of BSA (45).

In conclusion, our data show that PrP is susceptible to *N*-homocysteinylation of  $\epsilon$ -amino groups of lysyl residues with Hcy-thiolactone, which leads to aggregation. The aggregates exhibit structural changes similar to those observed for amyloidogenic forms of PrP.

## REFERENCES

1. Lauren, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W., and Strittmatter, S. M. (2009) *Nature* 457, 1128-1132
2. Cisse, M., and Mucke, L. (2009) *Nature* 457, 1090-1091
3. Balducci, C., Beeg, M., Stravalaci, M., Bastone, A., Sclip, A., Biasini, E., Tapella, L., Colombo, L., Manzoni, C., Borsello, T., Chiesa, R., Gobbi, M., Salmona, M., and Forloni, G. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2295-2300
4. Prusiner, S. B. (1991) *Science* 252, 1515-1522
5. Rezaei, H., Eghiaian, F., Perez, J., Doublet, B., Choiset, Y., Haertlé, T., and Grosclaude, J. (2005) *J Mol Biol* 347, 665-679
6. Rachidi, W., Mange, A., Senator, A., Guiraud, P., Riondel, J., Benboubetra, M., Favier, A., and Lehmann, S. (2003) *J Biol Chem* 278, 14595-14598
7. Tsirolnikov, K., Rezaei, H., Dalgalarondo, M., Chobert, J. M., Grosclaude, J., and Haertlé, T. (2006) *Biochim Biophys Acta* 1764, 1218-1226
8. Tsirolnikov, K., Shchutskaya, Y., Muronetz, V., Chobert, J. M., and Haertlé, T. (2009) *Biochim Biophys Acta* 1794, 506-511
9. Seshadri, S. (2006) *J Alzheimers Dis* 9, 393-398
10. Suszynska, J., Tisonczyk, J., Lee, H. G., Smith, M. A., and Jakubowski, H. (2009) *J Alzheimers Dis*
11. Jakubowski, H. (1997) *J Biol Chem* 272, 1935-1942
12. Jakubowski, H. (1999) *FASEB J* 13, 2277-2283
13. Jakubowski, H., and Fersht, A. R. (1981) *Nucleic Acids Res* 9, 3105-3117
14. Chwatko, G., Boers, G. H., Strauss, K. A., Shih, D. M., and Jakubowski, H. (2007) *FASEB J* 21, 1707-1713
15. Jakubowski, H. (2000) *J Nutr* 130, 377S-381S
16. Jakubowski, H., and Goldman, E. (1993) *FEBS Lett* 317, 237-240
17. Jakubowski, H. (2001) *J Nutr* 131, 2983S-2987S
18. Jakubowski, H. (2004) *Cell Mol Life Sci* 61, 470-487
19. Jakubowski, H. (2006) *Chemistry* 12, 8039-8043
20. Jakubowski, H. (2001) *Biomed Pharmacother* 55, 443-447
21. Lentz, S. R., and Haynes, W. G. (2004) *Cleve Clin J Med* 71, 729-734
22. Lawrence de Koning, A. B., Werstuck, G. H., Zhou, J., and Austin, R. C. (2003) *Clin Biochem* 36, 431-441
23. Spence, J. D., Bang, H., Chambless, L. E., and Stampfer, M. J. (2005) *Stroke* 36, 2404-2409
24. Dodds, L., Fell, D. B., Dooley, K. C., Armson, B. A., Allen, A. C., Nassar, B. A., Perkins, S., and Joseph, K. S. (2008) *Clin Chem* 54, 326-334
25. Obeid, R., and Herrmann, W. (2006) *FEBS Lett* 580, 2994-3005
26. Mattson, M. P., and Shea, T. B. (2003) *Trends Neurosci* 26, 137-146
27. Gottfries, C. G., Lehmann, W., and Regland, B. (1998) *J Neural Transm* 105, 773-786
28. Boldyrev, A. A., and Johnson, P. (2007) *J Alzheimers Dis* 11, 219-228
29. Jakubowski, H., Boers, G. H., and Strauss, K. A. (2008) *FASEB J* 22, 4071-4076
30. Jakubowski, H. (2006) *J Nutr* 136, 1741S-1749S
31. Kamath, A. F., Chauhan, A. K., Kisucka, J., Dole, V. S., Loscalzo, J., Handy, D. E., and Wagner, D. D. (2006) *Blood* 107, 591-593
32. Scopes, R. K., and Stoter, A. (1982) *Methods Enzymol* 90 Pt E, 479-490
33. Rezaei, H., Marc, D., Choiset, Y., Takahashi, M., Hui Bon Hoa, G., Haertlé, T., Grosclaude, J., and Debey, P. (2000) *Eur J Biochem* 267, 2833-2839
34. Nilsson, M. R. (2004) *Methods* 34, 151-160
35. Rezaei, H., Choiset, Y., Eghiaian, F., Treguer, E., Mentre, P., Debey, P., Grosclaude, J., and Haertlé, T. (2002) *J Mol Biol* 322, 799-814

36. *Jakubowski, H. (2007) Clin Chem Lab Med 45, 1704-1716*
37. *Jakubowski, H. (2008) Anal Biochem 380, 257-261*
38. *Jakubowski, H. (2002) J Biol Chem 277, 30425-30428*
39. *Perna, A. F., Satta, E., Acanfora, F., Lombardi, C., Ingrosso, D., and De Santo, N. G. (2006) Kidney Int 69, 869-876*
40. *Sauls, D. L., Lockhart, E., Warren, M. E., Lenkowski, A., Wilhelm, S. E., and Hoffman, M. (2006) Biochemistry 45, 2480-2487*
41. *Undas, A., Brozek, J., Jankowski, M., Siudak, Z., Szczeklik, A., and Jakubowski, H. (2006) Arterioscler Thromb Vasc Biol 26, 1397-1404*
42. *Undas, A., Jankowski, M., Twardowska, M., Padjas, A., Jakubowski, H., and Szczeklik, A. (2005) Thromb Haemost 93, 346-350*
43. *Undas, A., Perla, J., Lacinski, M., Trzeciak, W., Kazmierski, R., and Jakubowski, H. (2004) Stroke 35, 1299-1304*
44. *Jakubowski, H. (2005) Clin Chem Lab Med 43, 1011-1014*
45. *Paoli, P., Sbrana, F., Tiribilli, B., Caselli, A., Pantera, B., Cirri, P., De Donatis, A., Formigli, L., Nosi, D., Manao, G., Camici, G., and Ramponi, G. (2010) J Mol Biol*
46. *Knaus, K. J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W. K., and Yee, V. C. (2001) Nat Struct Biol 8, 770-774*

The abbreviations used are: PrP, prion protein; Hcy, homocysteine; PK, proteinase K; DLS, dynamic light scattering; IR, infrared spectroscopy; CD, circular dichroism.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** SDS-PAGE analyses of PrP and GAPD *N*-homocysteinylation with Hcy-thiolactone. Electrophoresis of unreduced samples was performed in 12% SDS-PAGE. A: *N*-Homocysteinylation by 100-fold excess (per lysine) of Hcy-thiolactone for 24 h, 1: native PrP, 2: supernatant after modification, 3: pellet after modification, 4: pellet after modification, reduced by beta-mercaptoethanol, B: *N*-Homocysteinylation of PrP with "physiological" concentrations of Hcy-thiolactone during 1 month, 1: control PrP, 2: pellet after modification, 3: supernatant after modification. C: *N*-Homocysteinylation by 100-fold excess (per lysine) of Hcy-thiolactone for 24 h, 1: native GAPD, 2: supernatant after modification, 3: pellet after modification.

**Figure 2.** Ovine prion sequence analysis (Database Swiss Prot, № P23907) [[www.expasy.org](http://www.expasy.org)] is performed using peptides obtained from MALDI-TOF analysis. The full-length amino acid sequence is showed from 23 to 234 a.a. (without N-terminal signal peptide and C-terminal peptide). All possible sites of trypsinolysis are showed with arrows. Lysyl residues are labeled with grey color. Underlined peptides (3 short: LCK (23-25), K (26), TNMK (110-113) and one long peptide sequences YPPQGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQGGSHSQWNKPSKPK (58 residues from 52 to 109)) are inaccessible for analysis because of restrictions of the method. Modified Lys<sub>197</sub> and Lys<sub>207</sub> are encircled.

**Figure 3.** Hydrodynamic diameter of protein particles with and without addition of Hcy-thiolactone: A – proteins (diamonds - PrP, circles – GAPD) with (full) or without (empty) 100-fold excess of Hcy-thiolactone, B – proteins (diamonds - PrP, circles – GAPD) with (full) 10-fold excess of Hcy-thiolactone.

**Figure 4.** Normalized transmission IR-spectra (top) and their second derivatives (bottom) in the amide I range of native PrP (thick line) and *N*-Hcy-PrP (thin line). From the left to the right dotted lines correspond to the position of bands associated to  $\beta$ -sheets ( $\beta$ ),  $\alpha$ -helices ( $\alpha$ ), random coils (r) and anti-parallel intermolecular  $\beta$ -sheets ( $\beta$ ).

**Figure 5.** Fluorescence emission spectra of thioflavin T in the presence of *N*-Hcy-PrP. Fluorescent spectra of native (dotted line), *N*-homocysteinylation with 10-fold excess ("native") of Hcy-thiolactone (dashed line), 100-fold excess of Hcy-thiolactone (solid line) and heat-aggregated PrP (dot-dashed line).

**Figure 6.** Susceptibility of *N*-Hcy-PrP, native heat-aggregated, and native untreated PrP to proteinase K digestion. Conditions of proteolytic reactions are described in Materials and Methods section. Electrophoresis of unreduced samples was performed on 12% SDS-PAGE.

**Figure 7.** Epifluorescence microscopy of *N*-Hcy-PrP in the presence of thioflavin T after 24 h (A), 48 h (B) or 72 h (C) of reaction with Hcy-thiolactone at 37°C. ThT fluorescence images are shown in the upper, phase contrast images shown in the lower.

**Figure 8.** Transmission electron microscopy of *N*-Hcy-PrP after 24 h of reaction with 50-fold excess of Hcy-thiolactone at 37°C.

**Figure 9.** Structure of the C-terminal part of monomeric PrP. Salt bridges formed by lysines and glutamates, namely K197 and E199 (A) and K207 and E149 (B) are shown in licorice.

**Table 1**

Prion modification analysis performed using peptides obtained from MALDI-TOF analysis. (Database Swiss Prot, № P23907) [[www.expasy.org](http://www.expasy.org)]. #MC - number of miscleaved sites, lysines are shown in bold and underlined, cysteines are shown in bold and italic.

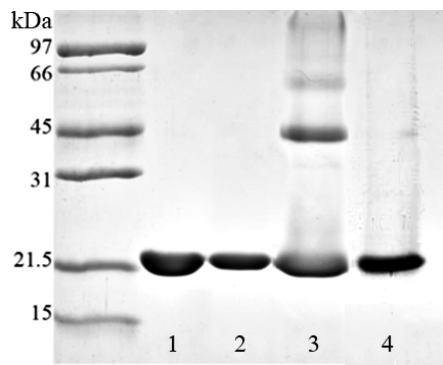
position	#MC	peptide sequence	peptide mass	in control sample	in N-Hcy-PrP sample	modified peptide mass (+117)	in N-Hcy-PrP sample	modified and alkylated peptide mass (+117+57)	in N-Hcy-PrP sample
27-40	0	RP <b><u>K</u></b> PGGGWNTGGSR	1426.73	+	+	1543.91	-	1600.93	-
26-40	1	<b><u>K</u></b> RP <b><u>K</u></b> PGGGWNTGGSR	1554.82	+	+	1672.00	-	1729.02	-
27-51	1	RP <b><u>K</u></b> PGGGWNTGGSRYPGQGSPPGGR	2497.22	-	-	2614.40	-	2671.42	-
26-51	2	<b><u>K</u></b> RP <b><u>K</u></b> PGGGWNTGGSRYPGQGSPPGGR	2625.31	-	-	2742.49	-	2799.51	-
172-188	0	YSNQNNFVHD <b><u>C</u></b> VNITV <b><u>K</u></b> *	2051.96	-	-	2169.14	-	2226.16	-
172-197	1	YSNQNNFVHD <b><u>C</u></b> VNITV <b><u>K</u></b> QHTVTTTT <b><u>K</u></b> *	3049.48	N/A	N/A	3166.66	N/A	3223.68	N/A
189-197	0	QHTVTTTT <b><u>K</u></b>	1016.54	+	+	1133.72	+	1190.74	-
189-207	1	QHTVTTTT <b><u>K</u></b> GENFTETDI <b><u>K</u></b>	2151.06	+	+	2268.24	-	2325.26	+
198-207	0	GENFTETDI <b><u>K</u></b>	1153.54	+	+	1270.72	+	1327.74	+
198-211	1	GENFTETDI <b><u>K</u></b> IMER	1682.81	+	+	1799.99	-	1857.01	+
189-211	2	QHTVTTTT <b><u>K</u></b> GENFTETDI <b><u>K</u></b> IMER**	2680.32	+	+	2797.50	+	2854.52	+

\* Peptide mass was calculated given the alkylation of cysteyl residues

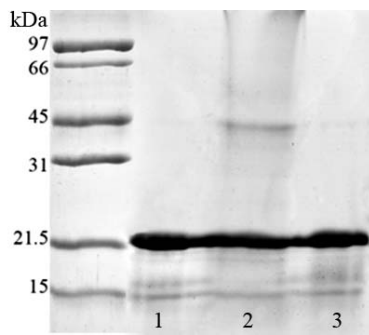
\*\* Presence of peptides with two homocysteinylation and alkylated residues cannot be determined for their mass exceeds 3000 Da.

**Figure 1**

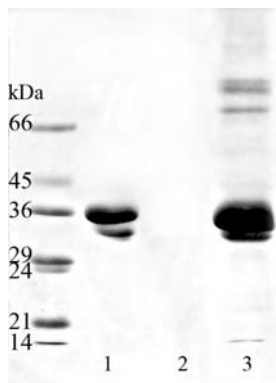
**A**



**B**



**C**



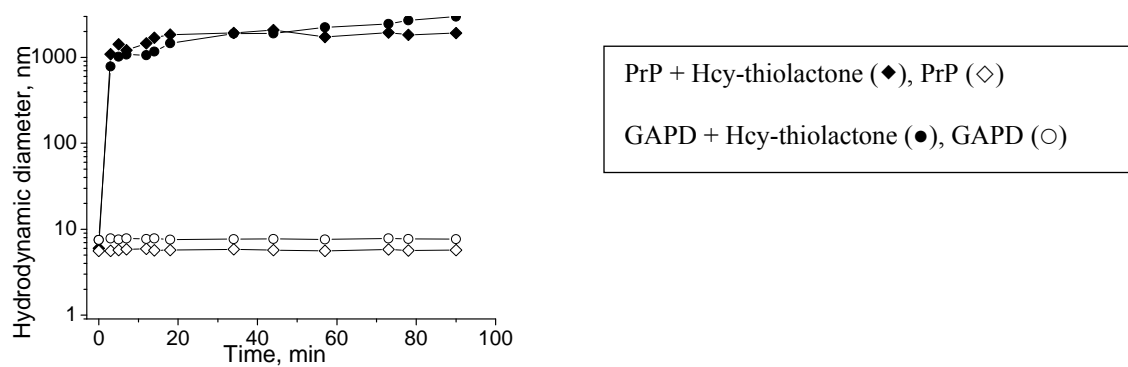
**Figure 2**

23	<p> <u>LCK</u>↓<u>RPK</u>↓PGGGWNTGGS↓RY↓PGQGS↓PGGN↓RY↓PPQGGGGWGQ↓PHGGGWGQ↓                 </p>	70
	<p>                 PHGGGWGQ↓PHGGGWGQ↓PHGGGGWGQGGSHS↓QWNKPSKPKT↓                 </p>	110
	<p> <u>NMK</u>↓HVAGAAAAGAVVGGGLGGYMLGSVMSRPLIHFGNDYED                 </p>	150
	<p>                 ↓RYYRENMYQYPNQVYYRPVDRY↓SNQNNFVHDCVNI↓TVKQH↓                 </p>	190
	<p>                 TVTTTT↓G↓GENFTETD↓I↓R↓IMER↓V↓VE↓QMCITQYQRESQAYYQ↓RGAS↓                 </p>	234



**Figure 3**

A



B

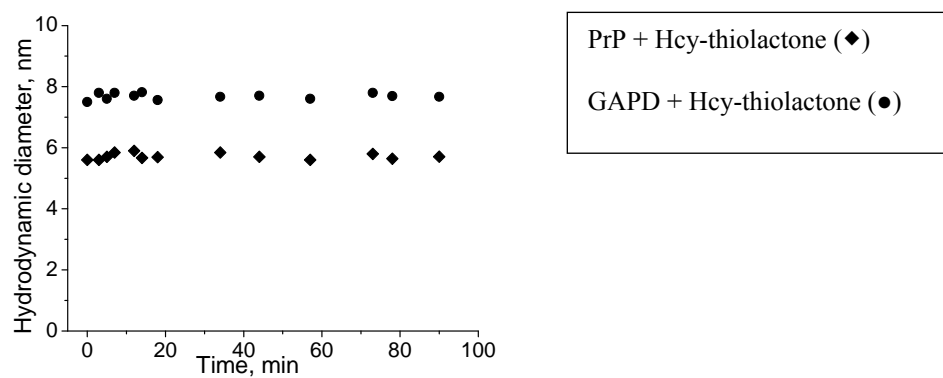
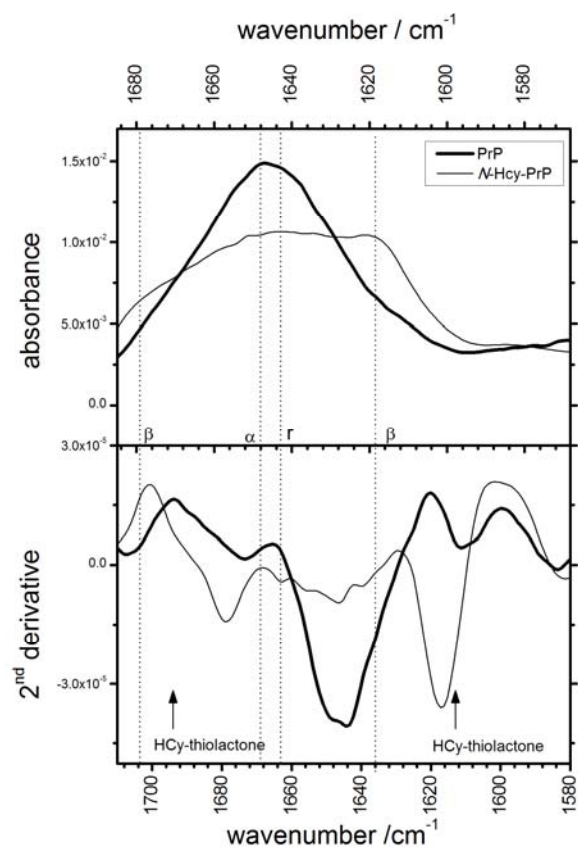
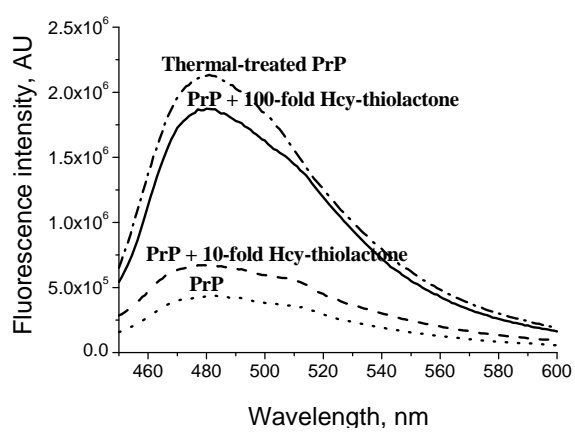


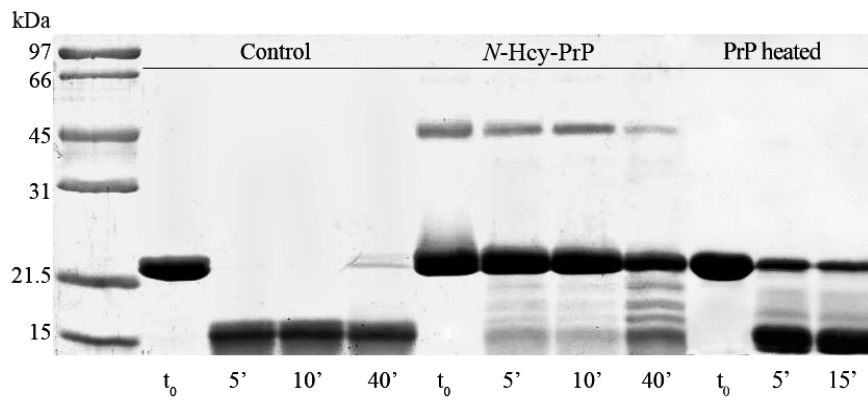
Figure 4



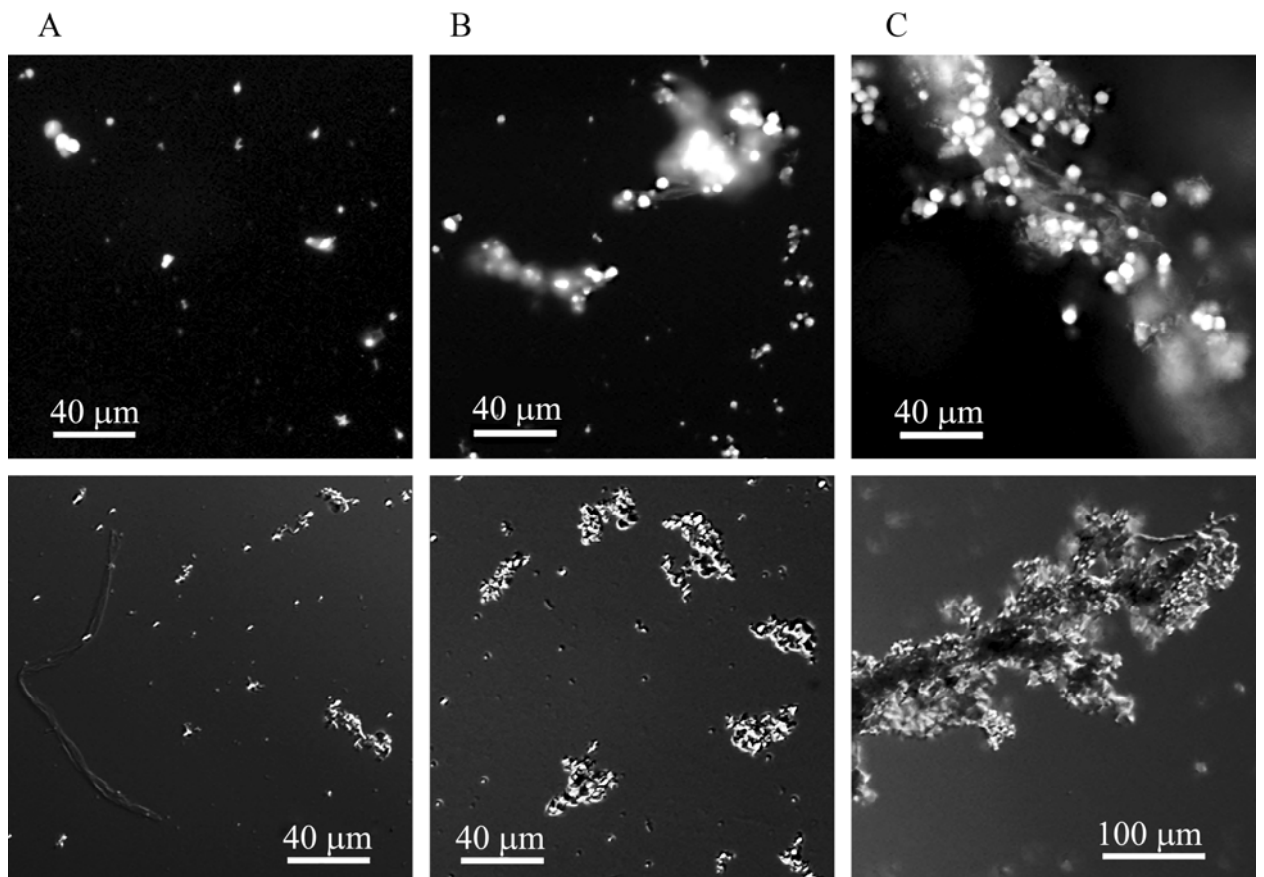
**Figure 5**



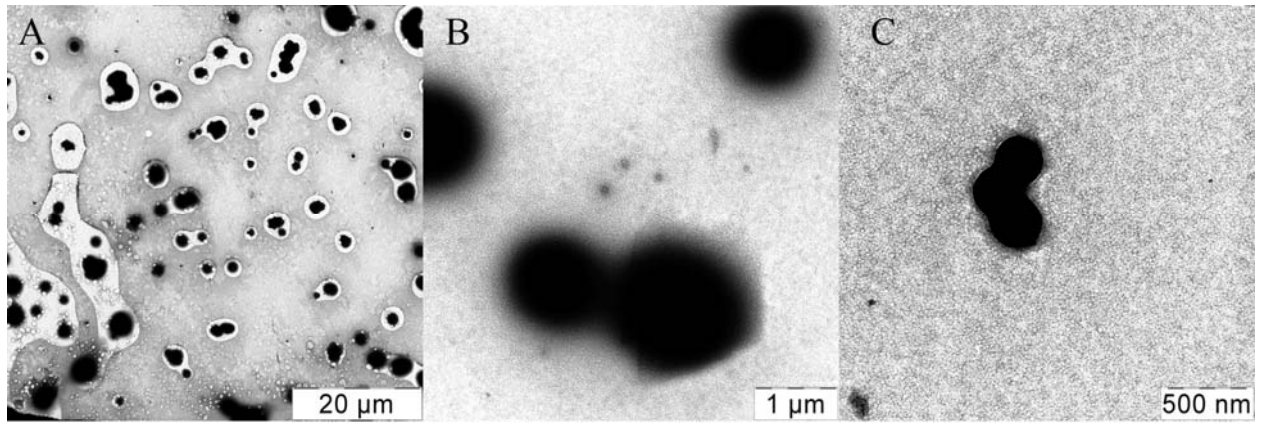
**Figure 6**



**Figure 7**

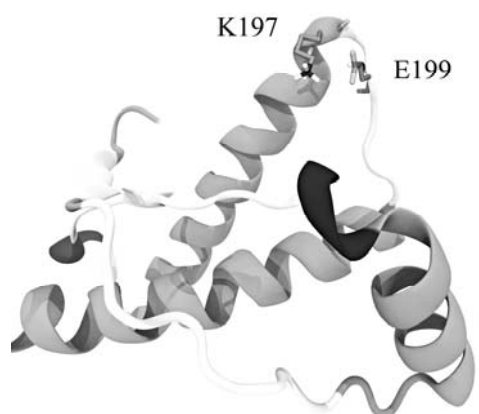


**Figure 8**

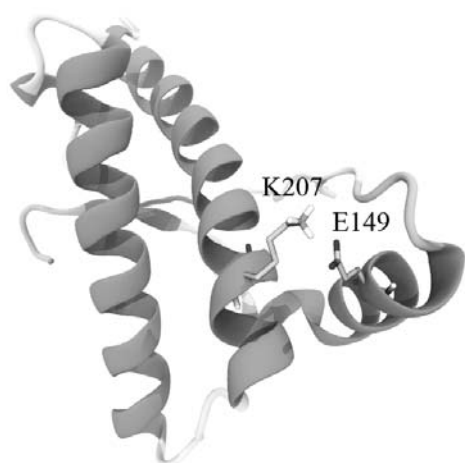


**Figure 9**

A



B



# Chaperone-Like Activities of Different Molecular Forms of $\beta$ -casein. Importance of Polarity of N-Terminal Hydrophilic Domain

