

**СПОСОБНОСТЬ ШАПЕРОНОПОДОБНОГО БЕЛКА
 α -КРИСТАЛЛИНА ПРЕДОТВРАЩАТЬ АГРЕГАЦИЮ,
НО НЕ РЕФОЛДИНГ β_L -КРИСТАЛЛИНА,
ПОВРЕЖДЕННОГО УЛЬТРАФИОЛЕТОМ**

© 2019 г. К. О. Муранов^{1*}, Н. Б. Полянский¹, С. Ю. Клейменов², М. А. Островский¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

²Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: k.muranov@hotmail.com

Поступила в редакцию 05.06.2019;

после доработки 05.06.2019;

принята в печать 20.06.2019

α -Кристаллин, входящий в семейство малых белков теплового шока, участвует в поддержании прозрачности хрусталика, предотвращая агрегацию поврежденных белков цитоплазмы волоконных клеток хрусталика. Целью работы было исследовать способность α -кристаллина восстанавливать нативную структуру β_L -кристаллина, поврежденного ультрафиолетом (УФ). Было показано, что α -кристаллин тормозит агрегацию β_L -кристаллина, поврежденного УФ, в условиях, близких к физиологическим (температура – 37°C, изотонический раствор, pH 7.0). Однако инкубация β_L -кристаллина, поврежденного УФ, с α -кристаллином не приводила к ренатурации белка, что было показано методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Таким образом, α -кристаллин не обладает свойствами истинного шаперона и не способен восстанавливать нативную структуру белка, поврежденного УФ.

Ключевые слова: α -кристаллин, молекулярный шаперон, β_L -кристаллин, УФ-излучение.

DOI: 10.1134/S0207401X19120148

ВВЕДЕНИЕ

Олигомерный белок α -кристаллин, принадлежащий к семейству малых белков теплового шока (sHSP) [1], образован полипептидами αA - и αB -кристаллина, которые состоят соответственно из 173 и 175 аминокислотных остатков молекулярной массой в 19.8 и 20.0 кДа [2]. Если αA -кристаллин обнаружен только в хрусталике и сетчатке глаза, то αB -кристаллин присутствует и во множестве других тканей организма – мозге, сердечной мышце и др. [3–5].

α -Кристаллин выполняет несколько функций в хрусталике. Во-первых, он вместе с β - и γ -кристаллином обеспечивает хрусталику прозрачность [6–8]. Во-вторых, как шапероноподобный белок α -кристаллин предотвращает агрегацию дестабилизированных белков [9, 10]. И, в-третьих, α -кристаллин участвует в формировании хрусталика на ранних стадиях онтогенеза [11–14].

Шапероноподобное действие α -кристаллина обнаружено более 20 лет назад, но молекулярный механизм этого явления понятен не до конца [10, 15]. В частности, до сих пор не ясно, способен ли α -кристаллин только предупреждать агрегацию поврежденного белка или, как истинный шаперон,

может восстанавливать его структуру. Поскольку в некоторых модельных системах α -кристаллин восстанавливает структуру поврежденных белков, то такая возможность не исключена и в условиях *in vivo* [16–18].

Целью данной работы было исследовать способность α -кристаллина ренатурировать поврежденные белки. В качестве целевого белка для исследования этой способности α -кристаллина был использован поврежденный ультрафиолетом β_L -кристаллин. Такой белок ближе к реальным субстратам, чем другие, широко используемые в исследованиях целевые белки, как то: белки, дестабилизированные под воздействием тепла, восстановителей дисульфидных связей, детергентов и др. [19–22]. Следует отметить, что ультрафиолет является важнейшим катарактогенным фактором [23], при действии на глаз *in vivo* он способен повреждать белки хрусталика [24, 25].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение α - и β_L -кристаллина

Белки выделяли из свежемороженых хрусталиков бычков двухлеток с помощью ранее

описанной методики [21, 26]. Кортекс хрусталика гомогенизировали при 0°C в Na-фосфатном буфере (ФБ) (40 мМ Na-фосфат, 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 3 мМ NaN_3 , pH 6.8). Гомогенат центрифугировали при 27000g и 4°C в течение 1 ч. Супернатант разделяли на колонке TSK-gel HW-55 fine. Фракции, содержащие α - и β_L -кристаллин, собирали и рехроматографировали на колонках TSK-gel HW-55 fine и Sephacryl S200 superfine соответственно. Полученные фракции концентрировали с помощью ультрафильтрации (Millipore PTTK disk membrane, NMWL 30,000). Молекулярный вес полученных α - и β_L -кристаллина составлял (828 ± 45) и (43 ± 3) кДа соответственно. Концентрация белков измерялась фотометрически при 280 нм, коэффициент экстинкции составлял $0.85 \text{ cm}^2 \cdot \text{mg}^{-1}$ для α -кристаллина и $2.3 \text{ cm}^2 \cdot \text{mg}^{-1}$ для β_L -кристаллина [27].

