

УДК 577.112.7;617.741

СВЯЗЬ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ И ШАПЕРОННОЙ АКТИВНОСТЬЮ α A-КРИСТАЛЛИНА ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ЕГО МОДИФИКАЦИИ АССОЦИИРОВАННЫМИ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ ОКИСЛИТЕЛЬНЫМИ АГЕНТАМИ И ЗАЩИТНАЯ РОЛЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ МОЛЕКУЛ

© 2022 S.S. Moghadam¹, M. Ghahramani¹, K. Khoshaman¹, A. Oryan², A.A. Moosavi-Movahedi³, **B.I. Kurganov⁴**, and R. Yousefi^{1,3*}

¹ Protein Chemistry Laboratory, Department of Biology, College of Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran; e-mail: ryousefi@shirazu.ac.ir; r.yousefi2000@gmail.com

² Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

³ Institute of Biochemistry and Biophysics (IBB), University of Tehran, Tehran, Iran

⁴ Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

Поступила в редакцию 12.09.2021

После доработки 16.10.2021

Принята к публикации 16.10.2021

Целью исследования было оценить влияние пероксинитрита (PON, агент окислительного стресса при диабете), метилглиоксаля (MGO, диабет-ассоциированное реактивное карбонильное соединение) и их одновременного воздействия на структурные и функциональные характеристики α A-кристаллина человека (α A-Cry) с помощью различных методов спектроскопии. Кроме того, с помощью метода тензиометрического анализа и метода динамического светорассеяния были определены такие параметры, как поверхностное натяжение и размеры олигомеров обработанного и необработанного белка. Наши результаты показали, что инкубация PON и MGO с α A-Cry человека приводит к образованию новых хромофоров, вызывает изменения в структурах этого белка (от вторичной и до четвертичной), уменьшение размера белковых олигомеров и значительное усиление шаперонной активности α A-Cry. Для отмены действия протестированных химических соединений применяли аскорбиновую кислоту и глутатион (основные компоненты антиоксидантной защиты хрусталика глаза). Как ожидалось, оба изученных антиоксиданта в значительной степени предотвращают образование высокомолекулярных агрегатов белка α A-Cry (по результатам SDS-ПААГ). Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что антиоксидантная защита клеток хрусталика, в частности глутатион, может обеспечивать эффективную защиту от быстрого возникновения и прогрессирования диабетической катаракты, предотвращая деструктивные реакции высокорепактивных метаболитов, ассоциированных с сахарным диабетом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: α A-кристаллин человека, диабетическая катаракта, антиоксиданты хрусталика глаза, структура белка, шаперонная активность.

DOI: 10.31857/S0320972522020026

ВВЕДЕНИЕ

Высокорекреационноспособные химические соединения, ассоциированные с сахарным диабетом (СД), обычно подразделяют на соединения, содержащие карбонильные группы, и окси-

данты. Следовательно, СД рассматривается как нарушение обмена веществ, связанное как с окислительным, так и с карбонильным стрессом [1]. К карбонильным соединениям, содержание которых в организме увеличивается при СД, относятся многие сахара и производные сахаров, различные формы продуктов окисления аскорбиновой кислоты и высокорекреационноспособные побочные продукты метаболизма, такие как метилглиоксаль (MGO) и малоновый диальдегид (MDA) [2, 3]. Кроме того, СД вызывает повышение содержания в организме различных активных форм кислорода (ROS) и активных форм азота (RNS). Наиболее известным представителем активных форм азота является

Принятые сокращения: СД – сахарный диабет; α A-Cry – α A-кристаллин; AGE – конечный продукт гликирования; ANS – 1-анилино-8-нафталиносulfонат; ASA – аскорбиновая кислота; DLS – динамическое светорассеяние, dynamic light scattering; α -Gls – α -глюкозидаза; GSH – глутатион; HMM – высокая молекулярная масса; MGO – метилглиоксаль; PON – пероксинитрит; ThT – тиофлавин Т.

* Адресат для корреспонденции.

пероксинитрит (PON) [4]. Реакционноспособные соединения, ассоциированные с СД, могут взаимодействовать с широким кругом биомолекул, в частности с долгоживущими белками, вызывая в них структурные и функциональные повреждения и создавая предпосылки для возникновения серьёзных осложнений, связанных с данным нарушением обмена веществ [5]. Кристаллины хрусталика глаза в силу длительного периода полураспада и ограниченного обновления являются одними из важных молекулярных мишеней для реакционноспособных соединений, ассоциированных с СД. С течением времени в кристаллинах накапливаются многочисленные химические модификации, которые в конечном итоге вызывают серьёзные структурные повреждения, приводя к денатурации и агрегации белка, что служит основной причиной рассеяния света в тканях хрусталика [6]. По этим причинам СД играет важную роль в развитии катаракты. Недавние исследования показывают, что у людей с диабетом вероятность развития катаракты в 2–5 раз выше, чем у людей без диабета [7]. Более того, у больных сахарным диабетом катаракта формируется в более молодом возрасте и быстрее прогрессирует [8].

Три основные группы белков (α -, β - и γ -кристаллины) имеют высокую концентрацию в тканях хрусталика позвоночных. Они образуют прозрачный матрикс с высоким показателем преломления [9]. Эти белки богаты чрезвычайно стабильными структурами бета-листов, которые играют важную структурную роль в хрусталике глаза [10]. α -Кристаллин (α -Crn) состоит из субъединиц α A и α B и принадлежит к семейству белков теплового шока. Он защищает хрусталики глаза от накопления в них развёрнутых белковых структур [11]. В целом, любой внутренний или внешний фактор, влияющий на структуру и функцию кристаллинов или вызывающий какое-либо изменение взаимодействий между этими белками, будет существенно влиять на качество зрения [12]. Генетические мутации и посттрансляционные неферментативные модификации являются двумя основными факторами, которые могут повреждать нативную структуру кристаллинов хрусталика, приводя к денатурации белков и образованию крупных светорассеивающих агрегатов в тканях хрусталика [13, 14]. Диабетическая катаракта, по-видимому, является частью многофакторного механизма, и несколько реактивных метаболитов способствуют развитию помутнения хрусталика наряду с хроническим повышением содержания сахара в крови [15]. Поскольку одними из наиболее важных факторов, приводящих к осложнениям при СД, считаются карбонильный и окислительный

стресс, мы изучили роль MGO (реакционноспособный карбонильный метаболит) и PON (ассоциированный с диабетом оксидант) в структурных и функциональных нарушениях α A-Crn человека. Высокореактивный карбонильный метаболит MGO вступает в реакцию с аминокетонами в белке с образованием шиффовых оснований, которые затем превращаются в продукты Амадори. Этот деструктивный путь приводит к образованию высокотоксичных для клетки аддуктов белка и сахаров, которые хорошо известны как конечные продукты гликирования (AGE) [16]. Кроме того, диабет и воспалительные процессы сопровождаются образованием в тканях радикалов супероксида и оксида азота, и эти два соединения способны образовывать PON, который, в свою очередь, является основным окислителем и сильным нитрующим агентом [17]. С другой стороны, окислительная среда, создаваемая этими соединениями в организме больных диабетом, способна катализировать реакции белков с реакционноспособными и содержащими карбонильные группы соединениями, приводя к образованию AGE [18–20]. Есть сообщения об одновременном повышении уровня MGO и PON у больных с хронической гипергликемией и катарактой, что может привести к серьёзным повреждениям биомолекул хрусталика глаза, особенно кристаллинам [21, 22]. В хрусталиках глаза имеется сильная антиоксидантная защитная система, которая может противостоять деструктивному влиянию окислительных агентов, создавать восстановительную среду, в которой существенно понижается скорость реакции между карбонильными соединениями и белками [23]. В этом исследовании мы провели изучение характера структурных повреждений, вызванных воздействием MGO и PON и их комбинации на рекомбинатный белок α A-Crn человека. Мы также изучили способность двух основных антиоксидантов хрусталика глаза человека, а именно: глутатиона (GSH) и аскорбиновой кислоты (ASA), устранять эффекты связанных с СД реактивных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Кумасси бриллиантовый голубой (СВВ), β -меркаптоэтанол (β -МЕ), 1-анилино-8-нафталиносальфонат (ANS), тиофлавин Т (ThT), GSH и другие реагенты были получены от компании «Sigma-Aldrich» (США). Канамицин и изопропил β -D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) поступили от компании «Merck» (США). Для приготовления всех растворов использовали дважды дистиллированную воду.

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка α A-Cry. Клетки *Escherichia coli* BL21 (DE3) трансфицировали кДНК α A-Cry человека, клонированной в вектор экспрессии pET-28(b+), и их использовали для получения рекомбинантного белка. Вкратце, клетки выращивали в стерильной культуральной среде (LB) при 37 °C в течение 16 ч. Экспрессию рекомбинантного белка α A-Cry индуцировали добавлением IPTG (0,25 мМ). После завершения инкубации клетки центрифугировали и затем лизировали ультразвуком. Рекомбинантный белок выделяли из супернатанта с помощью ионообменной хроматографии на колонке с ДЕАЕ-целлюлозой и последующей гель-фильтрации на колонке с Sephacryl S-300 [24–26]. Для оценки чистоты полученных препаратов белка использовали электрофорез в SDS-ПААГ (в 12%-ном геле). Очищенный α A-Cry человека лиофилизировали и до его дальнейшего использования в экспериментах хранили при –20 °C.

Синтез PON и модификация белка пероксинитритом. PON синтезировали, используя реакцию холодных растворов 0,6 М нитрита натрия и 0,7 М перекиси водорода в 0,6 М соляной кислоте в ледяной бане [27]. Реакцию быстро останавливали добавлением гидроксида натрия (1,5 М). Чистоту PON определяли спектрофотометрически с использованием коэффициента молярного поглощения – 1670 М⁻¹ см⁻¹ при длине волны 302 нм [28]. Конечный раствор (чистый препарат PON) замораживали и хранили при –20 °C.

Рекомбинантный белок (3 мг/мл) инкубировали с 2 мМ PON при комнатной температуре в течение 30 мин в 5 мл 50 мМ натрий-фосфатного буфера, содержащего 10 мМ бикарбонат натрия при pH 7,4 (буфер А). После завершения реакции, для удаления избытка PON, белковый раствор подвергали диализу дважды в течение 24 ч против дистиллированной воды. Модификацию белка пероксинитритом подтверждали путём определения остатков нитротирозина, нитротриптофана и дитирозина с помощью УФ-видимой (UV-Vis) спектрофотометрии [29, 30].

Неферментативное гликирование α A-Cry человека. α A-Cry человека (3 мг/мл) инкубировали с 5 мМ MGO в 200 мМ фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,01%-ный азид натрия, в темноте при 37 °C в течение трех дней. Затем образцы белка подвергали диализу против фосфатного буфера в течение 24 ч, чтобы удалить не вступившие в реакцию производные сахаров. α A-Cry (3 мг/мл) также модифицировали смесью PON (2 мМ) и MGO (5 мМ) в 50 мМ фосфатном буфере, содержащем 0,01%-ный азид натрия (pH 7,4) в течение 30 мин. Избыток реагентов в образцах удаляли диализом [31].