Reza Yousefi,<sup>1,2</sup> Yulia Y. Shchutskaya,<sup>1,3</sup> Jaroslaw Zimny,<sup>1,4</sup> Jean-Charles Gaudin,<sup>1</sup> Ali A. Moosavi-Movahedi,<sup>2</sup> Vladimir I. Muronetz,<sup>3</sup> Yuriy F. Zuev,<sup>5</sup> Jean-Marc Chobert,<sup>1</sup> Thomas Haertlé<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UR 1268 Biopolymères Interactions Assemblages, INRA, équipe Fonctions et Interactions des Protéines Laitières, B.P. 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France

<sup>2</sup> Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, P.O. Box: 13145-1384, Enghelab Ave., Tehran, Iran

<sup>3</sup> Laboratory of Animal Cell Biochemistry, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Lenin's Hills, 119992 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Department of Biochemistry and Biotechnology, Agricultural University, 60637 Poznan, Poland

<sup>5</sup> Laboratory of Biophysical Chemistry of Nanosystems (LBCN), Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences, Wolynska 35, P.B. 30, Kazan 420111, Russia

Received 29 December 2008; revised 13 March 2009; accepted 13 March 2009

Published online 25 March 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/bip.21190

## ABSTRACT:

As a member of intrinsically unstructured protein family,  $\beta$ -casein ( $\beta$ -CN) contains relatively high amount of prolyl residues, adopts noncompact and flexible structure and exhibits chaperone-like activity *in vitro*. Like many chaperones, native  $\beta$ -CN does not contain cysteinyl residues and exhibits strong tendencies for self-association. The chaperone-like activities of three recombinant  $\beta$ -CNs wild type (WT)  $\beta$ -CN, C4  $\beta$ -CN (with cysteinyl residue in position 4) and C208  $\beta$ -CN (with cysteinyl residue in position 208), expressed and purified from *E. coli*, which, consequently, lack the phosphorylated residues, were examined and compared with that of native  $\beta$ -CN using insulin and alcohol dehydrogenase as target/substrate proteins. The dimers ( $\beta$ -CND) of C4- $\beta$ -CN and C208  $\beta$ -CN were also studied and their chaperone-like activities were compared with those of their monomeric forms.

Lacking phosphorylation, WT  $\beta$ -CN, C208  $\beta$ -CN, C4  $\beta$ -CN and C4  $\beta$ -CND exhibited significantly lower chaperone-like activities than native  $\beta$ -CN. Dimerization of C208  $\beta$ -CN with two distal hydrophilic domains considerably improved its chaperone-like activity in comparison with its monomeric form. The obtained results demonstrate the significant role played by the polar contributions of phosphorylated residues and N-terminal hydrophilic domain as important functional elements in enhancing the chaperone-like activity of native  $\beta$ -CN.

© 2009 Wiley Periodicals, Inc. *Biopolymers* 91: 623–632, 2009.

**Keywords:** chaperone-like activity; aggregation; alcohol dehydrogenase (ADH); insulin

This article was originally published online as an accepted preprint. The "Published Online" date corresponds to the preprint version. You can request a copy of the preprint by emailing the *Biopolymers* editorial office at [biopolymers@wiley.com](mailto:biopolymers@wiley.com)

## INTRODUCTION

**N**ative bovine  $\beta$ -casein ( $\beta$ -CN) molecule is a single chain protein of known sequence containing five phosphoserine residues. Its molecular mass is 23.98 kDa.<sup>1</sup> Recombinant  $\beta$ -CN expressed and purified from *E. coli*, lacks the phosphorylated resi-

Correspondence to: T. Haertlé; e-mail: [haertle@nantes.inra.fr](mailto:haertle@nantes.inra.fr)

Contract grant sponsor: Conseil Régional des Pays de la Loire and of Service de Coopération et d'Action Culturelle of French Ministry of Foreign Affairs in Warsaw, Moscow and Tehran (Partenariat Hubert Curien Gundishapur)

Contract grant number: 18647RM

© 2009 Wiley Periodicals, Inc.



dues because the host does not realize post-translational phosphorylation.<sup>2</sup> In this aspect it reminds one of the forms of human  $\beta$ -CN differing from bovine  $\beta$ -CN by its heterogeneous phosphorylation from zero ( $\beta$ -CN-0P) to five ( $\beta$ -CN-5P) phosphates per casein molecule.<sup>3</sup>

$\beta$ -CN contains a short N-terminal hydrophilic polar domain, carrying most of the protein's net charges (mostly negative) and a prominent C-terminal hydrophobic domain. Thus, the primary structure of  $\beta$ -CN has a highly amphiphilic character.<sup>4</sup> This is playing a crucial function in aggregation and micellisation processes of this casein.<sup>5</sup> Due to combination of flexibility and amphipaticity,  $\beta$ -CN acts also as a surfactant molecule in solution.<sup>6</sup> Hence, this protein as a natural detergent and good emulsifier is suitable for use in a variety of food products<sup>6</sup> and may play also protective roles in milk and in mammary gland.

Polypeptide chains of beta and alpha  $s_1$  casein molecules are very mobile in solution and are neither random coil structures nor regularly folded globular proteins. Under physiological conditions, similarly to many other unfolded or poorly folded proteins, caseins are classified in the groups Natively Unfolded (NU)<sup>7</sup> or Intrinsically Unstructured Proteins (IUP),<sup>8</sup> which are known for their non compact and highly flexible structure, as well as for transient or permanent binding to several different (mostly hydrophobic) partners.<sup>7</sup> Recently, it has been recognized that some IUPs also display chaperone activity probably by a more primitive mechanism than well-defined energy-dependent protein chaperones.<sup>9</sup>

As many other members of NU protein class,  $\beta$ -CN contains relatively important amounts of glutamine and proline (15% instead of statistic  $1/20 = 5\%$ ).<sup>7</sup> These differences partially explain the lack of rigid (alpha and beta) structures in  $\beta$ -CN in aqueous solutions.<sup>10</sup> In contrast to a uniform distribution of prolyl residues observed throughout the chain of  $\alpha_{s1}$ -CN, the prolyl residues are concentrated primarily in the hydrophobic C-terminal portion of  $\beta$ -CN, which is particularly rich in Pro-Pro or Pro-X-Pro sequences.<sup>11</sup> It was proposed that  $\beta$ -CN is a rheomorphic (from the Greek rheos—stream and morph—form) protein because it is dynamic and its conformation is flexible adapting to the media.<sup>12</sup> Consequently,  $\beta$ -CN structure cannot be defined as either a globular or a random coil structure. More recent studies have also suggested existence of persistent regular structures in segments of  $\beta$ -CN molecule.<sup>1</sup> As predicted by secondary structure algorithms, N- and C-termini of  $\beta$ -CN have propensities to adopt alpha helical and  $\beta$ -structure, respectively.<sup>11</sup> It has been observed that heating can increase structuring of  $\beta$ -CN.<sup>13</sup>

Recently, a novel function for caseins has been proposed as “molecular chaperones” protecting many proteins including whey proteins against heat, chemical and UV light-induced aggregations.<sup>14,15</sup> Despite lack of sequence similarity

between caseins and small heat shock proteins (sHsps) or clusterins, these proteins share many structural similarities.<sup>16</sup> As molecular chaperones, caseins have been shown to act in a manner very similar to intracellular sHsps and the extra cellular protein clusterin.<sup>17</sup> They have distinct hydrophilic and hydrophobic domains enhancing solubility in aqueous media and allowing binding lipophilic molecules, respectively.<sup>18</sup> Many chaperones are dynamic and heterogeneous proteins with extensive regions of little or unordered structures often self-associating in micelle-like aggregates.<sup>19</sup> sHsps have subunit masses in the range of 16–43 kDa but mostly exist as large heterogeneous aggregates of 300–1000 kDa. Clusterin is expressed as a 75–80 kDa hetero dimeric protein, which later exists in a high range of aggregate states.<sup>20</sup>

The dynamics of association and dissociation of subunits between monomer and aggregate states is considered to be important for control of chaperone action of sHsps and clusterin.<sup>21</sup> The dissociated form (monomer state) of these proteins has been suggested to be the main chaperone active species rather than their aggregate states. The subunit exchange is likely to be also important in regulating chaperone action.<sup>22</sup> The individual caseins also have strong tendencies for self-association.<sup>23,24</sup>

The distinct amphiphilic character of  $\beta$ -CN causes this protein to associate into soap-like micellar structures in a reversible manner.<sup>25</sup> Similarly to sHsps and clusterin, the dynamics of association and dissociation of  $\beta$ -CN between monomeric and micellar states, which is affected by physicochemical condition, may influence the chaperone-like functions of caseins. The dynamics of micellar structures of caseins may facilitate chaperone-like actions via this mechanism and subunit exchange between caseins and substrate proteins may regulate their chaperone-like action.

In absence of intrinsic phosphorylated residues, amphiphilic character of  $\beta$ -CN, and consequently its solubilizing properties and antiaggregation (chaperone-like) activity of this casein will be changed. In this study, chaperone-like activities of native  $\beta$ -CN and of three recombinant  $\beta$ -CNs (WT  $\beta$ -CN, C4  $\beta$ -CN, and 208  $\beta$ -CN) were examined using bovine pancreatic insulin and alcohol dehydrogenase (ADH) as the target proteins. To mimic Gemini (Bis) surfactants, which have considerably greater solubilizing capabilities than conventional surfactants<sup>26,27</sup> and to find out the importance of N-terminal and/or C-terminal domains as possible functional elements in chaperoning activities of  $\beta$ -CN, two recombinant  $\beta$ -CNs (C4  $\beta$ -CN and C208  $\beta$ -CN) were first covalently dimerized individually. Then their chaperone-like activities were examined in the same experimental set up. The recombinant  $\beta$ -CNs in monomeric form and also C4  $\beta$ -CND (dimer with two distal hydrophobic domains), exhibit

**Table I** Sequence of the Used Primers

Primer name	Sequence (5' → 3')	Mutation
BCAS01	ACATGCC <u>ATG</u> GGA AGA GAG CTG GAA GAA CTC	
BCAS14	GATATACC <u>ATG</u> GGA AGA GAG CTG <b>TGT</b> GAA CTC AAT	E <sub>4</sub> → C
BCAS5C3	NNNNNNAAGC <u>TTA</u> GAC AAT AAT AGG GAA GGG	
BCAS3C-Rev	NNNNNNAAGC <u>TTA</u> GAC <b>ACA</b> AAT AGG GAA GGG	I <sub>208</sub> → C

Start (ATG) and stop (TTA) translation codons are underlined.  
Mutated codons are indicated in bold italicized letters.

only relatively weak chaperone-like activities when compared with chaperone-like activity of native  $\beta$ -CN. Surprisingly, a significant chaperone-like activity was observed in case of C208  $\beta$ -CND, which possesses two distal hydrophilic domains.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Crystallized and lyophilized equine liver ADH and bovine pancreatic insulin were purchased from Sigma Aldrich. Dithiothreitol (DTT) and other chemicals were of analytical grade (Sigma Aldrich) and were used without further purification. All solutions were prepared with double distilled water and were kept at 4°C before use.

### Purification of Native Bovine $\beta$ -CN

Purification of bovine  $\beta$ -CN was performed according to a two-step purification procedure.<sup>28,29</sup> Briefly, fresh bovine and camel milks were defatted by centrifugation (5000g, 7720 rpm, 15 min) and casein fraction was precipitated at pH 4.6. Casein enriched pellet was isolated by centrifugation (5860g, 8400 rpm, 60 min), washed three times with distilled water, lyophilized, and stored at -20°C until use. One gram of lyophilized powder of whole casein fraction (WCF) was dispersed in 60 mL of 20 mM sodium acetate buffer, pH 6.6, containing 4M urea, 35 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 1 mM PMSF. After centrifugation at 45,000g for 20 min, the supernatant was mixed with DEAE-cellulose (10 g of pre-equilibrated DEAE-cellulose already dispersed in 50 mL of the same buffer) for 30 min on a shaker at 4°C. A mixture containing DEAE and WCF was applied to a chromatography column and flow through (FT) was collected in two equal parts (FT1 and FT2). The column was washed twice with 40 mL of the same buffer and the eluted fractions were collected as W1 and W2. The results of SDS-PAGE (15% acrylamide gel)<sup>30</sup> showed that fractions FT1, FT2, and W1 contained mostly  $\beta$ -CN. These fractions were dialyzed twice against 2 L of imidazole buffer, pH 7.3, containing 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 0.01% sodium azide. Protein sample was dialyzed further against 1 L of the above buffer containing 4M urea and then loaded on anion-exchange column (DEAE-cellulose) pre-equilibrated with imidazole buffer, pH 7.3, containing 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 4M urea. Retained proteins were eluted by application of a linear NaCl gradient of 0–0.25M in the same buffer. The eluted fractions were analyzed using SDS-PAGE (15% acrylamide gel) and the fractions containing pure  $\beta$ -CN were collected and dialyzed against 50 mM phos-

phate buffer, pH 7.5, before use. Protein bands were detected on SDS PAGE by Coomassie blue staining.

### Mutagenesis of Bovine $\beta$ -CN

The expression vector pET21-BCasA<sub>2</sub>, a kind gift of Dr. Roger Clegg (Hannah Research Institute, Ayr, UK), encoding WT  $\beta$ -CN (A2 variant) was used as template in a PCR-based mutagenesis strategy. Mutated  $\beta$ -CN cDNAs were synthesized by PCR using primer described in Table I. BCAS01 and BCAS14 contained *Nco*I restriction upstream from the translation start ATG codon, and BCAS5C3 and BCAS3C-Rev contained *Hind*III restriction site downstream from the translation stop TAA codon. BCAS01 was used in combination with BCAS3C-Rev to mutate the isoleucyl residue at position 208 in a cysteinyl residue; BCAS14 was used in combination with BCAS5C3 to introduce a cysteinyl residue at position 4 in replacement of the glutamic acid residue. Amplification was performed in a Touchgene gradient thermocycler (Techne, Princeton, NJ), using a mix of 4 ng of DNA, 25 pmol of each dNTPs, 37 pmol of both primers (Cybergene, Evry, France), the buffer supplied with the DNA polymerase and 1 U *pfu* Turbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) in a total volume of 50  $\mu$ L. The program cycling conditions were as follows: 20 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C, and 2 min at 72°C. PCR fragments were subcloned in the pGEM(-T Easy vector (Promega, Madison, WI) and sequenced (Millegen, Toulouse, France). The plasmids containing the correctly mutated cDNAs were amplified. These cDNAs encoding mutated  $\beta$ -CN were introduced in the pET21-d expression vector (Novagen, EMD Biosciences, San Diego, CA) by using *Nco*I and *Hind*III restriction sites to give p $\beta$ CN-C4 and p $\beta$ CN-C208 expression vectors. Restriction enzymes were purchased from New England Biolabs (Beverly, MA).

### Expression of the Recombinant $\beta$ -CNs in *E. coli*

The recombinant  $\beta$ -CNs were produced in a 2 L Bioreactor. Twenty milliliter of an overnight pre culture was used to inoculate the 2 L of Terrific Broth medium. The culture was performed at 37°C with air flow-rate of 4 L/min and a stirring speed of 600 rpm  $\beta$ -CN expression was induced at 0.6 A<sub>600</sub> by adding isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside to 1 mM. After 3 h of cultivation, the cells were harvested by centrifugation at 3000g for 30 min and washed in phosphate buffered saline. The resulting pellets were kept at -80°C at least overnight.

### Purification of Recombinant $\beta$ -CNs

The purification of the recombinant  $\beta$ -CNs (WT, C4 and C208) was performed as follows. The bacterial pellet from a 2 L culture was thawed at ambient temperature in 20 mL of lysis buffer (8M urea,

50 mM Tris-HCl, and 0.5M NaCl). Sample was sonicated three times during 30 s with an ultra sonicator at full power (130 W). The sonicated sample was then centrifuged at 22,000g for 30 min. The supernatant was applied to a reversed phase (RP) chromatography on a HR16/10 column containing 30 RPC gel. The column was equilibrated with solvent A [95% H<sub>2</sub>O, 5% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid (trifluoroacetic acid (TFA))]. Proteins were eluted with a linear gradient of solvent B (20% H<sub>2</sub>O, 80% acetonitrile and 0.08% TFA). The semipurified protein was then further purified by anion-exchange chromatography. The separation was performed on 15 Q gel packed in a HR 10/10 column in a 25 mM Tris-HCl buffer, 4M urea with an increasing concentration of NaCl (from 0 to 1M). The recombinant  $\beta$ -CNs were then further purified and desalted by final RP chromatography on a HR 10/10 column with 15 RPC gel. The purity of the  $\beta$ -CN samples was examined using SDS-PAGE analysis (12% acrylamide).

### The Oxidation/Dimerization

The dimerization experiments of 20  $\mu$ M of each mutant casein (C4  $\beta$ -CN and C208  $\beta$ -CN) were performed in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.2, including 80 mM NaCl and 60  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> under sterile conditions and with agitation at 37°C. The experiments were followed for 24 and 72 h for C208  $\beta$ -CN and C4  $\beta$ -CN, respectively.

### Quantification of Chaperone-Like Activities of Different $\beta$ -CNs

The ability of different  $\beta$ -CNs to prevent aggregation of ADH and insulin was considered as a sign of their chaperone-like activities. The aggregation was detected by the measure of increase in absorbency at 360 nm as a function of time, using an UV-Cary (Varian, Model 1E) spectrophotometer equipped with a 10-cell-holder and Le Pelletier temperature controller. The light scattering in each cuvette was recorded automatically every 1 min. All measurements were performed in 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2. For quantitative estimation of chaperone-like activities of different caseins,  $k_1 \cdot A_{lim}$  was derived from the aggregation curves, with the assumption that, as proposed by Kurganov,<sup>31</sup> aggregation follows completely first order kinetics.  $A_{lim}$  is the limiting value of absorbance (A) at  $t \rightarrow \infty$  and  $k_1$  is the rate constant of the first order reaction. The  $k_1 \cdot A_{lim}$  product is the initial rate of aggregation and it is expressed in units of absorbency per time unit. To quantify chaperone-like activities of the caseins at different molar ratios of chaperone/target protein,  $k_1 \cdot A_{lim}$  of each experiment was divided individually per  $(k_1 \cdot A_{lim})_0$  of the control experiment (absence of casein) and subtracted from unit (one). The resulting values varied from zero (in the absence of casein) to one (where  $k_1 \cdot A_{lim} = 0$ ). These values, increasing from 0 to 1 with the increase of chaperone/substrate casein ratio, can be correlated directly with the chaperone-like activities of the studied caseins.

In brief, the following formula was used for quantification of chaperone-like activities:

$$\text{Chaperone-like activity} = 1 - (k_1 \cdot A_{lim}) / (k_1 \cdot A_{lim})_0 \quad (1)$$

The percentage of chaperone-like activities was obtained by multiplying the obtained values by 100.