Облучение β_L -кристаллина ультрафиолетом

Раствор β_L -кристаллина (2 мг/мл) облучали в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при температуре $(8 \pm 2)^\circ\text{C}$ светом ртутной лампы (ДРШ-1000), снабженной 15-сантиметровым водяным фильтром и ультрафиолетовым фильтром УФС-2. Суммарную дозу ультрафиолета, полученную образцом в процессе облучения в диапазоне 260–305 нм, измеряли с помощью оптического спектрометра AvaSpec-2048. Суммарная мощность ультрафиолета составляла $(0.8 \pm 0.1) \text{ мВт/см}^2$. Раствор белка в указанной концентрации полностью поглощал падающий на образец свет. В дальнейшем такой перпарат белка мы будем называть УФ- β_L -кристаллином. Концентрацию белка в УФ- β_L -кристаллине измеряли методом микробиурета [28].

Исследование взаимодействия белков

Препарат УФ- β_L -кристаллин смешивали с α -кристаллином в весовом соотношении 1/1 (конечная концентрация каждого белка в фосфатно-солевом буфере составляла 2 мг/мл) и инкубировали сутки при 37°C . Смесь разделяли на колонке Sephacryl S200 superfine (Sigma), получая фракцию потенциально ренатурированного УФ- β_L -кристаллина для исследования методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

Агрегацию УФ- β_L -кристаллина при 37°C в присутствии α -кристаллина оценивали по интенсивности светорассеяния при 450 нм с помощью спектрофотометра Shimadzu model 1240 mini (Shimadzu, Japan). Температуру образца поддерживали с помощью термостата Julabo-12 (Julabo, Germany) с точностью 0.1°C .

Калориметрические измерения

Тепловую денатурацию облученного ультрафиолетом β_L -кристаллина изучали методом ДСК с помощью микрокалориметра DASM-4M (Институт биологического приборостроения РАН, Пушкино, Россия). Раствор белка нагревали с постоянной скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ от 5 до 90°C при постоянном давлении 2.2 атм. Калориметрические профили необратимо денатурированного белка были скорректированы на базовую линию, а поправка на возможную агрегацию была получена при вторичном нагревании образца.

Статистические методы

Эксперименты были повторены от 3 до 5 раз. Статистический анализ проведен с использованием методов описательной статистики и тестов Краскела–Уоллиса и Коновера (© И.П. Гайдышев. Статистический пакет “AtteStat”, 2018).

Ингибирование агрегации УФ- β_L -кристаллина α -кристаллином

Использованный в работе препарат β_L -кристаллина по данным денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (данные не приводятся) является смесью βV3 -кристаллина и βV2 -кристаллина, а также протеолитических фрагментов βV2 -, βA2 - и βA1 -кристаллинов, что хорошо согласуется с литературными данными [29, 30].

Облучение ультрафиолетом раствора β_L -кристаллина вызывает его агрегацию (рис. 1). Однако

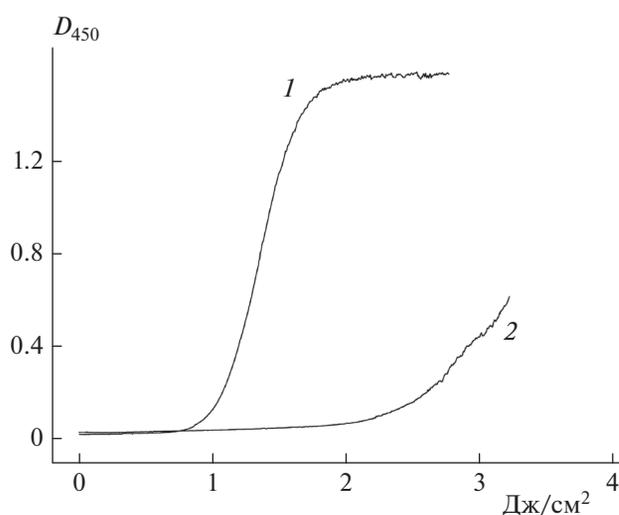


Рис. 1. Агрегация раствора β_L -кристаллина под действием ультрафиолета. По оси ординат – поглощение при 450 нм, по оси абсцисс – доза ультрафиолета; 1 – агрегация при 37°C , 2 – агрегация при 10°C .

