

На правах рукописи

Нефёдова Виктория Викторовна

**ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ ЗАМЕН В КРИСТАЛЛИНОВОМ
ДОМЕНЕ, КОРРЕЛИРУЮЩИХ С РАЗВИТИЕМ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ
НЕВРОПАТИЙ, НА СТРУКТУРУ И СВОЙСТВА МАЛОГО БЕЛКА
ТЕПЛОВОГО ШОКА HSPB1**

03.01.04 Биохимия

Автореферат диссертации

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедре биохимии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель доктор биологических наук, член-корр. РАН

Гусев Николай Борисович

Официальные оппоненты **Чеботарева Наталья Александровна**

доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», лаборатория структурной биохимии белка, ведущий научный сотрудник.

Ширинский Владимир Павлович

доктор биологических наук, профессор, Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения РФ, заведующий лабораторией клеточной подвижности.

Ведущая организация **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук**

Защита состоится «__» _____ 2018 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Малые белки теплового шока (sHsp) – широко распространенное семейство АТФ-независимых шаперонов, играющих важную роль в поддержании клеточного гомеостаза. Представителей этого семейства объединяет наличие Ig-подобного высоко консервативного α -кристаллинового домена (ACD) в центральной части молекулы, который фланкирован вариабельным и, как правило, неупорядоченным N-концевым доменом (NTD) и коротким С-концевым доменом (CTD) [1]. В геноме большинства организмов обнаружено несколько генов sHsp (например, у человека выявлено 10 генов). Для малых белков теплового шока характерна небольшая (от 12 до 43 кДа) молекулярная масса мономеров. Центральный α -кристаллиновый домен sHsp млекопитающих представлен семью β -складками, организованными в два β -листа. Наличие α -кристаллинового домена обеспечивает формирование стабильных димеров sHsp, которые могут ассоциировать и образовывать более крупные олигомеры [2], в состав которых входит до 24 (и более) мономеров [3, 4]. sHsp принимают участие в регуляции многочисленных процессов, протекающих в клетке, таких как защита клетки от накопления агрегатов неправильно свернутых белков, апоптоз, реорганизация сократительного аппарата и цитоскелета и пролиферация. Вероятно, именно поэтому мутации в генах sHsp зачастую приводят к развитию различных заболеваний. На сегодняшний день известно более 20 мутаций в гене малого белка теплового шока человека HspB1, наличие которых коррелирует с возникновением дистальной врожденной моторной невропатии (ДВМН) и болезни Шарко-Мари-Тута 2 типа (ШМТ2) [5] – заболеваний, характеризующихся прогрессирующим повреждением аксонов моторных и/или сенсорных нейронов [6]. Исследования по влиянию аминокислотных замен, коррелирующих с развитием невропатий, на структуру и функции HspB1 ведутся довольно давно, тем не менее, многие вопросы остаются нерешенными. Кроме того, остается непонятным, каким образом точечные замены в HspB1 приводят к развитию невропатий. Принято считать, что развитие невропатий может быть связано с нарушением аксонального транспорта и повреждением цитоскелета аксона. Предполагается, что аминокислотные замены в HspB1, коррелирующие с развитием невропатий, могут каким-то образом влиять на его взаимодействие с основным компонентом промежуточных филаментов нейронов – легкой цепью нейрофиламентов.

Список сокращений: ДВМН – дистальная врожденная моторная невропатия, ДСН – додецилсульфат натрия, ДТТ – дитиотрейтол, МЭ – β -меркаптоэтанол, ПААГ – полиакриламидный гель, ПФ – промежуточные филаменты, ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид, ШМТ2 – болезнь Шарко-Мари-Тута 2 типа, ЭГТА – этиленгликоль-бис(2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусной кислоты, ЭДТА – этилендиаминтетраацетат, ACD – α -кристаллиновый домен, CTD – С-концевой домен, IPTG – изопропил β -D-1-тиогалактопиранозид, MAPKAP киназа 2 – митогенактивируемая протеинкиназа 2, NFL – белок легкой цепи нейрофиламентов, NTD – N-концевой домен, S1 – субфрагмент 1 миозина.

α -Кристаллиновый домен играет важную роль в стабилизации структуры sHsp и в их взаимодействии с белками-субстратами. Поэтому в нашей работе мы сосредоточились на исследовании мутантных форм HspB1 с точечными заменами на границе N-концевого и α -кристаллинового домена (G84R), а также в самом начале (L99M) и в центре α -кристаллинового домена (R140G и K141Q). Представлялось целесообразным сравнить физико-химические свойства мутантных форм со свойствами белка дикого типа, а также проанализировать взаимодействие различных малых белков теплового шока с белком легкой цепи нейрофиламентов.

Целью данной работы был анализ структуры и свойств мутантных форм малого белка теплового шока HspB1 с аминокислотными заменами G84R, L99M, R140G и K141Q, экспрессия которых коррелирует с развитием наследственных нейродегенеративных заболеваний. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить в гомогенном состоянии препараты рекомбинантного HspB1 с аминокислотными заменами G84R, L99M, R140G и K141Q;
2. Изучить влияние анализируемых точечных замен на структуру и физико-химические свойства малого белка теплового шока HspB1;
3. Проанализировать влияние указанных аминокислотных замен на шапероноподобную активность HspB1;
4. Изучить способность белка дикого типа и его мутантных форм образовывать гетероолигомерные комплексы с малым белком теплового шока HspB6;
5. Получить клеточные линии HEK293F, стабильно синтезирующие HspB1 дикого типа и его мутантную форму R140G (т.е. белка с аминокислотной заменой в положении, характерном для мутаций других малых белков теплового шока) и исследовать олигомерное состояние белка дикого типа и его мутантной формы в этой линии клеток;
6. Исследовать взаимодействие HspB1 дикого типа и его мутантных форм, а также других малых белков теплового шока с белком легкой цепи нейрофиламентов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Аминокислотная замена R140G, расположенная в β 7-складке α -кристаллинового домена HspB1, приводит к уменьшению собственной триптофановой флуоресценции белка и уменьшению его гидрофобности, снижает термостабильность и устойчивость белка к трипсинолизу. Помимо этого, аминокислотная замена R140G сопровождается значительным снижением шапероноподобной активности HspB1. Олигомеры HspB1 с заменой R140G нестабильны в условиях *in vitro* и *in vivo*. Указанные изменения структуры могут быть следствием того, что замена R140G сопровождается разрушением солевого мостика, стабилизирующего контакт между мономерами в составе димера HspB1.

2. Аминокислотные замены G84R и L99M влияют на стабильность олигомеров HspB1, способствуя диссоциации, индуцированной фосфорилированием под действием МАРКАР киназы 2.

3. Малый белок теплового шока HspB1 и его исследуемые мутантные формы взаимодействуют с белком легкой цепи нейрофиламентов NFL и препятствуют его полимеризации. α B-кристаллин (HspB5) также взаимодействует с белком легкой цепи нейрофиламентов и ингибирует его полимеризацию. Другие малые белки теплового шока (HspB6 и HspB8) менее эффективны в регуляции полимеризации белка легкой цепи нейрофиламентов.

Научная новизна и практическая ценность работы

В ходе исследования проведен детальный анализ физико-химических свойств четырех мутантных форм HspB1, экспрессия которых коррелирует с развитием невропатий периферической нервной системы. Установлено, что замена консервативного остатка R140, расположенного в β 7-складке, в области контакта мономеров в составе димера HspB1, оказывает наибольшее влияние на структуру и уменьшает шапероноподобную активность белка. Замены G84R и L99M, расположенные на границе N-концевого и кристаллинового доменов и в начале α -кристаллинового домена, дестабилизируют олигомерную структуру HspB1 и способствуют диссоциации, индуцированной фосфорилированием. Малый белок теплового шока HspB1 взаимодействует с белком легкой цепи нейрофиламентов NFL и ингибирует полимеризацию нейрофиламентов, образованных NFL, при этом эффект мутантных форм белка сопоставим с эффектом белка дикого типа. Автором получена клеточная линия НЕК293F, стабильно синтезирующая мутантную форму HspB1 с заменой R140G.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность представленных в диссертации данных и выводов определяется использованием большого количества разнообразных современных физико-химических методов исследования белков.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на заседании кафедры биохимии Биологического факультета МГУ, на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» в 2013, 2014 гг. (г. Москва, Россия), Международной научной школе-конференции «Protein interactions, assemblies and human disease» в 2013 г. (о. Спецес, Греция), VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» в 2015 г. (г. Новосибирск, Россия), XXVIII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Институт Биоорганической Химии РАН в 2015 г. (г. Москва, Россия), V Съезде Физиологов СНГ и V Съезде Биохимиков России в 2016 (г. Сочи, Россия), Международном симпозиуме «The small HSP world. Second International Workshop of Cell Stress Society International (CSSI)» в 2016 г. (г. Бертиноро, Италия).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, включая 5 статей и 5 тезисов сообщений.

