

УДК 577.29

ВЛИЯНИЕ ТРЕГАЛОЗЫ НА ОЛИГОМЕРНОЕ СОСТОЯНИЕ И АНТИАГРЕГАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ α В-КРИСТАЛЛИНА

© 2022 Н.А. Чеботарева*, Т.Б. Еронина, В.В. Михайлова,
С.Г. Роман, К.В. Тугаева, **Б.И. Курганов**

Институт биохимии имени А.Н. Баха, ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
119071 Москва, Россия; электронная почта: n.a.chebotareva@gmail.com

Поступила в редакцию 20.09.2021

После доработки 21.10.2021

Принята к публикации 22.10.2021

α В-Кристаллин (α В-Сг), один из главных белков хрусталика глаза, вместе с другими кристаллинами поддерживает прозрачность хрусталика, предотвращая агрегацию белков и, таким образом, защищая глаз от катаракты. α В-Сг относится к классу молекулярных шаперонов, он широко экспрессируется во многих тканях и имеет динамичную четвертичную структуру, которая необходима для проявления шапероноподобной активности. Сдвиг в равновесии ансамблей олигомеров α В-Сг с различным числом субъединиц позволяет регулировать активность шаперона. Известно, что трегалоза ингибирует агрегацию белков *in vivo* и *in vitro* и широко используется в биотехнологии. Результаты изучения влияния трегалозы на шапероноподобную активность кристаллинов могут послужить основой для создания препаратов, способствующих замедлению катарактогенеза. В настоящей работе мы исследовали влияние трегалозы на четвертичную структуру и антиагрегационную активность α В-Сг с использованием мышечной гликогенфосфорилазы *b* (ФБ) в качестве модельного белка-мишени. По данным динамического светорассеяния, трегалоза влияет на процесс тепловой агрегации ФБ при 48 °С преимущественно на стадии нуклеации, причем в присутствии белкового шаперона основной эффект трегалозы связан с увеличением адсорбционной емкости (AC_0) α В-Сг (для 66 мМ трегалозы увеличение AC_0 является 1,5-кратным). По данным седиментационного анализа, трегалоза стабилизирует димерную форму ФБ на стадии диссоциации и денатурации ФБ и усиливает взаимодействие α В-Сг с белком-мишенью. Кроме того, трегалоза сдвигает равновесие между олигомерными формами α В-Сг в сторону образования малых олигомерных форм. Таким образом, трегалоза оказывает влияние на четвертичную структуру α В-Сг и увеличивает его антиагрегационную активность на стадии нуклеации процесса агрегации белка-мишени.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: α В-кристаллин, антиагрегационная активность, трегалоза, гликогенфосфорилаза *b*, динамическое светорассеяние, аналитическое ультрацентрифугирование.

DOI: 10.31857/S032097252202004X

ВВЕДЕНИЕ

Денатурация и агрегация белков, входящих в состав хрусталика, приводит к образованию крупных светорассеивающих агрегатов и потере прозрачности хрусталика – катаракте [1]. Катарактогенез очень часто обусловлен естественными возрастными изменениями. Единственным эффективным методом лечения катаракты в настоящее время является замена помутневшего хрусталика на искусственную линзу, поэтому понимание механизмов катарактогенеза и поиск веществ, способных замедлить этот процесс, является актуальной и социально значимой проблемой.

Принятые сокращения: ДЛС – динамическое лазерное светорассеяние; ФБ – гликогенфосфорилаза *b*; AUC – аналитическое ультрацентрифугирование; SV – скоростная седиментация; α В-Сг – α В-кристаллин.

* Адресат для корреспонденции.

Кристаллины, α -, β -, γ -, составляют более 90% растворимых белков, входящих в состав хрусталика глаза [2, 3], и обеспечивают его прозрачность. Концентрация белков в хрусталике глаза очень высокая, у человека она достигает 450 мг/мл [4]. В течение жизни белки хрусталика не обновляются, поэтому в процессе старения в них накапливаются посттрансляционные изменения, которые могут приводить к их денатурации и агрегации. Зависимое от возраста снижение растворимости кристаллинов и их агрегация являются патологическими признаками катаракты.

α -Кристаллин, гетероолигомер, состоящий из α A- и α B-кристаллинов, принадлежит к классу молекулярных шаперонов и является одним из главных белков хрусталика, обладающих шапероноподобной функцией. α -Кристаллин связывается с поврежденными белками и поддерживает их растворимость, препятствуя агре-

гации [5–9], в том числе предотвращает нежелательную агрегацию кристаллинов и развитие катаракты [10].

α В-Кристаллин (α В-Сг) широко экспрессируется во многих тканях и имеет динамичную четвертичную структуру, которая позволяет ему образовывать *in vitro* полидисперсные ансамбли обменивающихся субъединицами олигомеров, обладающих шапероноподобной активностью [11]. Подвижное равновесие между разными олигомерными формами α В-Сг очень чувствительно к факторам внешней среды: температуре, присутствию ионов, условиям краудинга и др. [12–18]. В современных моделях шапероноподобной активности α В-Сг сдвиг равновесия в ансамбле олигомеров позволяет регулировать активность шаперона, в результате чего олигомеры малого размера (мономер и димер) обычно являются более активными формами [5, 11, 14]. Существует предположение, что симметричные олигомерные комплексы высшего порядка могут использоваться для хранения, тогда как формы, способные к связыванию развернутых белков, представляют собой либо более мелкие комплексы (возможно, димеры), либо неполные сферы, дающие место для связывания белков-клиентов [5, 11]. Однако остается много неясного в вопросе о том, как функционирует α В-Сг в хрусталике в условиях краудинга, и какую роль играют разные олигомерные формы α В-Сг. Кроме того, известно, что структурные изменения, мутации и дисфункция самого α В-Сг также связаны с некоторыми видами катаракты [9, 10, 19–24].

Считается, что образование аморфных агрегатов — это быстрый путь формирования катаракты, а образование амилоидных фибрилл связывается с медленным развитием катаракты [10]. α В-Сг ингибирует оба типа агрегации [25]. Однако механизмы действия α В-Сг *in vitro* при образовании аморфных агрегатов или амилоидных фибрилл проявляют существенные различия [26]. Агрегация самого α В-Сг также может приводить к образованию как аморфных агрегатов, так и амилоидоподобных структур. В условиях краудинга происходит изменение конформации, олигомерного состояния и увеличение размера α В-Сг [10, 16], уменьшение его тепловой стабильности и антиагрегационной активности [10, 27], при этом α В-Сг способен образовывать кинетически различные аморфные и фибриллярные агрегаты [10]. Интересно отметить, что α -кристаллин сохраняет шаперонную активность и при образовании амилоидных фибрилл [28].

Одним из вариантов терапевтического лечения катаракты является использование малых

молекул для стабилизации нативного состояния кристаллинов [29]. Было обнаружено, что присутствие амилоидоподобных структур в белковых агрегатах хрусталика, индуцированных нагреванием, значительно снижается в присутствии трегалозы [30]. Трегалоза является природным осмолитом и стабилизирует белки при всевозможных стрессах (тепловом, осмотическом, высыхании и др.); поэтому ее называют химическим шапероном [31, 32].

Авторы работы [30] показали, что трегалоза значительно уменьшает агрегацию растворимых белков хрусталика, вызванную нагреванием в течение 4 ч при 55 °С. При высоких концентрациях трегалозы (30% w/v) количество нерастворимых агрегатов уменьшается вдвое, однако полного подавления процесса агрегации в присутствии трегалозы не происходит. Известно, что трегалоза вызывает преимущественную гидратацию поверхности белка, тем самым препятствуя его разворачиванию и агрегации [30]. Такое свойство трегалозы может быть полезно для отсрочки возникновения катаракты. Показано, что трегалозу можно использовать в глазных каплях для защиты эпителия роговицы от сухости, вызванной синдромом сухого глаза [33]. В биотехнологии и фармацевтике трегалоза широко используется благодаря своей нетоксичности и высокой растворимости в воде.

