

СТРУКТУРОНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ α -КРИСТАЛЛИНАСеливанова О.М., Глякина А.В., Суворина М.Ю., Никулин А.Д., Сурин А.К.,
Галзитская О.В.

ФГБУН Институт белка РАН

Проспект науки, 4, г. Пущино, Московская область, 142290, РФ;

e-mail: seliv@vega.protres.ru; ogalzit@vega.protres.ru

Поступила в редакцию: 04.07.2018.

Аннотация. α -Кристаллин является основным белком хрусталика глаза позвоночных. Под α -кристаллином понимается смесь гомологичных αA - и αB - кристаллинов, которые формируют большие гетерогенные комплексы и отвечают за прозрачность хрусталика глаза. Установлено, что α -кристаллин принадлежит к семейству малых белков теплового шока (sHsp) и выполняет шапероно-подобную функцию, предотвращая денатурацию и агрегацию белков. 3D структура нативного α -кристаллина не установлена. В данной работе мы исследовали с помощью метода электронной микроскопии (ЭМ) структуру α -кристаллина из хрусталика глаза быка. Наши экспериментальные данные привели к выводу, что получить достоверную структуру α -кристаллинового комплекса невозможно. Анализ литературы по изучению α -кристаллина привел нас к заключению, что в нативных *in vivo* условиях структура и функционирование α -кристаллина может отличаться от его поведения в условиях *in vitro*. В связи с этим высказывается ряд предположений относительно функционирования α -кристаллина в виде небольших его агрегатов (например, димеров) и роли αA -кристаллина в качестве специализированного шаперона хрусталика глаза (шаперона для αB -кристаллина).

Ключевые слова: α -кристаллин, малые белки теплового шока, электронная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

α -Кристаллин является основным структурным белком хрусталика глаза позвоночных. Он составляет около 40 % хрусталика глаза и вместе с другими кристаллинами (β - и γ -) около 90 % всех белков волокнистых клеток хрусталика [1-6]. Концентрация α -кристаллина в хрусталике глаза чрезвычайно велика и может колебаться от 450 мг/мл у человека до 1100 мг/мл у рыб [1-7]. Такая концентрация α -кристаллина способствует созданию необходимого рефрактивного индекса хрусталика глаза ($n=1,4$ у человека) и именно α -кристаллин отвечает за его прозрачность (8). α -Кристаллин сформирован из αA - и αB - кристаллинов, идентичность между которыми у млекопитающих около 35 %, хотя ранее ее определяли, как 57 % [9-11]. αA - αB -Кристаллины состоят из 173 и 175 аминокислотных остатков (а.о.) и имеют молекулярную массу 19,8 и 20,0 кДа, соответственно [8, 12] (из статьи). αA - и αB -Кристаллины у человека экспрессируются в разных хромосомах, соответственно в 21 и 11 [13, 14]. При этом αA -кристаллин экспрессируется в основном в хрусталике глаза, а αB -кристаллин и в других тканях: мозге, сердце, мускулатуре [15]. αB -Кристаллин связывают с различными патологиями организма, в том числе с нейродегенеративными заболеваниями [16, 17]. *In vitro* αB -кристаллин предотвращает стресс-индуцированную агрегацию различных частично развернутых белков [18, 19]. Перечень процессов с участием αB -кристаллина продолжает расти, что подчеркивает его важность в нормальном клеточном метаболизме белков. αA - и αB -изоформы α -кристаллина формируют сильно гетерогенные олигомерные комплексы, при этом в хрусталике глаза позвоночных молярное соотношение $\alpha A/\alpha B$ -кристаллинов в основном составляет 3:1 [20].

Показано, что α -кристаллин относится к семейству малых белков теплового шока (sHsp) [18]. Такие белки активно экспрессируются в организме в ответ на различные стрессовые воздействия (изменение температуры, pH) и предотвращают белковую денатурацию, которая может приводить к нежелательной агрегации белков. Показано, что шаперонной активностью обладают обе изоформы α -кристаллина. Шаперонная функция α -кристаллина предотвращает агрегацию белков в хрусталике глаза и соответственно препятствует развитию катаракты. В структурном отношении как и все белки sHsp семейства αA - и αB -кристаллины состоят из трех доменов: (а) достаточно консервативного N-концевого домена длиной около 60 а.о. [11]; (б) структурно консервативного центрального домена (ACD) длиной около 90 а.о. и (в) средне консервативного C-концевого домена длиной около 25 а.о. [21]. Согласно литературным данным все три домена вовлекаются в субстратное узнавание и принимают участие в нормальном шаперонном функционировании [22].