Личный вклад соискателя

За исключением моделирования структуры димера HspB1 соискатель лично принимал участие во всех этапах работы: разработке и апробации экспериментальных методов, проведении экспериментов, обработке и обобщении полученных результатов, подготовке статей и тезисов конференций.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения полученных результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 134 страницах печатного текста, иллюстрирована 34 рисунками и 8 таблицами. Список цитированной литературы содержит 180 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы представлены данные о структуре и функциях малых белков теплового шока. Особое внимание уделено описанию мутантных форм малого белка теплового шока HspB1, экспрессия которых коррелирует с развитием невропатий периферической нервной системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение препаратов белков

Рекомбинантный HspB1 дикого типа (WT) и его мутантные формы получали в клетках *E.coli* штамм BL21(DE3)pLysS. Кодировующие последовательности (кДНК) мутантных форм с заменами R140G и K141Q были получены на основе кДНК белка дикого типа (WT) посредством двух последовательных раундов ПЦР. Полученные кДНК мутантных форм HspB1 клонировали в вектор pET23b(+). Все конструкции, использованные для выполнения работы, были проверены секвенированием. Вектора pET21a, содержащие кодировующие последовательности мутантных форм HspB1 с заменами G84R и L99M, были получены в компании «Евроген». Синтез белка в клетках *E.coli* индуцировали добавлением IPTG или методом автоиндукции. При выделении HspB1 использовали методы фракционирования сульфатом аммония, ионообменной хроматографии на HiTrap Q 5 ml (GE Healthcare) и гель-фильтрации на HiLoad 26/60 Superdex 200 (GE Healthcare). Очищенные и сконцентрированные белки хранили при -20 °C в буфере В (20 mM Трис-ацетат pH 7,6, 10 mM NaCl, 0,1 mM ЭДТА, 2 mM ДТТ, 0,1 mM ФМСФ). Вектор pET30a, содержащий кДНК белка легкой цепи нейрофиламентов быка (NFL) был предоставлен к.б.н. Мининым А.А. (Институт белка РАН). Белок NFL выделяли из фракции тщательно отмытых телец включения. Тельца включения растворяли в буфере Q (20 mM Трис-ацетат pH 8,0, содержащий 8 M мочевины, 2 mM ЭГТА, 30 mM МЭ, 0,1 mM ФМСФ, 2 μM пепстатина и 2 μM

лейпептина) и проводили ионообменную хроматографию на HiTrap Q 5 ml (GE Healthcare). Фракции, содержащие наибольшее количество NFL, объединяли, доводили pH до 4,2 муравьиной кислотой и продолжали очистку белка на колонке HiTrap SP 5 ml (GE Healthcare) в буфере SP (10 mM Трис/муравьиная кислота pH 4,0, содержащий 8 M мочевины, 0,1 mM ФМСФ, 30 mM МЭ). В очищенном и сконцентрированном препарате белка доводили pH до 8,0, разделяли на аликвоты и хранили на -70 °C.

Измерение собственной триптофановой флуоресценции проводили в буфере FF (20 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM ДТТ) в диапазоне длин волн 300 – 400 нм при возбуждении светом с длиной волны 295 нм. Измерения спектров проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian) при 25 °C.

Ограниченный трипсинолиз проводили в буфере В, не содержащем ФМСФ. Весовое соотношение субстрат/фермент составляло 8000/1. В работе использовали трипсин фирмы Sigma, обработанный тозил-L-фенилаланин-хлорметилкетон (ТФХК). Реакцию начинали добавлением трипсина и останавливали через различные промежутки времени добавлением раствора ФМСФ. Полученные пробы анализировали методом электрофореза в присутствии ДСН. Для локализации участков протеолиза часть полученных пептидов анализировали методом масс-спектрометрии на масс-спектрометре Ultraflex Extreme BRUKER.

Фосфорилирование HspB1 MAPKAP киназой 2 проводили по следующей схеме. На первой стадии киназу p38 фосфорилировали конститутивно-активной киназой МКК6 в течение 1 часа при 37 °C в буфере Р (25 mM HEPES pH 7,5, 25 mM β -глицерофосфат натрия, 2 mM ДТТ, 20 mM $MgCl_2$), содержащем 400 μ M АТР, затем добавляли MAPKAP киназу 2 и продолжали инкубацию еще 1 час при 37 °C. Смесь протеинкиназ добавляли в пробы, содержащие 30 μ M HspB1 и 350 μ M АТР и инкубировали при 37 °C, реакцию останавливали добавлением буфера для электрофореза по методу Перрье-Перри [7], содержащем 8 M мочевины. За процессом фосфорилирования следили по изменению подвижности белков в ПААГ.

Исследование четвертичной структуры белков проводили методами гель-фильтрации и аналитического ультрацентрифугирования. При проведении гель-фильтрации пробы, содержащие разные количества HspB1, наносили на колонку Superdex 200 HR 10/30, уравновешенную буфером Б, содержащим 150 mM NaCl. Опыты по аналитическому ультрацентрифугированию HspB1 проводили на ультрацентрифуге Spinco модель E, используя ротор AnJ-Ti (20 °C, 44000 об/мин). За процессом седиментации следили спектрофотометрически, регистрируя оптическую плотность при 280 нм по длине ячейки каждые 1,5 мин. Коэффициенты седиментации рассчитывали в программе SEDFIT [8].

Исследование олигомерного состояния HspB1 дикого типа и его мутантной формы с заменой R140G в клетках линии HEK293. Клетки линии HEK293F (Human Embryonic Kidney 293), стабильно синтезирующие HspB1 WT и мутантную форму с заменой R140G, получали методом лентивирусной трансдукции. Лентивирусные частицы получали в клетках линии Expi293F. Для культивирования клеток линии HEK293F использовали среду следующего состава: DMEM High Glucose (Biological Industries), содержащую 10% FBS (Biological Industries), и 10 мкг/мл гентамицина. Заражение HEK293F проводили в присутствии гексадиметрина бромида (Polybrene) в концентрации 5 мкг/мл, методом спинокуляции, центрифугируя планшеты с прикрепленными клетками при 800 g, 30 °C в течение часа. За эффективностью заражения следили по флуоресценции зеленого флуоресцентного белка в контроле. Селекцию проводили с использованием антибиотика бластицидина S (конечная концентрация 17 мкг/мл). Экспрессию HspB1 WT и мутантной формы R140G детектировали методом Western Blotting с использованием первичных антител к HspB1 и тубулину и вторичных антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Лизат клеток HEK293F получали следующим образом. После удаления среды культивирования клетки 2 раза промывали раствором PBS, добавляли 150 мкл буфера N (20 mM HEPES pH 7,4, 10 mM NaCl, 1 mM ЭГТА, 1 mM MgCl₂, 50 mM NaF, 13 mM МЭ, 0,1 mM ФМСФ, ингибиторы протеаз (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich)) и снимали скребком для клеток. Полученную суспензию подвергали ультразвуковой обработке и ультрацентрифугированию (105000 g, 4 °C, 1 час). Лизаты анализировали методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 HR 10/30, уравновешенной 20 mM Трис-ацетатным буфером pH 7,6, содержащим 150 mM NaCl, 0,1 mM ЭДТА, 50 mM NaF, 15 mM МЭ и 0,1 mM ФМСФ. Детекцию HspB1 во фракциях после гель-фильтрации осуществляли методом Western Blotting с использованием первичных антител к HspB1 и вторичных антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена.

Шапероноподобную активность оценивали по способности HspB1 предотвращать агрегацию белков-субстратов. За агрегацией белков-субстратов следили по увеличению оптической плотности при 340 нм (A_{340}). Агрегацию лизоцима индуцировали добавлением ДТТ до конечной концентрации 20 mM. Эксперименты проводили в 50 mM фосфатном буфере pH 7,4. Опыты с субфрагментом-1 миозина (S1) проводили в 20 mM HEPES/NaOH pH 7,0, содержащем 115 mM NaCl, 15 mM МЭ, агрегацию индуцировали нагреванием образцов до 43 °C.

Взаимодействие малых белков теплового шока с белком NFL анализировали с использованием нескольких экспериментальных подходов. В первом случае NFL в буфере, содержащем 8 M мочевины, смешивали с малыми белками теплового шока. Полученную смесь диализовали ночь против буфера полимеризации (20 mM HEPES/NaOH (pH 7,2), 0,19 M NaCl, 0,1 mM ЭГТА, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ФМСФ, и 0,1 mM МЭ) при 37 °C. Во втором случае сначала проводили диализ NFL против буфера Т (5 mM Трис/ацетат pH 8,0, 1 mM ЭГТА) в течение ночи при 4 °C. В этом случае в

диализате образовывались тетрамеры NFL. Полученные тетрамеры смешивали с sHsp и индуцировали процесс полимеризации добавлением 1/10 объема 10-кратного буфера полимеризации. В третьем случае сначала проводили диализ раствора NFL против буфера полимеризации. К полученным филаментам добавляли различные количества HspB1 и инкубировали час при 37 °С. Все образцы подвергали низко- (10000 g, 30 мин, 37 °С) и высокоскоростному (105000 g 1 час, комнатная температура) центрифугированию. Белковый состав супернатантов и осадков после центрифугирования анализировали методом электрофореза в присутствии ДСН. Гели окрашивали и сканировали, интегральную интенсивность полос измеряли в программе GelAnalyzer.