Для выяснения молекулярных механизмов катарактогенеза необходимо понимать, как осмолиты, такие как трегалоза, влияют на шаперонную активность кристаллинов. Было обнаружено, что трегалоза стабилизирует нативную структуру α -кристаллина, ингибирует его агрегацию и дезагрегирует ранее сформированные низкомолекулярные агрегаты, но не влияет на его шапероноподобную активность [34].

В настоящей работе мы исследовали влияние трегалозы на шапероноподобную активность α В-Сг. Для этой цели была выбрана тест-система, основанная на тепловой агрегации мышечной гликогенфосфорилазы *b* (ФБ) при 48 °С. Эта тест-система была охарактеризована нами ранее, и для нее было показано, что скорость-лимитирующей стадией процесса агрегации на этапе роста агрегатов является диссоциация димера ФБ на мономеры [27, 35].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ФБ. ФБ выделяли из скелетных мышц кролика, как описано ранее [36], и хранили в 0,04 М β -глицерофосфатном буфере, рН 6,8, содержащем 0,03 М β -меркаптоэтанол и 50%-ный раствор глицерина, при –20 °С. Перед

экспериментом раствор ФБ был пропущен через колонку с Сефадексом (Sephadex G-15), уравновешенную с 0,03 М НЕРЕС, рН 6,8, содержащим 0,1 М NaCl. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически при 280 нм с использованием коэффициента поглощения $A_{\text{см}}^{1\%}$ 13,2 [37].

Выделение α В-Сг (HspB5). Кодирующая последовательность HspB5 человека была клонирована в векторе рЕТ23 для экспрессии в клетках *E. coli* как описано в работе [38]. Сверхэкспрессированный HspB5 очищали с помощью высаливания сульфатом аммония с последующей гель-фильтрацией. Наиболее чистые фракции по электрофорезу в присутствии додецилсульфата натрия объединяли, концентрировали, разделяли на аликвоты и хранили при -80°C .

Динамическое лазерное светорассеяние (ДЛС). При исследовании кинетики агрегации белков рассеивающийся под углом 90° свет He-Ne лазера («Coherent», США, Model 31-2082, 632,8 нм, 10 мВ) анализировали с использованием коммерческого прибора Photocor Complex («Photocor Instruments, Inc.», США). Полидисперсный анализ данных ДЛС проводили с помощью программы DYNALS («Alango», Израиль). Кинетику агрегации ФБ при 48°C изучали в 0,03 М НЕРЕС, рН 6,8, содержащем 0,15 М NaCl и 0,5 мМ дитиотреитол (ДТТ), в цилиндрической кювете с внутренним диаметром 6,3 мм. Процесс агрегации ФБ запускали добавлением белка до концентрации 0,3 мг/мл в предварительно прогретую в течение 5 мин при 48°C кювету, содержащую буфер. Для изучения эффекта трегалозы, α В-Сг и их смесей эти вещества также инкубировали в кювете в течение 5 мин при 48°C перед началом эксперимента.

Определение адсорбционной емкости шаперона на разных стадиях агрегации белка-мишени. Антиагрегационная активность белкового шаперона α В-Сг может быть охарактеризована величиной его начальной адсорбционной емкости (AC_0) [39–41], которая показывает, сколько молекул белка-мишени связывается одной молекулой шаперона.

Стадия нуклеации описывается уравнением [39, 40, 42]:

$$I - I_0 = K_{\text{agg}}(t - t_0)^2, \quad (t > t_0), \quad (1)$$

где I – интенсивность светорассеяния, t – время, I_0 – начальное значение интенсивности светорассеяния при $t = 0$, t_0 – момент времени, в который регистрируется начальное приращение интенсивности светорассеяния, т.е. лаг-период на кинетических кривых агрегации ФБ, и K_{agg} – параметр, характеризующий ускорение

процесса агрегации на стадии нуклеации. На этой стадии значение AC_0 может быть определено как величина, обратная длине отрезка, отсекаемого на оси абсцисс начальным линейным участком зависимости $K_{\text{agg}}/K_{\text{agg},0}$ от отношения молярных концентраций $[\alpha\text{В-Сг}]/[\text{ФБ}]$, где K_{agg} и $K_{\text{agg},0}$ – значения параметров, полученные в присутствии и в отсутствие шаперона соответственно.

Начальный участок процесса агрегации на стадии роста белковых агрегатов описывается уравнением [43]:

$$I - I_0 = v_0(t - t^*) - B(t - t^*)^2, \quad (t > t^*), \quad (2)$$

где v_0 – начальная скорость процесса агрегации на стадии роста агрегатов, t^* – длительность стадии нуклеации, определяемая отрезком на оси абсцисс, отсекаемым теоретической кривой, рассчитанной из этого уравнения при $I - I_0 = 0$, и B – константа. На стадии роста белковых агрегатов для определения AC_0 может быть использовано предложенное ранее уравнение [41]:

$$v_0 = v_0^{(0)}(1 - AC_0x), \quad (3)$$

где x – отношение молярной концентрации α В-Сг, рассчитанной на субъединицу белка с молекулярной массой 20 кДа, к молярной концентрации ФБ, рассчитанной на мономер с молекулярной массой 97,4 кДа ($x = [\alpha\text{В-Сг}]/[\text{ФБ}]$), и $v_0^{(0)}$ – значение v_0 при $x = 0$. AC_0 определяется как величина, обратная величине отрезка, отсекаемого на оси абсцисс начальным линейным участком зависимости $v_0/v_0^{(0)}$ от отношения $[\alpha\text{В-Сг}]/[\text{ФБ}]$.

Отметим, что адсорбционная емкость α В-Сг, рассчитанная из начального участка зависимости $K_{\text{agg}}/K_{\text{agg},0}$ от отношения $[\alpha\text{В-Сг}]/[\text{ФБ}]$ или зависимости $v_0/v_0^{(0)}$ от отношения $[\alpha\text{В-Сг}]/[\text{ФБ}]$, характеризует максимальную адсорбционную емкость α В-Сг, которая реализуется при избытке белка-мишени.

Определение антиагрегационной активности химического шаперона на разных стадиях агрегации белка-мишени. В случае химических шаперонов, которые обратимо связываются с белком-мишенью, антиагрегационная активность шаперона может быть охарактеризована его концентрацией полунасыщения $[L]_{0,5}$, которая рассчитывается по формулам, аналогичным уравнению Хилла [44]. На стадии нуклеации использована формула:

$$K_{\text{agg}}/K_{\text{agg},0} = 1/\{1 + ([L]/[L]_{0,5})^h\}, \quad (4)$$

а на стадии роста агрегатов – формула:

$$v_0/v_0^{(0)} = 1/\{1 + ([L]/[L]_{0.5})^h\}, \quad (5)$$

где $[L]$ – молярная концентрация химического шаперона, $[L]_{0.5}$ – значение $[L]$, при котором $K_{agg}/K_{agg,0} = 0,5$ или $v_0/v_0^{(0)} = 0,5$, и h – коэффициент Хилла.

Аналитическое ультрацентрифугирование (AUC). Эксперименты по скоростной седиментации (SV) проводили в аналитической ультрацентрифуге, модель E («Beckman», США), оснащенной абсорбционной оптикой, фотоэлектрическим сканером, монохроматором и компьютером в режиме онлайн. В опытах использовали титановый ротор An-F Ti и двухсекторные ячейки. Седиментационные профили регистрировали путем измерения оптической плотности при 280 нм. Все ячейки сканировали одновременно с интервалом в 2,5 мин. Дифференциальные распределения по коэффициентам седиментации $[s(s)]$ в зависимости от коэффициента седиментации s были определены и приведены к стандартным условиям (растворитель с плотностью и вязкостью воды при 20 °С) с помощью программы SEDFIT [45].