Флуоресцентный анализ. Изменения структуры рекомбинантного α A-Cry человека (0,15 мг/мл в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,4) после его модификации реагентами MGO и PON анализировали по внутренней (Trp/Tyr) и внешней (ANS) флуоресценции с использованием спектрофотометра Cary-Eclipse. Остатки тирозина и триптофана возбуждали при длинах волн 280 и 295 нм соответственно [32, 33]. Для определения флуоресценции дитирозина образцы белков подвергали возбуждению при длине волны 320 нм [34].

Для оценки содержания экспонированных гидрофобных участков использовали значения флуоресценции ANS. α A-Cry человека инкубировали с 100 мкМ ANS в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте, и регистрировали спектры эмиссии в диапазоне длин волн 400–600 нм при фиксированной длине волны возбуждения, равной 365 нм.

Для определения возможного образования амилоидных фибрилл белка использовали ThT [35, 36]. С этой целью белки в концентрации 0,15 мг/мл инкубировали с ThT (конечная концентрация – 20 мкМ) в течение 5 мин при комнатной температуре. Растворы белков возбуждали при длине волны 440 нм и регистрировали спектры эмиссии в диапазоне длин волн 450–600 нм.

Определение кругового дихроизма белка в дальнем ультрафиолетовом диапазоне. Изменения вторичной структуры α A-Cry человека изучали с помощью метода спектрометрии кругового дихроизма (КД). Эти эксперименты проводили при фиксированной концентрации белка (0,2 мг/мл), в 50 мМ фосфатном буфере при pH 7 и 25 °C с использованием спектрополяриметра («JASCO», Япония). Длина оптического пути была равна 0,1 см. Полученные спектры КД в дальнем ультрафиолетовом диапазоне выражали в виде молярной эллиптичности. Процентное содержание элементов вторичной структуры рассчитывали с использованием сервера DICHROWEB с помощью алгоритма CONTIN [37].

Определение хромофоров AGE. Образование различных хромофоров AGE в α A-Cry человека определяли флуориметрически [38] в растворе белка (0,15 мг/мл) в 50 мМ фосфатном буфере при pH 7,4. Были проанализированы различные хромофоры конечных продуктов гликирования (AGE), такие как аргпиримидин (возбуждения при 322 и 381 нм), K2P [1-(5-амино-5-карбоксипентил)-4-(5-амино-5-карбоксипентил-амино)-3-гидрокси-2,3-дигидропиридиний; возбуждение при 342 нм], карбоксиметиллизин (возбуждение при 352 нм), пентозидин (возбуж-

дение при 335, 370 и 375 нм) и весперлин А (возбуждение при 370 нм) [39–42].

Определение поверхностного натяжения. Поверхностное натяжение раствора белка (1 мг/мл) определяли в 100 мМ фосфатном буфере (рН 7,4) при 25 °С с использованием тензиометра (Krüss K100) по кольцевому методу Du Noüy [43].

Метод динамического рассеяния света (DLS). Распределение олигомеров α A-Сгу человека по их размеру определяли в образцах белков (1,5 мг/мл), приготовленных в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,4), при 25 °С с использованием прибора Nanotracs Wave («Microtracs», США). При использовании данного метода лазерный луч с длиной волны 780 нм и под углом 90° отражался белковым образцом [44]. Полученные результаты анализировались с помощью программного обеспечения Microtracs FLEX.

Определение шапероноподобной активности. Шапероноподобную активность α A-Сгу человека, препятствующую агрегации инсулина, определяли при 40 °С на спектрофотометре VisUV Cecil CE 7200 («Cecil Instruments Ltd.», Великобритания), снабжённом регулятором температуры. Регистрировали количество света, отражённого при 360 нм, как функцию времени. Агрегацию инсулина вызвали добавлением ди-тиотрейтола (ДТТ). Для количественной оценки шапероноподобной активности α A-Сгу использовали следующее уравнение [45, 46]:

$$\% \text{ защиты} = (1 - A_t/A_{t0}) \times 100, \quad (1)$$

где A_t и A_{t0} – это площади под поглощением света против времени в присутствии шаперона (α A-Сгу) и при его отсутствии соответственно.

Способность α A-Сгу вызывать рефолдинг других белков. Дрожжевая α -глюкозидаза (α -Gls) полностью разворачивалась и инактивировалась в присутствии 8 М мочевины. Затем раствор фермента разводили в 100 раз фосфатным буфером в присутствии α A-Сгу или при его отсутствии. Далее определяли активность α -Gls, и в качестве индекса рефолдинга рассматривали восстановление ферментативной активности [47].

Способность α A-Сгу восстанавливать ферментативную активность α -Gls в условиях теплового стресса определяли с помощью термической инактивации дрожжевой α -глюкозидазы. Этот фермент очень чувствителен к высокой температуре, и инкубация при 52 °С через 1 мин приводит к потере его активности на 50%. При 46 °С 50%-ная инактивация фермента достигается примерно за 15 мин [48]. Фермент разводили в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,0) до конечной

концентрации 0,2 Ед./мл и затем инкубировали при 46 °С в присутствии α A-Сгу (0,05 мг/мл) или при его отсутствии. Для определения кинетики процесса инактивации фермента его активность измеряли через каждые 5 мин [49].

Электрофорез белков в SDS-ПААГ. Электрофоретическую подвижность белков в 12%-ном полиакриламидном геле оценивали по стандартному протоколу проведения электрофореза в SDS-ПААГ [50, 51]. На каждую дорожку наносили по 12,5 мкг белка. Для визуализации белковых полос гель окрашивали СБВ.

Определение концентрации белка. Чтобы определить концентрацию α A-Сгу человека, 1 мг белка растворяли в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,4), и определяли концентрацию полученного раствора белка на спектрофотометре T90+ UV-Vis («PG Instruments Ltd.», Китай) при длине волны 280 нм с использованием коэффициента экстинкции 0,725 для 1 мг/мл раствора белка [52, 53]. Концентрацию инсулина (коэффициент экстинкции – 1,08 на 1 мг/мл) определяли путём измерения его поглощения при 276 нм.

Статистический анализ. Для анализа данных использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA (One-way ANOVA test) и программу Sigma Plot 12. Значение $p < 0,05$ рассматривалось как статистически достоверное [54].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка образования ковалентных сшивок в модифицированном белке α A-Сгу человека с помощью метода электрофореза в SDS-ПААГ. Белки кристаллины образуют большие олигомерные комплексы, которые играют важную роль в помутнении хрусталика и образовании катаракты [55]. Пероксинитрит (PON) и метилглиоксаль (MGO) способствуют образованию катаракты, индуцируя окислительный и карбонильный стресс соответственно в хрусталиках глаза [56, 57]. Одним из наиболее распространённых методов оценки образования белковых олигомеров большого размера является электрофорез в SDS-ПААГ, который можно проводить как в восстанавливающих условиях, так и при отсутствии восстановителей (рис. 1).

В этом исследовании образцы рекомбинантного α A-Сгу человека, обработанные PON и MGO, подвергали электрофорезу, чтобы оценить степень олигомеризации белков и образование в них перекрестных сшивок [58]. Как показано на рис. 1, в образце, обработанном PON, в восстанавливающих условиях полоса, соответствующая нативному белку, исчезла, и в то же

время появились белковые олигомеры большого размера. Наблюдались полосы с молекулярными массами примерно 30–35 кДа, указывающие на перекрестные сшивки модифицированного белка. Наличие нескольких белковых полос в восстанавливающих условиях указывало на то, что помимо дисульфидных связей другие ковалентные связи участвовали в образовании агрегатов белков с высокой молекулярной массой (НММ). Обработка α A-Cry человека метилглиоксалем также приводила к образованию высокомолекулярного белка. Эти агрегаты НММ способствуют развитию катаракты, вызывая помутнение хрусталика и рассеивание падающего света. Как показано на рис. 1, основная часть гликированных белков задерживалась из-за их очень большого размера на границе между концентрирующим и разделяющим гелем [59, 60]. Также на рис. 1 показаны картины электрофоретической подвижности в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях модифицированного MGO белка, которые свидетельствуют о том, что в образовании НММ-агрегатов участвуют ковалентные связи, отличающиеся от дисульфидных ковалентных связей. Более того, при обработке α A-Cry человека смесью MGO и PON наблюдались значительные изменения электрофоретической подвижности и интенсивности окраски белковых полос. Одновременная обработка белка пероксинитритом и метилглиоксалем также приводила к образованию НММ-агрегатов. Сравнение картин электрофоретического разделения белков в восстанавливающих условиях и без восстановителей не выявило существенных различий, что позволяет предположить, что белковые олигомеры сшиты ковалентными связями, отличными от дисульфидных.

Оценка структуры модифицированного α A-Cry с помощью УФ-видимой (UV-Vis) спектрофотометрии и флуоресцентной спектроскопии. По данным UV-Vis спектрофотометрии и флуоресцентной спектроскопии, модификация α A-Cry человека метилглиоксалем и пероксинитритом или смесью этих реагентов (MGO + PON) приводила к значительным структурно-функциональным изменениям белка, образованию новых хромофоров и олигомеризации белка. Как показано на рис. 2, *a*, спектры поглощения белка, обработанного PON, указывают на увеличение количества дитирозина, нитротирозина и нитротриптофана, что видно из величин оптического поглощения при 428 нм ($\epsilon_{428\text{нм}} = 4200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 400 нм ($\epsilon_{400\text{нм}} = 5200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и 330 нм ($\epsilon_{330\text{нм}} = 4000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) соответственно [61–63]. Обработка α A-Cry человека пероксинитритом вызывала повышение эмиссии между 375

и 405 нм, что предполагает образование дитирозиновых перекрестных сшивок [64]. Реакция α A-Cry с метилглиоксалем приводила к максимуму поглощения, указывая на образование новых хромофорных групп. Обработка α A-Cry смесью PON и MGO вызывала значительное снижение пика поглощения, расположенного между пиками поглощения α A-Cry после его инкубации или с PON, или с MGO.

Влияние PON и MGO на структуру α A-Cry человека дополнительно оценивали по флуоресценции остатков триптофана, тирозина и дитирозина. Как показано на рис. 2, *b* и *d*, белок, модифицированный PON, MGO (гликированный) и смесью PON + MGO, демонстрировал снижение интенсивности флуоресценции остатков тирозина и триптофана. Наше исследование выявило способность PON превращать остатки тирозина и триптофана в новые хромофоры, такие как дитирозин, нитротирозин и нитротриптофан. Согласно нашим предыдущим результатам, для образцов белка, инкубированных с MGO, характерны максимумы на двух длинах волн в этой области из-за переноса энергии от тирозина к новым хромофорам. Значительное снижение интенсивности флуоресценции тирозина и триптофана наблюдали после индивидуальной инкубации α A-Cry человека с PON и MGO [20, 22].

Выявленное снижение интенсивности флуоресценции тирозина и триптофана может быть связано с крупными структурными изменениями в микроокружении остатков ароматических аминокислот. Изучение флуоресценции дитирозина (рис. 2, *c*) выявило неожиданно сильное увеличение интенсивности флуоресценции белка, обработанного MGO или смесью PON и MGO, в то время как образование дитирозина является специфичным для реакции белка с PON [29]. Поскольку измерения на спектрофотометре в ближнем ультрафиолетовом диапазоне и видимой части спектра показали, что перекрестные ковалентные сшивки с образованием дитирозина происходят только в PON-модифицированном белке, пики высокой интенсивности, которые появляются в белке, обработанном метилглиоксалем, или в образцах белка, инкубированных со смесью PON и MGO, могут быть отнесены на счёт ассоциированных с процессом гликирования хромофоров, пики эмиссии которых перекрываются с пиком дитирозина. Новые пики эмиссии флуоресценции в белках, обработанных MGO, и в меньшей степени – в белке, модифицированном смесью PON + MGO, указывают на образование специфичных хромофоров [22, 29].