Гетероолигомерная смесь двух изоформ α -кристаллина не может быть разделена в нативных условиях, однако показано, что обе изоформы способны формировать αA - и αB -кристаллиновые гомоолигомерные комплексы [23]. Сильная гетерогенность олигомерных комплексов α -кристаллина является препятствием для его кристаллизации и привлечения метода рентгенно-структурного анализа для структурных исследований.

Кристаллическая структура была определена только для одного представителя семейства sHsp белков из *Methanococcus jannashii* [24]. Данный белок формирует гомогенный 24 субъединичный олигомер октаэдральной симметрии с внутренней полостью внутри. Данный олигомер был, видимо, взят за основу при многочисленных попытках получения модели гетероолигомерного α -кристаллинового комплекса и гомоолигомерных αA - и αB -кристаллиновых комплексов. Используя данные крио-электронной микроскопии (крио-ЭМ) установлено, что

наиболее гомогенным является α В-кристаллиновый комплекс. Согласно данным крио-ЭМ исследований предложена 3D модель α В-кристаллинового комплекса с разрешением около 29 Å (при средней заложенной молекулярной массе около 650 кДа). Олигомер представляет округлую частицу из 32 мономеров и имеет полость внутри [25, 26]. Для α -кристаллина из хрусталика глаза быка получена модель с разрешением около 44 Å. Данный комплекс в отличие от α В-кристаллинового комплекса не имеет выраженной полости внутри [26]. Исследования структуры рекомбинантных α А- и α В-кристаллиновых комплексов и сравнение их с аутентичным α -кристаллином из хрусталика глаза быка (α L-кристаллин) были продолжены в ряде работ с привлечением методов гель-фильтрации, аналитического центрифугирования и трансмиссионной электронной микроскопии (негативное контрастирование) (ссылки). Согласно полученным данным самым гомогенным является α В-кристаллиновый комплекс (средний коэффициент седиментации около 16,5 S), а самым гетерогенным - α L-кристаллин (20S и более) [23]. Анализ ЭМ изображений рекомбинантного α В-кристаллинового комплекса позволил предложить трехмерную модель с разрешением около 20 Å. Комплекс представляет собой округлую частицу около 13,5 нм в диаметре и имеет полость внутри. Основным строительным блоком является гексамер, построенный из 6 мономеров, четыре таких гексамера формируют 24 субъединичный α В-олигомерный кристаллиновый комплекс с полостью внутри. Данная модель была уточнена в работах [27-29] и показано, что дополнительным строительным блоком может быть димер [27, 29]. В работе [29] проведен анализ различных олигомерных образцов и показано, что они могут содержать от 12 до 48 олигомеров. При этом основным и дополнительным блоками остаются, соответственно, гексамер и димер. В это же работе была предпринята попытка связать структуру и функциональные свойства α В-кристаллинового комплекса. Известно, что sHps не являются АТФ-зависимыми шаперонами и их шаперонная активность регулируется различными путями. Для многих sHps белков фосфорилирование играет принципиальную роль [30]. В этой связи интересны исследования изменения структуры α В-кристаллинового комплекса при его фосфорилировании [29]. Показано, что дестабилизация межсубъединичных взаимодействий за счет фосфорилирования приводит к диссоциации олигомерных комплексов с образованием более мелких, преимущественно, 12- и 6- мерных ассоциатов [29]. Кроме того показано, что такая диссоциация α В-кристаллинового комплекса приводит к повышению шаперонной активности.

Следует отметить, что за последние 10 лет появилось большое количество обзоров по исследованию структурных и функциональных особенностей α -кристаллина [8, 10, 22]. Однако до сих пор нет четкого понимания связи между структурой и функцией α -кристаллина. Напротив, ставится ряд вопросов, стимулирующих дальнейшие исследования в связи чрезвычайно высокой значимостью хрусталика в жизнедеятельности организма. Эта значимость и в то же время загадочность всего процесса функционирования происходит из того, что все существующие до настоящего времени исследования проведены в условиях *in vitro* и все чаще ставится вопрос – так ли все в условиях *in vivo*?

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поскольку структурно-функциональные исследования α -кристаллина остаются актуальными мы предприняли попытку получить структурную модель аутентичного α -кристаллина из хрусталика глаза быка (α L-кристаллина). Аутентичный α -кристаллин был выделен и очищен согласно [31] с модификациями. Данный препарат сравнили с препаратом от фирмы Sigma. По данным SDS электрофореза и ЭМ анализа оба препарата идентичны (рис. 1).

