

**СПОСОБНОСТЬ ШАПЕРОНОПОДОБНОГО БЕЛКА  
 $\alpha$ -КРИСТАЛЛИНА ПРЕДОТВРАЩАТЬ АГРЕГАЦИЮ,  
НО НЕ РЕФОЛДИНГ  $\beta_L$ -КРИСТАЛЛИНА,  
ПОВРЕЖДЕННОГО УЛЬТРАФИОЛЕТОМ**

© 2019 г. К. О. Муранов<sup>1\*</sup>, Н. Б. Полянский<sup>1</sup>, С. Ю. Клейменов<sup>2</sup>, М. А. Островский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт 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

$\alpha$ -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  $\alpha$ -кристаллина восстанавливать нативную структуру  $\beta_L$ -кристаллина, поврежденного ультрафиолетом (УФ). Было показано, что  $\alpha$ -кристаллин тормозит агрегацию  $\beta_L$ -кристаллина, поврежденного УФ, в условиях, близких к физиологическим (температура – 37°C, изотонический раствор, pH 7.0). Однако инкубация  $\beta_L$ -кристаллина, поврежденного УФ, с  $\alpha$ -кристаллином не приводила к ренатурации белка, что было показано методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Таким образом,  $\alpha$ -кристаллин не обладает свойствами истинного шаперона и не способен восстанавливать нативную структуру белка, поврежденного УФ.

*Ключевые слова:*  $\alpha$ -кристаллин, молекулярный шаперон,  $\beta_L$ -кристаллин, УФ-излучение.

DOI: 10.1134/S0207401X19120148

## ВВЕДЕНИЕ

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

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

Шапероноподобное действие  $\alpha$ -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  $\alpha$ -кристаллин только предупреждать агрегацию поврежденного белка или, как истинный шаперон,

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

Целью данной работы было исследовать способность  $\alpha$ -кристаллина ренатурировать поврежденные белки. В качестве целевого белка для исследования этой способности  $\alpha$ -кристаллина был использован поврежденный ультрафиолетом  $\beta_L$ -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 $\alpha$ - и $\beta_L$ -кристаллина

Белки выделяли из свежзамороженных хрусталиков бычков двухлеток с помощью ранее

описанной методики [21, 26]. Кортекс хрусталика гомогенизировали при 0 °С в Na-фосфатном буфере (ФБ) (40 мМ Na-фосфат, 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 3 мМ NaN<sub>3</sub>, pH 6.8). Гомогенат центрифугировали при 27000g и 4 °С в течение 1 ч. Супернатант разделяли на колонке TSK-gel HW-55 fine. Фракции, содержащие α- и β<sub>L</sub>-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<sub>L</sub>-кристаллина составлял (828 ± 45) и (43 ± 3) кДа соответственно. Концентрация белков измерялась фотометрически при 280 нм, коэффициент экстинкции составлял 0.85 см<sup>2</sup> · мг<sup>-1</sup> для α-кристаллина и 2.3 см<sup>2</sup> · мг<sup>-1</sup> для β<sub>L</sub>-кристаллина [27].

### Облучение β<sub>L</sub>-кристаллина ультрафиолетом

Раствор β<sub>L</sub>-кристаллина (2 мг/мл) облучали в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при температуре (8 ± 2) °С 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 ± 0.1) мВт/см<sup>2</sup>. Раствор белка в указанной концентрации полностью поглощал падающий на образец свет. В дальнейшем такой препарат белка мы будем называть УФ-β<sub>L</sub>-кристаллином. Концентрацию белка в УФ-β<sub>L</sub>-кристаллине измеряли методом микробиурета [28].

### Исследование взаимодействия белков

Препарат УФ-β<sub>L</sub>-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 °С. Смесь разделяли на колонке Sephacryl S200 superfine (Sigma), получая фракцию потенциально ренатурированного УФ-β<sub>L</sub>-кристаллина для исследования методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

Агрегацию УФ-β<sub>L</sub>-кристаллина при 37 °С 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 °С.

