

## ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ОБРАЗОВАНИЯ ФИБРИЛЛ БЕЛКА YB-1 С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ И АНАЛИТИЧЕСКОГО УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЯ

Мачулин А. В.<sup>1</sup>, Хечинашвили Н. Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, г. Пущино, Московская область, Россия (142290, г. Пущино Московской обл., проспект Науки, д.5), e-mail: and.machul@gmail.com

<sup>2</sup>Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино, Московская область, Россия (142290, г. Пущино Московской области, проспект Науки, д.3)

---

С помощью методов атомно-силовой микроскопии (АСМ) и аналитического ультрацентрифугирования (АУ) была исследована кинетика образования фибриллярных структур белком YB-1. Измеренные гидродинамические параметры свежеприготовленного белка YB-1 (коэффициент седиментации, молекулярная масса) в условиях высокой (2M LiCl) и умеренной (150 mM KCl) ионной силы соответствовали мономерам белка, что коррелирует с полученными АСМ-изображениями. Рассчитанный гидродинамический объем этихмономеров в растворе примерно равен объему белка, адсорбированному на поверхности слюды (по данным АСМ). После трех суток инкубации белка в условиях высокой ионной силы точное определение константы седиментации стало невозможным, а структуры, наблюдаемые на АСМ-изображениях, представляли собой протяженные фибриллы. В условиях умеренной ионной силы в процессе инкубации белок YB-1 не полимеризовался.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, аналитическое ультрацентрифугирование, белок YB-1.

## INVESTIGATION OF THE PROTEIN YB-1 FIBRILS KINETICS WITH ATOMIC FORCE MICROSCOPY AND ANALYTICAL ULTRACENTRIFUGATION

Machulin A. V.<sup>1</sup>, Khechinashvili N. N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia, e-mail: and.machul@gmail.com

<sup>2</sup>Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

---

Using atomic force microscopy (AFM) and analytical ultracentrifugation (AU) the kinetics of protein YB-1 fibrillar structures formation was investigated. The measured hydrodynamic parameters of freshly prepared protein YB-1 (sedimentation coefficient, molecular weight) in high (2 M LiCl) and moderate (150 mM KCl) ionic strength correspond to protein monomers, which correlates with the obtained AFM images. Calculated hydrodynamic volume of the monomers in solution approximately equal to protein volume adsorbed on the mica surface (according to AFM data). In three days of protein incubation at high ionic strength, the precise definition of the sedimentation constant was not possible, and the observed AFM images structures represented extended fibrils. After incubation at moderate ionic strength protein YB-1 did not polymerize.

Key words: atomic force microscopy, analytical ultracentrifugation, protein YB-1.

### ВВЕДЕНИЕ

Белок YB-1 – многофункциональный ДНК- и РНК-связывающий белок млекопитающих, участвующий в различных внутриклеточных процессах, связанных с хранением, воспроизведением и экспрессией генетической информации, и функционирующий как в ядре, так и в цитоплазме. YB-1 может взаимодействовать с актиновым и тубулиновым цитоскелетами, а также секретироваться из клеток и выступать в качестве экстраклеточного регулятора различных процессов в организме [1].

YB-1 содержит 324 а. о. и состоит из трех доменов [8]. На N-конце находится небольшой домен, богатый аланином и пролином, далее идет домен холодого шока (CSD)

[7], а за ним – протяженный С-концевой домен, состоящий из чередующихся кластеров положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков, с размером каждого кластера примерно в 25–30 остатков. Данные о том, каким образом неструктурированные N- и С- домены белка располагаются относительно CSD-домена, отсутствуют.

Ранее, с помощью АСМ было показано, что инкубация белка YB-1 в 20 мМ Нерес-КОН, рН 7.6, 2 МLiCl приводит к образованию фибрилл [2]. Для того чтобы приблизиться к пониманию процесса фибрилlogenеза белка YB-1, необходимо выявить параметры протофибрилл, определяющих их функциональное состояние и упаковку в протяженные фибриллы. Кроме того, определение влияния внешних условий на процесс фибрилlogenеза даст возможность получать фибриллы с регулируемыми свойствами.

Целью данной работы было исследование кинетики образования фибриллярных структур белком YB-1 с помощью методов атомно-силовой микроскопии (АСМ) [4] и аналитического ультрацентрифугирования (АУ) [3].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Очистка белка YB-1 и образование фибрилл*

Белок YB-1 получали, как описано ранее [2]. Для получения фибрилл белка YB-1 концентрированный препарат белка размораживали и доводили его концентрацию до 0.1 мг/мл буфером 20 мМНЕРЕС-КОН, рН 7.6, содержащем 2МLiCl или 150мМКCl. Препарат белка прогревали в течение 15 мин при 30 °С, дальнейшую инкубацию белка проводили при 4 °С.