если агрегация при 37 °С начинается при дозе ультрафиолета, несколько меньшей 1 Дж/см², то при 10 °С старт агрегации наблюдается при вдвое большей дозе, близкой к 2 Дж/см².

Это означает, что при низкой температуре в растворе накапливаются денатурированные, способные к агрегации молекулы β_L -кристаллина (УФ- β_L -кристаллин). Если такой раствор нагреть до 37 °С, то белок агрегирует в течение 30–40 мин [31].

При добавлении α -кристаллина к раствору УФ- β_L -кристаллина наблюдается концентрационно-зависимое ингибирование процесса агрегации. Полное блокирование процесса наблюдается при соотношении повреждаемого белка к шаперону 1/1 по весу (данные не приводятся).

Влияние α -кристаллина на термостабильность облученного ультрафиолетом β_L -кристаллина

На рис. 2 представлены ДСК-профили нативного и облученного ультрафиолетом β_L -кристаллина до и после инкубации с α -кристаллином. Образец нативного β_L -кристаллина на ДСК-профиле имеет сложную форму (кривая 1 на рис. 2), что подтверждает гетерогенность препарата белка. Площадь под кривой соответствует молярной энтальпии при денатурации белка (ΔH) и пропорциональна количеству нативного белка. Облучение ультрафиолетом существенно снижает площадь под кривой, что указывает на снижение доли нативного белка (рис. 2). Инкубация поврежденного ультрафиолетом белка с α -кристаллином незначительно влияет на энергию денатурации. Необходимо отметить, что положение T_{max} на ДСК-профилях практически неизменно после облучения белка ультрафиолетом. Значение T_{max} для нативного β_L -кристаллина составляет $(64.9 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ (среднее \pm стандартное отклонение). Значение T_{max} для УФ- β_L -кристаллина – $(63.7 \pm 0.2)^\circ\text{C}$, а для УФ- β_L -кристаллина, инкубированного с α -кристаллином в течение 24 ч, – $(63.2 \pm 0.2)^\circ\text{C}$.

Для повреждения β_L -кристаллина ультрафиолетом были использованы дозы около 2 Дж/см², что сравнимо с естественным уровнем УФ-облучения. Например, житель Южной Европы (Франция, Бордо) в течение жизни получает дозу ультрафиолета около 1 Дж/см² [32]. Это дает основания предполагать, что в условиях *in vivo* солнечный свет может вызывать повреждение белков. Таким образом, УФ- β_L -кристаллин, использованный в нашем эксперименте, является естественным субстратом для α -кристаллина.

Денатурация β_L -кристаллина при ультрафиолетовом облучении описывается в рамках ударной модели [31]. Это значит, что молекула белка накапливает фотохимические повреждения без изменения нативной конформации. Но в опреде-