Модификация белка NFL пиренилмалеимидом (PM). Образцы NFL (5-6 мг/мл) восстанавливали в буфере N (20 mM Трис-ацетат pH 8,0, содержащем 8 M мочевины и 10 mM ДТТ), подвергали гель-фильтрации на колонке NAP10 (GE HealthCare), уравновешенной буфером U (150 mM фосфат натрия pH 7,4, содержащий 8 M мочевины). Модификацию белка легкой цепи нейрофиламентов проводили в течение 3 часов при комнатной температуре в темноте при молярном соотношении PM:NFL равном 10:1. Реакцию останавливали добавлением ДТТ до конечной концентрации 5 mM, образцы центрифугировали при 14000 g в течение 15 мин. Избыток пиренилмалеимида удаляли гель-фильтрацией на колонках NAP10. Модифицированный белок (PM-NFL) концентрировали ультрафильтрацией (MILIPORE 30,000 MWCO). Спектр флуоресценции препарата PM-NFL регистрировали в диапазоне длин волн 350-600 нм при длине волны возбуждающего света 344 нм на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian).

Электронную микроскопию проводили на микроскопе JEOL 2100 TEM при ускоряющем напряжении 200 кВ. Образцы филаментов NFL, полученные путем полимеризации против буфера с высокой ионной силой, наносили на углеродные сетки, предварительно обработанные тлеющим разрядом в течение 30 сек. Окраску проводили 1% раствором уранилацетата.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние точечных замен аминокислот в α -кристаллиновом домене на структуру и физико-химические свойства малого белка теплового шока HspB1

Измерение параметров триптофановой флуоресценции позволяет охарактеризовать окружение остатков триптофана в структуре белка. Для спектров флуоресценции HspB1 WT и анализируемых мутантных форм характерен широкий максимум, расположенный при 336-350 нм для белка дикого типа и его мутантных форм с заменами G84R, L99M и K141Q и при 330-344 нм в случае мутантной формы HspB1 R140G (рис. 1). Замена K141Q не влияет, а замены G84R и L99M лишь незначительно уменьшают (L99M) и увеличивают (G84R) интенсивность триптофановой флуоресценции HspB1. Замена R140G снижает интенсивность

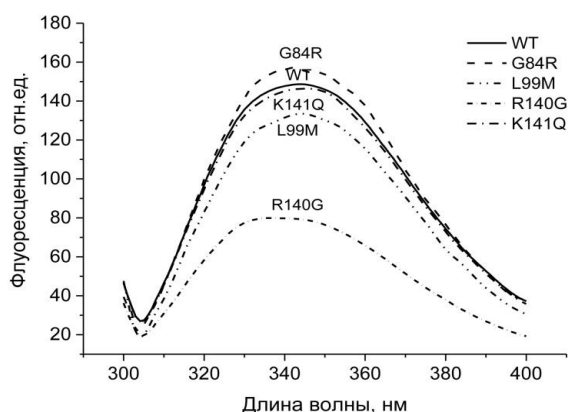


Рис. 1. Спектры флуоресценции HspB1 дикого типа и его мутантных форм.

олигомеров, в результате которой N-концевые домены оказываются экспонированными в растворитель, что приводит к тушению флуоресценции.

Метод ограниченного протеолиза часто используется для анализа структуры белка. В ранее опубликованной работе Барановой и соавт. было установлено, что ACD (остатки 90-171) HspB1 устойчив к протеолизу, а быстрому гидролизу подвергаются подвижные мало упорядоченные N- и C-концевые домены [9]. Ограниченный протеолиз HspB1 дикого типа и его мутантных форм сопровождается накоплением одинакового набора пептидов с кажущимися молекулярными массами 24,0, 18,5 и 16,0 кДа (рис.2). Методом масс-спектрометрии мы установили, что расщепление происходит по пептидным связям, образованным остатками аргинина: R4(5), R79 и R188 (рис. 2Г). Как набор пептидов, так и скорость их появления и последующей убыли были практически одинаковыми для белка дикого типа и для

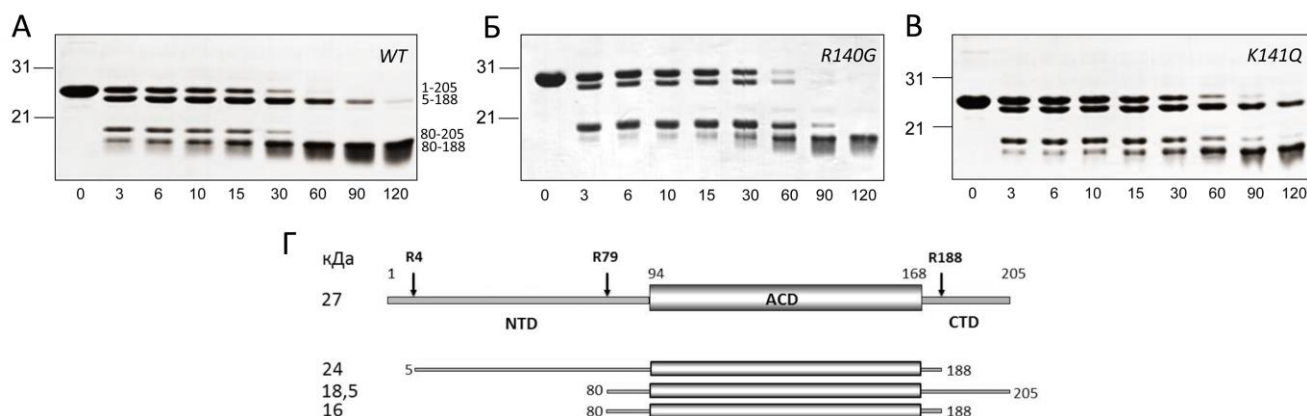


Рис. 2. Ограниченный трипсинолиз HspB1 дикого типа (WT) и его мутантных форм с заменами R140G и K141Q. А-В. Сканы гелей после электрофореза в присутствии ДСН по методу Леммли. Положение белков-маркеров отмечено слева (в кДа). Время инкубации в минутах обозначено под каждым треком. На панели А справа от электрофореграммы указаны номера аминокислотных остатков, входящих в состав соответствующих протеолитических фрагментов. Г. Схема протеолиза HspB1 дикого типа и его мутантов, полученная на основе данных масс-спектрометрии. Стрелками обозначены наиболее доступные для трипсинолиза остатки аргинина (R4, R79, R188). NTD, ACD и CTD: N-концевой, α -кристаллиновый и C-концевой домены HspB1, соответственно.

мутантных форм с заменами G84R и L99M (данные не представлены). Замена аминокислотного остатка K141 приводит к некоторой стабилизации структуры белка и ингибирует трипсинолиз пептидной связи, образованной остатком R79 (рис. 2В). Напротив, в случае мутантной формы R140G скорость исчезновения триптических фрагментов с кажущимися молекулярными массами 24,0 и 18,5 кДа заметно выше, чем в случае белка дикого типа (рис. 2В). Представленные данные могут означать, что замена R140G сопровождается дестабилизацией структуры белка и способствует гидролизу по остатку R79.

Для малого белка теплового шока HspB1 характерно образование гомоолигомеров, состоящих из разного количества субъединиц с кажущейся молекулярной массой от 600 кДа до 1 мДа [10]. Мы предположили, что анализируемые аминокислотные замены могут влиять на четвертичную структуру белка и исследовали олигомерное состояние HspB1 дикого типа и его мутантных форм несколькими методами. При гель-фильтрации HspB1 WT и его мутантная форма K141Q образуют стабильные олигомеры с кажущейся молекулярной массой ~560 кДа (рис. 3). При нанесении на колонку 30-120 мкг мутантная форма белка G84R элюируется в виде крупных олигомеров с кажущейся молекулярной массой 560-580 кДа. Гель-фильтрация малых количеств мутантной формы G84R приводит к появлению на профиле элюции пика, соответствующего малым олигомерам с кажущейся молекулярной массой 70 кДа. Аналогичные результаты были получены при исследовании мутантного белка с заменой L99M, при этом данный белок более склонен к диссоциации, чем белок с заменой G84R. На профилях элюции мутантного белка с заменой R140G (рис. 3) при любом количестве наносимого на колонку белка видно два асимметричных пика с кажущимися молекулярными массами 450-560 кДа и 70 кДа. Анализируя препараты данного белка, полученные в ходе различных