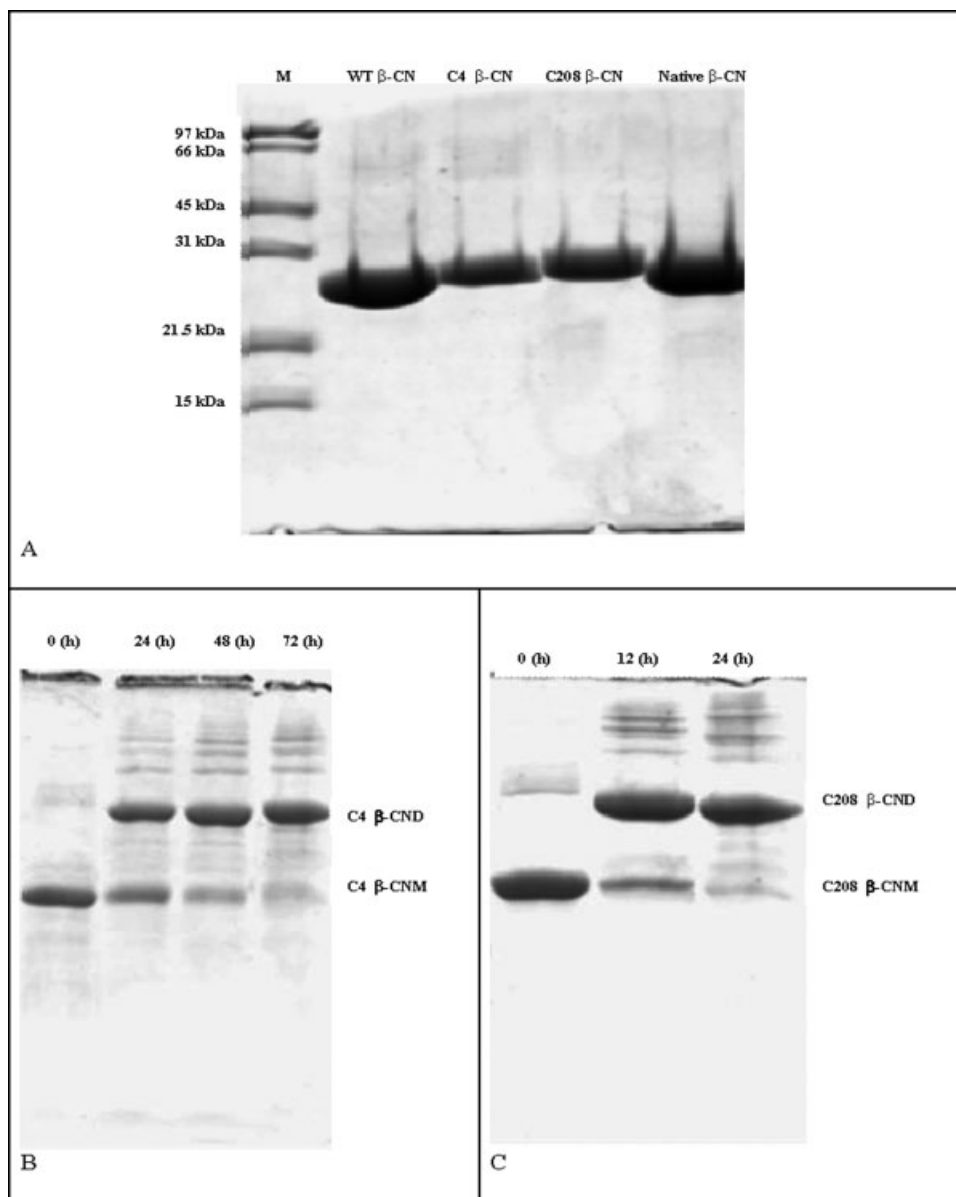
## RESULTS AND DISCUSSION

### Dimerization of C4 and C208 $\beta$ -CNs

Molecular chaperones interact preferentially with certain folding intermediates of substrate/target proteins. Their hydrophobic interactions play a crucial step in chaperoning function.<sup>32</sup> Since several chaperones are functioning through binding and the release of substrate proteins, consequently, faster binding and faster release may be linked with flexibilities and efficiencies of contacts and recognitions between hydrophobic domains of chaperones and target proteins. The C-terminus of  $\beta$ -CN contains many apolar residues (conveying high hydrophobicity) and considerable amount of prolyl residues (contributing to its flexibility and braking any alpha or beta structures).<sup>12,33</sup> Thus, not only the hydrophobicity of C-terminal but also the structural flexibility and the presence of polyproline II (PPII) structures in this region are responsible for the efficient chaperone-like activity of different forms of  $\beta$ -CN.<sup>33</sup>

C4  $\beta$ -CN and C208  $\beta$ -CN have been shown to dimerize.<sup>34</sup> The dimerizations of C4  $\beta$ -CN and C208  $\beta$ -CN were carried out in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.2, containing 80 mM NaCl and 60  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> under agitation and in sterile conditions at 37°C. At this pH thiol groups are adopting the conjugate base forms (R-S<sup>-</sup>) suitable for the oxidation.

SDS-PAGE of dimerized C208  $\beta$ -CN indicates much faster kinetics of its oxidation/dimerization compared with dimerization rate of C4  $\beta$ -CN (Figures 1B and 1C). Almost complete disappearance of monomeric form during 24 h for C208  $\beta$ -CN (Figure 1C) is connected with appearance of dimeric band of the comparable intensity. The use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leads to formation of small quantities of other polymeric forms due probably to unspecific oxidation of His and Trp residues. In case of C4  $\beta$ -CN it takes 72 h to obtain the same ratio dimer/monomer. This could be due first to greater mobility of C-terminal segment of  $\beta$ -CN, which leads to faster binding to aggregation prone conformers and might be important in antiaggregation activity of this protein. Besides flexibility of C-terminal domain of  $\beta$ -CN, the position of cysteinyl residue may play a role in the faster kinetics of dimerization. Since cysteinyl residue of C208  $\beta$ -CN is placed in the hydrophobic part of casein, hydrophobic-hydrophobic interactions of two C208  $\beta$ -CN molecules would bring their thiol into proximity and therefore facilitate disulfide bond formation. So, the differences in polarities of microenvironments of the cysteinyl residues in C4  $\beta$ -CN and C208  $\beta$ -CN may be additional factors responsible for the differences observed in kinetics of dimerization between the mutant caseins.



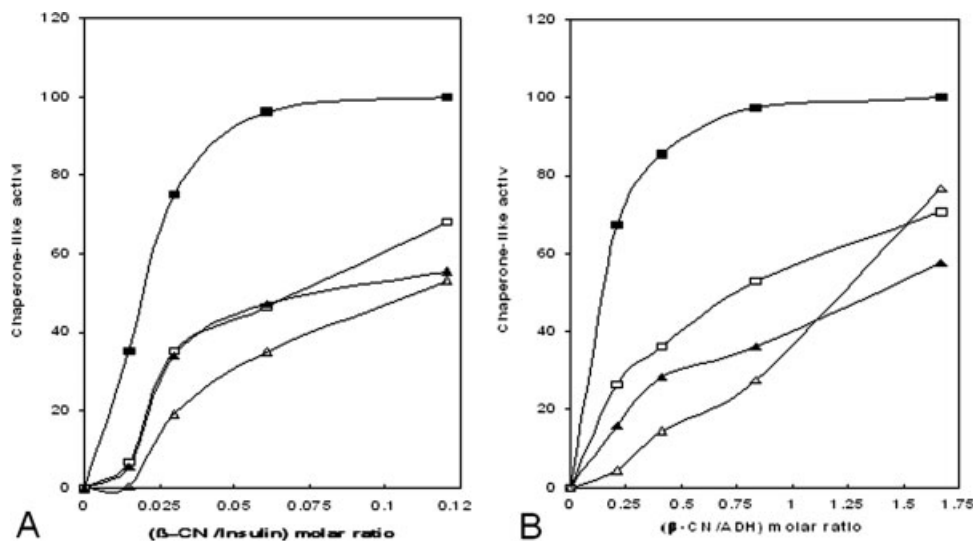
**FIGURE 1** SDS-PAGE profile of dimerization experiments of mutant  $\beta$ -casein. (A) SDS-PAGE profile (gel 12%) in reducing conditions, after purification of different  $\beta$ -CN samples. (B) and (C) nonreducing SDS-PAGE profiles of dimerization experiments of C4  $\beta$ -CN and C208  $\beta$ -CN, respectively, at different incubation times. The experimental conditions for dimerization of mutant  $\beta$ -CN are described in Materials and Methods. The  $\beta$ -CNM and  $\beta$ -CND represent monomeric and dimeric forms of mutant  $\beta$ -CN, respectively.

### Chaperone-Like Activities of Recombinant $\beta$ -CN

Aggregation can be considered to be a hydrophobically driven interaction of unfolded protein molecules, which is responsible for the formation of agglomerates of irregular form, resulting of incorrect protein-protein contacts.<sup>35</sup> Aggregations can be associated also with aberrant interactions with metal ions, changes in environmental conditions such as pH, temperature, chemical modification (oxidation

and proteolysis), specific mutations and misprocessing phenomena.<sup>36</sup> It has been reported that early aggregates interacting with cellular membranes, causing oxidative stress and increase in free calcium can impair fundamental cellular processes what can lead to the decrease of cellular viability and eventually to cell death.<sup>36</sup> Consequently, aggregations present serious problem and may be the causes of many so called aggregation diseases such as Alzheimer's, Parkinson's,





**FIGURE 2** Chaperone-like activities of native  $\beta$ CN and the monomeric form of mutant  $\beta$ CN. (A) Percentage of chaperone-like activity of  $\beta$ -CN versus different  $\beta$ -CN/insulin molar ratios. (B) Percentage of chaperone-like activities of  $\beta$ -CN versus different  $\beta$ -CN/ADH molar ratios. In (A) and (B) the symbols  $\blacksquare$ ,  $\square$ ,  $\blacktriangle$  and  $\triangle$  represent native  $\beta$ -CN, wild type  $\beta$ -CN, C4  $\beta$ -CN and C208  $\beta$ -CN, respectively. The percentage of chaperone-like activity was obtained according to the formula described in Materials and Methods.

and Huntington's, Creutzfeldt-Jakob disease, cataract and type II diabetes.<sup>36,37</sup> Therefore, chaperoning machinery is necessary to rescue living cells from toxicity of unfolded proteins and from harmfulness of their aggregates. Molecular chaperones are a large group of structurally unrelated proteins whose function is to interact with destabilized proteins preventing their aggregation and enabling their correct folding.<sup>38</sup> As mentioned before, several properties of caseins are similar to those of other chaperones in particular sHsps and clusterin.<sup>17</sup>

In this study, native bovine  $\beta$ -CN and three recombinant  $\beta$ -CN (WT  $\beta$ -CN, C4  $\beta$ -CN, C208  $\beta$ -CN)<sup>34</sup> were used for comparison of the dependence of chaperone-like activities. ADH (1.87  $\mu$ M) and insulin (43  $\mu$ M) were used as the target proteins and the experiments were performed in 25 mM phosphate buffer, pH 7.2. Aggregation of ADH and insulin was induced under thermal (60°C) and chemical (20 mM DTT) stresses, respectively. Different molar ratios of casein/insulin (0.00, 0.015, 0.030, 0.060, and 0.120) were applied to compare chaperone-like activities of native and mutant casein samples (Figure 2A). When using ADH as target, casein/ADH ratios were 0.00, 0.20, 0.41, 0.83, and 1.66 (Figure 2B). The increase in absorbance in all of the kinetic curves is connected with the growth of aggregates formed at the initial stage of aggregation. In this study it was supposed that aggregation rate constant ( $k_1$ ) follows a first order

kinetics and  $k_1$  was obtained from the initial stages of the kinetic curves.<sup>29</sup>

The antiaggregative (chaperone-like) activities of the  $\beta$ -CNs were quantified using parameter  $k_1 \cdot A_{lim}$  product. The  $k_1 \cdot A_{lim}$  product as proposed by Kurganov<sup>31</sup> is useful for the quantitative estimation of chaperone activities in vitro. Both  $k_1$  and  $A_{lim}$  were decreased in the presence of the casein chaperones as they were calculated from the kinetics curves.

Decreases in the  $A_{lim}$  value in the presence of chaperone are due to the binding of denatured protein by chaperones.

Aggregation is preceded by the stage of unfolding of native protein molecule ( $N \rightarrow U$ ) and unfolded state exposing hydrophobic moieties is more prone to aggregation ( $U \rightarrow Agg$ ).

When it is bound to chaperone, denatured protein molecule is eliminated from aggregate.<sup>29</sup>

Chaperones interact preferentially with the protein in unfolded states and by doing so reduce the rate constant of aggregation. Using equation-1 described in the Material and Methods section, the percentage of chaperone-like activity of  $\beta$ -CN applied in this study was quantified in different molar ratios to the substrate/target proteins. It was demonstrated, using insulin and ADH as substrate/target proteins, that WT  $\beta$ -CN exhibited considerably lower chaperone-like activity than native  $\beta$ -CN (Figures 2A and 2B). Native  $\beta$ -CN molecule contains phosphate center (5 phosphorylated

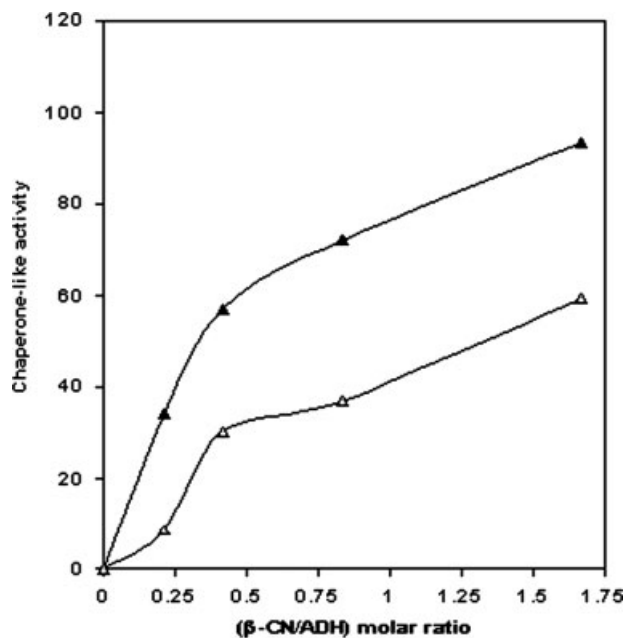
residues) in the N-terminal region, which is absent in the recombinant forms.<sup>5,39</sup> The net-charge of bovine  $\beta$ -CN at physiological pH is  $-13^{28,40}$  and the lack of the phosphorylated residues in WT  $\beta$ -CN diminishes considerably its net-charge. The reduction in the bulk negative charge on each molecule should result in decrease of amphiphilicity so essential for solubilization (maintenance in solution of unfolded substrates) and hence for the chaperoning functions of this protein.

As many other chaperones,  $\beta$ -CN does not contain cysteinyl residues. The high frequency of prolyl residues and the absence of cysteinyl residues in the primary structures bestow more open and flexible structures to chaperones.<sup>41</sup> In this study two recombinant  $\beta$ -CNs containing cysteinyl residues (C4 and C208) were studied and compared with native and WT  $\beta$ -CNs for their chaperone activities (Figures 2A and 2B). When DTT-induced insulin aggregation system was applied, the chaperone activity of C4  $\beta$ -CN and C208  $\beta$ -CN was significantly lower than that of native bovine  $\beta$ -CN. As seen in Figure 2A, chaperone-like activity of C4  $\beta$ -CN was comparable to that of WT  $\beta$ -CN whereas C208  $\beta$ -CN exhibited lower chaperone-like activity than WT  $\beta$ -CN. As expected, the presence of DTT prevents the dimerization of these recombinant caseins. Thus incorporation of cysteinyl residue in  $\beta$ -CN has no significant effect on chaperoning functions in the case of monomeric C4  $\beta$ -CN, whereas it decreases chaperone activity of monomeric C208  $\beta$ -CN, when insulin was used as target protein.

When thermal-induced ADH aggregation system was studied, the mutant caseins (WT, C4 and C208) exhibited significantly lower chaperone-like activities than native  $\beta$ -CN and the chaperone-like activity of C4  $\beta$ -CN was almost comparable to that of WT  $\beta$ -CN. The C208  $\beta$ -CN exhibited similar chaperone activity as observed when insulin was used as substrate/target protein with the exception that at the highest C208  $\beta$ -CN/ADH molar ratio, a significant antiaggregation activity was seen (Figure 2B). This casein form has faster dimerization kinetics; SDS-PAGE performed under non-reducing condition revealed the presence of significant amounts of dimerized C208  $\beta$ -CN when its higher concentration was applied (data not shown). The relatively high temperature ( $60^{\circ}\text{C}$ ) used to induce aggregation of ADH could also enhance the process of dimerization.

### Chaperone-Like Activities of Dimeric C4 $\beta$ -CND and C208 $\beta$ -CND

Protein charges are uniformly distributed in  $\alpha_{S1}$ - and  $\alpha_{S2}$ -CN, whereas  $\beta$ -CN and  $\kappa$ -CN have well distinct polar and apolar regions what is at the origin of their amphiphilic char-



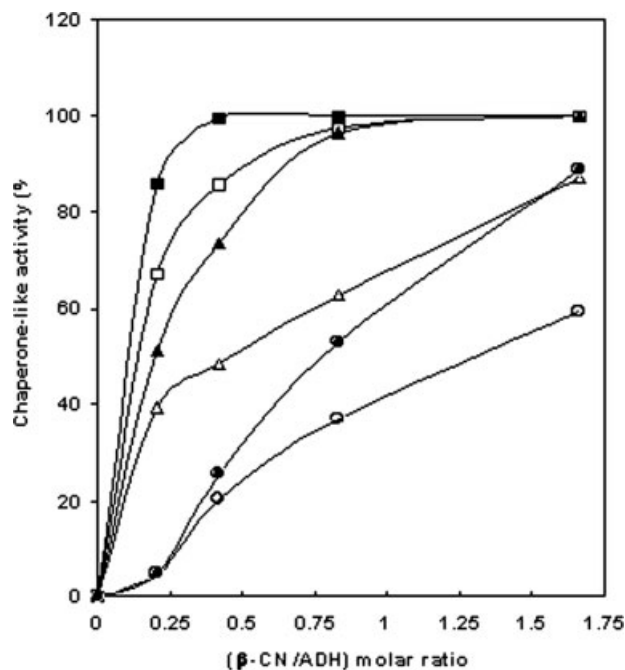
**FIGURE 3** Chaperone-like activity of dimeric  $\beta$ -CN. Different concentrations of dimeric  $\beta$ -CN were applied to examine their chaperone-like activities with ADH ( $1.87 \mu\text{M}$ ) as target/substrate protein. The symbols  $\blacktriangle$  and  $\triangle$  represent C208  $\beta$ -CND and C4  $\beta$ -CND, respectively.

acters.<sup>4</sup>  $\beta$ -CN is a highly amphiphilic molecule containing two distinct segments in its primary structure with a hydrophilic ( $\psi$ ) N-terminal part and a hydrophobic ( $\phi$ ) C-terminal part, along with a cluster of five phosphoserine residues in the N-terminal domain.<sup>5</sup> According to the primary structure, hydrophilic-hydrophobic pattern of native  $\beta$ -CN, C208  $\beta$ -CND and C4  $\beta$ -CND can be symbolized as " $\psi$ - $\phi$ ", " $\psi$ - $\phi$ - $\phi$ - $\psi$ " and " $\phi$ - $\psi$ - $\psi$ - $\phi$ ", respectively. Thus, C4  $\beta$ -CND and C208  $\beta$ -CND, which are dimerized by covalent association in dimers polar or apolar ends of these monomers creating a sort of palindrome structures, are dotted with two hydrophobic or hydrophilic ends, respectively.

Similar to  $\alpha$ -crystalline chaperone,  $\beta$ -CN acts as a surfactant molecule.<sup>6,20</sup> Recently dimeric or Gemini surfactants made from two surfactant monomers linked by a linker or spacer moiety have attracted attention.<sup>27,28</sup> So, the palindrome dimers of recombinant  $\beta$ -CNs (C4 and C208) could be considered also to be similar to such bis-surfactants.

In this study, the chaperone-like activities of dimeric recombinant  $\beta$ -CNs (C4  $\beta$ -CND and C208  $\beta$ -CND) were analyzed using ADH heat-induced aggregation systems.

When compared with its monomeric state, C208  $\beta$ -CND (double hydrophobic central cluster and hydrophilic extremities) exhibits a considerably greater chaperone-like activity (Figures 2A and 3) whereas there was almost no significant



**FIGURE 4** Temperature-dependent chaperone-like activities of native  $\beta$ -CN and dimeric  $\beta$ -CN. The temperature-dependent chaperone-like activities of native  $\beta$ -CN and dimeric  $\beta$ -CN were measured at 50 and 60°C, with ADH (1.87  $\mu$ M) used as target protein. The symbols rectangles ( $\square$  and  $\blacksquare$ ), triangles ( $\Delta$  and  $\blacktriangle$ ) and circles ( $\circ$  and  $\bullet$ ) represent native  $\beta$ -CN, C208  $\beta$ -CND and C4  $\beta$ -CND, respectively. Black and white colors represent two different temperatures in which the experiments were performed (60 and 50°C, respectively).

difference between chaperone activities of monomeric and dimeric forms of C4  $\beta$ -CN (central polar cluster and hydrophobic extremities). Similarly to mammalian sHsps in which the flexible C-terminal end is responsible for chaperone action,<sup>19,42</sup> the hydrophilic N-terminal domain of  $\beta$ -CN may play a crucial role in determination of its chaperone-like activity.

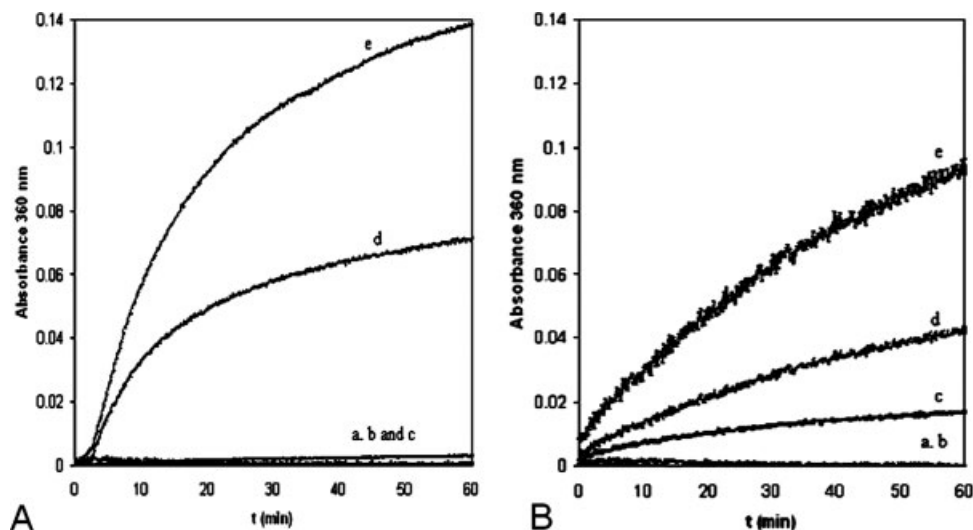
#### Temperature Dependent Chaperone-Like Activities of Native $\beta$ -CN and Dimeric Proteins

Increased temperature induces dissociation of some sHsp aggregates, such as  $\alpha$ -crystalline and enhances chaperone activity, suggesting that a dissociated form of sHsp is the active chaperone species.<sup>43–45</sup> In the case of  $\alpha$ -crystalline, elevated temperature led to an increase in rate of exchange of subunits and to a concomitant enhancement of chaperone activity.<sup>43–45</sup> The chaperone-like activity of bovine  $\beta$ -CN, C208  $\beta$ -CND and C4  $\beta$ -CND was measured at 50 and 60°C using ADH (0.18  $\mu$ M) as target protein. The data presented in Figure 4 show that these caseins exhibit greater chaperone-like activity

at 50°C than at 60°C. Effect of temperature was more pronounced in the case of C208  $\beta$ -CND as compared with other forms of  $\beta$ -CN. Since association of the caseins is temperature-dependent, when temperature increases, a greater portion of native  $\beta$ -CN associates. Thus, similarly to what was described in the case of sHsps or clusterin, the associated forms of  $\beta$ -CN can be also considered to be chaperone inactive because after association the hydrophobic C-terminal domain of  $\beta$ -CN monomer, necessary for interaction with partially unfolded substrate protein, could be hidden inside of the supra molecular assemblies.  $\beta$ -CN as a mild surfactant has high surface activity due to its amphiphilic nature and loose structure that leads to good emulsifying properties.<sup>6</sup> The higher surface activity, the less of surfactant is needed to perform a function.<sup>27</sup> As shown previously, during heating  $\beta$ -CN undertakes conformational changes that leads to compaction of its C-terminal domain. Since elongation of polymer chains increases the surface activity of conventional surfactants, then temperature-induced compaction of C-terminal domain and consequently smaller surface activity could be considered as further reasons for poorer chaperone-like activity of  $\beta$ -CN at the higher temperature. Weaker chaperone-like activity of the dimeric form of mutant  $\beta$ -CN might be also explained by its temperature-induced compaction decreasing its surface activity and chaperoning functions at the elevated temperature. Inaccessibility of chaperone functional elements at elevated temperature might be also considered to be one of the causes for the decrease of temperature-dependent chaperoning functions of the dimeric  $\beta$ -CN.