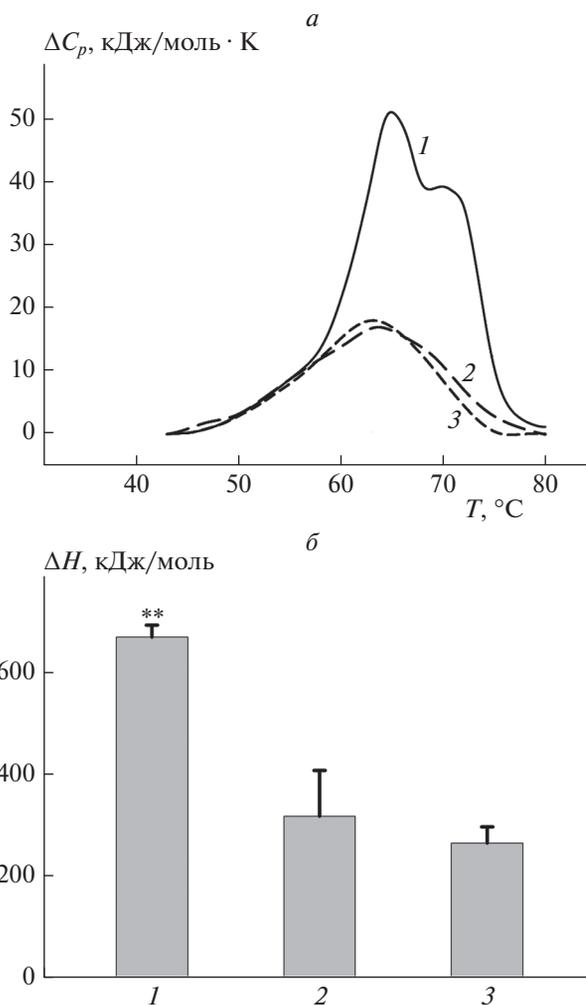


Рис. 2. Термостабильность препаратов нативного и поврежденного ультрафиолетом β_L -кристаллина. *a* – Профили дифференциальной сканирующей калориметрии: 1 – нативный β_L -кристаллин, 2 – УФ- β_L -кристаллин, 3 – УФ- β_L -кристаллин, инкубированный в течение суток с α -кристаллином; *б* – молярная энтальпия денатурации нативного β_L -кристаллина (1), поврежденного ультрафиолетом β_L -кристаллина (2), поврежденного ультрафиолетом β_L -кристаллина, инкубированного в течение суток с α -кристаллином (3); ** – $P < 0.02$ – достоверность различия между нативным белком и УФ- β_L -кристаллином и УФ- β_L -кристаллином, инкубированным в течение суток с α -кристаллином (тесты Краскела–Уоллиса и Коновера).

ленный момент, при достижении порога фотохимического повреждения, поглощение только одного кванта света вызывает одномоментную денатурацию молекулы [33].

Нагревание раствора до 37 °С индуцирует агрегацию белка, тогда как добавление α -кристаллина ингибирует этот процесс. Полное блокирование агрегации наблюдали при соотношении белок/шаперон 5/1 (моль на моль), что совпадает с данными, полученными нами на других моделях –

при тепловой и химической денатурации белка [21, 34].

Показано, что α -кристаллин восстанавливает структуру белков, денатурированных детергентами за счет образования с ними комплекса [16–18]. Поэтому можно было бы ожидать, что денатурированные молекулы УФ β _L-кристаллина, образовавшие комплекс с α -кристаллином, также будут восстанавливать свою нативную структуру. Действительно, молекулы поврежденного белка в составе комплекса находятся в особом положении по сравнению с молекулами в растворе. Такие молекулы не могут агрегировать, поскольку не имеют возможности взаимодействовать друг с другом. Вместе с тем денатурированные молекулы УФ β _L-кристаллина, связанные с α -кристаллином, частично экспонированы в гидрофильную среду растворителя. Под действием полярного окружения частично развернутые белковые цепи могут складываться в структуры, близкие к нативным, как это происходит при ренатурации белка из раствора детергента. В случае восстановления нативной структуры УФ β _L-кристаллина при инкубации с α -кристаллином доля нативного белка должна возрасти по сравнению с белком, не подвергнутым этой процедуре.

Чтобы оценить такую возможность, нами был использован метод ДСК, который позволяет определить долю нативного β _L-кристаллина в облученных ультрафиолетом образцах. Площадь под кривой ДСК соответствует общей теплоте денатурации белка и пропорциональна количеству в образце нативного белка [22, 31]. Мы установили, что общая энергия денатурации стабильных водорастворимых белковых форм облученного ультрафиолетом β _L-кристаллина не отличается от энергии денатурации β _L-кристаллина, инкубированного с α -кристаллином в течение 24 ч. Иными словами, взаимодействие денатурированного под действием ультрафиолета β _L-кристаллина с α -кристаллином не приводит к восстановлению нативной структуры денатурированного белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для исследования шапероноподобных свойств α -кристаллина широко используются модельные системы, основанные на взаимодействии денатурированных детергентами белков с α -кристаллином *in vitro*. В таких системах α -кристаллин проявляет свойства истинного шаперона и способствует восстановлению нативной структуры денатурированного белка. Такие свойства α -кристаллина могли бы играть важную роль в предупреждении возникновения помутнения хрусталика глаза (катаракты). Однако при использовании в качестве целевого белка физиологически значимого суб-