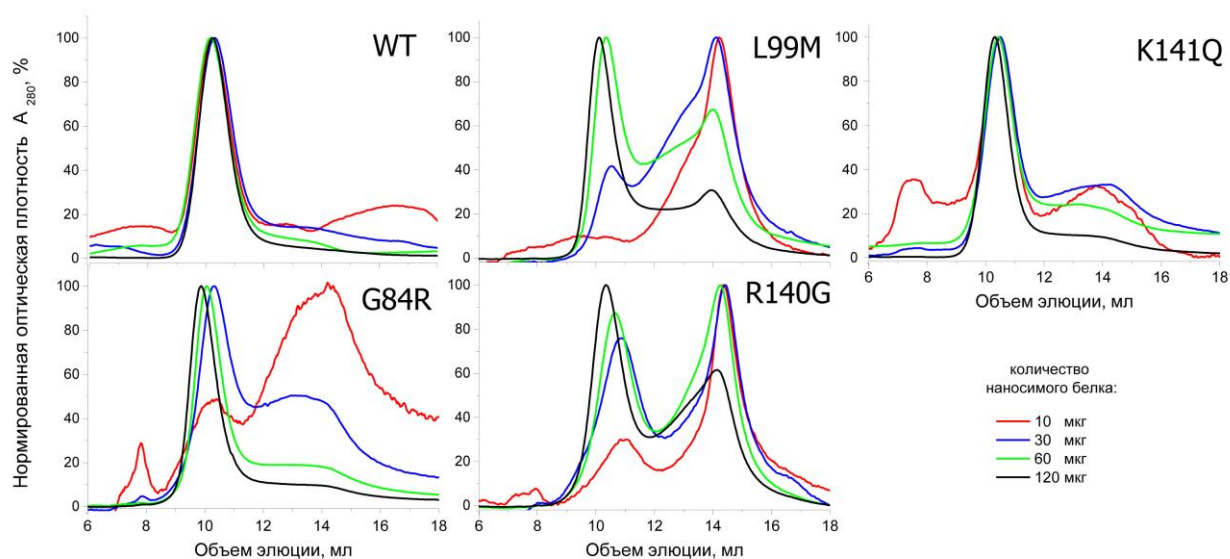


Рис. 3. Гель-фильтрация HspB1 дикого типа (WT) и его мутантных форм. Представлены нормированные профили элюции, полученные при нанесении различных количеств исследуемых белков на колонку Superdex 200 HR 10/30.

выделений, мы обнаружили, что, при сохранении общей формы профиля элюции, соотношение высоко- и низкомолекулярных форм может существенно различаться. Все это свидетельствует о том, что олигомерная структура этого белка крайне нестабильна, и белок может как образовывать олигомеры с большой молекулярной массой (и даже агрегаты, склонные к преципитации на фильтре гель-фильтрационной колонки), так и низкомолекулярные олигомеры.

Коэффициенты седиментации исследуемых белков, определенные методом аналитического ультрацентрифугирования, возрастают в ряду $WT \leq K141Q < L99M < G84R < R140G$. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными методом гель-фильтрации (табл. 1) и подтверждают предположение о склонности мутантной формы R140G к агрегации. Таким образом, было показано, что точечные замены (кроме K141Q) влияют на четвертичную структуру малого белка теплового шока HspB1, при этом наибольшее влияние оказывает замена R140G.

Таблица 1. Четверичная структура HspB1 дикого типа и его мутантных форм.

Белок HspB1	Кажущаяся молекулярная масса, определенная методом гель-фильтрации (кДа)	Коэффициент седиментации (s)
WT	560	19,9
G84R	560-580	26,3
L99M	от 50-70 до 580	22,8
R140G	от 70 до 450-560, агрегаты	32,0
K141Q	560	20,6

Исследование олигомерного состояния HspB1 дикого типа и его мутантной формы с заменой R140G на клеточном уровне проводили методом гель-фильтрации с последующим анализом распределения HspB1 во фракциях методом Western Blotting (рис. 4). Распределение HspB1 по профилю элюции отражает как распределение собственно HspB1 (который может находиться в фосфорилированном (диссоциированном) и в нефосфорилированном (ассоциированном) состоянии), так и распределение комплексов HspB1 с белками-партнерами. При сравнении профилей элюции белка дикого типа и его мутантной формы с точечной заменой R140G видно, что кривая распределения в случае мутантного белка сдвинута в область больших объемов элюции (т.е. меньших молекулярных масс), чем в случае белка дикого типа (рис. 4 А и Б). Кроме того, суммарное количество белка в случае мутантной формы HspB1 было всегда заметно меньше, чем в случае белка дикого типа (данные не приведены). Эти факты могут означать, что часть белка HspB1 R140G склонна к агрегации и задерживается на фильтре гель-фильтрационной колонки, а другая часть представлена в виде олигомеров меньшей молекулярной массы, чем белок дикого типа. Эти данные согласуются с результатами, полученными с использованием рекомбинантных белков *in vitro* (рис. 3).

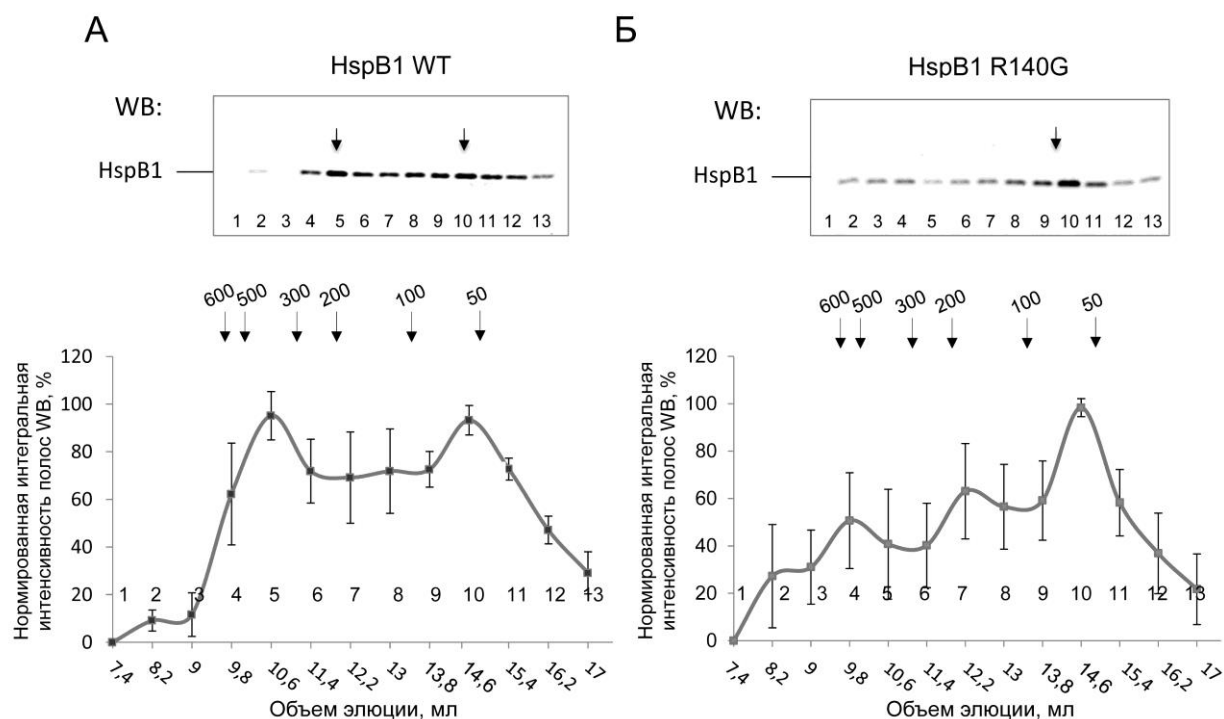


Рис. 4. Анализ распределения HspB1 WT (А) и HspB1 R140G (Б) в клеточных лизатах методом гель-фильтрации на колонке Superdex 200 HR 10/30. Представлены типичные сканы нитроцеллюлозных мембран после детекции HspB1 в отдельных фракциях, полученных в ходе гель-фильтрации (номера фракций указаны под каждым треком). WB – Western Blotting. На двух нижних панелях представлено распределение олигомерных форм исследуемых белков по профилю элюции (на оси абсцисс показаны номера фракций и объемы элюции) с указанием кажущихся молекулярных масс (в кДа, отмечены стрелками сверху). На оси ординат отложены средние значения $\pm$ стандартное отклонение, полученное в восьми независимых экспериментах. За 100% принято значение интегральной плотности полос во фракции с самым высоким содержанием HspB1.

Влияние фосфорилирования на четвертичную структуру мутантных форм HspB1 с заменами G84R и L99M

Ранее Рогалла и соавт. было показано, что фосфорилирование Ser 15, 78 и 82 HspB1 под действием МАРКАР киназы 2 приводит к диссоциации крупных олигомеров этого малого белка теплового шока [11]. Аминокислотные замены G84R и L99M расположены вблизи потенциально фосфорилируемых аминокислотных остатков серина. В этой связи представлялось целесообразным проанализировать влияние фосфорилирования на олигомерную структуру этих белков. Использование метода электрофореза в присутствии мочевины по методу Перрье-Перри позволяет следить за процессом фосфорилирования HspB1 [7]. Нефосфорилированный белок обладает сравнительно низкой электрофоретической подвижностью, а фосфорилирование сопровождается появлением белковых зон, обладающих более высокой электрофоретической подвижностью (см. врезку на рис. 5А). Точечные замены G84R и L99M не сопровождаются уменьшением максимальной степени фосфорилирования, и во всех случаях удается достичь степени фосфорилирования, составляющей 3 моль фосфата на моль белка (данные не представлены). При