SV-опыты выполняли в 0,03 М HEPES-буфере, pH 6,8, содержащем 0,15 М NaCl. Все образцы, если не указано иначе, предварительно инкубировали в термостате в течение 3 ч при 48 °С, затем охлаждали 2 мин в воде со льдом, вносили в ячейки и проводили опыт при 20 °С. Часть опытов SV проведена при 48 °С. Перед этими опытами ротор предварительно выдерживали в термостате при 48 °С в течение ночи.

Значения плотности и динамической вязкости растворов 350 мМ трегалозы в 0,03 М HEPES, pH 6,8, содержащем 0,15 М NaCl, использованных в опытах AUC, были измерены непосредственно при 48 °С и 20 °С. Плотность растворов измерена в денситометре DMA 4500 («Anton Paar», Австрия) и определена равной 1,0408 и

1,0536 г/см³ для растворов 350 мМ трегалозы при 48 °С и 20 °С соответственно. Динамическую вязкость растворов определяли на автоматическом микровязкозиметре AMVn («Anton Paar») в капиллярной системе 1,6/1,5 мм. Динамическая вязкость растворов 350 мМ трегалозы равна 0,8156 и 1,5218 (мПа·с) при 48 °С и 20 °С соответственно.

Анализ данных. Для вычислений использовали программу Origin Pro 2017 («Origin Lab Corp.», США). Для характеристики степени соответствия между экспериментальными данными и расчетными значениями мы использовали коэффициент детерминации R^2 как описано в работе [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние трегалозы на агрегацию ФБ в присутствии α В-Сг. На рис. 1 изображены кинетические кривые агрегации ФБ, регистрируемые методом ДЛС при 48 °С в присутствии различных концентраций α В-Сг в отсутствие (рис. 1, а) и в присутствии 66 мМ трегалозы (рис. 1, б).

Используя уравнение (1), можно оценить основные параметры стадии нуклеации t_0 и K_{agg} . Чтобы оценить на этой стадии значения AC_0 для α В-Сг по отношению к ФБ в отсутствие (кривая 1 на рис. 2, а) и в присутствии 66 мМ трегалозы (кривая 2 на рис. 2, а), были построены графики зависимости $K_{agg}/K_{agg,0}$ от $[\alpha\text{В-Сг}]/[\text{ФБ}]$. Показано, что на стадии нуклеации трегалоза в концентрации 66 мМ в 1,5 раза увеличивает адсорбционную емкость α В-Сг (табл. 1).

Из рис. 2, б (вставка) видно, что прирост величины $t_0/t_0^{(0)}$ с ростом концентрации α В-Сг становится более заметным в присутствии 66 мМ трегалозы.

С использованием уравнения (2) были оценены основные параметры процесса агрегации

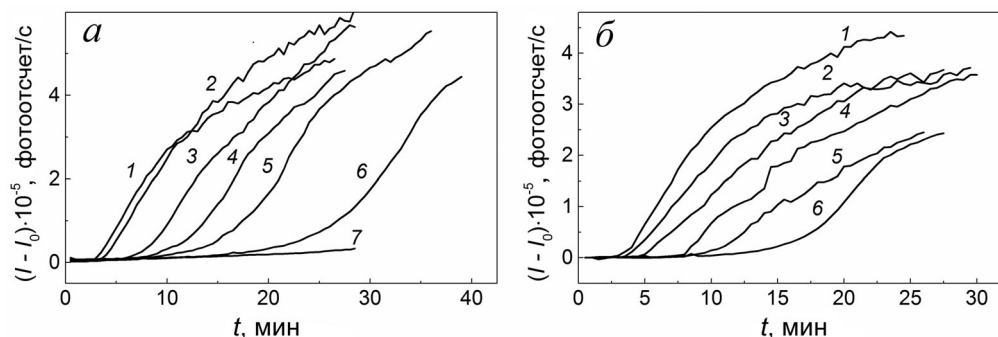


Рис. 1. Влияние α В-Сг на кинетику агрегации ФБ (0,3 мг/мл; 0,03 М HEPES, 0,15 М NaCl, 0,5 мМ ДТТ, pH 6,8) при 48 °С в отсутствие (а) и в присутствии 66 мМ трегалозы (б). Зависимости интенсивности светорассеяния $(I - I_0)$ от времени, полученные при следующих концентрациях α В-Сг: (а) (1) 0, (2) 0,0025, (3) 0,03, (4) 0,05, (5) 0,075, (6) 0,1 и (7) 0,2 мг/мл; (б) (1) ФБ без добавок, (2) 0, (3) 0,0025, (4) 0,01, (5) 0,03 и (6) 0,05 мг/мл

Таблица 1. Параметры, характеризующие влияние трегалозы на агрегацию ФБ (0,3 мг/мл) при 48 °С

Изучаемый шаперон	Эффективность действия шаперона	
	стадия нуклеации	стадия роста агрегатов
α В-Сг	$AC_0 = 2,04 \pm 0,04$ ФБ мономер на 1 субъединицу α В-Сг	$AC_0 = 1,96 \pm 0,04$ ФБ мономер на 1 субъединицу α В-Сг
α В-Сг в присутствии 66 мМ трегалозы	$AC_0 = 2,94 \pm 0,08$ ФБ мономер на 1 субъединицу α В-Сг	$AC_0 = 2,00 \pm 0,04$ ФБ мономер на 1 субъединицу α В-Сг
Трегалоза	$[L]_{0,5} = 86,2 \pm 1,4$ мМ	$[L]_{0,5} = 85,3 \pm 4,1$ мМ
Трегалоза в присутствии α В-Сг (0,015 мг/мл)	$[L]_{0,5} = 67,0 \pm 4,0$ мМ	$[L]_{0,5} = 86,6 \pm 5,0$ мМ

ФБ, а именно длительность стадии нуклеации (t^*) и начальная скорость процесса агрегации на стадии роста агрегатов (v_0). Чтобы оценить значения AC_0 для α В-Сг по отношению к ФБ на стадии роста агрегатов в отсутствие (кривая 1 на рис. 2, в) и в присутствии 66 мМ трегалозы (кривая 2 на рис. 2, в), были построены графики зависимостей $v_0/v_0^{(0)}$ от отношения $[\alpha$ В-Сг]/[ФБ]. Показано, что трегалоза в концентрации 66 мМ

практически не влияет на величину AC_0 на стадии роста агрегатов (рис. 2, в; табл. 1). Из рис. 2, г (вставка) видно, что прирост величины $t^*/t^{*(0)}$ с ростом концентрации α В-Сг не меняется в присутствии 66 мМ трегалозы.

Влияние α В-Сг на агрегацию ФБ в присутствии трегалозы. На рис. 3 представлены кинетические кривые агрегации ФБ (0,3 мг/мл), регистрируемые методом ДЛС, при 48 °С в присут-