Степень экспонирования гидрофобных поверхностей напрямую связана со скоростью аг-

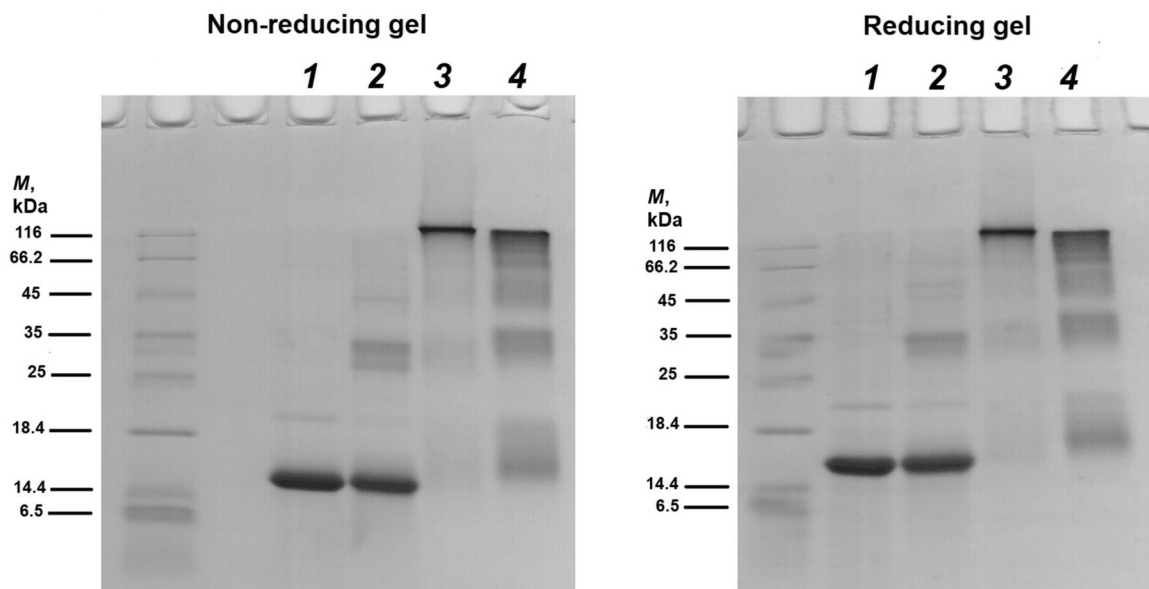


Рис. 1. Результаты проведения электрофореза в SDS-ПААГ α A-Сгу человека. α A-Сгу (3 мг/мл) инкубировали с 2 мМ PON в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4) при комнатной температуре в течение 30 мин (дорожка 2); с 5 мМ MGO в 200 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 3 дней при 37 °С (дорожка 3) или со смесью MGO и PON в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем в течение трех дней – при 37 °С (дорожка 4); дорожка 1 – немодифицированный белок α A-Сгу (контроль). Образцы белка анализировали с помощью электрофореза в SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях

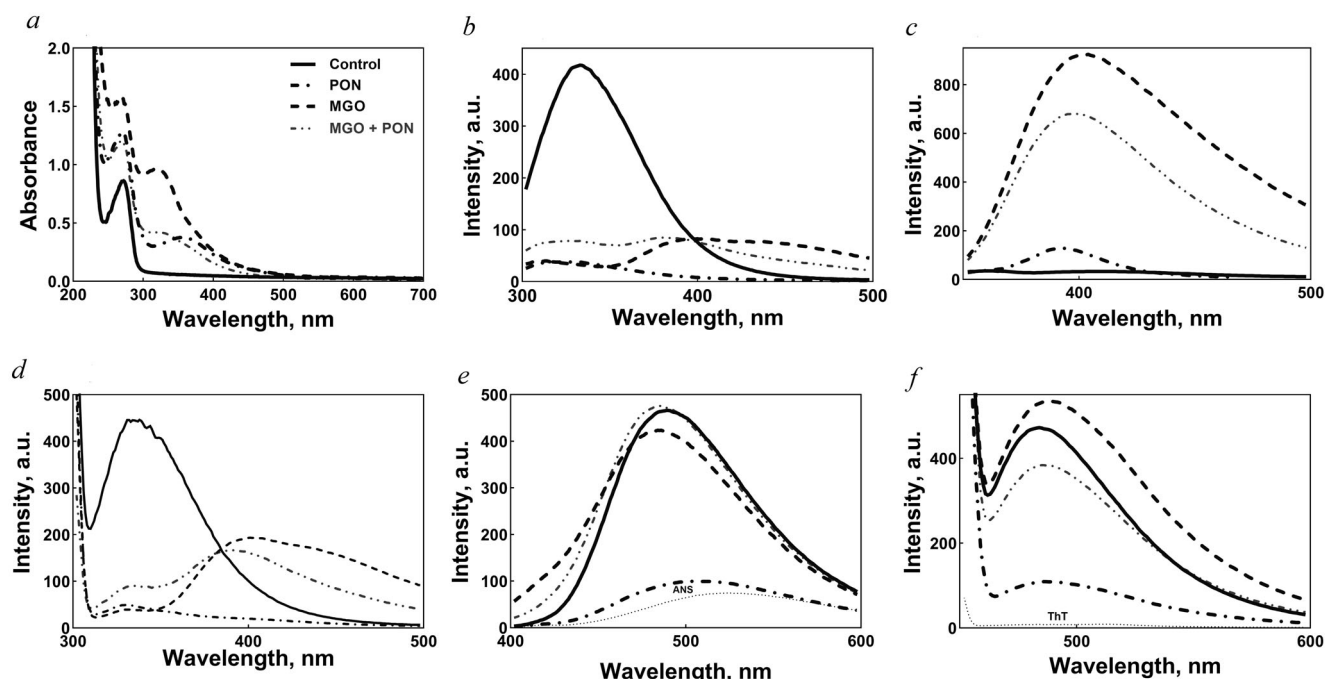


Рис. 2. Изучение структуры модифицированного α A-Сгу с помощью UV-Vis спектрофотометрии и флуоресцентной спектроскопии. *a* – Спектры поглощения в диапазоне UV-Vis образцов модифицированного α A-Сгу (1 мг/мл) при 200–700 нм. Измерения интенсивности флуоресценции проводили при концентрации белка 0,15 мг/мл. *b–d* – Анализ образцов модифицированного α A-Сгу по флуоресценции тирозина, дитирозина и триптофана после их возбуждения при длинах волн 280, 320 и 295 нм соответственно. Спектры эмиссии регистрировали в диапазоне 300–500 нм. Ширину щели фиксировали на уровне 5, 10 и 10 нм для каналов возбуждения и на уровне 10, 20 и 10 нм – для каналов эмиссии для тирозина, дитирозина и триптофана соответственно. *e* – Использование флуоресценции ANS (возбуждение при 365 нм) для оценки гидрофобности поверхности белка. *f* – Регистрация флуоресценции ThT (возбуждение при 440 нм) для определения амилоидогенных свойств модифицированного α A-Сгу

Таблица 1. Процентное содержание элементов вторичной структуры в различных образцах белка α A-Cry

α A-Cry	α -спираль	β -складчатая структура	β -поворот	Случайный клубок
Контроль	4,2	41,1	28,2	26,5
PON	3,9	41,0	28,2	26,8
MGO	6,0	37,9	29,4	26,7
MGO + PON	5,1	39,4	28,9	26,6

регаии белка, а в случае α -Cry влияет на его шаперонную активность. Изменения структуры в модифицированном белке были далее изучены с помощью экспонирования гидрофобных поверхностей белка в раствор с использованием ANS (возбуждение при 365 нм). ANS связывается с гидрофобными участками белка, экспонированными в водную фазу, что приводит к повышению интенсивности флуоресценции [65]. Как показано на рис. 2, *e*, PON-модифицированный белок демонстрировал значительно более низкую интенсивность флуоресценции ANS, чем немодифицированный белок. Флуоресценция ANS в модифицированном метилглиоксальем α A-Cry была немного снижена, что свидетельствует о небольшом снижении гидрофобности поверхности белка. Флуоресценция ANS в α A-Cry, инкубированном со смесью PON и MGO, немного увеличивалась. Гидрофобность играет важную роль в шаперонной активности α A-Cry и его связывании с белками-мишенями. Следовательно, изменение количества экспони-

рованных в раствор гидрофобных поверхностей этого белка в результате его модификации различными соединениями может играть роль в модуляции его шаперонной функции.

Возможность образования амилоидных фибрилл модифицированным α A-Cry исследовали с помощью флуоресцентного зонда ThT, флуоресценция которого усиливается при его связывании с поперечной β -складчатой структурой в амилоидных фибриллах [66]. Как показано на рис. 2, *f*, флуоресценция ThT увеличивалась в образцах белка, модифицированного MGO, но уменьшалась в образцах, одновременно инкубированных с PON и MGO, в сравнении с немодифицированным белком. Белок α A-Cry, обработанный PON, показывал существенно сниженную флуоресценцию ThT, что указывает на то, что агрегация α A-Cry человека не связана с образованием амилоидных фибрилл.

Анализ вторичной структуры модифицированного α A-Cry с помощью метода КД. Чтобы выявить изменения в структуре белка α A-Cry, в особенности в его вторичной структуре, после его модификации двумя окислительными агентами (PON и MGO), мы изучили спектры КД модифицированного белка в дальнем ультрафиолетовом диапазоне [67]. Спектры КД немодифицированных и PON-модифицированных белков имели минимумы при ~ 217 нм, что предполагает образование больших количеств β -складчатых структур. Отрицательный пик в спектрах α A-Cry, модифицированного MGO или PON + MGO был сдвинут к 209 нм, что предполагает образование α -спиральной структуры.

Как показано на рис. 3, обработка α A-Cry метилглиоксальем или смесью PON + MGO приводила к значительным изменениям вторичной структуры белка, особенно в случае MGO-модифицированного белка. Реакция с этими двумя химическими реагентами привела к переходу от β -складчатой к α -спиральной структуре. Другими словами, в белке, модифицированном этими двумя соединениями, ассоциированными с сахарным диабетом, снижено содержание β -складчатой структуры и увеличено количество

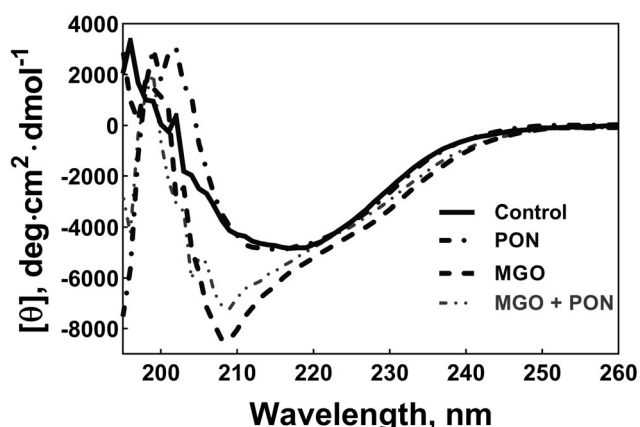


Рис. 3. Изучение структуры белка α A-Cry человека с использованием спектроскопии КД. Для выявления изменений во вторичной структуре были записаны спектры КД в дальнем ультрафиолетовом диапазоне (far UV-CD spectra) необработанного белка α A-Cry и его модифицированных форм при концентрации белка, равной 0,2 мг/мл и 1,5 мг/мл, с использованием оптического пути 0,1 и 1 см для дальнего и ближнего УФ-КД-спектров соответственно

α -спиралей (табл. 1). Обработка пероксинитритом также вызывала небольшие изменения вторичной структуры белка.

