

DOI: 10.7868/S004137711810020X

## ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО КРАУДИНГА НА СТРУКТУРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОТИМОЗИНА АЛЬФА

© Ю. А. Антифеева,<sup>1,\*</sup> О. И. Поварова,<sup>1</sup> Н. П. Родина,<sup>1</sup>  
**М. И. Сулацкий,<sup>1</sup> М. М. Карасев,<sup>2</sup> И. М. Кузнецова,<sup>1</sup>**  
**К. К. Туроверов<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

<sup>2</sup> Университет Хельсинки, Финляндия, FI-00014, и

<sup>3</sup> С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
 Санкт-Петербург, 19525;

\* электронный адрес: julgag@yandex.ru

Белки с внутренне неупорядоченными доменами благодаря поливалентности и высокой степени структурной пластиности способны конъюгировать с образованием фазового разделения жидкость—жидкость. Считается, что одним из ключевых факторов, необходимых для осуществления фазового разделения, является молекулярный краудинг. В настоящей работе мы изучили влияние макромолекулярного краудинга на структуру внутренне неупорядоченного белка протимозина альфа. Показали, что в растворе с низкими значениями pH присутствие краудинг-агентов приводит к увеличению содержания в белке  $\alpha$ -спиральной структуры, причем амплитуда эффекта определяется концентрацией и химической структурой краудинг-агента, но не зависит от его молекулярной массы. Присутствие полиэтиленгликоля в растворе способствует агрегации белка в области изоэлектрической точки. Полученные агрегаты неспецифически связывают флуоресцентный зонд ThT, но при этом являются аморфными.

**Ключевые слова:** внутренне неупорядоченные белки, немембранные органеллы, краудинг, протимозин альфа, тиофлавин Т

**Принятые сокращения:** КД — круговой дихроизм, ПТА — протимозин альфа, ПЭГ — полиэтиленгликоль, ДДТ — 4,4'-дихлордифенил-трихлорэтан, ИПТГ — изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид, ThT — тиофлавин Т.

В течение долгого времени считалось, что специфическая функциональность любого белка предопределяется его уникальной трехмерной структурой. В настоящее время уже известно, что 25–35 % белков протеома эукариот не имеют стабильной третичной и (или) вторичной структуры в нативном состоянии, а более 50 % белков содержат в своей структуре протяженные неупорядоченные участки (Oldfield et al., 2005). При этом, несмотря на отсутствие жесткой трехмерной структуры, такие белки в клетке выполняют ряд важных биологических функций. Например, благодаря своей поливалентности и высокой степени структурной пластиности белки, содержащие в своем составе неупорядоченные участки, являются основным компонентом немембранных органелл (Uversky et al., 2015). Немембранные органеллы представляют собой мультикомпонентные вязкие жидкые включения, которые образуются в клетке в результате спонтанного фазового разделения жидкость—жидкость (ядерные тельца, тельца Кахаля, стресс-гранулы и т. д.). Считается, что одним из ключевых факторов, необходимых для осущ-

ществления фазового разделения, является молекулярный краудинг.

Одним из наиболее характерных представителей класса внутренне неупорядоченных белков является протимозин альфа (ПТА), ядерный низкомолекулярный (12 кДа) белок, имеющий сильный отрицательный заряд в физиологических условиях ( $pI = 3.5$ ). В кариоплазме этот белок распределен неравномерно и колокализован с немембранными органеллами — ядерными тельцами промиелоцитной лейкемии и тельцами деления. Мы предполагаем, что благодаря своей неупорядоченной структуре ПТА обладает способностью образовывать жидкие включения, а конформационные переходы, проходящие в ответ на изменение окружающих условий, являются основополагающими событиями в этом процессе.

Цель настоящей работы — изучение влияния макромолекулярного краудинга на структуру внутренне неупорядоченного белка ПТА при различных значениях pH (1.5–10).

## Материал и методика

Условия молекулярного краудинга *in vitro* моделировали с помощью концентрированных растворов (80, 200 и 300 мг/мл) синтетических краудинг-агентов — полиэтиленгликоля (ПЭГ) с мол. массами 600, 4000 и 12 000 Да (ПЭГ 600, ПЭГ 4000 и ПЭГ 12000 соответственно) и декстрана с мол. массами 6 и 70 кДа (Декстран 6 и Декстран 70 соответственно).

Величину pH растворов контролировали с помощью pH-метра HI 9024 (HANNA Instruments, США), оснащенного электродом FC 200 для измерения pH вязких растворов.