### Калориметрические измерения

Тепловую денатурацию облученного ультрафиолетом β<sub>L</sub>-кристаллина изучали методом ДСК с помощью микрокалориметра DASM-4M (Институт биологического приборостроения РАН, Пушкино, Россия). Раствор белка нагревали с постоянной скоростью 1 °С/мин от 5 до 90 °С 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<sub>L</sub>-кристаллина α-кристаллином

Использованный в работе препарат β<sub>L</sub>-кристаллина по данным денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (данные не приводятся) является смесью βВ3-кристаллина и βВ2-кристаллина, а также протеолитических фрагментов βВ2-, βА2- и βА1-кристаллинов, что хорошо согласуется с литературными данными [29, 30].

Облучение ультрафиолетом раствора β<sub>L</sub>-кристаллина вызывает его агрегацию (рис. 1). Однако

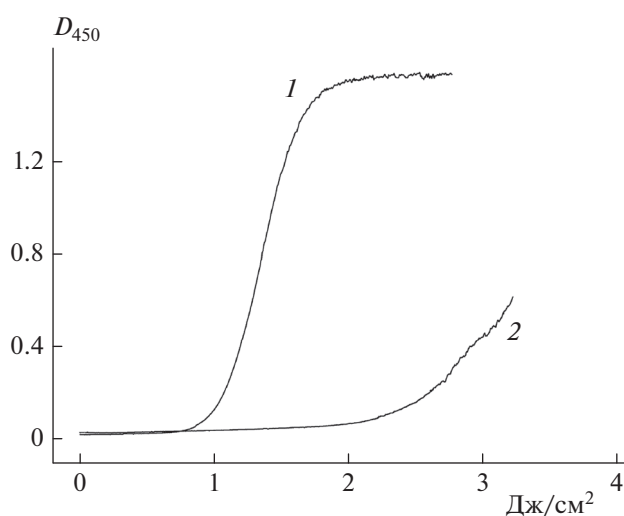


Рис. 1. Агрегация раствора β<sub>L</sub>-кристаллина под действием ультрафиолета. По оси ординат – поглощение при 450 нм, по оси абсцисс – доза ультрафиолета; 1 – агрегация при 37 °С, 2 – агрегация при 10 °С.

если агрегация при 37°C начинается при дозе ультрафиолета, несколько меньшей 1 Дж/см<sup>2</sup>, то при 10°C старт агрегации наблюдается при вдвое большей дозе, близкой к 2 Дж/см<sup>2</sup>.

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

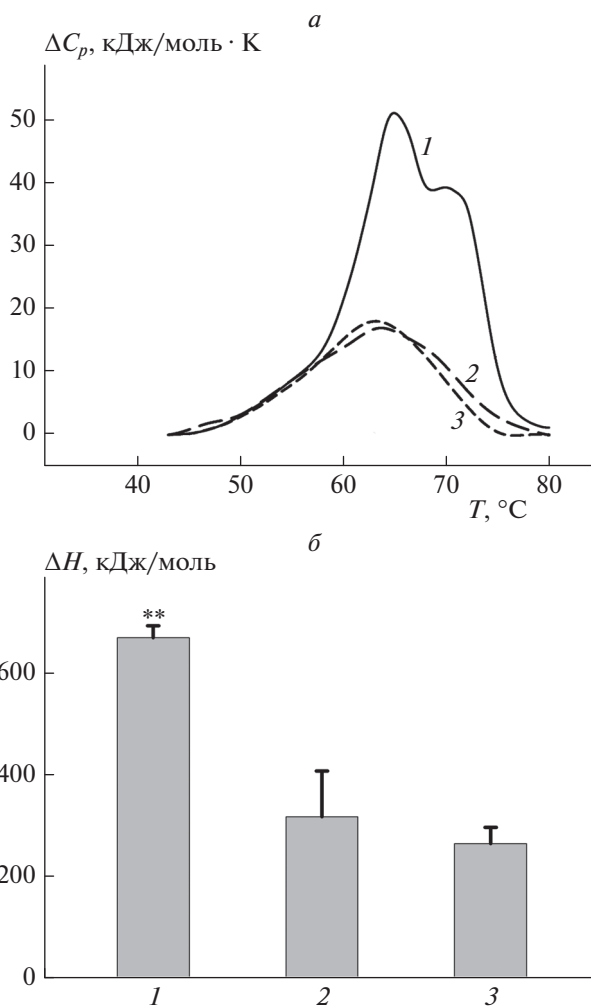
При добавлении  $\alpha$ -кристаллина к раствору УФ- $\beta_L$ -кристаллина наблюдается концентрационно-зависимое ингибирование процесса агрегации. Полное блокирование процесса наблюдается при соотношении повреждаемого белка к шаперону 1/1 по весу (данные не приводятся).