### *Атомно-силовая микроскопия*

Сканирование осуществлялось на приборе Интегра-Вита («НТ-МДТ», Зеленоград) в полуконтактном режиме. В работе использовались стандартные кремниевые кантиливеры NSG 03 длиной 100 мкм, с резонансной частотой 62-123 кГц и радиусом закругления острия 10 нм.

Для исследования методом АСМ все образцы готовились одинаково следующим образом. На свежесколотую слюду помещали каплю раствора белка объемом 5–10 мкл. После этого слюду с нанесенным раствором помещали во влажную атмосферу, для предотвращения высыхания капли, и выдерживали в течение 5 минут. Затем каплю раствора удаляли фильтрованной бумагой и подложку с образцом, не высушивая, дважды промывали в дистиллированной воде в течение 30 секунд для удаления не адсорбированного вещества. После промывания подложку с образцом высушивали на воздухе.

### *Аналитическое ультрацентрифугирование*

Эксперименты по АУ проводились на центрифуге BeckmanXL (BeckmanCoulter) на скорости 40000 об/мин при 20 °С. Распределения дифференциального коэффициента  $s(s)$  и

$s(M)$  рассчитывались с помощью программы SEDFIT [10]. Расчеты коэффициентов седиментации проводились с поправкой на температуру и ионную силу буферного раствора.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Анализ свежеприготовленного белка YB-1 в условиях высокой (2 M LiCl) и низкой (150 mM KCl) ионных силах методами АУ и АСМ*

Седиментационный анализ свежеприготовленного белка YB-1 в условиях высокой ионной силы 2M LiCl приведен на рисунке 1А. Как видно из рисунка, распределение по константе седиментации и по молекулярной массе унимодально. Вычисляемая величина константы седиментации  $s$  составляет,  $s_{20w} = 2.72 S$ . Вычисляемая молекулярная масса  $M$  составляет 35.3 кДа, что всего лишь на 2 % меньше теоретической величины, рассчитанной из первичной последовательности (36 кДа). Отметим, что константа седиментации равная 2.72 S соответствует глобулярному белку в растворе.

Седиментационный анализ белка YB-1 в условиях умеренной ионной силы 150мМ KCl (свежеприготовленный) дает константу седиментации равную 2.80 S, что также соответствует глобулярному белку в растворе (рис.1 В). Вычисляемая молекулярная масса  $M$  при этом равна 36.2 кДа.

То, что свежеприготовленный белок находится в глобулярном состоянии, подтверждается полученными АСМ изображениями мономеров белка на подложке (рис. 1 Б, Г). Таким образом, можно утверждать, что на начальном этапе ионные условия не влияют на конформацию белка в растворе. Кроме того, из этого следует, что в растворе неструктурированные N- и С- домены белка располагаются компактно вокруг домена холодового шока.

