

На правах рукописи

Коннова Татьяна Анатольевна

**ВЛИЯНИЕ МИНОРНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ
НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ШАПЕРОНОПОДОБНУЮ
АКТИВНОСТЬ БЕТА-КАЗЕИНА**

03.01.02 - биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2012

Работа выполнена в лаборатории биофизической химии наносистем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук (КИББ КазНЦ РАН) и лаборатории функциональных взаимодействий белков Национального института агрономических исследований (НИАИ), Нант, Франция.

Научные руководители: доктор химических наук, профессор
заведующий лабораторией
КИББ КазНЦ РАН, г. Казань
Юрий Федорович Зуев

профессор, заведующий лабораторией
НИАИ, г. Нант, Франция
Тома Эртле

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва
Владимир Израилевич Муронец

доктор химических наук, профессор
КФУ, г. Казань
Валерий Виленович Горбачук

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биохимии им. А.Н.
Баха Российской академии наук, г. Москва

Защита состоится 24 декабря 2012 г. в 11⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д002.005.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при КИББ КазНЦ РАН по адресу: 420111, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31, а/я №30, тел/факс (843)2927347.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке КазНЦ РАН.

Автореферат разослан «16» ноября 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Анастасия Анатольевна Пономарева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Постановка проблемы и ее актуальность. Молекула бета-казеина – одного из основных молочных белков – в отличие от типичных глобулярных белков обладает слабо выраженными элементами вторичной структуры [Creamer *et al.*, 1981; Caessens *et al.*, 1999]. Все полярные и заряженные остатки сконцентрированы на N-конце полипептидной цепи, в то время как остальная ее часть состоит преимущественно из остатков неполярных аминокислот и содержит большое количество пролиновых остатков [Swaisgood, 1992, 1993, 2003]. В первичной последовательности бета-казеина отсутствует цистеин, что исключает возможность образования внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей. Сочетание амфифильного строения и высокой гибкости полипептидной цепи бета-казеина приводит к ассоциации белка в водной среде с образованием наноразмерных коллоидных агрегатов – мицелл [Schmidt, Payens, 1972; Niki *et al.*, 1977; Evans *et al.*, 1979; Swaisgood, 2003].

Бета-казеин является удобной моделью для изучения различных аспектов строения коллоидной системы молока и связанных с ней функций. Строение поверхности коллоидных агрегатов молочных казеинов, где гидрофильные участки перемежаются с гидрофобными, их высокая связывающая способность по отношению к гидрофобным соединениям и возможность адаптации геометрии поверхности под связываемый лиганд определяют ряд функциональных особенностей молока. Кроме того, эти свойства в последние годы вызвали интерес к шапероноподобной функции казеинов [Bhattacharyya, 1999; Morgan *et al.*, 2005; Barzegar *et al.*, 2008; Hassanisadi *et al.*, 2008; Yousefi *et al.*, 2009]. Коллоидные свойства и шапероноподобная активность бета-казеинов имеют прикладное значение, благодаря способности стабилизировать микроэмульсии и эмульсии в пищевой промышленности, что определяет текстуру и вкусовые качества пищевых продуктов.

Одним из возможных подходов получения бета-казеина с новыми физико-химическими и функциональными свойствами является изменение его структуры методами белковой инженерии. Процесс самоорганизации бета-казеина чрезвычайно чувствителен к физико-химическим свойствам среды (полярности и вязкости растворителя, температуре, pH и т.п.), что влияет на размер, структуру и сорбционные свойства его коллоидных агрегатов [Schmidt, 1982; Leclerc, Calmettes, 1997; De Kruif, Grinberg, 2002; Mikheeva *et al.*, 2003; O'Connell *et al.*, 2003]. Кроме того, было показано, что точечное введение цистеиновых остатков в полипептидную цепь этого белка приводит к образованию димерных или олигомерных комплексов и значительно изменяет свойства мицеллярных агрегатов (размер, форму, температуру перехода мономер-мицелла, устойчивость к изменению pH и пр.) [Gaudin *et al.*, 2009; Yousefi *et al.*, 2009]. При этом, вероятно, могут происходить изменения функциональных свойств бета-казеина, в частности, его шапероноподобной активности. К настоящему времени работ по исследованию взаимосвязи структуры и функциональных особенностей бета-казеина немного и нет ясности, в какой степени

структура белка определяет эти свойства.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы было выявление вклада структурных особенностей бета-казеина в его ассоциативные, коллоидные и шапероноподобные свойства.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Получить очищенные препараты рекомбинантного бета-казеина дикого типа и его модифицированных форм, содержащих цистеиновые остатки в различных участках полипептидной цепи белка.
2. Охарактеризовать структуру и процессы самоассоциации рекомбинантных бета-казеинов методами динамического светорассеяния, флуоресценции, кругового дихроизма (КД) и инфракрасной спектроскопии (ИК).
3. Проанализировать влияние температуры и состава растворителя на структуру и свойства бета-казеина.
4. Охарактеризовать шапероноподобную активность природной и рекомбинантных форм бета-казеина по отношению к термо-индуцированной агрегации ряда целевых белков.

Научная новизна работы. Впервые с применением комплекса взаимодополняющих физических методов исследована взаимосвязь структурного состояния рекомбинантных бета-казеинов с цистеиновыми остатками, введенными в различные участки полипептидной цепи белка, с их ассоциативными и шапероноподобными свойствами.

Впервые выполнен всесторонний анализ структурных данных и самоассоциации бета-казеина в смешанном растворителе вода-этанол. Показана корреляция между микрофазным разделением водно-спиртовых растворов, вторичной структурой белка и строением мицелл бета-казеина.

Впервые установлено наличие верхней и нижней границ температурного интервала самоассоциации бета-казеина; при этом увеличение концентрации спирта вызывает понижение как верхней, так и нижней температур мицеллообразования.

Впервые аргументировано, что высокая стабильность вторичной структуры бета-казеина в условиях повышения температуры является кажущейся и обусловлена ограничениями методов разложения спектров КД в приложении к нативно-неупорядоченным белкам.

Впервые исследована шапероноподобная активность бета-казеина в отношении каталитического действия фермента в условиях действия повышенной температуры.

Научно-практическая значимость работы. Полученные результаты уточняют границы коллоидного состояния бета-казеина и дополняют имеющиеся данные о механизмах мицеллообразования белка. Понимание механизмов самоассоциации и взаимодействия бета-казеина с целевыми белками на молекулярном уровне, открывает перспективы для создания белковых препаратов медицинского назначения, исследования и лечения ряда заболеваний, известных как «конформационные».

Результаты работы могут быть использованы для прогнозирования влияния температуры и состава растворителя на структуру и функции бета-казеина и других нативно неупорядоченных белков, а также для направленного получения белков с новыми физико-химическими свойствами для пищевой промышленности и биотехнологии.

Полученные экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в учреждениях биологического, медицинского, биотехнологического, физико-химического профилей, занимающихся исследованием взаимосвязи структуры и функций биомакромолекул, динамики белков в водно-органических средах, а также в учебном процессе при чтении курсов лекций по биохимии, биофизике, физической и органической химии, и молекулярной биологии в ВУЗах.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Исследования проводились в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по теме «Межмолекулярные взаимодействия и молекулярная динамика как факторы регуляции функциональной активности белков» (номер госрегистрации №0120.0 803026) и поддержаны грантом правительства Франции для обучения в совместной аспирантуре, грантами РФФИ, а также грантом Президиума РАН (программа «Молекулярная и клеточная биология»). Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на 12-ой Международной школе-конференции молодых ученых: «Биология – наука XXI века» (Пушино, Россия, 2008), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, Россия, 2008), IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, Россия, 2009), 34-ом конгрессе FEBS «Life's Molecular Interaction» (Прага, Чехия, 2009), Российской школе-конференции молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань, Россия, 2010), V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Петрозаводск, Россия, 2011), 3-м Международном симпозиуме «Клеточная сигнализация у растений» (Казань, Россия, 2011), I Российском симпозиуме по поверхностно-активным веществам «От коллоидных систем к нанохимии» (Казань, Россия, 2011), 36-ом конгрессе FEBS «Biochemistry for Tomorrow's Medicine» (Турин, Италия, 2011), VII Съезде Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, Россия, 2011), Конференции молодых ученых в области науки о жизни (Париж, Франция, 2012); на семинарах лаборатории функциональных взаимодействий белков НИАИ (Нант, Франция, 2008 – 2011).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 17 работ; из них 2 статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 158 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. В работе представлено 49 рисунков и 4 таблицы. Список литературы включает 290 источников, из них 271 зарубежных.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили нативный бета-казеин коровьего молока (Lactalis, France), рекомбинантные формы бета-казеина дикого типа и содержащие аминокислотные замены/вставки цистеинового остатка в различных участках полипептидной цепи.

1.1. Приготовление образцов. Белки растворяли в Na-фосфатном буфере 50 мМ, рН 7.4. Стоковые растворы разбавляли буфером и этанолом до получения нужной концентрации белка и спирта.