страта, а именно β _L-кристаллина, поврежденного воздействием ультрафиолета, ренатурация денатурированного белка в присутствии α -кристаллина нами не обнаружена. Учитывая, что взаимодействие белков проводилось в условиях, близких к физиологическим (температура, pH, солевой состав среды), можно ожидать, что и в условиях *in vivo* ренатурация поврежденных ультрафиолетом белков не происходит. Авторы полагают, что причиной этому могут быть внутримолекулярные сшивки, образующиеся в белке при действии ультрафиолета, которые стабилизируют молекулу в развернутом (денатурированном) состоянии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Caspers G.J., Leunissen J.A., de Jong W.W. // J. Mol. Evol. 1995. V. 40. P. 238.
2. Bloemendal H., De Jong W., Jaenicke R. et al. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2004. V. 86. P. 407.
3. Iwaki T., Kume-Iwaki A., Goldman J.E. // J. Histochem. Cytochem. 1990. V. 38. P. 31.
4. Kannan R., Sreekumar P.G., Hinton D.R. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1860. P. 258.
5. Srinivasan A.N., Nagineni C.N. Bhat S.P. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 23337.
6. Benedek G.B. // Appl. Opt. 1971. V. 10. P. 459.
7. Delaye M., Tardieu A. // Nature. 1983. V. 302. P. 415.
8. Mirarefi A.Y., Boutet S., Ramakrishnan S. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2010. V. 1800. P. 556.
9. Derham B.K., Harding J.J. // Prog. Retin. Eye Res. 1999. V. 18. P. 463.
10. Horwitz J. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1992. V. 89. P. 10449.
11. Boyle D.L., Takemoto L., Brady J.P. et al. // BMC Ophthalmol. 2003. V. 3. P. 3.
12. Graw J. // Exp. Eye Res. 2009. V. 88. P. 173.
13. Hu W.F., Gong L., Cao Z. et al. // Curr. Mol. Med. 2012. V. 12. P. 177.
14. Maddala R., Rao V.P. // Exp. Cell Res. 2005. V. 306. P. 203.
15. Haslbeck M., Vierling E. // J. Mol. Biol. 2015. V. 427. P. 1537.
16. Ganea E., Harding J.J. // Biochem. J. 2000. V. 345. P. 467.
17. Nath D., Rawat U., Anish R. et al. // Protein Sci. 2002. V. 11. P. 2727.
18. Rachdan D., Lou M.F., Harding J.J. // Curr. Eye Res. 2005. V. 30. P. 919.
19. Bumagina Z.M., Gurvits B.Y., Artemova N.V. et al. // Biophys. Chem. 2010. V. 146. P. 108.
20. Hook D.W., Harding J.J. // Intern. J. Biol. Macromol. 1998. V. 22. P. 295.
21. Khanova H.A., Markossian K.A., Kurganov B.I. et al. // Biochemistry. 2005. V. 44. P. 15480.
22. Maloletkina O.I., Markossian K.A., Chebotareva N.A. et al. // Biophys. Chem. 2012. V. 163–164. P. 11.
23. Javitt J.C., Taylor H.R. // Doc. Ophthalmol. 1994. V. 88. P. 307.

24. *Artigas C., Navea A., Lopez-Murcia M.M. et al.* // J. Fr. Ophthalmol. 2014. V. 37. P. 773.
25. *Lofgren S.* // Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 2001. V. 42. P. 1833.
26. *Chiou S.H., Azari P., Himmel M.E. et al.* // Intern. J. Pept. Protein Res. 1979. V. 13. P. 409.
27. *Putilina T., Skouri-Panet F., Prat K. et al.* // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 13747.
28. *Itzhaki R.F., Gill D.M.* // Anal Biochem. 1964. V. 9. P. 401.
29. *Slingsby C., Bateman O.A.* // Exp. Eye Res. 1990. V. 51. P. 21.
30. *Srivastava K., Gupta R., Chaves J.M. et al.* // Biochemistry. 2009. V. 48. P. 7179.
31. *Muranov K.O., Maloletkina O.I., Poliansky N.B. et al.* // Exp. Eye Res. 2011. V. 92. P. 76.
32. *Delcourt C., Cougnard-Gregoire A., Boniol M. et al.* // Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 2014. V. 55. P. 7619.
33. *Setlow R., Doyle B.* // Biochim. Biophys. Acta. 1957. V. 24. P. 27.
34. *Borkman R.F., Knight G., Obi B.* // Exp. Eye Res. 1996. V. 62. P. 141.