Для изучения изменения вторичной структуры ПТА использовали метод спектроскопии кругового дихроизма (КД) в дальней УФ-области. Спектры КД регистрировали с помощью спектрополяриметра J-810 (Jasco, Япония). При построении спектра учитывали спектр КД растворителя. Значение эллиптичности  $\theta$  конвертировали в эллиптичность на один аминокислотный остаток ( $[\theta]$ ).

Флуоресценцию тиофлавина T (ThT) регистрировали с помощью спектрофлуориметра CaryEclipse (Varian, Австралия) со стационарным возбуждением. Измерение кривых затухания флуоресценции осуществляли с помощью спектрометра FluoTime 300 (Pico Quant, Германия). Флуоресценцию возбуждали с помощью Laser Diode Head LDH-C-440 (Pico Quant, Германия) (длины волн возбуждения и регистрации соответственно 440 и 490 нм). Структуру белковых агрегатов исследовали методом флуоресцентной конфокальной микроскопии с помощью микроскопа FV3000 (Olympus, Япония).

**Выделение и очистка ПТА.** Рекомбинантный ПТА получали с помощью бактерий *Escherichia coli* BL21 (DE3). Оказалось, что выход ПТА в клеточном лизате крайне низкий. Это могло быть обусловлено тем, что ПТА, во-первых, токсичен для бактерий, а во-вторых, из-за своей неупорядоченной структуры деградирует под действием бактериальных протеаз. Поэтому была разработана плазмида, кодирующая ПТА, сшитый с лидерной последовательностью PelB, адресующей содержащий ее белковый продукт в периплазму бактериальной клетки, что снижало концентрацию токсичного белка в цитоплазме и защищало его от действия протеаз.

Трансформированные этой плазмидой клетки высевали на чашку Петри с низкосолевой средой LB (10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl, 15 г/л агара, pH 7.5), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и инкубировали в течение ночи при 37 °C. Затем единичную колонию переносили в 8 мл свежей низкосолевой среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и культивировали в течение ночи при 37 °C с перемешиванием. Через 12 ч полученную культуру инокулировали в 200 мл среды TB (12 г/л триптона, 24 г/л дрожжевого экстракта, 4 % глицерина, 2.2 г/л K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 9.4 г/л K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Клетки культивировали при 37 °C при постоянном перемешивании (250 мин<sup>-1</sup>) до достижения оптической плотности (OD<sub>600</sub>) 0.8—1. Экспрессию индуцировали добавлением 0.02 мМ ИПТГ. Клетки культивировали в течение ночи при 37 °C и интенсивном перемешивании (250 мин<sup>-1</sup>). На этом этапе белок экспрессировался и направлялся в периплазму, где под действием сигнальной пептидазы лидерная последовательность удаляется. Во время экспрессии ПТА постепенно «перетекает» из периплазмы в культуральную среду, по-видимому, из-за изменения проницаемости внешней

мембранны клетки при интенсивном перемешивании бактериальной культуры, а также сильного отрицательного заряда белка. Наутро бактериальные клетки удаляли центрифугированием (2599 g, 30 мин). Затем к супернатанту добавляли 1 мМ ДДТ и инкубировали его на водяной бане (100 °C, 20 мин). Затем образец немедленно переносили на ледянную баню (-10 °C, 1 ч). Осадок удаляли центрифугированием (19 890 g, 1 ч). Далее очистку белка проводили согласно описанному методу (Yi et al., 2008). Чистоту препарата контролировали методом электрофореза в ПААГ. Выход белка составил 13.6 мг с 200 мл культуры.

**Использованные реагенты:** ПЭГ, декстран, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, глицерин, HCl, NaCl, NaOH, ампициллин, агар, ИПТГ (Sigma, США), KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, лимонная кислота (Реахим, Россия), глицин, триптон (AppliChem, США), дрожжевой экстракт, Tris-HCl (ICN Biomedicals, США), ДДТ (Fluka, США) и ThT (AnaSpec, США).