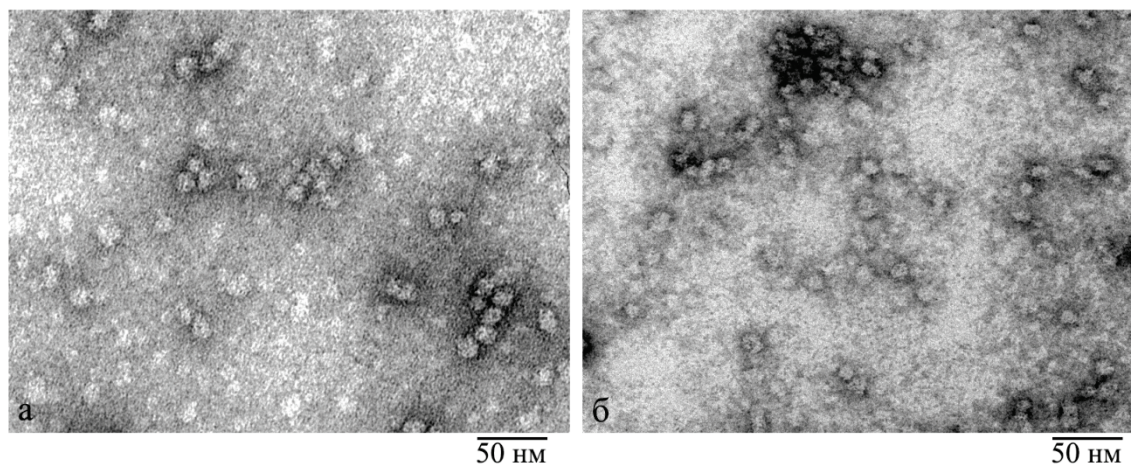


Рисунок 1. Сравнение α -кристаллиновых комплексов: (а) препарат выделен согласно [31]; (б) препарат от фирмы Sigma. На ЭМ изображениях видно, что оба препарата содержат идентичные олигомерные частицы

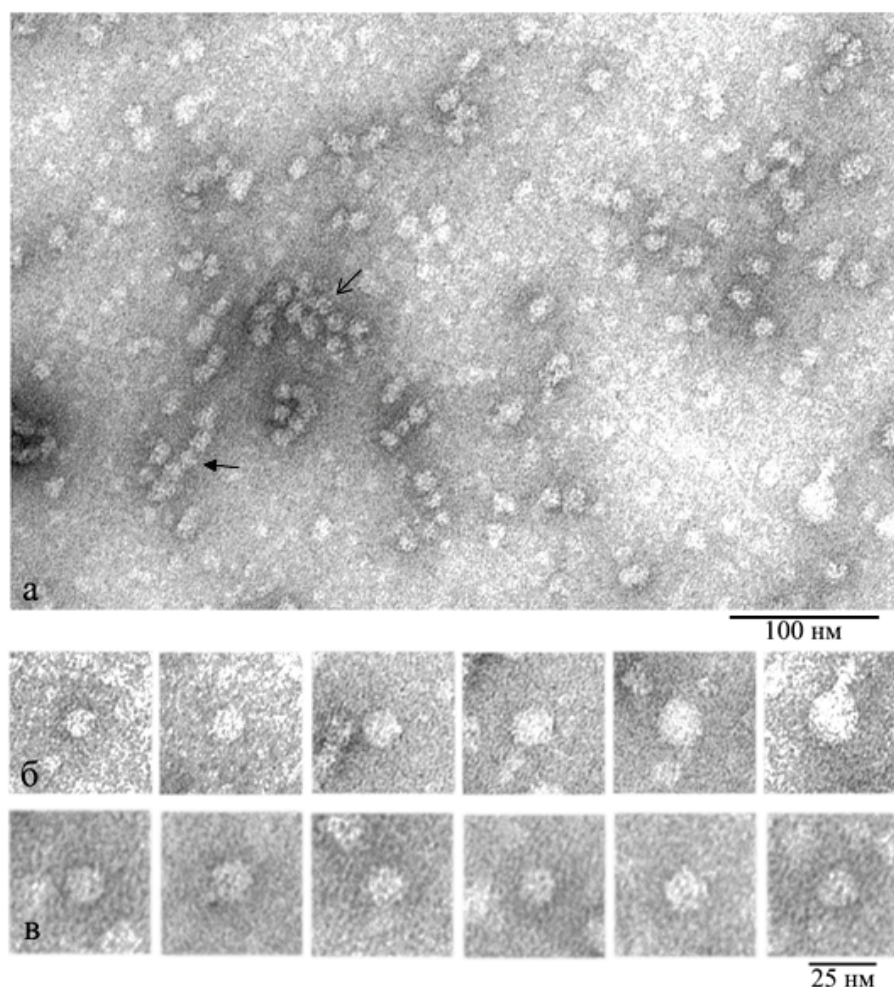


Рисунок 2. Электронно-микроскопический анализ препарата α -кристаллина из кортекса (20 mM TrisHCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM ЭДТА, 37°C): (а) – Поле препарата; (б) – олигомеры α -кристаллина разного размера; (в) – олигомеры α -кристаллина диаметром 13,5 нм. Данные частицы представляют наибольшую популяцию и были отобраны для 3D реконструкции. Открытая стрелка показывает олигомерные агрегаты. Закрытая стрелка – стопку олигомеров из 5 частиц