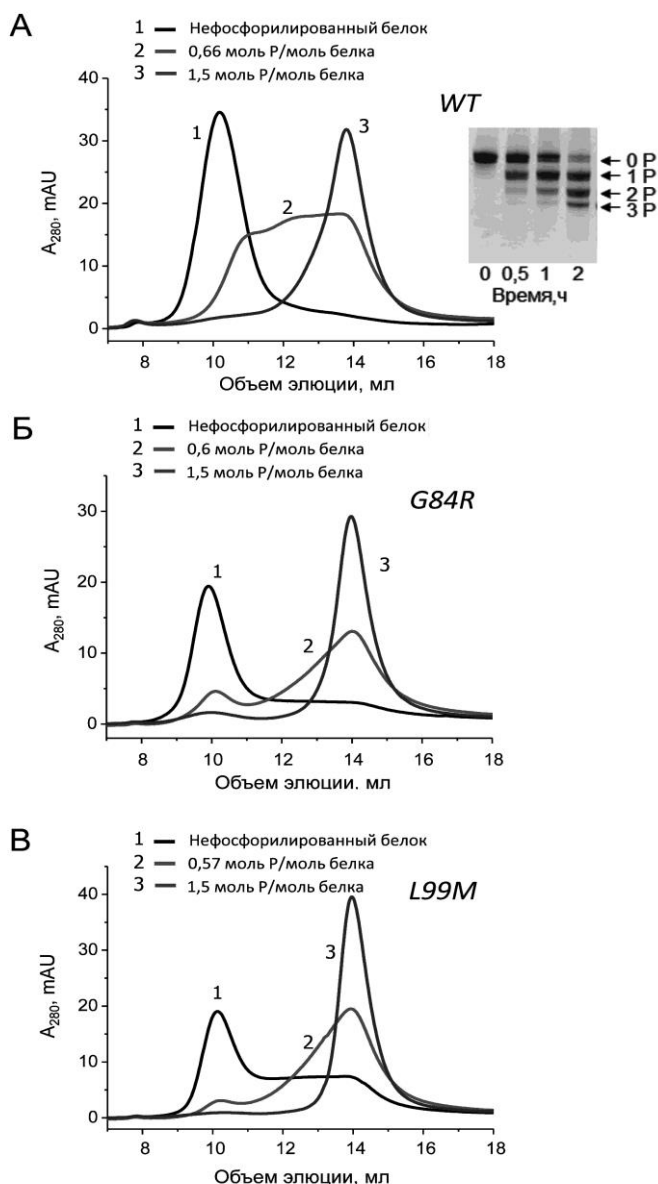


Рис. 5. Гель-фильтрация препаратов HspB1 дикого типа (WT) и белков с заменами G84R и L99M до и после фосфорилирования МАРКАР киназой 2. На панели А во врезке представлен скан геля после электрофореза по методу Перрье-Перри, положение фосфорилированных форм HspB1 указано стрелками. Время фосфорилирования указано под дорожками.

формами. Четвертичная структура белка с заменой R140G очень нестабильна, данный белок может быть представлен, как крупными олигомерами (450-560 кДа), так и олигомерами с малой (~70 кДа) молекулярной массой. Это отличие позволило изучить образование гетероолигомеров между HspB1 WT и мутантной формой с заменой R140G методом гель-фильтрации (рис. 6А) с последующим анализом белкового состава фракций методом электрофореза в присутствии мочевины (рис.

включении 0,6 моль фосфата на моль белка HspB1 дикого типа элюируется при гель-фильтрации в виде широкого пика, в составе которого находятся олигомеры с кажущимися молекулярными массами от 100 до 560 кДа. При такой же степени фосфорилирования (0,6 моль фосфата на моль белка) мутантные формы белка элюируются в основном в виде одиночного асимметричного пика с кажущейся молекулярной массой ~70 кДа (рис. 5Б и В). При высокой степени фосфорилирования (1,5 моль фосфата на моль белка) все анализируемые белки представлены в виде малых олигомеров с кажущейся молекулярной массой около 70 кДа. Представленные данные свидетельствуют о том, что точечные замены G84R и L99M способствуют диссоциации олигомеров HspB1, происходящей даже при очень низких степенях фосфорилирования.

Белок-белковые взаимодействия в гетероолигомерах HspB1 дикого типа и белка с заменой R140G

Для большинства анализируемых аминокислотных замен HspB1 (кроме L99M) характерно аутосомно-доминантное наследование, т.е. в клетках одновременно синтезируются мутантная форма и белок дикого типа [12]. В связи с этим, закономерен вопрос, возможно ли образование гетероолигомеров между белком дикого типа и его мутантными

6Б). Замена аргинина на глицин в белке HspB1 R140G приводит к смещению его изоэлектрической точки в более «кислую» область. Так расчетная pI белка дикого типа составляет 5,98, а белка с заменой R140G – 5,76. Внесения данной замены оказывается достаточным для разделения этих белков методом электрофореза в присутствии мочевины (рис. 6Б). HspB1 дикого типа элюируется в виде единственного пика с кажущейся молекулярной массой 560 кДа (рис. 6А). На профиле элюции изолированного белка с заменой R140G удается выявить 2 пика, с кажущимися молекулярными массами ~600 и 70 кДа. Если эквимольную смесь белка дикого типа и его мутантной формы R140G перед нанесением на колонку предварительно инкубировали при 42° С в течение часа, то на профиле элюции удавалось выявить 2 пика, с кажущимися молекулярными массами ~560-580 и ~70 кДа (рис 6А). По данным электрофореза и белок дикого типа, и мутантная форма присутствуют во всех фракциях профиля элюции (рис. 6Б).

Представленные данные означают, что малые олигомеры белка HspB1 R140G могут взаимодействовать с белком дикого типа и переходить в состав крупных смешанных олигомеров. В свою очередь, взаимодействуя с мутантной формой, белок дикого типа принимает участие в образовании небольших смешанных олигомеров. Суммируя вышесказанное, можно предположить, что, если в клетке одновременно присутствуют оба белка, то мутантная форма может взаимодействовать с белком дикого типа, образуя с ним смешанные комплексы, и таким образом мешать его нормальному функционированию.

В тканях человека одновременно может синтезироваться несколько малых белков теплового шока. Образование гетероолигомеров между мутантными формами HspB1 и белком HspB6 изучали методом гель-фильтрации (данные не приведены). Установлено, что точечные замены G84R, L99M и, особенно, R140G влияют на способность HspB1 взаимодействовать с HspB6. При этом образуются

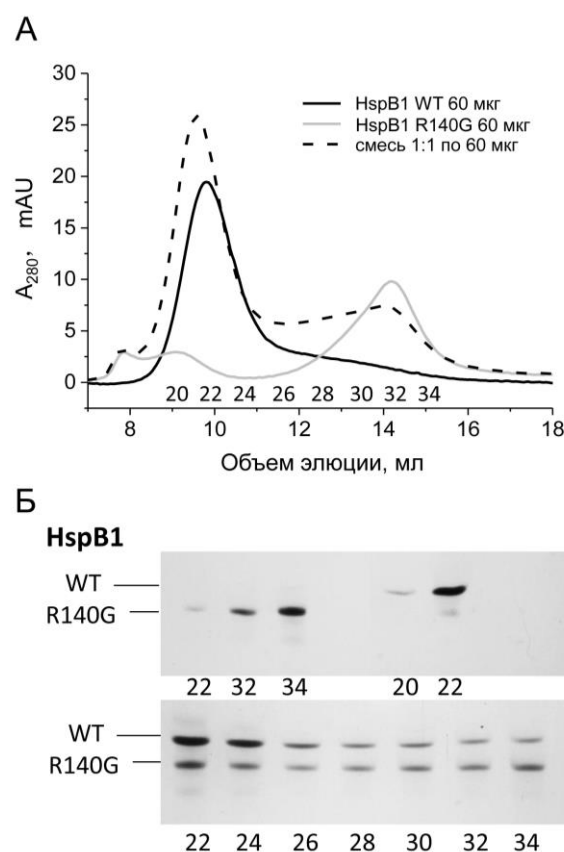


Рис. 6. Образование смешанных олигомеров HspB1 дикого типа (WT) и его мутантной формы R140G. **А.** Профили элюции изолированных белков и их смеси при гель-фильтрации на колонке Superdex 200 HR 10/30. **Б.** Сканы гелей после анализа фракций (панель А) методом электрофореза в присутствии мочевины (по методу Перрье-Перри). Номера дорожек соответствуют номерам фракций на панели А.

гетероолигомеры меньшего размера, чем гетероолигомеры, сформированные HspB1 дикого типа и HspB6.