Изучение структуры белка α A-Cry путём оценки поверхностного натяжения. Поверхностное натяжение может быть использовано в качестве индекса гидрофобности поверхности, чтобы далее определить структурные изменения в белках [68]. В нашем исследовании мы определили и сравнили значения поверхностного натяжения для необработанного белка α A-Cry и для его модифицированных вариантов. Как показано в табл. 2, поверхностное натяжение модифицированных белков по сравнению с контролем увеличено. Более ранние результаты показали, что количество гидрофобных поверхностей белка, экспонированных в раствор, понижается по мере увеличения поверхностного натяжения белка [43, 69]. Повышенное поверхностное натяжение PON-модифицированного белка соответствовало уменьшению количества гидрофобных поверхностей, подвергшихся воздействию растворителя, на что указывает флуоресценция ANS (рис. 2, e).

Поверхностное натяжение белка, обработанного PON + MGO, было ниже поверхностного натяжения α A-Cry, обработанного каждым из этих реагентов по отдельности. Этот вывод свидетельствует о том, что при взаимодействии α A-Cry со смесью двух веществ его гидрофобность немного увеличивалась [70].

Оценка образования хромофоров AGE в модифицированном белке. Окисление может приводить к образованию конечных продуктов гликирования (AGE), которые могут играть важную роль в снижении прозрачности хрусталика глаза [71]. В этом исследовании с помощью флуоресцентной спектрометрии при соответствующих длинах волн было изучено образование соединений AGE при инкубации α A-Cry человека с PON и MGO.

Как показано на рис. 4, реакция белка α A-Cry с MGO приводила к образованию больших количеств новых флуоресцентных хромофоров. Когда PON реагировал с гликированным белком, интенсивность излучения этих хромофоров сильно снижалась, что позволяет предположить, что хромофоры, полученные в результате реакции белка с MGO, были чувствительны к окислению PON.

Для определения этих вновь образующихся хромофоров образцы белка были подвергнуты возбуждению при определённых длинах волн. Мы идентифицировали некоторые соединения AGE, такие как аргпиримидин (возбуждение при 322 и 381 нм, рис. 4, a и b), пентозидин (возбуждение при 335, 370 и 375 нм, рис. 4, c–e),

Таблица 2. Поверхностное натяжение различных образцов белка α A-Cry

α A-Cry	Поверхностное натяжение (мН/м)
Контроль	45,4 \pm 1,3
PON	48,1 \pm 1,6
MGO	50,1 \pm 1,5*
MGO + PON	47,8 \pm 1,3

* $p < 0,05$

K2P (возбуждение при 342 нм, рис. 4, f) и карбоксиметиллизин (возбуждение при 352 нм, рис. 4, g), которые образовывались при гликировании α A-Cry метилглиоксалем [72].

Шаперонная активность модифицированного α A-Cry человека. Агрегация белков хрусталика глаза является одним из основных факторов развития помутнения хрусталика и катаракты, которые можно предотвратить с помощью α -Cry [73–75]. Мы определили шаперонную активность необработанного α A-Cry и его образцов, обработанных различными концентрациями PON и MGO (0,07 и 0,1 мг/мл), в отношении индуцированной DTT агрегации инсулина при 40 °C путём регистрации поглощения образцов при 360 нм. Как видно на рис. 5, шаперонная активность белка α A-Cry была значительно увеличена после обработки этими реагентами, ассоциированными с СД. Наибольшее повышение шаперонной активности α A-Cry наблюдалось после его инкубации с обоими реагентами.

Вероятно, что инкубация α A-Cry с MGO имела решающее значение для повышения его биологической активности. В целом, полученные нами результаты позволяют предположить, что реакция α A-Cry человека с PON и MGO по отдельности или с их смесью усиливает шаперонную активность этого белка и может обладать защитной функцией против различных типов химических повреждений, ассоциированных с СД. Усиление шаперонной активности α A-Cry носит дозозависимый характер (рис. 5, b и d).

Рефолдинг и восстановление активности дрожжевой α -глюкозидазы. Мы также оценили влияние α A-Cry на рефолдинг и восстановление ферментативной активности дрожжевой α -Gls, подвергнутой тепловому и химическому (мочевина) развёртыванию, используя методику, описанную в работе Khoshaman et al. [76]. Как показано на рис. 6, a, белок α A-Cry, обработанный PON, MGO или смесью PON + MGO, немного лучше восстанавливал ферментативную активность α -Gls по сравнению с необработанным шапероном.

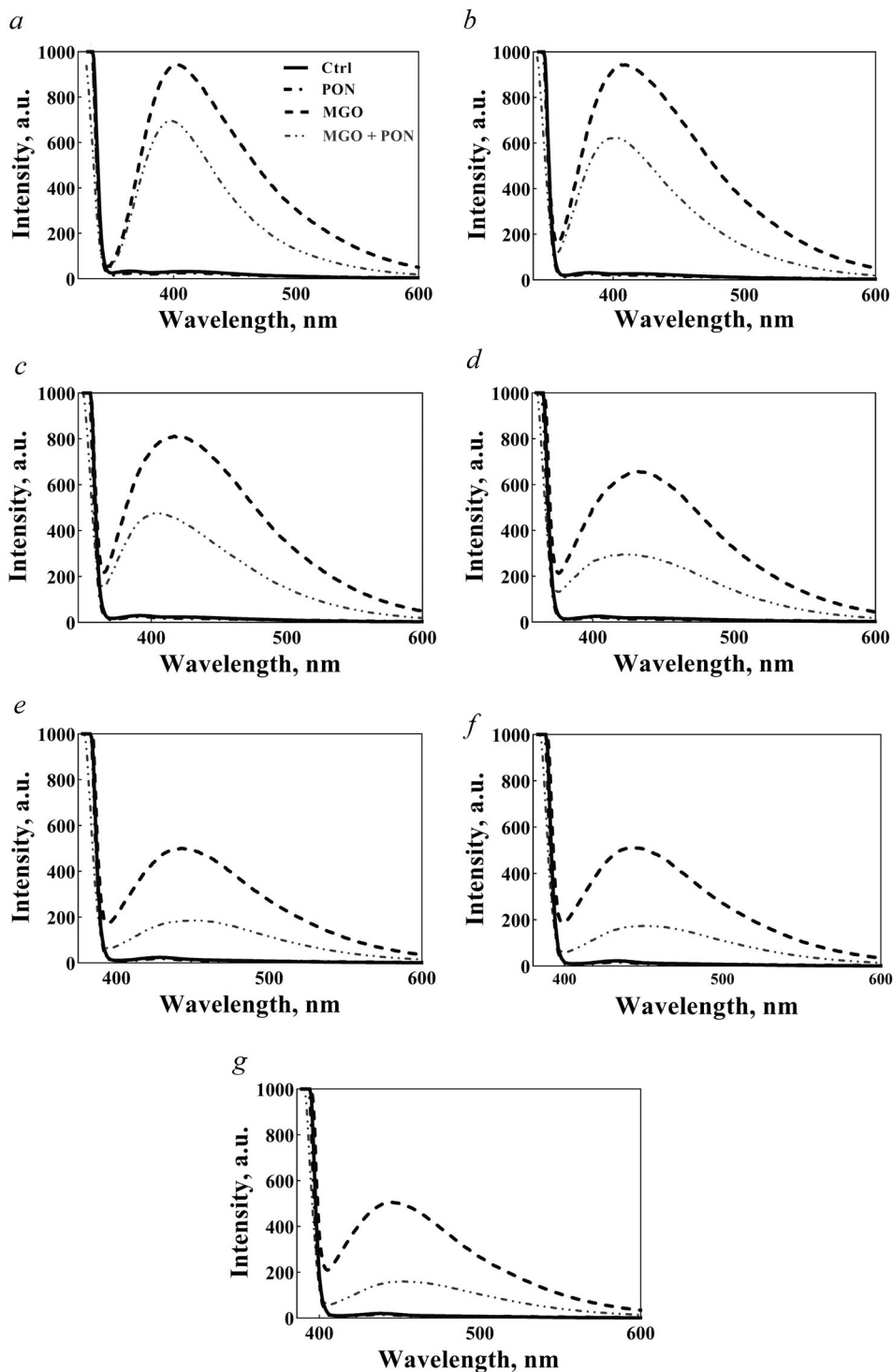


Рис. 4. Обнаружение хромофоров AGE в α A-Cry человека. Возможное образование аргпиримидина (*a* и *b*), пентозидина (*c*, *d* и *e*), К2Р (*f*) и карбоксиметиллизина (*g*) в модифицированном α A-Cry была изучена с помощью флуоресцентной спектроскопии при длинах волн возбуждения: 322 и 381 нм (*a* и *b*); 335, 370 и 375 нм (*c*, *d* и *e*); 342 нм (*f*) и 352 нм (*g*). Ширина щели при возбуждении/эмиссии была установлена на 10 нм. Концентрация α A-Cry составляла 0,15 мг/мл

Как видно из рис. 6, *a*, модифицированный белок α A-Cry лучше предотвращал тепловую инактивацию дрожжевой α -Gls, чем немодифицированный белок. На основании этих резуль-

татов можно предположить, что немодифицированный и модифицированный белки α A-Cry будут иметь различную антиагрегационную способность. Однако немодифицированный α A-Cry

восстанавливал активность α -Gls, денатурированной мочевиной, более эффективно, чем модифицированные белки (рис. 6, *b*).