#### Chaperone-Like Activity of Native $\beta$ -CN at Constant Molar Ratios to Substrate/Target Proteins and at Wide Range of Concentrations

It has been reported previously that the dynamics of association and dissociation of subunits is important in regulating the chaperone action of sHsps and clusterin.<sup>46</sup> In the monomeric state the chaperone binding sites are exposed and available for interactions with the destabilized target proteins when this functional region is buried in the chaperone inactive aggregated species. Consequently, chaperone activities of these caseins can be affected by their transition between monomeric and oligomeric states. As reported previously,  $\beta$ -CN undergoes a temperature-induced concentration-dependent micellisation process in which hydrophobic interactions are the principal associative forces.<sup>47</sup> Since association of  $\beta$ -CN monomers is a concentration dependent process,<sup>48</sup> when  $\beta$ -CN concentration increases, greater portion of this protein can oligomerize. Consequently, at greater concentrations of  $\beta$ -CN, weaker chaperone-activity could be



**FIGURE 5** The antiaggregation activities of bovine  $\beta$ -CN against insulin and ADH in constant molar ratios and wide concentrations range of chaperone/target protein. Different concentrations of  $\beta$ -CN/target protein with the same mass ratio (1:1) were applied: 0.05 mg/mL (a), 0.1 mg/mL (b), 0.25 mg/mL (c), 0.37 mg/mL (d), 0.5 mg/mL (e), with insulin and ADH used as target. DTT (20 mM) was used to induce aggregation of insulin at 40°C (A), whereas heat aggregation of ADH was induced at 60°C (B).

expected. To examine this hypothesis, different concentrations of native  $\beta$ -CN [2.08  $\mu$ M (0.05 mg/mL), 4.16  $\mu$ M (0.10 mg/mL), 10.41  $\mu$ M (0.25 mg/mL), 15.41  $\mu$ M (0.37 mg/mL), and 20.83  $\mu$ M (0.5 mg/mL)] were applied to prevent aggregation of either 8.62  $\mu$ M (0.05 mg/mL), 17.24  $\mu$ M (0.10 mg/mL), 43.10  $\mu$ M (0.25 mg/mL), 63.79  $\mu$ M (0.37 mg/mL) and 86.20  $\mu$ M (0.50 mg/mL) insulin or 0.625 (0.05 mg/mL), 1.25  $\mu$ M (0.10 mg/mL), 3.12  $\mu$ M (0.25 mg/mL), 4.62  $\mu$ M (0.37 mg/mL) and 6.25  $\mu$ M (0.50 mg/mL) ADH (Figures 5A and 5B). In all these experiments, molar ratios of  $\beta$ -CN/insulin and  $\beta$ -CN/ADH were constant being 0.241 and 3.33, respectively. Experiments were performed at 40 and 60°C using insulin and ADH as substrates, respectively. In control experiments in the applied experimental conditions using  $\beta$ -CN alone, the optical density change at 360 nm was followed and it was negligible (data not shown).

At higher concentrations, when the mass of both casein and target proteins increased,  $\beta$ -CN exhibits weaker chaperone-like activity (Figures 5A and 5B). Since the ratios of  $\beta$ -CN/target protein applied were constant, then at the higher concentrations of  $\beta$ -CN/target protein, a greater portion of casein chaperone could be assembled in the associated or micellar forms. Thus, as observed in the case of sHsps or clusterin, the associated form of  $\beta$ -CN might be also considered as a chaperone inactive form because after association the hydrophobic domain of  $\beta$ -CN monomer, necessary for the interaction with unfolded substrate proteins are buried inside of the supra molecular assemblies.

## CONCLUSIONS

The highly charged N-terminal domain containing the phosphate centre makes bovine  $\beta$ -CN strongly amphiphilic. The expressed in *E. coli* recombinant  $\beta$ -CNs lack the phosphorylated residues what decreases their amphiphilicity. Weaker chaperone-like activities of recombinant  $\beta$ -CNs, compared with native casein, demonstrate importance of phosphorylated residues in amphiphilic nature and antiaggregation activities of proteins. Considerably, greater chaperone-like activity of C208  $\beta$ -CND as compared with C4  $\beta$ -CND point to significant role played by N-terminal hydrophilic domain of  $\beta$ -CN in its chaperoning functions. Weaker chaperone activity of  $\beta$ -CN at higher temperatures and at higher concentrations at the constant ratio of chaperone/target proteins demonstrates the importance of dissociation and association of  $\beta$ -CN in chaperoning mechanism of this casein, indicating the importance of the hydrophobic segment in protein-protein interactions.

## REFERENCES

1. Livney, Y. D.; Schwan, A. L.; Dagleish, D. G. *J Dairy Sci* 2004, 87, 3638–3647.
2. Bu, H.; Hu, Y.; Sood, S. M.; Slattery, C. W. *Arch Biochem Biophys* 2003, 415, 213–220.
3. Greenberg, R.; Groves, M. L.; Dower, H. H. *J Biol Chem* 1984, 259, 5132–5138.
4. O'Connell, J. E.; Grinberg, V. Y.; de Kruijff, C. G. *J Colloid Interface Sci* 2003, 258, 33–39.



5. Portnaya, I.; Ben-Shoshan, E.; Cogan, U.; Khalfin, R.; Fass, D.; Ramon, D.; Danino, O. D. *J Agric Food Chem* 2008, 56, 2192–2198.
6. Gangnard, S.; Zuev, Y.; Gaudin, J.-C.; Fedotov, V.; M. Axelos, A. V.; Chobert, J.-M.; Haertlé, T. *Food Hydrocolloids* 2007, 21, 180–190.
7. Farrell, H. M.; Qi, P. X.; Uversky, V. N. *Adv Biopolym, A.C.S. Symposium series*, 2006, 935, 52–70.
8. Tompa, P. *Trends Biochem Sci* 2002, 27, 527–533.
9. Hegyi, H.; Tompa, P. *PLoS Comput Biol* 2008, 4, e1000017.
10. Csizsók, V.; Szollosi, E.; Friedrich, P.; Tompa, P. *Mol Cell Proteomics* 2006, 5, 265–273.
11. Kumosinski, T. E.; Brown, E. M.; Farrell, H. M., Jr. *J Dairy Sci* 1993, 76, 931–945.
12. Holt, C.; Sawyer, L. *J Chem Soc* 1993, 89, 2683–2692.
13. Farrell, H. M., Jr.; Qi, P. X.; Wickham, E. D.; Unruh, J. J. *J Protein Chem* 2002, 21, 307–321.
14. Morgan, P. E.; Treweek, T. M.; Lindner, R. A.; Price, W. E.; Carver, J. A. *J Agric Food Chem* 2005, 53, 2670–2683.
15. Bhattacharyya, J.; Das, K. P. *J Biol Chem* 1999, 274, 15505–15509.
16. Dunker, A. K.; Brown, C. J.; Lawson, J. D.; Iakoucheva, L. M. Z. *Biochemistry* 2002, 41, 6573–6582.
17. Carver, J. A.; Rekas, A.; Thorn, D. C.; Wilson, M.R. *IUBMB Life* 2003, 55, 661–668.
18. Lindner, R. A.; Ehrnsperger, J. A. M.; Buchner, J.; Esposito, G.; Behlke, J.; Lutsch, G.; Kotlyarov, A.; Gaestel, M. *Eur J Biochem* 2000, 267, 1923–1932.
19. Carver, J. A.; Aquilina, J. A.; Cooper, P. G.; Williams, G. A.; Truscott, R. J. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1204, 195–206.
20. Humphreys, D. T.; Carver, J. A.; Easterbrook-Smith, S. B.; Wilson, M. R. *J Biol Chem* 1999, 274, 6875–6881.
21. Van Montfort, R.; Slingsby, C.; Vierling, E. *Adv Protein Chem* 2001, 59, 105–156.
22. Wilson, M. R.; Easterbrook-Smith, S. B. *Trends Biochem Sci* 2000, 25, 95–98.
23. Horne, D. S. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2002, 7, 456–461.
24. O’Connell, J. E.; Grinberg, V. Y.; de Kruijff, C. G. *J Colloid Interface Sci* 2003, 258, 33–39.
25. Treweek, M. T.; Morris, A. M.; Carver, J. A. *Aust J Chem* 2003, 56, 357–367.
26. Hait, S. K.; Moulik, S. P. *Curr Sci* 2002, 82, 1101–1111.
27. Groth, C.; Nydén, M.; Holmberg, K.; Kanicky, J. R.; Shah, D. O. *J Surfactants Deterg* 2004, 7, 247–255.
28. Barzegar, A.; Yousefi, R.; Sharifzadeh, A.; Dalgalarroondo, M.; Chobert, J.-M.; Ganjali, M. R.; Norouzi, P.; Ehsani, M. R.; Niasari-Naslaji, A.; Saboury, A. A.; Haertlé, T.; Moosavi-Movahedi, A. A. *Int J Biol Macromol* 2008, 42, 392–399.
29. Hassanisadi, M.; Barzegar, A.; Yousefi, R.; Dalgalarroondo, M.; Chobert, J.-M.; Haertlé, T.; Saboury, A. A.; Moosavi-Movahedi, A. A. *Anal Chim Acta* 2008, 613, 40–47.
30. Schägger, H. von Jagow, G. *Anal Biochem* 1987, 166, 368–379.
31. Kurganov, B. L. *Biochemistry (Moscow)* 2002, 67, 409–422.
32. Friedrich, K. L.; Giese, K. C.; Buan, N. R.; Vierling, E. *J Biol Chem* 2004, 279, 1080–1089.
33. Caessens, P. W.; De Jongh, H. H.; Norde, W.; Gruppen, H. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1430, 73–83.
34. Gaudin, J.-C.; Le Parc, A.; Castrec, B.; Ropers, M. H.; Choiset, Y.; Shchutskaya, Y.; Muronetz, V. I.; Zuev, Y.; Chobert, J.-M.; Haertlé, T. *Biotechnol Adv* (Accepted).
35. Fields, G. B.; Alonso, D.; Stigter, D.; Dill, K. A. *J Phys Chem* 1992, 96, 3974–3981.
36. Stefani, M.; Dobson, C. M. *J Mol Med* 2003, 81, 678–699.
37. Kay, B. K.; Williamson, M. P.; Sudol, M. *FASEB J* 2000, 14, 231–241.
38. Mitraki, A.; King, J. *Biotechnology* 1989, 7, 690–697.
39. Horwich, A. *Adv Protein Chem* 2002, 59, 1–507.
40. Ribadeau Dumas, B.; Brignon, G.; Grosclaude, F.; Mercier, J.-C. *Eur J Biochem* 1972, 25, 505–514.
41. Cordeschi, M.; Di Paola, L.; Marrelli, L.; Maschiatti, M. *Biophys Chem* 2003, 103, 77–88.
42. Guha, S.; Manna, T. K.; Das, K. P.; Bhattacharyya, B. *J Biol Chem* 1998, 273, 30077–30080.
43. Carver, J. A.; Esposito, G.; Schwedersky, G.; Gaestel, M. *FEBS Lett* 1995, 369, 305–310.
44. Rekas, A.; Jankova, L.; Thorn, D. C.; Cappai, R.; Carver, J. A. *FEBS J* 2007, 274, 6290–6304.
45. Reddy, G. B.; Das, K. P.; Petrash, J. M.; Surewicz, W. K. *J Biol Chem* 2000, 275, 4565–4570.
46. Das, K. P.; Surewicz, W. K. *FEBS Lett* 1995, 369, 321–325.
47. Bova, M. P.; Huang, Q.; Ding, L.; Horwitz, J. *J Biol Chem* 2002, 277, 38468–38475.
48. Arima, S.; Niki, R.; Takase, K. *J Dairy Res* 1979, 46, 281–282.

*Reviewing Editor: David Wemmer*



## Phospholipids influence the aggregation of recombinant ovine prions From rapid extensive aggregation to amyloidogenic conversion

Kirill Tsiroulnikov<sup>a,c</sup>, Yuliya Shchutskaya<sup>a,b</sup>, Vladimir Muronetz<sup>b</sup>, Jean-Marc Chobert<sup>a</sup>, Thomas Haertlé<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, BIA-FIPL, BP 71627, F-44316 Nantes Cedex 3, France

<sup>b</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory, Moscow 119992, Russia

<sup>c</sup> On leave from the Laboratory of Proteolytic Enzyme Chemistry, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS, Moscow, Russia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 August 2008

Received in revised form 2 December 2008

Accepted 3 December 2008

Available online 16 December 2008

#### Keywords:

Prion protein

Amyloid

Phosphatidylinositol

### ABSTRACT

The transformation of prion protein (PrP) into its insoluble amyloid form correlates with neurodegeneration in transmissible spongiform encephalopathies. PrP is connected to the neuronal membrane by a covalently-linked glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. The current study demonstrates that phosphatidylinositol and phosphatidylethanolamine in low concentrations (0.5–50  $\mu\text{M}$ ) stimulate rapid unlimited aggregation of PrP. At a higher concentration (500  $\mu\text{M}$ ), lipid particles prevent the formation of large PrP aggregates and induce an increase in the  $\beta$ -sheet structure content of PrP protein. Thus, the liberation of PrP from the membrane and its direct interaction with its own GPI moiety, as well as with membrane lipids, can promote the formation of aggregated structures of PrP. The phospholipids studied are also able to upregulate the aggregation of oligomeric PrP forms (12-mers and 36-mers), the neurotoxicity of which has been reported recently. Low phosphatidylinositol concentrations induce these oligomers to form aggregates of smaller size when compared with aggregates formed directly from monomers. The inhibition of extensive aggregation observed at a high concentration of phosphatidylinositol (500  $\mu\text{M}$ ) results in both the formation of amyloids from PrP monomers and the interaction of protein molecules with lipid micelles. Thus, phospholipids are not only involved in the aggregation of prion monomers and their amyloidogenic conversion, but also regulate the aggregative status of prion oligomers already formed. Consequently, depending on their micellar status, phospholipids can either promote amyloidogenic conversion and conserve neurotoxic oligomeric forms (lipid micelles) or mediate the formation of large-size amorphous aggregates (non-micellar phospholipids).

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies are fatal infectious neurodegenerative disorders such as bovine spongiform encephalopathy, scrapie in sheep and goats, and Kuru and Creutzfeldt–Jakob disease in humans. The suspected causative agent of these diseases is PrP<sup>Sc</sup>, a highly aggregated amyloid isoform of the host-encoded “prion protein” (PrP) [1]. While the cellular PrP<sup>C</sup> isoform is predominantly alpha-helical, PrP<sup>Sc</sup> is characterized by a higher proportion of beta-sheet structure. Factors presumed to influence the transformation of monomeric alpha-helical PrP<sup>C</sup> into aggregated PrP<sup>Sc</sup> rich in beta-sheets are pH, metal ions, DNA, other proteins and traces/infection of/by PrP<sup>Sc</sup> itself.

**Abbreviations:** PrP, prion protein; PrP<sup>C</sup>, cellular isoform of PrP; PrP<sup>Sc</sup>, scrapie isoform of PrP; PrP, recombinant ovine PrP; GPI, glycosylphosphatidylinositol; PI, phosphatidylinositol; MG, 1-oleoylglycerol; TG, 1,2,3-trioleoylglycerol; PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine; SM, sphingomyelin; CH, cholesterol; SA, stearic acid; OA, oleic acid; PK, proteinase K; SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; DLS, dynamic light scattering; CD, circular dichroism; MOPS, 3-(N-morpholino) propane sulfonic acid

\* Corresponding author. Tel.: +332 40 67 50 91; fax: +332 40 67 52 44.

E-mail address: [haertle@nantes.inra.fr](mailto:haertle@nantes.inra.fr) (T. Haertlé).

Recently it has been proposed that the neurotoxicity of PrP<sup>Sc</sup> rich in beta-sheets may depend on its aggregative status, and oligomeric forms consisting of 12 or 36 monomers appear to be the most toxic compared to monomers and/or aged fibrils [2,3]. Therefore, it is important to investigate factors that can affect the transition from PrP<sup>C</sup> to PrP<sup>Sc</sup> and influence the aggregation of native monomers and PrP oligomers, thereby changing the toxicity of prion protein.

PrP is a membrane-bound protein, with a molecular weight of about 23 kDa, connected to the cell membrane by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. It is associated mainly with cholesterol- and glycosphingolipid-rich lipid rafts [4]. It has been demonstrated that the GPI anchor plays a role in the pathogenesis of prion diseases since PrP<sup>Sc</sup> lacking the glycolipid moiety has a greater propensity to form amyloid fibrils than does the protein with GPI [5]. The GPI anchor is thought to interfere with the ability of PrP to form fibrils, interacting directly with the protein or limiting its mobility by attaching PrP to the membrane. This observation is confirmed by the inability of PrP to transform into PrP<sup>Sc</sup> in a cell-free system where PrP is associated with raft membranes until the GPI anchor is cleaved [6]. Other data indicate that the interaction with lipid membranes of recombinant PrP devoid of the GPI anchor changes the protein structure and its aggregation [7–9]. Membranes composed of phosphatidylserine, as well as other

negatively-charged phospholipids, induce a rapid formation of amyloid fibrils by a variety of proteins [10,11]. Presumably, the role of lipids in such protein transformations consists in lowering the pH in the close vicinity of these membranes leading to the formation of amyloid structures on their surface. Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptide, suspected of being responsible for the onset of Alzheimer's disease, also interacts with phospholipid membranes. Moreover, A $\beta$  peptides penetrate membranes and form pores, and this process results in the acquisition of  $\alpha$ -helical structures by peptide molecules [12,13]. The presence of cholesterol reduces the penetration of A $\beta$  into membranes, displacing the equilibrium towards the formation of  $\beta$ -sheeted fibrils on the membrane surface [13].

The main goal of the current study was to investigate the influence of submicellar and micellar phospholipid concentrations on the aggregation of monomeric and oligomeric PrP forms and also on PrP conversion into a beta-sheet-rich conformation. It was proposed that monomers of PrP could aggregate in the presence of different concentrations of phospholipids because of hydrophobic interactions and that the lipid charge would probably be essential for such aggregation.

Moreover, the GPI anchor of PrP influences amyloidogenesis since PrP<sup>Sc</sup>, lacking the glycolipid moiety, forms amyloid fibrils more intensively than the protein with GPI does [5]. It was assumed that GPI might interact directly with the protein thereby influencing fibril formation [5]. Moreover lipid molecules, as well as the GPI moiety of PrP, could directly influence amyloidogenesis, inducing PrP aggregation. Anchoring PrP by GPI could preserve it from aggregation, at least partially, by separating the protein from lipids. Therefore, the liberation of PrP from the membrane and its "free circulation" could increase the formation of aggregated structures.

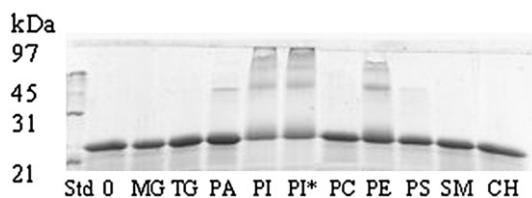
Hence, it was interesting to verify the effect of different phosphatidylinositol concentrations on the aggregation of PrP oligomers, the toxicity of which has been observed recently [2,3]. At the same time, phosphatidylinositol micelles (500  $\mu$ M phosphatidylinositol) may interact differently with oligomers of PrP. Therefore, the effects of phospholipids on both the native PrP monomers and oligomers were compared. In addition, the interactions with lipids may stimulate the conversion of prion protein into a beta-sheet-rich form. Consequently, the secondary structure changes during interactions were studied in order to define better the type of conversion of PrP, which proved to be amyloidogenic, as will be seen in the results.

Thus, the phospholipid environment may play an important role in the regulation of both the amyloidogenic conversion of prions and their aggregative status.

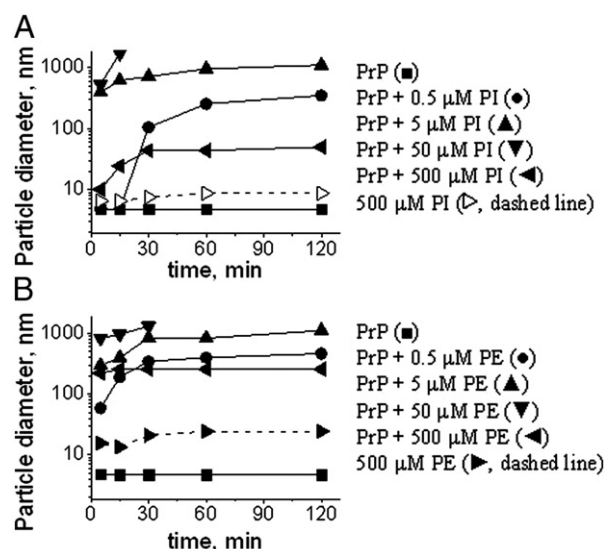
## 2. Results

### 2.1. PrP aggregates in the presence of lipids

20  $\mu$ M PrP (ovine PrP-V136R154Q171) was incubated with different lipids at 37 °C for 20 h. Fig. 1 shows the SDS-PAGE pattern of protein after incubation with 500  $\mu$ M 1-oleoylglycerol (MG), 1,2,3-



**Fig. 1.** Aggregation of 20  $\mu$ M PrP after incubation with 500  $\mu$ M lipids at 37 °C for 20 h. 0 – sample without lipids, MG – 1-oleoylglycerol, TG – 1,2,3-trioleoylglycerol, PA – phosphatidic acid, PI – phosphatidylinositol from aqueous stock solution, PI\* – phosphatidylinositol from ethanol stock solution, PC – phosphatidylcholine, PE – phosphatidylethanolamine, PS – phosphatidylserine, SM – sphingomyelin, CH – cholesterol. Std: standard of molecular mass.



**Fig. 2.** Size of PrP particles obtained after incubation of 20  $\mu$ M PrP without and with different concentrations of lipids at 37 °C. (A) PrP (■), PrP + 0.5  $\mu$ M PI (●), PrP + 5  $\mu$ M PI (▲), PrP + 50  $\mu$ M PI (▼), PrP + 500  $\mu$ M PI (◄), and size of lipid micelles at 500  $\mu$ M PI (▷, dashed line). (B) PrP (■), PrP + 0.5  $\mu$ M PE (●), PrP + 5  $\mu$ M PE (▲), PrP + 50  $\mu$ M PE (▼), PrP + 500  $\mu$ M PE (◄), and size of lipid micelles at 500  $\mu$ M PE (▷, dashed line).

trioleoylglycerol (TG), phosphatidic acid (PA), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), sphingomyelin (SM), and cholesterol. Protein samples were not heated before loading on the gel in order to preserve acquired structures. PrP formed aggregates after interaction with PI, PE and, to a lesser extent, with PA and PS. Moreover, PrP formed insoluble aggregates with 100  $\mu$ M PI, PA, and PE (but not 500  $\mu$ M), and at both concentrations of PS. To further investigate the size of the formed aggregates, the Dynamic Light Scattering (DLS) method was used.

### 2.2. Size of PrP–lipid aggregates

Because of the significant level of aggregation stimulated by PI and PE, these two phospholipids were chosen for further investigation of PrP–lipid interaction.

PrP in solution represented a monomeric molecule with a diameter of 4.8 nm, as demonstrated by DLS measurements (Fig. 2). After the interaction of 20  $\mu$ M PrP with 500  $\mu$ M PI at 37 °C, the formation of soluble aggregates with an average diameter of 50 nm was observed (Fig. 2A). Aggregates remained unchanged during at least 20 h of incubation with lipid. At this concentration, PI forms stable micelles or bilayer particles with a diameter of 8.7 nm (Fig. 2A, dashed line). Hence, it may be assumed that, under these conditions, PrP forms mixed micelles with PI.

As mentioned above, PrP formed insoluble aggregates after incubation with 100  $\mu$ M PI. The same effect was observed with 50  $\mu$ M PI (2.5-times molar excess of PI over PrP). DLS measurement of particle diameter demonstrated the formation of 530-nm aggregates immediately after the mixing of protein with lipid. After 10 min of incubation, the particle size reached 1720 nm (Fig. 2A). Further measurements were impossible due to the rapid precipitation of protein. Such a rapid precipitation was surprising since PrP was fully soluble at a higher concentration of PI. Apparently, the prevalence of PI molecules over PrP in the case of 500  $\mu$ M PI (micellar structures) blocked the sites of protein–protein interactions.

When the concentration of lipid was decreased to 5  $\mu$ M (PI/protein ratio of 1/4), PrP again aggregated rapidly but remained soluble despite the large size of the formed particles, which attained an average diameter of 615 nm after 15 min and reached almost 1000 nm

after 120 min of incubation (Fig. 2A). Surprisingly, when the PI concentration was decreased 10 times, down to 0.5  $\mu\text{M}$ , i.e. in a proportion of 1/40 with protein, the rapid aggregation of PrP was still observed. At this PI/PrP ratio, PrP remained in monomeric form during the initial 15 min of incubation with PI, but then the protein aggregated rapidly reaching a diameter of 100 nm after 30 min and 350 nm after 120 min of incubation (Fig. 2A). At 0.5–50  $\mu\text{M}$  PI, the formation of lipid particles was not detected by the DLS method.

Similar behavior of PrP in the presence of lipid was observed when PE was used instead of PI (Fig. 2B). After 2 h of incubation with 0.5 and 5  $\mu\text{M}$  lipid, the formation of PrP/lipid aggregates with diameters of 460 and 1100 nm, respectively, was observed (Fig. 2B). After incubation with 50  $\mu\text{M}$  PE, the protein precipitated but, in the presence of 500  $\mu\text{M}$  PE, stable soluble 250-nm aggregates were formed (Fig. 2B). At the same time, PE formed particles by itself with a diameter of approximately 20 nm at 500  $\mu\text{M}$  concentration. Thus, lipid charge was not the major factor influencing PrP aggregation. Nevertheless, it should be noted that PrP aggregates formed in the presence of 500  $\mu\text{M}$  PE were larger than those resulting from the interaction with 500  $\mu\text{M}$  PI.