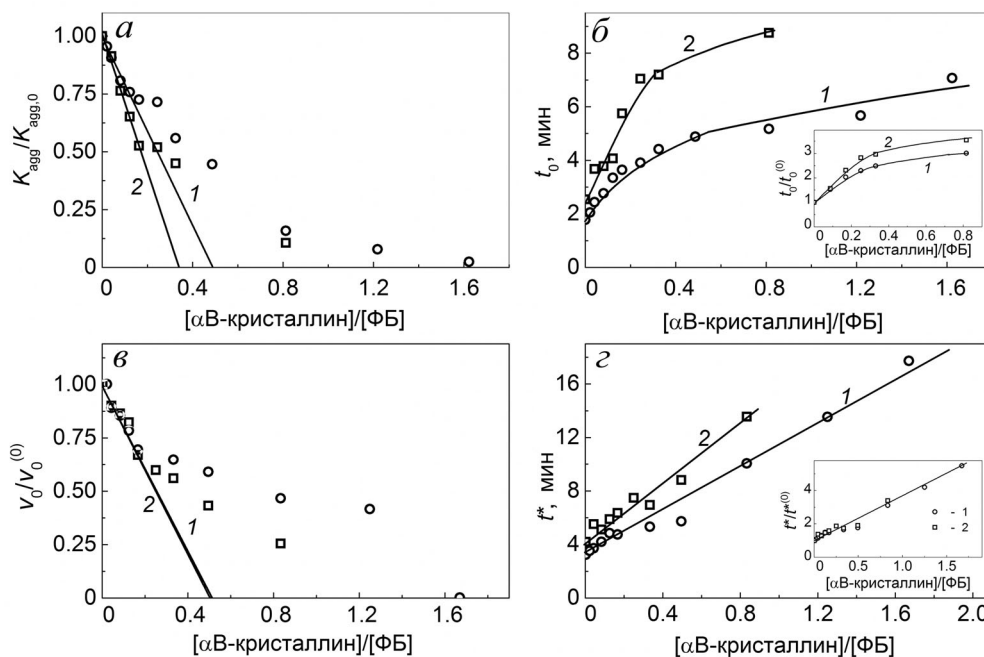


Рис. 2. Влияние α В-Сг на кинетические параметры агрегации ФБ (0,3 мг/мл) в отсутствие и в присутствии 66 мМ трегалозы при 48 °С. Зависимости относительного ускорения процесса агрегации на стадии нуклеации ($K_{agg}/K_{agg,0}$) (а), значений лаг-периодов (t_0) на кинетических кривых агрегации ФБ (б), относительной начальной скорости агрегации ($v_0/v_0^{(0)}$) на стадии роста агрегатов (в) и значений длительности стадии нуклеации (t^*) (г) от отношения молярных концентраций α В-Сг и ФБ. Кривые 1 (○) и 2 (□) на рисунках а, б, в и г получены в отсутствие и в присутствии 66 мМ трегалозы соответственно. На вставках на рис. 2, б и г изображены зависимости относительных значений лаг-периодов ($t_0/t_0^{(0)}$) и длительности стадии нуклеации ($t^*/t^{*(0)}$) от отношения молярных концентраций α В-Сг и ФБ. t_0 и $t_0^{(0)}$ – значения лаг-периода в присутствии и в отсутствие α В-Сг соответственно; t^* и $t^{*(0)}$ – значения длительности стадии нуклеации в присутствии и в отсутствие α В-Сг соответственно

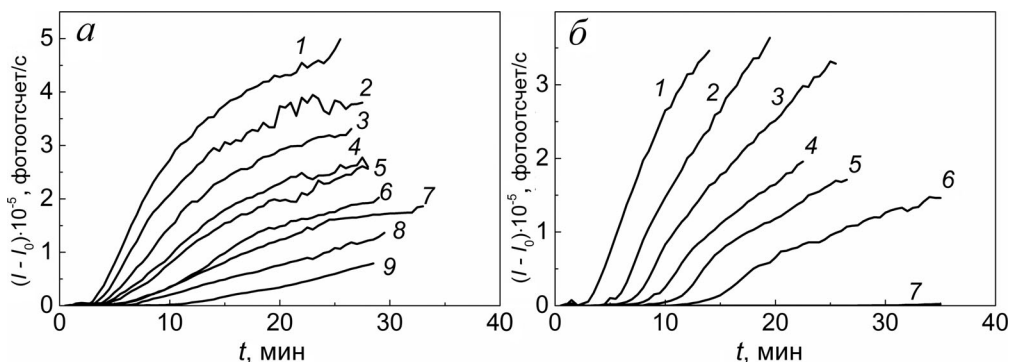


Рис. 3. Влияние трегалозы на кинетику агрегации ФБ (0,3 мг/мл) при 48 °С в отсутствие (а) и в присутствии 0,015 мг/мл α В-Сг (б). Зависимости интенсивности светорассеяния ($I - I_0$) от времени, полученные при следующих концентрациях трегалозы: (а) (1) 0, (2) 33, (3) 66, (4) 100, (5) 133, (6) 166, (7) 200, (8) 250 и (9) 350 мМ; (б) (1) ФБ без добавок, (2) 0, (3) 33, (4) 66, (5) 100, (6) 200 и (7) 350 мМ

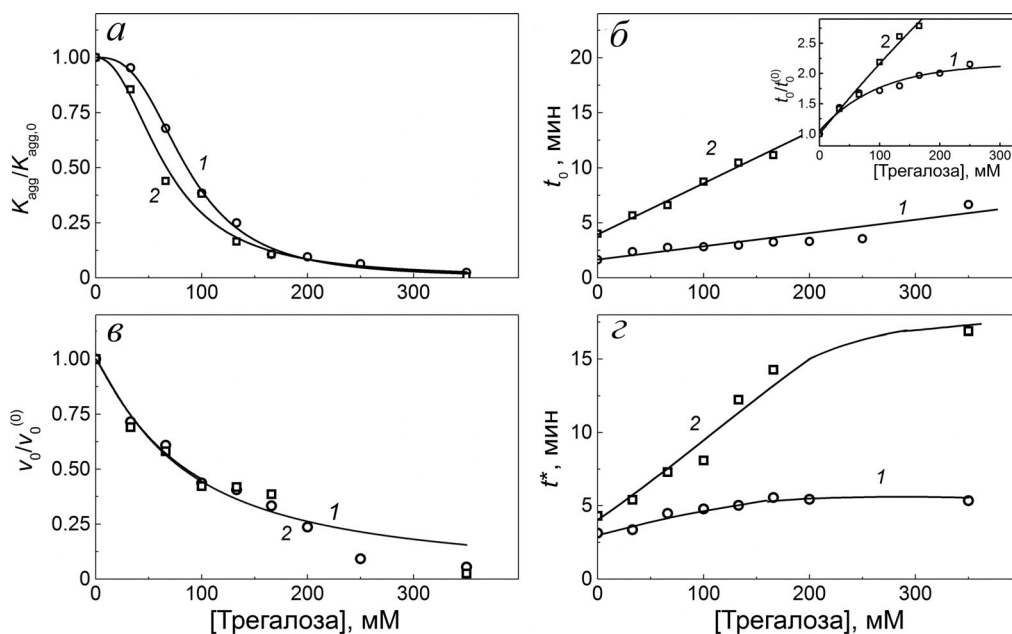


Рис. 4. Влияние трегалозы на кинетические параметры агрегации ФБ (0,3 мг/мл) в отсутствие и в присутствии 0,015 мг/мл α В-Сг при 48 °С. Зависимости относительного ускорения процесса агрегации на стадии нуклеации ($K_{agg}/K_{agg,0}$) (а), лаг-периода (t_0) на кинетических кривых агрегации ФБ (б), величины относительной начальной скорости процесса агрегации на стадии роста агрегатов ($v_0/v_0^{(0)}$) (в) и длительности стадии нуклеации (t^*) от концентрации трегалозы. Кривые 1 (○) и 2 (□) на панелях а, б, в и г получены в отсутствие и присутствии 0,015 мг/мл α В-Сг соответственно. На вставке на рис. 4, б изображены зависимости относительных значений лаг-периодов ($t_0/t_0^{(0)}$) от концентрации трегалозы (t_0 и $t_0^{(0)}$ — значения лаг-периода в присутствии и в отсутствие трегалозы соответственно)

ствии различных концентраций трегалозы в отсутствие (рис. 3, а) и в присутствии 0,015 мг/мл α В-Сг (рис. 3, б). В обоих случаях наблюдалось подавление агрегации ФБ (рис. 3, а и б).

На основании зависимости $K_{agg}/K_{agg,0}$ от концентрации трегалозы (рис. 4, а) показано, что α В-Сг в концентрации 0,015 мг/мл в 1,3 раза уменьшал значение параметра $[L]_{0,5}$, рассчитанного по формуле (4), т.е. увеличивал сред-

ство трегалозы к ФБ на стадии нуклеации (табл. 1).

Из рис. 4, б (вставка) видно, что прирост величины $t_0/t_0^{(0)}$ с ростом концентрации трегалозы становится более заметным в присутствии 0,015 мг/мл α В-Сг.