Защитная роль ASA и GSH против структурно-функциональных изменений α A-Сгу человека, модифицированного соединениями, ассоциированными с СД. Аскорбиновая кислота и глутатион яв-

ляются двумя основными компонентами антиоксидантной системы, которая защищает клетки от окислительного и карбонильного стрессов, и они играют ключевую роль в предотвращении прогрессирования катаракты в тканях хрусталика глаза [77, 78]. Как показано на рис. 7, ASA частично устраняет перекрёстное сшивание α A-Сгу

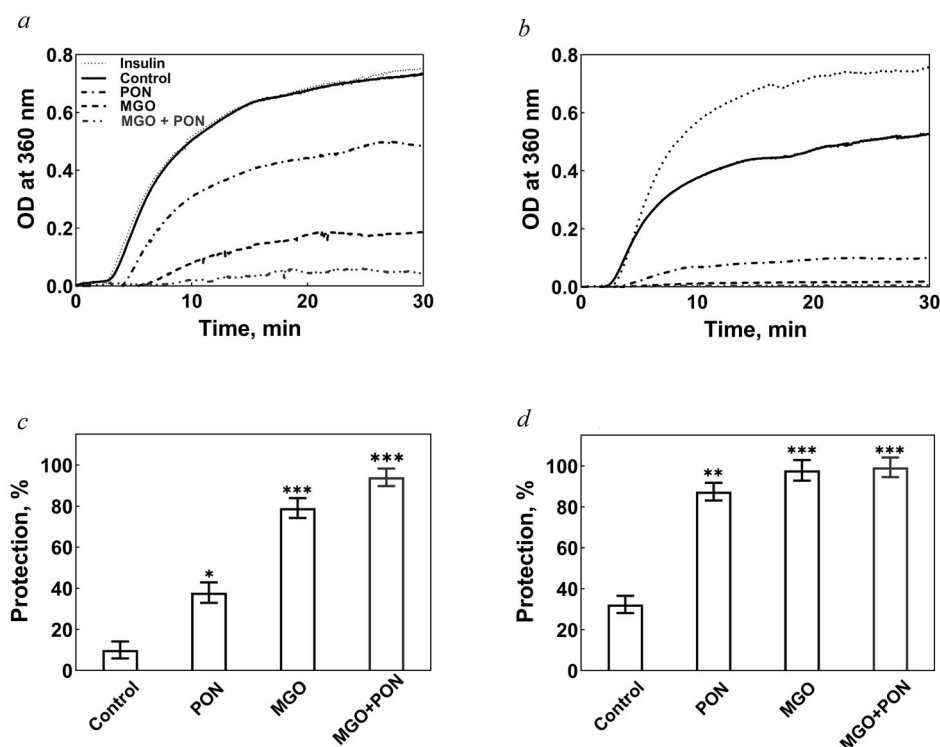


Рис. 5. Шапероноподобная активность α A-Сгу после модификации пероксинитритом и метилглиоксалем. Индуцированную DTT агрегацию бычьего панкреатического инсулина измеряли в присутствии 0,07 мг/мл (*a* и *c*) и 0,1 мг/мл (*b* и *d*) немодифицированного и модифицированного α A-Сгу. Агрегацию инсулина регистрировали при 360 нм в течение 30 мин. *b* и *d* – Шапероноподобная активность α A-Сгу, выраженная в виде процента защиты (%), рассчитанного с использованием уравнения (1). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

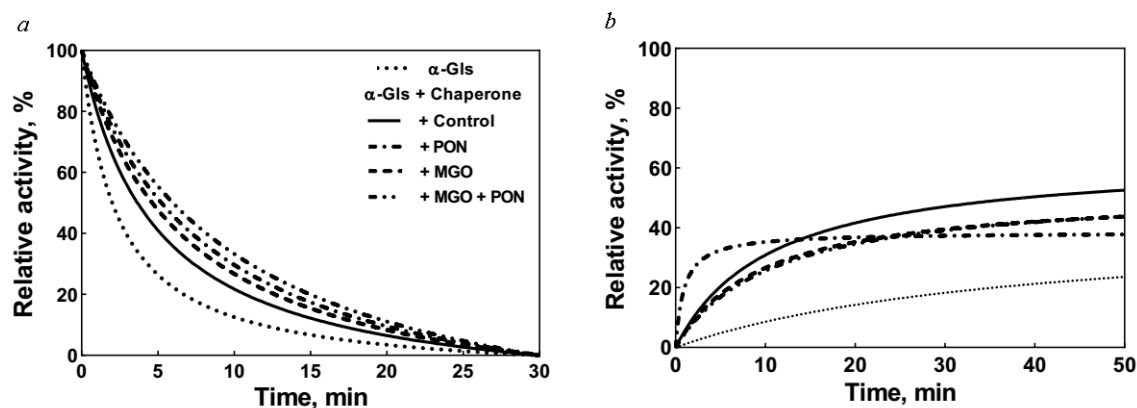


Рис. 6. Способность модифицированного α A-Сгу человека к рефолдингу и восстановлению активности α -Gls. *a* – Термическое разворачивание дрожжевого α -Gls в присутствии и при отсутствии модифицированного и немодифицированного α A-Сгу определяли по восстановлению ферментативной активности α -Gls через определенные промежутки времени. *b* – Рефолдинг дрожжевой α -Gls после денатурации мочевиной, инициированный 100-кратным разведением в буфере для рефолдинга в присутствии модифицированного и немодифицированного α A-Сгу

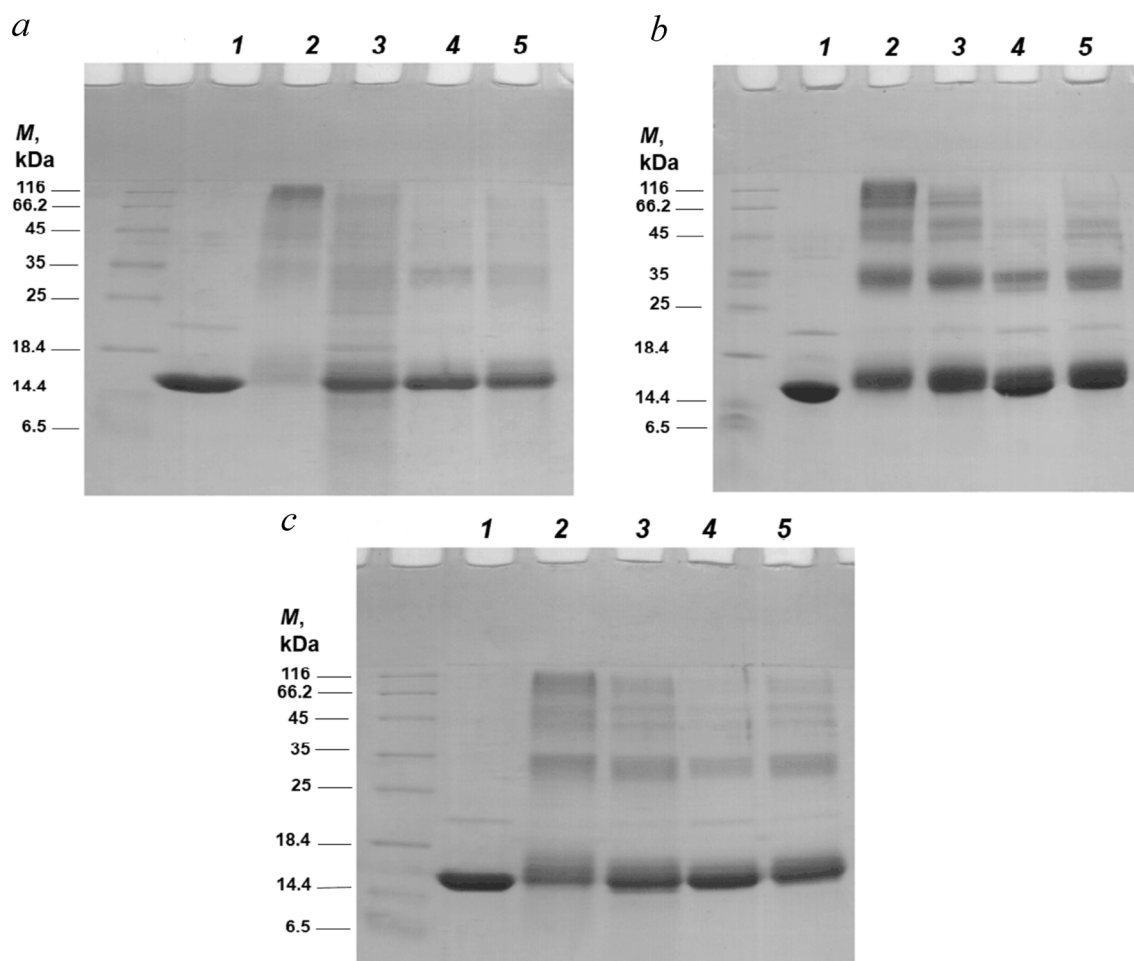


Рис. 7. Анализ белка α A-Cry человека с помощью электрофореза в SDS-ПААГ в присутствии ASA и GSH. Препараты немодифицированного и модифицированного белков α A-Cry человека инкубировали с ASA и GSH (10 мМ) по отдельности или с их смесью. После окончания инкубации 15 мкг каждого образца белка наносили на 12%-ный гель в присутствии восстановителей. Профили SDS-ПААГ белка, модифицированного PON (a), белка, модифицированного MGO (b), и белка, модифицированного смесью MGO + PON (c). Дорожка 1 – немодифицированный белок. Дорожки 2–4 – белки, модифицированные соответствующим реагентом при отсутствии (дорожка 2) или в присутствии ASA (дорожка 3), GSH (дорожка 4) или смеси ASA и GSH (дорожка 5)

и образованные большие белковые комплексы, возникшие в результате реакции белка с PON и MGO или смесью этих соединений.

GSH в значительной степени предотвращал агрегацию белка α A-Cry и образование НММ. Эффект GSH + ASA был почти таким же, как и у одного GSH, и в значительной степени предотвращал агрегацию модифицированного белка.

Особенности агрегации α A-Cry человека в присутствии PON и MGO. Чтобы изучить влияние модификации белка α A-Cry на его агрегацию и олигомеризацию, мы определили гидродинамические радиусы олигомеров с помощью метода динамического рассеяния света (DLS) [79]. Как показано на рис. 8, a, средний размер олигомеров белка α A-Cry (немодифицированный) человека составлял 13,51 нм. Модификация белка пероксинитритом или метилглиокса-

лем или их смесью (рис. 8, b–d соответственно) уменьшала средний гидродинамический радиус олигомеров до 12,71; 11,44 и 10,38 нм соответственно.

Шаперонная активность α A-Cry была обратно пропорциональна распределению его олигомеров по размерам. Иными словами, реакция с ассоциированными с СД соединениями увеличивает шаперонную активность α A-Cry. Уменьшение размера и повышение активности шаперона были особенно значительными для α A-Cry, модифицированного PON и MGO.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Являясь одним из активаторов окислительного и карбонильного стресса, хроническая

(длительная) гипергликемия может неблагоприятно влиять на различные органы, включая хрусталик глаза. Структурные изменения белков хрусталика глаза под воздействием окислительного/карбонильного стрессов приводят к образованию как возрастной, так и диабетической катаракты [80–82]. Сахарный диабет сопровождается усилением химической модификации белков и липидов, скорее всего из-за карбонильного и окислительного стресса, изменяющего функции белков [83]. Карбонильные группы реактивных карбонильных частиц (RCS) могут атаковать аминокислоты в аминокислотах, пептидах или белках с образованием соединений AGE и вызывать карбонильный стресс, за которым следует окислительный стресс и повреждения тканей. Метилглиоксаль, как важный представитель RCS, ассоциирован с гипергликемией как при СД 1-го, так и при СД 2-го типов и связанными с СД осложнениями, такими как нефропатия, бо-

лезнь Альцгеймера и катаракта [84, 85]. Следовательно, RCS может способствовать развитию диабета и его осложнений [86]. Кроме того, СД ассоциирован с повышенным окислительным стрессом, который играет важную роль в развитии осложнений и сопровождается образованием PON. Являясь сильным окислителем, PON атакует различные биомолекулы, что приводит к образованию производных аминокислот, таких как нитротирозин, дитирозин и нитротриптофан [87, 88]. Поскольку и MGO, и PON являются высокореактивными модификаторами белков, вырабатываемыми в относительно высоких количествах во время гипергликемии, и способны модифицировать любые белки, их возможное участие в модификации белков хрусталика может привести к сильным структурным и функциональным изменениям этих белков [89].