1.2. Получение рекомбинантных форм бета-казеина. Нарработку рекомбинантных форм бета-казеина проводили в бактериальных системах экспрессии. Для этого в штаммы-продуценты *E.coli* Rosetta (DE3) pLysS и BL21 (DE3) встраивали плазмиды на основе векторов pET21-d (+) и pET32-b, содержащих первичные последовательности бета-казеинов дикого типа и модифицированных (Novagen, США). Модификацию первичной последовательности бета-казеина C30 проводили с помощью метода сайт-направленного мутагенеза (QuikChange, Invitrogen, США). Культуры клеток *E.coli* выращивали в питательных средах LB (Luria-Bertani) [Гловер, 1988] с добавлением соответствующего антибиотика (хлорамфеникола, ампициллина). Индукцию экспрессии рекомбинантных белков бактериальными продуцентами проводили добавлением ИПТГ (изопропил- β -D-тиогалактозид). После получения клеточных лизатов проводили трехстадийную (анионообменную и две обратно-фазовые) хроматографическую очистку белков методом FPLC с использованием системы Äkta Purifier, оснащенной программным обеспечением Unicorn Control (Amersham Biosciences, США).

1.3. Самоассоциация бета-казеина. Гидродинамические диаметры бета-казеина в молекулярном и мицеллярном состояниях определяли методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Для расчета радиуса частиц по автокорреляционным кривым использовали метод CONTIN.

Спектры флуоресцентного излучения триптофана записывали в диапазоне длин волн 300 - 400 нм при длине волны возбуждения 295 нм на спектрофлуориметре Hitachi F-4500 (Hitachi, Япония). Спектры корректировали вычитанием спектра рамановского поглощения воды. Значения максимума флуоресценции определяли с использованием программы Peak Fit (Systat Software, Великобритания).

1.4. Вторичная структура бета-казеина. Спектры КД были записаны на

спектрополяриметре Jas.co J-810 (Jas.co Incorporated, США) в дальней УФ области в кюветах Hellma 106-QS с длиной оптического пути 0.02 см. Анализ вторичной структуры белков по спектрам КД был выполнен с использованием алгоритма расчета [Provencher, Glockner, 1981] и программы CONTINLL [Whitmore, Wallace, 2008] с сайта DICROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>), базисный набор белков №7 [Janes, 2005; Wallace, Janes, 2009].

Спектры ИК регистрировали на спектрофотометре Tensor 27 (Bruker, Германия), спектральное разрешение 4 см^{-1} , 128 сканов. Для приготовления образцов использовали дейтерированную воду (D_2O , Aldrich 151882-100G, 99.9%). Исследуемые растворы помещали в термостатируемую кювету из CaF_2 с толщиной слоя 100 или 10 мкм. Из спектров растворов бета-казеина вычитали спектры соответствующих растворителей, снятые при тех же температурах, и спектры паров атмосферной воды. Сглаживания спектров не производили.

1.5. Определение шапероноподобной активности рекомбинантных бета-казеинов.

1.5.1. Антиагрегационные свойства бета-казеина.

Тепловая денатурация алкогольдегидрогеназы и каталазы. Для оценки антиагрегационных свойств бета-казеина использовали тест-систему, основанную на подавлении агрегации модельных белковых субстратов – алкогольдегидрогеназы (АДГ) из лошадиной печени (Sigma Aldrich) и каталазы из коровьей печени (Sigma Aldrich) [Bhattacharyya, Das, 1999]. Кинетику агрегации прослеживали по изменению коэффициента поглощения раствора при 360 нм на спектрофотометре Lambda 25 (Perkin Elmer, США). Агрегацию АДГ индуцировали нагреванием реакционной смеси до температуры 48°C , каталазы – до 55°C . Для описания кинетических кривых агрегации использовали уравнение:

$A = A_{\text{lim}} \{1 - \exp[-k_1(t - t_0)]\} + \beta(t - t_0)$ [Курганов, 2002]. Для количественного описания шапероноподобной активности (A_{III}) бета-казеинов использовали формулу: $A_{III} = [1 - (k_1 * A_{\text{lim}}) / (k_1 * A_{\text{lim}})] * 100\%$.

Тепловая денатурация моноклональных иммуноглобулинов G (IgG). Антиагрегационные свойства бета-казеина оценивали по изменению иммунореактивности моноклональных IgG к бета-лактоглобулину при температурном воздействии. Активные концентрации антител определяли методом непрямого ИФА, общая концентрация белка была измерена методом Bradford [1976].

1.5.2. Ферментативная активность АДГ. Активность АДГ определяли по изменению оптического поглощения реакционной среды при 340 нм. Реакцию инициировали внесением фермента, предварительно проинкубированного при заданной температуре, в реакционную смесь. Активность фермента контролировали по начальной скорости реакции окисления этанола. Все спектрофотометрические измерения осуществляли на приборе Lambda 25 (Perkin Elmer, США).

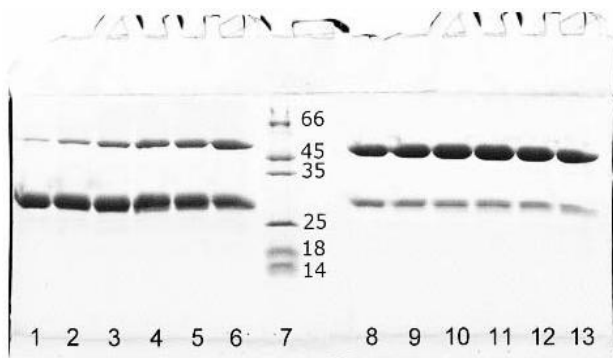
2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Получение рекомбинантного бета-казеина. В работе были использованы нативный бета-казеин, рекомбинантный бета-казеин дикого типа и рекомбинантные мутантные формы, содержащие цистеин в начале цепи, в 30-м и 208-м положениях, а также двойной мутант C0-208:



Плазмиды, содержащие первичные последовательности бета-казеинов дикого типа b-CN WT и несущих мутации b-CN C0, b-CN C208, b-CN C0-208 были предоставлены лабораторией функциональных исследований белков Национального института агрономических исследований (Нант, Франция). Модификация бета-казеина заменой изолейцина в 30 положении на цистеин (b-CN C30) была произведена нами в КИББ КазНЦ РАН.

А



Б

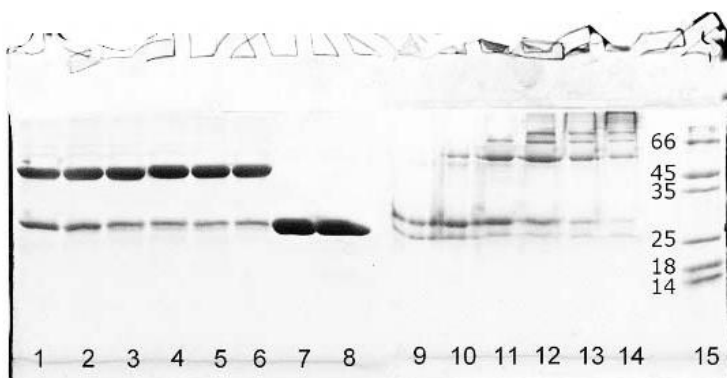


Рис. 1. Электрофореграмма олигомеризации рекомбинантных бета-казеинов: bCN-C0 (А, дорожки 1-6), bCN-C30 (А, 8-13), bCN-C208 (Б, 1-6) и bCN-C0-208 (Б, 9-14).

Время инкубации раствора белка при 37°C, pH 7.4:

А: 1-6, 8-13; Б: 1-6; 9-14 – 0, 1, 3, 6, 9, 24 часа

Б: 7, 8 – WT 0 ч, 24 ч

Маркер молекулярного веса (кДа) - дорожки А – 7 и Б – 15

2.2. Структурные и физико-химические свойства бета-казеина.

2.2.1. Олигомеризация цистеинсодержащих бета-казеинов. Введение цистеиновых остатков в структуру бета-казеина способствует образованию внутри и межмолекулярных дисульфидных связей. Введение цистеина в концевые или центральный участки полипептидной цепи вызывало спонтанную димеризацию бета-

казеина (рис. 1А), а двойная замена в концевых участках приводила к образованию олигомеров и «кольцевой» формы белка (рис. 1Б). Присутствие в растворе некоторого количества олигомеров наблюдали сразу же после растворения рекомбинантных белков. К 24 часам после начала эксперимента практически все мономеры белка переходили в олигомерную форму.