В дальнейших исследованиях мы использовали препарат α -кристаллина, выделенный согласно [31] и любезно предоставленный К.О. Мурановым (Институт биохимической физики РАН им. Н.М. Эмануэля, Москва). Согласно ЭМ исследованиям α -кристаллин представляет собой округлые олигомерные частицы диаметром 12-25 нм (рис. 2). Частицы разного размера представлены на рисунке 2б. Однако наиболее представленной является популяция частиц с диаметром около 13-14 нм (рис. 2в). Можно заметить, что на поле препарата (рис. 2а) в агрегатах частицы имеют меньшие размеры, их диаметр около 11 нм, что отражает эффект негативного контрастирования уранилацетатом. Уранилацетат не может окружить полностью частицы, и их размеры выявляются не полностью (открытая стрелка). На поле также заметны частицы, взаимодействующие друг с другом с образованием вытянутых частиц (закрытая стрелка). Кроме того, на поле наблюдаются и более мелкие частицы, которые слабо окрашиваются и при построении модели их не учитывали.

В таблице 1 представлены наиболее часто встречающиеся популяции частиц (частицы выбраны с одной ЭМ пленки). Из 1143 частиц более 50 % частиц имеет размеры около 12-14 нм. Именно такие частицы (рис. 2в) были взяты для построения 3D модели. Моделирование проводилось из обработки индивидуальных частиц с размерами около 13,5 нм и с учетом средней молекулярной массы около 650-750 кДа.

Таблица 1. Распределение α -кристаллиновых олигомерных комплексов по размерам

Диаметр (нм)	Количество частиц	%
12-14	605	53
15-19	309	27
20-25	229	20

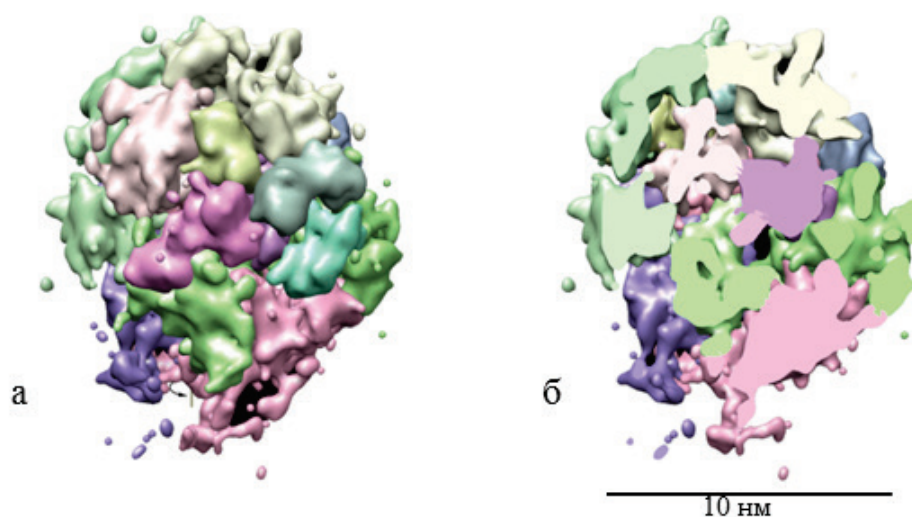


Рисунок 3. 3D реконструкция нативного α -кристаллинового комплекса из хрусталика глаза быка. Разрешение около 20 Å при FSC=0,5 и Eo-test критерии (Рязанцев С.Н., California NanoSystems Institute at University of California, Los Angeles, USA). При реконструкции использовали молекулярную массу 650 кДа. (а) – Общий вид модели; (б) – срез модели (сверху вниз, средняя часть). Заметно, что отсутствует выраженная полость внутри. При увеличении молекулярной массы комплекса плотность частицы повышается