## Результаты и обсуждение

Изменения pH-индуцированных конформационных переходов ПТА в отсутствие и в присутствии краудинг-агентов регистрировали с использованием метода КД. Как и ожидалось, снижение pH раствора в отсутствие краудинг-агентов приводит к увеличению доли альфа-спиралей в структуре белка (рис. 1, *кривая 1*). Мы установили, что в кислых растворах присутствие краудинг агентов в растворе приводит к увеличению содержания в белке  $\alpha$ -спиральной структуры (рис. 1, *кривые 2—4*; вставка: *кривые 2, 3*). Наблюдаемый эффект определяется концентрацией краудинг-агента, но не зависит от его молекулярной массы. Это может быть обусловлено взаимным проникновением полимерных клубков друг в друга в изученном диапазоне концентраций полимера и, следовательно, уменьшением величины исключенного объема за счет изменения формы молекулы. Однако краудинг-агенты, с различной химической структурой (декст-

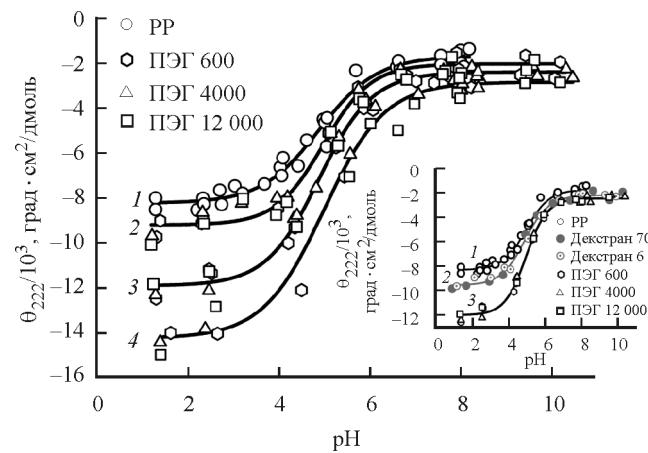


Рис. 1. Конформационные переходы ПТА в разбавленных буферных растворах (PP) и в условиях молекулярного краудинга.

Представлена зависимость эллиптичности на 1 аминокислотный остаток измеренная при длине волны 222 нм ( $\theta_{222}$ ), от pH раствора. Условия молекулярного краудинга моделировали с помощью растворов ПЭГ 600, ПЭГ 4000 и ПЭГ 12 000 (символы обозначены на графике) различной концентрации: 0 (кривая 1; вставка: кривая 1), 80 (кривая 2), 200 (кривая 3; вставка: кривая 3) и 300 (кривая 4) мг/мл, декстрана 70 и декстрина 6 в концентрации 200 мг/мл (вставка: кривая 2).