2.2.2. Влияние внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей на процесс самоассоциации бета-казеина. Для исследования процесса самоассоциации бета-казеина использовали метод динамического светорассеяния. При нагреве растворов нативного и дикого типа бета-казеинов происходил переход из молекулярного состояния со средним гидродинамическим диаметром частиц 7-8 нм в мицеллярное (17-18 нм). Положение мицеллярного перехода на температурной шкале зависело от концентрации бета-казеина (рис. 2А). Способность бета-казеина к мицеллообразованию сохранялась и для модифицированных форм. Для димеров bCN-C0, bCN-C30 и bCN-C208 отмечено снижение температуры мицеллярного перехода по сравнению с безцистеиновыми формами (рис. 2Б). Олигомеры bCN-C0-208 находились в растворе в форме мицеллярных ассоциатов с гидродинамическим диаметром 18-23 нм во всем исследованном температурном интервале. В присутствии редуцирующего агента (меркаптоэтанола) профили изменения размеров частиц цистеинсодержащих белков аналогичны профилям бета-казеина нативного и дикого типа. При этом мицеллярные ассоциаты восстановленных форм бета-казеинов,

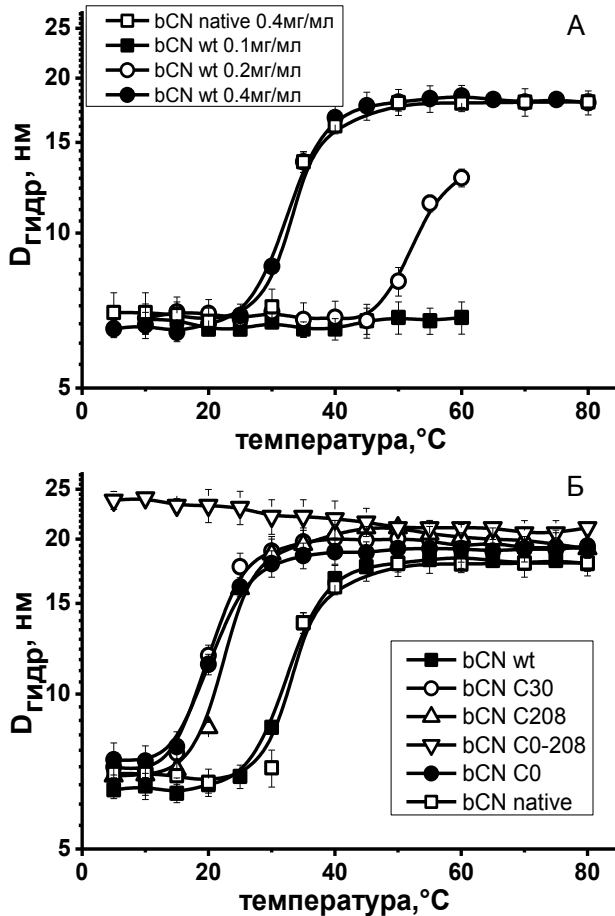
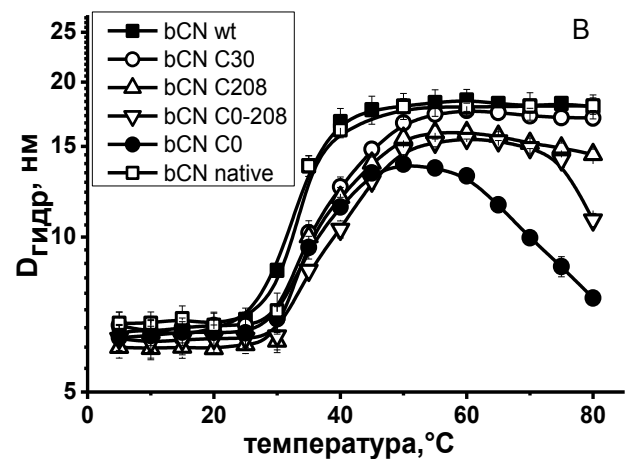


Рис. 2. Температурная зависимость гидродинамического диаметра частиц для различных концентраций нативного бета-казеина (А), для олигомерных форм (Б) и мономерных форм (В) модифицированных бета-казеинов (концентрация 0.4 мг/мл).



содержащих цистеин в начале полипептидной цепи, оказывались неустойчивыми к действию повышенных температур (рис. 2В). Таким образом, образование меж- и внутримолекулярных дисульфидных связей, облегчая взаимодействие гидрофобных участков полипептидной цепи, способствует ассоциации бета-казеина.

Аналогичная данным светорассеяния картина для самоассоциации различных форм бета-казеина наблюдалась методом триптофановой флуоресценции. Единственный триптофановый остаток, локализованный в гидрофобной части молекулы бета-казеина, при самоассоциации белка, погружаясь вглубь мицелл, оказывался в менее полярном окружении, что проявлялось в «голубом» сдвиге максимума флуоресценции. При низких температурах значения λ_{MAX} для всех рекомбинантных бета-казеинов в мономерной форме заметно ниже, чем для нативного бета-казеина (рис. 3А), что может свидетельствовать о более компактной организации их молекул. Наличие или отсутствие мицеллярного перехода для олигомерных форм С0, С30 и С208 (рис. 3Б) согласуется с данными светорассеяния. Таким образом, наличие димеров, олигомеров и формы "intra", т.е. формирование внутри- и межмолекулярных связей, оказывает значительное влияние на поведение бета-казеина в процессе самоассоциации.

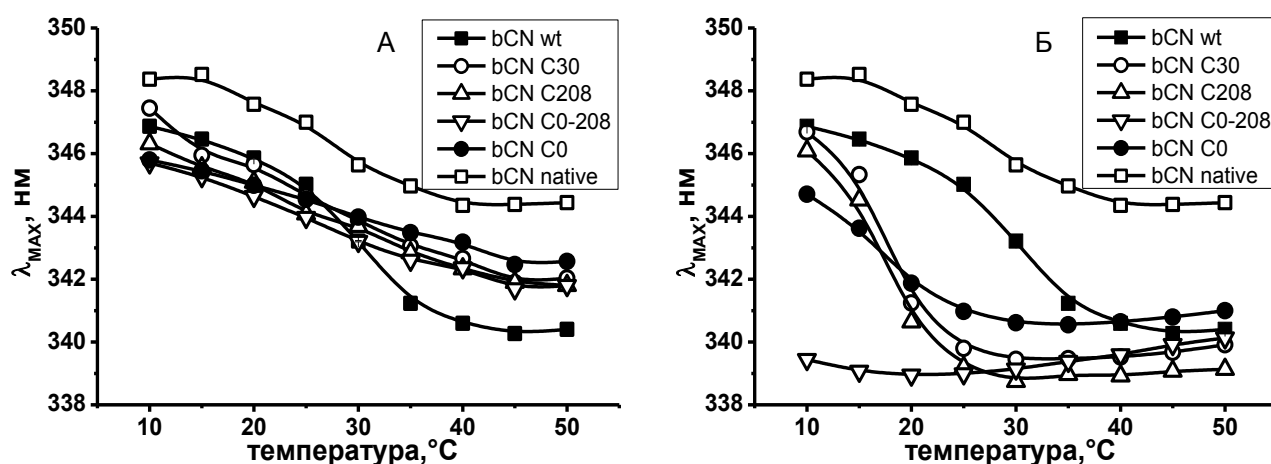


Рис. 3. Температурная зависимость положения максимума триптофановой флуоресценции рекомбинантного бета-казеина (концентрация 0.4 мг/мл). А - мономерные формы, Б - олигомерные формы.

2.2.3. Вторичная структура цистеинсодержащих бета-казеинов. Для изучения вторичной структуры рекомбинантных бета-казеинов использовали метод спектроскопии кругового дихроизма. Олигомеры и мономеры рекомбинантных бета-казеинов имеют похожие спектры (рис. 4), характерные для неупорядоченной структуры с присутствием небольшой доли других структур.

Разностные спектры показывают, что уменьшение интенсивности сигнала на 198-200 нм (и соответственный рост на 222 нм) в ряду WT>C0=C30>C0-208>C208 (олигомеры) и WT>C0=C0-208>C30>C208 (мономеры) могут быть обусловлены разрушением спирали типа полипролин II (РПИИ). Если считать, следуя [Gangnard *et al.*, 2007], что указанные изменения в спектре бета-казеина отражают образование

более упорядоченной и менее гидратированной структуры, то из спектров на рис. 4 следует, что наибольшей структурированностью обладает мутант C208, а наименьшей – WT, как в димерной, так и в мономерной формах. Одинаковую степень внутренней упорядоченности имеют димеры C0 и C30, а среди мономеров – C0, C30 и C0-208. В определенной степени, такой вывод соотносится с положением максимума флуоресценции для этих белков.

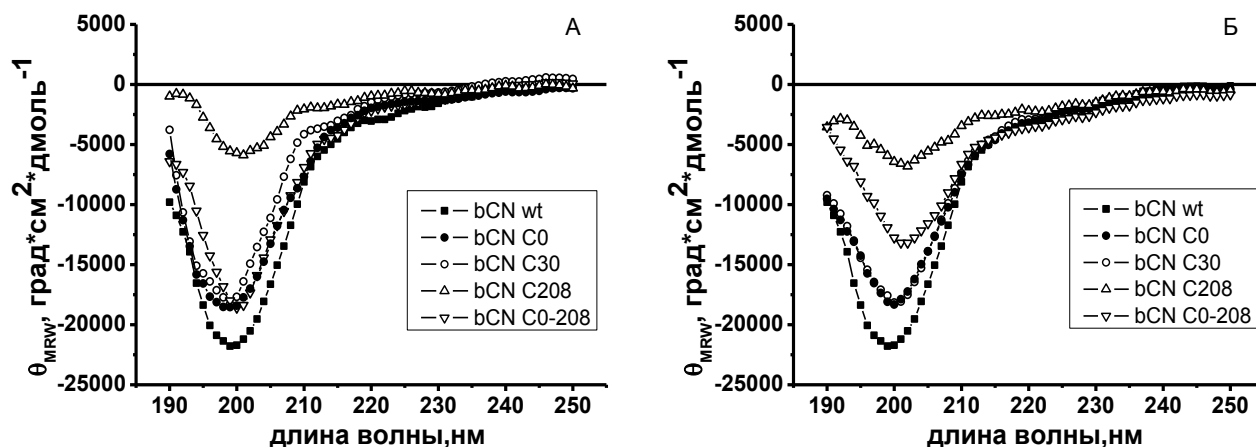


Рис. 4. Спектры КД для бета-казеина дикого типа и его модифицированных форм (температура 10°C). А – мономерные формы, Б – олигомерные формы.