Представленная модель имеет округлые очертания и слегка пониженную плотность внутри частицы (данные 3D реконструкции любезно предоставлены Рязанцевым С.Н.). Следует отметить, что для α -кристаллинового комплекса в литературе даются молекулярные массы от 300 до 1200 кДа [10, 25]. Такой же разброс встречается и для коэффициентов седиментации от 15S до 45S [23]. Однако большая часть популяции имеет коэффициент седиментации около 22 S. Мы для определения молекулярной массы α -кристаллинового комплекса воспользовались зависимостью логарифма коэффициента седиментации к логарифму молекулярной массы для глобулярных белков и белковых комплексов и получили для α -кристаллинового комплекса с коэффициентом седиментации 20-22 S молекулярную массу около 740 кДа, что совпадает с экспериментально полученной средней молекулярной массой пиковой фракции α -кристаллинового комплекса [10, 32]. 3D модель на рисунке 3, представляет частицы с молекулярной массой около 650 кДа и диаметром около 13,5 нм (разрешение около 20 Å). Согласно данной модели α -кристаллиновый комплекс имеет округлую слегка эллипсоидную форму и не имеет полости внутри, что совпадает с ранее полученной 3 D моделью (крио-ЭМ) с разрешением около 44 Å [26]. Попытки получить модели от частиц с большей молекулярной массой (700 и 750 кДа) дали сходные результаты: частицы получаются округлой слегка бобовидной формы и не имеют полости внутри. Можно лишь отметить, что повышается их плотность. Отсюда мы можем сделать заключение, что получить достоверную модель гетерогенного α -кристаллинового комплекса не представляется возможным.

ОБСУЖДЕНИЕ

α -Кристаллин представляет собой высокогетерогенные комплексы с молекулярной массой 300-1200 кДа [10, 33]. При этом в большинстве работ дается средняя молекулярная масса около 700 кДа [10, 36]. Такое сильное различие в молекулярной массе определяется многими параметрами, включая температуру, концентрацию, ионную силу, метод выделения, возраст хрусталика, источник выделения [10]. Зная молекулярную массу мономера α -кристаллина, олигомерные комплексы могут содержать от 15 до 50 молекул белка, а частицы с молекулярной массой около 700 кДа до 35 мономеров. Отсюда в разных исследовательских группах при использовании сходных методов выделения и очистки белка (ионно-обменная хроматография, аналитическое центрифугирование, малоугловое рентгеновское рассеяние, динамическое рассеяние света и др.) получают для пиковых фракций различающиеся значения молекулярных масс и коэффициентов седиментации [10, 20, 23, 32-34]. При этом как правило для α -кристаллинового комплекса при средней молекулярной массе около 700 кДа определено соотношение α A- и α B-кристаллинов, как 3:1 [38]. Правильное значение молекулярной массы необходимо для получения достоверной 3D модели α -кристаллинового комплекса. Это важно для определения связи между структурой и функцией комплекса. В связи с сильной гетерогенностью α -кристаллинового комплекса и невозможностью его кристаллизации на первый план выходит крио-ЭМ и ЭМ с последующей компьютерной обработкой отдельных изображений, необходимой для получения 3D модели [23, 25-28, 35]. Ранее наиболее достоверную 3D модель удалось получить для наиболее гомогенных негативно контрастированных индивидуальных частиц α B-кристаллинового комплекса [23]. Однако, наши попытки получения 3D модели негативно контрастированных частиц α -кристаллинового комплекса из хрусталика глаза быка показывает, что при сильной гетерогенности по молекулярной массе, коэффициенту седиментации и параметрам частиц получить достоверную модель невозможно. Это наводит на мысль, что в условиях *in vivo* α -кристаллин может не

образовывать олигомерные комплексы больших размеров. Косвенно на это указывает то, что α B-кристаллин, экспрессирующийся в различных тканях организма, не формирует там олигомерные комплексы [22]. В обзоре [22] высказывается предположение, что при фосфорилировании не только α B-, но и α A- и α -кристаллиновых комплексов происходит их диссоциация на более мелкие компоненты (до димеров) и при этом повышается их шаперонная активность [35]. Однако до конца данный процесс не изучен. Тем не менее, существует пример усиления шаперонной активности для sHsp16,3 из *Mycobacterium tuberculosis*. При повышении температуры происходит диссоциация комплекса и значительное повышение шаперонной активности [36]. Возникает предположение, что диссоциация комплексов является необходимым условием повышения шаперонной активности. Т.е., изменение температуры, как возможно и других стресс факторов, может быть спусковым механизмом для проявления шаперонной активности. Это наводит на мысль, что существование ряда шаперонов в виде больших олигомерных комплексов есть эволюционное приобретение организмов для сохранности белков шаперонов в неактивной форме до стрессовых воздействий на организм.