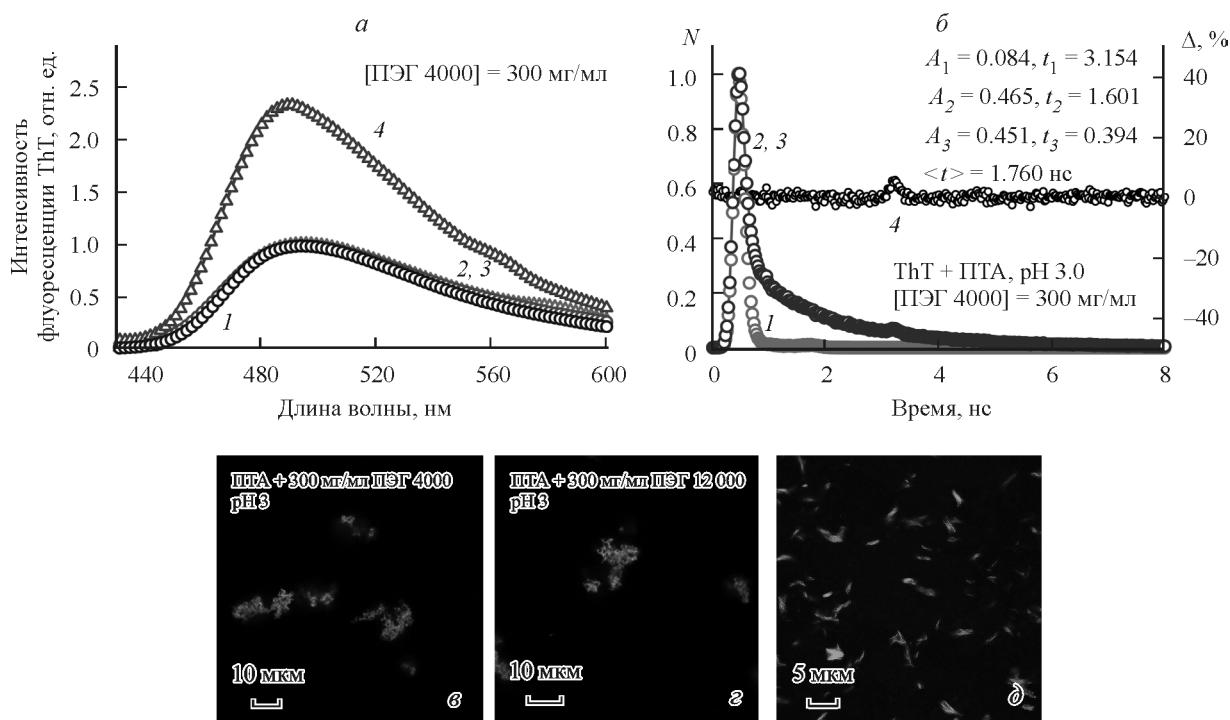


Рис. 2. Свойства ThT при его взаимодействии с агрегатами, образованными ПТА под действием ПЭГ в области изоэлектрической точки.

*а* — сравнение спектров флуоресценции ThT в различных условиях: кривая 1 — 300 мг/мл ПЭГ 4000, pH 3, кривая 2 — 300 мг/мл ПЭГ 4000, pH 1.7; кривая 3 — ПТА+300 мг/мл ПЭГ 4000, pH 1.7; кривая 4 — при его взаимодействии с агрегатами, образованными ПТА в присутствии 300 мг/мл ПЭГ 4000, pH 3 ( $\lambda_{\text{возб}} = 412 \text{ нм}$ ). *б* — затухание флуоресценции ThT, взаимодействующего с агрегатами ПТА ( $\lambda_{\text{возб}} = 440 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{пер}} = 490 \text{ нм}$ ). Профиль возбуждающего импульса — кривая 1, экспериментально зарегистрированная кривая затухания флуоресценции — кривая 2, аппроксимация экспериментальных данных трехэкспоненциальной кривой затухания — кривая 3 (параметры аппроксимации представлены на графике), отклонение между экспериментальными и рассчитанными кривыми затухания флуоресценции — кривая 4;  $N(t)$  — зависимость числа регистрируемых фотонов от времени ( $t$ ), нормализованная на 1 в максимуме. *в, г* — визуализация агрегатов ПТА, взаимодействующих с ThT, образующихся в различных условиях, конфокальная микроскопия. *д* — визуализация амилоидных фибрилл на основе инсулина, окрашенных с помощью ThT (Sulatskaya et al., 2018; публикуется с разрешения авторов), конфокальная микроскопия.

ран и ПЭГ) оказывают разное по величине влияние на вторичную структуру ПТА (рис. 1, вставка, кривые 2, 3) при одинаковом содержании полимера в растворе.

Интересно, что в отличие от декстрана наличие в растворе ПЭГ способствует преципитации белка в области изоэлектрической точки ( $pI = 3.5$ ) (рис. 2, в, г). Эффективность преципитации зависит от концентрации ПЭГ, что может быть связано с агрегацией незаряженного белка вследствие ограничения доступного объема. Этот факт в совокупности со слабым действием декстрана на ПТА может свидетельствовать либо о более сильном характере взаимодействия между декстраном и ПТА по сравнению с силой взаимодействия между ПЭГ и белком, либо различной степенью гигроскопичности этих двух полимеров.

Мы изучили свойства полученных агрегатов с помощью ThT, который образует интенсивно флуоресциру-

ющий комплекс с амилоидными фибрillами (Levine, 1999). Результаты, полученные методом конфокальной микроскопии (рис. 2, в—д), а также возрастание величины времени жизни флуоресценции ThT в присутствии агрегатов ПТА до величины, характерной для этого красителя в связанном с амилоидными фибрillами состоянии (рис. 2, б; см. таблицу) свидетельствуют о взаимодействии ThT с коацерватами. Однако интенсивность флуоресценции ThT в растворах, содержащих агрегаты ПТА, возрастает незначительно (в 2.5 раза) (рис. 2, а). Скорее всего, это связано с тем, что очень маленькая доля красителя оказывается в связанном с агрегатами состоянии ( $OD_{420} = 0.025$ ). Этот факт, а также существенное отличие формы агрегатов ПТА (рис. 2, в, г) от классических амилоидных фибрill (рис. 2, д) свидетельствуют об аморфном характере этих надмолекулярных образований и о неспецифическом характере связывания ThT с агрегатами.