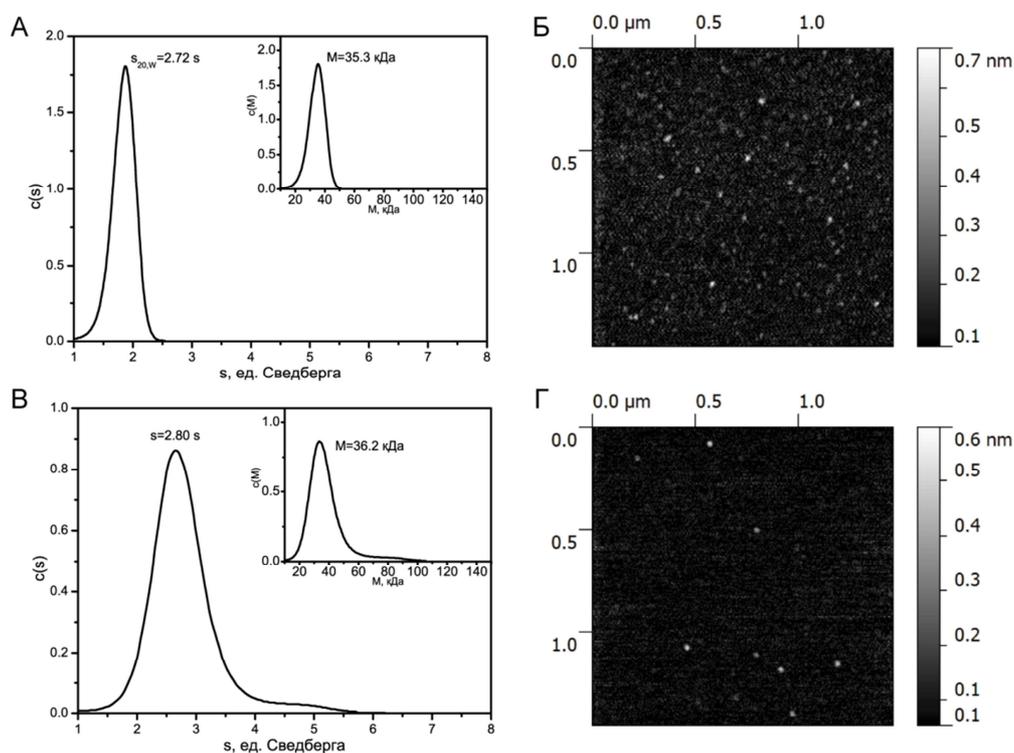


Рис. 1. А – седиментационный профиль белка YB-1 в условиях высокой ионной силы (2 M LiCl). Основной график иллюстрирует распределение седиментационной постоянной, а вложенный график иллюстрирует распределение молекулярной массы. Б – АСМ изображение мономеров белка YB-1 в условиях высокой ионной силы (2 M LiCl). В – седиментационный профиль белка YB-1 в условиях умеренной ионной силы (150 mM KCl). Основной график – распределение седиментационной постоянной, а вложенный график – распределение молекулярной массы. Г – АСМ изображение мономеров белка YB-1 в условиях умеренной ионной силы (150 mM KCl)

#### *Объем YB-1 в растворе (AV) и на подложке (АСМ)*

Несмотря на то, что при взаимодействии с зондом высота и ширина биологических объектов получается отличной от реальной, расчет объема белковых молекул по данным атомно-силовой микроскопии дает весьма достоверные результаты. Кроме того, многие работы [9] указывают на то, что объем глобулярных белков, измеряемый АСМ, коррелирует с молекулярной массой.

В первом приближении объем белка в растворе можно рассчитать по формуле [5]:

$$V = (M_0/N_0)(V_1 + dV_2),$$

где  $M_0$  – молекулярная масса белка,  $N_0$  – число Авогадро,  $V_1$  и  $V_2$  – парциальные удельные объемы белка ( $0.74 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$  и  $1 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$  в растворе, соответственно),  $d$  – степень гидратации белка (0.4 моль  $\text{H}_2\text{O}$ /моль белка).

Для мономера белка YB-1 (молекулярная масса 36 кДа) в растворе имеем гидродинамический объем равный:

$$V_{гидр} = 68.17 \text{ нм}^3$$

АСМ-изображение свежеприготовленного белка YB-1 в условиях умеренной ионной силы представлено на рисунке 1 Г. Хорошо видно, что белок находится в мономерной форме. Анализируя АСМ-изображения мономеров белка YB-1, были получены средние значения высоты, которая составила 0.42 нм и средний диаметр на половине максимальной высоты, который был равен 34 нм.

Для оценки объема микрочастиц белка из АСМ изображений применяем формулу для сегмента сферы:

$$V = (h/6) (3r^2 + h^2),$$

где  $h$  – высота молекулы белка,  $r$  – радиус белка.

Для измеренных с АСМ-изображений параметров (среднее значение высоты и ширины высчитывалось по профилю сечения для набора частиц), получаем:

$$V_{АСМ} = 60.7 \pm 7.0 \text{ нм}^3$$

Таким образом, объем белка YB-1 на подложке по данным АСМ на 11 % меньше такового, рассчитанного по гидродинамическим параметрам.

#### *Кинетика образования фибриллярных структур белком YB-1*

После инкубации белка YB-1 в условиях высокой ионной силы 2 М LiCl в течение суток наблюдалось изменение седиментационного профиля (рис. 2 А). На рисунке видно второй меньший пик, константа седиментации которого соответствует димеру белка. Через трое суток точное определение константы седиментации становится невозможным, а молекулярная масса отдельных образованных в растворе структур становится  $7 \cdot 10^6$  Да, что говорит о прошедшей в растворе процессе полимеризации вещества (рис. 2Б). При этом структуры, наблюдаемые на АСМ-изображениях, представляют собой протяженные фибриллы, что коррелирует с полученными гидродинамическими данными (рис. 2В), а также с полученными ранее данными других работ [2, 6].