Анализ зависимости $v_0/v_0^{(0)}$ от концентрации трегалозы (рис. 4, в) показал, что α В-Сг в концентрации 0,015 мг/мл практически не оказывал

влияния на величину параметра $[L]_{0,5}$, рассчитанного по формуле (5) (табл. 1).

Из рис. 4, з видно, что длительность стадии нуклеации (t^*) в отсутствие α В-Сг растет с увеличением концентрации трегалозы от 0 до 150 мМ, а затем при дальнейшем ее увеличении до 350 мМ практически не меняется (кривая 1 на рис. 4, з). В присутствии же 0,015 мг/мл α В-Сг (кривая 2 на рис. 4, з) величина t^* растет с увеличением концентрации трегалозы.

Таким образом, можно сделать вывод, что влияние трегалозы на процесс агрегации Φ Б в присутствии α В-Сг связано в основном с увеличением адсорбционной емкости α В-Сг на стадии нуклеации. Подобное влияние полностью отсутствует на стадии роста агрегатов.

Можно предположить, что развернутые молекулы Φ Б образуют комплексы с α В-Сг, которые некоторое время не агрегируют, т.к. в них нет «липких» мест для агрегации. Формирование ядер происходит благодаря образованию дополнительных контактов между развернутыми молекулами Φ Б в составе этих комплексов, что требует большего времени и замедляет стадию нуклеации. При этом относительный рост величины лаг-периода выражен тем сильнее, чем выше концентрация α В-Сг. Трегалоза «усиливает» действие α В-Сг. Комплекс белка-мишени с α В-Сг лучше связывает трегалозу (рис. 4, а), и на начальных этапах в присутствии трегалозы растет адсорбционная емкость α В-Сг (рис. 2, а).

Седиментационный анализ влияния трегалозы на олигомерное состояние α В-Сг и белка-мишени. Ранее было показано, что начальные этапы про-

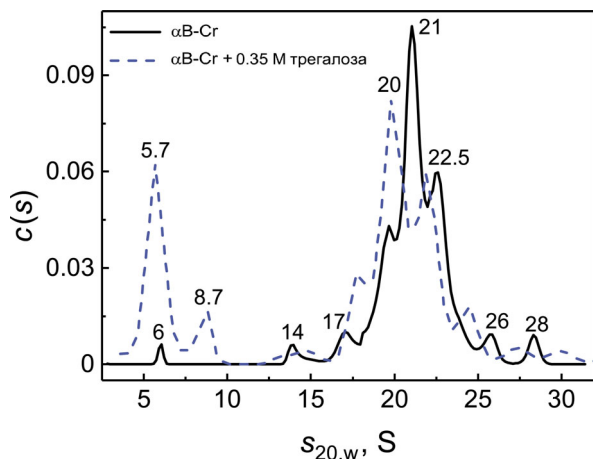


Рис. 5. Влияние трегалозы на олигомерное состояние α В-Сг (0,2 мг/мл). Дифференциальные распределения по коэффициентам седиментации, $c(s)$, для α В-Сг в отсутствие (сплошная кривая) и в присутствии (пунктирная кривая) 350 мМ трегалозы. Скорость вращения ротора – 48 000 об./мин

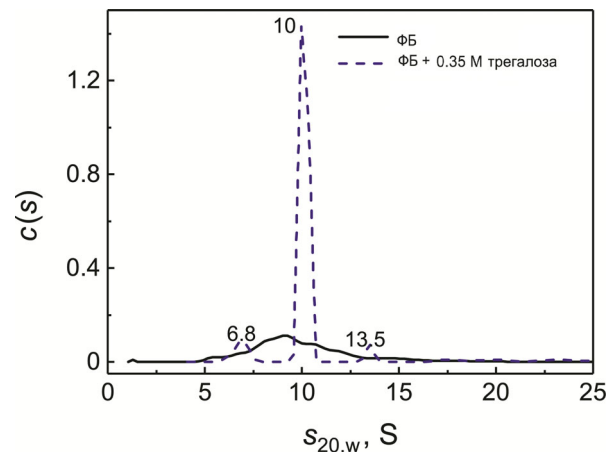


Рис. 6. Распределения $c(s)$ по коэффициентам седиментации при 20 °С для Φ Б (0,6 мг/мл, сплошная кривая) и смеси Φ Б + 350 мМ трегалоза (штриховая кривая)

цесса тепловой агрегации Φ Б включают стадию конформационных изменений димеров Φ Б и стадию их обратимой диссоциации на мономеры [36, 46], за которыми следуют стадии денатурации мономеров, нуклеации и роста агрегатов [35]. Ввиду того что активность α В-Сг неразрывно связана с его четвертичной структурой, представляло интерес исследовать влияние трегалозы на олигомерное состояние белкового шаперона и белка-мишени, а также на их взаимодействие в течение более длительного времени, а именно после 3-часового инкубирования при 48 °С. Для этой цели использовали метод АУС.

Как видно из рис. 5, трегалоза влияет на распределение $c(s)$ α В-Сг: все распределение сдвинуто в сторону меньших значений коэффициента седиментации ($s_{20,w}$). Это указывает на то, что доля более мелких олигомеров в распределении возрастает в присутствии трегалозы. Кроме того, в присутствии трегалозы значительно возрастает доля диссоциированных форм α В-Сг: на это указывает присутствие пиков с $s_{20,w}$ 5,7 и 8,7 S. Вследствие этого трегалоза может оказывать влияние на шапероноподобную активность α В-Сг.

Влияние 350 мМ трегалозы на олигомерное состояние Φ Б. Распределение по коэффициентам седиментации $c(s)$ для Φ Б при 20 °С после прогревания белка в течение 3 ч при 48 °С и быстрого охлаждения представляет собой широкий пик в области значений коэффициентов седиментации от 5 до 20 S, включающий разные олигомерные формы частично развернутого белка от мономера до тетрамера и небольших агрегатов. Трегалоза в концентрации 350 мМ стабилизирует преимущественно димерную форму (пик 10 S), а также мономерную и/или частично

Таблица 2. Оценка доли агрегированного белка (γ_{agg}), осаждающегося в процессе ускорения ротора в опыте АУС при 20 °С

Образец	γ_{agg} (%)
ФБ (0,5 мг/мл)	33
ФБ в присутствии α В-Сг (0,2 мг/мл)	60
*ФБ в присутствии α В-Сг и 350 мМ трегалозы	12
*ФБ в присутствии 350 мМ трегалозы	0

Примечание. Образцы до опыта были прогреты при 48 °С в течение 3 ч, затем быстро (в течение 2 мин) охлаждены.

* Если трегалозу добавить к образцам после 3-часового прогрева при 48 °С, то она не препятствует выпадению в осадок белка (58% от общего количества) в процессе ускорения ротора, т.е. не действует на агрегацию крупных частиц, образованных ФБ или ФБ и α В-Сг.

развернутую димерную (пик 6,8 S) и тетрамерную с пиком 13,5 S (см. рис. 6). Кроме того, в присутствии осмолита ФБ не оседает в процессе ускорения ротора (табл. 2).

При анализе влияния трегалозы на денатурацию ФБ должны быть учтены следующие данные: 1) 350 мМ трегалоза защищает ФБ от образования крупных агрегатов и выпадения их в осадок; 2) если агрегаты уже сформированы, то добавление трегалозы увеличивает долю агрегированного белка (58%) по сравнению с ФБ (33%, табл. 2); 3) трегалоза стабилизирует преимущественно димерную форму белка ($s_{20,w} = 10$ S, рис. 6). При интерпретации влияния трегалозы следует учитывать, что процесс агрегации олигомерного белка включает в себя стадию обратной диссоциации димера ФБ на мономеры, подвергающиеся денатурации (см. обзор [46]). Связываясь в зоне контакта субъединиц, лиганды, как, например, аденозинмонофосфат или глюкозо-6-фосфат, препятствуют диссоциации димера ФБ [36, 46]. На основании вышесказанного и полученных результатов можно предполагать, что трегалоза стабилизирует нативную димерную форму ФБ.