It has previously been demonstrated that heat denaturation of PrP at neutral pH and subsequent cooling to ambient temperature results in the formation of protein structures with amyloid properties [14]. Oligomeric forms of prion were obtained at pH 7.2 by heating PrP for 1 h at 65  $^{\circ}\text{C}$ . The transition into amyloidogenic forms was confirmed by ThT fluorescence studies. In the presence of amyloidogenic PrP, Thioflavin T (ThT) displays an increased emission intensity with a maximum at 490 nm (Fig. 3). The particle size of thermally denatured PrP increased from 4.5 nm to 9 nm (Fig. 4A), consistent with the formation of previously observed oligomers [2,3].

The influence of PI on the size of such oligomers was examined. 0.5  $\mu\text{M}$  PI did not change oligomer size. In contrast, incubation with 5 and 50  $\mu\text{M}$  PI resulted in a further increase in particle diameter up to 200 and 250 nm, respectively (Fig. 4A). Incubation with 500  $\mu\text{M}$  PI led to significant growth in the size of the observed lipid micelles from 8.7 nm to 50 nm (Fig. 4A). Thus, incubation with the highest concentrations of PI, and the possible formation of mixed particles with lipid, protected PrP from excessive aggregation.

The influence of stearic (SA) and oleic (OA) acids on PrP aggregation was investigated in order to check whether the aggregating effect of small concentrations of phospholipids was highly specific for PrP or if other lipids, like fatty acids, could also induce PrP aggregation. Fig. 4B shows that, at 0.5  $\mu\text{M}$ , both SA and OA provoked the rapid formation of protein aggregates with diameters of 18 and 190 nm, respectively. However, such aggregates were unstable and PrP returned to a monomeric state after 15–30 min of incubation (Fig. 4B). On the other hand, at 20  $\mu\text{M}$  of both fatty acids (equimolar concentration with protein) PrP was found in aggregates with a

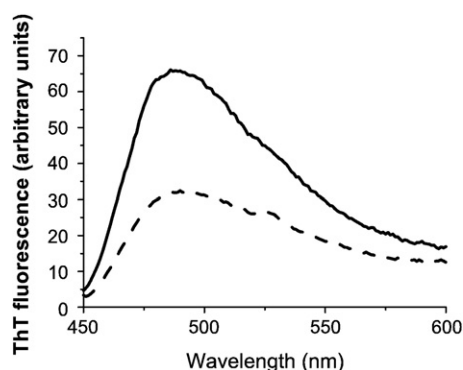


Fig. 3. Fluorescence emission spectra of ThT in the presence of native monomeric 7  $\mu\text{M}$  PrP (dashed line) and amyloidogenic PrP oligomers.

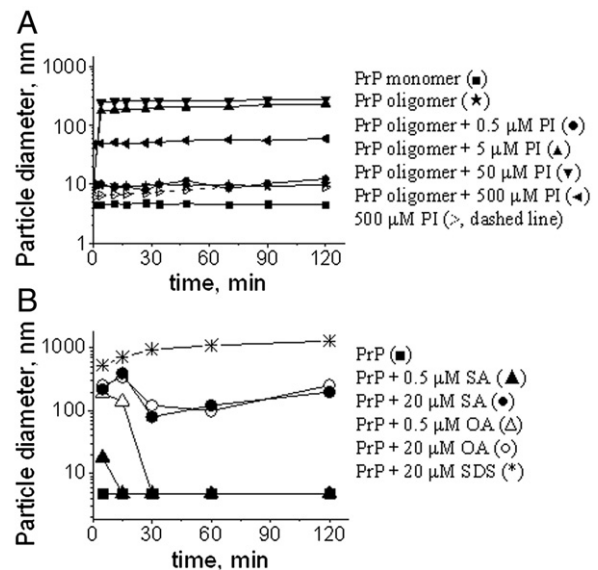


Fig. 4. Size of PrP particles obtained after incubation of 20  $\mu\text{M}$  PrP without and with different concentrations of lipids at 37  $^{\circ}\text{C}$ . (A) PrP monomer (■), PrP heat-denatured oligomer (★), PrP oligomer + 0.5  $\mu\text{M}$  PI (●), PrP oligomer + 5  $\mu\text{M}$  PI (▲), PrP oligomer + 50  $\mu\text{M}$  PI (▼), PrP oligomer + 500  $\mu\text{M}$  PI (◄), and size of lipid micelles at 500  $\mu\text{M}$  PI (▷, dashed line). (B) PrP (■), PrP + 0.5  $\mu\text{M}$  SA (▲), PrP + 20  $\mu\text{M}$  SA (●), PrP + 0.5  $\mu\text{M}$  OA (△), PrP + 20  $\mu\text{M}$  OA (○), PrP + 20  $\mu\text{M}$  SDS (\*).

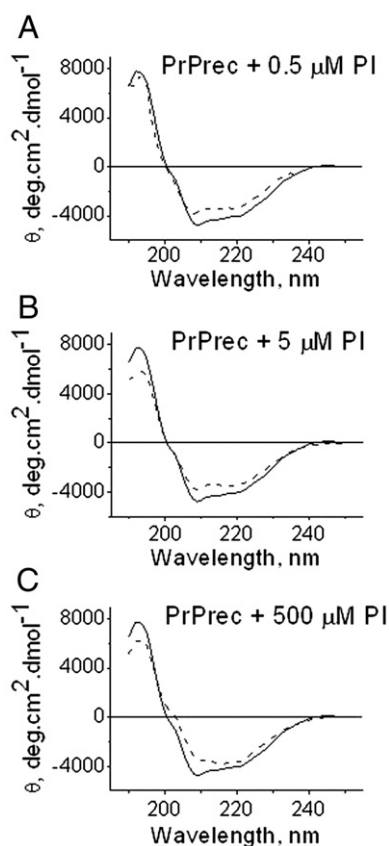
diameter of around 200 nm. At this concentration, micelles of OA and SA were observed with diameters of 80 and 120 nm, respectively. Thus, it is evident that the influence of these fatty acids on PrP aggregation is not as strong as that of PI and PE.

The aggregative capacity of small concentrations of amphiphilic molecules like SDS was also tested. It was reported recently that SDS provokes the oligomerization and modification of the secondary structure of PrP [15,16,17]. However, such structural alterations were observed only if SDS was at least in 5-fold or higher excess over the protein concentration. 0.5  $\mu\text{M}$  SDS did not produce any effect on the PrP monomeric state but at 20  $\mu\text{M}$  SDS (equimolar concentration with protein) protein aggregated rapidly and formed particles with diameters between 500 and 1000 nm (Fig. 4B). Thus, the aggregation of PrP generally occurs following its interaction with a small amount of lipid. Such a transition is most effective in the case of PI and PE. Apparently, the nature of the fatty acid chain in the phospholipid molecule influences the size of the PrP aggregate.

### 2.3. Secondary structure of PrP aggregates

Alterations in PrP secondary structure arising from PI-dependent PrP aggregation were studied by CD in far UV. Fig. 5A, B demonstrates that the typical  $\alpha$ -helical conformation of PrP was only slightly changed in the large PrP aggregates obtained with 0.5 or 5  $\mu\text{M}$  PI. In contrast, small-size aggregates of PrP with 500  $\mu\text{M}$  PI displayed a spectral indication of an  $\alpha$ -helix  $\rightarrow$   $\beta$ -sheet transition (Fig. 5C). Table 1 presents the ratio  $\theta_{218 \text{ nm}}/\theta_{207 \text{ nm}}$  characterizing the changes in  $\beta$ -sheet content. PrP aggregates formed in the presence of 0.5 and 5  $\mu\text{M}$  PI displayed a  $\theta_{218 \text{ nm}}/\theta_{207 \text{ nm}}$  ratio similar to normal monomeric PrP. In contrast, protein aggregates formed in the presence of 500  $\mu\text{M}$  PI displayed an increased  $\theta_{218 \text{ nm}}/\theta_{207 \text{ nm}}$  ratio, i.e. a higher content of  $\beta$ -sheet structure. Thus, surprisingly, small-size aggregates featured a greater content of  $\beta$ -sheet structure than larger aggregates. Apparently, the formation of  $\beta$ -sheet structures is inhibited in big, rapidly-aggregated PrP particles. The effective transition of secondary structure might require the formation of small aggregates and the limitation of intermolecular protein-protein interactions.





**Fig. 5.** CD spectra of 20  $\mu\text{M}$  PrP pre-incubated for 60 min at 37  $^{\circ}\text{C}$  with different concentrations of phosphatidylinositol: (A) – 0.5  $\mu\text{M}$ , (B) – 5  $\mu\text{M}$ , (C) – 500  $\mu\text{M}$  (dashed lines). PrP without lipids is shown as a solid line on all the spectra.

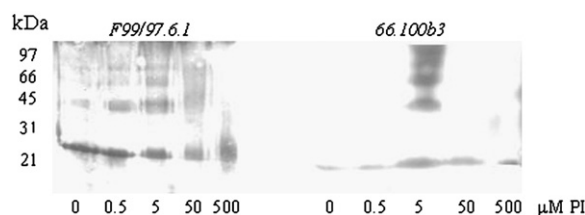
#### 2.4. Immuno-labeling of PrP aggregates

To reveal which part of the PrP molecule could be involved in the interaction with lipids and/or in intermolecular protein–protein interactions, Western blot of proteins incubated with different concentrations of PI at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 2 h was performed. Fig. 6 demonstrates that at 0.5, 5, and 50  $\mu\text{M}$  PI, both monomeric PrP and its aggregates were recognized by the monoclonal antibody F99/97.6.1, specific for the PrP C-terminus. At 500  $\mu\text{M}$  PI, a diffuse signal corresponding to monomeric PrP was observed and the binding of this antibody to PrP aggregates was strongly diminished (Fig. 6). Surprisingly, the antibody 66.100b3, specific for the PrP N-terminus, recognized PrP aggregates in the single case when the protein was incubated with 5  $\mu\text{M}$  PI (Fig. 6). It should be noted that this antibody has a much weaker affinity for the N-terminal epitope than that of F99/97.6.1 for the C-terminus. Such results indicate that aggregates formed in the presence of 5  $\mu\text{M}$  PI possessed exposed N-termini, which were even more accessible to the antibody than the N-terminal part of monomeric PrP. In contrast, in insoluble PrP/50  $\mu\text{M}$  PI or in small-size PrP/500  $\mu\text{M}$  PI aggregates, the N-termini are inaccessible. The absence of signal at 0.5  $\mu\text{M}$  PrP (Fig. 6) could be explained by the

**Table 1**  
 $\theta_{218 \text{ nm}}/\theta_{207 \text{ nm}}$  ratio characteristic of the content of  $\beta$ -sheet structure in PrP

Concentration of PI, $\mu\text{M}$	$\theta_{218 \text{ nm}}/\theta_{207 \text{ nm}}$
0	0.97
0.5	0.92
5	1.02
500	1.38

Increase in  $\beta$ -sheet structure in PrP after 60 min of incubation with 500  $\mu\text{M}$  phosphatidylinositol at 37  $^{\circ}\text{C}$ .



**Fig. 6.** Interaction of 20  $\mu\text{M}$  PrP and its aggregates obtained after incubation with different concentrations of phosphatidylinositol at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 2 h, with antibodies F99/97.6.1 and 66.100b3 specific for the PrP C- and N-terminus, respectively.

dissociation of aggregates in the conditions of SDS PAGE, i.e. in 0.1% SDS. Therefore, in small-size PrP/PI aggregates, both termini of the protein molecule, probably shielded by lipids, became almost inaccessible to antibodies.

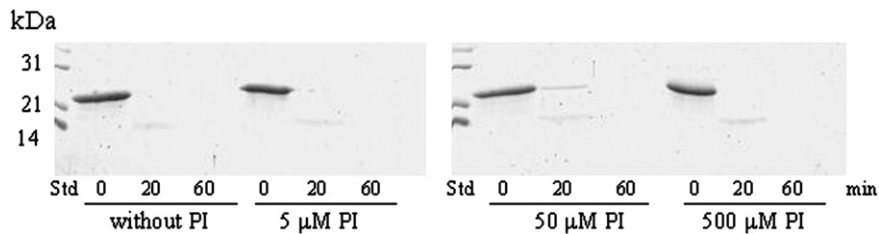
#### 2.5. PK susceptibility of PrP aggregates

Resistance to PK hydrolysis is characteristic of amyloid PrP structures. PrP aggregated in the presence of different ratios of PI was exposed to PK hydrolysis. No increase in PK-resistance was observed for PrP aggregates formed in the presence of 5 or 500  $\mu\text{M}$  PI (Fig. 7). A slight increase in PK-resistance was displayed when PrP was incubated with 50  $\mu\text{M}$  PI (Fig. 7). Since PrP was insoluble in such conditions, this increased resistance to proteolysis could be explained by an impaired accessibility of the protease to substrate molecules. Nevertheless, the protein precipitate was completely solubilized at the end of the reaction. Thus, even PrP aggregates relatively rich in  $\beta$ -sheet structure lacked PK resistance.

### 3. Discussion

Transmissible spongiform encephalopathies are provoked by the accumulation of highly aggregated insoluble forms of PrP. The interactions between different concentrations of lipids (mainly phospholipids) with native monomeric PrP and its oligomeric form produced by heating were investigated in this study. It was observed that the aggregation is surprisingly rapid even at the very low lipid/PrP ratio of 1/50 (0.5  $\mu\text{M}$  lipid concentration). At 50  $\mu\text{M}$  lipid (lipid/protein ratio of 2.5/1) PrP formed insoluble structures. In contrast, at 500  $\mu\text{M}$  lipid (lipid/PrP ratio of 25/1), monomeric and oligomeric PrP formed small-size soluble aggregates (or mixed particles with lipid) with, however, a marked increase in  $\beta$ -sheet structure content.

The current study demonstrates that PrP instantaneously aggregates after interaction with phospholipids, especially with PI, PA, PE, and PS. Thus, lipid charge is not the main factor influencing PrP aggregation. Surprisingly, PI and PE in small concentrations also caused rapid aggregation of monomeric PrP. The aggregation was rapid even when the concentration of phospholipid was 0.5 and 5  $\mu\text{M}$ , i.e. in lipid/PrP ratios of 1/40 and 1/4, respectively, and resulted in the formation of large aggregates, 300–1000 nm in diameter. Phospholipid super-molecular structures were not detected under these conditions probably because of the limitations of the DLS method. Taking into account that the real concentration of lipid particles can be much smaller than the concentration of free lipid used in this study, the rapid aggregation of PrP implies that, after the initial lipid-induced transformation of the PrP molecule, further aggregation occurs without lipid, i.e. the interaction of PI (PE) with the PrP molecule gives the protein a propensity to interact with other “normal” PrP molecules and makes them more prone to aggregate. In their turn, newly formed oligomers interact with other molecules or oligomers, resulting in instant PrP aggregation. This process can be regarded as a type of “chain reaction” since, after the initial event of PrP–PI(PE) interaction, all free, non-bound with PI (PE) PrP molecules acquire the properties of lipid-bound PrP and are recruited into the big aggregates.



**Fig. 7.** Susceptibility of PrP to proteinase K digestion. Protein samples (20  $\mu$ M) were pre-incubated without or with 5, 50, or 500  $\mu$ M phosphatidylinositol for 60 min at 37  $^{\circ}$ C. Std: standard of molecular mass. Conditions of proteolytic reactions are described in the Materials and methods section.

Such a mechanism is in agreement with the “protein only” hypothesis, according to which small amounts of infective aggregated PrP<sup>Sc</sup> particles are able to catalyze the transformation of all normal PrP<sup>C</sup> without the help of other molecules. Apparently, lipids, and firstly the GPI anchor of PrP, could play an important role in directing such transformations and hence modulating the PrP aggregating properties.

At equimolar PrP/PI(PE) concentrations, phospholipid provoked the instant precipitation of monomeric and oligomeric forms of PrP. Surprisingly, when PI concentration was increased 10 fold, i.e. to 500  $\mu$ M, PrP formed small-size soluble oligomers. At such lipid concentrations, the formation of lipid micelles was detected. It can be assumed that, under these conditions, PrP joined with lipid molecules to give so-called mixed lipid particles, which protected it from further aggregation. Lipid molecules can shield PrP regions responsible for intermolecular interactions. The fact that PE has the same effect on PrP aggregation as PI indicates that the lipid charge and alterations in pH on the surface of lipid particles are not the major factors influencing protein aggregation, as has previously been assumed. Hydrophobic contacts with lipid aliphatic carbon chains probably also play an essential role in the induction of protein aggregation. Other types of lipid molecules, namely fatty acids, stimulated PrP aggregation as well, but their effect was much weaker than that observed in the case of PI and PE. Apparently, the nature of the lipid aliphatic chain moiety can influence the properties of the aggregates formed.

The study of the secondary structure of PrP aggregates revealed that the  $\alpha$ -helical structure remained practically intact in large-size aggregates obtained as a result of the interaction of monomeric PrP with 0.5 or 5  $\mu$ M PI. In contrast, small-size PrP aggregates formed in the presence of 500  $\mu$ M PI displayed an increased content of  $\beta$ -sheet structure, characteristic of amyloid PrP<sup>Sc</sup>. Thus, unlimited aggregation inhibited  $\beta$ -sheet structure formation or destabilized such a type of secondary structure. The transformation from alpha to beta structure appears to be relatively slow or unstable and more effective in small-size aggregates. Formation of  $\beta$ -sheet structures in small oligomers may be a general feature of PrP since the same type of secondary structure transition has been observed in small-size copper-bound PrP aggregates [18]. Despite the aggregation and the increased amount of  $\beta$ -sheet structure, all PrP aggregates formed after the interaction with PI did not acquire any PK resistance and could be hydrolyzed, i.e. all PrP aggregates were not truly amyloid.

The study of the interaction of aggregates with antibodies specific for the N- and C-terminal parts of the PrP molecule revealed that the protein N-terminus was highly exposed to the environment in the case of aggregates obtained with 5  $\mu$ M PI. The accessibility of the N-terminus for antibody recognition was even greater in aggregates than in the monomeric molecule. In contrast, N-termini were hidden in insoluble or small-size aggregates obtained with 50 or 500  $\mu$ M PI, respectively. In such aggregates, the N-terminal part is probably involved in interactions with lipids and in intermolecular protein-protein interactions. The C-terminus of PrP remained accessible to antibody in aggregates obtained with 50  $\mu$ M PI, but recognition was

inhibited in the case of 500  $\mu$ M PI. It can be concluded that both termini of the PrP molecule, but especially the N-terminus, are involved in the organization of protein-lipid particles and possibly in the formation of the increased content of  $\beta$ -sheet structure, which was observed in small-size PrP-PI aggregates.

It has previously been shown that, in certain conditions, heat denaturation of monomeric PrP results in the formation of oligomers with amyloid characteristics [14], and these forms, in contrast to large-size aggregates, are mostly neurotoxic *in vitro*.

Small-size aggregates of PrP with amyloid properties confirmed by ThT fluorescence spectra were also able to change their aggregative status in the presence of phospholipids. Incubation with 5 and 50  $\mu$ M PI led to further aggregation of such PrP structures, as in the case of monomeric PrP, but the size of the formed particles was smaller than that of aggregates resulting from the interaction of monomers with PI. 0.5  $\mu$ M PI did not have any effect on the aggregate size. Higher concentrations of phospholipids had a different influence on PrP aggregation. In the presence of 500  $\mu$ M PI, further aggregation of small-size PrP oligomers was not observed, probably due to the interaction with PI micelles or the incorporation of PrP into these micelles.

The results obtained demonstrate that lipid molecules, especially the GPI moiety of PrP, can influence the amyloidogenesis of the protein. Intrinsically, depending on their concentration, phospholipids can exert radically diverse effects on the formation of amyloidogenic structures. Thus, low PI concentrations provoke a rapid extensive aggregation of both monomeric and oligomeric forms of PrP. In the case of monomers, aggregation was not accompanied by the formation of  $\beta$ -sheet structures, which is consistent with the literature data [2,3]. High concentrations of lipid (above CMC) led to the opposite final effect. The transition of the alpha-helical structure to the beta-sheet isoform was observed in the case of monomeric PrP, which is characteristic of the formation of amyloidogenic structures. Such structures were apparently incorporated into mixed protein-phospholipid soluble particles. Oligomeric forms of PrP did not form large-size aggregates in the presence of high concentrations of phospholipids, but demonstrated similar interactions with PI micellar structures. Consequently, it can be concluded that low concentrations of phospholipid mediate the extensive aggregation of mono- and oligomeric forms of PrP thereby lowering their pathological influence, while high concentrations stimulate the amyloidogenic processes.

The existence of the identical effect of PE on protein aggregation should be highlighted since this phospholipid is the major component of lipid membranes in the brain. Anchoring PrP by GPI could preserve it, at least partially, from aggregate formation by separating the distal fragments of the PrP molecule from membrane lipids and its own glycolipid moiety. In contrast, liberation of PrP from the membrane can result in unhampered PrP-lipid (GPI) interactions and hence increase the risk of formation of aggregated and  $\beta$ -sheet-enriched proteo-lipid structures. It is possible that a stabilizing system exists in the cell that prevents the direct contact of PrP with GPI if PrP is liberated from the membrane.

## 4. Materials and methods

### 4.1. Materials

Recombinant ovine variant PrP-V136R154Q171 was prepared and purified as previously described [19]. Lipids, proteinase K, MOPS, and all other chemicals were purchased from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. 10 mg/ml lipid stock solutions were prepared in ethanol except for phosphatidylserine prepared in chloroform and phosphatidylinositol soluble in water.

### 4.2. Dynamic light scattering (DLS)

Experiments were performed using a Zetasizer Nano-ZS device (Malvern Instruments, Malvern, U.K.). Laser wavelength was 532 nm. This device is equipped with 173° optics for the detection of scattered intensity. Size distribution by number was used for interpretation of the results. Measurements were made at 37 °C using 20 μM protein in 20 mM MOPS buffer, pH 7.2. Each measurement was an average of 5 runs of 30 s.

### 4.3. Circular dichroism (CD) spectra

Protein samples were pre-incubated without or with different concentrations of PI at 37 °C for 60–120 min before measurements. CD spectra were recorded from 190 to 250 nm on a Jobin Yvon CD Mark 6 spectropolarimeter in a 0.2-mm-pathlength cuvette. Measurements were made at 37 °C using 20 μM protein in 20 mM MOPS buffer, pH 7.2. Each spectrum was an average of three scans.

### 4.4. Fluorescence spectra

ThT binding assays were performed by adding freshly-prepared ThT stock solution in water to 7 μM PrP samples in 20 mM MOPS buffer, pH 7.2, at a molar ratio of 10:1. Fluorescence measurements were performed on a Hitachi F 4500 spectrofluorimeter at 20 °C using an excitation wavelength of 435 nm.

### 4.5. Western blotting

Protein samples were pre-incubated without or with different concentrations of PI at 37 °C for 120 min. PrP and its aggregates were immuno-labeled using mouse monoclonal antibodies 66.100b3 specific for the sequence K<sup>26</sup>RPKP<sup>30</sup> of the PrP N-terminus [20] and F99/97.6.1 specific for Q<sup>220</sup>YQRES<sup>225</sup> of the PrP C-terminus [21]. Working dilutions of antibodies were 1:1000. Samples for electrophoresis were prepared in 0.1% Laemmli buffer without heating with the aim of preventing protein aggregates from dissociating. After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membrane Hybond™-ECL™ (Amersham Biosciences). After blocking and 1 h of incubation with primary anti-PrP antibodies, membrane was washed and incubated with a secondary anti-mouse IgG antibody (Fc specific) coupled to horseradish peroxidase (Sigma) for 30 min. After the washing step, 10 ml of ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences) was applied for 1 min. Membrane was exposed for 1–2 min to Hyperfilm™ ECL (Amersham Biosciences), then the film was developed and fixed using Kodak GBX Developer and Fixer solutions.

### 4.6. PK digestion

Protein samples were pre-incubated without or with different concentrations of PI at 37 °C for 120 min before enzymatic hydrolysis. PK digestion of PrP was performed in the presence of 5 μg/ml (0.15 μM) PK and 0.5 mg/ml (20 μM) PrP in 20 mM MOPS buffer, pH 7.2, at 37 °C. Proteolytic reaction was stopped by the addition of Laemmli buffer to the samples and instant boiling for 5 min. The effectiveness of 99.5% PK inactivation was confirmed by using the synthetic substrate Suc-

Ala-Ala-Pro-Phe *p*-nitroanilide. 15% SDS-PAGE and consequent staining of gel with Coomassie Blue R-250 were then performed. 5 μg of protein was applied in each lane.