Относительно шаперонной активности α B-кристаллина показано, что он экспрессируется во многих тканях организма и предотвращает агрегацию большого спектра белков не только в хрусталике глаза [10, 22]. В то же время α A-кристаллин обнаруживается в основном в хрусталике глаза и, видимо, является именно специализированным хрусталиковым шапероном. При нокауте по α A-кристалиновому гену у мышей развивалась катаракта, которая начиналась в ядре хрусталика и с возрастом распространялась к его периферийной кортикальной части. Кроме того, наблюдалось формирование телец включения с агрегатами α B- и γ -кристаллина [10, 37]. Т.е., α A-кристаллин необходим для сохранения прозрачности глаза и предотвращении агрегации α B-кристаллина. В то же время нокаут по α B-кристалиновому гену показал, что α B-кристаллин не является необходимым для поддержания прозрачности хрусталика на ранних этапах жизни, но при этом резко снижает ее продолжительность и проследить дальнейшее влияние на организм данной мутации не удастся [10]. Возникает предположение, что α A-кристаллин является специализированным шапероном хрусталика глаза и скорее всего является шапероном для α B- и γ -кристаллинов. Об этом косвенно свидетельствует еще ряд данных. Гены α A- и α B-кристаллинов локализованы в разных хромосомах и экспрессируются в разное время. Отмечается, что в возрастных хрусталиках происходит изменение соотношения α A- и α B-изоформ кристаллина от оптимального для млекопитающих 3:1 до 3:2, т.е. происходит уменьшение α A-кристалиновой изоформы [38].

Хрусталик глаза обладает уникальными свойствами. Ядро хрусталика закладывается в эмбриональный период развития организма и сохраняется всю жизнь. Новые волокнистые клетки формируются на периферии ядерной области и слой за слоем увеличивают размер хрусталика. Интересной особенностью является то, что со временем в ядерных клетках хрусталика исчезают светорассеивающие органеллы - ядра, митохондрии, рибосомы, протеосомы. В связи с этим нарушается нормальный метаболизм как в центральных клетках хрусталика, так прекращается полноценная связь с периферической его частью [8, 10]. Кроме того, с возрастом происходят различные пост-трансляционные модификации белков хрусталика, что приводит к их денатурации и агрегации, следствием чего является развитие катаракты с центральной части хрусталика и распространение ее к периферии хрусталика.

За последние 40 лет проведено большое количество структурно-функциональных исследований α -кристаллина, основного белка, отвечающего за прозрачность хрусталика глаза. Однако, все более остро встает главный вопрос соотношении его структуры и функции в условиях *in vivo* и *in vitro*. Существуют ли α -кристалиновые комплексы в условиях *in vivo*? Аномально высокая концентрация α -кристаллина в хрусталике глаза заставляет задуматься, сможет ли весь α -кристаллин при концентрации 450-500 мг/мл в виде олигомерных комплексов с молекулярной массой около 700-750 кДа и размером около 14 нм поместиться в единицу объема волокнистой клетки? Наши подсчеты показали, что в случае существования α -кристаллина в виде больших комплексов для других компонентов клетки не останется места. В случае мономерного состояния α -кристаллина или небольших его агрегатов в условиях *in vivo* остается достаточно места для других компонентов и белков волокнистых клеток. То, что при этом сохраняются шаперонные свойства α -кристаллина, свидетельствует в пользу отсутствия крупных олигомеров α -кристаллина в нативных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных и наши экспериментальные данные позволяют нам высказать ряд предположений: (1) Формирование гетерогенных комплексов α -кристаллина является эволюционным приобретением, необходимым для предотвращения кристаллизации α -кристаллина при аномально высокой его концентрации в хрусталике глаза; (2) В связи с сильной гетерогенностью α -кристалиновых комплексов невозможно получить достоверную 3D модель α -кристаллина; (3) Олигомерное состояние α -кристаллинов можно отнести к неактивному их состоянию, поскольку при диссоциации α -кристалиновых комплексов происходит усиление их шаперонной активности. Данная форма существования шаперонов в неактивной форме в виде комплексов, видимо, так же может быть отнесена к эволюционным приобретениям и предотвращает активное расходование белка шаперона во время отсутствия стрессовых воздействий на организм; (4) α A-кристаллин является специфическим хрусталиковым шапероном. При этом скорее всего его основным субстратным белком является α B-кристаллин; (5) В условиях *in vivo* поведение α -кристаллина и его структурное состояние может существенно отличаться от условий *in vitro*, что прежде всего связано с его высокой концентрацией (crowding

effect). Как показали наши подсчеты, только если α -кристаллин в хрусталике глаза будет находиться в мономерной форме или в виде небольших агрегатов, возможно поместить в нее остальные компоненты клетки.

Таким образом на первый план выходит задача тщательного анализа полученных в условиях *in vitro* данных по изучению структурно-функциональных особенностей α -кристаллина и разработки методов исследования α -кристаллина при высоких концентрациях, близких к условиям *in vivo*.

Работа поддержана Российским Научным Фондом грант № 18-14-00321. ЭМ исследования были проведены на базе оборудования ЦКП (№507648).