Влияние трегалозы на седimentацию ФБ в присутствии α В-Сг. Из рис. 7, а видно, что для смеси ФБ и α В-Сг пики свободного α В-Сг с $s_{20,w}$ 21 и 22,6 S практически исчезают, а пик, соответствующий ФБ (9S), увеличивается и становится более компактным с $s_{20,w} = 9,1$ S. Пики на 6,4 и 14 S могут соответствовать взаимодействию мономера или тетрамера ФБ с мономерной/димерной формой шаперона. В присутствии α В-Сг в изученных условиях значительная часть ФБ оседает при ускорении ротора (около 60%), что почти вдвое больше, чем в отсутствие шаперона. Это указывает на слипание части комплексов ФБ– α В-Сг с образованием более крупных агрегатов.

Добавление к смеси (ФБ + α В-Сг) 350 мМ трегалозы препятствует образованию крупных агрегатов (табл. 2). Доля γ_{agg} сокращается в 5 раз, с 60% до 12% агрегированного белка. Влияние 350 мМ трегалозы на взаимодействие α В-Сг с белком-мишенью продемонстрировано на рис. 7, б. Распределение $c(s)$ в присутствии трегалозы имеет главный узкий пик с $s_{20,w} = 10,4$ S и небольшие пики с 4; 7,5 и 14 S. Сравнение и анализ трех распределений $c(s)$ для смеси α В-Сг и ФБ в отсутствие (рис. 7, а, сплошная кривая) и в присутствии 350 мМ трегалозы, а также $c(s)$ для α В-Сг в присутствии 350 мМ трегалозы (рис. 7, б) позволяют сделать вывод о взаимодействии диссоциированных форм белкового

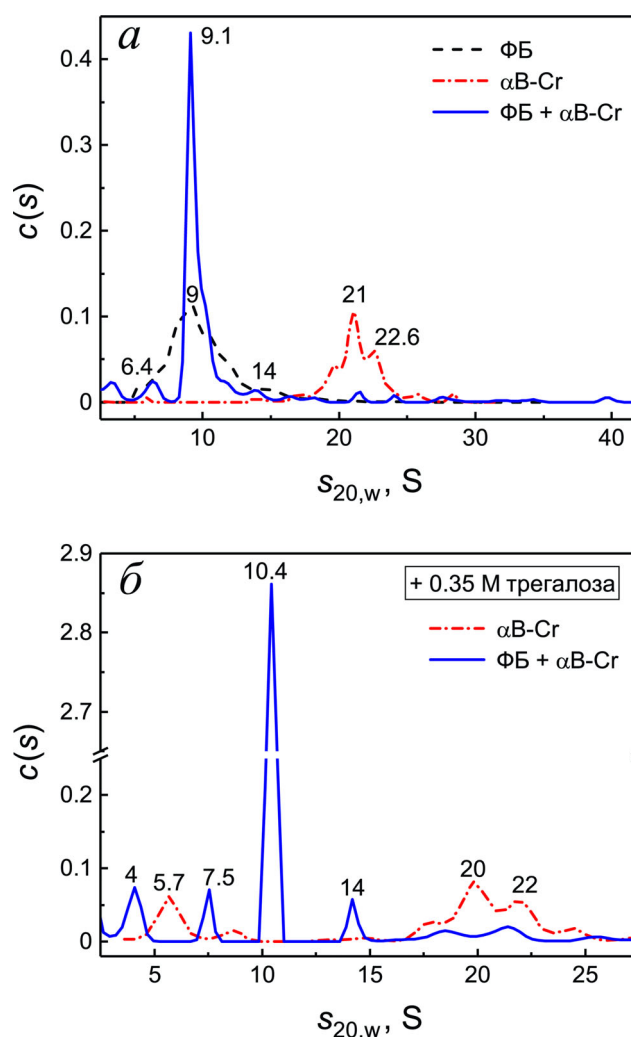


Рис. 7. Взаимодействие ФБ (0,6 мг/мл) и α В-Сг (0,2 мг/мл) в отсутствие и в присутствии 350 мМ трегалозы. а – Распределения $c(s)$ при 20 °С для ФБ (пунктирная кривая), α В-Сг (штрих-пунктирная) и их смеси (сплошная). б – Распределения $c(s)$ при 20 °С в присутствии 350 мМ трегалозы для α В-Сг (штрих-пунктирная кривая) и смеси ФБ и α В-Сг (сплошная кривая)

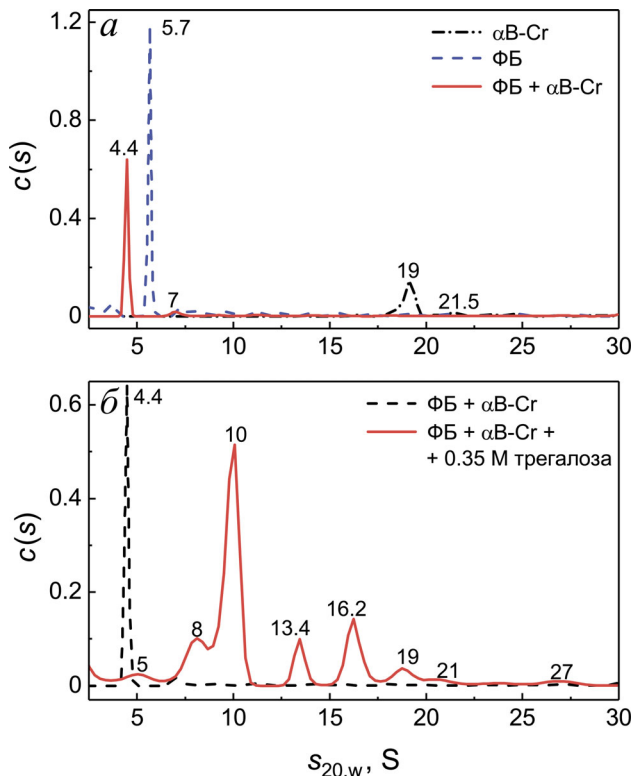


Рис. 8. Влияние 350 мМ трегалозы на взаимодействие α V-Cr с ФБ при 48 °С. *a* – Распределения $c(s)$ для α V-Cr (0,2 мг/мл, штрих-пунктирная кривая), ФБ (0,6 мг/мл, штриховая) и их смеси (сплошная) были получены при 48 °С и приведены к стандартным условиям при 20 °С. *б* – Распределения $c(s)$ для смеси α V-Cr с ФБ в отсутствие (штриховая кривая) и в присутствии (сплошная кривая) 350 мМ трегалозы, полученные при 48 °С и приведенные к стандартным условиям при 20 °С. Общее время прогрева образцов (время предварительного инкубирования и время седиментации при 48 °С) составляло 3 ч

шаперона с разными формами белка-мишени в присутствии химического шаперона. Главный пик 10,4 S предполагает возрастание доли нативного димера ФБ, а также взаимодействие димера ФБ с мономером/димером α V-Cr. Образование более крупных высокомолекулярных комплексов также возможно, поскольку 12% белка оседает в виде агрегатов в процессе ускорения ротора (табл. 2).

Поскольку при нагревании образцов в течение 3 ч с последующим быстрым охлаждением (в течение 2 мин) и проведением опытов АУС при 20 °С некоторые стадии общего процесса агрегации ФБ могут быть обратимы, например, начальные стадии диссоциации и денатурации белка. Представляет интерес сравнить эти данные с теми, что были получены непосредственно при 48 °С. Действие трегалозы на смесь (ФБ + α V-Cr) в опыте, проведенном при 48 °С, показано на рис. 8.