## Acknowledgments

The authors thank H. Rezaei (Institut National de la Recherche Agronomique, Virologie et Immunologie Moléculaires, Jouy-en-Josas, France) for providing the plasmid carrying a gene of ovine PrP-V136R154Q171 (25–233) variant, and J.P.M. Langeveld (Department of Bacteriology and TSEs, Central Institute for Animal Disease Control, Lelystad, Netherlands) for kindly providing the mouse monoclonal anti-PrP antibodies 66.100b3 and F99/97.6.1.

The authors acknowledge the support of GIS Prion, the European REX Neuroprion Task group PRIONINACT Dec-1 (Decontamination), the INTAS project # 03-51-4813 and the RFBR project # 05-04-48955-a.

## References

- [1] S.B. Prusiner, Prions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 13363–13383.
- [2] J.R. Silveira, G.J. Raymond, A.G. Hughson, R.E. Race, V.L. Sim, S.F. Hayes, B. Caughey, The most infectious prion protein particles, *Nature* 437 (2005) 257–261.
- [3] S. Simoneau, H. Rezaei, N. Sales, G. Kaiser-Schulz, M. Lefebvre-Roque1, C. Vidal, J.G. Fournier, J. Comte1, F. Wopfner, J. Grosclaude, H. Schatzl, C.I. Lasmezas, In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers, *PLoS Pathog.* 3 (2007) 1175–1186.
- [4] D.R. Taylor, N.M. Hooper, The prion protein and lipid rafts, *Mol. Membr. Biol.* 23 (2006) 89–99.
- [5] B. Chesebro, M. Trifilo, R. Race, K. Meade-White, C. Teng, R. LaCasse, L. Raymond, C. Favara, G. Baron, S. Priola, B. Caughey, E. Masliha, M. Oldstone, Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie, *Science* 308 (2005) 1435–1469.
- [6] G.S. Baron, K. Wehrly, D.W. Dorward, B. Chesebro, B. Caughey, Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP<sup>res</sup> (PrP<sup>Sc</sup>) into contiguous membranes, *EMBO J.* 21 (2002) 1031–1040.
- [7] N. Sanghera, T.J. Pinheiro, Binding of prion protein to lipid membranes and implications for prion conversion, *J. Mol. Biol.* 315 (2002) 1241–1256.
- [8] J. Kazlauskaitė, N. Sanghera, I. Sylvester, C. Vénien-Bryan, T.J.T. Pinheiro, Structural changes of the prion protein in lipid membranes leading to aggregation and fibrillization, *Biochemistry* 42 (2003) 3295–3304.
- [9] C. Renner, S. Fiori, F. Fiorino, D. Landgraf, D. Deluca, M. Mentler, K. Grantner, F.G. Parak, H. Kretzschmar, L. Moroder, Micellar environments induce structuring of the N-terminal tail of the prion protein, *Biopolymers* 73 (2004) 421–433.
- [10] H. Zhao, E.K.J. Tuominen, P.K.J. Kinnunen, Formation of amyloid fibers triggered by phosphatidylserine-containing membranes, *Biochemistry* 43 (2004) 10302–10307.
- [11] H. Zhao, A. Jutila, T. Nurminen, S.A. Wickström, J. Keski-Oja, P.K.J. Kinnunen, Binding of endostatin to phosphatidylserine-containing membranes and formation of amyloid-like fibers, *Biochemistry* 44 (2005) 2857–2863.
- [12] A. Quist, I. Doudevski, H. Lin, R. Azimova, D. Ng, B. Frangione, B. Kagan, J. Ghiso, R. Lal, Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 10427–10432.
- [13] C.C. Curtain, F.E. Ali, D.G. Smith, A.I. Bush, C.L. Masters, K.J. Barnham, Metal ions, pH, and cholesterol regulate the interactions of Alzheimer's disease amyloid-β peptide with membrane lipid, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 2977–2982.
- [14] H. Rezaei, Y. Choiset, F. Eghiaian, E. Treguer, P. Mentre, P. Debey, J. Grosclaude, T. Haertlé, Amyloidogenic unfolding intermediates differentiate sheep prion protein variants, *J. Mol. Biol.* 322 (2002) 799–814.
- [15] K.-W. Leffers, J. Schell, K. Jansen, R. Lucassen, T. Kaimann, L. Nagel-Steger, J. Tatzelt, D. Riesner, The structural transition of the prion protein into its pathogenic conformation is induced by unmasking hydrophobic sites, *J. Mol. Biol.* 344 (2004) 839–853.
- [16] G. Panza, J. Stöhr, C. Dumpitak, D. Papatthanassiou, J. Wei, D. Riesner, D. Willbold, E. Birkmann, Spontaneous and BSE-prion-seeded amyloid formation of full length recombinant bovine prion protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373 (4) (2008) 493–497.
- [17] J. Hope, M. Shearman, H. Baxter, A. Chong, S. Kelly, N. Price, Cytotoxicity of prion protein peptide (PrP<sup>106–126</sup>) differs in mechanism from the cytotoxic activity of the Alzheimer's disease amyloid peptide, Aβ<sub>25–35</sub>, *Neurodegeneration* 5 (1996) 1–11.
- [18] K. Tsirolnikov, H. Rezaei, M. Dalgalarondo, J.-M. Chobert, J. Grosclaude, T. Haertlé, Cu(II) induces oligomers with amyloid characteristics in two alleles of recombinant ovine prion proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1764 (2006) 1218–1226.
- [19] H. Rezaei, D. Marc, Y. Choiset, M. Takahashi, G. Hui Bon Hoa, T. Haertlé, J. Grosclaude, P. Debey, High yield purification and physico-chemical properties of full-length recombinant allelic variants of sheep prion protein linked to scrapie susceptibility, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 2833–2839.
- [20] C.M.A. Thuring, L.J.M. van Keulen, J.P.M. Langeveld, M.E.W. Vromans, F.G. van Zijderveld, T. Sweeney, Immunohistochemical distinction between preclinical bovine spongiform encephalopathy and scrapie infection in sheep, *J. Comp. Pathol.* 132 (2005) 59–69.
- [21] K.I. O'Rourke, T.V. Baszler, T.E. Besser, J.M. Miller, R.C. Cutlip, G.A. Wells, S.J. Ryder, S.M. Parish, A.N. Hamir, N.E. Cockett, A. Jenny, D.P. Knowles, Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue, *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 3254–3259.





## Engineering of caseins and modulation of their structures and interactions

Jean-Charles Gaudin<sup>a</sup>, Annabelle Le Parc<sup>a</sup>, Benoit Castrec<sup>a</sup>, Marie-Hélène Ropers<sup>a</sup>,  
Yvan Choiset<sup>a</sup>, Juliya Shchutskaya<sup>a,b</sup>, Reza Yousefi<sup>a,d</sup>, Vladimir I. Muronetz<sup>b</sup>, Yuri Zuev<sup>c</sup>,  
Jean-Marc Chobert<sup>a</sup>, Thomas Haertlé<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UR 1268 Biopolymères Interactions Assemblages, INRA, 44300 Nantes, France

<sup>b</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Lenin's Hills, Moscow, 119992, Russia

<sup>c</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan, P.O. Box 30, 420111, Russia

<sup>d</sup> Department of Biology, College of Sciences, Shiraz University, Shiraz, 71454, Iran

### ARTICLE INFO

Available online 20 May 2009

#### Keywords:

Casein  
Polymerization  
Disulfide bond  
Micellization  
Interfacial properties

### ABSTRACT

$\beta$ -Casein ( $\beta$ -CN) is a milk protein widely used in food industries because of its mild emulsifying properties due to its amphiphilicity. However, the elements determining its micellization behavior in solution and interfacial behavior at the air–water interface are not well known. In order to study how the forced dimerisation influences functional properties of  $\beta$ -CN, recombinant wild-type  $\beta$ -CN was produced and distal cysteinylated forms of recombinant  $\beta$ -CN were engineered. We show that 1) cysteinylated  $\beta$ -CN formed mainly dimers bridged by disulfide bonds; 2) the process of dimerization adds to the micellization process with temperature and is poorly reversible; 3) covalent disulfide linkage forms at the air–water interface at a lower temperature than in bulk. In conclusion, the location of the cysteinylated in the C-terminus or N-terminus or both is of importance for the properties of  $\beta$ -CN.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Caseins are the most abundant milk proteins (80%). Their consumption in food products covers a large range of applications from cheeses and yoghurts to oil-in-water emulsions (Damodaran, 1997). The outstanding emulsifying properties of commercial caseinates are due to the strong surface activities of their two major components,  $\alpha_{s1}$ - and  $\beta$ -caseins (Dagleish, 1997).  $\beta$ -Casein ( $\beta$ -CN) is one of the most abundant caseins (Southward, 1989; Wong et al., 1996).  $\beta$ -CN is a single phosphorylated polypeptide of 209 amino acids residues (molecular mass of ~24 kDa) (Grosclaude et al., 1973) lacking cysteinyl residue. Its N-terminal fragment consists mostly of hydrophilic residues. This part of the molecule contains also all the phosphoserine residues whereas the C-terminal portion is mainly hydrophobic (Rollega, 1992).  $\beta$ -CN is classified in the super family of Intrinsically Unfolded Proteins (IUPs) (Tompa, 2005). Indeed, although some fragments of  $\beta$ -CN have a propensity to fold in distinct secondary structures, the presence of numerous prolyl residues (1/6 of all amino acids) regularly distributed over its sequence, destabilizes any structured fragments and creates the so-called random coil spatial organization of the  $\beta$ -CN molecule (Creamer et al., 1981; Kumosinski et al., 1993). Other concepts concerning the folding of  $\beta$ -CN suggest that it is not a random coil but rather a rheomorphic protein adopting a partially randomized structure.

According to this hypothesis,  $\beta$ -CN and also other caseins, would rather adopt conformations imposed by their environment and protein–protein interactions rather than by medium only (Holt and Sawyer, 1993).

$\beta$ -CN is a flexible and amphiphilic protein, which can concentrate at hydrophobic/hydrophilic interfaces and acts as a surfactant in solution. At the air/water interface, the hydrophobic part of  $\beta$ -CN forms trains of amino acids (Cassiano and Areas, 2003; Husband et al., 1997; Van Hekken and Strange, 1993). In aqueous solutions, it self-associates and forms colloidal aggregates (micelles) (Berry and Creamer, 1975; Andrews et al., 1979; Evans et al., 1979; Schmidt, 1982; Leclerc and Calmettes, 1997; De Kruif and Grinberg, 2002; Mikheeva et al., 2003; O'Connell and De Kruif, 2003). The association of  $\beta$ -CN is reversible, dependent on temperature, pH, ionic strength and  $\beta$ -CN concentration.

Several attempts to modify the primary structure of  $\beta$ -CN were undertaken in order to check the importance of different segments of protein sequence as a factor determining its association (Berry and Creamer, 1975; Evans et al., 1979; Caessens et al., 1999; Farrell et al., 2002; O'Connell et al., 2003). Modifications of the hydrophobic C-terminal and of the hydrophilic N-terminal parts of  $\beta$ -CN molecule, chemically or by site-directed mutagenesis, induce many changes in its micellization properties. For instance, duplication of the six N-terminal amino acids (RELEL) of bovine  $\beta$ -CN (Gangnard et al., 2007) or reversal of the charges in the central portion in human  $\beta$ -CN (Bu et al., 2003) resulted in important changes in association properties. It has been shown that phosphate groups lead by phosphoserines located within the N-terminus are not essential for micellization but their absence impairs the

\* Corresponding author. UR 1268 Biopolymères Interactions Assemblages, INRA, F-44300 Nantes, France. Tel.: +33 2 40 67 50 91; fax: +33 2 40 67 52 44.

E-mail address: [haertle@nantes.inra.fr](mailto:haertle@nantes.inra.fr) (T. Haertlé).



temperature-dependant association of bovine  $\beta$ -CN (Gangnard et al., 2007).

Heterologous protein expression is a powerful tool to produce modified proteins. In the present study, wild-type (WT) and mutants  $\beta$ -CN were produced in *Escherichia coli*. As this host does not realize post-translational modifications, produced  $\beta$ -CN was not phosphorylated. Cysteinyll residues were introduced either at the N-terminal or at the C-terminal end of  $\beta$ -CN, or at both extremities by site-directed mutagenesis, allowing after oxidation, the formation of disulfide bonds between monomers. Disulfide bonds stabilize protein structure and influence the physico-chemical properties as well as functionalities of proteins. For instance, the foaming capacity of lupine seed protein (Pozani et al., 2002), the persistence of viscous and elastic properties of gluten (Shewry and Tatham, 1997), and the modification of interfacial properties of  $\beta$ -lactoglobulin (Kim et al., 2005), are modulated by disulfide bond formation. The aim of this work was to place cysteinyl residues in  $\beta$ -CN sequence and study the effects of “oriented” organizations imposed by the covalent disulfide bonds on the self-association and the behavior at the air–water interface of  $\beta$ -CN.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mutagenesis of bovine $\beta$ -CN

The expression vector pET21-BCasA<sub>2</sub>, a kind gift of Dr. Roger Clegg (Hannah Research Institute, Ayr, UK), encoding WT  $\beta$ -CN (A2 variant) was used as template in a PCR-based mutagenesis strategy. Mutated  $\beta$ -CN cDNAs were synthesized by PCR using the following primers: BCAS01 5'-A CAT GCC **ATG** GGA AGA GAG CTG GAA GAA CTC-3'; BCAS14 5'-GA TAT ACC **ATG** GGA AGA GAG CTG TGT GAA CTC AAT-3'; BCAS5C3 5'-N NNN AAG CTT **TTA** GAC AAT AAT AGG GAA GGG-3'. BCAS3C-Rev 5'-N NNN AAG CTT **TTA** GAC ACA AAT AGG GAA GGG-3' (translation start and stop codons are in bold italicized characters and mutated codons are underlined). BCAS01 and BCAS14 contained NcoI restriction upstream from the translation start ATG codon, and BCAS5C3 and BCAS3C-Rev contained HindIII restriction site downstream from the translation stop TAA codon. BCAS01 was used in combination with BCAS3C-Rev to mutate the isoleucyl residue at position 208 in a cysteinyl residue; BCAS14 was used in combination with BCAS5C3 to introduce a cysteinyl residue at position 4 in replacement of the glutamic acid residue, and BCAS14 was used in combination with BCAS3C-Rev to introduce cysteinyl residues at both positions 4 and 208 (Fig. 1). Amplification was performed in a Touchgene gradient thermocycler (Techne Inc., Princeton, NJ, USA), using a mix of 4 ng of DNA, 25 pmol of each dNTPs, 37 pmol of both primers (Cybergene, Evry, France), the buffer supplied with the DNA polymerase and 1 U *pfu* Turbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in a total volume of 50  $\mu$ L. The program cycling conditions were as follows: 20 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 50 °C and 2 min at 72 °C. PCR fragments were sub-cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) and sequenced (Millegen, Toulouse,

France). The plasmids containing the correctly mutated cDNAs were amplified. These cDNAs encoding mutated  $\beta$ -CN were introduced in the pET21-d expression vector (Novagen, EMD Biosciences, San Diego, CA, USA) by using NcoI and HindIII restriction sites to give p $\beta$ CN-C4, p $\beta$ CN-C208 and p $\beta$ CN-C4-208 expression vectors. Restriction enzymes were purchased from New England Biolabs (Beverly, MA, USA).

### 2.2. Preparation of native and recombinant proteins

Purified native bovine  $\beta$ -CN (A2 variant) was isolated from bulk milk from Prim'Holstein cows. WT and mutated  $\beta$ -CN production was achieved in *E. coli* BL21-DE3 strain (Promega) with expression vectors pET21-BCasA<sub>2</sub>, p $\beta$ CN-C4, p $\beta$ CN-C208, p $\beta$ CN-C4-208 encoding wild type  $\beta$ -CN (wt $\beta$ -CN) and mutated  $\beta$ -CN:  $\beta$ -CN<sub>C4</sub>,  $\beta$ -CN<sub>C208</sub>,  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub>, respectively (Fig. 1). All four recombinant caseins were produced and purified using the same protocol, as previously described (Gangnard et al., 2007) and their purity was checked by SDS-PAGE.

### 2.3. Alkylation and digestion

Recombinant  $\beta$ -CN were diluted at the concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup> in a degassed buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 10 mM dithiothreitol (DTT), 6 M guanidium chloride and incubated 1 h at 45 °C. Iodoacetamide was added to 50 mM final concentration and the mix was incubated for 30 min at room temperature in the dark. The reaction was stopped by addition of 0.1% (v/v) tri-fluoro-acetic acid (TFA). Carbamido-methylated samples were purified by reversed phase chromatography (Nucleosil C<sub>18</sub> 3.9  $\times$  150 mm column, Waters SAS, Guyancourt, France) and eluted in 0.08% (v/v) TFA, 80% (v/v) acetonitrile. TFA and acetonitrile were evaporated under vacuum. Carbamido-methylated proteins (100  $\mu$ L at 0.16  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) were digested with a molar ratio of 0.5% trypsin (Promega, Madison, USA) for 4 h at 37 °C in the dark. The reaction was stopped by addition of 0.1% v/v formic acid. Digestion products were analyzed by mass-spectrometry.

### 2.4. Mass spectrometry

Mass spectra of recombinant caseins and products from tryptic digestion of alkylated recombinant caseins were performed by electrospray ionization in an ion trap spectrometer (LCQ Advantage, Thermo-Fisher, San Jose, USA), equipped with an electrospray ionization source and operated in the positive ion mode. Protein samples were solubilized at a concentration of 5 nmol mL<sup>-1</sup> with an aqueous mixture of water and acetonitrile (1:1, v/v) acidified with 0.1% formic acid. Samples were infused into the mass spectrometer at a continuous flow rate of 2.5  $\mu$ L min<sup>-1</sup>. Mass data were acquired using the X-Calibur software (Thermo-Fisher) on the mass-to-charge (*m/z*) range 600–2000. Mass spectrometry analyses were performed within the RIO platform “Biopolymers-Interaction-Structural Biology” located at the INRA Center of Nantes (UR1268, Biopolymères Interactions Assemblages. INRA. F-44300 Nantes).

### 2.5. Oligomerization assays

Lyophilized recombinant  $\beta$ -CN were solubilized in 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 1 mM EDTA, 0.05% (w/v) NaN<sub>3</sub> at a concentration of 1, 5 and 10 mg mL<sup>-1</sup>. They were incubated at 4 °C or 20 °C with or without the addition of NaCl (till 100 mM final concentration). Polymerization degree was analyzed by loading 5  $\mu$ g of proteins on 12% SDS-PAGE in reducing (in the presence of 3%  $\beta$ -mercaptoethanol) or non-reducing conditions.



**Fig. 1.** Sequences of native, recombinant wild-type and mutated  $\beta$ -CN. The N-terminus and C-terminus of wild-type (wt) and mutated recombinant  $\beta$ -CN are shown and compared to the sequence of native (nat)  $\beta$ -CN. Additional residues are indicated by underlined italicized letters and cysteinyl residues introduced in bold-underlined letters. The position of the mutated residues is indicated as well as phospho-seryl residues.

## 2.6. Dynamic light scattering (DLS)

Hydrodynamic diameters of the different supramolecular states of recombinant  $\beta$ -CN were measured by DLS using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). Lyophilized  $\beta$ -CN ( $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) were solubilized in 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 80 mM NaCl for 24 h at 4 °C. Samples of  $\beta$ -CN were transferred to low-volume spectroscopic plastic cells and put in a thermostated instrument changing temperature from 20 °C to 50 °C or from 50 °C to 20 °C by steps of 5 °C (equilibration time 10 min). The experiment was realized in the absence and in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol (molar ratio  $\beta$ -mercaptoethanol/protein = 1000). The hydrodynamic diameters of produced  $\beta$ -CN were measured in triplicate. Each measurement corresponded to five auto-correlation functions recorded during 40 s. The viscosity and the refractive index of the solvent were those of water, known to change with the temperature. The index of protein was set at 1.45, independently of the temperature. The angle of the laser beam was 173°. The CONTIN method was used to calculate the radii from the auto correlation data. The experiment was realized in duplicate for each sample.

## 2.7. Fluorescence spectroscopy

Fluorescence spectra were measured with a Hitachi F-4500 spectrofluorimeter fitted with a right angle holder. The slit widths were set at 2.5 nm in emission and 5.0 nm in excitation pathways.  $\beta$ -CN were solubilized as described above and the concentration adjusted to  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ . They were placed in quartz cuvettes with optical pathway of 1 cm. The spectra were collected in triplicate at temperatures varying from 20 °C to 50 °C or from 50 °C to 20 °C every 5 °C. After each measurement the temperature was stabilized for 15 min. Emission spectra were recorded between 315 nm and 390 nm, every 1 nm, with excitation wavelength set at 298 nm. The fluorescence emission of tryptophanyl residue shows a blue shift when its local environment becomes more hydrophobic (Lakowicz, 1999). The scan speed was set at  $60 \text{ nm min}^{-1}$ .

## 2.8. Characterization of $\beta$ -CN at the air–water interface

Interfacial properties of the different  $\beta$ -CN were characterized at the air–water interface on a Langmuir trough (Nima 601, Nima Technology, England) equipped with a Wilhelmy plate for monitoring the surface tension. The film pressure is defined as the difference between the surface tension measured at the air–liquid interface and the surface tension measured at the air–liquid interface covered by the protein film. The area occupied at the interface by  $\beta$ -CN is modulated by means of two movable Teflon barriers. It corresponds to the reverse of the surface density and was recorded simultaneously with the film pressure. It was calculated per molecule according to the data deduced

from mass spectrometry. The curves exhibiting the film pressure versus the area are called isotherms of compression. Experiments were conducted as follows. One day before the measurements, lyophilized  $\beta$ -CN were solubilized at a concentration of  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  in 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 80 mM NaCl during 24 h at 4 °C.  $\beta$ -CN samples ( $70 \mu\text{L}$  at  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  checked by UV–visible spectrometry at 280 nm) were spread on the sub-phase (500 mL of 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 containing 80 mM NaCl) maintained at 17 °C. We took care to spread the protein solution in the same way for all measurements in order to avoid discrepancies due to the formation history of the film. After 30 min of equilibrium, the film was compressed and decompressed with a speed of  $40 \text{ cm min}^{-1}$ . The temperature was then increased to 33 °C (temperature measured in the subphase) and the film was left for 45 min till equilibrium. The film was once again compressed then decompressed.

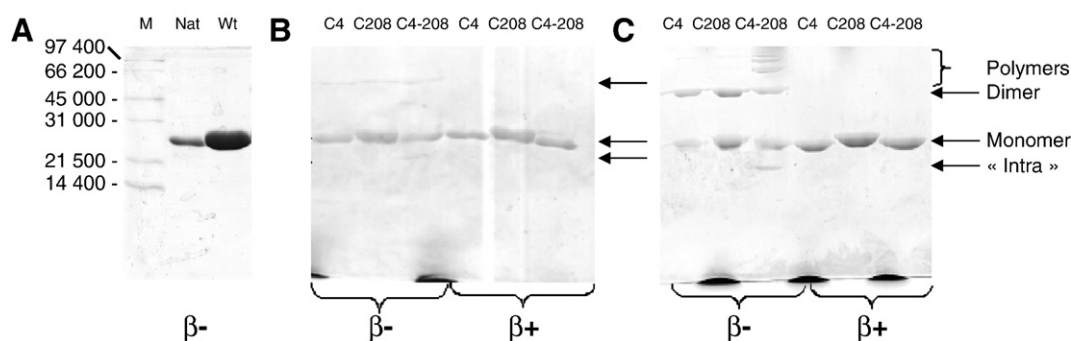
## 3. Results and discussion

### 3.1. Characterization of recombinant $\beta$ -CN

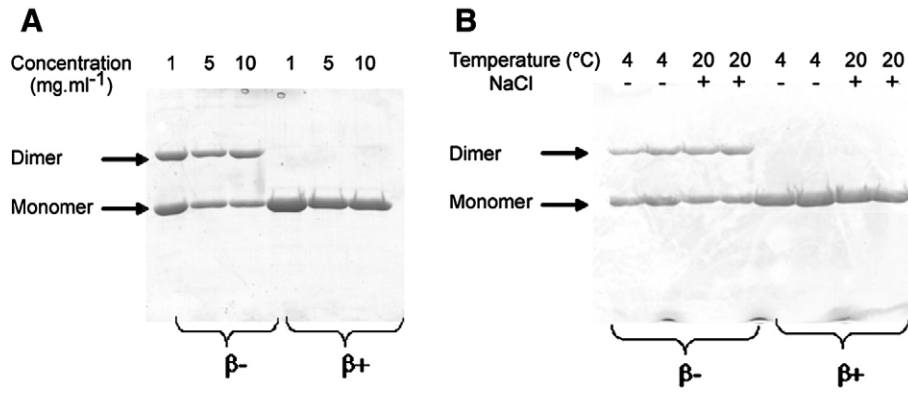
As compared to native  $\beta$ -CN, the sequence of wt $\beta$ -CN encoded by the expression vector has a N-terminal additional methionyl residue and sequences of cysteinylated  $\beta$ -CN have an additional N-terminal M-G dipeptide. From mass spectrometry spectra of recombinant proteins produced in *E. coli*, the measured molecular mass of wt $\beta$ -CN was similar to the theoretical mass whereas in the case of all other mutated  $\beta$ -CN a  $D$  of  $-131.5 \text{ g mol}^{-1}$  was observed between measured and theoretical molecular masses (data not shown). This difference corresponds to the excision of the N-terminal methionine in the mutated caseins. Consequently, as compared with native  $\beta$ -CN, produced mutated  $\beta$ -CNs have only one N-terminal additional glycylic residue (Fig. 1). The presence of a glycylic residue just downstream from the N-terminal methionine in proteins produced in *E. coli* is known to induce the frequent elimination of the methionine (Hirel et al., 1989). The addition of cysteinyl residues in the sequence of the mutated  $\beta$ -CN has also been confirmed by measuring the molecular mass of carbamido-methylated derivatives of the different mutant proteins (data not shown). The purity of produced wt $\beta$ -CN and its mutants was higher than 95% as attested by mass spectrometry.