В нашем предыдущем исследовании было показано, что MGO и PON играют ключевую

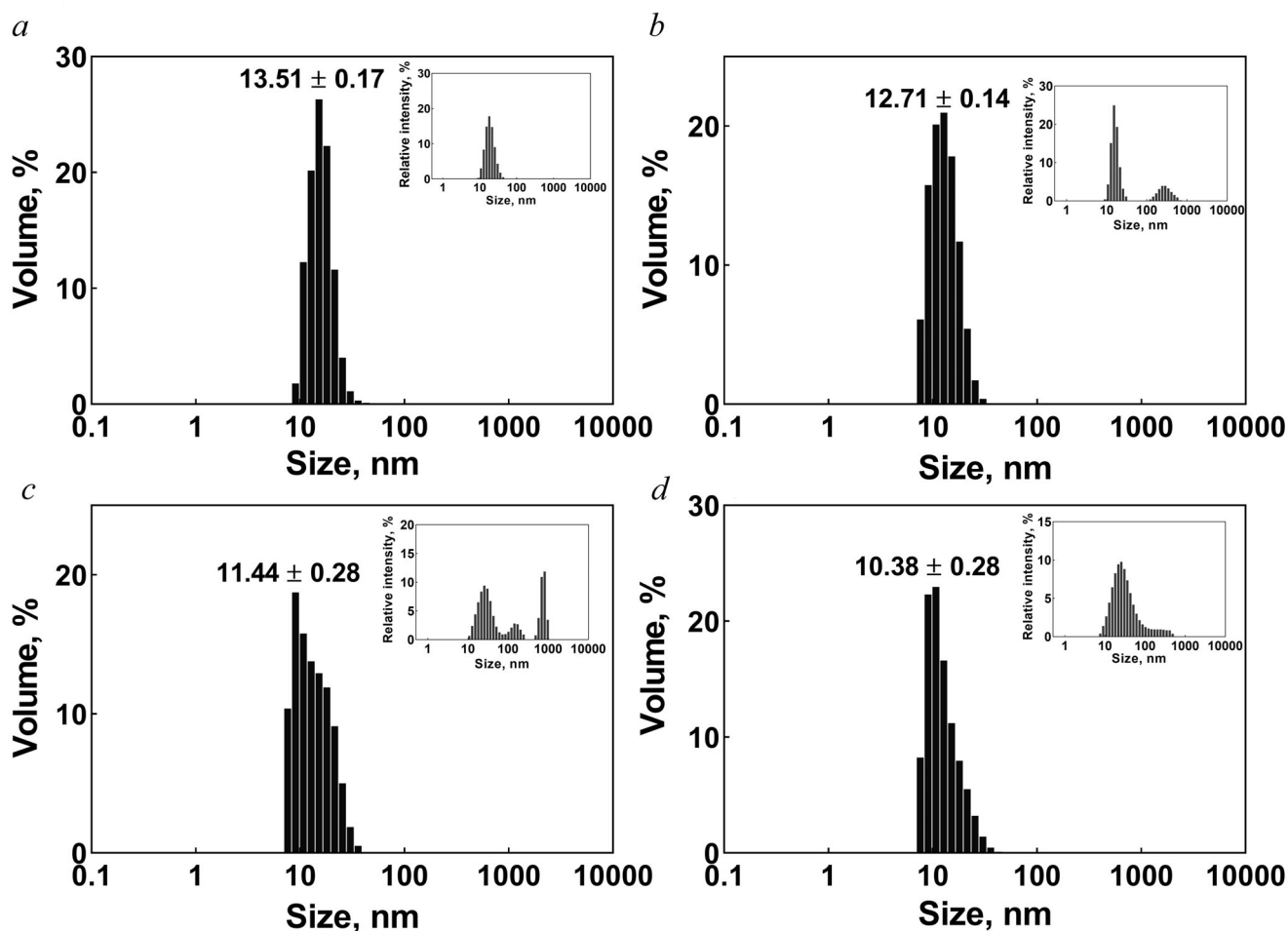


Рис. 8. Анализ белка α A-Cry с использованием DLS. Олигомеры немодифицированного белка α A-Cry (a); белка, модифицированного PON (b); белка, модифицированного MGO (c), и белка, модифицированного PON + MGO (d), исследовали на гидродинамическое распределение по размерам. Перед проведением измерений образцы белка разводили в 50 мМ фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) до концентрации 2 мг/мл. Распределение размеров представлено для относительного объёма. На вставках – относительная интенсивность рассеяния

роль в изменении структуры, олигомеризации и агрегации белков хрусталика [22]. В настоящей работе мы показали, что эти два ассоциированных с СД соединения не только сильно меняют вторичную и четвертичную структуры α A-Сгу человека (рис. 2, 3, и 8), но также они повышают его шаперонную активность (рис. 5 и 6, а). Другими словами, повреждения структуры белка α A-Сгу, возникшие в результате его реакции с этими двумя соединениями, могут быть в какой-то степени компенсированы повышением шаперонной активности белка. Является ли это защитным механизмом, развившимся в глазных линзах для ослабления/предотвращения молекулярного повреждения, связанного с СД? Вступая в реакцию с α A-кристаллином человека, эти небольшие и высокорезактивные молекулы, содержание которых резко возрастает при диабете, могут индуцировать особую конформацию белка с более высокой активностью. В белке α A-Сгу имеются несколько пептидных фрагментов, которые играют ключевую роль в его шаперонной активности [90], и реакция этого белка с MGO и PON может приводить к экспонированию этих аминокислотных последовательностей, обеспечивая лучшие условия для взаимодействия белка α A-Сгу с белками-клиентами. Предыдущие исследования показали, что четвертичная структура α -Сгу находится в тесной связи с его шаперонной активностью [91]. Этот белок существует в состоянии равновесия в основном между димером и олигомером. Такое равновесие, и в особенности размер олигомеров, играют важную роль в проявлении его шаперонной активности [92]. Во многих исследованиях показано, что уменьшение размеров олигомеров белка α A-Сгу приводит к повышению его шаперонной активности [93]. Как показано на рис. 8, реакция PON и MGO с α A-Сгу человека уменьшала размер его олигомеров и в то же время увеличивала его шаперонную активность. Эти наблюдения находятся в соответствии с результатами предыдущих работ [94]. Результаты, полученные при анализе картины электрофоретической подвижности (рис. 1), позволяют предположить, что α A-Сгу, обработанный MGO, склонен к образованию поперечно-сшитых агрегатов НММ. Ковалентное сшивание этого белка наблюдалось, хотя и в меньшей степени, при инкубации α A-Сгу с одним PON или с PON + MGO. Более того, модификация α A-Сгу человека с PON и MGO индуцировала образование в структуре белка новых хромофоров (рис. 4). Также PON и MGO вызывали структурные изменения α A-Сгу, приводящие к увеличению поверхностного натяжения белка (рис. 2 и 3; табл. 1 и 2). Эти

повреждения структуры в значительной степени были снижены в присутствии двух сильных антиоксидантных соединений (GSH и ASA) (рис. 7).

Для поддержания биологической целостности клеток и тканей необходим баланс между производством и катаболизмом оксидантных молекул. По этой причине в тканях глаза имеется мощная система антиоксидантной защиты, предотвращающая повреждения, вызванные избытком метаболитов кислорода. Антиоксидантная защита глазной системы включает в себя ферменты, белки, ASA, GSH, аминокислоты (цистеин и тирозин), мочевую кислоту и др. Недавние исследования указывают на то, что GSH и ASA являются важными антиоксидантами, защищающими белки хрусталика глаза от окислительных агентов, что важно для нормального функционирования эпителия хрусталика [95]. В нашем исследовании GSH продемонстрировал более выраженный эффект в предотвращении структурных повреждений, вызываемых соединениями, ассоциированными с сахарным диабетом (рис. 7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что два ассоциированных с СД соединения (метилглиоксаль и пероксинитрит) вызывают важные структурные изменения в α A-Сгу человека. Эти два высокорезактивных соединения могут существенно изменять вторичную, третичную и четвертичную структуры белка. В то же время их химическое взаимодействие с α A-Сгу повышает его шаперонную активность. Повышенная шаперонная активность этого белка связана с уменьшением размера его олигомеров. Антиоксидантные соединения (GSH и ASA) оказались способны обращать структурные изменения в белке α A-Сгу. Вероятно, что повышение шаперонной активности α A-Сгу человека связано с его неполным окислением. Повышение шаперонной активности этого белка при окислении может играть важную роль в преодолении деструктивных эффектов окислительного стресса в хрусталике глаза больных сахарным диабетом.

Финансирование. Проведение настоящей работы было поддержано Ученым советом университета Шираз, Научным фондом Ирана (INSF) (проекты 9914455 и 9610387), Национальным институтом медицинских исследований (NIMAD) (проект 964854) и Министерством на-