Исследование шапероноподобной активности мутантных форм малого белка теплового шока HspB1

Для малых белков теплового шока характерно наличие так называемой шапероноподобной активности, т.е. способности предотвращать агрегацию денатурированных белков-субстратов [13]. Шапероноподобную активность малых белков теплового шока исследовали с использованием модельных белков-субстратов, агрегацию которых вызывали различными химическими или физическими воздействиями. Агрегацию лизоцима индуцировали восстановлением дисульфидных связей с помощью ДТТ (рис. 7А, кривая Л-м), а агрегацию S1-фрагмента миозина вызывали нагреванием до 43 °С (рис. 7Б). HspB1 дикого типа задерживал начало процесса агрегации лизоцима, но был не способен полностью предотвратить ее (рис. 7А, кривая WT). Любопытно, что при длительной инкубации HspB1 дикого типа не уменьшал, а даже увеличивал оптическую плотность измеряемой пробы. Это может быть связано с тем, что на ранних этапах HspB1 дикого типа связывается с частично денатурированным лизоцимом и препятствует его агрегации. На более

поздних этапах HspB1 выступает в качестве своеобразного мостика и связывает между собой агрегаты частично денатурированного лизоцима, что способствует дальнейшей агрегации лизоцима и сопровождается увеличением оптической плотности. Аналогичные эффекты были ранее описаны и подробно рассмотрены в литературе [14]. В указанных условиях шапероноподобная активность мутантной формы K141Q была сопоставимой с активностью белка дикого типа (рис. 7, кривая

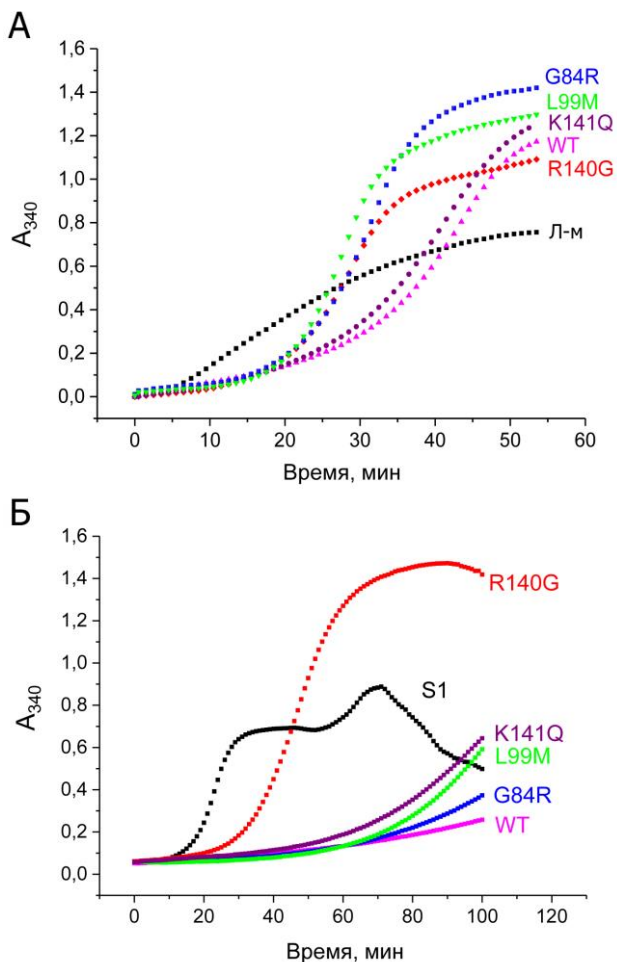


Рис. 7. Шапероноподобная активность HspB1 дикого типа и его мутантных форм с использованием (А) лизоцима (Л-м) или (Б) субфрагмента-1 миозина (S1) в качестве модельных белков-субстратов. Весовое соотношение HspB1/Л-м и HspB1/S1 оставляло 1/2.

K141Q). Шапероноподобная активность всех остальных исследуемых белков была меньше соответствующей активности белка дикого типа (рис. 7А, кривые G84R, L99M, R140G). При нагревании пробы, содержащей изолированный S1, происходит его термическая денатурация, сопровождающаяся агрегацией и увеличением оптической плотности при 340 нм (рис. 7Б, кривая S1). При длительной инкубации происходит дальнейшая агрегация денатурированного белка и его выпадение в осадок, вследствие чего оптическая плотность при 340 нм начинает уменьшаться. Добавление HspB1 дикого типа замедляет процесс термоагрегации S1. Все остальные мутантные формы за исключением R140G также способны замедлять процесс агрегации S1. Белок с заменой R140G обладает минимальной шапероноподобной активностью и в ходе длительной инкубации даже способствует агрегации денатурированного S1. Таким образом, из всех исследуемых мутантных белков наименьшей шапероноподобной активностью обладает мутантная форма белка с заменой R140G. Остальные исследованные белки (с заменами G84R, L99M и K141Q) обладали либо сравнимой, либо несколько пониженной по сравнению с белком дикого типа шапероноподобной активностью.

Возможное влияние анализируемых мутаций на структуру HspB1

Подводя итог первой части работы, можно заключить, что все исследованные аминокислотные замены в той или иной степени влияют на свойства HspB1, а замена R140G вызывает наибольшие изменения свойств. Эта точечная замена приводила с одной стороны к дестабилизации олигомерной структуры, а с другой стороны увеличивала вероятность агрегации исследуемого белка. Для того, чтобы описать молекулярные механизмы, лежащие в основе обнаруженных изменений, мы обратились к профессору С.В. Стрелкову (Католический Университет Левена, Бельгия) с просьбой промоделировать структуру димера α -кристаллиновых доменов HspB1 (на основе кристаллографических данных PDB: 3Q9Q и 2WJ7). Из этой модели следует, что соседние остатки Arg140 и Lys141 повернуты в разные стороны и могут образовывать солевые мостики с остатками Asp129 и Glu126 соседнего мономера, таким образом стабилизируя структуру димера HspB1 (рис. 8). Точечная замена R140G предотвращает образование солевого мостика Asp129-Arg140 и таким образом приводит к дестабилизации межмономерных взаимодействий и общему изменению структуры HspB1. Согласно модели, вклад солевого мостика Lys141-Glu126 в стабилизацию структуры HspB1 менее выражен. Возможно, именно этим обусловлен минимальный эффект, вызываемый точечной заменой K141Q. Эффекты, наблюдаемые при аминокислотной замене G84R, могут быть связаны с изменением подвижности N-концевого домена HspB1 в результате замены маленького незаряженного остатка глицина на объемный заряженный остаток аргинина. Однозначная интерпретация результатов, полученных при точечной замене L99M затруднительна. По данным Барановой и соавт. [2] остаток Leu99 находится в гидрофобном кармане, расположенном поблизости от остатка Arg140 и от межмономерных контактов, образуемых им. Можно предположить, что

незначительные изменения структуры, вызванные заменой одного гидрофобного остатка (лейцина) на другой гидрофобный остаток (метионин), оказываются достаточными для того, чтобы каким-то образом дестабилизировать межсубъединичные контакты. Вследствие этого даже при низкой степени фосфорилирования HspB1 с точечной заменой L99M более склонен к диссоциации, чем белок дикого типа.

Исследовав физико-химические свойства мутантных форм HspB1, мы попытались ответить на вопрос, каким образом анализируемые аминокислотные замены могут приводить к развитию периферических невропатий. Мы предположили, что это может быть связано с влиянием HspB1 (и, возможно, других малых белков теплового шока) на сборку одного из элементов цитоскелета нейронов – нейрофиламентов.

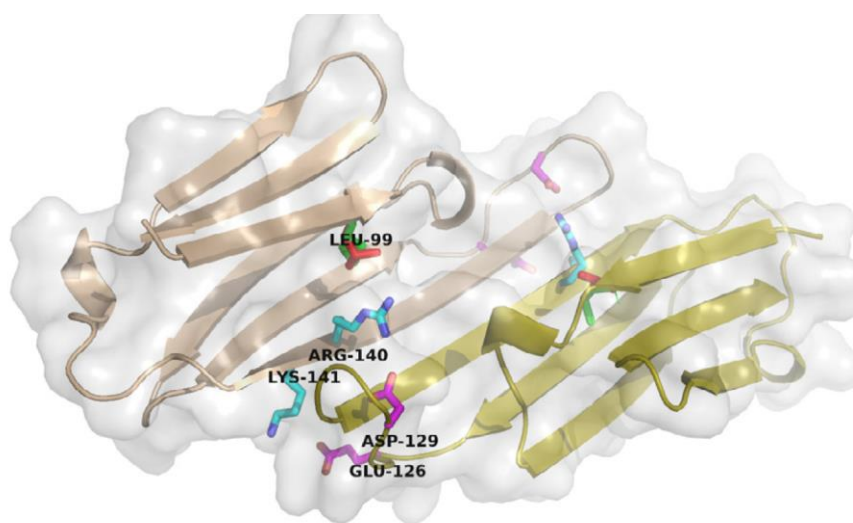


Рис. 8. Модель димера α -кристаллиновых доменов HspB1. Мономеры обозначены желтым и коричневым цветами. Аминокислотные остатки Arg140 и Lys141 обозначены синим цветом, остатки Asp129 и Glu126 обозначены розовым цветом, Leu99 – красным цветом.