### Влияние $\alpha$ -кристаллина на термостабильность облученного ультрафиолетом $\beta_L$ -кристаллина

На рис. 2 представлены ДСК-профили нативного и облученного ультрафиолетом  $\beta_L$ -кристаллина до и после инкубации с  $\alpha$ -кристаллином. Образец нативного  $\beta_L$ -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 ( $\Delta H$ ) 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  $\alpha$ -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  $\beta_L$ -кристаллина составляет  $(64.9 \pm 0.2)^\circ\text{C}$  (среднее  $\pm$  стандартное отклонение). Значение  $T_{max}$  для УФ- $\beta_L$ -кристаллина —  $(63.7 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ , а для УФ- $\beta_L$ -кристаллина, инкубированного с  $\alpha$ -кристаллином в течение 24 ч, —  $(63.2 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ .

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

Денатурация  $\beta_L$ -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  $\beta_L$ -кристаллина. *a* — Профили дифференциальной сканирующей калориметрии: 1 — нативный  $\beta_L$ -кристаллин, 2 — УФ- $\beta_L$ -кристаллин, 3 — УФ- $\beta_L$ -кристаллин, инкубированный в течение суток с  $\alpha$ -кристаллином; *б* — молярная энтальпия денатурации нативного  $\beta_L$ -кристаллина (1), поврежденного ультрафиолетом  $\beta_L$ -кристаллина (2), поврежденного ультрафиолетом  $\beta_L$ -кристаллина, инкубированного в течение суток с  $\alpha$ -кристаллином (3); \*\* —  $P < 0.02$  — достоверность различия между нативным белком и УФ- $\beta_L$ -кристаллином и УФ- $\beta_L$ -кристаллином, инкубированным в течение суток с  $\alpha$ -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°C индуцирует агрегацию белка, тогда как добавление  $\alpha$ -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  $\alpha$ -кристаллин восстанавливает структуру белков, денатурированных детергентами за счет образования с ними комплекса [16–18]. Поэтому можно было бы ожидать, что денатурированные молекулы УФ $\beta$ <sub>L</sub>-кристаллина, образовавшие комплекс с  $\alpha$ -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 $\beta$ <sub>L</sub>-кристаллина, связанные с  $\alpha$ -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 $\beta$ <sub>L</sub>-кристаллина при инкубации с  $\alpha$ -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  $\beta$ <sub>L</sub>-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  $\beta$ <sub>L</sub>-кристаллина не отличается от энергии денатурации  $\beta$ <sub>L</sub>-кристаллина, инкубированного с  $\alpha$ -кристаллином в течение 24 ч. Иными словами, взаимодействие денатурированного под действием ультрафиолета  $\beta$ <sub>L</sub>-кристаллина с  $\alpha$ -кристаллином не приводит к восстановлению нативной структуры денатурированного белка.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для исследования шапероноподобных свойств  $\alpha$ -кристаллина широко используются модельные системы, основанные на взаимодействии денатурированных детергентами белков с  $\alpha$ -кристаллином *in vitro*. В таких системах  $\alpha$ -кристаллин проявляет свойства истинного шаперона и способствует восстановлению нативной структуры денатурированного белка. Такие свойства  $\alpha$ -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  $\beta$ <sub>L</sub>-кристаллина, поврежденного воздействием ультрафиолета, ренатурация денатурированного белка в присутствии  $\alpha$ -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. Delage 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.