### 3.2. Study of cysteinylated $\beta$ -CN polymerization

Samples of native  $\beta$ -CN, wt $\beta$ -CN and all three mutated  $\beta$ -CN were dissolved and immediately loaded on SDS-PAGE or incubated at 4 °C for 24 h before SDS-PAGE analysis under reducing and non-reducing conditions (Fig. 2). After incubation, in non-reducing conditions, native  $\beta$ -CN and wt $\beta$ -CN showed a unique band on the gel at about 23,000 Da (Fig. 2A) indicating that both proteins are present as monomers in solution. In the same conditions, immediately after



**Fig. 2.** Polymerization of recombinant and mutated  $\beta$ -CN. Lyophilized  $\beta$ -CN solubilized at  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  in 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 1 mM EDTA, 0.05% sodium azide were analyzed on 12% SDS-PAGE immediately (B) or after 24 h incubation at 4 °C (A and C) in reducing ( $\beta$ +) and non-reducing ( $\beta$ -) conditions. Nat = native  $\beta$ -CN, Wt = wt $\beta$ -CN, C4 =  $\beta$ -CN<sub>C4</sub>, C208 =  $\beta$ -CN<sub>C208</sub> and C4-208 =  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub>. M: molecular mass marker ("Low Molecular Range", Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).



**Fig. 3.** Influence of protein concentration, temperature and ionic strength on recombinant and mutated  $\beta$ -CN polymerization. Lyophilized  $\beta$ -CN<sub>C208</sub> mutant was solubilized in 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 1 mM EDTA, 0.05% sodium azide and incubated 24 h before analysis on 12% SDS-PAGE in reducing ( $\beta$ +) and non-reducing ( $\beta$ -) conditions. (A) Protein was solubilized at various concentrations (1, 5 and 10 mg mL<sup>-1</sup>). (B) Incubation was performed at 4 °C or 20 °C with (+) or without (-) the addition of NaCl (100 mM final concentration).

dissolution or after 24 h incubation at 4 °C, all mutant caseins showed the same predominant visible band on the gel (Fig. 2B and C), indicating that mutant  $\beta$ -CNs are mainly present as monomers in solution. Nevertheless, much thinner additional bands of higher relative mass were also distinguished in the case of single mutants  $\beta$ -CN<sub>C4</sub> and  $\beta$ -CN<sub>C208</sub>, as well as very thin bands of lower relative mass and higher relative mass in the case of the double mutant  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub>. The analysis, in the same conditions, of the samples obtained after 24 h incubation at 4 °C, showed an increased intensity of the additional bands (compare Fig. 2B and C). Because all  $\beta$ -CN mutants are monomeric in reducing conditions, these bands could be attributed to the formation of  $\beta$ -CN dimers (all mutants) and larger  $\beta$ -CN polymers (double-mutant only) by disulfide bond linkage. In the case of the double mutant  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> the band with a lower relative mass disappearing in reducing conditions can be attributed to a “circularized” form of  $\beta$ -CN due to intra-molecular disulfide bond formation.

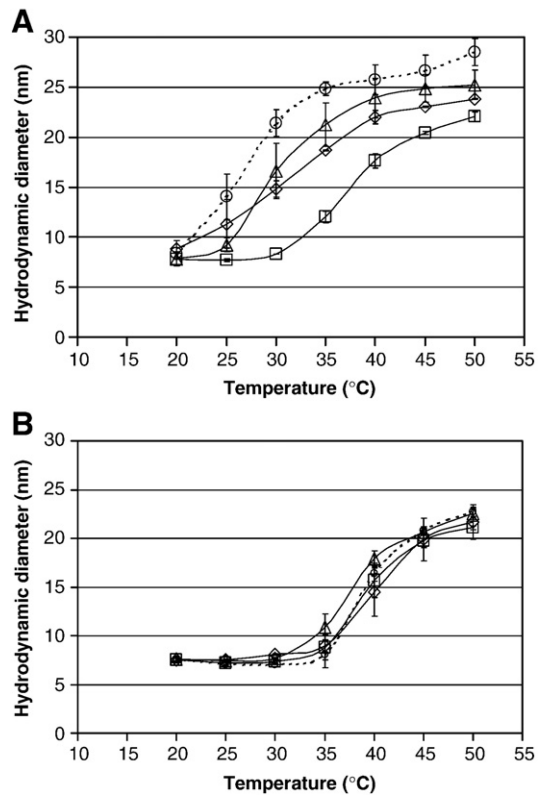
The proportion dimer/monomer was almost identical in both cases indicating that, in the applied conditions, the position of the cysteine has not great influence on disulfide bond formation. Longer incubations at 4 °C did not allow to observe higher proportion of dimers or polymers (only in the case of the double mutant) indicating that the equilibrium of the reaction has been reached within 24 h.

In order to increase the dimerization and polymerization yields of mutated  $\beta$ -CN, experiments were repeated by increasing the protein concentration up to 10 mg mL<sup>-1</sup>, the temperature to 20 °C and the ionic strength to an equivalent of 100 mM NaCl. As shown in Fig. 3, in the case of  $\beta$ -CN<sub>C208</sub>, none of these factors had a significant effect on the yield of dimer formation. Thus, they did not influence significantly the disulfide bond formation yield. The same results were obtained with  $\beta$ -CN<sub>C4</sub> and  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> mutants (data not shown).

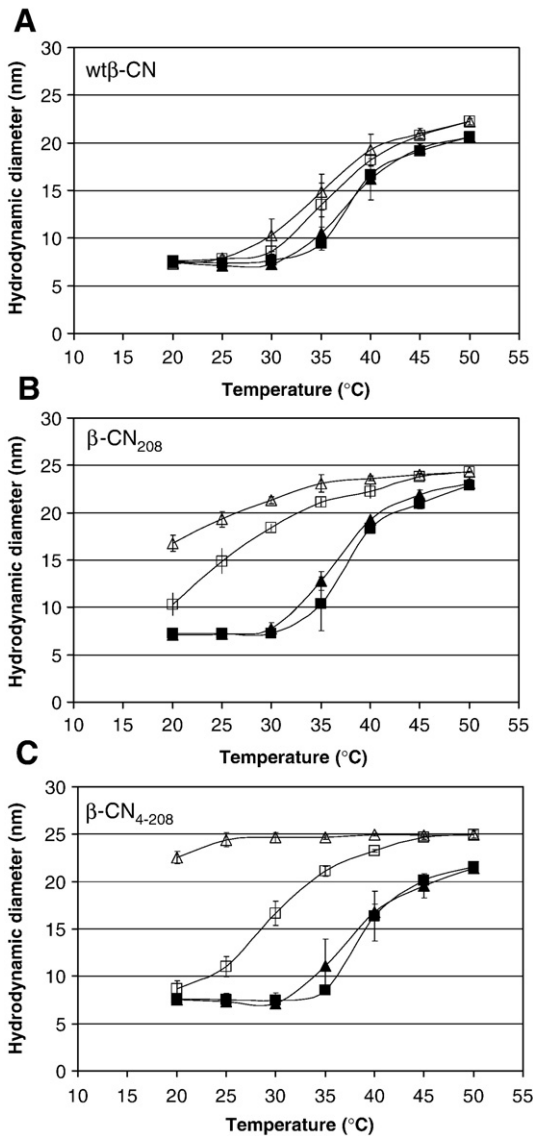
**3.3. Characterization of cysteinylated  $\beta$ -CN micellization by DLS**

DLS results show the micellization behavior of  $\beta$ -CN (wt and mutated) in solution at 0.5 mg mL<sup>-1</sup> as a function of temperature (from 20 to 50 °C), in oxidative and in reducing conditions (Fig. 4). In non-reducing conditions, at low temperatures, in all studied samples,  $\beta$ -CNs are characterized by an hydrodynamic diameter ( $D_H$ ) of particles of about 8 nm at 20 °C, that corresponds to the expected size of the monomer (Fig. 4A). During these experiments, the population and the size of dimers (and oligomers) could not be distinguished precisely since  $D_H$  represents the size of the sphere that encompasses the molecule. As temperature increased,  $D_H$  shifted to higher values ranging from 22 to 28 nm in all the samples. The population with larger size corresponds to micellization of monomers appearing at a critical temperature. In the case of wt $\beta$ -CN, micelles appeared at 30 °C with a  $D_H$  reaching 22 nm at

50 °C. In the case of cysteinylated  $\beta$ -CN, micelles appeared at a lower temperature (just above 20 °C). In this case, the value of  $D_H$  at 50 °C (24–28 nm) was a little bit larger than that observed in the case of wt $\beta$ -CN. The behavior of wt $\beta$ -CN was identical in the presence or absence of a reducing agent indicating that it has no effect on wt $\beta$ -CN micellization (Fig. 4B). In reducing conditions, cysteinylated  $\beta$ -CN had a similar behavior to that of wt $\beta$ -CN indicating that the differences observed in oxidative state were not due to the presence of cysteinyl residues in their sequences but rather to the presence of disulfide linked dimers and oligomers of  $\beta$ -CN.



**Fig. 4.** Hydrodynamic diameter of recombinant wild-type and mutated  $\beta$ -CN. The  $D_H$  of wt $\beta$ -CN ( $\square$ ),  $\beta$ -CN<sub>C4</sub> ( $\Delta$ ),  $\beta$ -CN<sub>C208</sub> ( $\diamond$ ) and  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> ( $\circ$ ) diluted at 0.5 mg mL<sup>-1</sup> in 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 80 mM NaCl was measured as a function of temperature in non-reducing (A) and in reducing conditions (B).



**Fig. 5.** Reversibility of mutated β-CN aggregation measured by DLS. The  $D_H$  of wtβ-CN (A), β-CN<sub>C208</sub> (B) and β-CN<sub>C4-208</sub> (C) diluted at 0.5 mg mL<sup>-1</sup> in 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 80 mM NaCl was measured in non-reducing (white filled symbols) and in reducing conditions (black filled symbols) as a function of temperature from 20 to 50 °C (□) and then from 50 to 20 °C (Δ).

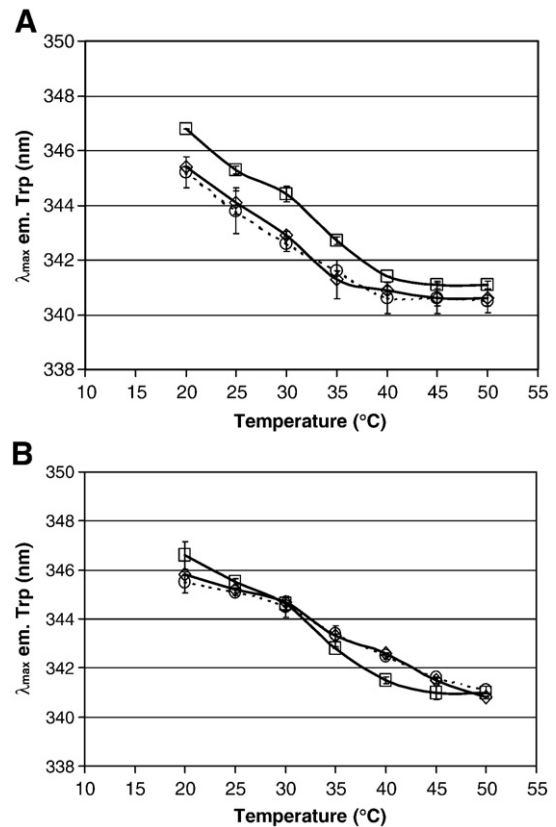
The reversibility of the phenomenon was studied in non-reducing and reducing conditions (Fig. 5). The micellization of wtβ-CN was totally reversible in both conditions (Fig. 5A). In non-reducing conditions the micellization of β-CN<sub>C208</sub> was only partially reversible (Fig. 5B) and the micellization of β-CN<sub>C4-208</sub> was poorly reversible (Fig. 5C). Indeed, after cooling from 50 to 20 °C the  $D_H$  obtained were 16 nm and 22 nm for β-CN<sub>C208</sub> and β-CN<sub>C4-208</sub>, respectively, instead of 8–10 nm before heating from 20 to 50 °C. On the contrary, the micellization of those mutant proteins was totally reversible in reducing conditions, indicating that the observed effects are due to the formation of disulfide bonds between protein monomers. It can be speculated that formation of disulfide bond between β-CN molecules during the micellization process stabilizes the overall micelle structure. The results obtained with β-CN<sub>C4</sub> in non-reducing conditions are not shown because the heating of the protein at 50 °C (duration of about 30 min) caused the irreversible precipitation of the protein. It should be indicated that this single mutant protein generated larger micelles with higher formation rate in non-reducing conditions than the β-CN<sub>C208</sub> single mutant (Fig. 4A). In the case of β-CN<sub>C4</sub> mutant it

can be speculated that precipitation is caused by cross-linking of adjacent micelles by disulfide bond formation.

In conclusion, these DLS experiments demonstrate that the formation of dimers or polymers by disulfide bonds modifies (even radically in the case of β-CN<sub>C4</sub>) the temperature-induced micellization behavior of β-CN in solution.

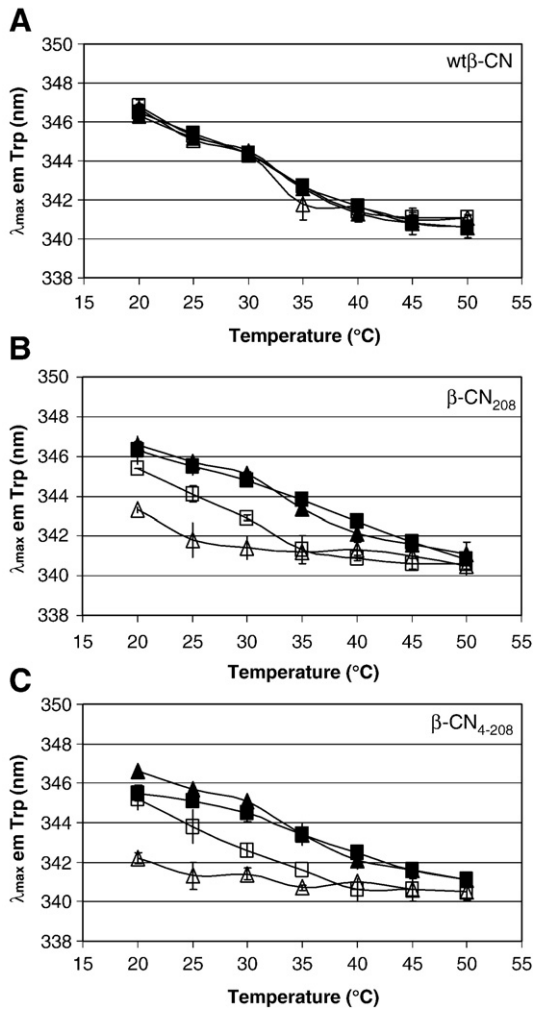
#### 3.4. Characterization of cysteinylated β-CN micellization by fluorescence spectroscopy

β-CN contains a tryptophanyl residue in position 143 of its sequence. The value of  $\lambda_{\max}$  Trp depends on the environment of the tryptophanyl residue. A change in the environment (more or less hydrophobic) due to the modification of the structures (secondary and/or tertiary) of the protein causes a shift of the  $\lambda_{\max}$  Trp wavelength. In the case of wtβ-CN,  $\lambda_{\max}$  Trp was observed at 20 °C (Fig. 6A). The heating of the protein from 20 °C to 50 °C caused a shift of the  $\lambda_{\max}$  Trp values from 347 nm to 341 nm. This demonstrates the more hydrophobic Trp<sub>143</sub> environment at 50 °C than at 20 °C. β-CN<sub>C208</sub> and β-CN<sub>C4-208</sub> presented similar curves of  $\lambda_{\max}$  Trp variations (Fig. 6A) during heating in comparison to wtβ-CN. However, their  $\lambda_{\max}$  Trp were slightly smaller than that of β-CN indicating that, whatever the temperature, Trp<sub>143</sub> is in a more hydrophobic environment in mutants than in wtβ-CN. No full measurement of  $\lambda_{\max}$  Trp could be performed in the case of β-CN<sub>C4</sub> because at temperature higher than 40 °C the solution became slightly opalescent, confirming the DLS observations. Under reducing conditions (Fig. 6B), wtβ-CN, β-CN<sub>C208</sub> and β-CN<sub>C4-208</sub> showed similar  $\lambda_{\max}$  Trp profiles confirming that the differences observed with β-CN<sub>C208</sub> and β-CN<sub>C4-208</sub> as compared to wtβ-CN are mainly due to the formation of disulfide bonds.



**Fig. 6.** Changes of  $\lambda_{\max}$  Trp of recombinant wild-type and mutated β-CN.  $\lambda_{\max}$  Trp of wtβ-CN (□), β-CN<sub>C208</sub> (◇) and β-CN<sub>C4-208</sub> (○) diluted at 0.5 mg mL<sup>-1</sup> in 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 80 mM NaCl was measured by fluorescence spectroscopy as a function of temperature (20–50 °C) in non-reducing (A) and in reducing conditions (B).

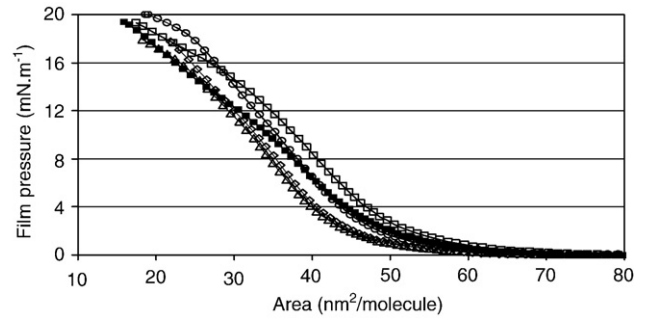




**Fig. 7.** Reversibility of aggregation of mutated  $\beta$ -CNs measured by fluorescence spectroscopy.  $\lambda_{\max}$  Trp of wt $\beta$ -CN (A),  $\beta$ -CN<sub>C208</sub> (B) and  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> (C) diluted at 0.5 mg mL<sup>-1</sup> in 50 mM Tris-HCl, pH 8.2, 80 mM NaCl was measured in non-reducing (white filled symbols) and in reducing conditions (black filled symbols) as a function of temperature from 20 to 50 °C (□) and then from 50 to 20 °C (Δ).

The reversibility of  $\beta$ -CN micellization has been also investigated by spectrofluorimetry (Fig. 7). In non-reducing conditions, the changes of wt $\beta$ -CN structure during micellization are totally reversible during the cooling (Fig. 7A). In the same conditions,  $\beta$ -CN<sub>C208</sub> and  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> behaved differently (Fig. 7B and C). During cooling,  $\lambda_{\max}$  Trp did not recover its initial value indicating that micellization of mutated  $\beta$ -CN is not fully reversible, especially for  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> when  $\lambda_{\max}$  Trp remains lower than that observed in the case of  $\beta$ -CN<sub>C208</sub>. In reducing conditions, all proteins behaved the same. These observations agree well and confirm data obtained by DLS. The reversibility of  $\beta$ -CN micellization was particularly impaired when cysteinyl residues were added in its sequence, especially in the case of the two mutants  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> and  $\beta$ -CN<sub>C4</sub>. Reinforcing the hydrophobic interactions in the C-terminal part of the molecule ( $\beta$ -CN<sub>C208</sub> mutant) did not produce so strong effect. The more pronounced one was obtained when two N-terminal extremities of  $\beta$ -CN were linked, indicating that electrostatic interactions between the N-terminal extremities of  $\beta$ -CN molecules have a destabilizing effect on  $\beta$ -CN micelle.

It must be pointed out that the variation of the  $\lambda_{\max}$  Trp with temperature does not match the variations in size, especially for wt $\beta$ -CN. In this case,  $D_H$  values increased around 30 °C whereas the values of  $\lambda_{\max}$  Trp decreased just above 20 °C. It means that the structure of proteins begins to change already before the appearance of first micelles and/or dimers.



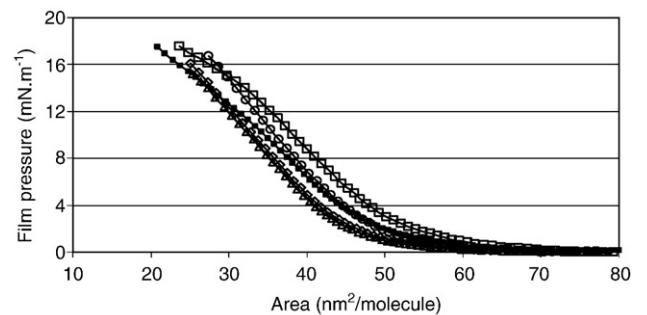
**Fig. 8.** Isotherms of compression at 17 °C of native  $\beta$ -CN (■), wt $\beta$ -CN (□),  $\beta$ -CN<sub>C4</sub> (○),  $\beta$ -CN<sub>C208</sub> (Δ) and  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> (◇).

### 3.5. Interfacial properties of mutated $\beta$ -CN

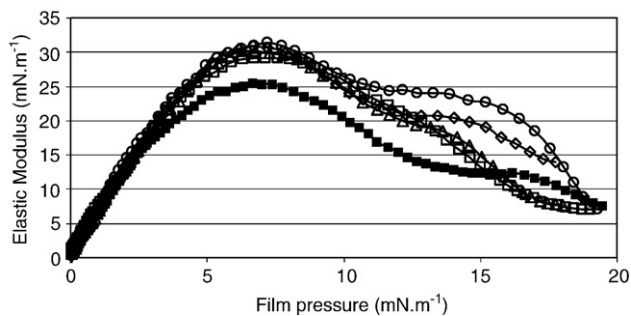
#### 3.5.1. Isotherms of compression

Interfacial properties of  $\beta$ -CN<sub>C4</sub>,  $\beta$ -CN<sub>C208</sub>,  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub>, wt $\beta$ -CN and native  $\beta$ -CN were compared at 17 °C and 33 °C in non-reducing conditions where  $\beta$ -CN mutants display different aggregative properties in bulk. The isotherms of compression at 17 °C are shown in Fig. 8. It appears clearly that each modification performed on  $\beta$ -CN leads to a modification of the surface activity of proteins. The main features are as follows: (i) wt $\beta$ -CN covers a larger surface area than native  $\beta$ -CN and mutants; (ii)  $\beta$ -CN<sub>C208</sub> and  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> display similar isotherms of compression on a wide range of area and pressures; (iii)  $\beta$ -CN<sub>C4</sub> covers a larger surface area than the two other mutants  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> and  $\beta$ -CN<sub>C208</sub>; (iv) the slopes of the isotherms of the three mutants are similar, indicating that the compressibilities of the layer are different. As the decompression isotherms overlapped the compression isotherms, the organizations of the different forms of  $\beta$ -CN at the air-water interface could be considered as reversible in the investigated pressure range. This allowed us to perform the isotherms of compression at 33 °C with the film spread at 17 °C. Increasing temperature from 17 to 33 °C did not modify the surface activity of proteins, even for mutants (Fig. 9). We would have expected to get a reduced area by increasing temperature since the formation of intra molecular disulfide bonds would impair the unfolding of casein that is known to be very flexible. However there is no reduction of area. The decrease in area is observed only between the different forms of caseins.