уки и высшего образования Российской Федерации (Б.И.К).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nowotny, K., Jung, T., Höhn, A., Weber, D., and Grune, T. (2015) Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus, *Biomolecules*, **5**, 194-222, doi: 10.3390/biom5010194.
- Semchyshyn, H. M. (2014) Reactive carbonyl species *in vivo*: Generation and dual biological effects, *Sci. World J.*, **2014**, 1-10, doi: 10.1155/2014/417842.
- Vander Jagt, D. L. (2008) Methylglyoxal, diabetes mellitus and diabetic complications, *Drug Metabol. Drug Interact.*, **23**, 93-124, doi: 10.1515/dmdi.2008.23.1-2.93.
- Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiol. Rev.*, **87**, 315-424, doi: 10.1152/physrev.00029.2006.
- Sasaki, K., Sasaki, H., Jonasson, F., Kojima, M., and Cheng, H. M. (2004) Racial differences of lens transparency properties with aging and prevalence of age-related cataract applying the WHO classification system, *Ophthalmic. Res.*, **36**, 332-340, doi: 10.1159/000081636.
- Linetsky, M., Shipova, E., Cheng, R., and Ortwerth, B. J. (2008) Glycation by ascorbic acid oxidation products leads to the aggregation of lens proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1782**, 22-34.
- Kiziltoprak, H., Tekin, K., Inanc, M., and Sakir Goker, Y. (2019) Cataract in diabetes mellitus, *World J. Diabetes*, **10**, 140-153.
- Šimunović, M., Paradžik, M., Škrabić, R., Unić, I., Bučan, K., et al. (2018) Cataract as early ocular complication in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus, *Int. J. Endocrinol.*, **2018**, 1-6, doi: 10.1155/2018/6763586.
- Benedek, G. B. (1971) Theory of transparency of the eye, *Appl. Opt.*, **10**, 459-473, doi: 10.1364/AO.10.000459.
- Delaye, M., and Tardieu, A. (1983) Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency, *Nature*, **302**, 415-417, doi: 10.1038/302415a0.
- Bhat, S. P., and Nagineni, C. N. (1989) Alpha B subunit of lens-specific protein alpha crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **158**, 319-325, doi: 10.1016/s0006-291x(89)80215-3.
- Robman, L., and Taylor, H. (2005) External factors in the development of cataract, *Eye (Lond)*, **19**, 1074-1082, doi: 10.1038/sj.eye.6701964.
- Ma, Z., Hanson, S. R., Lampi, K. J., David, L. L., and Smith, J. B. (1998) Age-related changes in human lens crystallins identified by HPLC and mass spectrometry, *Exp. Eye Res.*, **67**, 21-30, doi: 10.1006/exer.1998.0482.
- Fu, L., and Liang, J. J. (2003) Alteration of protein-protein interactions of congenital cataract crystallin mutants, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 1155-1159, doi: 10.1167/iovs.02-0950.
- Reddy, V. S., Kumar, C. U., and Reddy, G. B. (2014) Effect of chronic hyperglycemia on crystallin levels in rat lens, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **446**, 602-607, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.012.
- Wang, Y., and Ho, C.-T. (2012) Flavour chemistry of methylglyoxal and glyoxal, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 4140-4149, doi: 10.1039/c2cs35025d.
- Alvarez, B., and Radi, R. (2003) Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins, *Amino Acids*, **25**, 295-311, doi: 10.1007/s00726-003-0018-8.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., and Colombo, R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clin. Chim. Acta*, **329**, 23-38, doi: 10.1016/s0009-8981(03)00003-2.
- Dayanand, C. D., Pradeep, K. V., and Kutty, A. V. (2012) Protein carbonyl content as a stable oxidative stress marker in type II diabetes, *Int. J. Biol. Med. Res.*, **3**, 2362-2365.
- Ghahramani, M., Yousefi, R., Khoshaman, K., Sasan Moghadam, S., and Kurganov, B. I. (2016) Evaluation of structure, chaperone-like activity and protective ability of peroxynitrite modified human α -crystallin subunits against copper-mediated ascorbic acid oxidation, *Int. J. Biol. Macromol.*, **87**, 208-221, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.040.
- Chang, W., Wang, R., and Wu, L. (2005) Methylglyoxal-induced nitric oxide and peroxynitrite production in vascular smooth muscle cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **38**, 286-293, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.10.034.
- Moghadam, S., Oryan, A., Kurganov, B. I., Tamaddon, A. M., Alavianehr, M. M., et al. (2017) The structural damages of lens crystallins induced by peroxynitrite and methylglyoxal, two causative players in diabetic complications and preventive role of lens antioxidant components, *Int. J. Biol. Macromol.*, **103**, 74-88, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.090.
- Chen, Y., Mehta, G., and Vasiliou, V. (2014) Antioxidant defenses in the ocular surface, *Ocul. Surf.*, **7**, 176-185, doi: 10.1016/s1542-0124(12)70185-4.
- Merck, K. B., Groenen, P. J., Voorter, C. E., de Haard-Hoekman, W. A., Horwitz, J., et al. (1993) Structural and functional similarities of bovine alpha-crystallin and mouse small heat-shock protein. A family of chaperones, *J. Biol. Chem.*, **268**, 1046-1052.
- Biswas, A., and Das, K. P. (2004) Role of ATP on the interaction of α -crystallin with its substrates and its implications for the molecular chaperone function, *J. Biol. Chem.*, **279**, 42648-42657, doi: 10.1074/jbc.M404444200.
- Nagaraj, R. H., Panda, A. K., Shanthakumar, S., Santhoshkumar, P., Pasupuleti, N., et al. (2012) Hydroimidazolone modification of the conserved Arg12 in small heat shock proteins: studies on the structure and chaperone function using mutant mimics, *PLoS One*, **7**, 1-10, doi: 10.1371/journal.pone.0030257.
- Robinson, K. M., and Beckman, J. S. (2005) Synthesis of peroxynitrite from nitrite and hydrogen peroxide, *Methods Enzymol.*, **396**, 207-214, doi: 10.1016/S0076-6879(05)96019-9.
- Ghahramani, M., Yousefi, R., Khoshaman, K., and Alavianmehr, M. M. (2015) The impact of calcium ion on structure and aggregation propensity of peroxynitrite-modified lens crystallins: new insights into the pathogenesis of cataract disorders, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **125**, 170-180, doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.11.002.
- Ischiropoulos, H., and Al-Mehdi, A. B. (1995) Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications, *FEBS Lett.*, **364**, 279-282, doi: 10.1016/0014-5793(95)00307-u.
- Alvarez, B., Rubbo, H., Kirk, M., Barnes, S., Freeman, B. A., et al. (1996) Peroxynitrite dependent tryptophan nitration, *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 390-396, doi: 10.1021/tx950133b.

31. Kumar, P. A., Kumar, M. S., and Reddy, G. B. (2007) Effect of glycation on alpha-crystallin structure and chaperone-like function, *Biochem. J.*, **408**, 251-258, doi: 10.1042/BJ20070989.
32. Al-Hilaly, Y. K., Williams, T. L., Stewart-Parker, M., Ford, L., Skaria, E., et al. (2013) A central role for dityrosine crosslinking of amyloid- β in Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol. Commun.*, **1**, 83, doi: 10.1186/2051-5960-1-83.
33. Hospes, M., Hendriks, J., and Hellingwerf, K. J. (2013) Tryptophan fluorescence as a reporter for structural changes in photoactive yellow protein elicited by photoactivation, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **12**, 479-488, doi: 10.1039/c2pp25222h.
34. Heinecke, J. W., Li, W., Daehnke, H. L. 3rd, and Goldstein, J. A. (1993) Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages, *J. Biol. Chem.*, **268**, 4069-4077.
35. Paoli, P. Sbrana, F., Tiribilli, B., Caselli, A., Pantera, B., et al. (2010) Protein N-homocysteinylation induces the formation of toxic amyloid-like protofibrils, *J. Mol. Biol.*, **400**, 889-907, doi: 10.1016/j.jmb.2010.05.039.
36. Meehan, S., Knowles, T. P., Baldwin, A. J., Smith, J. F., Squires, A. M., et al. (2007) Characterisation of amyloid fibril formation by small heat-shock chaperone proteins human α A-, α B- and R120G α B-crystallins, *J. Mol. Biol.*, **372**, 470-484, doi: 10.1016/j.jmb.2007.06.060.
37. Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Res.*, **32**, W668-W673, doi: 10.1093/nar/gkh371.
38. Gakamsky, A., Duncan, R. R., Howarth, N. M., Dhillon, B., Buttenschön, K. K., et al. (2017) Tryptophan and non-tryptophan fluorescence of the eye lens proteins provides diagnostics of cataract at the molecular level, *Sci. Rep.*, **7**, 40375, doi: 10.1038/srep40375.
39. Kessel, L., Kalinin, S., Nagaraj, R. H., Larsen, M., and Johansson, L. B. (2002) Time-resolved and steady-state fluorescence spectroscopic studies of the human lens with comparison to argpyrimidine, pentosidine and 3-OH-kynurenine, *Photochem. Photobiol.*, **76**, 549-554, doi: 10.1562/0031-8655(2002)076<0549:trassf>2.0.co;2.
40. Coussons, P. J., Jacoby, J., McKay, A., Kelly, S. M., Price, N. C., et al. (1997) Glucose modification of human serum albumin: A structural study, *Free Radic. Bio. Med.*, **22**, 1217-1227, doi: 10.1016/s0891-5849(96)00557-6.
41. Munch, G., Keis, R., Wessels, A., Riederer, P., Bahner, U., et al. (1997) Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **35**, 669-677, doi: 10.1515/cclm.1997.35.9.669.
42. Cheng, R., Feng, Q., Argirov, O. K., and Ortwerth, B. J. (2005) K2P – a novel cross-link from human lens protein, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1043**, 184-194, doi: 10.1196/annals.1333.023.
43. Alavi, P., Yousefi, R., Amirghofran, S., Karbalaei-Heidari, H. R., and Moosavi-Movahedi, A. A. (2013) Structural analysis and aggregation propensity of reduced and non-reduced glycated insulin adducts, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **170**, 623-638, doi: 10.1007/s12010-013-0207-1.
44. Zhou, C., Qi, W., Lewis, E. N., and Carpenter, J. F. (2015) Concomitant Raman spectroscopy and dynamic light scattering for characterization of therapeutic proteins at high concentrations, *Anal. Biochem.*, **472**, 7-20, doi: 10.1016/j.ab.2014.11.016.
45. Bumagina, Z., Gurvits, B., Artemova, N., Muranov, K., and Kurganov, B. I. (2010) Paradoxical acceleration of dithiothreitol-induced aggregation of insulin in the presence of a chaperone, *Int. J. Mol. Sci.*, **11**, 4556-4579, doi: 10.3390/ijms11114556.
46. Kurganov, B. I. (2002) Kinetics of protein aggregation. Quantitative estimation of the chaperone-like activity in test-systems based on suppression of protein aggregation, *Biochemistry (Moscow)*, **67**, 409-422, doi: 10.1023/a:1015277805345.
47. Biswas, A., and Das, K. P. (2007) Alpha-crystallin assisted refolding of enzyme substrates: Optimization of external parameters, *Protein J.*, **4**, 247-255, doi: 10.1007/s10930-006-9066-8.
48. Khoshaman, K., Yousefi, R., Niazi, A., Oryan, A., Moosavi-Movahedi, A. A., et al. (2018) Importance of the positively charged residue at position 54 to the chaperoning function, conformational stability and amyloidogenic nature of human α A-crystallin, *J. Biochem.*, **163**, 187-199, doi: 10.1093/jb/mvx071.
49. Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., and Buchner, J. (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones, *J. Biol. Chem.*, **268**, 1517-1520.
50. Weber, K., and Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412.
51. Schägger, H., and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379, doi: 10.1016/0003-2697(87)90587-2.
52. Porter, R. R. (1953) Partition chromatography of insulin and other proteins, *Biochem. J.*, **53**, 320-328, doi: 10.1042/bj0530320.
53. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein. Sci.*, **4**, 2411-2423, doi: 10.1002/pro.5560041120.
54. Scientist for Experimental Data Fitting (1995) Microsoft Windows Version 2.0. Salt Lake City: Micro Math, Inc.
55. Moreau, K. L., and King, J. A. (2012) Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention, *Trends Mol. Med.*, **18**, 273-282, doi: 10.1016/j.molmed.2012.03.005.
56. Argirova, M., and Breipohl, W. (2002) Comparison between modifications of lens proteins resulted from glycation with methylglyoxal, glyoxal, ascorbic acid, and fructose, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **16**, 140-145, doi: 10.1002/jbt.10031.
57. Thiagarajan, G., Lakshmanan, J., Chalasani, M., and Balasubramanian, D. (2004) Peroxynitrite reaction with eye lens proteins: α -crystallin retains its activity despite modification, *Biochem. Mol. Biol.*, **45**, 2115-2121, doi: 10.1167/iovs.03-0929.
58. Cubillos-Rojas, M., Schneider, T., Sánchez-Tena, S., Bartons, R., Ventura, F., et al. (2016) Analysis of protein oligomerization by electrophoresis, *Methods Mol. Biol.*, **1449**, 341-348, doi: 10.1007/978-1-4939-3756-1_22.
59. Nowak, P., Zbikowska, H. M., Ponczek, M., Kolodziejczyk, J., and Wachowicz, B. (2007) Different vulnerability of fibrinogen subunits to oxidative/nitrative modifications induced by peroxynitrite: Functional consequences, *Thromb. Res.*, **121**, 163-174, doi: 10.1016/j.thromres.2007.03.017.
60. Akhand, A. A., Hossain, K., Cato, M., Miyata, T., Du, J., et al. (2001) Glyoxal and methylglyoxal induce lyoxal and methylglyoxal induce aggregation and inactivation of ERK in human endothelial cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 1228-1235, doi: 10.1016/s0891-5849(01)00702-x.
61. Bray, M. R., and Clarke, A. J. (1995) Identification of an essential tyrosyl residue in the binding site of