Олигомерные состояния α V-Cr и ФБ в опытах при 48 °С отличаются от таковых в опытах при 20 °С (после 3-часового прогрева при 48 °С и быстрого 2-минутного охлаждения во льду с водой). При повышенной температуре ФБ на распределении $c(s)$ представлена преимущественно мономерной формой (пик 5,7 S) и небольшими агрегатами, в то время как крупные агрегаты осаждаются в процессе ускорения ротора. α V-Cr дает два пика на распределении $c(s)$, а именно 19 и 21,5 S, а распределение $c(s)$ для смеси шаперона с белком-мишенью имеет основной пик 4,4 S и небольшой пик 7 S (рис. 8, *a*). Это позволяет предположить, что мономер ФБ взаимодействует с мономером/димером α V-Cr, что приводит к формированию более асимметричного комплекса и уменьшению коэффициента седиментации с 5,7 до 4,4 S. При добавлении 350 мМ трегалозы распределение $c(s)$ для смеси меняется коренным образом (рис. 8, *б*). Трегалоза, по-видимому, стабилизирует димерную форму ФБ (пик 10 S) и усиливает взаимодействие диссоциированных форм α V-Cr с ФБ (пики 5, 8, 13,4, 16,2 S); при таких условиях возможно также присутствие небольшого количества свободного α V-Cr (19 S) и более крупных комплексов (27 S).

Различия распределений на рис. 7 и 8 свидетельствуют о том, что начальные стадии процесса тепловой агрегации ФБ, такие как диссоциация и денатурация, а также нуклеация, могут быть частично обратимы.

Трегалоза, по данным ДЛС, оказывает влияние на стадии нуклеации процесса тепловой агрегации ФБ. При этом основной эффект трегалозы в присутствии белкового шаперона связан с увеличением адсорбционной емкости α V-Cr по отношению к белку-мишени на стадии нуклеации (для 66 мМ трегалозы увеличение AC_0 является 1,5-кратным): подобный эффект полностью отсутствует на стадии роста агрегатов. По данным седиментационного анализа, трегалоза, по-видимому, стабилизирует димерную форму ФБ и усиливает взаимодействие α V-Cr с ФБ. Таким образом, можно сделать следующие выводы: (1) трегалоза влияет на шапероноподобную активность α V-Cr, увеличивая его адсорбционную емкость по отношению к белку-мишени на стадии нуклеации; (2) трегалоза сдвигает равновесие между олигомерными формами α V-Cr в сторону более мелких олигомерных форм; (3) при тепловом стрессе более активными являются, по-видимому, диссоциированные формы α V-Cr.

Финансирование. Работа Н.А.Ч., Т.Б.Е., В.В.М., С.Г.Р. и Б.И.К. проводилась при поддержке Российского научного фонда (грант

№ 21-14-00178); К.В.Т. – при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Калмыкову П.В. (посмертно) за техническую помощь в проведении SV-опытов.

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

- Muranov, K. O., and Ostrovsky, M. A. (2022) Molecular mechanisms of the lens transparency maintenance and clouding, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, in press.
- Dilley, K. J., and Harding, J. J. (1975) Changes in proteins of the human lens in development and aging, *Biochem. Biophys. Acta Protein Struct.*, **386**, 391-408, doi: 10.1016/0005-2795(75)90283-4.
- Siezen, R. J., Thomson, J. A., Kaplan, E. D., and Benedek, G. B. (1987) Human lens gamma-crystallins: Isolation, identification, and characterization of the expressed gene products, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6088-6092, doi: 10.1073/pnas.84.17.6088.
- Fagerholm, P. P., Philipson, B. T., and Lindström, B. (1981) Normal human lens – the distribution of protein, *Exp. Eye Res.*, **33**, 615-620, doi: 10.1016/s0014-4835(81)80101-7.
- Sprague-Piercy, M. A., Rocha, M. A., Kwok, A. O., and Martin, R. W. (2021) α -Crystallins in the vertebrate eye lens: complex oligomers and molecular chaperones, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **72**, 143-163, doi: 10.1146/annurev-physchem-090419-121428.
- Shamsi, A., Mohammad, T., Anwar, S., Hassan, Md. I., Ahmad, F., et al. (2020) Biophysical insights into implications of PEG-400 on the α -crystallin structure: multispectroscopic and microscopic approach, *ACS Omega*, **5**, 19210-19216, doi: 10.1021/acsomega.0c02648.
- Derham, B. K., and Harding, J. J. (1999) Alpha-crystallin as a molecular chaperone, *Prog. Retin. Eye Res.*, **18**, 463-509, doi: 10.1016/s1350-9462(98)00030-5.
- Horwitz, J. (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10449-10453, doi: 10.1073/pnas.89.21.10449.
- Haslbeck, M., Peschek, J., Buchner, J., and Weinkauff, S. (2016) Structure and function of α -crystallins: Traversing from *in vitro* to *in vivo*, *Biochim. Biophys. Acta*, **186**, 149-166, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.06.008.
- Grosas, A. B., Rekas, A., Mata, J. P., Thorn, D. C., and Carver, J. A. (2020) The Aggregation of α B-crystallin under crowding conditions is prevented by α A-crystallin: implications for α -crystallin stability and lens transparency, *J. Mol. Biol.*, **432**, 5593-5613, doi: 10.1016/j.jmb.2020.08.011.
- Riedl M., Strauch, A., Catoci, D. A. M., and Haslbeck, M. (2020) Proteinaceous transformers: structural and functional variability of human sHsps, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 5448, doi: 10.3390/ijms21155448.
- Inoue, R., Takata, T., Fujii, N., Ishii, K., Uchiyama, S., et al. (2016) New insight into the dynamical system of α B-crystallin oligomers, *Sci. Rep.*, **6**, 29208, doi: 10.1038/srep29208.
- Hayashi, J., and Carver, J. A. (2020) The multifaceted nature of α B-Crystallin, *Cell Stress Chaperones*, **25**, 639-654, doi: 10.1007/s12192-020-01098-w.
- Liu, Z., Wang, C., Li, Y., Zhao, C., Li, T., et al. (2018) Mechanistic insights into the switch of α B-Crystallin chaperone activity and self-multimerization, *J. Biol. Chem.*, **293**, 14880e14890. doi: 10.1074/jbc.RA118.004034.
- Chebotaeva, N. A., Eronina, T. B., Sluchanko, N. N., and Kurganov, B. I. (2015) Effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions on oligomeric state and chaperone-like activity of α B-Crystallin in crowded media, *Int. J. Biol. Macromol.*, **76**, 86-93, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.02.022.
- Chebotaeva, N. A., Eronina, T. B., Roman, S. G., Mikhaylova, V. V., Sluchanko, N. N., et al. (2019) Oligomeric state of α B-Crystallin under crowded conditions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **508**, 1101-1105, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.12.015.
- Roman, S. G., Chebotaeva, N. A., and Kurganov, B. I. (2017) Anti-aggregation activity of small heat shock proteins under crowded conditions, *Int. J. Biol. Macromol.*, **100**, 97-103, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.05.080.
- Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K., and Uversky, V. N. (2014) What macromolecular crowding can do to a protein? *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 23090-23140, doi: 10.3390/ijms151223090.
- Clark, A. R., Lubsen, N. H., and Slingsby, C. (2012) sHSP in the eye lens: protein mutations, cataract and proteostasis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44**, 1687-1697, doi: 10.1016/j.biocel.2012.02.015.
- Berry, V., Francis, P., Reddy, M. A., Collyer, D., Vithana, E., et al. (2001) Alpha-B crystallin gene (CRYAB) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans, *Am. J. Hum. Genet.*, **69**, 1141-1145, doi: 10.1086/324158.
- Graw, J. (2009) Genetics of crystallins: Cataract and beyond, *Exp. Eye Res.*, **88**, 173-189, doi: 10.1016/j.exer.2008.10.011.
- Gerasimovich, E. S., Strelkov, S. V., and Gusev, N. B. (2017) Some properties of three α B-Crystallin mutants carrying point substitutions in the C-terminal domain and associated with congenital diseases, *Biochimie*, **142**, 168-178, doi: 10.1016/j.biochi.2017.09.008.
- Makley, L. N., McMenimen, K. A., DeVree, B. T., Goldman, J. W., McGlasson, B. N., et al. (2015) Pharmacological chaperone for α -crystallin partially restores transparency in cataract models, *Science*, **350**, 674-677, doi: 10.1126/science.aac9145.
- Ghahramani, M., Yousefi, R., Krivandin, A., Muranov, K., Kurganov, B., et al. (2020) Structural and functional characterization of D109H and R69C mutant versions of human α B-Crystallin: the biochemical pathomechanism underlying cataract and myopathy development, *Int. J. Biol. Macromol.*, **146**, 1142-1160, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.239.
- Treweek, T. M., Meehan, S., Ecroyd, H., and Carver, J. A. (2015) Small heat-shock proteins: Important players in regulating cellular proteostasis, *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**, 429-451, doi: 10.1007/s00018-014-1754-5.
- Kulig, M., and Ecroyd, H. (2012) The small heat-shock protein α B-Crystallin uses different mechanisms of chaperone action to prevent the amorphous versus fibrillar aggregation of α -lactalbumin, *Biochem. J.*, **448**, 343-352, doi: 10.1042/BJ20121187.
- Chebotaeva, N. A., Roman, S. G., Borzova, V. A., Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., et al. (2020) Chaperone-like activity of HSPB5: The effects of quaternary structure