При повышении температуры в спектрах КД рекомбинантных белков происходит уменьшение интенсивности минимума при 198-200 нм и рост глубины минимума при 222 нм. Наличие изодихроической точки указывает на равновесный переход между двумя состояниями. Разностные спектры между 10°C и 50°C имеют форму, характерную для структуры РРП (рис.5), и свидетельствуют, что повышение температуры сопровождается разрушением участков левой спирали РРП.

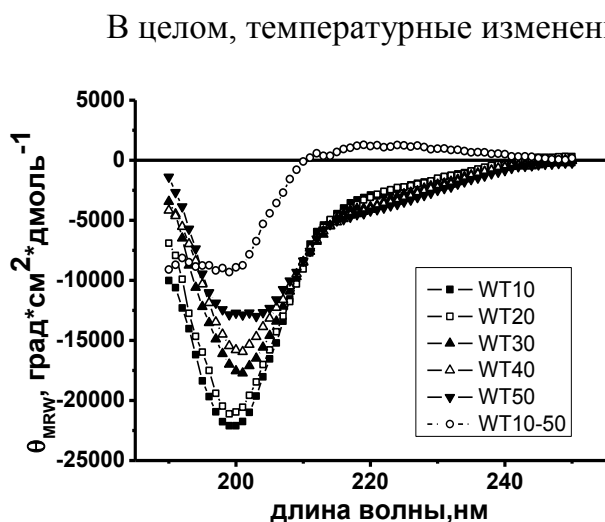


Рис. 5. Спектры КД бета-казеина дикого типа при разных температурах.

В целом, температурные изменения в спектрах КД отражают, преимущественно, процесс роста упорядоченности вторичной структуры, не связанный, или связанный лишь опосредованно с ассоциацией бета-казеина, и согласуются с известными данными литературы [Gangnard *et al.*, 2007]. Введение точечных замен на цистеины также способствует росту упорядоченности вторичной структуры, при этом наибольшее влияние оказывают замены, затрагивающие гидрофобный домен (рис. 6). Играть ли какую-то роль образующиеся при этом межмолекулярные сшивки – неясно, так как столь же интенсивные изменения вторичной структуры протекают и в мономерной форме.

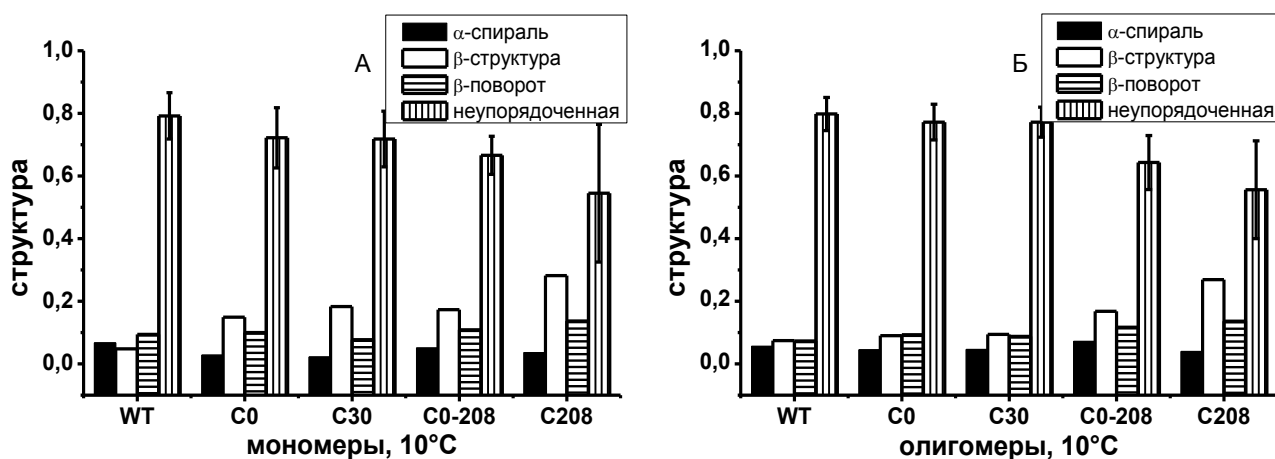


Рис. 6. Содержание элементов вторичной структуры в мономерных (А) и олигомерных (Б) формах модифицированных рекомбинантных бета-казеинов.

2.3. Физико-химические свойства бета-казеинов в водно-этанольных растворах.

2.3.1. Самоассоциация нативного бета-казеина в водно-этанольных растворах. Добавление этанола значительно видоизменяет температурные зависимости мицеллообразования бета-казеина, влияя как на размер ассоциатов, так и на температуру перехода; причем эти эффекты зависят от концентрации белка. В растворах с концентрацией казеина 0.5 мг/мл (рис. 7А) небольшие добавки этанола приводили к уменьшению размера мицелл, слабо влияя на температуру их образова-

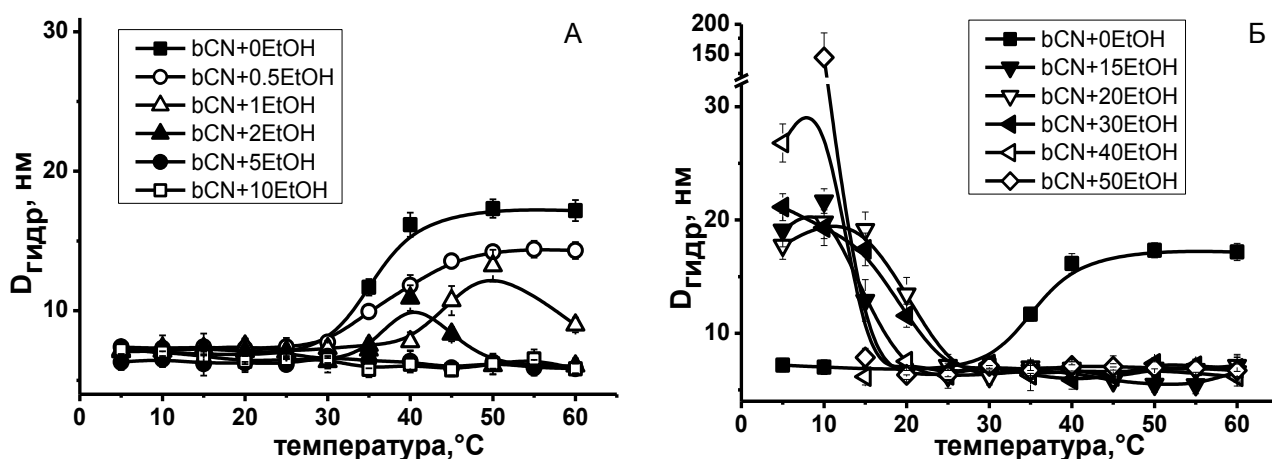


Рис. 7. Температурная зависимость гидродинамического диаметра частиц нативного бета-казеина в растворах с содержанием этанола 0-50% v/v. Концентрация белка 0.5 мг/мл.

ния. При дальнейшем нагреве мицеллы распались до мономеров; причем температура распада мицелл понижалась с увеличением концентрации спирта. Это приводило к сужению температурного интервала существования мицелл, а при концентрации этанола 5 – 10% бета-казеин мицелл не образовывал. При дальнейшем увеличении содержания спирта (рис. 7Б) вновь наблюдалась самоассоциация белка, но температура разрушения мицелл понижалась до 10 – 20°C, а температура мицеллообразования, по-видимому, смещалась в область отрицательных значений.

Повышение концентрации казеина до 2.5 мг/мл (данные не представлены) способствовало большей стабильности мицеллярных структур, и ассоциаты белка существовали во всем диапазоне концентраций спирта. При этом температурные границы образования и распада мицелл изменялись аналогично описанному выше. С

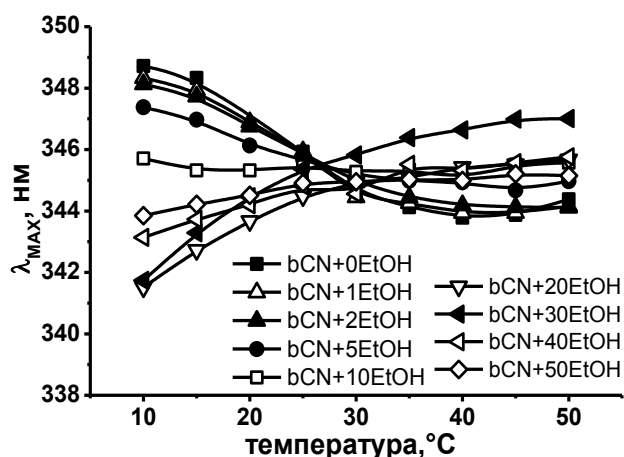


Рис. 8. Температурная зависимость положения максимума триптофановой флуоресценции в водно-этанольных (0-50% v/v) растворах бета-казеина. Концентрация белка 0.5 мг/мл.