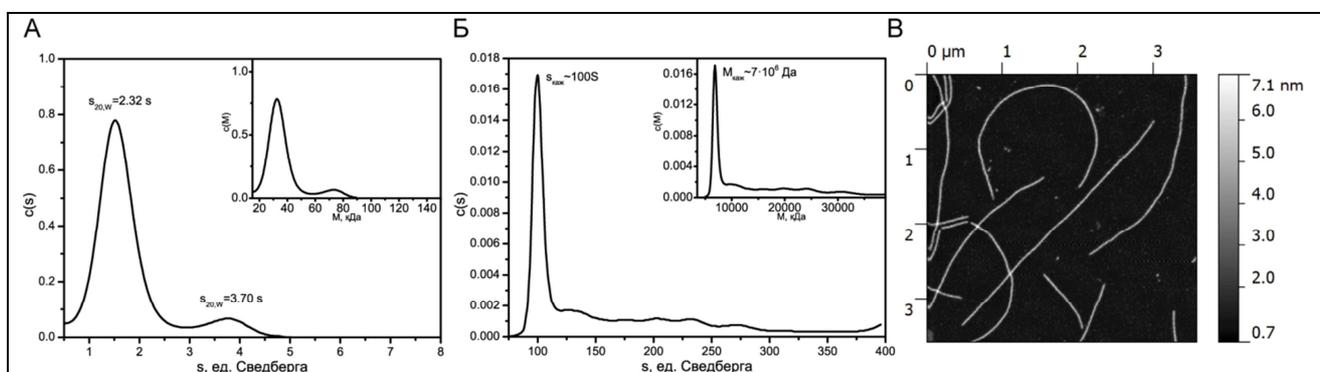


Рис. 2. А – седиментационный профиль белка YB-1 после суток инкубации в растворе в условиях высокой ионной силы (2M LiCl). Основной график – распределение седиментационной постоянной, вложенный график – распределение молекулярной массы. Б

– седиментационный профиль белка YB-1 после трех суток инкубации в растворе в условиях высокой ионной силы (2M LiCl). Основной график – распределение седиментационной постоянной, вложенный график – распределение молекулярной массы. В – АСМ изображение фибрилл белка YB-1 после трех суток инкубации в растворе в условиях высокой ионной силы (2M LiCl)

В условиях умеренной ионной силы в процессе инкубации белок YB-1 коэффициент седиментации не изменялся, что свидетельствует об отсутствии процесса полимеризации.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе с помощью методов АСМ и АУ было показано, что свежеприготовленный белок YB-1 находится в глобулярной мономерной форме и ионные условия не влияют на его конформацию в растворе. Это говорит о том, что в растворе неструктурированные N- и C- домены белка располагаются компактно вокруг домена холодового шока. Рассчитанный гидродинамический объем мономеров белка YB-1 в растворе равен  $68.17 \text{ нм}^3$ , а объем белка, адсорбированного на поверхности слюды (по данным АСМ) –  $60.7 \text{ нм}^3$ . После трех суток инкубации белка в условиях высокой ионной силы определение его константы седиментации из АУ было невозможно, что согласуется с полученными ранее АСМ-данными об образуемых фибриллярных структурах. Можно заключить, что структурной единицей, инициирующей возникновение протофибрилл и последующее развитие процесса образования протяженных фибрилл, является димерная форма белка YB-1.

#### Список литературы

1. Елисеева И. А. и др. Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) и его функции // Успехи биологической химии. – 2011. – Т. 51. – С. 65-132.
2. Селиванова О. М. и др. Белок YB-1 обладает способностью образовывать протяженные нанофибриллы // Биохимия. – 2010. – Т. 75, N 5. – С. 629-636.
3. Сердюк И. Н., Евсеева О. Н. Новые возможности аналитического ультрацентрифугирования для анализа гидродинамических свойств белков // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 349-372.
4. Binnig G., Quate C., Gerber C. Atomic force microscope // Phys. Rev. Lett. – 1986. – №56 – P. 930-934.
5. Edstrom R. D. et al. Direct visualization of phosphorylase-phosphorylase kinase complexes by scanning tunneling and atomic force microscopy // Biophys. J. – 1990. – V.58. – P.1437-1448.

6. Guryanov S. G. et al. Formation of amyloid-like fibrils by y-box binding protein 1 (YB-1) is mediated by its cold shock domain and modulated by disordered terminal domains // PLoS ONE. – 2012. – V. 7, № 5. – P. e36969.
7. Kloks C. P. A. M. et al. The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1// J. Mol. Biol. – 2002. – V.316. – P. 317–326.
8. Kohno K. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1// BioEssays. – 2003. – V.25. – P.691–698.
9. Schneider S. W. et al. Molecular weights of individual proteins correlate with molecular volumes measured by atomic force microscopy// Pflugers. Archiv. European Journal of Physiology. – 1998. – V. 434, №3. – P. 362-367.
10. Schuck P. Size-Distribution Analysis of Macromolecules by Sedimentation Velocity Ultracentrifugation and Lamm Equation Modeling // Biophys. J. – 2000. – V.78. – P. 1606-1619.

*Авторы выражают благодарность Гурьянову С. Г. (Институт Белка РАН) за предоставленный препарат белка YB-1 и Тимченко А. А. (Институт Белка РАН) за помощь в проведении экспериментов по АУ.*

**Рецензенты:**

Кутышенко Виктор Павлович, д.ф.-м.н., профессор, зав. лабораторией «ЯМР-исследований биосистем», Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), г. Пущино.

Новосёлова Елена Григорьевна, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник, Институт биофизики клетки РАН (ИБК РАН), г. Пущино.