Список литературы / References:

1. Benedek G. Why the eye lens is transparent. *Nature*, 1983, vol. 302, pp. 383-384.
2. Delaye M., Tardieu A. Short-range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. *Nature*, 1983, vol. 302, pp. 415-417.
3. Philipson B. Distribution of protein within lenses with x-ray cataract. *Invest. Ophthalmol.*, 1969, vol. 8, pp. 271-280.
4. Pierscionek B.K., Augusteyn R.C. The refractive index and protein distribution in the blue eye trevally lens. *J. Am. Optom. Assoc.*, 1995, vol. 66, pp. 739-743.
5. Pierscionek B.K., Chan D.Y. Refractive index gradient of human lenses. *Optom. Vis. Sci. Off. Publ. Am. Acad. Optom.*, 1989, vol. 66, pp. 822-829.
6. V  r  tout F., Delaye M., Tardieu A. Molecular basis of eye lens transparency. Osmotic pressure and X-ray analysis of alpha-crystallin solutions. *J. Mol. Biol.*, 1989, vol. 205, pp. 713-728.
7. Fagerholm P.P., Philipson B.T., Lindström B. Normal human lens – the distribution of protein. *Exp. Eye Res.*, 1981, vol. 33, pp. 615-620.
8. Bloemendal H., de Jong W., Jaenicke R., Lubsen N.H., Slingsby C., Tardieu A. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2004, vol. 86, pp. 407-485.
9. de Jong W.W., Caspers G.J., Leunissen J.A. Genealogy of the alpha-crystallin-small heat-shock protein superfamily. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1998, vol. 22, pp. 151-162.
10. Horwitz J. Alpha-crystallin. *Exp. Eye Res.*, 2003, vol. 76, pp. 145-153.
11. Shiliaev N.G., Selivanova O.M., Galzitskaya O.V. Search for conserved amino acid residues of the α -crystallin proteins of vertebrates. *J. Bioinform. Comput. Biol.*, 2016, vol. 14, p. 1641004.
12. Bloemendal H. The vertebrate eye lens. *Science*, 1977, vol. 197, pp. 127-138.
13. Quax-Jeuken Y., Quax W., van Rens G., Khan P.M., Bloemendal H. Complete structure of the alpha B-crystallin gene: conservation of the exon-intron distribution in the two nonlinked alpha-crystallin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, vol. 82, pp. 5819-5823.
14. Ngo J.T., Klisak I., Dubin R.A., Piatigorsky J., Mohandas T., Sparkes R.S., Bateman J.B. Assignment of the alpha B-crystallin gene to human chromosome 11. *Genomics*, 1989, vol. 5, pp. 665-669.
15. Srinivasan A.N., Nagineni C.N., Bhat S.P. Alpha A-crystallin is expressed in non-ocular tissues. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, pp. 23337-23341.
16. Renkawek K., de Jong W.W., Merck K.B., Frenken C.W., van Workum F.P., Bosman G.J. Alpha B-crystallin is present in reactive glia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1992, vol. 83, pp. 324-327.
17. Renkawek K., Voorter C.E., Bosman G.J., van Workum F.P., de Jong W.W. Expression of alpha B-crystallin in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1994, vol. 87, pp. 155-160.
18. Horwitz J. Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, vol. 89, pp. 10449-10453.
19. Horwitz J., Huang Q.L., Ding L., Bova M.P. Lens alpha-crystallin: chaperone-like properties. *Methods Enzymol.*, 1998, vol. 290, pp. 365-383.
20. Siezen R.J., Berger H. The quaternary structure of bovine alpha-crystallin. Size and shape studies by sedimentation, small-angle X-ray scattering and quasi-elastic light scattering. *Eur. J. Biochem.*, 1978, vol. 91, pp. 397-405.
21. de Jong W.W., Caspers G.J., Leunissen J.A. Genealogy of the alpha-crystallin-small heat-shock protein superfamily. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1998, vol. 22, pp. 151-162.
22. Haslbeck M., Peschek J., Buchner J., Weinkauff S. Structure and function of α -crystallins: Traversing from in vitro to in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, vol. 1860, pp. 149-166.
23. Peschek J., Braun N., Franzmann T.M., Georgalis Y., Haslbeck M., Weinkauff S., Buchner J. The eye lens chaperone alpha-crystallin forms defined globular assemblies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009, vol. 106, pp. 13272-13277.
24. Kim K.K., Kim R., Kim S.H. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*, 1998, vol. 394, pp. 595-599.
25. Haley D.A., Horwitz J., Stewart P.L. The small heat-shock protein, alphaB-crystallin, has a variable quaternary structure. *J. Mol. Biol.*, 1998, vol. 277, pp. 27-35.
26. Haley D.A., Bova M.P., Huang Q.L., Mchaourab H.S., Stewart P.L. Small heat-shock protein structures reveal a continuum from symmetric to variable assemblies. *J. Mol. Biol.*, 2000, vol. 298, pp. 261-272.