ростом содержания спирта выше 10% наблюдалось прогрессирующее увеличение размера ассоциатов казеина, а при 40-50% спирта появлялись частицы размером до 100 – 200 нм. Таким образом, в водных и водно-спиртовых растворах мицеллы казеина существуют в определенном температурном диапазоне, границы которого можно условно обозначить как верхняя и нижняя температуры демицеллизации, которые, в свою очередь, зависят от концентрации белка. Характер изменения положения максимума флуоресценции триптофана (рис. 8) качественно соответствует

данным динамического светорассеяния по мицеллообразованию бета-казеина в водных и водно-спиртовых растворах.

2.3.2. Влияние растворителя на вторичную структуру бета-казеина.

Круговой дихроизм. Спектры КД раствора нативного бета-казеина в буфере имеют глубокий минимум при 198 нм и более слабое плечо в области 220 – 240 нм (рис. 9А), характерные для преимущественно неупорядоченных белков [Woody, 1992].

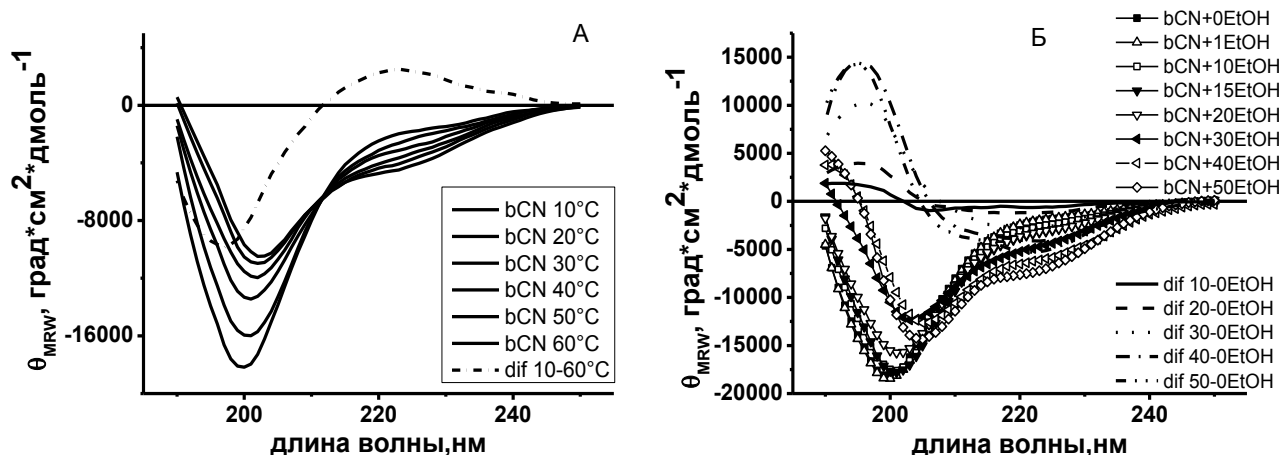


Рис. 9. Спектры КД растворов нативного бета-казеина (0.5 мг/мл) в буфере при различных температурах (А) и в смеси вода-этанол с содержанием спирта 0 – 50% при температуре 10°C (Б).

Наличие и положение изодихроической точки указывает, что нагрев вызывает

переход между двумя структурными состояниями: спираль РРІІ переходит в неупорядоченную конформацию [Drake *et al.*, 1988; Woody, 1992; Toumadje, Johnson, 1995; Soulages *et al.*, 2002]. Разностный спектр между 10 и 60°C также имеет форму и положение экстремумов, характерные для спирали РРІІ.

Анализ спектров КД водно-этанольных растворов бета-казеина показал, что с ростом концентрации спирта изменения в спектрах немонотонны, изодихроичная точка отсутствует (рис. 9Б). Разностные спектры малоинтенсивны и по форме соответствуют приросту альфа-спиральной структуры. Начиная с 20% этанола, в спектрах появляются признаки бета-структуры.

В интервале 40-50% этанола вновь начинает превалировать альфа-спиральная структура. Расчет доли вторичных структур, выполненный по спектрам КД (рис. 10), согласуется с проведенным качественным анализом и показывает рост структурированности бета-казеина по мере увеличения содержания этанола, хотя различные элементы вторичной структуры меняются по-разному. Анализ спектров КД бета-казеина в водных и водно-спиртовых растворах при нагреве до 60°C также показывает рост структурированности (данные не приводятся). Ранее авторы [Farrell *et al.*, 2001] интерпретировали температурные изменения спектров КД бета-казеина именно таким образом.

Общий рост упорядоченных структур по мере добавления спирта представляется естественным, поскольку увеличение гидрофобности растворителя должно способствовать образованию внутрибелковых водородных связей. Однако

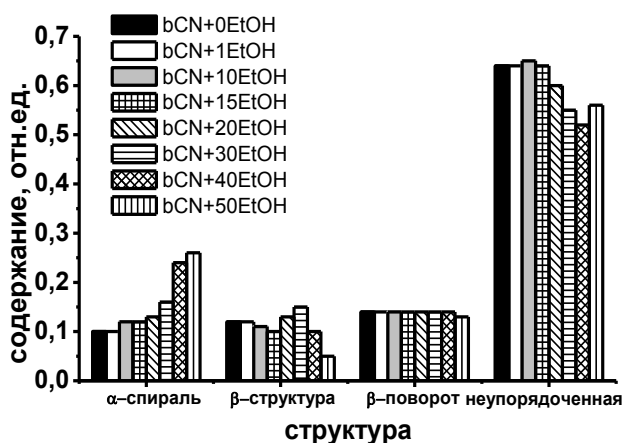


Рис. 10. Содержание вторичных структур в растворах нативного бета-казеина (0.5 мг/мл) при температуре 10°C. Концентрация этанола 0, 1, 10, 15, 20, 30, 40 и 50%.

(рис. 11) по модели двух состояний дает значение высокотемпературного предела эллиптичности -5638 ± 378 град*см²/дмоль, весьма близкое величине -5560 град*см²/дмоль, соответствующей эллиптичности для полностью неупорядоченной структуры [Park *et al.*, 1997].

аналогичное увеличение структурированности при нагреве вызывает сомнения. Анализ температурных зависимостей эллиптичности казеина на длинах волн 222 и 198 нм (рис. 11), соответствующих характеристическим точкам дихроичности альфа-спиралей и неупорядоченных структур, соответственно, показал, что полученные зависимости в пределе высоких температур сходятся к некоторому общему внутри каждой группы данных уровню эллиптичности. Аппроксимация зависимостей при длине волны 222 нм

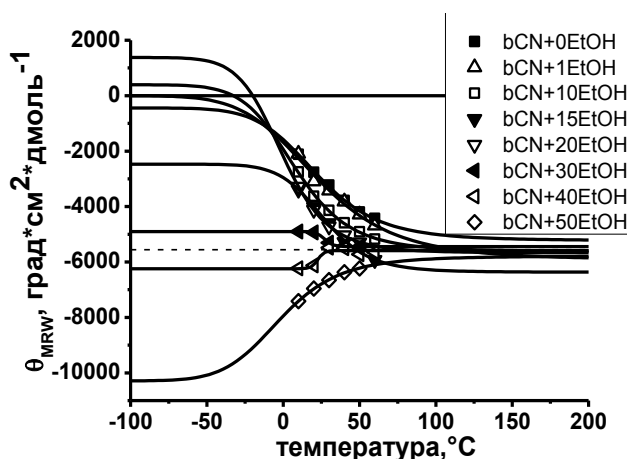


Рис. 11. Температурная зависимость эллиптичности при длине волны 222 нм для 0.5 мг/мл растворов бета-казеина в водно-этанольных растворах. Штриховая линия отмечает уровень эллиптичности -5560 град*см²/дмоль.

привлечение дополнительных структурных методов. Мы провели сравнение изменений в инфракрасных спектрах при нагреве водных и водно-спиртовых растворов нативного бета-казеина с изменениями в спектрах модельных соединений (полипролин и полиаланин), в отношении температурного поведения структуры и гидратированности которых имеются более определенные сведения, чем в отношении бета-казеина. Сопоставление показало, что при нагреве водных растворов бета-казеина имеют место два параллельных процесса: распад элементов спирали РРП с переходом в гидратированную неупорядоченную структуру и дальнейшая дегидратация последней (спектры не приводятся).

Спектральные изменения бета-казеина в смеси вода : этанол (20%) в два раза интенсивнее, чем в буфере (рис. 12А). На разностных температурных спектрах казеина в водно-спиртовом растворе проявляются две однонаправленные компоненты – 1627 и 1680 см⁻¹, что является характерным признаком бета-структуры. Температурная зависимость (рис. 12Б) спектральных изменений бета-казеина на частоте 1627 см⁻¹ указывает на слабую кооперативность плавления бета-структуры с температурой полуперехода 33.6 ± 0.8 °С. Зависимость интенсивности поглощения для бета-казеина в буфере показывает значительно более слабые и разнонаправленные изменения. Первоначальный рост и последующий спад обусловлены наложением двух близких компонент – спирали РРП и неупорядоченной, температурная эволюция которых неодинакова. Таким образом, качественный анализ ИК-спектров свидетельствует, что молекула казеина в 20% растворе этанола содержит значительную долю бета-структуры и обладает более компактной конформацией, чем в буфере. При нагреве происходит распад бета-

Таким образом, несмотря на исходно различный уровень вторичных структур, определяемый при низких температурах составом растворителя, нагрев вызывает их разрушение с переходом при достаточно высоких температурах в неупорядоченное состояние. Интересно, что согласно приведенным зависимостям это же состояние должно реализоваться вне зависимости от температуры в растворе с некоторой концентрацией спирта, промежуточной между 30 и 40%.