Взаимодействие HspB1 и других малых белков теплового шока с белком легкой цепи нейрофиламентов (NFL)

Полимеризация NFL в условиях, приближенных к физиологическим (pH 7,2, 190 mM NaCl), сопровождается образованием коротких филаментов длиной 100-200 нм и диаметром около 10 нм (рис. 9А), осаждающихся при ультрацентрифугировании (рис. 9А, врезка), что согласуется с данными литературы [15]. Если к сформированным филаментам добавляли HspB1 и полученную смесь подвергали ультрацентрифугированию, то осадок нейрофиламентов содержал в своем составе HspB1, при этом при насыщении на 2 моль мономеров NFL приходится 1 моль мономеров HspB1 (данные не представлены). Эти результаты свидетельствуют о том, что HspB1 способен напрямую взаимодействовать с полимеризованными NFL. Полимеризация NFL (методом диализа) в присутствии HspB1 сопровождается значительным увеличением количества белка нейрофиламентов в супернатанте после

высокоскоростного центрифугирования (рис. 9Б). Представленные данные означают, что HspB1 может каким-то образом ингибировать образование филаментов NFL или влияет на их гидродинамические свойства, препятствуя осаждению при ультрацентрифугировании. При использовании другого подхода мы смешивали тетрамеры NFL с HspB1 и его мутантными формами и после смешивания инициировали процесс полимеризации нейрофиламентов повышением ионной силы. Оказалось, что HspB1 и исследуемые мутантные формы (G84R, L99M, R140G и K141Q) ингибировали процесс полимеризации (рис. 9В) и увеличивали количество NFL, остающихся в супернатанте после ультрацентрифугирования (рис. 9В). Хотя количество NFL, остающегося в супернатанте в присутствии HspB1 дикого типа и его мутантных форм, было сравнимым, оказалось, что количество мутантных форм HspB1, детектируемых в осадке NFL было больше, чем количество HspB1 дикого типа, соосаждающегося с NFL (рис. 9В). Эти результаты могут свидетельствовать о том, что мутированные формы HspB1 либо прочнее связываются, либо имеют дополнительные участки связывания на поверхности филамента NFL.

Процесс полимеризации промежуточных филаментов от димеров до зрелых

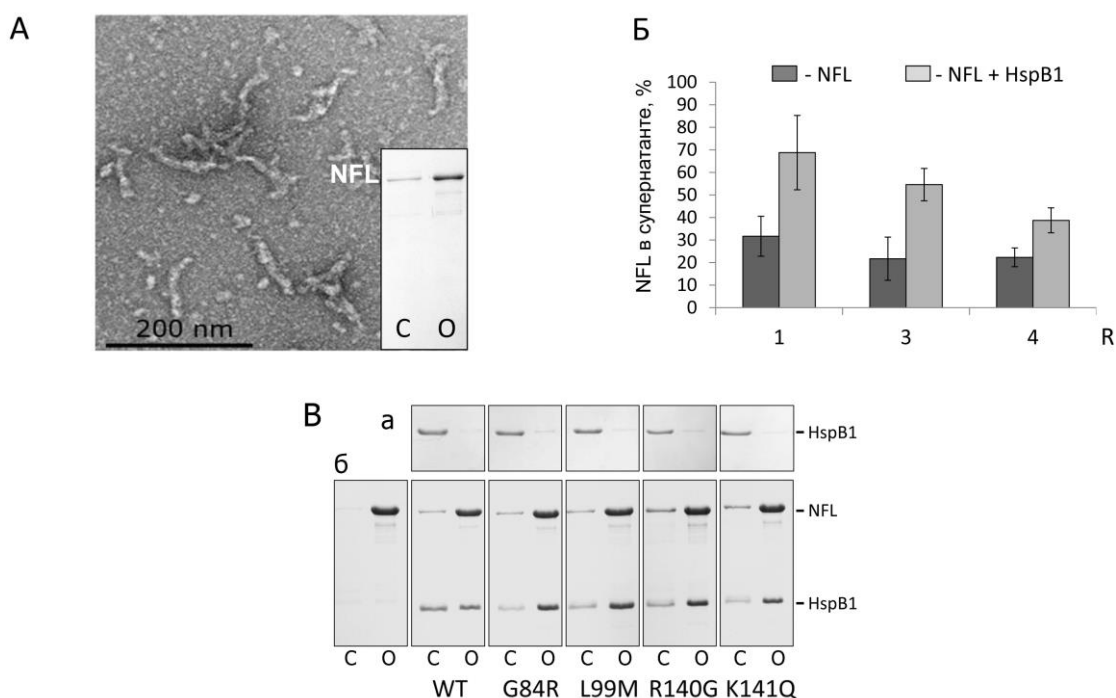


Рис. 9. **А.** Электронная микроскопия филаментов NFL. Во врезке представлены данные электрофореза фракций супернатанта (С) и осадка (О) после ультрацентрифугирования. **Б.** Доля NFL, остающегося в супернатанте после ультрацентрифугирования изолированных филаментов (NFL), и филаментов, полученных в присутствии HspB1 (NFL+HspB1). Концентрация HspB1 во всех пробах 2 μ M, R – молярное отношение NFL/HspB1 в расчете на мономеры белков. **В.** Электрофореграмма образцов, полученных после высокоскоростного центрифугирования (105000g) изолированных (а) HspB1 дикого типа (WT) и его мутантных форм, а также смеси (б) нейрофиламентов с HspB1 дикого типа и мутантными формами. Молярное отношение NFL/sHsp 1/1 (по 11 μ M). С- супернатант, О – осадок.

филаментов проходит в три стадии: очень быстрое образование тетрамеров из димеров, сборка ULF-частиц (Unit Length Filaments), переупаковка субъединиц в составе ULF и удлинение филаментов [16]. Мы исследовали влияние малых белков теплового шока на переход от тетрамеров к более высоко организованным олигомерным структурам NFL. Для этой цели NFL был модифицирован по единственному остатку цистеина (Cys322) пиренилмалеимидом. После удаления избытка метки и перевода белка в раствор с низкой ионной силой был получен препарат модифицированных пиренилмалеимидом тетрамеров NFL (PM-NFL). Такой препарат белка имеет два выраженных максимума флуоресценции мономеров пирена (385 нм и 400 нм) и плечо при 470 нм, соответствующее флуоресценции эксимеров пирена (рис. 10А). Повышение ионной силы приводит к инициации полимеризации, которая сопровождается одновременным увеличением флуоресценции мономеров и уменьшением флуоресценции эксимеров. Для анализа кинетики полимеризации использовали отношение флуоресценции при 385 нм (F_{385}) к флуоресценции при 470 нм (F_{470}). Полимеризация изолированного PM-NFL сопровождается увеличением F_{385}/F_{470} , от 2,9 до 3,9 за 90 мин (рис. 10Б). Если полимеризацию PM-NFL проводили в присутствии HspB1, то измеряемый параметр увеличивался от 2,9 до 3,4 за аналогичное время (рис. 10Б). Эти данные свидетельствуют о том, что HspB1 ингибирует процесс полимеризации NFL. Аналогичные результаты были получены при исследовании мутантных форм HspB1, при этом мутантные формы HspB1 в такой же степени, как и белок дикого типа, ингибировали полимеризацию PM-NFL. На рис. 10Б приведены результаты, полученные с использованием мутантных форм HspB1 R140G и K141Q (для HspB1 G84R и L99M наблюдали аналогичную зависимость).

В связи с тем, что до последнего времени не было данных о взаимодействии различных малых белков теплового шока с NFL, мы проанализировали влияние четырех разных малых белков теплового шока на кинетику полимеризации PM-NFL. Оказалось, что HspB5 (α B-кристаллин) точно также, как HspB1, взаимодействует с NFL, ингибирует их полимеризацию и соосаждается с полимеризованными филаментами (рис. 11). HspB6 и HspB8 менее эффективно ингибируют процесс полимеризации (рис. 11А).

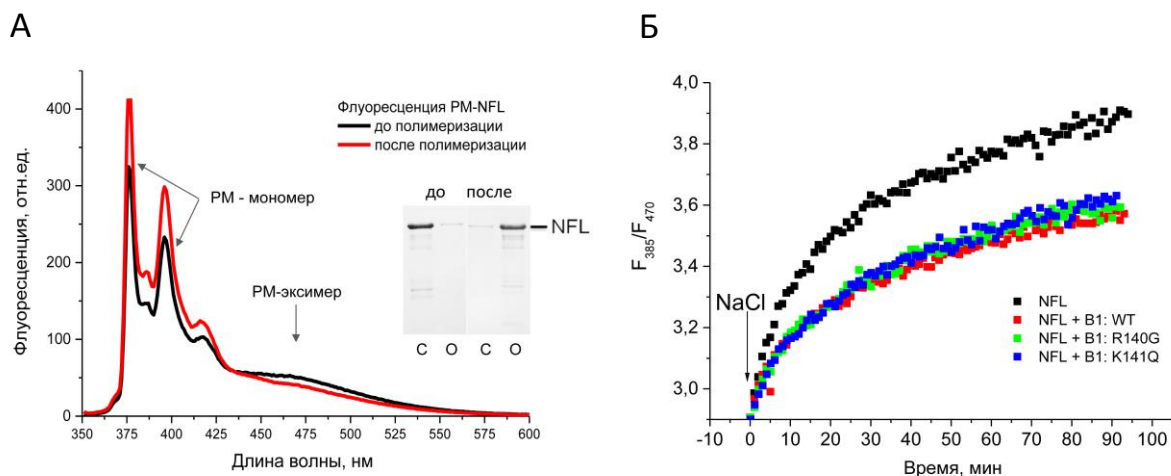


Рис. 10. Полимеризация NFL, модифицированных пиренилмалеимидом. **А.** Спектр флуоресценции PM-NFL до и после полимеризации. Во врезке представлена электрофореграмма фракций супернатанта (С) и осадка (О) после ультрацентрифугирования до и после полимеризации. **Б.** Кинетика полимеризации PM-NFL в присутствии HspB1 дикого типа и его мутантных форм. Молярное соотношение мономеров NFL/sHsp составляло 2/1. Инициация полимеризации, индуцированной NaCl, отмечена стрелкой.