27. Jehle S., Vollmar B.S., Bardiaux B., Dove K.K., Rajagopal P., Gonen T., Oschkinat H., Klevit R.E. N-terminal domain of alphaB-crystallin provides a conformational switch for multimerization and structural heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, vol. 108, pp. 6409-6414.
28. Braun N., Zacharias M., Peschek J., Kastenmüller A., Zou J., Hanzlik M., Haslbeck M., Rappsilber J., Buchner J., Weinkauff S. Multiple molecular architectures of the eye lens chaperone α B-crystallin elucidated by a triple hybrid approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, vol. 108, pp. 20491-20496.
29. Peschek J., Braun N., Rohrberg J., Back K.C., Kriehuber T., Kastenmüller A., Weinkauff S., Buchner J. Regulated structural transitions unleash the chaperone activity of α B-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013, vol. 110, E3780-E3789.
30. Kampinga H.H., Garrido C. HSPBs: small proteins with big implications in human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2012, vol. 44, pp. 1706-1710.
31. Chiou S.H., Azari P., Himmel M.E., Squire P.G. Isolation and physical characterization of bovine lens crystallins. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1979, vol. 13, pp. 409-417.
32. Spector A., Li L.K., Augusteyn R.C., Schneider A., Freund T. α -Crystallin. The isolation and characterization of distinct macromolecular fractions. *Biochem. J.*, 1971, vol. 124, pp. 337-343.
33. Siezen R.J., Bindels J.G., Hoenders H.J. The quaternary structure of bovine alpha-crystallin. Size and charge microheterogeneity: more than 1000 different hybrids? *Eur. J. Biochem.*, 1978, vol. 91, pp. 387-396.
34. Bloemendal H., Berns T., Zweers A., Hoenders H., Benedetti E.L. The state of aggregation of α -crystallin detected after large-scale preparation by zonal centrifugation. *Eur. J. Biochem.*, 1972, vol. 24, pp. 401-406.
35. Peschek J., Braun N., Rohrberg J., Back K.C., Kriehuber T., Kastenmüller A., Weinkauff S., Buchner J. Regulated structural transitions unleash the chaperone activity of α B-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2013, vol. 110, pp. E3780-3789.
36. Gu L., Abulimiti A., Li W., Chang Z. Monodisperse Hsp16.3 Nonamer Exhibits Dynamic Dissociation and Reassociation, with the Nonamer Dissociation Prerequisite for Chaperone-like Activity. *J. Mol. Biol.*, vol. 319, pp. 517-526.
37. Brady J.P., Garland D., Douglas-Tabor Y., Robison W.G., Jr. Groome A., Wawrousek E.F. Targeted disruption of the mouse alpha A-crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, vol. 94, pp. 884-889.
38. Ma Z., Hanson S.R.A., Lampi K.J., David L.L., Smith D.L., Smith J.B. Age-Related Changes in Human Lens Crystallins Identified by HPLC and Mass Spectrometry. *Exp. Eye Res.*, 1998, vol. 67, pp. 21-30.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PECULIARITIES OF α -CRYSTALLIN

Selivanova O.M., Glyakina A.V., Suvorina M.Yu., Nikulin A.D., Surin A.K., Galzitskaya O.V.

Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences

Pushchino, 142290, Moscow Region, Russia; e-mail: seliv@vega.protres.ru; ogalzit@vega.protres.ru

Abstract. α -Crystallin is the basic protein of the eye lens of vertebrates. It represents a mixture of homologous α A- and α B-crystallins which form large heterogeneous complexes and provide for eye lens transparency. It was established that α -crystallin belongs to the family of small heat shock proteins (sHsp) and performs a chaperone-like function preventing denaturation and aggregation of proteins. The 3D-structure of native α -crystallin has not yet been determined. In this study we have analyzed the structure of α -crystallin from bovine eye lens using the electron microscopy (EM) method. Our experimental data have allowed us to conclude that it is impossible to obtain a reliable structure of the α -crystallin complex. Based on the analysis of the publications devoted to studying α -crystallin we have come to the conclusion that under native *in vivo* conditions the structure and functioning of α -crystallin can differ from its behavior under *in vitro* conditions. Therefore several assumptions are made concerning the functioning of α -crystallin in the form of small aggregates, for example dimers, and the role of α A-crystallin as a specified chaperone of eye lens – the chaperone for α B-crystallin.

Key words: α -crystallin, small heat-shock proteins, electron microscopy.