Инфракрасная спектроскопия.

Поскольку существует неопределенность в интерпретации температурных спектров КД бета-казеина, необходимо

структуры с образованием неупорядоченной структуры, что подтверждает сделанное ранее заключение в отношении температурной эволюции спектров КД.

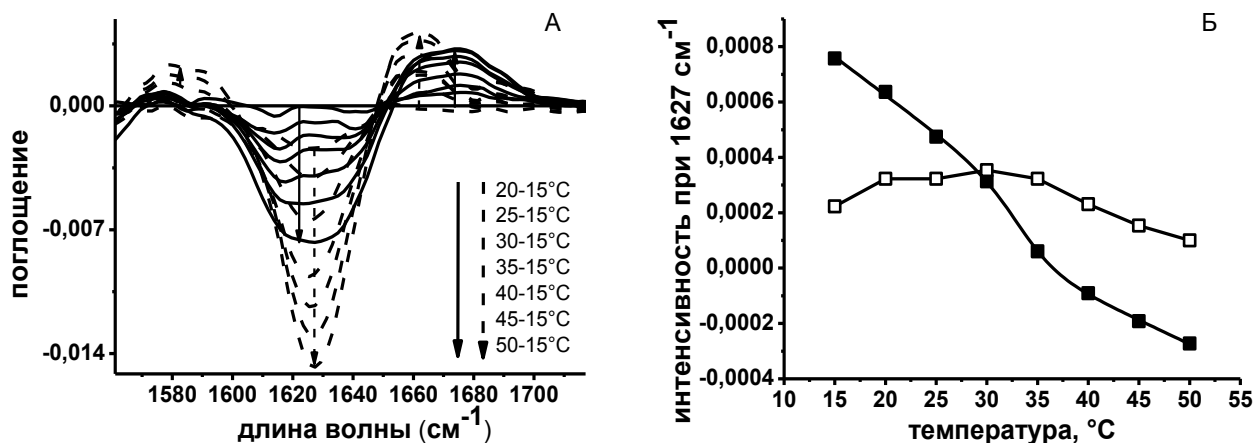


Рис. 12. Характеристика изменений вторичной структуры бета-казеина методом ИК-спектроскопии. А – Температурные разностные спектры растворов бета-казеина в водном буфере (сплошная линия) и в 20% растворе этанола (штриховая линия). Спектры нормированы на интенсивность в максимуме полосы амид 1. Б – Температурные зависимости интенсивности на частоте 1627 см⁻¹ в спектрах казеина в водном буфере (светлые символы) и в 20% растворе этанола (темные символы).

2.3.3. Самоассоциация рекомбинантного бета-казеина С0-208 в водно-этанольных растворах. Исследования самоассоциации рекомбинантных бета-казеинов в водно-этанольных растворах было выполнено на двойном мутанте С0-208, который в водной среде имел ярко выраженные отличия по ассоциативным свойствам от других бета-казеинов. В водно-этанольных смесях bCN С0-208 сохранял свои

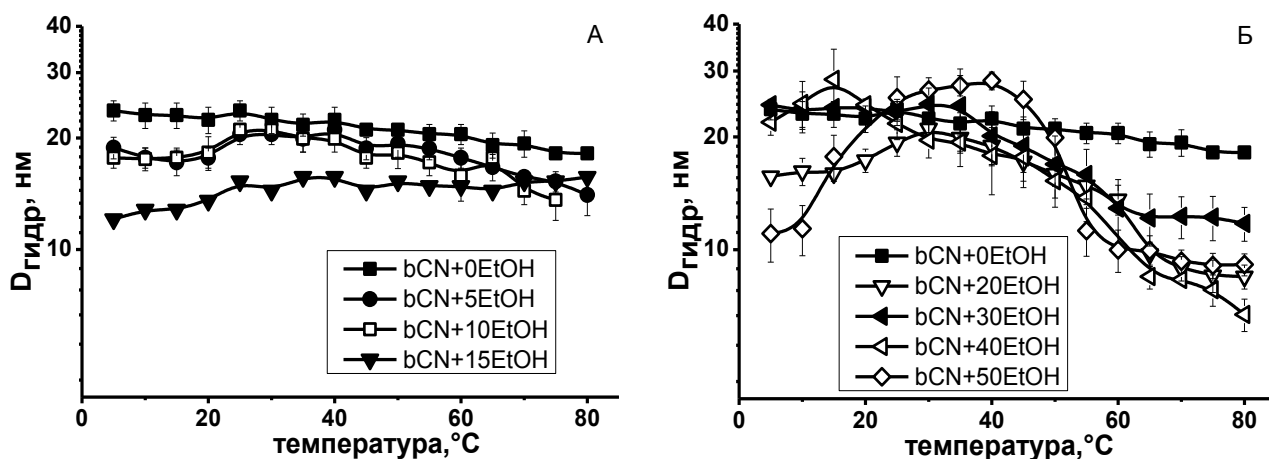


Рис. 13. Температурная зависимость гидродинамического диаметра частиц рекомбинантного бета-казеина С0-208 в растворах с содержанием этанола 0-50% v/v. Концентрация казеина 0.5 мг/мл.

характерные свойства вплоть до 15% содержания этанола. В этих системах во всем изученном интервале температур 5-80°C bCN С0-208 находился в мицеллярном состоянии, хотя размер мицелл при низких температурах существенно зависел от

содержания этанола (рис. 13А). Дальнейшее повышение содержания спирта приводило к разрушению мицелл при высоких температурах, а при максимальном содержании спирта, 50%, температурный интервал существования мицелл существенно сужался (рис. 13Б).

2.3.4. Модель ассоциации бета-казеина в водно-этанольных растворах.

Основываясь на данных литературы о границах концентрационных интервалов различных микроструктур в водно-этанольных растворах [Onori, 1988; D'Angelo *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1999; Wakisaka, Matsuura, 2006], мы предлагаем модель самоассоциации бета-казеина в водно-этанольных растворах. Добавление спирта приводит к образованию клатратных структур, представляющих собой одиночные молекулы спирта, окруженные молекулами воды, что эквивалентно связыванию каждой молекулой спирта 14-20 молекул воды [Sato *et al.*, 1999]. В интервале мольных долей спирта $X_2 = 0 - 0.032$ (0 – 10% этанола) при низких температурах существует достаточно молекул воды не связанных со спиртом и образующих непрерывную трехмерную сетку водородных связей, для гидратации гидрофобных групп белка, что препятствует его ассоциации (рис. 14). Нагрев ослабляет водородные связи воды и уменьшает энтальпийный вклад гидрофобной гидратации [Привалов, 1987], что приводит к мицеллизации казеина. При дальнейшем росте температуры в этом интервале концентраций растет и доля молекул спирта, участвующих в предпочтительной сольватации белка, что приводит к уменьшению размера мицелл и

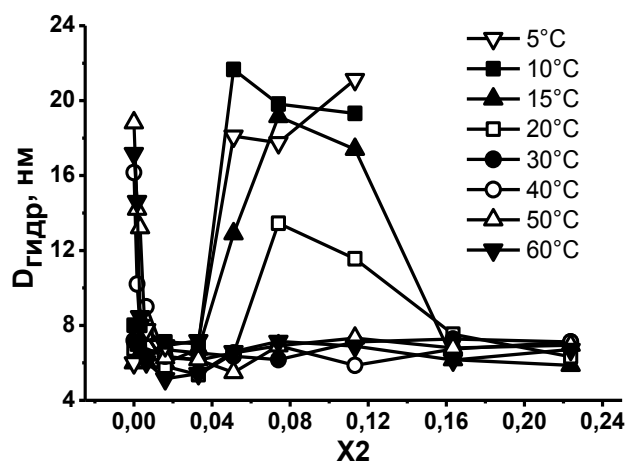


Рис. 14. Зависимость среднего гидродинамического диаметра частиц нативного бета-казеина от мольной доли этанола при температурах 5-60°C.

их диссоциации. В следующем интервале концентраций $0.032 < X_2 < 0.16$ (10 – 40% этанола) вся вода связана со спиртом, образуя комплексы. Понижение температуры увеличивает прочность водородных связей между молекулами растворителя. Как следствие, связывание воды спиртом уменьшает гидратацию гидрофобных групп бета-казеина и вновь способствует его ассоциации. Растворитель в целом по отношению к белку становится более гидрофобным, что способствует росту упорядоченных структур. В этом диапазоне концентраций нагрев разрушает водно-спиртовую структуру и облегчает взаимодействие молекул воды и этанола с белком, что приводит к распаду мицелл и переходу бета-казеина в мономерное состояние. При $X_2 > 0.18$ (>50%) дисперсное состояние молекул воды способствует непосредственному взаимодействию спирта и гидрофобных белковых групп, приводя к мономеризации казеина и резкому росту его спиральности.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют, что температурозависимая ассоциация бета-казеина в водно-этанольных растворах протекает принципиально различным образом в области малых и больших концентраций спирта и может быть объяснена на основе существующих представлений о микрофазном расслоении смешанного водно-спиртового растворителя.

2.4. Влияние внесенных модификаций в структуру бета-казеина на его шапероноподобные свойства.