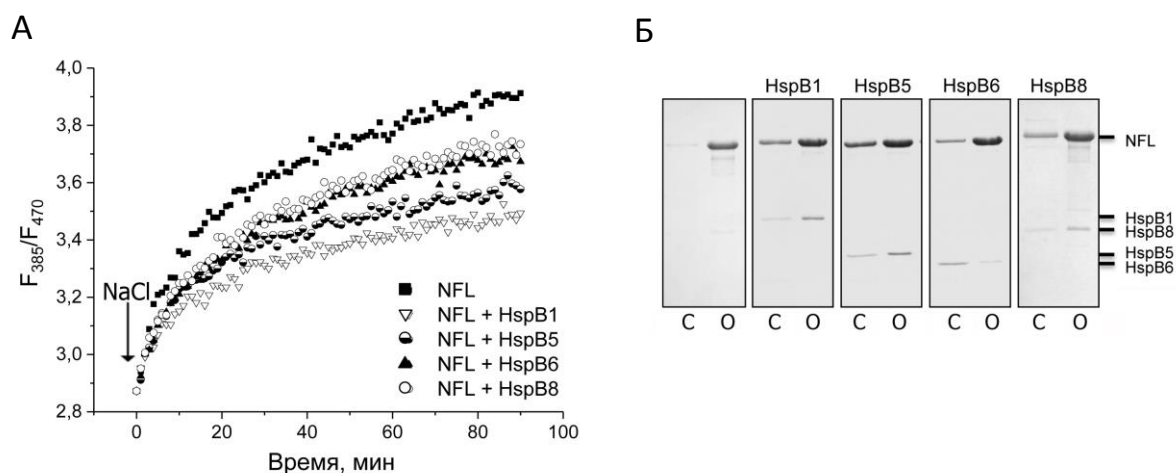


Рис. 11. Взаимодействие различных малых белков теплового шока с NFL. **А.** Кинетика полимеризации PM-NFL в отсутствие и в присутствии различных sHsp. Инициация полимеризации, индуцированной NaCl, отмечена стрелкой. Молярное соотношение NFL/sHsp составляло 2/1. **Б.** Электрофореграмма образцов, полученных после высокоскоростного центрифугирования (105000g) смеси нейрофиламентов с различными малыми белками теплового шока. Молярное соотношение NFL/sHsp составляло 9/1 (18 μ M NFL и 2 μ M sHsp). С – супернатант, О – осадок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы были получены гомогенные препараты рекомбинантного малого белка теплового шока человека HspB1 и четырех мутантных форм этого белка. Использование нескольких методов позволило выявить различия в структуре и свойствах белка дикого типа и его мутантных форм. Было установлено, что точечные замены в α -кристаллиновом домене могут сопровождаться изменениями

структуры HspB1, приводящими к уменьшению термостабильности, дестабилизации межсубъединичных контактов и уменьшению шапероноподобной активности. Мутантная форма HspB1 R140G образует гетероолигомеры с белком дикого типа и, вероятно, таким образом может препятствовать нормальному функционированию HspB1 в клетке. Проверено предположение о том, что малые белки теплового шока влияют на сборку промежуточных филаментов, образуемых белком легкой цепи нейрофиламентов (NFL). Установлено, что HspB1 и его исследуемые мутантные формы, а также HspB5 ингибируют процесс полимеризации NFL. Два других малых белка теплового шока, HspB6 и HspB8 менее эффективны в регуляции полимеризации NFL.

ВЫВОДЫ

1. Точечная аминокислотная замена R140G, затрагивающая консервативный остаток Arg в β 7-складке HspB1, сопровождается уменьшением собственной триптофановой флуоресценции, понижением термостабильности и увеличивает чувствительность HspB1 к протеолизу. Олигомеры белка HspB1 R140G нестабильны, склонны к диссоциации и агрегации. Белки с точечными заменами G84R и L99M образуют олигомеры большего размера, чем белок дикого типа. Указанные замены способствуют диссоциации олигомеров HspB1, индуцированной фосфорилированием MAPKAP киназой 2.
2. Все исследованные мутантные формы образуют гетероолигомеры с малым белком теплового шока HspB6, размеры которых меньше гетероолигомеров, образованных HspB1 дикого типа и HspB6.
3. Точечная замена R140G приводит к значительному, а замены G84R и L99M к незначительному уменьшению шапероноподобной активности HspB1, измеренной *in vitro*.
4. Малый белок теплового шока HspB1 взаимодействует с белком легкой цепи нейрофиламентов, ингибируя его полимеризацию. Аминокислотные замены в α -кристаллиновом домене не влияют на способность HspB1 ингибировать полимеризацию легкой цепи нейрофиламентов. α B-кристаллин (HspB5) также взаимодействует с белком легкой цепи нейрофиламентов и ингибирует его полимеризацию. Другие малые белки теплового шока (HspB6 и HspB8) менее эффективны в регуляции полимеризации белка нейрофиламентов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Дацкевич П.Н., **Нефёдова В.В.**, Судницына М.В., Гусев Н.Б. (2012) Мутации малых белков теплового шока и наследственные заболевания человека. *Биохимия* 77(13): 1500-1514.
2. **Nefedova V.V.**, Datskevich P.N., Sudnitsyna M.V., Strelkov S.V., Gusev N.B. (2013) Physico-chemical properties of R140G and K141Q mutants of human small heat shock protein HspB1 associated with hereditary peripheral neuropathies. *Biochimie* 95 (8):1582-1592.
3. **Nefedova V.V.**, Sudnitsyna M.V., Strelkov S.V., Gusev N.B. (2013) Structure and properties of G84R and L99M mutants of human small heat shock protein HspB1 correlating with motor neuropathy. *Arch. Biochem. Biophys.* 538(1):16-24.
4. **Нефёдова В.В.**, Муранова Л.К., Судницына М.В., Рыжавская А.С., Гусев Н.Б. (2015) Малые белки теплового шока и дистальные наследственные невропатии. *Биохимия* 80(13): 1734-1747.
5. **Nefedova V.V.**, Sudnitsyna M.V., Gusev N.B. (2017) Interaction of small heat shock proteins with light component of neurofilaments (NFL). *Cell Stress Chaperones* 22(4): 467-479.

Тезисы докладов

1. **Нефёдова В.В.**, Судницына М.В., Дацкевич П.Н. Структура и свойства мутантов R140G и K141Q малого белка теплового шока HspB1, экспрессируемых при различных формах нейропатий человека. Тезисы докладов XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2013», с.50-51, Москва.
2. **Нефёдова В.В.**, Судницына М.В. Влияние точечных мутаций G84R и L99M на структуру и свойства малого белка теплового шока HspB1. Тезисы докладов XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014», с.61-62, Москва.
3. **Нефёдова В.В.**, Судницына М.В., Гусев Н.Б. Влияние точечных мутаций в α -кристаллиновом домене на структуру и свойства малого белка теплового шока (2015) Материалы VII Российского симпозиума «Белки и пептиды», стр. 279, Новосибирск.
4. **Нефёдова В.В.** Взаимодействие малых белков теплового шока с легкой цепью нейрофиламентов. (2016) Сборник тезисов XXVIII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии, Институт Биоорганической Химии РАН», стр. 62, Москва.
5. **Нефёдова В.В.**, Судницына М.В., Гусев Н.Б. Влияние малых белков теплового шока на полимеризацию легких цепей нейрофиламентов. (2016) Сборник научных

трудов V Съезд физиологов СНГ и V Съезд Биохимиков России, *ActaNaturae*, Спецвыпуск т.2, стр. 64, Сочи.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mymrikov, E.V., et al., *Physiol. Rev.*, 2011. **91**(4): p. 1123-59.
2. Baranova, E.V., et al., *J. Mol. Biol.*, 2011. **411**(1): p. 110-22.
3. Braun, N., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011. **108**(51): p. 20491-6.
4. Jehle, S., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011. **108**(16): p. 6409-14.
5. Benndorf, R., et al., *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2014. **761**: p. 15-30.
6. Pareyson, D., et al., *Lancet Neurol*, 2009. **8**(7): p. 654-67.
7. Perrie, W.T., et al., *Biochem J*, 1970. **119**(1): p. 31-8.
8. Lebowitz, J., et al., *Protein science : a publication of the Protein Society*, 2002. **11**(9): p. 2067-79.
9. Baranova, E.V., et al., *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2009. **65**(Pt 12): p. 1277-81.
10. Rogalla, T., et al., *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**(27): p. 18947-56.
11. Landry, J., et al., *J Biol Chem*, 1992. **267**(2): p. 794-803.
12. Houlden, H., et al., *Neurology*, 2008. **71**(21): p. 1660-8.
13. Mymrikov, E.V., et al., *J. Biol. Chem.*, 2017. **292**(2): p. 672-684.
14. Bumagina, Z., et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2010. **11**(11): p. 4556-79.
15. Heins, S., et al., *J. Cell Biol.*, 1993. **123**(6 Pt 1): p. 1517-33.
16. Herrmann, H., et al., *J. Mol. Biol.*, 1999. **286**(5): p. 1403-20.