#### Среднее время жизни флуоресценции ThT ( $\tau$ ) при связывании ThT с амилоидными фибрillами и агрегатами ПТА

Условия	$\tau$ , нс	Литературный источник
ThT + ПЭГ 4000 (300 мг/мл) + ПТА, pH 3	1.76	Настоящая работа
ThT + инсулиновые амилоидные фибрillы	1.77	Sulatskaya et al., 2018
ThT + ПЭГ 400 (400 мг/мл)	0.006	Rodina et al., 2017
ThT в водном растворе	0.001	То же

Таким образом, ограничение конформационной энтропии внутренне неупорядоченного белка ПТА, вызванное присутствием краудинг-агентов, не стимулирует образования фазового разделения жидкость—жидкость и амилоидных фибрилл, но в некоторых условиях способствует формированию аморфных агрегатов. По всей видимости, взаимодействие белковых цепей друг с другом существенно превосходит взаимодействие между полипептидной цепью и растворителем в этих условиях, что приводит к преципитации белка. Мы полагаем, что получение жидких включений ПТА в условиях молекулярного краудинга будет возможно при изменении соотношения интенсивностей между двумя типами взаимодействий (белок—белок и белок—растворитель) за счет модуляции таких параметров, как температура, ионная сила, вязкость и полярность растворителя, заряд целевого белка и т. д.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 16-04-01614 и 18-34-00975).

## Список литературы

- LeVine H., 3rd. 1999. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Meth. Enzymol.* 309 : 274—284.
- Oldfield C. J., Cheng Y., Cortese M. S., Brown C. J., Uversky V. N., Dunker A. K. 2005. Comparing and combining predictors of mostly disordered proteins. *Biochem.* 44 : 1989—2000.
- Rodina N. P., Sulatsky M. I., Sulatskaya A. I., Kuznetsova I. M., Uversky V. N., Turoverov K. K. 2017. Photophysical properties of fluorescent probe thioflavin T in crowded milieu. *J. Spectr. Article ID 2365746:* 1—10. Doi: 10.1155/2017/2365746.
- Sulatskaya A. I., Sulatsky M. I., Povarova O. I., Rodina N. P., Kuznetsova I. M., Lugovskii A. A., Voropay E. S., Lavysh A. V., Maskevich A. A., Turoverov K. K. 2018. Trans-2-[4-(dimethylamino) styryl]-3-ethyl-1, 3-benzothiazolium perchlorate-New fluorescent dye for testing of amyloid fibrils and study of their structure. *Dyes Pigments.* 157 : 385—395.
- Uversky V. N., Kuznetsov I. M., Turoverov K. K., Zaslavsky B. 2015. Intrinsically disordered proteins as crucial constituents of cellular aqueous two phase systems and coacervates. *FEBS Lett.* 589 : 15—22.
- Yu S., Brickenden A., Choy W.-Y. 2008. A new protocol for high-yield purification of recombinant human prothymosin  $\alpha$  expressed in *Escherichia coli* for NMR studies. *Protein Express. Purif.* 57 : 1—8.

Поступила 17 VII 2018

## EFFECT OF MOLECULAR CROWDING ON PROTHYMOSEN ALFA STRUCTURE

Yu. A. Antifeeva,<sup>1,\*</sup> O. I. Povarova,<sup>1</sup> N. P. Rodina,<sup>1</sup> M. I. Sulatsky,<sup>1</sup> M. M. Karasev,<sup>2</sup>  
I. M. Kuznetsova,<sup>1</sup> K. K. Turoverov<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

<sup>2</sup> University of Helsinki, Finland, 00014, and

<sup>3</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251;

\* e-mail: julgag@yandex.ru

Due to polyvalence and a high level of conformational entropy, proteins containing intrinsically disordered domains are able to conjugate forming liquid—liquid phase separation. It is believed that molecular crowding is a crucial factor for phase separation occurrence. The effect of macromolecular crowding on the structure of a model intrinsically disordered protein prothymosin alpha was studied. It was found that the presence of crowding agents leads to an increase in the amount of  $\alpha$ -helices in the protein in the acidic environment. The amplitude of the effect is strongly dependent on the concentration and chemical structure of the crowding agents, but is indifferent to its molecular weight and hydrodynamic radius. The presence of polyethylene glycols in the solution promotes protein aggregation in the region of pI. These aggregates are able to bind the fluorescent probe ThT, but have an amorphous structure.

**Key words:** intrinsically disordered proteins, membrane-less organelles, crowding, prothymosin alpha, thioflavin T