2.4.1. Влияние на тепловую денатурацию АДГ и каталазы. Для исследования шапероноподобных свойств рекомбинантных бета-казеинов использовали тест-систему, основанную на торможении агрегации АДГ и каталазы, индуцированной тепловым воздействием. Установлено, что все исследованные формы бета-казеина проявляли шапероноподобное действие, ограничивая агрегацию АДГ и каталазы, причем их активность возрастала с ростом молярного соотношения бета-казеин/целевой белок (рис. 15). Молекулярный механизм действия казеинов, очевидно, аналогичен механизму классических шаперонов, когда блокируются

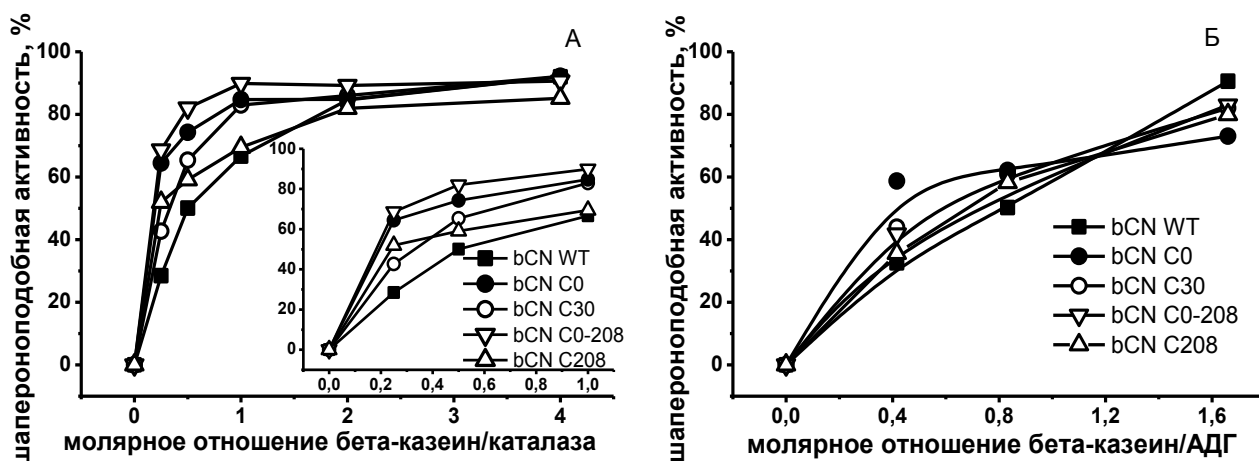


Рис. 15. Зависимость шапероноподобной активности бета-казеинов от молярного соотношения казеинов к белковому субстрату: А – каталаза; Б – АДГ.

экспонированные в растворитель гидрофобные области частично развернутого целевого белка. Бета-казеин, как и малые белки теплового шока, имеет гибкую, слабо упорядоченную структуру с протяженными гидрофобными участками, что может способствовать его взаимодействию с разворачивающимся целевым белком, приводя к формированию стабильных комплексов. Высоко сольватированная полярная область бета-казеина, возможно, является важной в поддержании растворимости комплекса с целевым белком. Очевидно, что отличия исследованных мутантных форм бета-казеина в уровне шапероноподобной активности связаны с различием в их структурной организации и амфифильных свойствах.

2.4.2. Каталитическая активность АДГ в присутствии бета-казеинов.

Несмотря на то, что в контроле (буферный раствор) при температуре, превышающей температуру денатурации, АДГ теряла часть активности (рис. 16, вставка), установлено, что в присутствии бета-казеина активность фермента может сохраняться

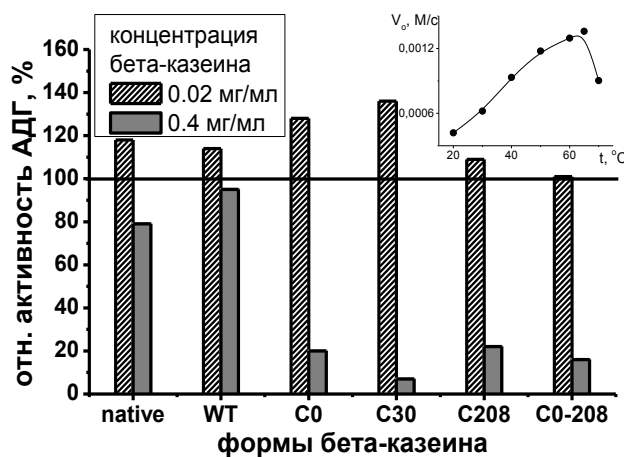


Рис. 16. Активность АДГ в присутствии различных форм бета-казеина при 70°C (за 100% принята активность фермента в отсутствии бета-казеинов при 70°C). На вставке представлена зависимость V_0 от температуры для АДГ в отсутствии бета-казеинов.

температурах выше температуры денатурации.

2.4.3. Антиген-связывающая способность IgG в присутствии бета-казеина.

Антиген-связывающая способность антител коррелирует непосредственно с конформационной стабильностью белковой молекулы [Li *et al.*, 2005, 2006]. В связи с

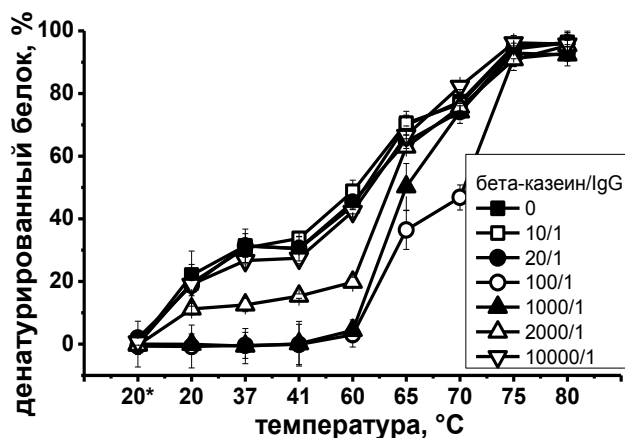


Рис. 17. Общее количество IgG (%), потерявших иммунореактивность вследствие разрушения нативной пространственной организации. Сравнение различных концентраций защитного агента – нативного бета-казеина. 20* – точка без преинкубации раствора антител.

этим, ИФА может быть применен для детектирования конформационных изменений антител, связанных с потерей нативных эпитопов в результате денатурации. Нами была проанализирована иммунореактивность моноклональных IgG, находящихся как в буферном растворе, так и в растворе исследуемых белков (глобулярных и неупорядоченных) при различных температурных обработках. Присутствие казеинов и белков молочной сыворотки в растворе антител эффективно сохраняло иммунореактивность IgG в диапазоне температур 20–60°C (рис. 17). Наибольший термо-защитный эффект наблюдался при 100- и 1000-кратных соотношениях белок/IgG. При температуре 60-80°C снижение уровня детектируемого IgG коррелировало с ростом температуры. Активных концентраций антител

в более широком диапазоне температур. Однако, этот эффект наблюдался только при малых концентрациях шаперона (рис. 16). Увеличение концентрации бета-казеина до 0.4 мг/мл, когда все формы белка находятся в мицеллярном состоянии, приводило к инактивации фермента во всем температурном диапазоне по сравнению с контролем. Вероятно, в мицеллярной форме бета-казеин блокирует активные центры фермента, ингибируя, тем самым, его каталитическое действие. Таким образом, обладая шапероноподобной активностью и препятствуя агрегации АДГ, бета-казеин и его модифицированные формы могут поддерживать активность фермента при

практически не было зафиксировано при температуре 75-80°C.

Очевидно, потеря антиген-связывающей способности IgG, последовавшая за воздействием описанных условий, происходит в основном благодаря конформационному разворачиванию молекулы иммуноглобулина. Способность сывороточных белков молока и казеинов стабилизировать антитела может быть объяснена различными молекулярными взаимодействиями. Защитный эффект казеинов, возможно, имеет место благодаря наличию протяженных гидрофобных участков в белковой молекуле, которые подобно шаперонам за счет гидрофобных взаимодействий с развернутой молекулой поддерживают конформацию IgG. С другой стороны свойства БСА (64 кДа), вероятно, могут быть обусловлены большой молекулярной массой белка и присутствием достаточно крупных молекул в растворе с антителами, так называемым, краудинг (crowding) эффектом [Chebotareva *et al.*, 2004; Chebotareva, 2007; Jeschke, Uhrmacher, 2008; Miyoshi, Sugimoto, 2008].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из фундаментальных задач биоинженерии и молекулярной биологии является установление связи пространственной организации биомакромолекул с их функциональными свойствами, а также структурой и физико-химическими свойствами индивидуальных растворителей для направленного получения белков с заданными характеристиками.

В настоящей работе для исследования структуры и агрегационных свойств рекомбинантных и нативного бета-казеинов в водных и водно-этанольных растворах применен комплекс физико-химических методов (динамическое светорассеяние, флуоресцентная и инфракрасная спектроскопии, спектроскопия кругового дихроизма). Исследована шапероноподобная активность бета-казеинов по отношению к термо-индуцированной агрегации ряда целевых белков.

Обнаружено, что образование внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей, помимо влияния на вторичную структуру, оказывает воздействие на ассоциативные свойства бета-казеина, а также на его способность взаимодействовать с различными белками-субстратами. Точечное введение цистеина в полипептидную цепь бета-казеина способствует росту упорядоченности его вторичной структуры. Наибольшее влияние оказывают замены, затрагивающие гидрофобный домен. Дисульфидные связи, в особенности между гидрофобными участками полипептидной цепи, и, как следствие, димеризация и олигомеризация способствуют самоассоциации рекомбинантных белков.