- Schizophyllum commune xylanase A, *Biochemistry*, **34**, 2006-2014, doi: 10.1021/bi00006a022.
62. Ye, Y., Quijano, C., Robinson, K. M., Ricart, K. C., Strayer, A. L., et al. (2007) Prevention of peroxynitrite-induced apoptosis of motor neurons and pc12 cells by tyrosine-containing peptides, *J. Biol. Chem.*, **282**, 6324-6337, doi: 10.1074/jbc.M610800200.
63. Annibal, A., Colombo, G., Milzani, A., Dalle-Donne, I., Fedorova, M., et al. (2016) Identification of dityrosine cross-linked sites in oxidized human serum albumin, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1019**, 147-155, doi: 10.1016/j.jchromb.2015.12.022.
64. Maina, M. B., Al-Hilaly, Y. K., Burra, G., Rickard, J., Harrington, C., et al. (2021) Oxidative stress conditions result in trapping of PHF-core tau (297-391) intermediates, *Cells*, **10**, 703, doi: 10.3390/cells10030703.
65. Hawe, A., Sutter, M., and Jiskoot, W. (2008) Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization, *Pharm. Res.*, **25**, 1487-1499, doi: 10.1007/s11095-007-9516-9.
66. Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D., and Guo, Z. (2017) Thioflavin T as an amyloid dye: Fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation, *R. Soc. Open. Sci.*, **4**, 1-12, doi: 10.1098/rsos.160696.
67. Greenfield, N. J. (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat. Protoc.*, **1**, 2876-2890, doi: 10.1038/nprot.2006.202.
68. Schor, M., Reid, J. L., MacPhee, C. E., and Stanley-Wall, N. R. (2016) The diverse structures and functions of surfactant proteins, *Trends Biochem. Sci.*, **41**, 610-620, doi: 10.1016/j.tibs.2016.04.009.
69. Sattarahmady, N., Moosavi-Movahedi, A. A., and Habibi-Rezaei, M. (2011) A biophysical comparison of human serum albumin to be glycated *in vivo* and *in vitro*, *J. Med. Biochem.*, **30**, 5-10, doi: 10.2478/v10011-010-0026-7.
70. Yousefi, R., Javadi, S., Amirghofran, S., Oryan, A., and Moosavi-Movahedi, A. A. (2016) Assessment of structure, stability and aggregation of soluble lens proteins and alpha-crystallin upon non-enzymatic glycation: The pathomechanisms underlying cataract development in diabetic patients, *Int. J. Biol. Macromol.*, **82**, 328-338, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.036.
71. Ho, M.-C., Peng Y.-J., Chen, S.-J., and Chiou, S.-H. (2010) Senile cataracts and oxidative stress, *J. Clin. Gerontol. Geriatr.*, **1**, 17-21, doi: 10.1016/j.jcgg.2010.10.006.
72. Javadi, S., Yousefi, R., Hosseinkhani, S., Tamaddon, A. M., and Uversky, V. N. (2017) Protective effects of carnosine on dehydroascorbate-induced structural alteration and opacity of lens crystallins: Important implications of carnosine pleiotropic functions to combat cataractogenesis, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **35**, 1766-1784, doi: 10.1080/07391102.2016.1194230.
73. Das, K. P., and Surewicz, W. K. (1995) On the substrate specificity of α -crystallin as a molecular chaperone, *Biochem. J.*, **311**, 367-370, doi: 10.1042/bj3110367.
74. Hook, D. W. A., and Harding, J. J. (1998) Protection of enzymes by α -crystallin acting as a molecular chaperone, *Int. J. Biol. Macromol.*, **22**, 295-306, doi: 10.1016/s0141-8130(98)00027-0.
75. Reddy, G. B., Das, K. P., Petrash, J. M., and Surewicz, W. K. (2000) Temperature-dependent chaperone activity and structural properties of human alphaA- and alphaB-crystallins, *J. Biol. Chem.*, **275**, 4565-4570, doi: 10.1074/jbc.275.7.4565.
76. Khoshaman, K., Yousefi, R., Tamaddon, A. M., Abolmaali, S. S., Oryan, A., et al. (2017) The impact of different mutations at Arg54 on structure, chaperone-like activity and oligomerization state of human α A-crystallin: The pathomechanism underlying congenital cataract causing mutations R54L, R54P and R54C, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1865**, 604-618, doi: 10.1016/j.bbapap.2017.02.003.
77. Kusic, B., Miric, D., Zoric, L., Ilic, A., and Dragojevic, I. (2012) Antioxidant capacity of lenses with age-related cataract, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2012**, 467130, doi: 10.1155/2012/467130.
78. Donma, O., Yorulmaz, E. Ö., Pekel, H., and Suyugül, N. (2002) Blood and lens lipid peroxidation and antioxidant status in normal individuals, senile and diabetic cataractous patients, *Curr. Eye Res.*, **25**, 9-16, doi: 10.1076/ceyr.25.1.9.9960.
79. Amin, S., Barnett, G., Pathak, J., Roberts, C., and Sarangpani, P. (2014) Protein aggregation, particle formation, characterization & rheology, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **19**, 438-449, doi: 10.1016/j.cocis.2014.10.002.
80. Singh, V. P., Bali, A., Singh, N., and Jaggi, A. S. (2014) Advanced glycation end products and diabetic complications, *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, **18**, 1-14, doi: 10.4196/kjpp.2014.18.1.1.
81. Gul, A., Rahman, M. A., Hasnain, S. N., Salim, A., and Simjee, S. U. (2008) Could oxidative stress associate with age products in cataractogenesis? *Curr. Eye Res.*, **33**, 669-675, doi: 10.1080/02713680802250939.
82. Beswick, H. T., and Harding, J. J. (1987) Conformational changes induced in lens alpha- and gamma-crystallins by modification with glucose 6-phosphate. Implications for cataract, *Biochem. J.*, **246**, 761-769, doi: 10.1042/bj2460761.
83. Baynes, J. W., and Thorpe, S. R. (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm, *Diabetes*, **48**, 1-9, doi: 10.2337/diabetes.48.1.1.
84. Bizzozero, O. A. (2009) Protein carbonylation in neurodegenerative and demyelinating CNS diseases, *Handbook Neurochem. Mol. Neurobiol.*, 543-562, doi: 10.1007/978-0-387-30375-8_23.
85. Luthra, M., and Balasubramanian, D. (1993) Nonenzymatic glycation alters protein structure and stability. A study of two eye lens crystallins, *J. Biol. Chem.*, **268**, 18119-18127.
86. Asmat, U., Abad, K., and Ismail, K. (2015) Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review, *Saudi Pharm. J.*, **24**, 547-553, doi: 10.1016/j.jsps.2015.03.013.
87. Bartesaghi, S., and Radi, R. (2018) Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration, *Redox Biol.*, **14**, 618-625, doi: 10.1016/j.redox.2017.09.009.
88. Nuriel, T., Hansler, A., and Gross, S. S. (2011) Protein nitrotryptophan: formation, significance and identification, *J. Proteomics*, **74**, 2300-2312, doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.032.
89. Nagai, R., Unno, Y., Hayashi, M. C., Masuda, S., Hayase, F., et al. (2002) Peroxynitrite induces formation of N^ε-(carboxymethyl) lysine by the cleavage of Amadori product and generation of glucosone and glyoxal from glucose, *Diabetes*, **51**, 2833-2839, doi: 10.2337/diabetes.51.9.2833.
90. Kumar, M. S., Mrudula, T., Mitra, N., and Reddy, G. B. (2004) Enhanced degradation and decreased stability of eye lens alpha-crystallin upon methylglyoxal modification, *Exp. Eye Res.*, **79**, 577-583, doi: 10.1016/j.exer.2004.07.003.
91. Raman, B., and Rao, C. M. (1994) Chaperone-like activity and quaternary structure of alpha-crystallin, *J. Biol. Chem.*, **269**, 27264-27268.
92. Boelens, W. C. (2020) Structural aspects of the human small heat shock proteins related to their functional activi-

- ties, *Cell Stress Chaperones*, **25**, 581-591, doi: 10.1007/s12192-020-01093-1.
93. Nagaraj, R. H., Nahomi, R. B., Mueller, N. H., Raghavan, C. T., Ammar, D. A., et al. (2016) Therapeutic potential of α -crystallin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 252-257, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.03.012.
94. Sharma, K. K., and Santhoshkumar, P. (2009) Lens aging: Effects of crystallins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 1095-1108, doi: 10.1016/j.bbagen.2009.05.008.
95. Cabrera, M. P., and Chihuilaf, R. H. (2011) Antioxidants and the integrity of ocular tissues, *Vet. Med. Int.*, **2011**, 905153, doi: 10.4061/2011/905153.

**RELATIONSHIP BETWEEN THE STRUCTURE AND CHAPERONE
ACTIVITY OF HUMAN α A-CRYSTALLIN AFTER ITS MODIFICATION
WITH DIABETES-ASSOCIATED OXIDATIVE AGENTS
AND PROTECTIVE ROLE OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS**

**S. S. Moghadam¹, M. Ghahramani¹, K. Khoshaman¹, A. Oryan²,
A. A. Moosavi-Movahedi³, B. I. Kurganov⁴, and R. Yousefi^{1,3*}**

¹ *Protein Chemistry Laboratory, Department of Biology, College of Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran; e-mail: ryousefi@shirazu.ac.ir; r.yousefi2000@gmail.com*

² *Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran*

³ *Institute of Biochemistry and Biophysics (IBB), University of Tehran, Tehran, Iran*

⁴ *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia*

The study was aimed to evaluate the impact of peroxynitrite (PON, oxidative stress agent in diabetes), methylglyoxal (MGO, diabetes-associated reactive carbonyl compound), and their simultaneous application on the structural and functional features of human α A-crystallin (α A-Cry) using various spectroscopy techniques. Additionally, the surface tension and oligomer size distribution of the treated and untreated protein were tested using tensiometric analysis and dynamic light scattering, respectively. Our results indicated that the reaction of PON and MGO with human α A-Cry leads to the formation of new chromophores, alterations in the secondary to quaternary protein structure, reduction in the size of protein oligomers, and significant enhancement in the chaperone activity of α A-Cry. To reverse the effects of the tested compounds, ascorbic acid and glutathione (main components of lens antioxidant defense system) were applied. As expected, the two antioxidant compounds significantly prevented formation of high molecular weight aggregates of α A-Cry (according to SDS-PAGE). Our results suggest that the lens antioxidant defense system, in particular, glutathione, may provide a strong protection against rapid incidence and progression of diabetic cataract by preventing the destructive reactions of highly reactive DM-associated metabolites.

Keywords: human α A-crystallin, diabetic cataract, lens antioxidant, protein structure, chaperone activity