- dynamics and crowding, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4940, doi: 10.3390/ijms21144940.
28. Garvey, M., Ecroyd, H., Ray, N. J., Gerrard, J. A., and Carver, J. A. (2017) Functional amyloid protection in the eye lens: Retention of α -crystallin molecular chaperone activity after modification into amyloid fibrils, *Biomolecules*, **7**, 67, doi: 10.3390/biom7030067.
 29. 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.
 30. Ram, L., Mittal, C., Harsolia, R. S., and Yadav, J. K. (2020) Trehalose inhibits the heat-induced formation of the amyloid-like structure of soluble proteins isolated from human cataract lens, *Protein J.*, **39**, 509-518, doi: 10.1007/s10930-020-09919-8.
 31. Jain, N. K., and Roy, I. (2009) Effect of trehalose on protein structure, *Protein Sci.*, **18**, 24-36, doi: 10.1002/pro.3.
 32. Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., Shubin, V. V., Sluchanko, N. N., et al. (2019) Comparative effects of trehalose and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin on aggregation of UV-irradiated muscle glycogen phosphorylase *b*, *Biochimie*, **165**, 196-205, doi: 10.1016/j.biochi.2019.08.006.
 33. Matsuo, T., Tsuchida, Y., and Morimoto, N. (2002) Trehalose eye drops in the treatment of dry eye syndrome, *Ophthalmology*, **109**, 2024-2029, doi: 10.1016/s0161-6420(02)01219-8.
 34. Attanasio, F., Cascio, C., Fisichella, S., Nicoletti, V. G., Pignataro, B., et al. (2007) Trehalose effects on α -crystallin aggregates, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 899-905, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.061.
 35. Eronina, T. B., Mikhaylova, V. V., Chebotareva, N. A., and Kurganov, B. I. (2016) Kinetic regime of thermal aggregation of holo- and apoglycogen phosphorylases *b*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **92**, 1252-1257, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.08.038.
 36. Kurganov, B. I., Chebotareva, N. A., Kornilav, B. A., Malikov, V. P., Orlov, V. N., et al. (2000) Dissociative mechanism of thermal denaturation of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase *b*, *Biochemistry*, **39**, 13144-13152, doi: 10.1021/bi000975w.
 37. Kastenschmidt, L. L., Kastenschmidt, J., and Helmreich, E. (1968) Subunit interactions and their relationship to the allosteric properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase *b*, *Biochemistry*, **7**, 3590-3607, doi: 10.1021/bi00850a037.
 38. Mymrikov, E. V., Bukach, O. V., Seit-Nebi, A. S., and Gusev, N. B. (2010) The pivotal role of the beta 7 strand in the intersubunit contacts of different human small heat shock proteins, *Cell Stress Chaperones*, **15**, 365-377, doi: 10.1007/s12192-009-0151-8.
 39. Kurganov, B. I. (2013) Antiaggregation activity of chaperones and its quantification, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 1554-1566, doi: 10.1134/S0006297913130129.
 40. Kurganov, B. I. (2017) Quantification of anti-aggregation activity of chaperones, *Int. J. Biol. Macromol.*, **100**, 104-117, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.066.
 41. Eronina, T. B., Chebotareva, N. A., Roman, S. G., Kleymenov, S. Y., Makeeva, V. F., et al. (2014) Thermal denaturation and aggregation of apofom of glycogen phosphorylase *b*. Effect of crowding agents and chaperones, *Biopolymers*, **101**, 504-516, doi: 10.1002/bip.22410.
 42. Kurganov, B. I. (1998) Kinetics of heat aggregation of proteins, *Biochemistry (Moscow)*, **63**, 364-366.
 43. Mikhaylova, V. V., Eronina, T. B., Chebotareva, N. A., Shubin, V. V., Kalacheva, D. I., and Kurganov, B. I. (2020) Effect of arginine on chaperone-like activity of HspB6 and monomeric 14-3-3 ζ , *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2039, doi: 10.3390/ijms21062039.
 44. Kurganov, B. I. (1982) *Allosteric Enzymes. Kinetic Behaviour*, John Wiley & Sons, Chichester, pp. 56-60.
 45. Brown, P. H., and Schuck, P. (2006) Macromolecular size- and shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation, *Biophys. J.*, **90**, 4651-4661, doi: 10.1529/biophysj.106.081372.
 46. Chebotareva, N. A., Roman, S. G., and Kurganov, B. I. (2016) Dissociative mechanism for irreversible thermal denaturation of oligomeric proteins, *Biophys. Rev.*, **8**, 397-407, doi: 10.1007/s12551-016-0220-z.

EFFECT OF TREHALOSE ON OLIGOMERIC STATE AND ANTI-AGGREGATION ACTIVITY OF α B-CRYSTALLIN

N. A. Chebotareva*, T. B. Eronina, V. V. Mikhaylova,
S. G. Roman, K. V. Tugaeva, and B. I. Kurganov

*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology"
of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; e-mail: n.a.chebotareva@gmail.com*

α B-Crystallin (α B-Cr), one of the main crystalline lens proteins, along with other crystallins maintains lens transparency suppressing protein aggregation and thus preventing cataractogenesis. α B-Cr belongs to the class of molecular chaperones; being expressed in many tissues it has a dynamic quaternary structure, which is essential for its chaperone-like activity. A shift in the equilibrium between ensembles of oligomers of different size allows regulating the chaperone activity. Trehalose is known to inhibit protein aggregation *in vivo* and *in vitro*, and it is widely used in biotechnology. The results of studying the effect of trehalose on the chaperone-like activity of crystallins can serve as a basis for the design of drugs delaying cataractogenesis. We have studied the trehalose effect on the quaternary structure and anti-aggregation activity of α B-Cr using muscle glycogen phosphorylase *b* (Phb) as a target protein. According to the dynamic light scattering data, trehalose affects the nucleation stage of Phb thermal aggregation at 48 °C, and an increase in α B-Cr adsorption capacity (AC_0) is the main effect of trehalose on the aggregation process in the presence of the protein chaperone (AC_0 increases 1.5-fold in the presence of 66 mM trehalose). According to the sedimentation analysis data, trehalose stabilizes the dimeric form of Phb at the stages of denaturation and dissociation and enhances the interaction of α B-Cr with the target protein. Moreover, trehalose shifts the equilibrium between α B-Cr oligomers towards the smaller forms. Thus, trehalose affects the quaternary structure of α B-Cr and increases its anti-aggregation activity at the nucleation stage.

Keywords: α B-crystallin, anti-aggregation activity, trehalose, glycogen phosphorylase *b*, dynamic light scattering, analytical ultracentrifugation