Показано влияние микрогетерогенности структуры смешанного растворителя на вторичную структуру белка и его коллоидное состояние. В исследуемом интервале концентраций спирта (0 – 50% v/v) бета-казеин претерпевает переход между различными структурными состояниями. Наблюдаемые переходы коррелируют с изменениями в характере межмолекулярных взаимодействий в бинарном

растворителе. В области низких концентраций спирта основным фактором, определяющим структуру и мицеллообразование бета-казеина, является снижение качества воды как растворителя вследствие образования ее молекулами клатратной структуры вокруг молекул спирта. Клатратная структура раствора препятствует непосредственному взаимодействию молекул белка и спирта. Нагрев разрушает клатраты и способствует мономеризации белка. В области высоких концентраций этанола клатратная структура воды разрушается и уже при низких температурах преобладает непосредственное взаимодействие белка с молекулами спирта, дестабилизирующее мицеллы и вызывающее резкий рост вторичных структур в белке. Полученные результаты способствуют пониманию факторов, управляющих процессами мицеллизации казеинов.

Результаты исследования влияния рекомбинантных бета-казеинов на стабилизацию структуры и модуляцию активности белков-субстратов демонстрируют приобретение этими белками повышенной устойчивости к денатурирующим воздействиям температуры. Кроме того, повышение температурной стабильности ферментов сопровождается изменением их каталитической активности в сторону, как ингибирования, так и активации, что зависит от структуры и концентрации используемого бета-казеина. Результаты, полученные на основе анализа иммунореактивности антител методом непрямого ИФА, демонстрируют способность бета-казеина поддерживать конформацию и сохранять антиген-связывающую способность моноклональных IgG. Обнаруженный эффект согласуется с предыдущими сообщениями о защитном влиянии компонентов молока, замедляющих индуцированную нагреванием денатурацию и агрегацию IgG [Chen, Chang, 1998; Chen *et al.*, 2000; Ando *et al.*, 2005; Trujillo *et al.*, 2007]. Выявленные механизмы воздействия бета-казеинов на функциональную активность и стабильность белковых субстратов позволяют целенаправленно модифицировать структуру белков в промышленных препаратах с целью повышения их устойчивости и исходной каталитической активности в широком диапазоне температур и pH.

ВЫВОДЫ

1. Структура и ассоциативные свойства модифицированных форм бета-казеина существенно зависят от места локализации введенного цистеинового остатка. Мицеллярные ассоциаты мономерных форм, содержащих цистеин в начале полипептидной цепи, оказываются менее устойчивыми к температурному воздействию, тогда как мицеллы, образованные олигомерными формами модифицированных бета-казеинов сохраняют стабильность при высоких температурах.
2. Точечное введение цистеина способствует росту внутренней упорядоченности белка, при этом наибольшее влияние на вторичную структуру оказывают замены, затрагивающие гидрофобный домен пептидной цепи бета-казеина.
3. Изменения вторичной структуры и ассоциативных свойств бета-казеина в водно-этанольных растворах определяются структурой растворителя, которая зависит от его состава и температуры. Содержание элементов вторичных структур и размеры мицелл бета-казеина коррелируют с концентрационными границами существования различных микрогетерогенных структур в смешанном растворителе. Показано наличие верхней и нижней границ температурного интервала самоассоциации бета-казеина. В отличие от существующего мнения о спирализации бета-казеина при высоких температурах, достоверно установлено, что увеличение температуры приводит к росту содержания неупорядоченной структуры.
4. На модельных системах (тепловая денатурация алкогольдегидрогеназы, каталазы, иммуноглобулина G) установлено защитное действие бета-казеина, направленное на торможение процесса агрегации и сохранение частичной ферментативной активности целевого белка. Показано, что шапероноподобная активность рекомбинантных бета-казеинов существенно зависит от места локализации цистеинового остатка и структурного состояния белка.
5. Впервые показано, что в условиях температурного стресса все олигомерные формы бета-казеина в молекулярном состоянии проявляют значительный шапероноподобный эффект по отношению к каталитической активности алкогольдегидрогеназы, а в мицеллярной форме этого эффекта не наблюдается.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК

1. Шапероноподобная активность β -казеина и термостабильность алкогольдегидрогеназы / Н.Л. Захарченко, **Т.А. Коннова**, Н.Е. Гоголева, Д.А. Файзуллин, Т. Эртле, Ю.Ф. Зуев // Биоорганическая химия. – 2012. – Т. 38, № 2. – С. 223–228.
2. Мицеллообразование бета-казеина в водно-этанольных растворах / **Т.А. Коннова**,

Д.А. Файзуллин, Т. Эртле, Ю.Ф. Зуев // Доклады Академии Наук. – 2013. (в печати).

Работы, опубликованные в материалах конференций

3. Шапероноподобная активность бета-казеина и влияние модификаций первичной структуры / С.С. Горина, Н. Е. Мухаметшина, **Т.А. Коннова** и др. // Тезисы докладов / Изд-во Пущинского НЦ РАН. – Пущино, 2008. – С. 15-16.
4. Влияние модификации первичной структуры бета-казеина на его шапероноподобную активность / Н.Л. Захарченко, Н. Е. Мухаметшина, **Т.А. Коннова** и др. // Сб. трудов / Изд-во Арта. – Новосибирск, 2008. – С. 273.
5. Структура и шаперонная активность рекомбинантных форм бета-казеина / Ю.Ф. Зуев, **Т.А. Коннова**, Н.Л. Захарченко и др. // Тезисы докладов / Изд-во «ФизтехПресс» КФТИ КазНЦ РАН. – Казань, 2009. – С. 72.
6. Структура рекомбинантных мономерных и олигомерных форм бета-казеина / Н.Л. Захарченко, Д.А. Файзуллин, Ю.В. Гоголев, Н.Е. Мухаметшина, **Т.А. Коннова**, Т. Haertlé, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов / Изд-во «ФизтехПресс» КФТИ КазНЦ РАН. – Казань, 2009. – С. 166.
7. Chaperone-like activities and structural properties of different molecular forms of beta-casein / N.E. Mukhametshina, N.L. Zakhartchenko, **T.A. Konnova** et al. // Abstracts / Wiley Blackwell, FEBS. – Prague, Czech Republic, 2009. – P. 157.
8. **Коннова, Т.А.** Температуро-зависимая диссоциация мицелл бета-казеина в водно-этанольных растворах / Т.А. Коннова, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов / Из-во Казанского государственного университета. – Казань, 2010. – С. 29.
9. Захарченко, Н.Л. Структурные различия природной и рекомбинантной форм бета-казеина. Метод флуоресценции / Н.Л. Захарченко, **Т.А. Коннова** // Тезисы докладов / Из-во Казанского государственного университета. – Казань, 2010. – С. 22.
10. **Konnova, T.A.** Influence of ethanol on beta-casein micellar organization and colloidal stability / T.A. Konnova, D.A. Fayzullin, N.L. Zakhartchenko et al. // Abstracts / Wiley Blackwell, FEBS. – Torino, Italy, 2011. – P. 113.
11. Взаимосвязь структуры и шапероно-подобной активности бета-казеина / Н.Л. Захарченко, **Т.А. Коннова**, Н.Е. Гоголева, и др. // Тезисы докладов / Изд-во Карельского НЦ РАН. – Петрозаводск, 2011. – С. 221.
12. Структурная организация и стабильность мицелл бета-казеина в водно-этанольных растворах / **Т.А. Коннова**, Д.А. Файзуллин, Н.Л. Захарченко и др. // Тезисы докладов / Изд-во Карельского НЦ РАН. – Петрозаводск, 2011. – С. 371.
13. Защитные свойства бета-казеина по отношению к белкам в стрессовых условиях / Н.Л. Захарченко, **Т.А. Коннова**, Н.Е. Гоголева и др. // Тезисы докладов / Изд-во Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского. – Нижний Новгород, 2011. – С. 267.
14. Бета-казеин – природный амфифил: структура, самоассоциация, шапероно-

- подобные свойства / **Т.А. Коннова**, Н.Л. Захарченко, Д.А. Файзуллин и др. // Тезисы докладов / Из-во «Печать-Сервис-XXI век». – Казань, 2011. – С. 83.
15. Шапероноподобная активность бета-казеина в условиях температурного и химического стрессов / **Т.А. Коннова**, Н.Л. Захарченко, Н.Е. Гоголева и др. // Тезисы докладов / Изд-во «ФизтехПресс» КФТИ КазНЦ РАН. – Казань, 2011. – С. 83 – 84.
16. The role of beta-casein micellar network in its chaperone-like activity / **T. A. Konnova**, N. L. Zakhartchenko, N. E. Gogoleva et al. // Abstracts / Université Paris Diderot. – Paris, France, 2012. – P. 51.
17. Ферментативная активность липазы *Candida Rugosa* в присутствии мицелл бета-казеина / Н.Л. Захарченко, Л.Р. Богданова, **Т.А. Коннова**, Ю.Ф. Зуев // Тезисы докладов / Изд-во Нижегородского государственного университета им. Н.И.Лобачевского. – Нижний Новгород, 2012. – С. 112.