In salt concentration conditions used (80 mM NaCl), the attractive and repulsive interactions are screened by the salt. Hence, the changes in interfacial behavior observed between wt $\beta$ -CN,  $\beta$ -CN<sub>C4</sub>,  $\beta$ -CN<sub>C208</sub> and  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> can not be explained by the differences in charges carried by all forms of  $\beta$ -CN. However, the small differences in the sequence must be kept in mind. The lack of phosphorylated sites on the hydrophilic part of wt $\beta$ -CN and the appearance of an additional



**Fig. 9.** Isotherms of compression at 33 °C of native  $\beta$ -CN (■), wt $\beta$ -CN (□),  $\beta$ -CN<sub>C4</sub> (○),  $\beta$ -CN<sub>C208</sub> (Δ) and  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> (◇).



**Fig. 10.** Elastic moduli at 17 °C of native  $\beta$ -CN (■), wt $\beta$ -CN (□),  $\beta$ -CN<sub>C4</sub> (○),  $\beta$ -CN<sub>C208</sub> (△) and  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> (◇) as a function of the film pressure.

residue enables it to occupy better the interface. The lack of phosphorylated sites decreases the interactions with water. The peptides without phosphorylated sites, as well as the additional apolar methionyl residue are less in contact with water and place themselves preferentially at the interface, thus increasing the occupied area in comparison to native  $\beta$ -CN. The replacement of methionine by glycine increases the polarity at the N-terminus and decreases the number of large apolar residues in mutants. This tends to decrease the area occupied by mutants at the interface in comparison to wt $\beta$ -CN. The replacement of a large apolar residue, isoleucine, at the position 208 for a smaller apolar cysteine does not change significantly the polarity of the C-terminus part but can reduce slightly the area occupied at the interface. These two changes could explain the smallest area occupied by  $\beta$ -CN<sub>C208</sub> and  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> at the interface. The introduction of the cysteinyl residue in position 4 in replacement to the residue glutamate contributes to decrease the polarity at the interface. In the case of  $\beta$ -CN<sub>C4</sub>, the changes act in opposite directions in comparison to wt $\beta$ -CN and may explain the smaller decrease in area at low pressures and the increase in area at high pressures. However, the shift in area is too large (up to 7 nm<sup>2</sup>/molecule) to claim that two residues among 209 amino acids are responsible for such a decrease. We assume that the spreading of molecules at the interface promotes, even at low temperatures, the formation of S–S bonds owing to the better opening of the structure at interfaces. If so, the smaller area for  $\beta$ -CN<sub>C208</sub> and  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> can be explained by the formation of disulfide bonds among the apolar groups located at the interface. The dimerization by C208 cysteine residues brings in contact hydrophobic ends of caseins and creates in some sense an extra “hydrophobic core” that prevents caseins to evolve freely at interfaces. The dimerization by C4 cysteine residues is also thought to occur. It concerns the N-terminus part weakly or not located at the interface and for which the experiments performed at the air–water interface are less sensitive. This idea is supported by the fact that at higher rate of compression, the area occupied by  $\beta$ -CN<sub>C4</sub> is higher than that of wt $\beta$ -CN. This can be understood in considering that the force (proportional to pressure) required to decrease area is higher between molecules bound by S–S bonds than devoid of inter molecular disulfide bonds. This corroborates also the fact that the slopes are identical at high pressures for  $\beta$ -CN<sub>C4</sub> and  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> on one hand and identical at low pressures for  $\beta$ -CN<sub>C208</sub> and  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> on the other hand. As a consequence, both locations of cysteinylations may act on compacity at the interface but at different interfacial densities. The graft of cysteinyl residues at several positions may also induce changes in organizations at the air–water interface that are well seen in considering the surface elasticities.

### 3.5.2. Surface elasticity

The elastic moduli  $E$  of the different forms of  $\beta$ -CN (Fig. 10) were deduced from Fig. 8, according to the relation  $E = -A^* d\pi/dA$  where  $A$  is the interfacial area and  $\pi$  the surface pressure. The shapes of the curve showing  $E$  versus  $\pi$  for all  $\beta$ -CN forms are characterized by one or two local maxima. The physical meaning of the first local maximum

was recently confirmed for native form of  $\beta$ -CN as the signature of the beginning of the train and loop formation (Noskov et al., 2007). Because  $\beta$ -CN is a flexible polypeptide with no tertiary structure and insignificant secondary structure,  $\beta$ -CN is schematically represented as a multiblock copolymer with a few hydrophilic and hydrophobic blocks (Aguie-Beghin et al., 1999; Aschi et al., 2001; Hambardzumyan et al., 2003; Noskov et al., 2007). Its adsorption is usually described as the formation of pancakes (Graham and Phillips, 1979; Gau et al., 1994; Mellema et al., 1998; Ague-Beghin et al., 1999; Aschi et al., 2001; Cicuta and Hopkinson, 2001; Patino et al., 2001; Hambardzumyan et al., 2003, 2004; Maldonado-Valderrama et al., 2003; Benjamins et al., 2006). The surface layer is essentially constituted as trains without loops. The increase of surface concentration leads to a repulsion of adsorbed segments and to an increase in the surface elasticity. When the film pressure further increases, some hydrophilic segments begin to be displaced from the proximal region of the surface layer and forms trains and loops. The film relaxes and the surface elasticity decreases. The formation of the first maximum is usually explained by a conformational transition from all trans conformation to trains with tails or loops (Graham and Phillips, 1979; Gau et al., 1994; Mellema et al., 1998; Ague-Beghin et al., 1999; Aschi et al., 2001; Cicuta and Hopkinson, 2001; Hambardzumyan et al., 2003, 2004; Maldonado-Valderrama et al., 2003, 2005; Lucassen-Reynders et al., 2004; Noskov et al., 2007). The further increase of the film pressure brings the hydrophobic parts in contact with each other and the surface elasticity increases again. When the hydrophobic parts start to penetrate into the subphase, the elasticity decreases again (Noskov et al., 2007). Having in mind the description of the conformational change of native  $\beta$ -CN molecules at the interface, it is possible to discuss the changes observed in Fig. 10. The modifications performed on recombinant and mutant forms of  $\beta$ -CN molecules affect essentially the appearance of the second local peak that is associated to the squeezing out of more hydrophobic segments. It shifts to lower film pressure values in proportions depending on the localization of the modified sites. For wt $\beta$ -CN, the second maximum of the elastic modulus appears as a shoulder of the first one, i.e., at lower film pressures. Thus the lack of phosphorylated sites as well as the additional methionyl residue contribute to the increase of interactions between the hydrophobic parts within the molecule, and thus to reduce the pressure of squeezing out from the interface. The cysteinylations shifts the second peak to higher film pressures in the order  $\beta$ -CN<sub>C208</sub> ~  $\beta$ -CN<sub>C4-208</sub> <  $\beta$ -CN<sub>C4</sub>. This can be interpreted by the steric constraints generated by the S–S linkage. In the case of cysteinylations in position 4, the S–S bonds are located deeper in water but act at high film pressures on the compressibility of the protein layer. For the cysteinylations in position 208, the S–S segments are present with apolar residues at the air–water interface and favor the formation of an extra hydrophobic core that is removed in water during compression.

**Table 1**

Main features of recombinant  $\beta$ -CN and mutant forms in the bulk and at the air–water interface.

Protein	Bulk properties between 20 and 50 °C		Interfacial properties
	Micellization	Micellization reversibility	Interfacial properties (Referred to wild-type)
wt $\beta$ -CN	30 °C	+++	Covalent disulfide linkage underneath the interface More or less compact
$\beta$ -CN <sub>C4</sub>	25 °C	–	
$\beta$ -CN <sub>C208</sub>	<25 °C	+	Covalent disulfide linkage at the interface More compact
$\beta$ -CN <sub>C4-208</sub>	<25 °C	+/-	Covalent disulfide linkage at the interface More compact

## 4. Conclusions

The introduction of cysteinyl residues within the N-terminus and/or the C-terminus parts of  $\beta$ -CN induces the dimerization (single and double mutants) and polymerization (double mutant) of the molecule by covalent disulfide linkage. All results are summarized in Table 1. Mutants showed micellization behavior different from wt $\beta$ -CN that is temperature-controlled. The reversibility of  $\beta$ -CN micellization was particularly impaired in the presence of cysteinyl residues. In contrary to bulk properties, the interfacial behavior was not sensitive to temperature. The interface seems to promote the dimerization of mutants at lower temperature than in the bulk. The obtained results may imply that cysteines should be considered as critical residues in the modulation of  $\beta$ -CN aggregation and surface properties with the cysteinylation of either its N- or C-terminus part or both of them.

## Acknowledgements

Vladimir I. Muronetz and Yuri Zuev express their gratitude for funding by French Ministry of Foreign Affairs awarded by SCAC in French Embassy in Moscow and for funding from Programme of Russian Academy of Sciences “Molecular and Cellular Biology”. We thank the RIO platform “Biopolymers-Interaction-Structural Biology” located at the INRA Centre of Nantes (UR 1268, Biopolymères Interactions Assemblages. INRA. F-44300 Nantes; [http://www.nantes.inra.fr/plateformes\\_et\\_plateaux\\_techniques/plateforme\\_bibs](http://www.nantes.inra.fr/plateformes_et_plateaux_techniques/plateforme_bibs)) for the mass spectrometry facilities. We present our thanks to Alain Riaublanc (INRA Nantes) for his advices and constructive discussions.

## References

- Aguié-Beghin V, Leclerc E, Daoud M, Douillard R. Asymmetric multiblock copolymers at the gas–liquid interface: phase diagram and surface pressure. *J Colloid Interface Sci* 1999;214:143–55.
- Andrews AL, Atkinson D, Evans MT, Finer EG, Green JP, Phillips MC, et al. The conformation and aggregation of bovine beta-casein A. I. Molecular aspects of thermal aggregation. *Biopolymers* 1979;18:1105–21.
- Aschi A, Gharbi A, Bitri L, Calmettes P, Daoud M, Aguié-Beghin V, et al. Structure and properties of adsorption layers of beta-casein formed from guanidine hydrochloride rich solutions. *Langmuir* 2001;17:1896–904.
- Benjamins J, Lyklema J, Lucassen-Reynders EH. Compression/expansion rheology of oil/water interfaces with adsorbed proteins. Comparison with the air/water surface. *Langmuir* 2006;22:6181–8.
- Berry GP, Creamer LK. The association of bovine beta-casein. The importance of the C-terminal region. *Biochemistry* 1975;14:3542–5.
- Bu H, Sood SM, Slattery CW. The effect of conserved residue charge reversal on the folding of recombinant non-phosphorylated human [beta]-casein. *Arch Biochem Biophys* 2003;419:244–50.
- Caessens PW, Jongh HH, Norde W, Gruppen H. The adsorption-induced secondary structure of beta-casein and of distinct parts of its sequence in relation to foam and emulsion properties. *BBA Protein Struct M* 1999;1430.
- Cassiano MM, Areas JAG. Dependence of the interfacial behavior of beta-casein on phosphoserine residues. *J Dairy Sci* 2003;86:3876–80.
- Cicuta P, Hopkinson I. Studies of a weak polyampholyte at the air–buffer interface: the effect of varying pH and ionic strength. *J Chem Phys* 2001;114:8659–70.
- Creamer LK, Richardson T, Parry DAD. Secondary structure of bovine alpha s1- and beta-casein in solution. *Arch Biochem Biophys* 1981;211:689–96.
- Dalgleish DG. Structure–function relationships of caseins. In: Damodaran S, editor. *Food proteins and their applications*. New-York: Marcel Dekker; 1997. p. 199–23.
- Damodaran S. *Food proteins and their applications*. In: Damodaran S, editor. *Food proteins and their applications*. New York: Marcel Dekker; 1997.
- De Kruijff CG, Grinberg VY. Micellisation of [beta]-casein. *Colloids Surf A* 2002;210:183–90.
- Evans MT, Phillips MC, Jones NM. The conformation and aggregation of bovine beta-casein. Thermodynamics of thermal association and the effects of changes in polar and apolar interactions on micellization. *Biopolymers* 1979;18:1123–40.
- Farrell Jr HM, Qi PX, Wickham ED, Unruh JJ. Secondary structural studies of bovine caseins: structure and temperature dependence of beta-casein phosphopeptide (1–25) as analyzed by circular dichroism, FTIR spectroscopy, and analytical ultracentrifugation. *J Prot Chem* 2002;21:307–21.
- Gangnard S, Zuev Y, Gaudin J-C, Fedotov V, Choiset Y, Axelos MAV, et al. Modifications of the charges at the N-terminus of bovine [beta]-casein: consequences on its structure and its micellisation. *Food Hydrocoll* 2007;21:180–90.
- Gau CS, Yu H, Zografi G. Surface viscoelasticity of beta-casein monolayers at the air/water interface by electrocapillary wave diffraction. *J Colloid Interface Sci* 1994;162:214–21.
- Graham DE, Phillips MC. Proteins at liquid interfaces: III. Molecular structures of adsorbed films. *J Colloid Interface Sci* 1979;70:427–39.
- Grosclaude F, Mahé MF, Ribadeau Dumas B. Primary structure of bovine alpha s1-casein and beta-casein. *Corrigendum Eur J Biochem* 1973;40:323–4.
- Hambardzumyan A, Aguié-Beghin V, Panaiotov I, Douillard R. Effect of frequency and temperature on rheological properties of beta-casein adsorption layers. *Langmuir* 2003;19:72–8.
- Hambardzumyan A, Aguié-Beghin V, Daoud M, Douillard R. beta-casein and symmetrical triblock copolymer (PEO-PPO-PEO and PPO-PEO-PPO) surface properties at the air–water interface. *Langmuir* 2004;20:756–63.
- Hirel P-H, Schmitter J-M, Dessen P, Fayat G, Blanquet S. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Nat Acad Sci* 1989;86:8247–51.
- Holt C, Sawyer L. Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the S1-alpha, kappa- and beta-caseins. *J Chem Soc Faraday Trans* 1993;89:2683–92.
- Husband FA, Wilde PJ, Mackie AR, Garrood MJ. A comparison of the functional and interfacial properties of beta-casein and dephosphorylated beta-casein. *J Colloid Interface Sci* 1997;195:77–85.
- Kim DA, Cornec M, Narsimhan G. Effect of thermal treatment on interfacial properties of [beta]-lactoglobulin. *J Colloid Interface Sci* 2005;285:100–9.
- Kumosinski TF, Brown EM, Farrell Jr HM. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: an energy-minimized beta-casein structure. *J Dairy Sci* 1993;76:931–45.
- Lakowicz JR. *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York: Kluwer Academic/Plenum; 1999.
- Leclerc E, Calmettes P. Structure of [beta]-casein micelles. *Phys B: Condens Matter* 1997;241–243:1141–3.
- Lucassen-Reynders EH, Fainerman VB, Miller R. Surface dilatational modulus or Gibbs' elasticity of protein adsorption layers. *J Phys Chem B* 2004;108:9173–6.
- Maldonado-Valderrama J, Wege HA, Rodriguez-Valverde MA, Galvez-Ruiz MJ, Cabrerizo-Vilchez MA. Comparative study of adsorbed and spread beta-casein monolayers at the water–air interface with the pendant drop technique. *Langmuir* 2003;19:8436–42.
- Maldonado-Valderrama J, Galvez-Ruiz MJ, Martin-Rodriguez A, Cabrerizo-Vilchez MA. A scaling analysis of beta-casein monolayers at liquid–fluid interfaces. *Colloid Surf A* 2005;270:323–8.
- Mellema M, Clark DC, Husband FA, Mackie AR. Properties of beta-casein at the air/water interface as supported by surface rheological measurements. *Langmuir* 1998;14:1753–8.
- Mikheeva LM, Grinberg NV, Grinberg VY, Khokhlov AR, de Kruijff CG. Thermodynamics of micellization of bovine beta-casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. *Langmuir* 2003;19:2913–21.
- Noskov BA, Latnikova AV, Lin SY, Loglio G, Miller R. Dynamic surface elasticity of beta-casein solutions during adsorption. *J Phys Chem C* 2007;111:16895–901.
- O'Connell JE, De Kruijff CG. [beta]-Casein micelles; cross-linking with transglutaminase. *Colloids Surf A* 2003;216:75–81.
- O'Connell JE, Grinberg VY, De Kruijff CG. Association behavior of [beta]-casein. *J Colloid Interface Sci* 2003;258:33–9.
- Patino JMR, Sanchez CC, Nino MRR, Fernandez MC. Structural and dynamic properties of milk proteins spread at the air–water interface. *J Colloid Interface Sci* 2001;242:141–51.
- Pozani S, Doxastakis G, Kiosseoglou V. Functionality of lupin seed protein isolate in relation to its interfacial behaviour. *Food Hydrocoll* 2002;16:241–7.
- Rollema HS. Casein association and micelle formation. In: Fox PF, editor. *Advanced dairy chemistry II. Proteins*. Appl Sci London: Elsevier; 1992. p. 111–41.
- Schmidt DG. *Proteins*. In: Fox PF, editor. *Developments in dairy chemistry*. London: Elsevier; 1982. p. 61–86.
- Shewry PR, Tatham AS. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *J Cereal Sci* 1997;25:207–27.
- Southward CR. Uses of casein and caseinates. *Developments in dairy chemistry*. 4 Functional milk proteins; 1989.
- Tomba P. The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett Budapest Spec Issue – Proteins and Peptides* 2005;579:3346–54.
- Van Hekken DL, Strange ED. Functional properties of dephosphorylated bovine whole casein. *J Dairy Sci* 1993;76:3384–91.
- Wong DWS, Camirand WM, Pavlath AE. Structures and functionalities of milk proteins. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1996;36:807–44.

## Summary

Intrinsically Unstructured Proteins (IUP) constitute a large protein family of various functions. Of this family, so-called amyloidogenous proteins are of the most interest because changes in their spatial structure can induce their aggregation into amyloid fibrils and also a transformation into forms capable of destabilize native structures and functions in native proteins. The aim of the present work was to investigate the role of disulfide bonds in aggregation and amyloidogenous transformations of IUPs, and also to determine new factors influencing these processes. Ovine prion protein and cow milk caseins (including recombinant and mutant forms) were chosen as the objects of investigation. The native spatial organizations of the prion protein and caseins was demonstrated to define their behavior in aggregation and amyloidogenous transformations. For example, experiments with purified preparations of beta-casein have shown that point mutations of seryl to cysteyl residues make beta-casein able to form dimers. C-terminal mutant was found to dimerise more easily than the N-terminal mutant. Using homocysteinylation as a method of introducing additional cysteyl residues into studied proteins allowed to discover particular aggregative modes in different caseins ( $\alpha_{S1}$ , beta and kappa) after their homocysteinylation forming sometimes amyloid-like structures. The influence of various factors, such as temperature, presence and concentration of phospholipids, and homocysteinylation on the aggregation of recombinant ovine prion protein was investigated. Phospholipids were found to induce either amyloid-like or non-amyloid prion protein aggregation depending on their concentration. The influence of homocysteinylation on aggregation found in the present work raises question if the pathological effects observed in hyperhomocysteinemia are not connected with the emergence of amyloid aggregates of prions and other IUP.



## Résumé

La famille des Protéines Intrinsèquement Déstructurées englobe de nombreuses protéines aux fonctions diverses. Certaines de ces protéines peuvent changer de structure et s'agréger sous la forme de fibrilles amyloïdes. Certaines transformations amyloïdes générant des agents pathogènes suscitent un intérêt particulier. L'objectif de cette thèse était de mettre en évidence les facteurs ayant une influence sur l'agrégation et la transformation amyloïde des protéines naturellement flexibles et surtout, d'étudier le rôle des ponts disulfure dans ces processus. Les caséines du lait bovin, sous formes natives, recombinantes et de mutants, et la protéine prion ovine ont été choisies comme objets de ce travail. Le repliement initial des caséines et de la protéine prion prédétermine leur potentialité à s'agréger et à se replier parfois aussi sous forme amyloïde. Les expériences menées avec les mutants recombinants de la caséine bêta, dans lesquels certains résidus de sérine ont été mutés en cysteines ont montré que la caséine bêta mutée de la sorte acquiert la capacité à se dimériser. Le mutant possédant un résidu de cystéine en position N-terminale dimérise plus facilement et plus rapidement que le mutant ayant la cystéine introduite en position C-terminale. L'introduction de résidus cystéyle par homocystéinylation des protéines pour a permis d'observer les différents modes d'agrégation des différentes caséines ( $\alpha_{S1}$ , bêta et kappa) ainsi que la formation, parfois, de structures amyloïdes.

L'étude de l'agrégation des protéines prion recombinantes ovines après chauffage, en présence de concentrations différentes en phospholipides et après homocystéinylation a montré qu'en fonction de la concentration, les phospholipides peuvent orienter l'agrégation de la protéine prion vers un repliement amyloïde ou autre. L'homocystéinylation de la protéine prion ovine n'a qu'une influence amyloïdogène. Ceci permet de formuler une hypothèse selon laquelle certains effets pathologiques observés dans le cas des hyper homocystéinémies peuvent être causés par l'apparition d'agrégats amyloïdes des IUP après leur homocystéinylation.

## Резюме

Естественно развернутые белки, представляют собой многочисленное семейство белков с разнообразными функциями. Особый интерес представляют так называемые амилоидогенные белки, изменение структуры которых приводит к их патологической агрегации в амилоидные фибриллы, а также к возникновению инфекционных форм, провоцирующих нарушения структуры и функций нормальных белков. **Целью** данной работы было выявление новых факторов, влияющих на агрегацию и амилоидогенные превращения белков с естественно развернутой структурой, и, прежде всего, изучение роли образования дисульфидных связей в этих процессах. Было выбрано два объекта: овечий прион и казеины коровьего молока (включая рекомбинантные и мутантные формы). Было продемонстрировано, что исходная структурная организация прионов и казеинов предопределяет их поведение в процессе агрегации и амилоидогенных превращений. Так, в экспериментах с очищенными препаратами рекомбинантных форм  $\beta$ -казеина было показано, что при точечных заменах остатков серина на цистеин  $\beta$ -казеин приобретает способность к димеризации, причем С-концевой мутант димеризуется легче, чем N-концевой. Использование гомоцистеинилирования, как инструмента для внедрения остатков цистеина, позволило выявить особенности агрегации разных типов казеинов молока (альфаS1, бета и каппа) после такой модификации, и продемонстрировать их способность к формированию амилоидоподобных структур.

Была исследована агрегация рекомбинантных овечьих прионов под действием таких факторов, как температура, различные концентрации фосфолипидов, а также гомоцистеинилирование. Было установлено, что, в зависимости от концентрации, фосфолипиды способны направлять агрегацию приона по разным путям: как с патологическим изменением структуры, так и без. Обнаруженное в работе амилоидогенное влияние гомоцистеинилирования на агрегацию приона позволяет предположить, что наблюдаемые при гипергомоцистеинемии патологические эффекты могут быть связаны с появлением амилоидных агрегатов прионов и других естественно-развернутых белков после их модификации гомоцистеинтиолактоном

## **Благодарности**

Хочу поблагодарить своего научного руководителя Владимира Израилевича Муронца за потрясающий стиль руководства, неоценимую помощь и поддержку во время работы.

Большое спасибо всем сотрудникам отдела Биохимии животной клетки за теплую атмосферу в лаборатории и готовность помочь. Я рада, что мне пришлось работать и просто общаться со Шмальгаузен Еленой Викторовной, Налетовой Ириной Николаевной, Асриянц Региной Абрамовной, Поздняковой Натальей Васильевной, Севостьяновой Ириной Александровной, Элькиной Юлией Леонидовной, Стоговым Сергеем Владимировичем, Куравским Михаилом Львовичем.

Также хотелось бы поблагодарить своего французского научного руководителя Тома Эртле за теплый прием в его лаборатории, тему и объекты диссертации, помощь и предоставленные возможности. Большое спасибо всему коллективу лаборатории функциональных взаимодействий молочных белков, Жан-Марку Шоберу, Изабель Броннек, Анитре Рабесоне и многочисленным стажерам лаборатории за готовность помочь и теплую атмосферу. Отдельное спасибо Мишель Дальгаррондо за терпение и готовность поделиться знаниями, в том числе за достигнутый прогресс в изучении французского языка. Спасибо Ивану Шуазету за помощь в освоении новых методов, его критику и желание способствовать научному прогрессу. Также хотелось бы поблагодарить секретаря Кристин за помощь в решении многочисленных организационных сложностей.

Благодарю свою семью – родителей, брата и мужа за помощь, терпение, внимание и поддержку.